

博士論文

乳酸菌が産生する新規機能性物質に関する基礎的研究

2018年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

海切 弘子

## 目次

略記	1
第1章 緒言	3
1.1 腸内細菌叢	3
1.2 乳酸菌が産生する機能性物質	3
1.2.1 HYA	
1.2.2 EPS	
1.3 皮膚	4
1.3.1 皮膚の構造	
1.3.2 皮膚バリア	
1.4 アトピー性皮膚炎	6
1.5 炎症性腸疾患と腸管バリア	6
1.6 本研究の目的および本論文の構成	7
第2章 腸内細菌代謝産物 HYA のアトピー性皮膚炎抑制作用	12
2.1 目的	12
2.2 材料および方法	12
2.2.1 腸内細菌代謝産物	
2.2.2 動物実験および飼育方法	
2.2.3 皮膚症状のスコアリング	
2.2.4 HE 染色とトルイジンブルー染色	
2.2.5 定量 RT-PCR	
2.2.6 蛍光免疫染色法による TJ タンパク質の局在および NFκ-B p65 リン酸化の解析	
2.2.7 ウェスタンブロット法による TJ タンパク質発現の測定	
2.2.8 統計処理	
2.3 結果	15
2.3.1 NC/Nga マウスのクリニカルスコア	

2.3.2	血清中 IgE 濃度	
2.3.3	皮膚 HE 染色とトルイジンブルー染色	
2.3.4	炎症性サイトカイン遺伝子発現	
2.3.5	NFκ-B p65 のリン酸化評価	
2.3.6	皮膚におけるタイトジャンクション遺伝子発現とタンパク質発現	
2.4	考察とまとめ	17
第 3 章 腸内細菌代謝産物 HYA の及ぼす腸内環境への影響		24
3.1	目的	24
3.2	材料および方法	24
3.2.1	パイエル板における遺伝子発現	
3.2.2	糞便中の IgA の測定	
3.2.3	PCR-DGGE(変性剤濃度勾配ゲル)	
3.3	結果	25
3.3.1	パイエル板における IFN-γ 産生と T-bet 遺伝子発現	
3.3.2	IgA 産生	
3.3.3	腸内細菌叢	
3.4	考察とまとめ	26
第 4 章 EPS 摂取による炎症性腸疾患への影響		31
4.1	目的	31
4.2	材料および方法	31
4.2.1	飼料	
4.2.2	動物実験および飼育方法	
4.2.3	大腸炎の病態評価	
4.2.4	血中 LBP 濃度の測定	
4.2.5	腸管 TJ タンパク質発現	
4.2.6	リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量の測定	
4.2.7	好中球の解析	
4.2.8	糞中有機酸の解析	

4.2.9	EPS によるリガンド活性の解析	
4.2.10	統計処理	
4.3	結果	35
4.3.1	大腸炎の病態評価	
4.3.2	血中 LBP 濃度	
4.3.3	消化管バリア機能の評価	
4.3.4	消化管組織炎症の評価	
4.3.5	好中球浸潤の評価	
4.3.6	糞中の有機酸	
4.3.7	TLR2 リガンド活性	
4.4	考察とまとめ	37
第 5 章	総括	55
参考文献		57
謝辞		62

略記

AD; atopic dermatitis

BSA; bovine albumin

CD; Crohn's Disease

CLA; conjugated linoleic acid

CLDN; claudin

DAI; disease activity index

DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DF; dietary fiber

DGGE; denaturing gradient gel electrophoresis

DSS; dextran sulfate sodium

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

EPS; exopolysaccharide

FBS; fetal bovine serum

GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HE; hematoxylin eosin

HYA; 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid

IBD; inflammatory bowel disease

IFN; interferon

Ig; immunoglobulin

IL; interleukin

LBP; lipopolysaccharide-binding protein

NF- $\kappa$ B; nuclear factor-kappa B

Mcpt1; mast cell protease 1

OCLN; occludin

PBS; phosphate buffered saline

PFA; paraformaldehyde

PUFA; polyunsaturated fatty acid

SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SEM; standard error of the mean

SG; stratum granulosum, granule layer

SCFA; short chain fatty acid

SPF; specific pathogen free

TBST; tris-buffered saline tween 20

TGF; transforming growth factor

Th; helper T

TJ; tight junction

TLR; Toll-like receptor

TNF; tumor necrosis factor

TNFR; tumor necrosis factor receptor

Treg; regulatory T

UC; ulcerative colitis

ZO; zonula occludens

## 第1章 緒言

### 1.1 腸内細菌叢

ヒトの腸管には、およそ 500~1,000 種類、100 兆個以上の腸内細菌が生息している。特に大腸は、腸内細菌の増殖に非常に適した環境であり、腸内細菌が  $10^{11}$ /mL も生息している。腸内細菌は互いに影響し合いながら一定の細菌数バランスを保つことで、腸内細菌叢を形成し、食物繊維などを発酵分解し代謝産物を産生している。この恒常性を維持することは難治性疾患を予防するために重要である。腸内細菌叢とアトピー性皮膚炎の関連性について報告があり (1, 2)、腸内細菌叢のバランスの崩れと炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)発症との関連性についての報告もあるように (3, 4)、腸内細菌叢が崩れ、抗炎症性腸内細菌が減少し、炎症惹起を誘導する腸内細菌の増殖によって、粘膜の炎症が発生することが IBD の要因の 1 つと考えられている。また、IBD では、*Faecalibacterium parausnitzii* (酪酸産生菌)が減少しているという知見も得られている (5)。また、腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸 1 つである酪酸によって Treg 細胞の分化が誘導されること、*Fecalibacterium* や *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* の菌群は炎症性サイトカインの産生を抑制し、IBD 発症の抑制に有効であることが報告されている (6, 7)。このように、腸管細菌叢は腸管免疫と深く関係しており、宿主と相利共生関係を維持している (Figure 1.1)。

### 1.2 乳酸菌が産生する機能性物質

#### 1.2.1 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)

脂質は、私たちヒトの生命活動や身体維持に欠かせない栄養素の 1 つであり、その種類は豊富である。なかでも、中性脂質は私たちにとって摂取量が最も多く、重要なエネルギー源であるだけでなく、それを構成する脂肪酸の種類により、生体に及ぼす影響が異なることが知られている。摂取された中性脂質や脂肪酸の大半は、消化管上部で消化、吸収されるが、その一部あるいは、消化管上皮細胞の脱落に由来する脂肪酸は、大腸に到達し、腸内細菌の代謝を受ける。脂肪酸には、私たちの体内で合成されず、食物から摂食しなければならない必須脂肪酸がある。必須脂肪酸の 1 つであるリノール酸は、乳酸菌により機能性脂肪酸である共役リノール酸(CLA)へ変換されることが知られている。共役リノール酸とは、分子内に共役ジエン構造をもつリノール酸の異性体であり、抗炎症および抗アレルギー作用など複数の生体調節機能が報告されている (9, 10)。これまで、腸内細菌による

リノール酸から CLA への代謝の詳細は不明であったが、近年、岸野らは様々な乳酸菌を対象にリノール酸を CLA へと共役化する活性を探索した結果、*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a がリノール酸を効率よく CLA (*cis*-9,*trans*-11 および *trans*-9, *trans*-11)へと変換することを見出し、その代謝中でリノール酸を 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)に水酸化する酵素 CLA-HY を同定した (Figure 1.2) (8)。これまでに私たちの研究室では、この HYA が腸上皮バリアを保護し、大腸炎の発症を改善することを見出しており (11)、その分子機序として HYA が、G タンパク質共役型受容体 (GPR40)に受容され、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR)2 の発現を抑制することを明らかにしている。このように、HYA などの乳酸菌代謝産物は、新たな高機能食品素材として期待されているが、現在のところ、その生体調節機能に関する情報はきわめて限定的である。

### 1.2.2 Exopolysaccharide (EPS)

微生物が産生分泌する糖残基を含む高分子量の重合体を菌体外多糖 (EPS)という。なかでも乳酸菌が産生する EPS は、菌株によって異なった生理作用をもつことが報告されている。例えば、*Lactobacillus sanfranciscensis* 産生の EPS がビフィズス菌の生育を促すこと (12)、*Bifidobacterium* 産生の EPS が腸内細菌叢へ影響を与え短鎖脂肪酸の生成を増進させること (13)、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 産生の EPS がナチュラルキラー細胞活性を高めること (14)などが示されている。また、エンドウ豆由来の植物性乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株は、免疫グロブリン (Ig)A の産生能が高い乳酸菌として選抜されたが、同時に高い EPS 産生能を有している極めてユニークな乳酸菌である (15)。この NTM048 株が産生する EPS は、グルコースの  $\alpha$ 1-6, 1-3 結合からなる  $\alpha$ -グルカンを主成分するヘテロ多糖であり、分子量は 10~40 kDa である (Figure 1.3) (16)。これまでに、私たち研究室では、NTM048 株由来の EPS が、慢性皮膚疾患の 1 つである乾癬の症状を抑制すること、その作用機序として EPS 摂取は全身免疫系の IL-17 産生量を抑制することを見出している。しかしながら、NTM048 株由来の EPS による生体調節機能はいまだ十分に明らかではない。

## 1.3 皮膚

### 1.3.1 皮膚の構造



皮膚は、ヒトの身体の外表を覆う人体最大の臓器であり、外界と生体の境界をなすバリア機能をもつ。表皮とその下の真皮、さらにその下の皮下組織の 3 部構成になっている (Figure 1.3)。真皮 (dermis) は、約 2 mm の厚さで主にコラーゲンとフィブリンから構成される層で、肌の弾力を保ち、抗原認識細胞である真皮樹状細胞が存在している。また、皮膚内部に毛嚢・脂腺・汗腺・血管・リンパ管など、様々な構造を有しており、肥満細胞やヘルパー T 細胞といった多くの免疫細胞も存在し、皮膚の恒常性維持に関与している。表皮は厚さ 0.06~0.2 mm からなり、外界側から、角質層、顆粒層、有棘層、基底層と呼ばれる 4 つの層を形成している。角質層 (cornified layer) は約 10 層からなり、脱核した角質細胞とその細胞間を埋める角質細胞間脂質によって構成され、扁平した形を積み重ねた膜状となる。ケラチン繊維とフィラグリンを多く含み、皮膚内部の水分蒸発の調節や皮膚内部への異物の侵入を防ぐバリア機能としての役割を果たしている。顆粒層 (granular layer : SG) は 2~3 層からなり、ケラトヒアリン顆粒を含む。顆粒細胞は、核、ミトコンドリア、粗面小胞体などの細胞中のすべての器官を消失させ、細胞間に層板顆粒を放出し、角質細胞に必要な成分であるケラチンタンパク質、繊維間物質のみを細胞内に残し角質層へと移行する。顆粒層の細胞は、表皮近くから順に SG1、SG2、SG3 細胞と呼ばれ、SG2 細胞にのみタイトジャンクション構造が存在している (Figure 1.4)。皮膚のタイトジャンクション構造は、膜貫通型タンパク質および、細胞内タンパク質によって構成されている。有棘層 (spinous layer) は 5~10 層からなり、表皮の中では最も厚い層で、それを構成する細胞は棘でつながっているように見えるため、有棘細胞と呼ばれる。細胞同士はデスモソームやギャップ結合により接着し、ケラチンを合成しながら顆粒層を形成する。顆粒層下層の有棘細胞は多角形であるが、上昇するに従い扁平となる。基底層 (basal layer) は、表皮の最下層にある細胞集団で、ケラチノサイトの幹細胞を含む 1 層の基底細胞からなる。隣接する細胞や基底細胞下にある基底膜と結合するための構造として、デスモソーム、ヘミデスモソームを有する。表皮角化細胞、メラノサイト、ランゲルハンス細胞で構成されている。ランゲルハンス細胞は皮膚の免疫を担っており、角質層まで手を伸ばし抗原を認識し免疫応答する (17, 18)。

### 1.3.2 皮膚バリア

外界と生体と内を隔てる皮膚のバリアは、角質層の角質バリアと顆粒層の SG2 細胞がもつタイトジャンクションバリアの 2 つのバリア機能で構成されている。角質バリアは 10

層の積み重なった角質細胞から構成されており、角質バリアが損傷を受けた場合、表皮の分化速度を考えると10層の角質細胞を積み重ねていくには1~2週間かかるかと推測される。一方、顆粒層SG2のタイトジャンクション構造は、新生とエンドサイトーシスを繰り返しながら動的に維持されている構造であり、その再生は短時間のうちに起こると考えられている(17)。これらのバリア機能が損傷すると、ダニやハウスダストなど、様々な外来抗原が表皮内に侵入し、ランゲルハンス細胞に捕獲され、抗原として提示される。これによって炎症が惹起され、アトピー性皮膚炎をはじめとする慢性的炎症疾患が引き起こされる。このように、皮膚のバリア機能は生体を環境抗原から守り、生体恒常性を維持する重要な役割をもつ。

#### 1.4 アトピー性皮膚炎

アトピー性皮膚炎(AD)は、掻痒症、発赤、浮腫、潰瘍形成、皮膚の乾燥および肥厚などを特徴とする慢性再発性の掻痒炎皮膚疾患である。先進国では、ADを含むアレルギー疾患の有病率は、急激に増加している。ADは、血液中IgEレベルの上昇によって特徴付けられる(18, 19)。ADの病因は複雑であり、Th1、Th2、Th17、TregなどのヘルパーT(Th)細胞サブセットの不均衡を含む様々な免疫学的因子の誘導が関与する(20, 21)。Th1細胞によって分泌されるインターフェロン(IFN)- $\gamma$ はTh2細胞の増殖を抑制するが、Th2細胞によって産生されるインターロイキン(IL)-4はTh1細胞からのTh1分化を阻止するので、AD発病におけるTh1/Th2バランスの不均衡をきっかけに、ナイーブT細胞を誘導し、IgE産生へ誘導が始まる。さらに、最近の研究では、Th17細胞もアトピー性湿疹を悪化させ、ADの発症と進展において重要な役割を果たすことが示されている(22, 23)。Th細胞サブセットの不均衡に加えて、腸内細菌叢の異常も、AD発症に深く関わることを示唆されている(1)。臨床試験では、アレルギー性の子供と健康な子供の間で腸内細菌叢の構成に差が認められている(2)。これらの腸内細菌叢に関連して、腸管IgAは、腸管内抗原による免疫活性化を抑制するため、IgEが関わるアレルギー疾患のリスクの低下と関連していると考えられている(24)。

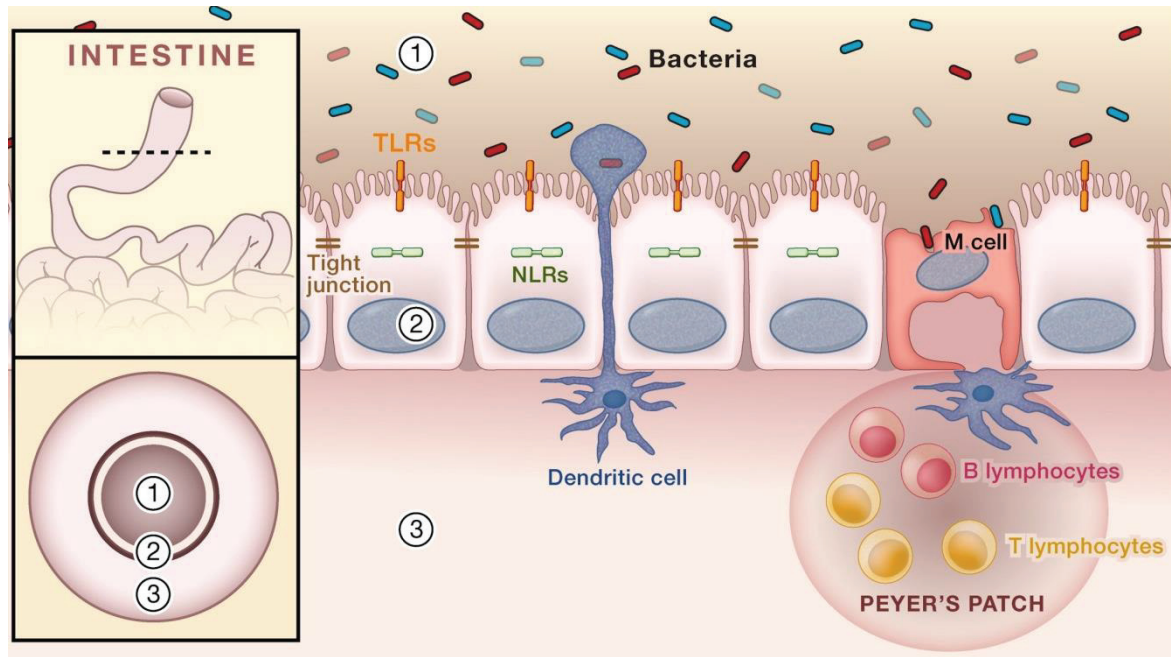
#### 1.5 炎症性腸疾患と腸管バリア

炎症性腸疾患(IBD)は、クローン病(Crohn's Disease: CD)と潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis: UC)を指している。UCは、大腸に慢性的に炎症が生じ、潰瘍が観察

される原因不明の疾患である。病変部位は直腸を中心として始まり、大腸全体にまで広がることもある。症状としては血便、粘液便、下痢や腹痛などがあげられる。寛解と再燃を繰り返す慢性の疾患である。CDの原因も不明であり、主に10～20歳代の若年で発症し、消化管に縦長あるいは不整型の潰瘍、粘膜が腫れたり、内腔面が狭くなったりする炎症性病変である。CDの病変は口腔から肛門までの消化管のあらゆる部位に見られ、小腸や大腸が好発部位である。主な症状として腹痛、下痢、発熱、肛門病変などがあり、その他、消化管以外の合併症を伴うこともある。CDとUCは、厚生労働省により医療費助成対象疾病(指定難病)に定められている。これらIBDの発症には、腸管上皮バリア破綻による宿主免疫細胞と腸内細菌叢の相互作用の異常が深く関与しており、上皮細胞によるバリア機能の破綻により粘膜固有層内へ侵入した異物が、細菌に対する免疫応答を誘導し、組織破壊を伴い炎症性腸疾患が誘発される(25)。

#### 1.6 本研究の目的および本論文の構成

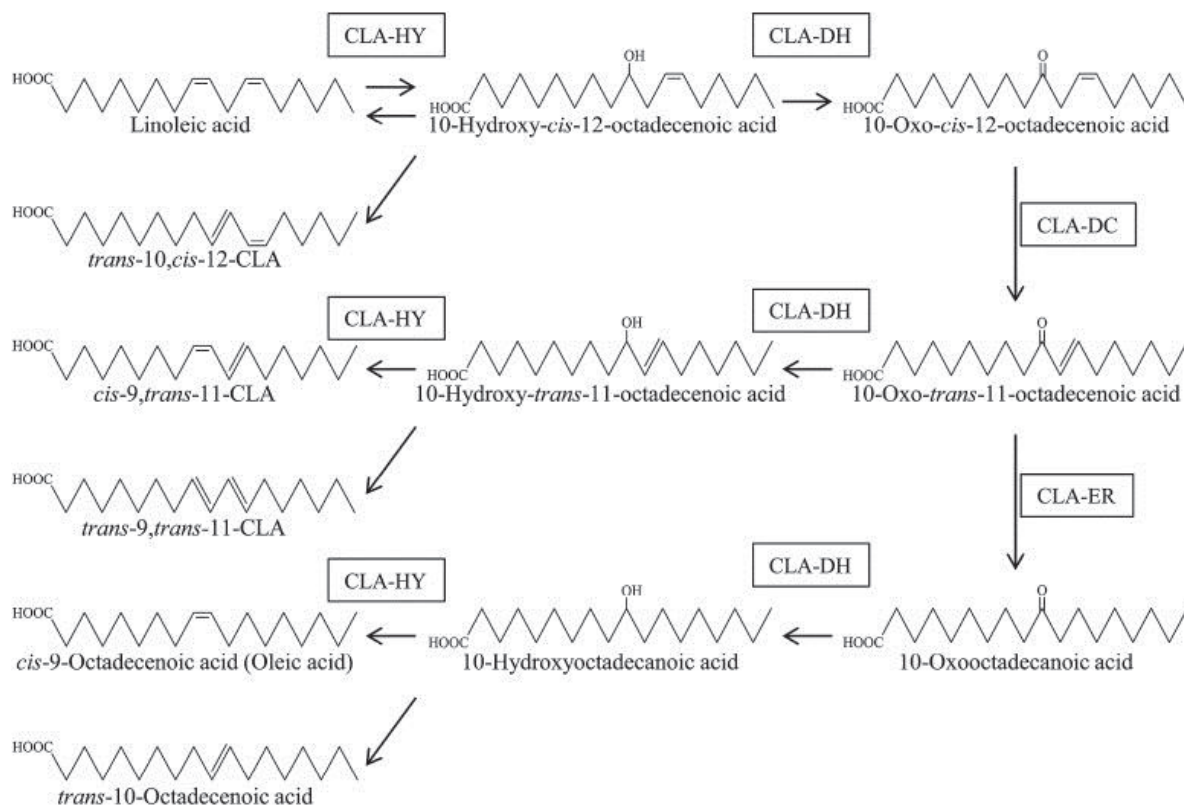
以上をふまえ、ADや大腸炎において、腸管でのバリア機能や免疫作用など恒常性を維持していくことが、疾患の症状を軽減もしくは抑制することに繋がると考えられる。また、腸内細菌叢は環境や経口摂取したものの影響を受けながら、何らかの変化を生じている。そこで、本研究では、新たな機能性食品素材として期待される乳酸菌代謝産物に着目し、HYAのAD軽減作用、NTM048株由来のEPSの大腸炎軽減作用を探索することを目的とした。第1章では本研究の背景および目的について述べた。第2章ではリノール酸の腸内細菌代謝産物HYAの機能性を探索するために、ADモデルマウスNC/Ngaを用いて、皮膚炎抗炎症の軽減について検討した。第3章では、HYAによる腸内免疫器官パイエル板細胞のIgA産生への影響、腸内細菌叢への影響について検討した。また、第4章では、腸管IgA産生上昇作用が知られているエンドウ豆由来の乳酸菌*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048株が産生するEPSについて、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎モデルマウスに対する軽減作用も探索した。そして最後に、第5章で本研究を総括し、今後の展望も記載した。



**Figure 1.1 Regulators of Host-Microbial Interactions in the Gut**

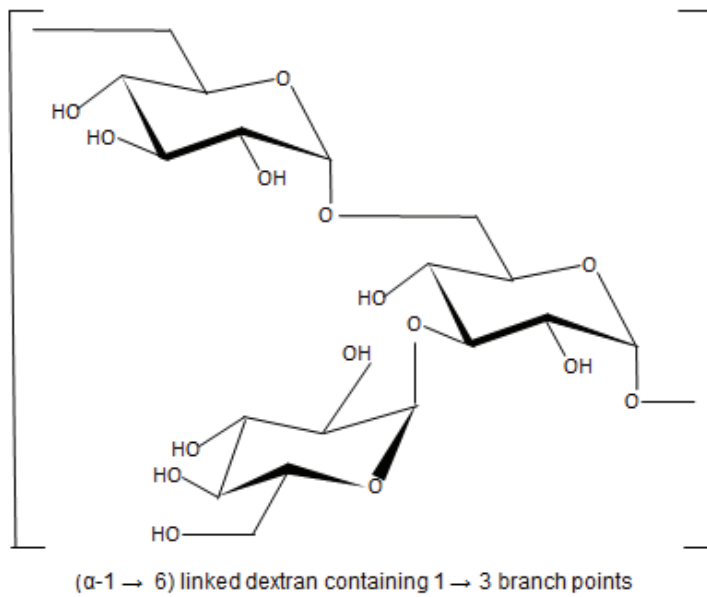
The commensal microbiota, intestinal epithelial cells, and intestinal immune cells engage in a complex crosstalk. Epithelial cells, M cells, and dendritic cells (DCs) can directly sense and sample the intestinal contents and communicate information about the microbiota to other subsets of immune cells. Toll-like receptors, expressed by epithelial cells, M cells and DCs, and NOD-like receptors, are classes of microbe-sensing molecules. Cytokines, chemokines, and host and microbial metabolites are key molecular mediators of intestinal homeostasis that influence responses of both host and microbe.

Adapted from ref. (4).

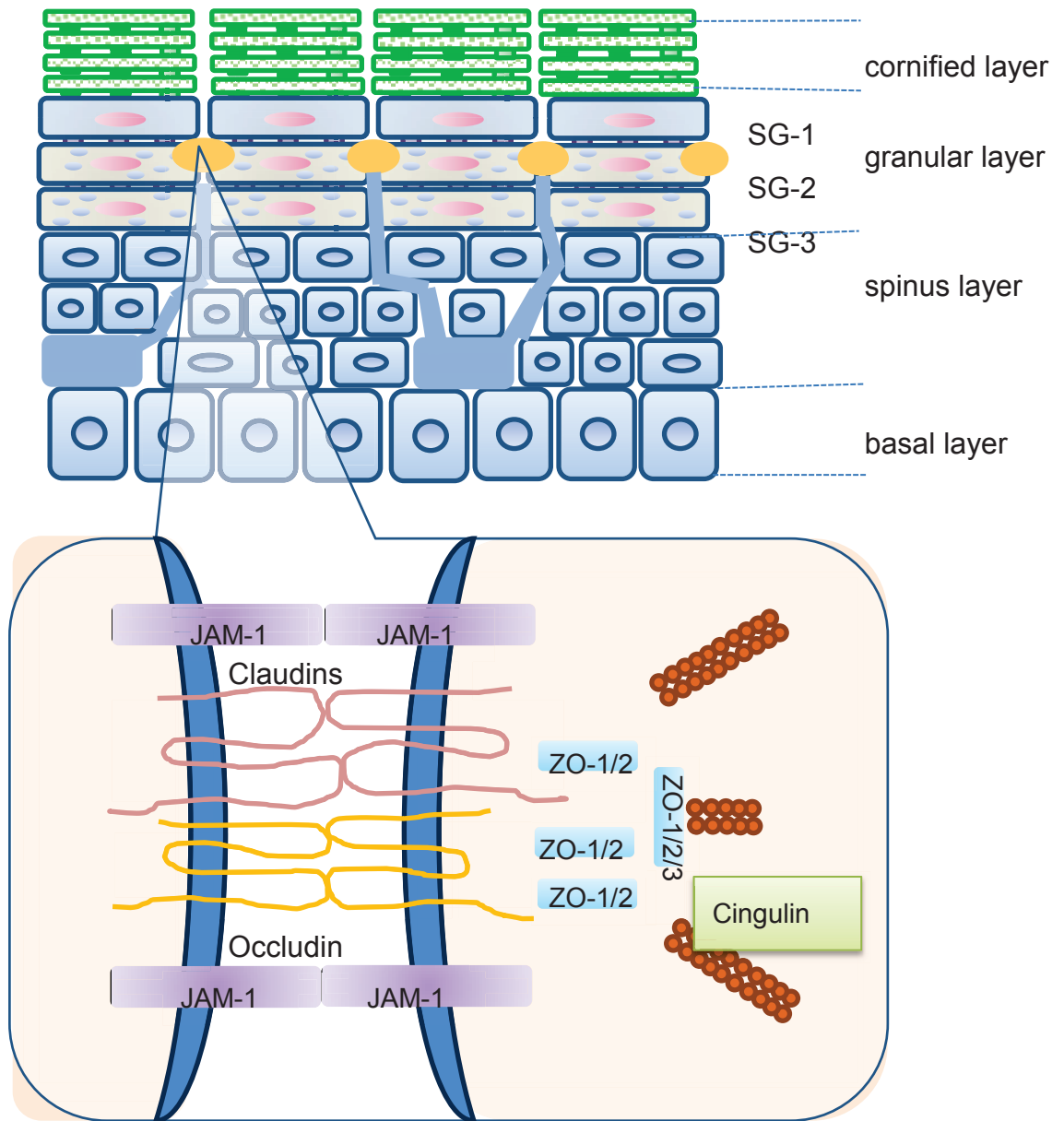


**Figure 1.2 Polyunsaturated fatty acid-metabolism pathway.**

Adapted from ref. (8).



**Figure 1.3 Structure of Exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048**



**Figure 1.4 Structure of skin and tight junction**



## 第 2 章

### 腸内細菌代謝産物 HYA のアトピー性皮膚炎抑制作用

#### 2.1 目的

本章では、リノール酸の腸内細菌代謝産物 HYA の皮膚における生理機能を検討した。アレルギー疾患のひとつであるアトピー性皮膚炎モデルマウス NC/Nga を用い、HYA 摂取によるアトピー性皮膚炎軽減効果を検討した。

#### 2.2 材料および方法

##### 2.2.1 腸内細菌代謝産物

本研究で使用したリノール酸由来腸内細菌代謝産物 HYA の構造を Figure 2.1 に示した。これらの HYA は、岸野らの合成方法に従い、日東薬品工業株式会社より提供された (8)。

##### 2.2.2 動物実験および飼育方法

NC/Nga 雌性マウス (4 週齢、10 匹) は日本チャールズリバー株式会社 (Kanagawa, Japan) から購入された。すべての実験計画は広島大学動物実験倫理委員会に承認された。12 時間の明暗サイクル (明期: 8:00~20:00)、室温  $24 \pm 1$  °C に制御された動物飼育室にて、1 ケージに 5 匹ずつ入れて飼育した。飼育期間中の飼料と飲料水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものと入れ替え、飲料水は 3 日に一度交換した。

マウスは各群の平均体重が等しくなるように 2 群に分け、基本飼料 AIN-93G (オリエンタル酵母工業 (株)) を摂食させた Control 群、基本飼料の 0.01 % (w/w) を HYA に置換した飼料を摂食させた HYA 群とした。それぞれの食餌を自由摂食させ、6 週間飼育した。2 週間の飼料摂食後 (6 週齢時) にバリカン (THRIVE, HAIR CLIPPER MODEL, 2000AD : Daito Electric Machine Industry Co., Osaka, Japan) でマウスの背部の毛を剃った。6 週間の試験期間中の飼料と水は自由摂食させ、飼料は毎日新しいものと交換し、飲料水は 3 日に 1 回交換した。

##### 2.2.3 皮膚症状のスコアリング

飼育開始時から飼育終了時までのマウスの皮膚症状を毎週観察した。マウスの顔および剃毛した背部の皮膚炎重症度を掻痒・発赤出血・浮腫・擦過傷・乾燥の 5 項目、4 段階 (重



症：3～未発症：0)で評価した(26)。搔痒については、飼育していたケージの中で3分間の搔痒回数をカウントし評価した。

試験開始4、6、8、10週齢時には尾静脈より血液を採取し、血清を回収した。試験終了前々日、前日に糞便を回収した。

#### 2.2.4 Hematoxylin Eosin (HE) 染色とトルイジンブルー染色

マウスの皮膚組織を OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)に包埋し凍結後、クリオスタットで凍結切片(7  $\mu\text{m}$ )を作成し、スライドガラス上に準備した。切片を3%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、PBS(-)で3回洗浄した。ヘマトキリン液に1分間浸漬、流水水洗(色出し)後、エオジン液に2分間浸した。70%ドライゾールにて分別、95%ドライゾールにて脱水、キシレンにて透徹し、封入し顕微鏡観察を行った。

トルイジンブルー染色は固定後の組織切片を0.05%トルイジンブルー pH 4.1 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)に浸漬し、水道水で流水洗いをし、分別、脱水、透徹後封入し観察を行い、肥満細胞を数えた。

#### 2.2.5 定量 RT-PCR

皮膚組織からの total RNA 抽出には TRIzol (Life Technologies)を使用した。Total RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) 添付プロトコールに従って逆転写し、cDNA に合成した(BIO-RAD T100™ Thermal Cycler, Hercules, CA, USA)。合成した cDNA を用いて、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA)の添付プロトコールに従い、定量 RT-PCR を行った (Applied Biosystems™ StepOnePlus™, Waltham, MA, USA)。Crossing Point 法により得られる Ct 値から  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を用いて遺伝子解析を行った。なお、本章で使用したプライマー配列を Table 2.1.に示した。

#### 2.2.6 蛍光免疫染色法による TJ タンパク質の局在および NF $\kappa$ -B p65 リン酸化の解析

マウスの皮膚組織を OCT compound に包埋凍結し、クリオスタットで凍結切片(7  $\mu\text{m}$ )を作成し、スライドガラス上に準備した。切片を3%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、PBS(-)で3回洗浄した。切片の周囲をパップペンで囲んだ。切片上にブロッキング溶液(4%スキムミルクまたは、5%正常ヤギ血清 in PBS(-)) (Wako Pure Chemical

Industries, Osaka, Japan) を添加し、湿潤箱に入れ 30 分静置しブロッキングした。ブロッキング後、切片上に 1 次抗体溶液(1% スキムミルクまたは、1.25% 正常ヤギ血清 in PBS(-))を添加し、湿潤箱に入れ、4 °C で一晩静置した。使用した 1 次抗体とその濃度を以下に示した。

- Rabbit anti-claudin-1 : 1/100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- Rabbit anti-p-NFκ-B p65 : 1/100 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

その後、PBS(-)で洗浄(10 分 × 3 回)、切片上に 2 次抗体溶液 (4% スキムミルクまたは、5% 正常ヤギ血清 in PBS(-)) を添加し、湿潤箱に入れ、室温で 1 時間静置した。使用した 2 次抗体・蛍光色素とその濃度を以下に示した。

- Goat anti-rabbit-IgG-Alexa Flour 488 : 1/200 (Abcam, Cambridge, UK)

- 4'-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI): 1/1000 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, JAPAN)

- Rhodamine-Phalloidin : 1/500 (Thermo Fisher Scientific)

PBS(-)で洗浄(10 分 × 3 回)し、MilliQ water で洗浄(10 分 × 1 回)した。切片を Mounting Fluid を用いて封入した。カバーガラスの周囲にマニキュアを塗り、カバーガラスを固定した。完成したスライドは 4 °C で保存した。蛍光顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany)によって解析した。

### 2.2.7 ウェスタンブロット法によるタンパク質発現の測定

皮膚組織サンプルに、プロテアーゼ阻害剤と脱リン酸化酵素阻害剤を含む Lysis Buffer F (1% SDS, 1% Triton X100, 1% Deoxycholate Na, 30 mM Tris)を加え、ハサミで細かく裁断した後、ホモジナイザー (POLYTRON PT 2500 : KINEMATICA, Switzerland)で破碎 (20,000 rpm, 1 分)した。破碎したサンプルを 95°C のヒーティングブロックで 5 分間加温した。遠心分離機を用いて遠心分離 (13,000 rpm, 4 °C, 15 分)し、上清を回収した。サンプル上清と 3 × Laemmli Sample Buffer (4% SDS, 10% glycerol, 10% β-mercaptoethanol および 0.04% bromophenol blue を含む 125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)を 2 : 1 の割合で混合した。95 °C のヒーティングブロックで 10 分間加温し、電気泳動に供するまで -20 °C で保管した。サンプル上清中のタンパク質量を BCA 法で測定した (Thermo scientific, Rockford, AZ, USA)。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)用のゲルを作製し、分子量マーカ

一(Precision Plus Protein Standards : Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 5  $\mu$ L と、調製したサンプルをタンパク質量として 30  $\mu$ g アプライし、120 V 定電圧で約 90 分間泳動した。電気泳動終了後、ゲルを取り出し、メタノールで親水化した PVDF メンブレン (Millipore : Merck KgaA, Darmstadt, Germany) を転写用のゲルホルダーにセットし、100 V 定電圧で 90 分間転写した。転写終了後、脱塩水で洗浄し(5 分間  $\times$  3 回)、ボンソー S 染色液に浸し 1 分間振盪、脱塩水で洗浄し、total タンパク質量を測定するためメンブレンをスキャナーで取り込んだ。目的のタンパク質に合わせてメンブレンをトリミングした。トリミングしたメンブレンを 5% スキムミルクまたは 5% BSA (Nacalai tesque INC, Kyoto, Japan) に浸し、室温で 1 時間振盪しブロッキングを行った。ブロッキング液除去後、2.5% スキムミルク または 2.5% BSA 溶液中に調製した各種 1 次抗体溶液にメンブレンを浸し、4  $^{\circ}$ C で一晩振盪した。TBST で 5 分間 5 回洗浄し、2.5% スキムミルク または 2.5% BSA 溶液中に調製した 2 次抗体 (Goat anti-Rabbit-IgG HRP) 溶液を用いて、室温で 1 時間振盪した。再び洗浄を 5 回行い、ECL kit (Plus-ECL : Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) でメンブレンを処理し、化学発光検出装置 (LAS-3000 : FUJIFILM, Tokyo, Japan) によりメンブレン上のタンパク質を検出した。定量は Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。

## 2.2.8 統計処理

結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。群間の比較については、Tukey-Kramer 法により多群間の検定を行った。 $p$  値が 0.05 未満の場合に、統計的に有意とした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 NC/Nga マウスのクリニカルスコア

NC/Nga マウスは、顔面の浮腫や耳介の欠落、背部皮膚の出血や乾燥を示し、アトピー性皮膚炎様の症状を発症した。一方、HYA 群のマウスは Control 群と比較して出血や乾燥、顔面の浮腫が抑制された (Figure 2.2 A)。マウスの皮膚症状のスコアリングを行った結果、Control 群の 9 および 10 週目の皮膚スコアは、初期値(4 週目)に比べて高値を示した。Control 群と比較して HYA 群のマウスは皮膚スコアの上昇が抑制される傾向を示した (Figure 2.2 B)。

### 2.3.2 血清中 IgE 濃度

飼育開始時から 2 週間に 1 回、マウス尾静脈から血液を採取し、血清中 IgE 濃度を ELISA にて測定した (Figure 2.2 C)。HYA 群では 6 週齢および 10 週齢で Control 群と比較して、血清中 IgE 濃度が抑制された。

### 2.3.3 皮膚 HE 染色とトルイジンブルー染色

皮膚切片をスライド上へのせ、HE 染色し、皮膚肥厚度を測定した。肥厚度は HYA 群で抑制された (Figure 2.3 A, C)。トルイジンブルー染色により染色された肥満細胞をカウントした。誘導された肥満細胞は HYA 群で抑制された (Figure 2.3 B, D)。

### 2.3.4 炎症性サイトカイン遺伝子発現

解剖時に回収したマウス皮膚組織におけるアトピー性皮膚関連因子の遺伝子発現量を解析した。Control 群と比較して HYA 群は TNF- $\alpha$  の発現が抑制された。また、アレルギー疾患関連因子である IL-33 や Mcpt1 の発現が HYA 群では抑制される傾向が示された (Figure 2.4 A)。IL-4、IL-5 の発現量について差は認められなかった。

### 2.3.5 NF $\kappa$ -B p65 のリン酸化評価

NF $\kappa$ -B p65 のリン酸化タンパク質の発現量について、HYA 群は Control 群に比べて抑制される傾向が示され、HYA は皮膚の炎症シグナルを抑えていることが提案された (Figure 2.4 B, C)。

### 2.3.6 皮膚におけるタイトジャンクション遺伝子発現とタンパク質発現

皮膚におけるタイトジャンクション遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した (Figure 2.5 A)。Control 群に比べて、HYA 群ではタイトジャンクションの 1 つである Claudin-1 の遺伝子発現が上昇し、TJ タンパク質分子の発現量をウェスタンブロット法にて解析し、数値化した結果を Figure 2.5. B に示した。タンパク質分子の発現量においても遺伝子発現と同様、Control 群と比較して HYA 群は Claudin-1 の発現が上昇していた。また、HYA による Claudin-1 の上昇は、蛍光免疫染色法によっても確認された。Claudin-1 の局在を解析した結果を示した (Figure 2.5 C)。

## 2.4 考察とまとめ

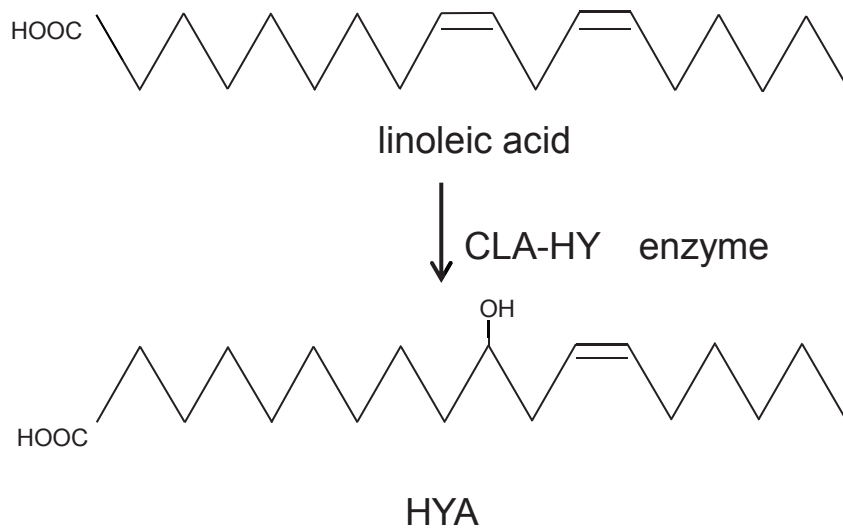
HYA 摂取は、クリニカルスコアおよび組織学的分析による皮膚の肥厚化を抑制しており、皮膚の AD 症状を抑制した。また、トルイジンブルー染色に示されるように、HYA 摂取は、皮膚におけるアレルギー性炎症の主要メディエーターである肥満細胞浸潤を抑制した。皮膚病変の改善と関連して、炎症誘発性皮膚における遺伝子発現については、炎症性マーカーである TNF- $\alpha$  発現および NF $\kappa$ -B p65 リン酸化は、HYA 群において Control 群と比べて低かった。AD の皮膚炎症および病変が Th2 サイトカインおよび IgE 産生の増加と密接に関連していることが報告されている (26, 27)。HYA は Th2 サイトカインの IL-4 や IL-5 を抑制しなかったが、Th2 サイトカインの産生を促進する IL-33 を抑制する傾向を示し、Th1/Th2 バランスへの影響をさらに探索する必要がある。

タイトジャンクション Claudin-1 について、遺伝子発現、タンパク質発現ともに HYA 群で上昇していた。これは、HYA 摂取により、皮膚表皮バリアが維持されたといえる。AD に関連する皮膚症状は、抗原による刺激の増加を可能にする表皮バリアの欠落と密接に関連していることを示している。最近の研究では、Claudin-1 の減少を媒介とした表皮 TJ 機能の障害が AD 患者バリア欠陥の発症に関与していることが示された (28)。しかし、Claudin-1 の増加は、腸内 IgA 産生および腸内細菌叢の変化によって生じた他のメカニズムの影響も考えられる。

HYA による Claudin-1 の上昇の詳細なメカニズムは不明のままである。AD の病態は、腸管 IgA 産生、腸内細菌叢、腸管免疫の Th1/2 バランスによる影響を受けること、また、過去の研究において、HYA が腸管バリア損傷や炎症を抑制することが示されていることから (11)、HYA の抗 AD 作用は腸管機能を介して発現している可能性も考えられた。そこで、次の実験では、腸管に着目した HYA の役割を探索することにした。

Table 2.1 Primer sequences used for experiments

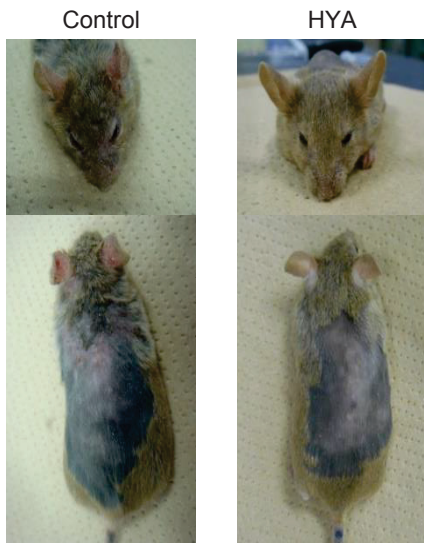
Gene		Sequence (5'- 3')
GAPDH	Forward	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG
Claudin-1	Forward	GATGTGGATGGCTGTCATTG
	Reverse	CCTGGCCAAATTCATACCTG
IL-4	Forward	AGAGAGTGAGCTCGTCTGTAGG
	Reverse	CTTCTTCAAGCATGGAGTTTTTC
IL-5	Forward	TGCAAGAGTTCCTTGGTGTG
	Reverse	GCACAGTTTTGTGGGGTTTT
IL-6	Forward	CTGATGCTGGTGACAACCAC
	Reverse	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
IL-33	Forward	CTTCTCGCTGATTTCCAAGG
	Reverse	TGAAGCTGAACAGAACGTGTG
TNF- $\alpha$	Forward	TCGTAGCAAACCACCAAGTG
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTG
Mcpt1	Forward	TGTAATTCCTTGCCTGGTC
	Reverse	TCAGGGTTTCTGAGGTAGGTTC
Tbet	Forward	ACCAGAACGCAGAGATCACTCA
	Reverse	CAAATTCTCCCGGAATCCTT
Gata3	Forward	CATCCCTGAGCCACATCTCT
	Reverse	AGGGCTCTGCCTCTCTAACC
Roryt	Forward	GCAAATACGGTGGTGTGGA
	Reverse	CGCTGAGGAAGTGGGAAA
Foxp3	Forward	CGAAAGTGGCAGAGAGGTATTG
	Reverse	TGAAGGCAGAGTCAGGAGAAG



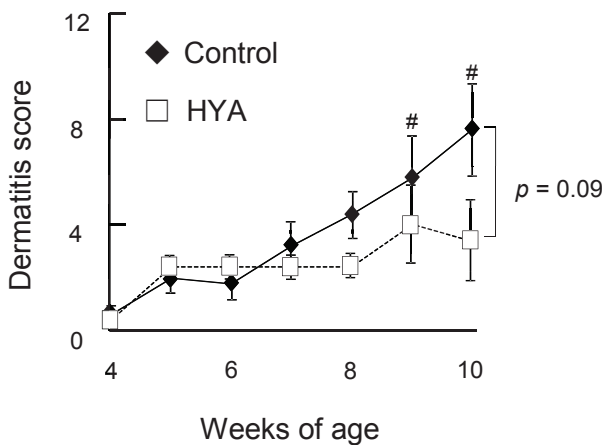
**Figure 2.1 Chemical structures of linoleic acid and HYA**

HYA is metabolized and synthesized from linoleic acid by CLA-HY enzyme.

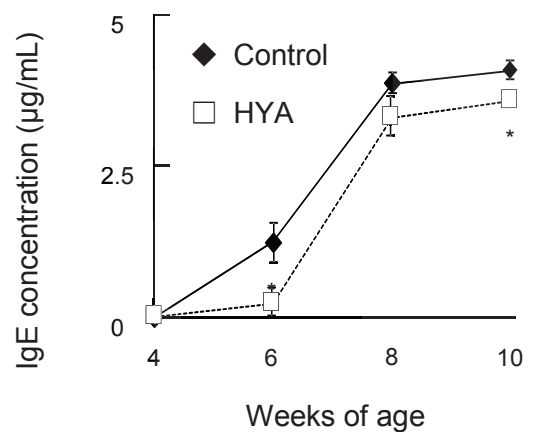
A



B



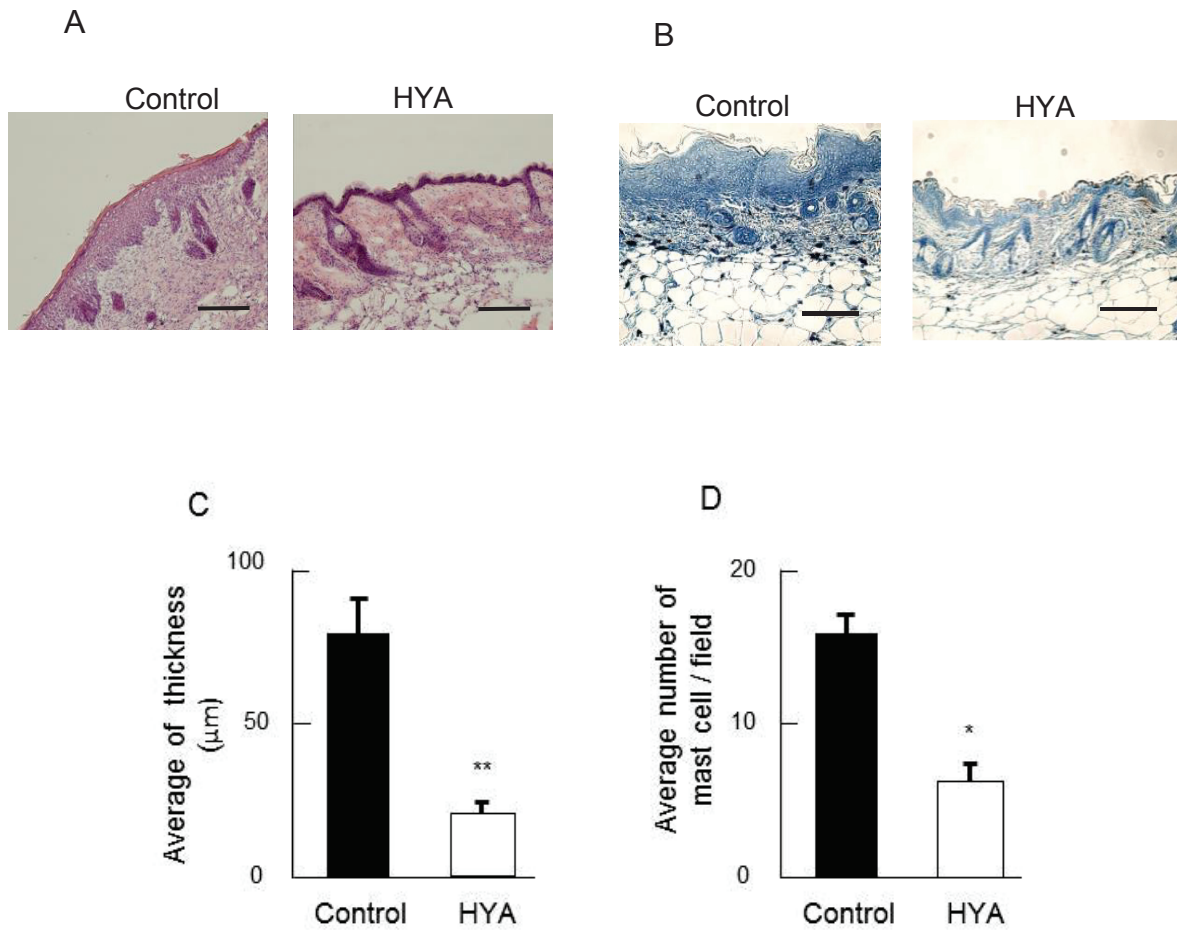
C



**Figure 2.2 Inhibitory effects of HYA on skin lesions and inflammation in NC/Nga mice.**

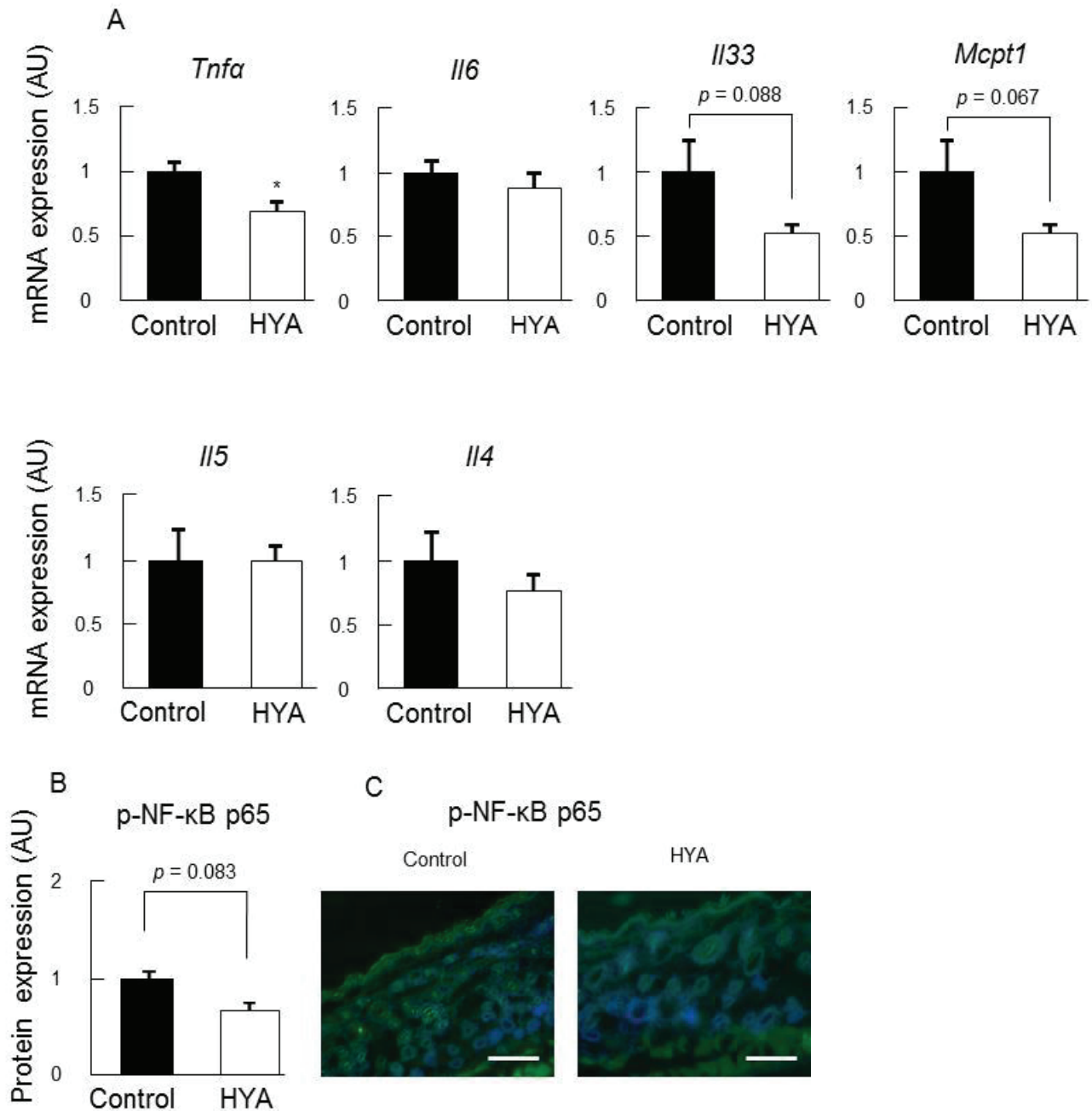
(A) Representative photographs of 10-week-old mice are shown. Control mice showed severe lesions and inflammation of the dorsal skin. Feeding HYA alleviated AD-like skin lesions. (B) Clinical scores of the AD symptoms were evaluated based on 5 items (scratching behavior, hemorrhage, edema, excoriation/erosion, and xerosis/dryness). (C) Plasma total IgE levels were measured by ELISA. Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \* $p$  < 0.05 vs control group. # $p$  < 0.05 vs each initial value at 4 weeks old.





**Figure 2.3 Anti-inflammatory effects of HYA -in the dorsal skins of NC/Nga mice.**

(A) Dorsal skin samples of mice were stained with hematoxylin and eosin. Scale bar = 200 µm. (B) Dorsal skin samples of mice were stained with toluidine blue. Scale bar = 100 µm. (C) The thickness of epidermis was quantified. (D) The number of mast cells was quantified. Values are means ± SEM (n = 5). \* $p < 0.05$  vs control group.

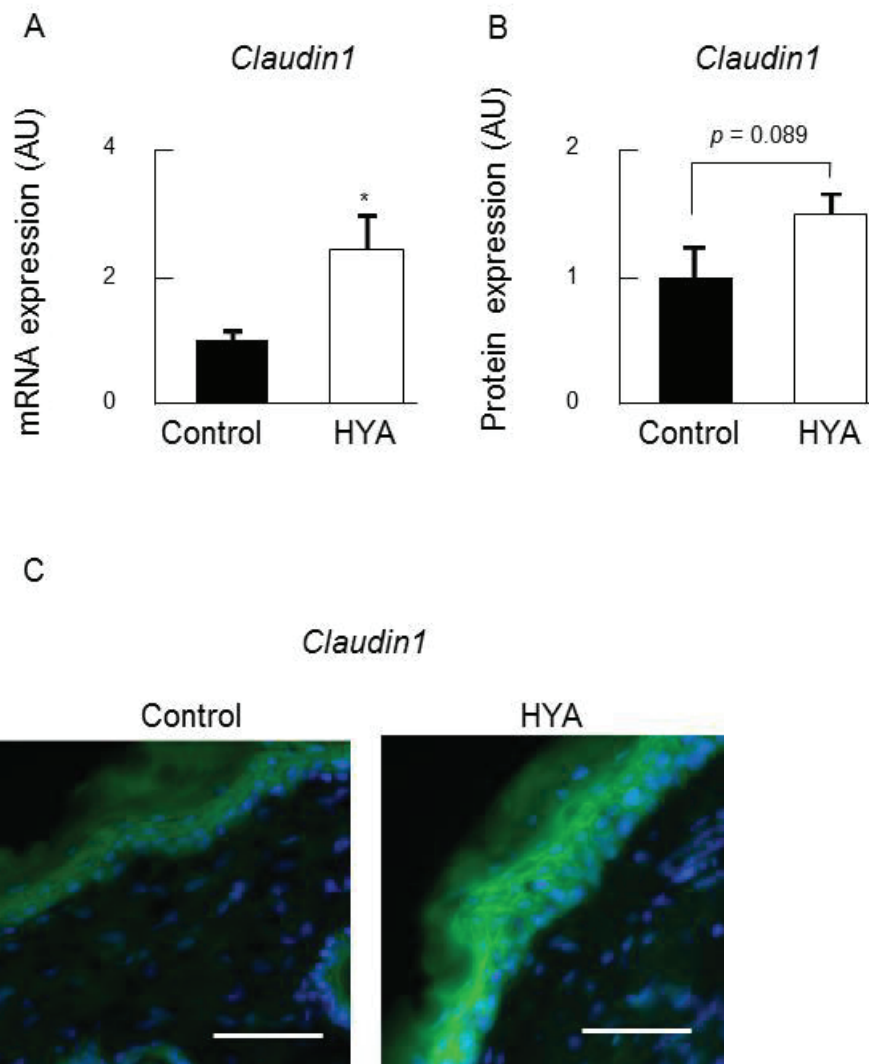


**Figure 2.4 Cytokine expression in the dorsal skin of NC/Nga mice.**

(A) Total RNA was extracted from dorsal skin samples of mice, and the mRNA expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-33 and Mcpt1 were measured by real-time RT-PCR. (B

and C) Phospho-NF- $\kappa$ B p65 in the dorsal skin samples of mice were analysed by immunoblot (B) and immunofluorescence (C) analyses. Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (green) and nuclei (blue) were stained using an immunofluorescence method. Scale bar = 200  $\mu$ m.

Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \*p < 0.05 vs control group.



**Figure 2.5 Tight junction protein phosphorylation of NF- $\kappa$ B in the dorsal skin of NC/Nga mice.**

(A) The mRNA expression of claudin-1 in dorsal skin samples of mice was measured by real-time RT-PCR. (B and C) Claudin-1 expression in the dorsal skin samples of mice were analyzed by immunoblot (B) and immunofluorescence (C) analyses. Claudin-1 (green) and nuclei (blue) were stained using an immunofluorescence method. Scale bar = 50  $\mu$ m.

Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \* $p$  < 0.05 vs control group.

## 第3章

### 腸内細菌代謝産物 HYA の及ぼす腸内細菌叢への影響

#### 3.1 目的

過去の研究において、HYA が腸上皮バリアを保護し大腸炎発症を抑制することが示されている。また、AD の発症と進展には、Th1/Th2 バランスの Th2 偏向、腸内細菌叢の乱れ、腸管バリアの低下が関わることも知られている。そこで本章では、HYA による AD 抑制の作用機序を探索することを目的とし、腸管 Th1/Th2 バランス、糞中 IgA 産生量、腸内細菌叢の解析を実施した。

#### 3.2 材料および方法

##### 3.2.1 パイエル板における遺伝子発現

小腸粘膜から採取したパイエル板細胞を、次の方法で調製した (29)。小腸のパイエル板細胞をシャーレ上で細かく切断し、100  $\mu\text{m}$  メッシュのナイロン製細胞ストレーナー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で漉した。1% ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、2 mM L-グルタミン、50  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール、10 mM 4-(2,5-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジジエタンスルホン酸、5 U/ml ペニシリン、および 5  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で懸濁した細胞を室温で 5 分間 350  $\times$  g (1500 rpm) で遠心分離し、上清を捨て再び RPMI 培地を加え、フィルター滅菌した 10 mg/ml Dispase 溶液 (Thermo Fisher Scientific) を加える。37  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベーションし遠心分離した。培地を加えて混合し、遠心分離後に上清を捨てた。この洗浄を 3 回繰り返した。得られたパイエル板細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  個/well の密度で播種した。37  $^{\circ}\text{C}$  で 6 時間のインキュベーションの後、全 RNA を細胞から抽出し、リアルタイム RT-PCR を前述 (第 2 章 2.2) のように行った。また、37  $^{\circ}\text{C}$  で 72 時間のインキュベーション後、細胞培養培地を採取し、ELISA キット (DuoSet ELISA development system, R&D Systems, Abingdon, UK, mouse IgA ELISA quantitation kit, Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA) を用いてサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 および IL-17A) 濃度および IgA 濃度の測定を行った。

### 3.2.2 糞便中の IgA の測定

糞便 (10 mg in 1.5 mL PBS(-))を海砂とともにホモジナイズし、830×g、4 °Cで30分間遠心分離して上清を回収した。上清中の IgA 濃度をマウス IgA ELISA 定量キット (Bethyl Laboratories)を用いて測定した。

### 3.2.3 PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル)

Power Fecal DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories, Carlsbad, CA) を用いて、細菌 DNA を糞便から抽出した。

PCR 反応は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio, Shiga, Japan)を使用した。なお Primer mix は、ユニバーサルプライマー HAD-1GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') および HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') を用いて、DNA サンプル由来の 16S rRNA 遺伝子の V2-V3 領域を増幅した。サーマルサイクラーの条件は、94 °Cで5分間の初期変性、94 °Cで30秒間、50 °Cで30秒間、および72 °Cで1分間の30サイクルおよび72 °Cで7分間の最終伸長とした。次いで、PCR 産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) に供した。DGGE は、30%~55%の変性剤 (100%変性溶液は40%ホルムアミドと7M尿素を含む) を含む8%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。ゲルは、DCode システム (Bio-Rad, Hercules, CA)を使用して、TAE 緩衝液中、80V で16時間、60 °Cで作動させた。ゲルを Silver Stain Kit (Bio-Rad)で銀染色し、DGGE バンドの画像を Image J ソフトウェアで作成した。Ward 法 (30)にてクラスター分析を行い、DGGE バンドパターンを解析した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 パイエル板における IFN- $\gamma$ 産生と T-bet 遺伝子発現

Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生については、Control 群よりも HYA 群で高かった (Figure 3.1 A)。Th1 細胞に対する特異的転写因子 T-bet についても HYA 群が Control 群より高い傾向がみられた ( $p = 0.06$ , Figure 3.1 B)。その一方で、GATA-3、ROR $\gamma$ 、Foxp3 の遺伝子発現に差は認められなかった。IL-17 または IL-10 のタンパク質産生についても差は認められなかった (データ省略)。IL-4 産生については、両群ともに検出限界以下であった。

### 3.3.2 IgA 産生

糞便中 IgA 濃度は、Control 群に比べて HYA 群の方が約 4 倍高かった (Figure 3.2)。

### 3.3.3 腸内細菌叢

PCR-DGGE 法による PCR 産物の銀染色写真を Figure 3.3 A に、クラスター解析を行った結果を Figure 3.3 B に示した。

クラスター解析は 2 つの大きなクラスターを示した。Control-A、Control -B、Control -C および Control -D は第 1 クラスターに属し、HYA-A、HYA-C および HYA-E と Control-E は 2 番目のクラスターに属していた。2 匹のマウス (HYA-B および D)が他のクラスターとなったが、HYA 摂食は腸内細菌叢に緩やかな影響を与えたことが示唆された。

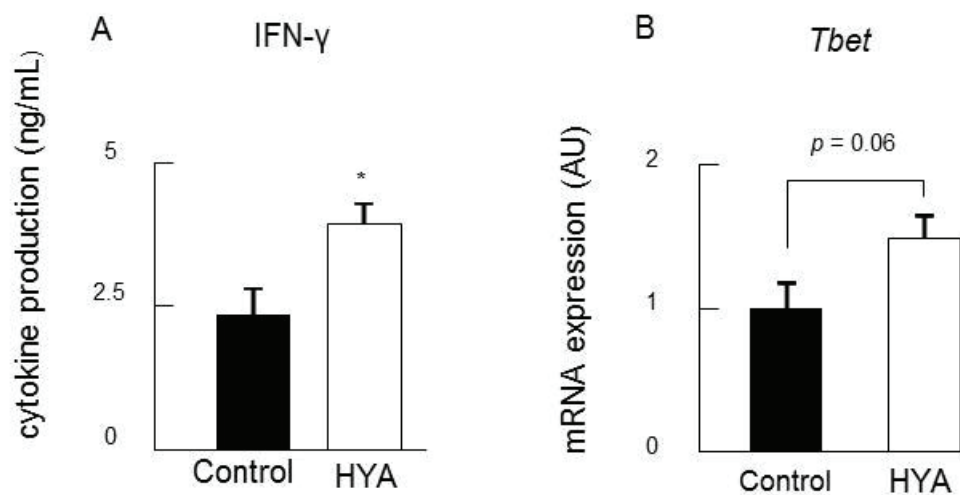
## 3.4 考察とまとめ

パイエル板細胞から産生された Th2 系サイトカインである IL-4 は、Control 群と HYA 群の両方で検出限界以下であったが、HYA 群では Th2 系を負に調節する Th1 系サイトカイン IFN- $\gamma$  の産生が増加した。IFN- $\gamma$  は Th1 および Th2 分化への誘導を制御するサイトカインであり、それぞれの分化の方向性を制御する転写因子 T-bet や GATA-3 発現を誘導して分化の方向性を決定付けると考えられている (31, 32)。HYA により IFN- $\gamma$  の産生がし、Th1 分化へ誘導されたことが示された。HYA によって誘導された Th1 応答の増加はまた、Th1 特異的転写因子である T-bet のより高い発現によっても確認された。したがって、HYA 摂取により、Th1 優性に Th1/Th2 バランスがシフトし、血清 IgE レベルを低下させたと考えられた。

腸内細菌叢の組成は AD 症状と密接に関連していることが知られている。NC/Nga マウスにおいて、経口抗生物質治療による腸内細菌叢の乱れがアトピー症状を悪化させることが、臨床スコアおよび引っ掻き行動によって示された (33)。本研究では、糞便中の 16S rRNA 遺伝子プロファイルの PCR-DGGE 分析により、HYA 摂取が腸内細菌叢組成のゆるやかな変化を生じたことを示した。これらの結果は、HYA が腸内細菌叢を穏やかに修飾すること、IgA 産生を高めることが少なくとも部分的に Th1 応答の増加および抗アレルギー効果に関与していることを示唆している。SPF (Specific Pathogen Free)マウスと比較して、

無菌マウスにおいて Th1 応答が減少することの報告があること (34)、プレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖を摂食することで、腸内細菌叢を調節し、マウス脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生を増加させることが示されている (35)。さらに、*Lactobacillus* 属に属するいくつかの菌株は、Th1 応答を増強するとの報告がある (36)。本研究の結果と併せると、HYA による腸内細菌叢バランスの変化が、AD のようなアレルギー性疾患に対して炎症抑制効果を与えたと考えられる。しかしながら、HYA は小腸で容易に吸収されると考えられるため、摂取された HYA が、微生物の定着する大腸に達して、腸内細菌叢の組成に直接影響を及ぼす可能性は低い。したがって、HYA によって誘導された腸管 IgA 産生により、腸内細菌叢のバランスが変化すると推察される。IgA 欠損マウスを用いた研究で、腸内細菌叢の調節における IgA の重要性が明らかになっている (37)。彼らは、IgA が欠如していることにより、糸状菌を含む嫌気性細菌が増加することを示した。さらに腸管 IgA は、Th2 応答を促進する微生物および食物抗原に対する免疫防御を提供することも知られている (38)。また、*Lactobacillus johnsonii* NCC533 の摂取による皮膚病変の減少は、より高い腸内 IgA 産生を伴うことを示した報告もある (39)。臨床試験では、より高い糞便 IgA レベルを有する乳児のアトピー性疾患の発生率も低いことが示されている (40)。HYA による腸内細菌叢バランスが変化するメカニズムは不明であるが、腸内細菌叢バランスを整えるために、HYA により産生量が増加した IgA の役割は重要であると考えられる。今後は HYA による IgA 産生誘導の分子機序を明らかにする必要がある。

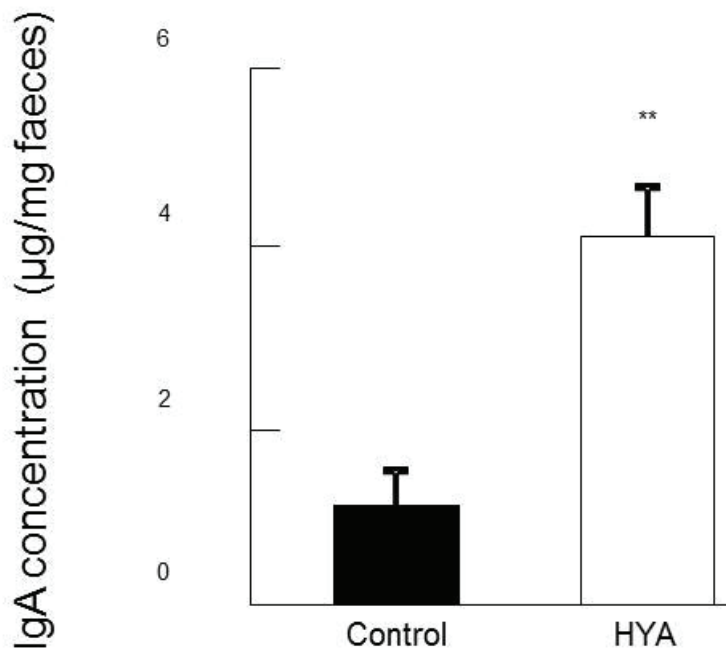




**Figure 3.1 Induction of Th1 responses by HYA in the Peyer's patches of the small intestines of NC/Nga mice.**

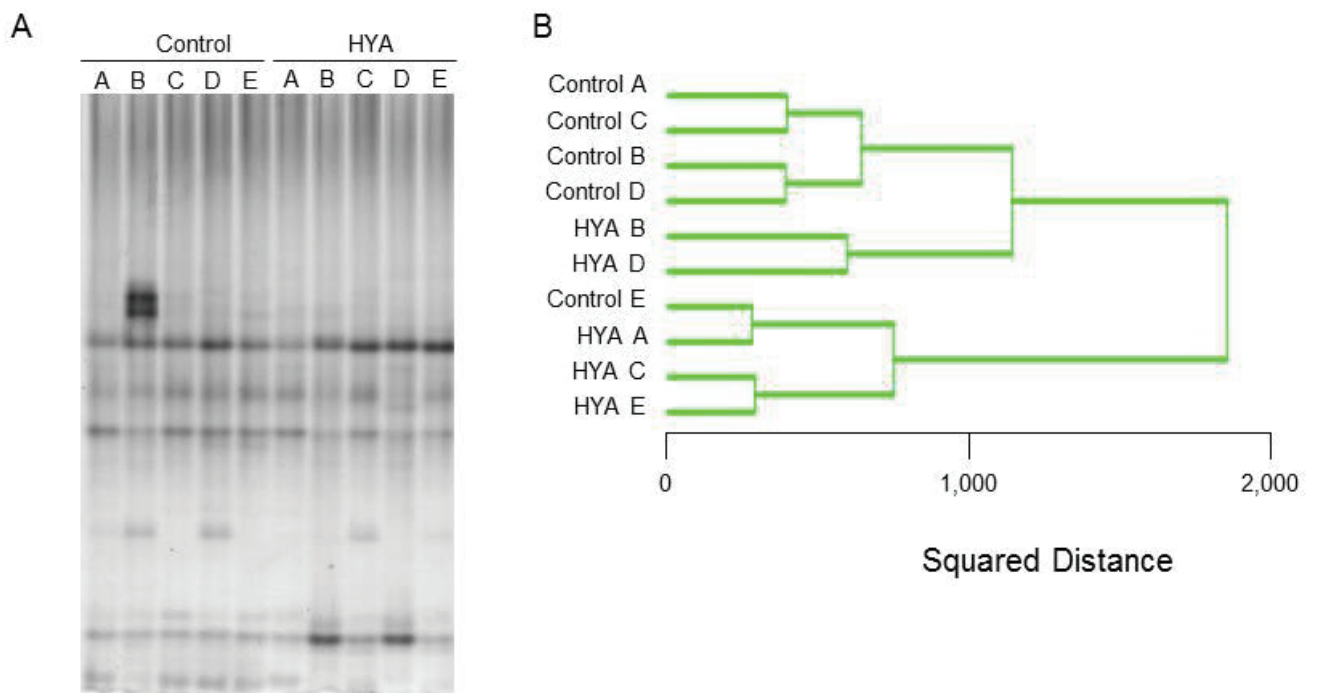
(A) IFN- $\gamma$  production from Peyer's patch cells were measured by ELISA. (B) Total RNA was extracted from Peyer's patch cells, and mRNA expression of T-bet was measured by real-time RT-PCR. Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \* $p$  < 0.05 vs control group.





**Figure 3.2 Faecal IgA level of NC/Nga mice.**

Fresh faecal samples were collected before sacrifice and IgA concentration was measured by ELISA. Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \*\* $p < 0.01$  vs control group.



**Figure 3.3 PCR-DGGE analysis of 16S rRNA gene profiles in the faeces of NC/Nga mice.**

(A) Silver staining of PCR products separated by PCR-DGGE. (B) Hierarchical cluster analysis of PCR-DGGE 16S rRNA gene profiles in faecal microbiota. The squared distances between 2 clusters were measured by Ward's method.

## 第4章

### EPSによる腸管保護効果の探索

#### 4.1 目的

エンドウ豆由来の植物性乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株は、菌体外多糖(EPS)を多く作り出す特徴がある。マウスパイエル板由来の細胞を使用した実験では、この EPS は、TGF- $\beta$  遺伝子発現増加させ IgA の産生を誘導すること、マウス脾細胞を使用した実験では、Th1 (IFN- $\gamma$ )、Th2 (IL-4)といった T 細胞の分化・誘導に関連しているとの報告がある (8)。また、EPS の経口投与により、糞中の IgA 産生を用量依存的に上昇させることが分かっている (9)。当研究室では、EPS の経口摂取により、乾癬症状スコアの改善し、乾癬の病態中心である IL-23/IL17 経路関連遺伝子の発現を抑制し、自己免疫疾患 (乾癬) の症状が緩和することが見出されている。しかしながら、NTM 由来の EPS による大腸炎への影響は知られていない。そこで、本章では EPS による大腸炎に対する軽減効果を探索することを目的とした。

#### 4.2 材料および方法

##### 4.2.1 飼料

マウスの基本飼料として、通常の AIN-93G に 5%含まれているセルロースをスターチに置換たものとした。NTM048 由来の EPS を含む添加飼料は、基本飼料から 5%スターチ置換、10%スターチ置換により調製した。試験飼料の組成は Table 4.1 に示した。ビタミン組成およびミネラル組成は Table 4.2 と Table 4.3 にそれぞれ示した。

##### 4.2.2 動物実験および飼育方法

雄性の BALB/c マウス (7 週齢、28 匹)を日本チャールズリバー株式会社 (Kanagawa, Japan)から購入し、すべての実験計画は広島大学動物実験倫理委員会に承認された。6 日間の予備飼育を行った後、各群の平均体重がなるべく等しくなるように、4 群に分けた (n=7)。Control 群と DSS 群には基本飼料を、DSS + 5% EPS 群と DSS + 10% EPS 群にはそれぞれ 5%と 10% EPS 添加飼料を 9 日間与えた。これら試験飼料開始 2 日目から、DSS、DSS + 5% EPS、DSS + 10% EPS 群には 2% DSS 溶液を自由飲水させて大腸炎を誘導した。Control には超純水を飲水させた。また、試験飼料開始 1 日目と 4・5 日目に採糞を行った。試験終了後 (DSS 飲水開始 8 日目)に解剖を行い、各種解析を実施

した。

#### 4.2.3 大腸炎の病態評価

##### (1) Disease Activity Index / DAI の評価

DAI は大腸炎の病態の指標として、下痢、血便の 2 項目をスコア化し、算出した。評価基準は Table 4.4 に示した (41)。

##### (2) 結腸長の測定

DSS 誘導性大腸炎を発症したマウスでは、結腸長の短縮がみられることが報告されている。そこで、解剖時に採取した結腸を用い、DSS 誘導性大腸炎による結腸の病状の指標として、結腸長を測定し、結腸全体の写真撮影を行った。また、結腸組織の状態観察のため、HE 染色を行った。第 2 章参照。

#### 4.2.4 血中 Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)濃度の測定

96well プレートに、キャプチャー抗体溶液 (anti-LBP : MS-biG35)を添加し、4 °Cで 1 晩静置後、TBST で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液を添加し、室温 2 時間で静置した。TBST で 3 回洗浄し、希釈した血しょうサンプル溶液を入れ、400 rpm で 2 時間振盪した。TBST で 4 回洗浄し、検出溶液 (anti-LBP-HRP : MS-biG33)を入れ、室温 400 rpm で 2 時間振盪した。その後、4 回洗浄し、TMB 溶液を入れ室温で 15 分暗所静置した。Stop solution で反応を止め、吸光光度計 (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO、Thermo Fisher Scientific K.K. Yokohama Japan)により、波長 450 nm (参考波長 : 620 nm)の吸光度を測定した。

#### 4.2.5 腸管 TJ タンパク質発現

結腸組織における TJ タンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて解析した(第 2 章を参照)。使用した 1 次抗体と濃度を以下に示した。

- Rabbit anti-Claudin-3 : 1/6000 (Thermo fisher )
- Rabbit anti-Claudin-7 : 1/3000 (Thermo fisher)
- Rabbit anti-Occludin : 1/4000 (Thermo fisher )
- Rabbit anti-ZO-1 : 1/3000 (Thermo fisher )
- Rabbit anti-ZO-2 : 1/2000 (Santa Cruz)

また、蛍光免疫染色法にて結腸組織における Claudin-3, Claudin-7, ZO-1 の局在を解析した(第 2 章参照)。使用した 2 次抗体・蛍光色素とその濃度を以下に示した。

- ・ Goat anti-rabbit-IgG-Alexa Flour 488 : 1/200 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- ・ 4'-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI): 1/1000 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, JAPAN)

#### 4.2.6 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量の測定

第 2 章を参照。

なお、本章で使用したプライマー配列を Table 4.5 に示した。

#### 4.2.7 好中球の解析

蛍光免疫染色法にて結腸組織における好中球を染色し解析した(第 2 章を参照)。

固定液・抗体とその濃度を以下に示した。

- ・ 固定液 : acetone (Wako)
- ・ FITC conjugated anti mouse Ly-6G (Gr-1) : 1/200 (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
- ・ 4'-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI): 1/1000 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, JAPAN)

#### 4.2.8 糞中有機酸の解析

DSS 開始 4 日目の糞便の重量を測定し、その 4 倍量の MilliQ water を加え、鉢で破砕後、ボルテックス(4 °C, 10 min)により、均質化した。1.5 mL マイクロチューブに糞便溶液を 112  $\mu$ L 移し、内部標準物質として 25 mM クロトン酸を 8  $\mu$ L 加えて攪拌した。遠心分離後(13,000 rpm, 4 °C, 10 min)、新しい 1.5 mL マクロチューブに上清を 54  $\mu$ L 移し、10%スルホサリチル酸を 6  $\mu$ L 添加して攪拌し、氷上で 30 分静置した。攪拌後、遠心分離(13,000 rpm, 4 °C, 10 min)し、新しい 1.5 mL マクロチューブに上清を 45  $\mu$ L 移し、MilliQ water を 90  $\mu$ L 加えて攪拌した。フィルター(DISMIC-3 : 孔径 0.2 $\mu$ m, ADVANTEC)で濾過し、バイアルに入れた。最高濃度のスタンダードを以下の溶液を混和して調製し、段階希釈し、5 つのスタンダードを調製した。

	添加量( $\mu$ L)	最終濃度( $\mu$ M)
・ 50 mM 酢酸	120 $\mu$ L	5.0

・ 50 mM プロピオン酸	60 $\mu$ L	2.5
・ 50 mM n-酢酸	60 $\mu$ L	1.0
・ 5 mM n-吉草酸	60 $\mu$ L	0.25
・ 5 mM iso-吉草酸	60 $\mu$ L	0.25
・ 5 mM 乳酸	12 $\mu$ L	0.05
・ 5 mM コハク酸	12 $\mu$ L	0.05
・ Milli Q water	616 $\mu$ L	

各スタンダード溶液 250  $\mu$ L に 3 mM クロトン酸 50  $\mu$ L を加えて攪拌し、バイアルに移した。

サンプルおよびスタンダード溶液中の有機酸濃度を LC/MS (MassLynx : Waters) を用いて測定した。LC/MS 測定条件は以下に示した。

・ HPLC	Acquity UPLC (Waters)
・ Mass spectrometer	Acquity UPLC (Waters)
・ Ionization mode	ESI (-)
・ Column	ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100mm, 1.7 $\mu$ m)(Waters)
・ Mobile solvent A	0.05%ギ酸 in MilliQ water
・ Mobile solvent B	0.05%ギ酸 in Methanol
・ Seal wash	10% Methanol
・ Strong needle wash	Methanol
・ Weak needle wash	MilliQ water
・ Flow rate	0.2 mL/min
・ Sample temp.	4 $^{\circ}$ C
・ Column temp.	40 $^{\circ}$ C
・ Injection volume	5 $\mu$ L

#### 4.2.9 EPS によるリガンド活性の解析

HEK-Blue h TLR2 細胞 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いた。培養培地は 100 mL/L fetal bovine serum (FBS, 非動化処理を実施 ; Thermo Trace Ltd.)、44 mM sodium bicarbonate、50000 IU/L penicillin、50 mg/L streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Sigma) を使用し、5%二酸化炭素と 95%空気存在下、

37 °Cで培養した。通常の培養においては、細胞を 75 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに播種し、70 – 80%コンフルエント時に、PBS(-)により細胞を剥離し実験に用いた。

HEK-Blue h TLR2 細胞を 96 well plate に  $0.5 \times 10^6$  cell/mL で 100  $\mu$ L 播種した。細胞播種と同時に、EPS (終濃度 ; 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2%)、または、ペプチドグリカン(終濃度 ; 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL)を添加した。16 時間後、プレートシェーカーで振盪させ、遠心分離し(1200 rpm、15 min)、サンプル上清を 20  $\mu$ L ずつ回収し ALP 産生量の測定のために 96 well plate に移した。各サンプルにつき 2well 使用した。また、ブランクとして PBS(-)を使用した。ALP assay solution buffer を 100  $\mu$ L ずつ添加し、15 分間 37 °C でインキュベートした。0.2 M NaOH を 100  $\mu$ L ずつ添加し、405 nm の吸光度を測定した。HEK-Blue h TLR4 についても、同様に実験を行った。

#### 4.2.10 統計処理

第 2 章を参照

### 4.3 結果

#### 4.3.1 大腸炎の病態評価

試験期間中のマウスの体重変化を Figure 4.1(A)に示した。DSS + Control 群では DSS 投与開始 6 日目から体重減少したが、6~8 日目の DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群での体重変化は DSS 群よりも高値を示した。DAI スコアを Figure 4.1(B)に示した。DSS + Control 群では DSS 投与開始 6 日目からスコアの上昇が確認されたが、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群では、スコア上昇が抑えられた。結腸長を測定した結果と結腸の写真を Figure 4.1(C)に示した。DSS 投与により結腸長の短縮が見られたが、DSS + 10% EPS 群では結腸長の短縮が抑制された。また、各群の結腸組織を HE 染色した結果を Figure 4.1(D)に示した。DSS 摂取群では、結腸組織の重度の損傷が見られたが、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群では、組織損傷は抑制されていた。

#### 4.3.2 血中 LBP 濃度

血中 LBP 濃度を ELISA 法にて測定した結果を Figure 4.2 に示した。DSS + Control 群では LBP 濃度が大きく上昇したが、5% EPS、10% EPS 添加食の摂取により、その上昇が抑えられた。

#### 4.3.3 消化管バリア機能の評価

結腸による TJ タンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて解析し、数値化した結果を Figure 4.3(A)に示した。DSS + Control 群では、ZO-1 以外の TJ 構成因子の発現量が減少した。Claudin-3、ZO-2 については、DSS + 5% EPS 群で発現量の減少が抑制された。DSS + 10% EPS 群においても発現量の減少が抑制される傾向にあった。また、蛍光免疫染色法にて結腸組織における Claudin-3、Claudin-7、ZO-1 の局在を解析した結果を Figure 4.3(B)に示した。DSS 群では結腸組織のクリプトの損傷や Claudin-3、Claudin-7、ZO-1 の局在の以上が確認され、重度の TJ 損傷が認められたが、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群では損傷が抑えられていた。

#### 4.3.4 消化管組織炎症の評価

結腸組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現量を、リアルタイム PCR 法にて測定し、数値化した結果を Figure 4.4 に示した。DSS 群では IL-6, IL-10, IL-18, CXCL-2 の遺伝子発現が増加したが、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群では抑制された。また、TLR2 の遺伝子発現については、DSS 群、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群で増加傾向にあり、特に、DSS + 5% EPS 群での増加が顕著に見られた。

#### 4.3.5 好中球浸潤の評価

蛍光免疫染色法にて結腸組織における好中球を染色し、好中球の数を測定した結果を Figure 4.5 に示した。DSS 群では好中球が増加していたが、DSS + 5% EPS 群、DSS + 10% EPS 群では抑制されていた。

#### 4.3.6 糞中の有機酸

糞中の有機酸濃度を LC/MS 法にて測定した結果を Figure 4.6 に示した。酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸、乳酸、コハク酸を測定したところ、DSS + 10%EPS 群では、n-酪酸とコハク酸の濃度上昇が確認できた。酢酸、プロピオン酸、n-吉草酸、iso-吉草酸、乳酸については群間差は認められなかった。

#### 4.3.7 TLR2 リガンド活性



EPS、ペプチドグリカンを作用させた HEK-Blue h TLR2 細胞の ALP 産生量を解析した結果を Figure 4.7 に示した。それぞれ濃度依存的に TLR2 リガンド活性が上昇した。TLR4 リガンド活性について、0.1、0.2%EPS により ALP 活性が上昇したが、その程度は小さかった(Figure 4.8)。

#### 4.4 考察とまとめ

DSS 投与による体重変化量の減少は、5%、10% EPS 摂取によって抑制された。また、DSS によるクリニカルスコアの上昇、結腸長の短縮、結腸組織の損傷も抑制された。血中 LBP 濃度は、体内への LPS の流入に応じて上昇するため、消化管バリア損傷の指標として測定したが、DSS によって LBP 濃度は大きく上昇していたが、5%、10% EPS 摂取ではその上昇を抑制した。タイトジャンクションタンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて測定したところ、DSS によってタイトジャンクション構成因子である Claudin-3、Claudin-7 の発現量が減少していたが、5%、10% EPS 摂取によりその発現量の減少が抑制されていた。蛍光免疫染色法でもその違いが明確に見られた。また、ZO-1 の総発現量では差は認められなかったが、蛍光免疫染色法では、DSS による ZO-1 の局在の乱れが EPS 摂取により抑制されていた。消化管組織炎症の評価のため、結腸における炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。DSS により、CXCL-2、IL-6、IL-18、IL-10 の遺伝子発現量は上昇したが、5%、10% EPS 摂取はそれを抑制した。以上の結果より、EPS は DSS 誘導性大腸炎を軽減する大腸保護作用があることが示された。そのメカニズムとして、TJ バリアの保護が考えられた。糞中の有機酸を測定した結果、10% EPS 摂取群での n-酪酸とコハク酸の増加が見られたが、酢酸、プロピオン酸、乳酸は変化が見られず、腸内環境への EPS 摂取のよる影響についてはさらに検討する必要がある。

近年、プレバイオティクスの一部も TLR に受容されることが報告されている。腸管上皮細胞において、菌体を認識する受容体の発現および機能は適切に制御されていることが分かっており、TLR2 に関しては、創傷の回復や腸管上皮細胞間の接着を強化する作用があることが報告されている (39, 41)。TLR2 は主に *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などのグラム陽性菌の細胞壁成分を認識するが、健常なヒトの腸管上皮での発現量に比べて炎症性腸疾患においては、TLR2 の発現が増大することが知られている。また、キノコ抽出の多糖が TLR2 アゴニストとして作用し、抗腫瘍効果を有することが見出されている (42)。

HEK-Blue h TLR2 細胞において、EPS による TLR2 リガンド活性をみると、EPS の濃度依存的に活性が上昇しており、EPS による腸管保護作用に TLR2 の活性化が関与している可能性が考えられた。これらを踏まえると、大腸で EPS が腸内細菌による変化を受ける前に、TLR2 に作用し、TJ バリア保護作用と腸管保護作用を発揮している可能性が示唆された。



Table 4.2 Vitamin Mix (AIN-93G)

Ingredient	g/kg mix
Thiamine hydrochloride	0.6
Riboflavin	0.6
Pyridoxine hydrochloride	0.7
Nicotinic Hydrochloride	3.0
D-Calcium pantothenate	1.6
Folic acid	0.2
D-Biotin	0.02
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	2.5
(0.1% mannitol)	
Retinyl palmitate (Vitamin A)	15.0
(500,000 IU/g)	
d- $\alpha$ -Tocopheryl acetate (Vitamin E)	0.8
(500 IU/g)	
Cholecalciferol (Vitamin D3)	0.3
(400,000 IU/g)	
Menaquinone (Vitamin K)	0.1
Sucrose, finely powdered to make	974.7
<b>Total</b>	<b>1000</b>

Table 4.3 Mineral Mix (AIN-93G)

Ingredient	g/kg mix
<b>Essential mineral element</b>	
Calcium carbonate, anhydrous	357
Potassium phosphate, monobasic	196
Potassium citrate, tri-potassium	70.78
Sodium chloride	74
Potassium sulfate	46.6
Magnesium oxide	24
Ferric citrate	6.06
Zinc carbonate	1.65
Manganous carbonate	0.63
Cupric carbonate	0.3
Potassium iodate	0.01
Sodium selenite, anhydrous	0.01025
Ammonium paramolybdate, 4hydrate	0.00795
<b>Potentially beneficial mineral element</b>	
Sodium meta-silicate, 9hydrate	1.45
Chromium potassium sulfate, 12hydrate	0.275
Lithum chloride	0.0174
Boric acid	0.0815
Sodium fluoride	0.0635
Nickel carbonate	0.0318
Ammonium vanadate	0.0066
Powdered sucrose	221.026
Total	1000

Table 4.4 Clinical scoring system

---

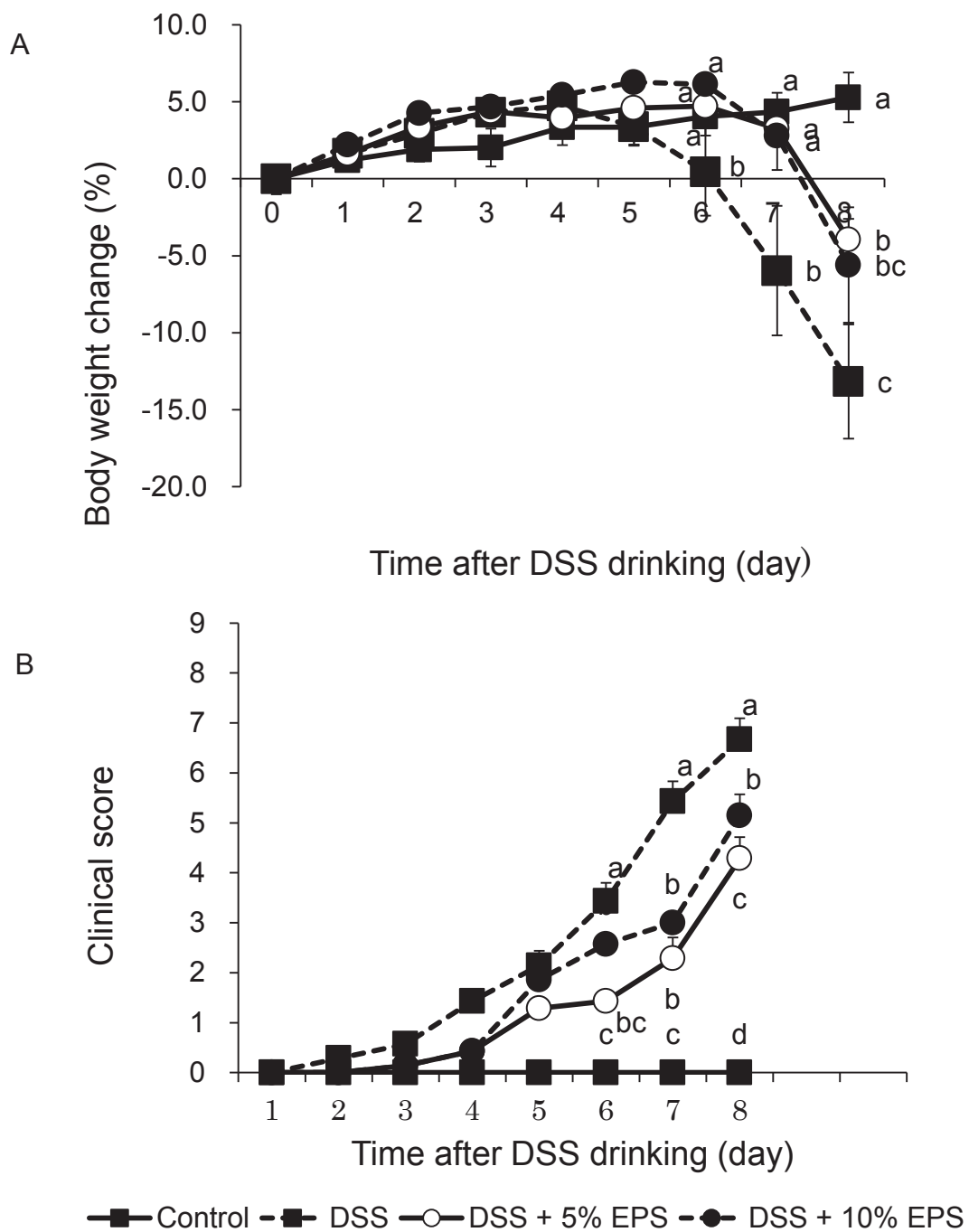
Score	Diarrhea stool	Bloody stool
0	Normal	Normal color
1	Mildly soft	Brown color
2	Very soft	Reddish color
3	Watery	Bloody stool
4	More watery	More bloody

---

The sum of the scores of Diarrhea stool and Bloody stool was defined as the clinical score.

Table 4.5 Primer sequences used for experiments

Gene	Sequence (5'- 3')	
GAPDH	Forward	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG
TNF- $\alpha$	Forward	TCGTAGCAAACCACCAAGTG
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTG
CXCL-2	Forward	AGTGAACTGCGCTGTCAATG
	Reverse	ACTTTTTGACCGCCCTTGAG
IL-6	Forward	CTGATGCTGGTGACAACCAC
	Reverse	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
IL-18	Forward	TGGCAACTGTTCTGAACTCA
	Reverse	CAAAGGTTTGGGAAGCAGCCC
IL-10	Forward	AGCCGGGAAGACAATAACTG
	Reverse	TCCAGCTGGTCCTTTGTTTG
TLR2	Forward	CTCCCACTTCAGGCTCTTTG
	Reverse	GCCACTCCAGGTAGGTCTTG



**Figure 4.1 Effects of EPS on body weight change, clinical score, colon length, and colon structure in DSS-induced colitic mice.**

(A) Body weight change in male BALB/c mice fed the Fiber free, 5% EPS and 10% EPS diets with distilled water or DSS. (B) Clinical score of the inflammation in male BALB/c mice. (C) Colon length were measured on day 8. (D) Colonic tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Values are the means  $\pm$  SEM (n=7). Means at each time point without a common letter are different,  $p < 0.05$ .

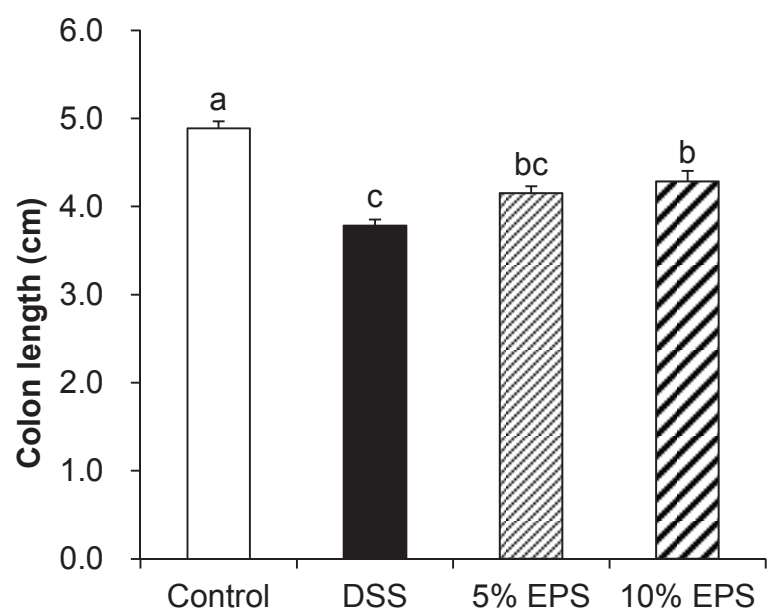


C



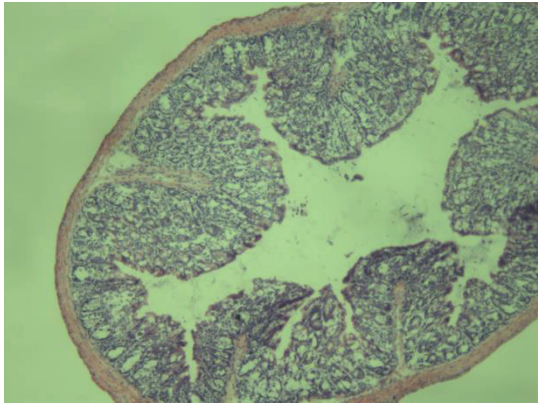
Control      DSS      5% EPS      10% EPS

DSS

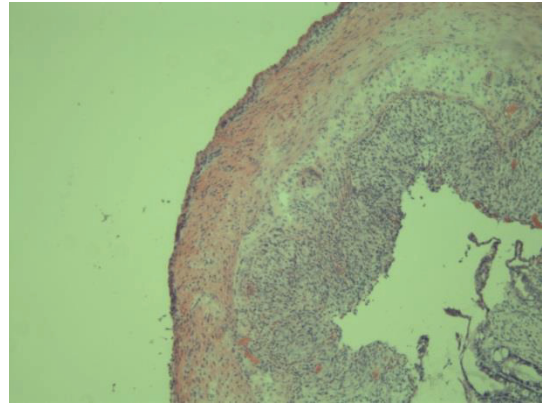


DSS

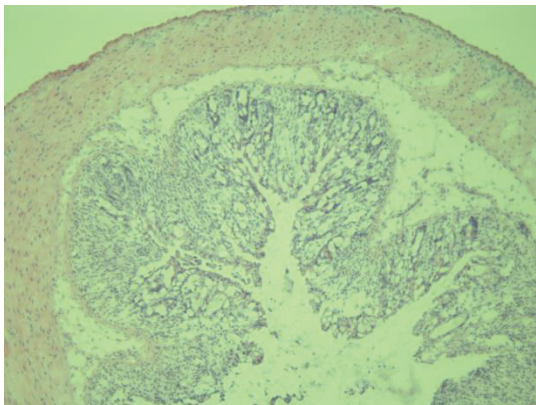
D



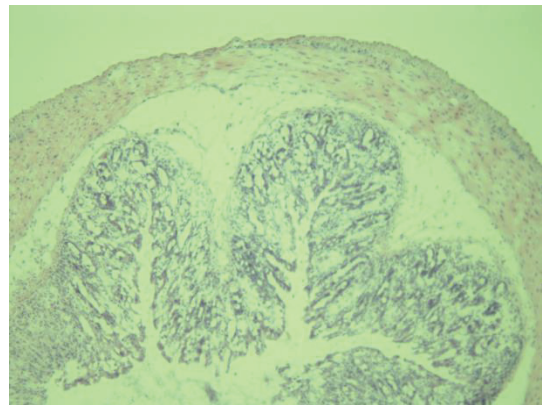
Control



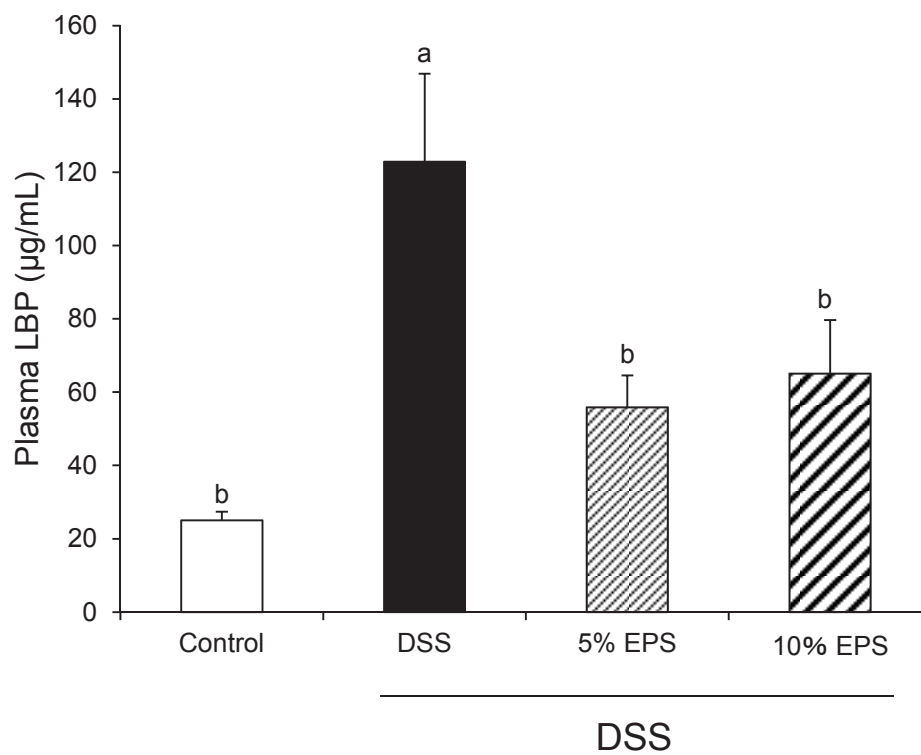
DSS



DSS + 5% EPS

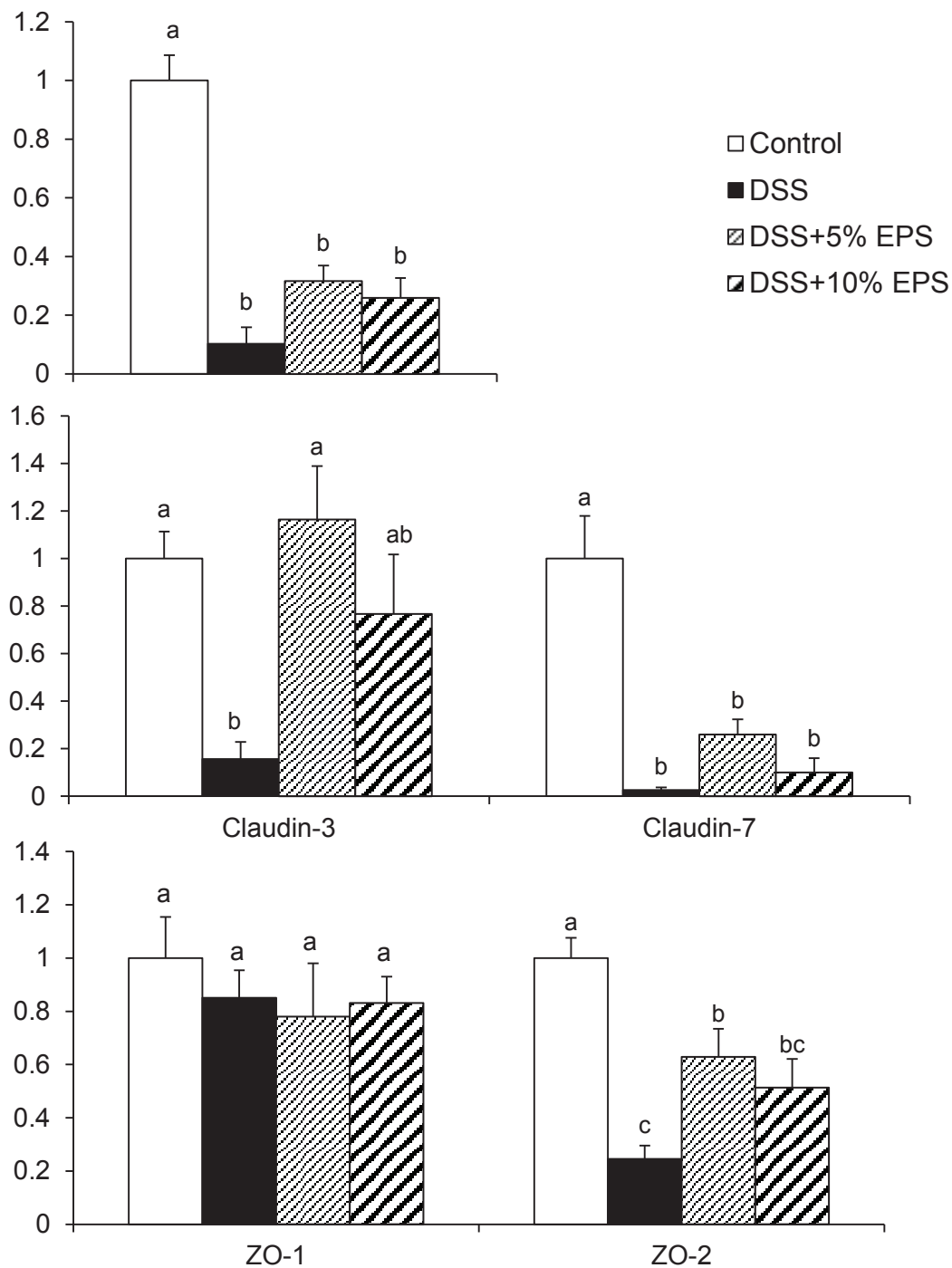


DSS + 10% EPS



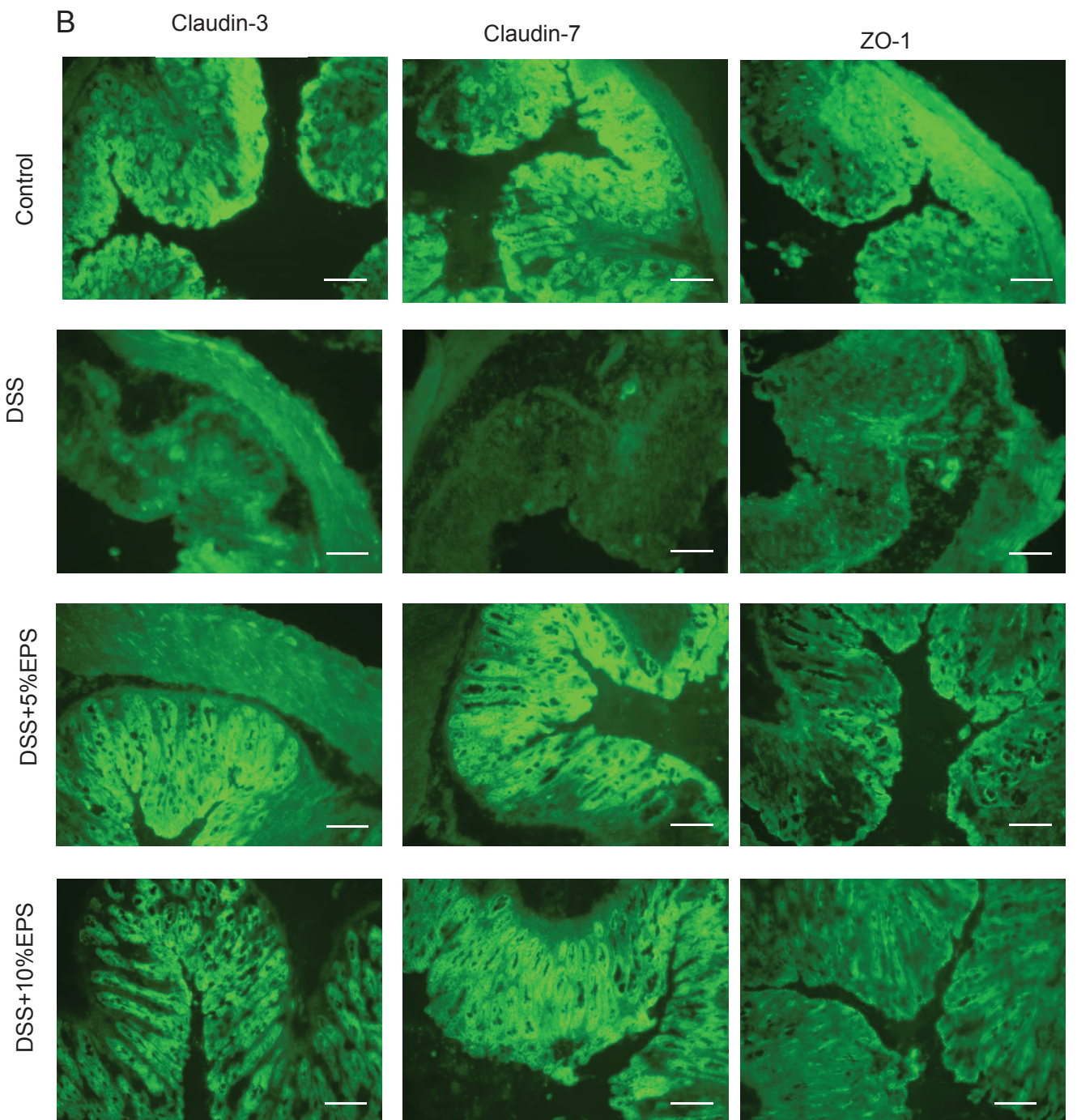
**Figure 4.2 Effect of EPS on plasma LBP in DSS-induced colitic mice.**

Plasma LBP at day 9 in male BALB/c mice fed the Fiber free, 5% EPS and 10%EPS diets with distilled water or DSS. Values are the means  $\pm$  SEM (n=7).  $p < 0.05$ .

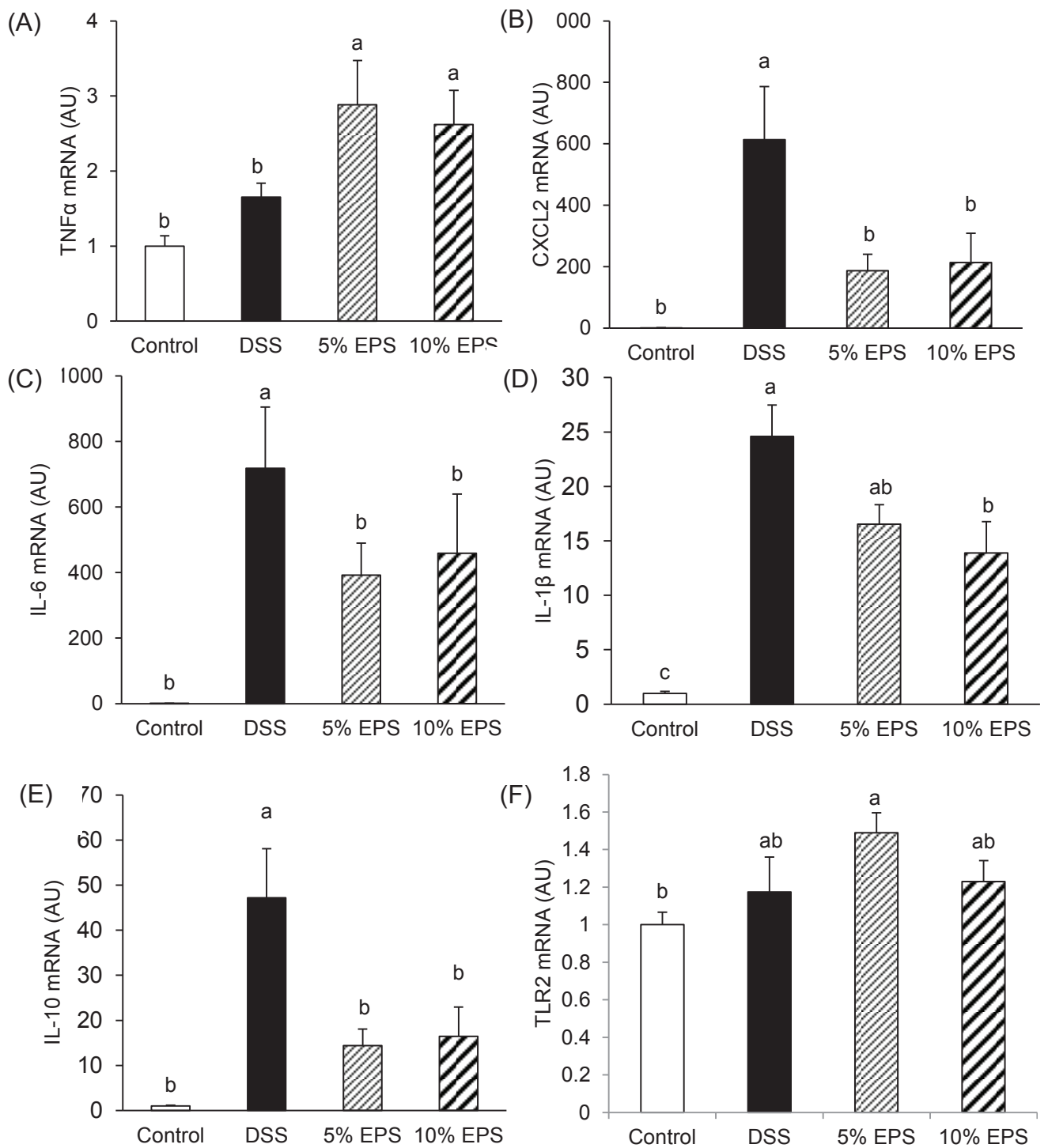


**Figure 4.3 Effects of EPS on the TJ protein expression in DSS-induced colitic mice.**

(A) Immunoblot analysis of TJ proteins, Occludin, Claudin-3, Claudin-7, ZO-1, and ZO-2, in colons of male BALB/c mice fed the FF, 5%EPS and 10% EPS diets with distilled water or DSS. Values are the means  $\pm$  SEM (n=7). Means without a common letter are different,  $p < 0.05$ . (B) Intercellular localization of TJ proteins, ZO-1, Claudin-3, and Claudin-7, in the colons of male BALB/c mice. The images are representatives of colons from 7 mice. Scale bar = 100 $\mu$ m.

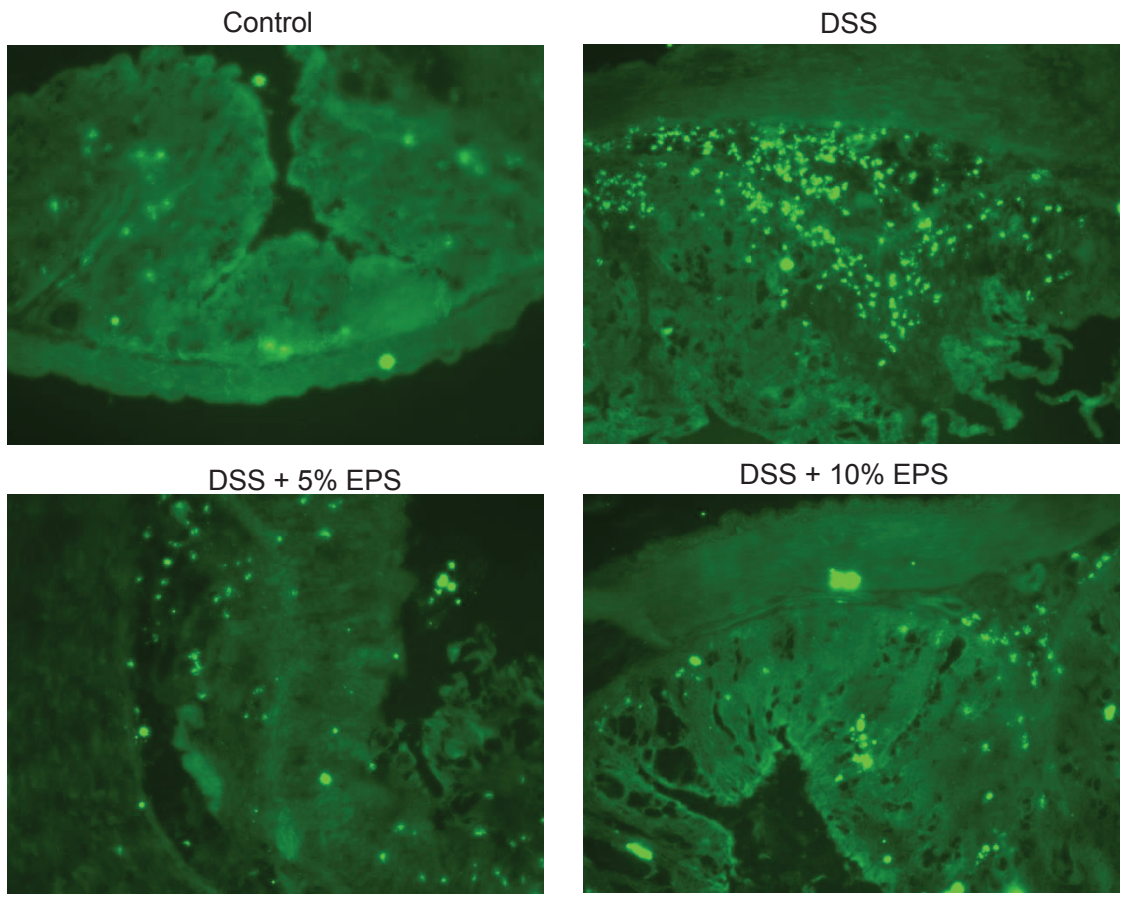
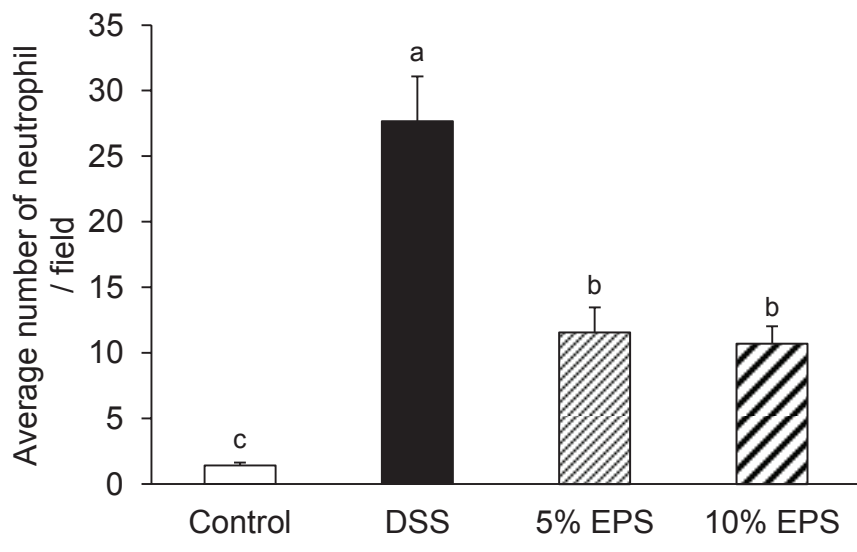






**Figure 4.4 Cytokine expression in the colon of DSS-induced colitic mice.**

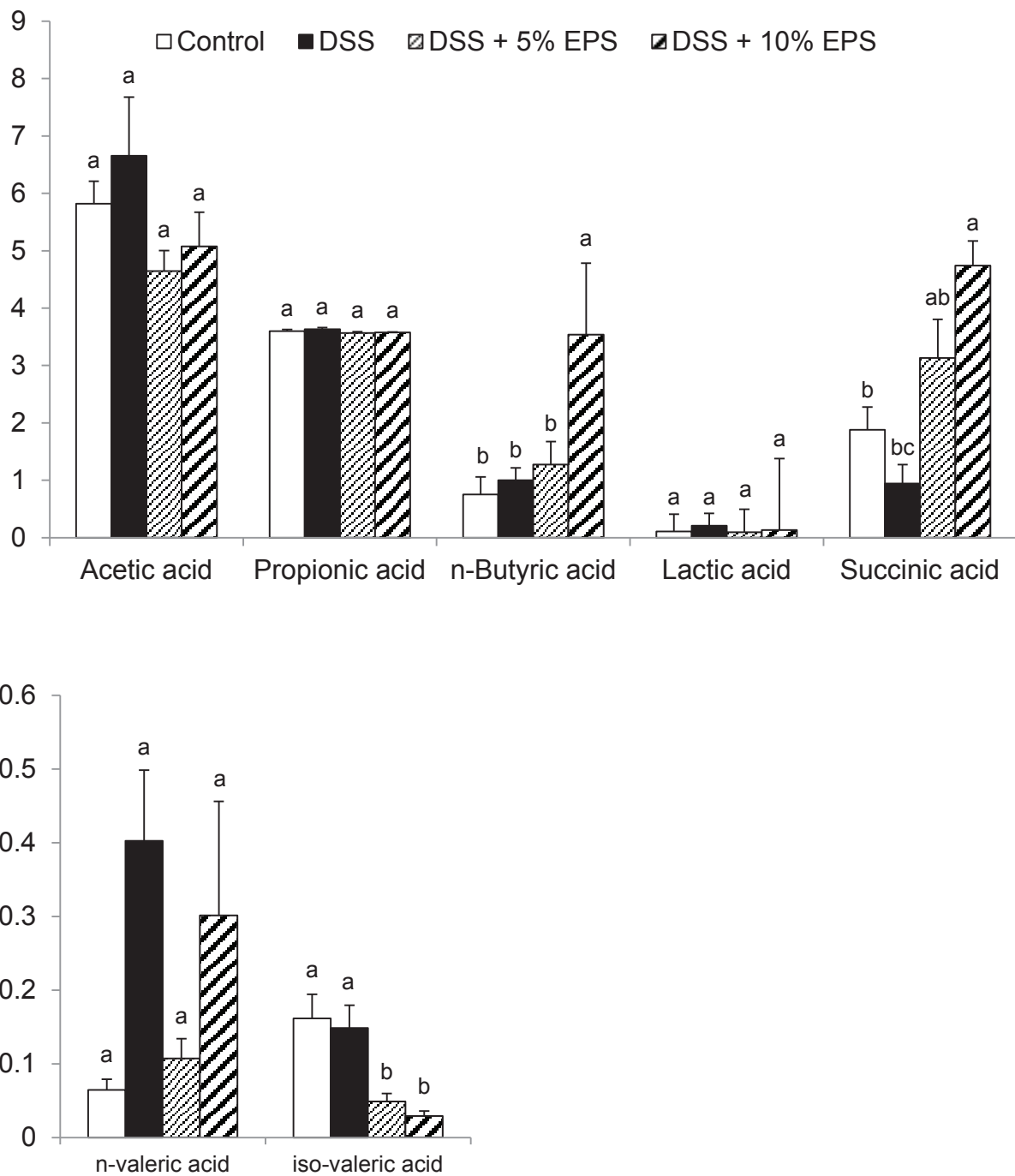
Gene expression of inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  (A), CXCL-2 (B), IL-6 (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-10 (E), and TLR2 (F), in the colons of male BALB/c mice fed the control, 5% EPS and 10% EPS diets with distilled water or DSS. Values are the means  $\pm$  SEM (n=7). Means without a common letter are different,  $p < 0.05$ .



**Figure 4.5 Anti inflammatory effects of EPS in the colon of DSS-induced colitic mice.**

The number of neutrophils was quantified. Values are the means  $\pm$  SEM (n = 7).  $p < 0.05$

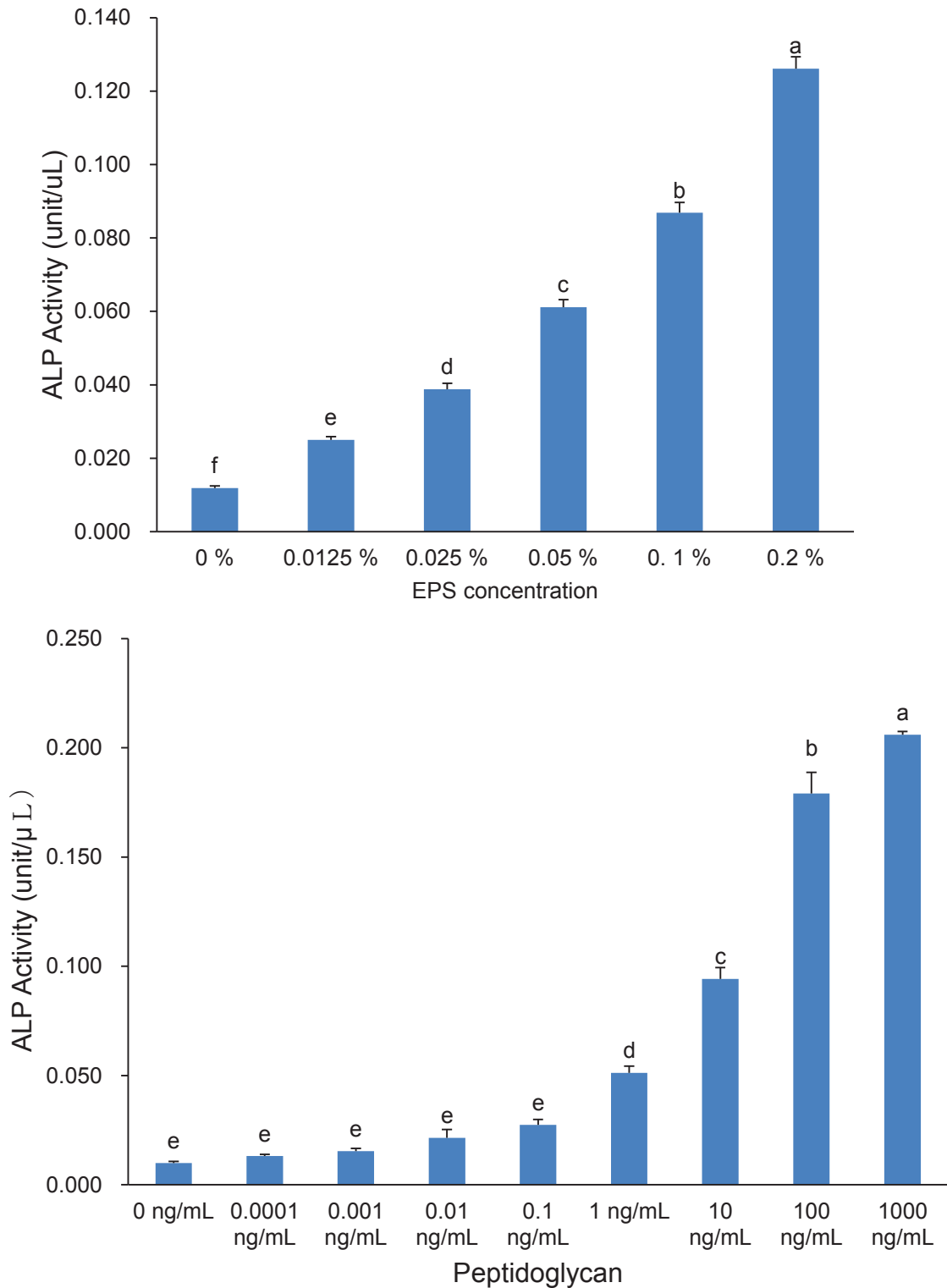
The images are representative of colons from 7 mice.



**Figure 4.6 Organic acid in faeces of DSS-induced colitic mice.**

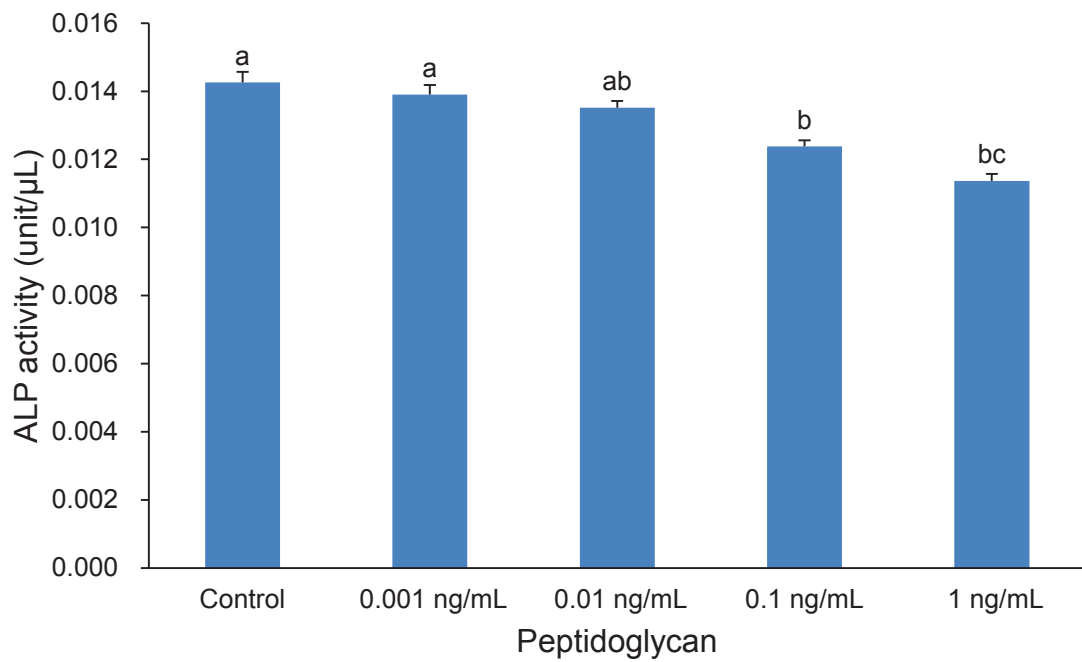
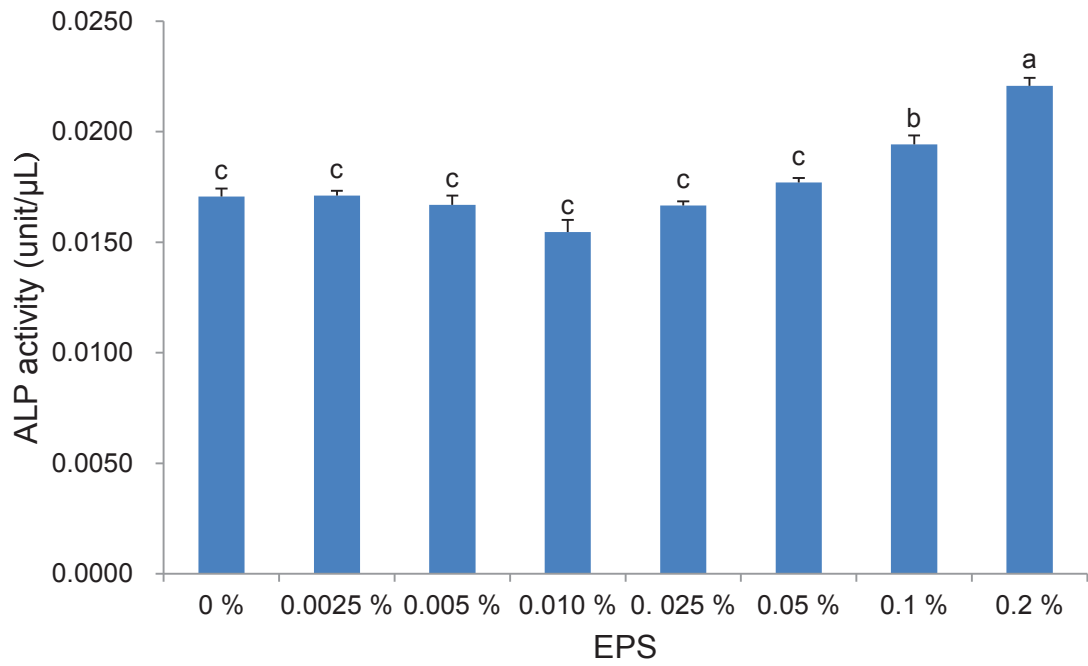
Organic acids concentrations in the faeces of mice fed the control, 5% EPS, and 10% EPS diets with water or DSS. Faeces were collected at day 4 of DSS administration. Faecal concentrations of acetic, propionic, n-butyric, lactic and succinic acids are shown. Values are the means  $\pm$  SEM (n=7). Means without a common letter different,  $p < 0.05$ .





**Figure 4.7 TLR2 ligand activity of EPS and peptidoglycan in HEK Blue h TLR2 cells.**

TRL2 ligand activity of EPS and peptidoglycan. Values are the means  $\pm$  SEM (n = 4).  $p < 0.05$ .



**Figure 4.8 TLR4 ligand activity of EPS and peptidoglycan in HEK Blue h TLR4 cells.**

TRL4 ligand activity of EPS and peptidoglycan. Values are the means  $\pm$  SEM (n = 4).  $p < 0.05$ .

## 第 5 章

### 総括

本研究は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、腸内細菌代謝産物である 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA)によるアトピー性皮膚炎軽減作用を検討した。また、DSS 誘導腸炎モデルマウスを用いて、*Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来の菌体外多糖(EPS)による抗炎症作用を検討した。

第 2 章ではアトピー性皮膚炎(AD)モデル NC/Nga マウスを用いて、HYA 摂取による炎症軽減作用について検討を行った。AD は慢性再発性の掻痒炎皮膚疾患であり IgE 産生の上昇や Th2 サイトカイン産生の増加を引き起こすことが知られている (43, 44)。HYA 摂取により AD 症状と相関関係にある血清 IgE の上昇を抑制し、皮膚病変部に生じる炎症を抑制した。また、アレルギー性炎症の主要メディエーターである肥満細胞の皮膚への浸潤を抑制していることが示唆された。さらに、HYA 摂取群の皮膚では、Control 群に比べて炎症性マーカーである TNF- $\alpha$  の遺伝子発現、NF $\kappa$ -Bp65 のリン酸化が抑制されていた。AD 発症要因の 1 つとして考えられている皮膚バリアの損傷の発現をみると、HYA 摂取群では、皮膚バリアにとって重要な TJ 分子である Claudin-1 の発現低下を抑制していた。したがって、機能性脂肪酸 HYA の摂取は、皮膚の炎症、Th1/Th2 バランス、バリア損傷の改善を通して、AD 症状を緩和することが示唆された。

皮膚における Claudin-1 の増加は、腸内 IgA 産生、腸内細菌叢、腸管免疫の Th1/Th2 バランスの影響を受けることから、HYA 抗 AD 作用は腸管機能を介して発現している可能性も考えられる。そこで、第 3 章では、腸管の Th1/Th2 バランス、糞中 IgA 産生量、腸内細菌叢の解析を実施した。HYA 摂取は、Th2 を負に調節する Th1 サイトカイン IFN- $\gamma$  および Th1 特異的転写因子である Tbet の小腸のパイエル板細胞での産生が上昇させ、Th2 へ誘導するサイトカイン IL-33 産生の抑制する傾向がみられた。HYA により Th1 優性に Th1 /Th2 バランスがシフトし、血清 IgE レベルを低下させたと考えられた。プロバイオティクスとして知られているガラクトオリゴ糖は腸内細菌叢を減少させ、IFN- $\gamma$  産生を増加させること(35)、さらに、IFN- $\gamma$  は *Lactobacillus* 属のバクテリアは Th1 応答を増強すること(36)、また、IgA 欠損マウスを用いて腸内細菌叢の調節において IgA が重要であること(37)、腸管 IgA が、主として免疫学的に微生物および Th2 応答を促進する食物抗原に対する防衛的役割として作用すること(38)、これらの知見と総合的にみると、HYA 摂取により、緩やかに腸内細菌叢に影響を与え、AD のようなアレルギー性疾患に対して予

防的に作用していると考えられる。さらに、Inoue らは、*Lactobacillus johnsonii* NCC533 の摂食による皮膚病変の減少は、腸内 IgA 産生を高めることを示しており(39)、臨床試験では、高い糞便 IgA レベルを有する幼児はアトピー性疾患の発生率が低いことが報告されている(44)。したがって、HYA 誘発 IgA 産生は、大腸内で直接腸内細菌叢に作用する経路とは異なった経路で抗アレルギー効果を発揮していると考えられる。

第4章では、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株が産生する EPS による大腸炎に対する軽減効果を探索した。腸管バリア機能の損傷を抑制し、DSS 誘導性大腸炎を軽減する大腸保護作用があることが示された。また、血中 LBP 濃度の上昇が抑制されたこと、TJ タンパク質発現量やその局在からも TJ バリア保護作用があることが示された。EPS による TJ 保護効果の分子機序は分からないが、近年、腸管上皮細胞において、菌体を認識する受容体の発現および機能は適切に制御されていることが分かっており、TLR2 に関しては、傷の回復や腸管上皮細胞間の接着を強化する作用があること、TLR に受容されていることが報告されている(39, 40)。したがって、EPS において、TLR が関与している可能性が考えられる。

本研究では、腸内で乳酸菌代謝産物 HYA の生理機能として、腸内細菌叢を穏やかに修飾すること、部分的に Th1 応答の増加および抗アレルギー効果に関与していることが提案された。また、乳酸菌が産生する EPS が、DSS 誘導性大腸炎に対して保護的な役割を發揮することを明らかにした。本研究で得られた知見は、乳酸菌が産生する新たな機能性物質の食品素材への開発の一助となることが期待される。

## 参考文献

1. Drago L, Toscano M, De Vecchi E, Piconi S, Iemoli E. Changing of fecal flora and clinical effect of *L. salivarius* LS01 in adults with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2012. 46(Suppl):S56-63.
2. Drell T, Larionova A, Voor T, Simm J, Julge K, Heilman K. Differences in gut microbiota between atopic and healthy children. *Current Microbiology*. 2015. 71(2):177-183.
3. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. *Gastroenterology*. 2014. 146(6):1489-1499.
4. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunencko T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, Punit S, Karlsson M, Bry L, Glickman JN, Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host & Microbe*. 2010. 8(3):292-300.
5. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013. 504(7480):446-450.
6. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Disease*. 2009. 15(8):1183-1189.
7. Llopis M, Antolin M, Carol M, Borrueal N, Casellas F, Martinez C, Espín-Basany E, Guarner F, Malagelada JR. *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflammatory Bowel Disease*. 2009. 15(2):275-283.
8. Kishino S, Takeuchi M, Park SB, Hirata A, Kitamura N, Kunisawa J. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. 110(44):17808-17813.
9. Martinasso G, Saracino S, Maggiora M, Oraldi M, Canuto RA, Muzio G. Conjugated linoleic acid prevents cell growth and cytokine production induced by TPA in human keratinocytes NCTC 2544. *Cancer Letters*. 2010. 287(1) 62-66.
10. Bergamo P, Gogliettino M, Palmieri G, Cocca E, Maurano F, Stefanile R. Conjugated linoleic acid protects against gliadin-induced depletion of intestinal

defenses. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011. 55 S248-S256.

11. Miyamoto J, Mizukure T, Park SB, Kishino S, Kimura I, Hirano K. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2015. 290(5):2902-2918.

12. Bello FD, Walter J, Hertel C, Hammes WP. In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001. 24(2):232-237.

13. Salazar N, Ruas-Madiedo P, Kolida S, Collins M, Rastall R, Gibson G, de Los Reyes-Gavilán CG. Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 2009. 135(3):260-267.

14. Makino S, Ikegami S, Kume A, Horiuchi H, Sasaki H, Orii N. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *British Journal of Nutrition*. 2010. 104(7):998-1006.

15. Matsuzaki C, Hayakawa A, Matsumoto K, Katoh T, Yamamoto K, Hisa K. Exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 as an immunostimulant to enhance the mucosal barrier and influence the systemic immune response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015. 63(31):7009-7015.

16. Matsuzaki C, Kamishima K, Matsumoto K, Koga H, Katayama T, Yamamoto K, Hisa K. Immunomodulating activity of exopolysaccharide producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas. *Journal of Applied Microbiology*. 2013. 116: 980-989.

17. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *Journal of Experimental Medicine*. 2009. 206(13):2937-2946.

18. Svoboda M, Bílková Z, Muthný T. Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *Journal of Investigative Dermatology*. 2016. 81(3):147-52.

19. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*. 2012. 18(5):693-704.

20. Nagashio Y, Matsuura Y, Miyamoto J, Kometani T, Suzuki T, Tanabe S. Hesperidin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice

by suppressing Th17 activity. *Journal of Functional Foods*. 2013. 5:1633-1641.

21. Correa da Rosa J, Malajian D, Shemer A, Rozenblit M, Dhingra N, Czarnowicki T. Patients with atopic dermatitis have attenuated and distinct contact hypersensitivity responses to common allergens in skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015. 135(3):712-720.

22. Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010. 130(11):2621-2628.

23. Suarez-Farinas M, Dhingra N, Gittler J, Shemer A, Cardinale I, de Guzman Strong C. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013. 132(2):361-370.

24. Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T, Korpela R, Poussa T, Savilahti E. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2010. 21(1 Pt 1):67-73.

25. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007. 446(7135):557-561.

26. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*. 1997. 9(3):461-466.

27. Segawa S, Hayashi A, Nakakita Y, Kaneda H, Watari J, Yasui H. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates the development of dermatitis and inhibits immunoglobulin E production in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008. 31(5):884-889.

28. Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S. Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. 113(28):E4061-4068.

29. Kikuchi Y, Yoshida H, Ogita T, Okita K, Fukudome S, Suzuki T. In vivo dose response and in vitro mechanistic analysis of enhanced immunoglobulin A production by *Lactobacillus plantarum* AYA. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2015. 34(3):53-58.

30. Ward JH. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*. 1963. 58: 236–244
31. Dorfman DM, Morgan EA, Pelton A, Unitt C. T-cell transcription factor GATA-3 is an immunophenotypic marker of acute leukemias with T-cell differentiation. *Human Pathology*. 2017. 65:166-174.
32. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2002. (12):933-944.
33. Watanabe J, Fujiwara R, Sasajima N, Ito S, Sonoyama K. Administration of antibiotics during infancy promoted the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2010. 74(2):358-363.
34. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology*. 1997. 159(4):1739-1745.
35. Tanabe S, Hochi S. Oral administration of a galactooligosaccharide preparation inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International Journal of Molecular Medicine*. 2010. 25(3):331-336.
36. Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel AB, Pestel J, Mercenier A. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002. 110(4):617-623.
37. Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunology*. 2012. 5(6):712-719.
38. Furuya Y, Kirimanjeswara GS, Roberts S, Metzger DW. Increased susceptibility of IgA-deficient mice to pulmonary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection. *Infection and Immunity*. 2013. 81(9):3434-3441.
39. Inoue R, Nishio A, Fukushima Y, Ushida K. Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. *British Journal of Dermatology*. 2007. 156(3):499-509.
40. Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilahti E. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2005. 16:65-71.



41. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009.296(5):G1140-1149.
42. Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010. Aug;69(3):381-389.
43. Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010. 125:S284-S296.
44. Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilahti E. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2005. 16(1):65-71.
45. Kiiski V, Karlsson O, Remitz A, Reitamo S. High serum total IgE predicts poor long-term outcome in atopic dermatitis. *Advances in Dermatology and Venereology*. 2015. 95: 943-947.
46. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011. 127(3):773-786.e1-7.

## 謝辞

広島大学大学院生物圏科学研究科教授 鈴木卓弥先生には指導教官として本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始丁寧かつ熱心なご指導、ご教示を賜りました。ここに深謝の意を表します。

研究を進めるにあたり、有益なご指導、ご助言を頂きました同研究科教授 島本整先生、浅川学先生、並びに諸先生方に深謝の意を表します。研究の端緒を開いてくださった元広島大学大学院生物圏科学研究科教授、現日清食品ホールディングス株式会社 田辺創一氏に深謝の意を表します。また、研究協力を賜りました日東薬品工業株式会社 研究開発本部 久景子様をはじめ、研究所の皆様に感謝の意を表します。

動物資源化学研究室の卒業生および在校生の皆様には、多くの協力と支援をいただき、心より感謝致します。最後に、研究生生活を支えてくれた家族に感謝します。

2018年3月 海切弘子