

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380065

研究課題名(和文) プロバイオティクスの免疫調節機能とその食品成分による増強効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of immunomodulatory function of probiotics and its enhancement with food factors

研究代表者

戸塚 護 (Totsuka, Mamoru)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70227601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロバイオティクスの免疫調節作用およびその効果を相乗的に増強する食品成分の働きについて解析した。食肉・魚肉などに多く含まれるジペプチドであるカルノシンを経口投与したマウスでは、腸内細菌の存在下で腸管IgA産生が増強した。Lactococcus lactis C59株の経口投与は経口免疫寛容誘導を増強した。この効果は制御性T細胞を誘導する活性をもつフラボノイドであるナリンゲニンの同時経口投与で増強された。in vitro分化誘導系において、新たに制御性T細胞、制御性B細胞を誘導する機能を示すフラボノイドを同定した。

研究成果の概要(英文)：Immunomodulatory function of probiotics and its enhancement with food factors were investigated. When carnosine, a dipeptide contained abundantly in meat and fish meat, was orally administered to mice, intestinal IgA production was enhanced only in the presence of gut microbiota. Oral administration of live Lactococcus lactis C59 cells enhanced the induction of oral tolerance. The enhancing effect was up-regulated when narigenin, a flavonoid with a regulatory T cell enhancing activity, was orally administered with the probiotic C59. In vitro analyses using murine lymphocytes newly identified flavonoids which enhance the differentiation and/or activity of regulatory T cells or regulatory B cells.

研究分野：食品免疫学・食品機能科学

キーワード：乳酸菌 制御性T細胞 IgA抗体 フィトケミカル カルノシン 制御性B細胞 経口免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) プロバイオティクスの免疫調節機能

ビフィズ菌や乳酸菌などのプロバイオティクスが免疫応答を調節する機能を有することが明らかにされているが、疾患に対するプロバイオティクスの効果は不安定であり、効果なしとする研究結果も報告されている。菌株ごとに効果が異なること、人種や個人の遺伝的要因、生活環境の違いなどの多数の変動要因が関係していることが原因と考えられる。

一方、研究レベルにおいても、その機能を担う物質の同定に至った例は少なく、作用機構についても未解明な点が多い。死菌体より生菌の方が効果が高い傾向があり、単一菌株の投与よりむしろ複数の菌株を同時に投与することで高い抗炎症および抗アレルギー効果が得られること (Kwon, H.-K. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2010) や、無菌マウスに 46 菌株の Clostridium 属細菌をまとめて定着させた場合に制御性 T 細胞 (Treg) が効果的に誘導されることも報告されている (Atarashi, K. et al., Science, 2011)。これらの研究はいずれも活性成分の同定には至っていないが、菌間の相互作用で産生される物質や代謝産物などプラスαの因子が活性に関与していることが強く示唆される。これらのことを食品科学的観点からみた場合、食品関連成分がプロバイオティクスの効果をより高める働きをもつプラスαの因子として機能する可能性も十分あるという発想に至った。

### (2) 食品因子による腸管上皮細胞の免疫制御機能の修飾

腸管上皮細胞 (IEC) はタイトジャンクションを介して物理的バリアを形成するとともに、各種サイトカインの産生や腸管腔への IgA 輸送などにより、腸管免疫系の制御に重要な役割を果たしている。著者らは、これまでにヒト IEC 株 Caco2 細胞や、マウス小腸 IEC の初代培養系の構築、マウス腸管組織培養系の確立、マウス小腸および大腸 IEC 培養株の樹立を行い、IEC の免疫調節機能の解析を行うための実験系を確立してきた。これらの実験系を用いて、ビフィズ菌体 (*B. bifidum* OLL6378 株) が IEC の IgA 輸送を担う多量体免疫グロブリンレセプター (pIgR) の発現を増強すること、また同菌体で刺激したマウス小腸 IEC 株の培養上清が、粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生を増強することを明らかにしてきた。また、ヒト IEC 株 Caco-2 細胞を用いて、各種食品由来成分による IL-8 産生の抑制作用についても解析してきた。

### (3) 食品因子による制御性 T 細胞の分化誘導促進作用

過剰な免疫応答を抑制する働きをもつ Treg は、プロバイオティクスの抗アレルギー効果において主要な働きをしていると考えられる。著者らは、卵白アルブミンをマウス

に経口投与して経口免疫寛容を誘導する実験系において、乳酸菌 (*Lactobacillus gasseri* OLL2809 株) の経口投与が経口免疫寛容誘導を増強するように働くこと、この時制御性 T 細胞の誘導が強化されていることを明らかにしている。一方、*in vitro* 実験で Treg の分化誘導を促進する食品成分を検索したところ、柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンゲニンにその促進活性があることを見いだした。植物由来食品因子が Treg を誘導する活性をもつことを明らかにした例は、これまで国内外において報告がない。

## 2. 研究の目的

プロバイオティクスの免疫調節機構には、菌体構成成分だけではなく、細菌の代謝産物などプラスαの因子が重要な働きをしていると考えられる。食品中にもこのプラスαの働きをする因子の存在が予想される。本研究では、主に腸管粘膜免疫応答の強化機能、Treg の分化誘導機能を対象として、プロバイオティクスの免疫調節効果と相乗的にその効果を増強する食品成分の働きについて解析する。その作用メカニズムの解析を通じて、プロバイオティクスおよび各種食品由来因子の免疫調節機能の分子基盤を明らかにするとともに、免疫調節において効果的な食品摂取の組み合わせという概念の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) カルノシンの経口投与が粘膜 IgA 産生に与える効果

0.5%カルノシンを含む飲水を BALB/c マウスに 2 週間自由摂取させた後、小腸粘膜中の IgA 量を ELISA 法にて測定した。この時、鼻腔洗浄液 (NALF) 中の IgA 量も同様に測定した。また、小腸粘膜固有層リンパ球を単離し、IgA 産生細胞、その他の免疫関連細胞の変化をフローサイトメトリーにより解析した。カルノシンの IgA 産生亢進効果における腸内細菌の影響を検討するため、抗生物質をあらかじめ投与して腸内細菌を除去したマウスにカルノシンを経口投与した際の腸管 IgA 産生、IgA 産生 B 細胞、およびその他の免疫関連細胞の変化を、ELISA 法、フローサイトメトリーを用いて解析した。

インフルエンザウイルス感染モデルマウスに 0.5%カルノシンを含む飲水を自由摂取させ、体重変化および感染 4 日後の NALF、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のウイルス感染価について調べた。また、カルノシンのアジュバント効果について、インフルエンザウイルスワクチンとともにカルノシンをマウスに経鼻投与し、NALF、BALF、血清中の抗インフルエンザウイルス IgA、IgG 抗体量を調べた。

### (2) ダイゼインがヘルパー T 細胞の機能分化に与える効果

BALB/c マウス脾臓由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3ε抗体と抗 CD28 抗体刺激を加え、

ダイゼインの存在下あるいは非存在下で培養した。インターフェロン (IFN- $\gamma$ ) およびインターロイキン 4 (IL-4) の産生を ELISA 法で、Th1/Th2 に特異的な転写因子の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で解析した。

(3) *Lactococcus lactis* C59 株の免疫調節作用  
卵白アルブミン (OVA) 特異的な T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスに 20%OVA 水を自由摂取させて経口免疫寛容を誘導させる系において、*Lactococcus lactis* C59 株生菌体の経口投与の効果を解析した。すなわち、抗原に対する脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖応答、IL-2 産生応答、他の T 細胞の抗原応答に対する抑制活性を解析した。この時の脾臓および腸管免疫組織由来 T 細胞のサイトカイン産生の解析も行った。C59 から莢膜多糖 (CPS) を調製し、上記と同じ実験系において強制胃内投与した場合の効果を解析した。

(4) ナリンゲニンの免疫調節作用

上記 (3) と同じ実験系において、*in vitro* での Treg 誘導活性が示されているナリンゲニンの強制胃内投与が経口免疫寛容誘導に与える影響を解析した。また、*Lactobacillus gasseri* OLL2809 株 (LG2809) あるいは C59 とナリンゲニンを同時に経口投与した場合の効果についても検討した。

(5) 制御性 T 細胞を誘導する植物化学成分の探索

BALB/c マウス脾臓から抗原未感作 (ナイーブ) CD4<sup>+</sup>T 細胞を調製し、の *in vitro* 分化誘導系において、各種食品成分を添加して分化誘導した。その T 細胞の Foxp3 分子の発現をフローサイトメトリーで解析し、他の T 細胞応答を抑制する機能をもつかどうかを解析した。また、その T 細胞のサイトカイン産生、制御性 T 細胞マーカーの発現を解析した。

(6) 制御性 B 細胞を誘導する植物化学成分の探索

C57BL6/J マウス脾臓から B 細胞を調製し、リポ多糖の存在下、各種フラボノイドを添加し、48 時間培養した。その培養上清中に含まれる IL-10 量を ELISA 法により測定した。

#### 4. 研究成果

(1) カルノシンの経口投与が粘膜 IgA 産生に与える効果

0.5%カルノシンを含む飲用水を 2 週間自由摂取させた BALB/c マウス小腸粘膜において IgA 量が有意に増加した。この時粘膜固有層リンパ球において IgA 産生形質細胞の割合も有意に増加した。このことから、カルノシンが腸管粘膜免疫を増強することが示唆された。*in vitro* 実験において、カルノシンは菌体成分で刺激した腸管上皮細胞の IL-6 産生を亢進させる効果が認められており、この

培養上清が腸管粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生を増強させることが示されている。そこでカルノシンの腸管 IgA 産生増強効果に対する腸内細菌の関与を検討するため、抗生物質を経口投与し腸内細菌を大きく減少させた BALB/c マウスに、0.5%カルノシン含有水を自由摂取により 2 週間経口投与した。この場合には小腸粘膜 IgA 抗体量の増加が観察されなかったことから、カルノシンは腸内細菌とともに腸管に作用する、あるいは腸内細菌叢の変化を介して IgA 産生増強することが示唆された。

0.5%カルノシンを含む飲用水を 2 週間自由摂取させた BALB/c マウスでは鼻腔洗浄液中の IgA 抗体量が増加する傾向が観察された。同様にカルノシンを投与しインフルエンザウイルスを感染させたマウスで体重変化および感染 4 日後の鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液中のウイルス感染価について調べた結果、ともにカルノシン投与による変化は観察されず、感染防御亢進効果は認められなかった。インフルエンザウイルスワクチンとともにカルノシンをマウスに経鼻投与し、抗インフルエンザウイルス IgA、IgG 抗体量を調べたところ、血清中抗インフルエンザウイルス IgG 抗体量が増加する傾向が示された。経口投与した場合に腸管における IgA 抗体産生は増加するが鼻腔での感染防御亢進効果がないことを考えると、カルノシンの免疫増強効果は主に投与した局所で起こることが示唆された。

(2) ダイゼインがヘルパー T 細胞の機能分化に与える効果

大豆イソフラボンの 1 つであるダイゼインが抗原未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞の Th2 への機能分化に及ぼす影響を解析した。ダイゼイン存在下で刺激した抗原未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞では、IFN- $\gamma$  産生には変化が見られないのに対して IL-4 産生が著しく低下した。また、Th2 特異的な転写因子である GATA-3 の発現低下、Th1 特異的な転写因子である T-bet の発現増加が認められた。このことより、ダイゼインは抗原未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-4 産生を抑制する事により Th2 への分化を抑制し、Th1 への分化を促進する事が示唆された。

(3) *Lactococcus lactis* C59 株の免疫調節作用

C59 株生菌体の経口投与で、経口免疫寛容誘導の指標となる CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖応答、IL-2 産生量が共に低下したことから、C59 経口投与は経口免疫寛容を強化することが示唆された。*Lactobacillus gasseri* OLL2809 株の経口投与が TGF- $\beta$  産生の低下、IL-10 産生の増加を示したのに対し、C59 経口投与では TGF- $\beta$  産生量の低下は認められず、IL-10 産生が低下した。C59 は LG2809 とは異なったメカニズムで経口免疫寛容を強化することが示唆された。C59 から莢膜多糖 (CPS) を精製し、その免疫調節作用を検討した。CPS の経口投与によって経口免疫寛容誘導が強化されることが示されたことから、C59

の免疫調節作用は少なくともその一部は CPS によるものであることが示唆された。

#### (4) ナリンゲニンの免疫調節作用

*in vitro* において制御性 T 細胞を誘導する活性が明らかにされているナリンゲニンが経口免疫寛容誘導に与える影響について、DO11.10 マウスに卵白アルブミン (OVA) 含有水を自由摂取させて経口免疫寛容を誘導するモデルを用いて解析した。ナリンゲニン経口投与群では、対照群と比較して T 細胞の増殖応答、サイトカイン産生、制御性 T 細胞 (Treg) 誘導に有意な差は認められなかった。一方、経口免疫寛容誘導を増強する効果をもつ C59 株の生菌体とナリンゲニンを同時に経口投与した群では、C59 単独投与群と比較してさらに T 細胞の増殖応答、IL-2 産生量の低下が認められ、同時投与群でのみ制御性 T 細胞の誘導の増強が観察された。これらの結果から C59 株とナリンゲニンが相加的あるいは相乗的に働いて経口免疫寛容誘導を強化することが示された。

#### (5) 制御性 T 細胞を誘導する植物化学成分の探索

マウスナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Treg への分化を誘導・促進する植物由来食品因子を探索したところ、エリオジクチオールが TGF- $\beta$  添加の有無に関わらず、Treg 誘導のマスター転写因子である Foxp3 発現を誘導し、他の T 細胞の増殖を抑制する活性を誘導することが示された。

#### (6) 制御性 B 細胞を誘導する植物化学成分の探索

免疫抑制機能をもつ制御性 B 細胞 (Breg) の分化誘導・活性化に関する植物由来食品因子の探索を行った。マウス脾臓由来 B 細胞をリポ多糖 (LPS) による刺激の存在下、11 種類のフラボノイドを添加して培養し、IL-10 産生に与える影響を解析した。既に IL-10 産生増強効果を明らかにしたフラボノール類のケンフェロール、タマリキセチンに加えて、フラボン類のアピゲニン、クリシンも IL-10 産生増強効果を示した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Hiroshi Akiyama, Shigeru Katayama, Tomomasa Kanda, Mari

Maeda-Yamamoto, Mamoru Totsuka, Shingo Takahashi, Toshihiko Shoji, Takahiro Inakuma, Soichiro

Nakamura, Prevention of allergic disease development and symptoms by food factors, *Current Pharmaceutical Design*, 20, 892-905 (2014).

<http://dx.doi.org/10.2174/13816128113199990039>

Ryo Hatano, Kiyoshi Yamada, Taku Iwamoto, Nana Maeda, Tetsuro Emoto, Makoto Shimizu and Mamoru Totsuka, Antigen presentation by small

intestinal epithelial cells uniquely enhances IFN- $\gamma$  secretion from CD4<sup>+</sup> intestinal intraepithelial lymphocytes *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(4), 592-596 (2013).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.024>

〔学会発表〕(計 23 件)

戸塚護、ファイトケミカルによる制御性 T/B 細胞の分化制御、日本食品免疫学会第 10 回学術大会シンポジウム 2 「食品による免疫機能の回復と健康」、2014 年 10 月 17 日、「東京大学伊藤謝恩ホール(東京都・文京区)」

堀内準矢、葉鎮豪、清水誠、戸塚護、フラボノイド類が制御性 B 細胞の IL-10 産生に与える影響、日本食品免疫学会第 10 回学術大会、2014 年 10 月 17 日、「東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)」

西田実紗、青木一吉田綾子、鈴木チセ、薩秀夫、清水誠、戸塚護、*Lactococcus lactis* C59 株とナリンゲニンの同時経口投与による経口免疫寛容誘導の強化、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27 日-30 日、明治大学生田校舎(神奈川県・川崎市)

Chenhao YEH, Junya HORIUCHI, Hideo SATSU, Makoto SHIMIZU, Mamoru TOTSUKA, Oral administration of kaempferol induces IL-10-producing regulatory B cell population and inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27 日-30 日、明治大学生田校舎(神奈川県・川崎市)

戸塚護、食品成分による T 細胞・B 細胞機能分化の制御、日本農芸化学会関東支部 2013 年度第 2 回支部例会シンポジウム「食品機能研究の最前線」、2014 年 2 月 1 日、「東京農工大学農学部講堂(東京都・府中市)」

Chen-Hao Yeh, Marc Veldhoen and Mamoru Totsuka, Aryl hydrocarbon receptor deficiency induces regulatory B cell population with IL-10 and IL-27 production、第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 11 日-13 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Mamoru Totsuka, Modulation of T-cell and B-cell functions by dietary polyphenols、2013 Annual Conference of the Korean Society of Nutrition "Inflammation and Nutrition" Session

5 “Immunity and Inflammation”, 2013年11月8日, 「Seoul ( Korea )」

西田実紗、青木 - 吉田綾子、鈴木チセ、清水誠、戸塚護、*Lactococcus lactis* C59株の経口投与による経口免疫寛容誘導の強化、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013年3月24日-28日、「東北大学(宮城県・仙台市)」

内田順也、清水誠、戸塚護、カルノシン経口投与による小腸粘膜におけるIgA産生亢進効果、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013年3月24日-28日、「東北大学(宮城県・仙台市)」

石原惟志、ベ ミンジョン、清水誠、戸塚護、ダイゼインによる2型ヘルパーT細胞(Th2)への機能分化の抑制、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013年3月24日-28日、「東北大学(宮城県・仙台市)」

西田実紗、吉田綾子、鈴木チセ、清水誠、戸塚護、経口免疫寛容誘導における乳酸菌およびナリングニン経口投与の効果、日本食品免疫学会第9回学術大会、2013年10月17日-18日、「東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)」

内田順也、清水誠、戸塚護、カルノシン経口投与による粘膜免疫応答の増強効果、日本食品免疫学会第9回学術大会、2013年10月17日-18日、「東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)」

戸塚護、乳酸菌による腸管免疫応答の調節、JBA 発酵と代謝研究会シンポジウム「乳酸菌研究の新たなる道標 - 基盤研究、食、健康、ものづくり」、2012年9月12日、「東京大学中島董一郎記念ホール(東京都・文京区)」

〔図書〕(計 1 件)

牛乳と健康-わが国における研究の軌跡と将来展望(牛乳乳製品健康科学会議総説集)(編集:牛乳乳製品健康科学会議、一般社団法人Jミルク)ライフサイエンス出版社、p.212-218 (2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸塚 護 (TOTSUKA, Mamoru)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
准教授  
研究者番号: 70227601