

博士論文

乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持作用に関する研究

平成 24 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

宮内 栄治

博士論文
乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持作用に関する研究

宮内栄治

博士論文

乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持作用に関する研究

平成 24 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

宮内 栄治

目次

略記	1
第1章 緒言	
1 腸管ホメオスタシス	2
2 腸管ホメオスタシスの破綻と炎症性腸疾患	2
2.1 炎症性腸疾患における腸管バリア機能の低下	3
2.2 炎症性腸疾患における T 細胞の異常	4
3 炎症性腸疾患に対する乳酸菌の効果	6
4 乳酸菌と生体との相互作用機序	8
5 本研究の目的および本論文の構成	9
第2章 乳酸菌による腸管バリア保護効果の解析	
1 序論	19
2 材料および方法	19
2.1 乳酸菌の培養	19
2.2 Caco-2 細胞培養	20
2.3 腸管バリア保護効果の評価	21
2.4 動物実験	22
2.5 ミエロペルオキシダーゼ活性の測定	23
2.6 マウスにおける腸管透過性の評価	23
2.7 大腸上皮細胞の単離	23
2.8 SDS-PAGE および Western blotting	24
2.9 統計処理	25

3	結果および考察	25
3.1	<i>Lactobacillus</i> 属の腸管バリア保護効果の比較	25
3.2	<i>L. rhamnosus</i> による腸炎抑制効果	26
3.3	<i>L. rhamnosus</i> による腸管バリア保護効果	27
3.4	<i>L. rhamnosus</i> による腸管バリア保護メカニズム	28
4	要約	29

第3章 腸管バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の同定

1	序論	38
2	材料および方法	38
2.1	乳酸菌の培養	38
2.2	腸管バリア保護効果の評価	38
2.3	菌体の酵素処理	39
2.4	SDS-PAGE および Western blotting	39
2.5	統計処理	39
3	結果および考察	39
3.1	<i>L. rhamnosus</i> 菌代謝産物および酵素処理菌体の腸管バリア保護効果	39
3.2	<i>E. hirae</i> の腸管バリア保護効果の評価	41
3.3	<i>E. hirae</i> 酵素処理菌体の腸管バリア保護効果	41
3.4	<i>E. hirae</i> 由来 LTA および TLR2 リガンドの腸管バリア保護効果	42
3.5	<i>E. hirae</i> 、LTA および PCSK の tight junction に及ぼす影響	43
4	要約	43

第4章 腸管バリア保護効果を高める乳酸菌培養法の確立

1 序論	52
2 材料および方法	52
2.1 乳酸菌の培養	52
2.2 テイコ酸中D-alanineの定量	53
2.3 Real-time PCR	53
2.4 腸管バリア保護効果の評価	54
2.5 統計処理	54
3 結果および考察	54
3.1 HPLCによるD-Alaの定量	55
3.2 菌培養条件の違いによるテイコ酸D-Ala量の変化	55
3.3 テイコ酸のD-Ala修飾と腸管バリア保護効果の関係	56
3.4 テイコ酸のD-Ala修飾促進による腸管バリア保護効果の増強	57
4 要約	58

第5章 乳酸菌による炎症性T細胞分化抑制効果

1 序論	67
2 材料および方法	67
2.1 乳酸菌の培養	67
2.2 動物実験	68
2.3 大腸組織のサイトカイン量測定	68
2.4 大腸上皮細胞の単離	69
2.5 脾細胞およびT細胞の単離	69
2.6 共培養	70
2.7 フローサイトメトリー	70
2.8 <i>in vitro</i> 細胞実験	71

2.9	Real-time PCR	71
2.10	統計処理	72
3	結果および考察	72
3.1	<i>B. infantis</i> による腸炎抑制効果	72
3.2	炎症上皮細胞による IFN- γ および IL-17 産生誘導	73
3.2.1	脾細胞からの IFN- γ および IL-17 産生誘導	73
3.2.2	CD4 ⁺ T 細胞からの IFN- γ および IL-17 産生誘導	74
3.3	<i>B. infantis</i> による Th1/Th17 細胞抑制効果	75
3.4	<i>B. infantis</i> による共刺激分子発現の制御	75
3.5	CD80 と CD40 を介した Th1/Th17 細胞の活性化	77
3.6	CD80 と CD40 を介した Th1/Th17 細胞活性化メカニズムの解明	78
4	要約	79
第 6 章 総括		
1	<i>L. rhamnosus</i> による腸炎抑制効果	93
2	<i>L. rhamnosus</i> の腸管バリア保護メカニズムの解明	93
3	<i>L. rhamnosus</i> および <i>E. hirae</i> の腸管バリア保護効果に 関わる活性成分	94
4	乳酸菌の腸管バリア保護効果を高める培養法	96
5	乳酸菌による炎症性 T 細胞抑制効果	97
5.1	DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける Th1/Th17 細胞 活性化メカニズム	97
5.2	<i>B. infantis</i> による Th1/Th17 細胞抑制メカニズム	98
6	まとめおよび今後の展望	98
	参考文献	103

略記

本論文で使用した主な略記は以下の通りである。

CD :	cluster of differentiation
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSS :	sodium dextran sulfate
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
FDAA :	N ^α -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-alaninamide
FITC :	fluorescein isothiocyanate
HBSS :	Hanks' balanced salt solution
HPLC :	high performance liquid chromatography
IBD :	inflammatory bowel disease
IEC :	intestinal epithelial cell
IFN-γ :	interferon-gamma
IL- :	interleukine-
LTA :	lipoteichoic acid
MHC :	major histocompatibility complex
MLCK :	myosin light chain kinase
MPO :	myeloperoxidase
PBS :	phosphate buffered saline
PCSK :	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄
Th :	helper T cell
TER :	transepithelial electric resistance
TLR :	Toll-like receptor
TNF-α :	tumor necrosis factor-alpha
Treg :	regulatory T cell
ZO-1 :	zonula-occludens-1

第1章

緒言

1 腸管ホメオスタシス

腸管は、摂取した食物の消化・吸収を担う器官であり、食物と同時に取り込まれる病原菌や毒素なども含む「異物」に常に暴露される器官である。また、腸管には 100 兆個もの腸内細菌が棲息しており、これらの微生物も生体にとっては「異物」である。このため、腸管には全免疫細胞の約 60%が集中しており、異物に対する生体防御システムとして、腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue, GALT）を構成している（Figure 1-1）(1)。GALT はパイエル板や腸管孤立リンパ小節などのリンパ節に加え、腸管上皮間リンパ球や粘膜固有層リンパ球などの消化管特異的な免疫細胞で構成されている。これには、微生物や食物抗原を取り込む樹状細胞やマクロファージといった自然免疫細胞と、T 細胞や B 細胞を含む獲得免疫細胞が含まれる。

このような、膨大な数の「異物」と「免疫細胞」が共存する腸管において、そのホメオスタシス維持に腸管上皮細胞が重要な役割を果たしている。腸管上皮細胞は、腸管腔内の異物と免疫細胞を隔てる物理的バリアとして機能し、異物の侵入を防いでいる。また、上皮細胞はムチンや抗菌ペプチドを産生するなど、生物学的バリアとしても機能している。さらに近年の研究では、上皮細胞はケモカイン、サイトカイン、共刺激分子を発現することで、免疫細胞の局在、活性化に寄与することが明らかにされている。

2 腸管ホメオスタシスの破綻と炎症性腸疾患

腸管ホメオスタシスが破綻した場合、腸内細菌などの異物に対して免疫細胞が過剰に応答し、慢性的な炎症が引き起こされる。炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease; IBD）はその代表的な疾患であり、我が国でも近年増加している

腸疾患の一つである。本疾患は、潰瘍性大腸炎とクローン病の二つの非特異的・慢性の腸疾患に分けられる。潰瘍性大腸炎は、大腸にのみ炎症がみられ、粘膜を中心とした表層の障害であるのに対し、クローン病では小腸も含め消化管のいずれの部位でも炎症がみられ、その炎症も全層性のことが多い。潰瘍性大腸炎の患者数は2009年時点で113,306人と報告されており、毎年おおよそ8,000人増加している。クローン病の患者数は、2009年には30,891人に達しており、毎年おおよそ1,500人増加している（難病情報センターのデータによる（Figure 1-2））。現時点では根本的な治療法はなく、日本においては特定疾患（難病）に指定されている。

IBD 発症の原因は未解明な部分が多く残されているが、近年の全ゲノム関連解析（genome-wide association study: GWAS）結果から IBD 発症に関わる感受性遺伝子がいくつか特定されており、腸管バリア機能の異常や T 細胞を中心とした獲得免疫システムの異常が IBD 病因の一つである可能性が示されている（Figure 1-3）（2）。さらに近年、腸管上皮細胞が免疫細胞を直接制御していることが示されており、腸管上皮-免疫細胞の相互作用が IBD の病因に関わっている可能性が考えられる。以下の節では、これらについて詳しく述べることにする。

2.1 炎症性腸疾患における腸管バリア機能の低下

腸管上皮細胞の機能のうち、最も重要なものが物理的バリア、即ち tight junction による物質透過性の制御である。隣接する上皮細胞同士は、tight junction によって強固に結合しており、栄養素、イオン、水分の透過を制御すると同時に、微生物などの異物の侵入を防いでいる(3, 4)。Tight junction は50種類以上のタンパク質から構成され、occludin や claudin ファミリーなどの膜貫通タンパク質が zonula occludens-1 (ZO-1) などのアダプタータンパク質を介してアクチン細胞骨格と結合している(5, 6) (Figure 1-4)。近年の研究により、

食品成分(7, 8)、微生物(7, 9)、サイトカイン(10)など、種々の因子が tight junction の機能に影響を与えることが明らかになってきている。このように、tight junction による物質透過制御は種々の因子から影響を受け変化することから、tight junction 構造を正常に保つことが、腸管ホメオスタシス維持において重要であると考えられる。

腸管バリア機能の異常による物質透過性の亢進は、炎症性腸疾患 (IBD) (11) や過敏性腸症候群(12)、さらには、食物アレルギー(13)、アトピー性皮膚炎(14) など、あらゆる疾患患者において確認されている。特に近年、IBD に関する研究は盛んに行われており、モデル動物を用いた研究などにより、腸管バリア機能の異常が IBD の病因の一つであることが示されている(15)。実際、IBD 患者の腸管上皮細胞において、tight junction 構成タンパク質の発現・異常が多数報告されている(15-19)。さらに、物質透過性の増加は、IBD の重篤度と相関し、また、炎症再発の兆候として観察される(20)。IBD 患者や IBD モデル動物の腸管において、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの過剰産生が報告されており(21-24)、これらの炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、tight junction 構成タンパク質の発現・局在異常を引き起こされる(25-27)。従って、これらの炎症性サイトカインによるバリア機能の低下を抑制することは、IBD 発症予防・緩和に有効であると考えられる。

2.2 炎症性腸疾患における T 細胞の異常

T 細胞は獲得免疫の中心的役割を果たすリンパ球であり、発現する抗原分子の違いからヘルパーT細胞 (CD4⁺) とキラーT細胞 (CD8⁺) に分けられる。ヘルパーT (Th) 細胞はそのサイトカイン産生パターンの違いから、Th1 細胞、Th2 細胞、および Th17 細胞と、これらの活性化を抑制する Treg 細胞 (naturally occurring regulatory T cells; nTreg 細胞, inducible regulatory T cell; iTreg 細胞, Tr1 細胞, Th3 細胞を含む) に分けられる(Figure 1-5)(28)。これらの炎症性、制

御性 Th 細胞のバランスにより、腸管免疫のホメオスタシスが保たれている。Th細胞の抗原特異性の獲得や活性化には、サイトカインによるシグナルの他に、2つの独立したシグナルが必要である (Figure 1-6)。1つ目は、抗原ペプチドが結合した主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 分子によるシグナルで、これにより Th 細胞は抗原特異性を獲得する。2つ目は、共刺激分子による補助シグナルである。共刺激分子の種類により作用は異なり、Th 細胞に活性化シグナル、または抑制シグナルが送られる(29)。これらのシグナルは、樹状細胞などの抗原提示細胞により活性化されるが、近年、腸管上皮細胞も T 細胞と相互作用し、これらのシグナルを活性化することが明らかとなってきた(30-33)。

1986 年に Th 細胞が Th1 および Th2 細胞に分化することが発見されて以来 (34, 35)、クローン病は Th1 細胞の、潰瘍性大腸炎は Th2 細胞の過剰反応により引き起こされると理解されてきた。2000 年に入り、新たに同定された Th17 細胞が自己免疫疾患などの多くの疾病に関与していることが報告され(36, 37)、IBD と Th17 細胞の関係について、盛んに研究が行われてきた。Th17 細胞は本来、病原菌を含む腸内細菌に対する防御機構として重要な役割を果たしている。しかし、Th17 細胞の過剰な活性化は、腸管を含むあらゆる組織の炎症に繋がると考えられる。実際に、IBD 患者の腸管組織や血中において Th17 細胞関連サイトカインが過剰に産生されており(38, 39)、Th17 細胞が腸炎発症に関与していることが強く示唆されている。このことは、GWAS 解析の結果からも支持される。Figure 1-3 に示すように、Th17 分化・活性化に関わる多くの遺伝子が、IBD 感受性遺伝子として特定されている。IBD モデル動物を用いた研究においても、Th17 細胞が腸炎惹起に寄与していることが示されている。T 細胞移入大腸炎モデル (リンパ球を欠損した免疫不全マウスに T 細胞を移入することで大腸炎を誘導) に Th17 細胞を移入することで、より重篤な腸炎が惹起される(40)。また、同モデルに Th17 分化を阻害した T 細胞を移入した場合、腸炎を発症し

ない(41)。さらに、IL-17 欠損マウスにおいては、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎が軽減される。Th17 細胞が腸炎発症に寄与するメカニズムについては不明な点が残されているが、これらの結果から、Th17 細胞反応を抑制することが腸炎抑制に有効であることが示唆される。

これらの腸管バリア機能の低下と T 細胞異常などの過剰な免疫反応は互いに影響しあい、慢性的な腸炎が引き起こされると考えられる。即ち、腸管バリア機能低下による腸内細菌の侵入が過剰な免疫反応を引き起こし、免疫細胞から過剰産生されたサイトカインにより腸管バリア機能の低下が誘導される (Figure 1-7) (42)。

3 炎症性腸疾患に対する乳酸菌の効果

上記に述べたように、IBD は腸内細菌に対する過剰な免疫応答によって引き起こされると考えられている。しかし近年、一部の腸内細菌やプロバイオティクスは、IBD 発症の予防・緩和に有効であることが明らかになってきており、臨床試験によりその効果が確認されている(43)。これらの知見をもとに、ヨーロッパではプロバイオティクスが補完代替医薬として IBD 患者に用いられている(44)。特に、lactobacilli や bifidobacteria といった乳酸菌は、プロバイオティクスとして多くの研究が行われ、生体に有益な機能が数多く報告されている。

乳酸菌とは、発酵により乳酸を産生する細菌群の総称であり、人・動物の腸管以外にも広く自然界に分布している。また、安全性が高いために発酵食品の製造に多く用いられ、ヨーグルトを代表とする乳発酵食品をはじめ、日本では味噌、醤油、日本酒、漬物など多岐にわたって利用されている。

以前、プロバイオティクスは「腸内微生物のバランスを改善することにより宿主に有益に働く生菌添加物」と定義されていた(45)。しかし、乳酸菌などの死菌体や菌生成物が免疫調節機能などを有することが明らかとなり、現在では、プロバイオティクスは「食品としてあるいは他の応用例として宿主の健康増進

効果が期待しえる生きた微生物菌体あるいは生きた微生物を含む食品、菌体成分である」と広義に捉えられている(46)。

IBD 患者に対する乳酸菌の腸炎抑制メカニズムは不明な点が多く残されているが、以下のようなメカニズムが推定される。

(a) 腸内細菌叢の改善

乳酸菌による腸内細菌叢の改善効果は、以前より盛んに研究が行われてきた。一般に、*lactobacilli* や *bifidobacteria* などの善玉菌の投与により、*Escherichia coli* などの増殖が抑制され、宿主にとって有益な効果が期待できる。IBD モデル動物においても、VSL#3 (*lactobacilli* や *bifidobacteria* などの複数の乳酸菌株からなる製剤) の投与による腸内細菌叢の変化が確認されている(47, 48)。しかし、プロバイオティクスによる腸内細菌叢の変化が、IBD においてどのような影響をもたらすのか、今のところ明らかになっていない。

(b) 腸管免疫システムの制御

プロバイオティクスを含む多くの微生物は、免疫細胞に作用し、腸管免疫システムの制御などに寄与することが知られている。プロバイオティクスに感作された樹状細胞は、抗炎症作用を有する制御性の樹状細胞に分化する(49)。この樹状細胞は、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを高産生する制御性 T 細胞の分化を誘導し、腸炎抑制に寄与する(49)。IBD 患者の腸管生検体を用いた研究では、プロバイオティクスが TNF- α や IL-8 といった炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制することが確認されている(50)。

(c) 腸管バリア機能の保護

プロバイオティクスは、腸管上皮細胞に作用し細胞内シグナル伝達を制御し、抗菌ペプチドやムチンなどによる生物学的バリアを強化する(51, 52)。さらに、プロバイオティクスが *tight junction* のバリア機能を正常に保つことも報告されている。*Enteropathogenic Escherichia coli* などの病原菌は、*tight junction* 構

成タンパク質の発現を低下させることによりバリア機能を低下させるが(53)、プロバイオティクスは病原菌によるバリア機能低下を抑制する(54)。また、TNF- α や IFN- γ によるバリア機能の低下を抑制することも報告されており(55, 56)、プロバイオティクスは腸炎抑制に重要な役割を果たしていることが示唆される。

4 乳酸菌と生体との相互作用機序

上記に述べたように、乳酸菌は生体の免疫細胞や上皮細胞と相互作用することにより、腸炎抑制効果を発揮すると考えられる。乳酸菌の免疫細胞との相互作用には、マクロファージや樹状細胞が重要な役割を担っている。パイエル板や腸管孤立リンパ小節の上皮細胞層には、M 細胞などの特殊な円柱上皮細胞が存在する (Figure 1-1)。腸管腔に存在する腸内細菌などの抗原は M 細胞からリンパ節に取り込まれる。乳酸菌もこの経路を介し、リンパ節に存在するマクロファージや樹状細胞に認識される(57)。また、樹状細胞は、上皮細胞間から腸管腔に樹状突起と伸ばして乳酸菌を含む腸内細菌を捕捉する(58)。マクロファージや樹状細胞は Toll-like receptor (TLR) を発現しており、乳酸菌などの微生物やウイルスの構成成分を認識する。TLR は、いくつかのファミリーを形成する膜タンパク質受容体であり、現在までにヒトで 10 種、マウスで 13 種が同定されている (Figure 1-8) (59)。それぞれの TLR は異なる微生物・ウイルス成分を認識し、異なる免疫反応を誘導する。

また、腸管上皮細胞もいくつかの TLR ファミリーを発現しており、乳酸菌などの微生物を認識することが明らかになっている (Table 1-1) (60)。また、乳酸菌が産生するペプチドや有機酸も腸管上皮細胞に影響を与えることが報告されている(61, 62)。しかし、このような乳酸菌の菌体成分 (TLR リガンド) や菌代謝産物が腸炎抑制にどのように関与するのか、未だに不明瞭な点が残されている。

5 本研究の目的および本論文の構成

上記に示したように、乳酸菌は様々な腸管ホメオスタシス維持効果を有し、IBD 発症の予防や緩和に有効であることが示唆されている。しかし、乳酸菌の腸炎抑制メカニズムや活性成分については不明な点が多く残されており、IBD などの疾患に対するプロバイオティクス療法を確立するためには、これらの解明が必須である。

そこで本研究は、乳酸菌は腸管バリア保護効果や炎症性 T 細胞抑制効果を介して腸管ホメオスタシスを維持し、腸炎を抑制するのではないかと考え、そのメカニズム解明を試みた。

第 2 章では、乳酸菌の腸炎抑制効果および腸管バリア保護メカニズムについて解析を行った。第 3 章では、乳酸菌の腸管バリア保護効果に関わる活性成分について検討し、その一つとしてリポテイコ酸を見出した。第 4 章では、リポテイコ酸の D-alanine 修飾に着目し、乳酸菌の腸管バリア保護効果を高める培養法を検討した。第 5 章では、乳酸菌による炎症性 T 細胞抑制効果について検討を行った。そして最後に、第 6 章で本研究を総括した。なお、本研究の内容は、*Letters in Applied Microbiology* (Vol. 46, No. 4, pp. 469-476, 2008) と *Journal of Dairy Science* (Vol. 92, No. 6, pp. 2400-2408, 2009) (第 2 章・第 3 章) および、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (Vol. 76, 印刷中, 2012) (第 4 章) に掲載されたことを付記する。

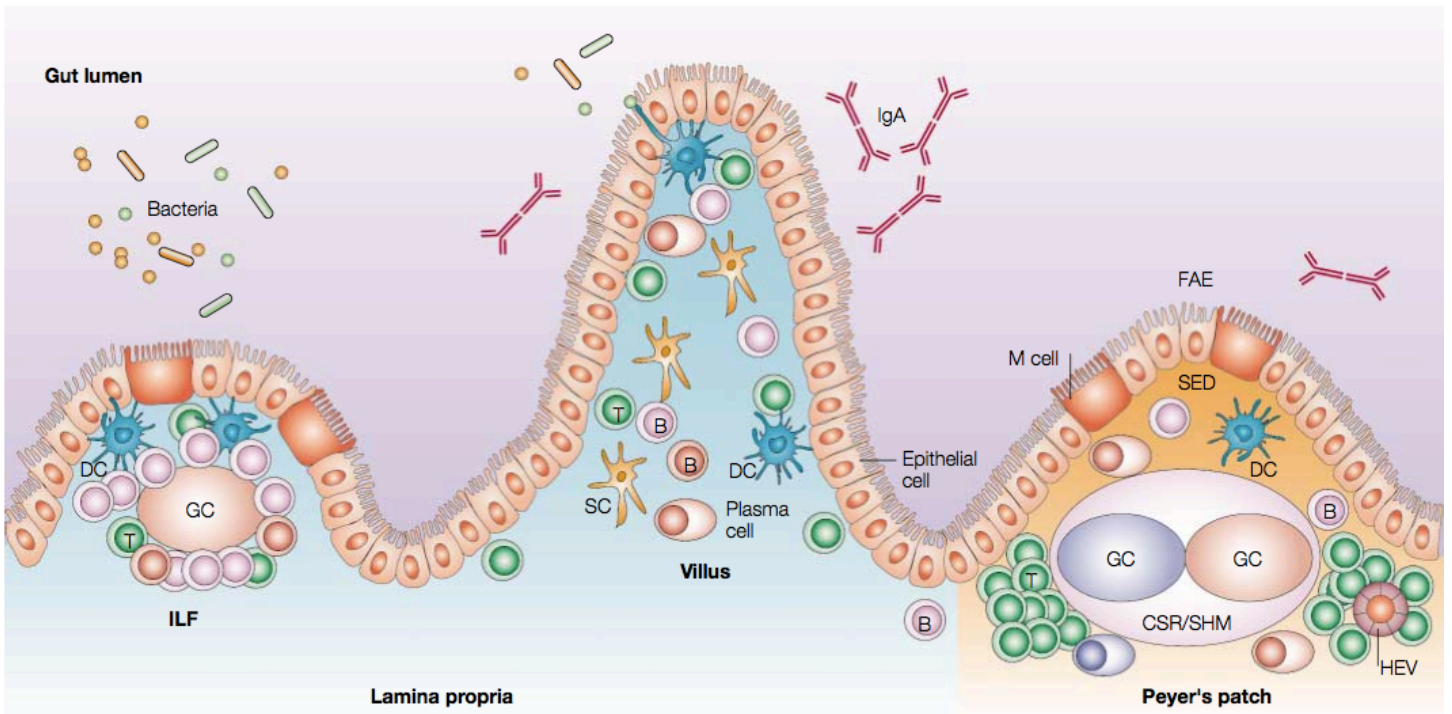


Figure 1-1 Gut-associated lymphoid tissue (cited from reference 1)

Peyer's patches and isolated lymphoid follicles (ILF) are composed of specialized follicle-associated epithelium (FAE) containing M cells, subepithelial dome (SED) rich in dendritic cells (DCs), and germinal center (GC). Class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) occur mainly in GC-B cells. Lymphocytes, including T and B cells, enter the Peyer's patches through high endothelial venules (HEV). The diffuse tissues of the lamina propria contain a large number of plasma cells, T and B cells, macrophages, dendritic cells (DC) and stromal cells (SC).

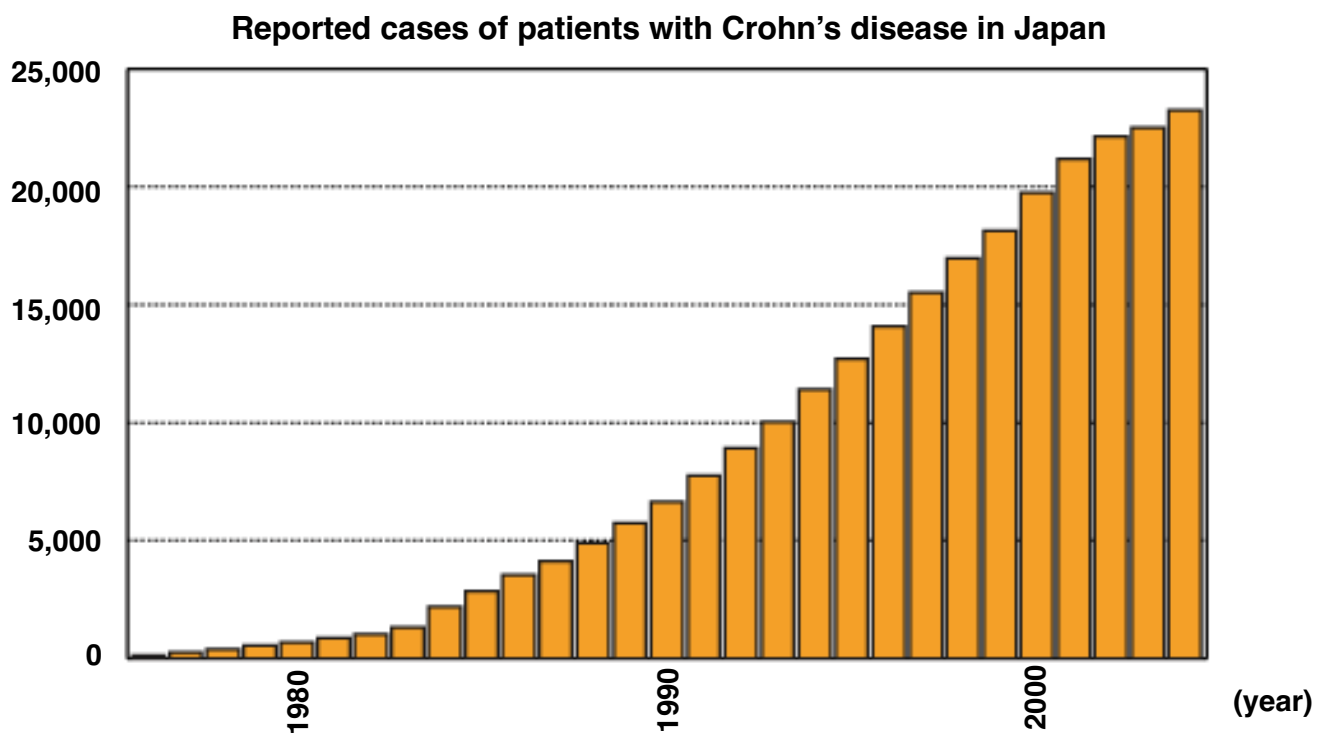
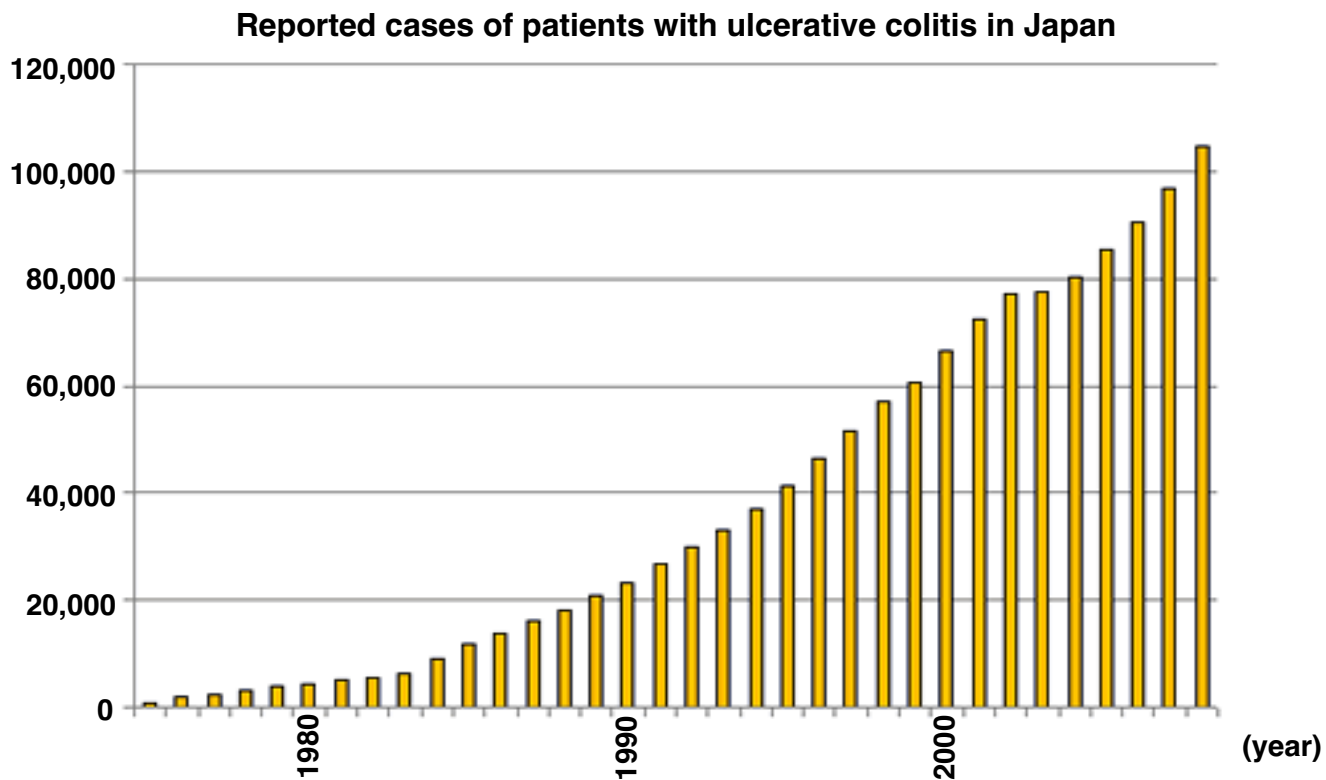


Figure 1-2 Transition of number of patients with IBD
(cited from the web pages of Japanese Intractable Diseases Information Center)

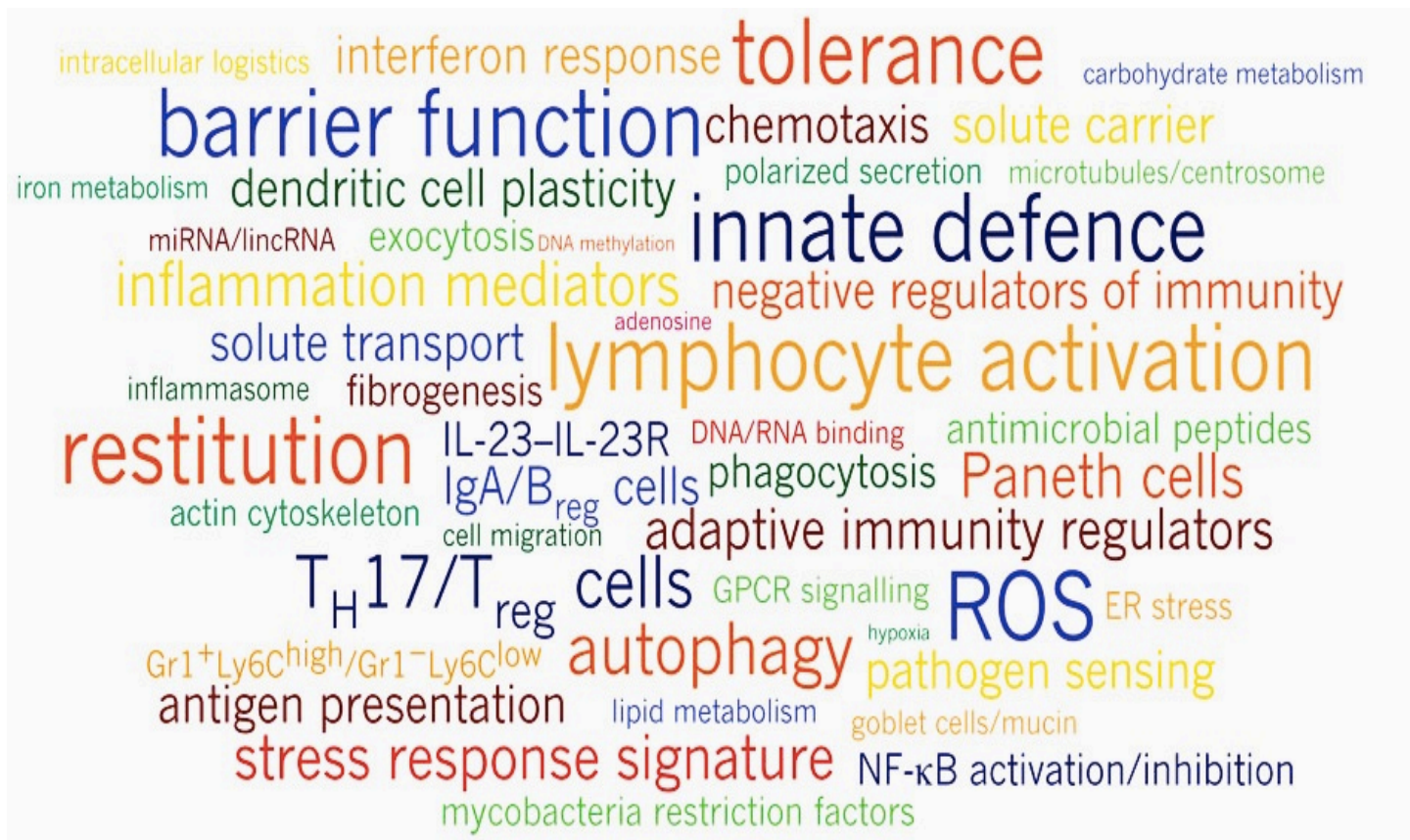


Figure 1-3 Recurring terms illustrating biological processes implicated by at least three genes represented in IBD loci

Font sizes are proportional to the number of genes associated with each respective process.

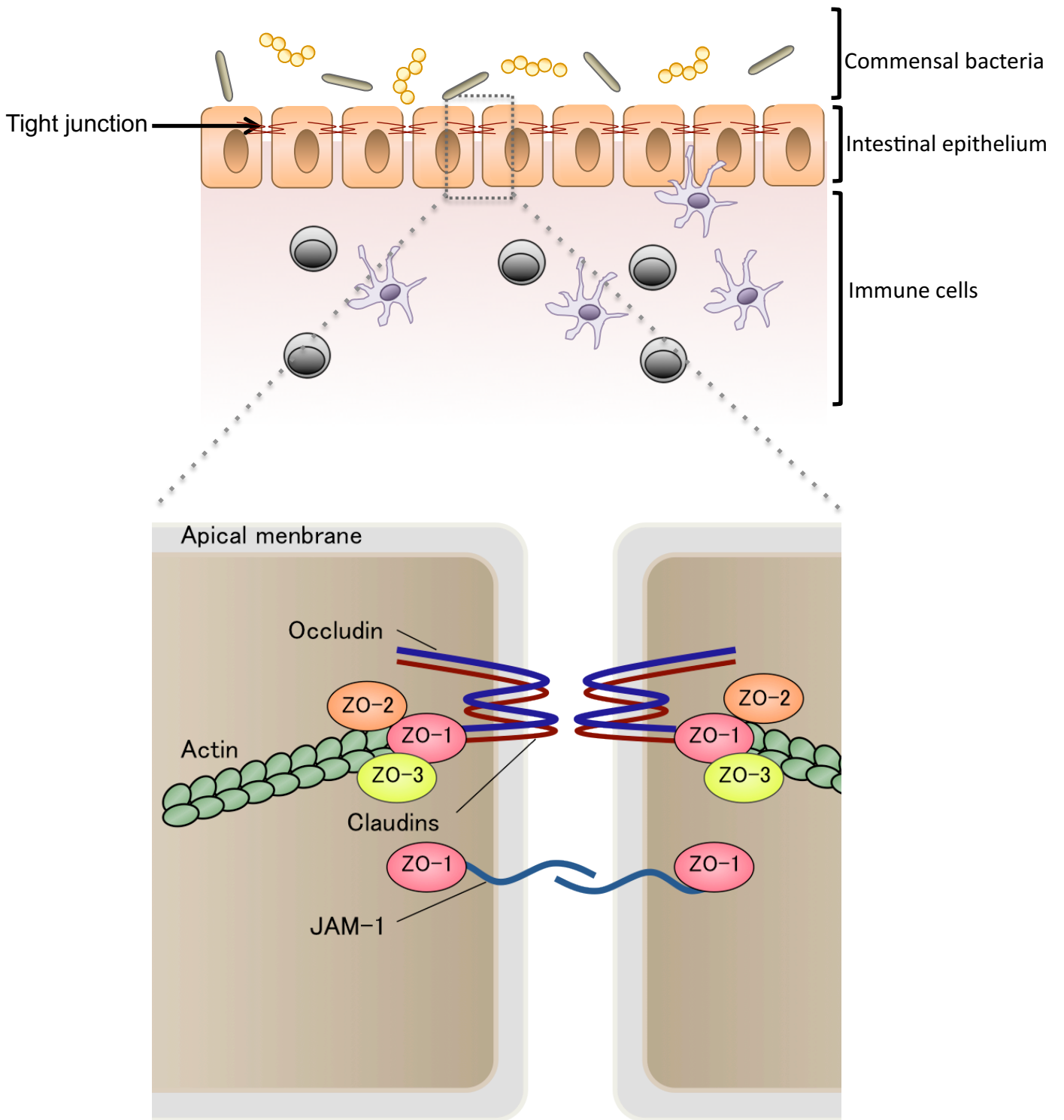


Figure 1-4 Structure of tight junction

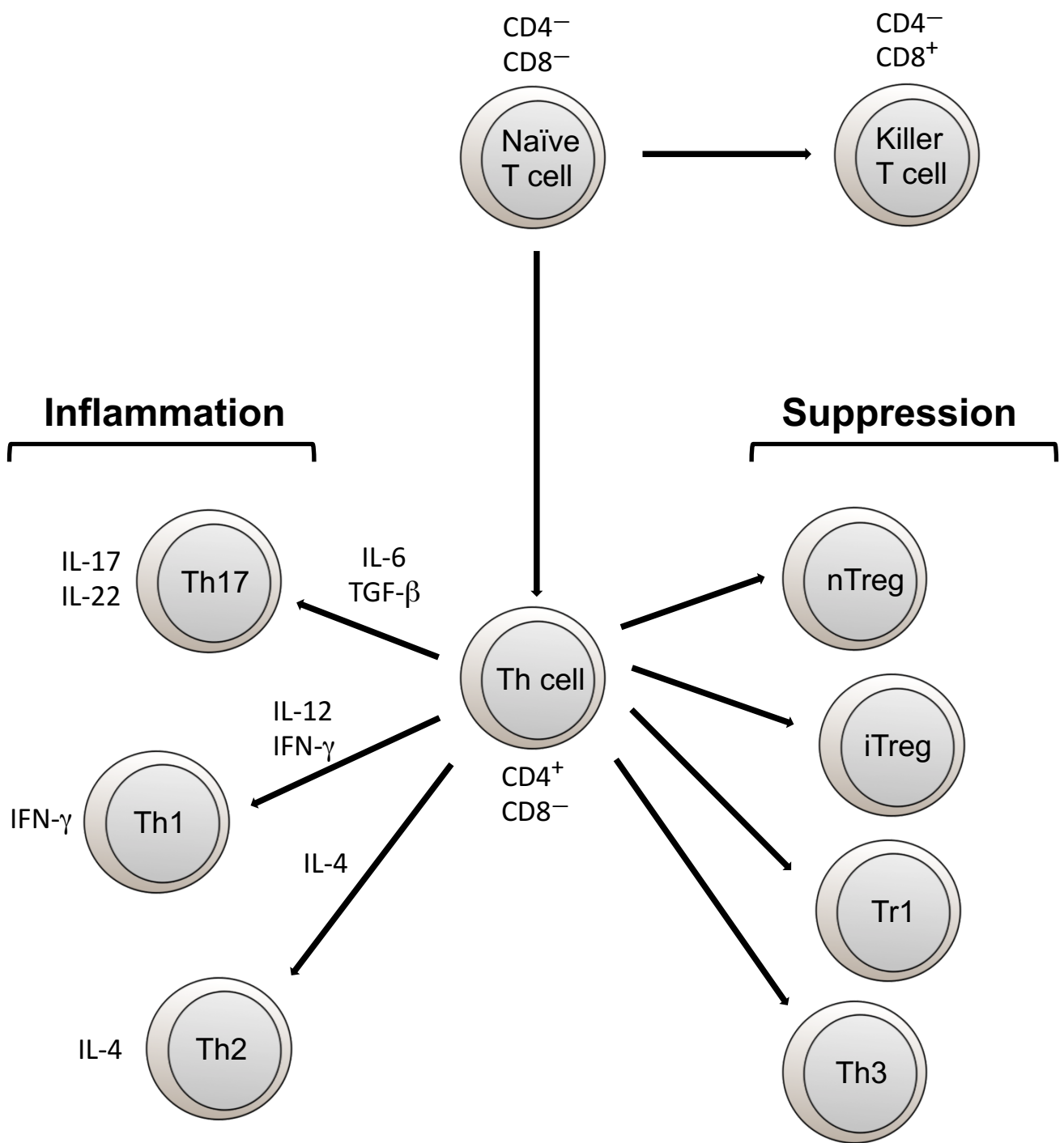


Figure 1-5 Differentiation of T cells

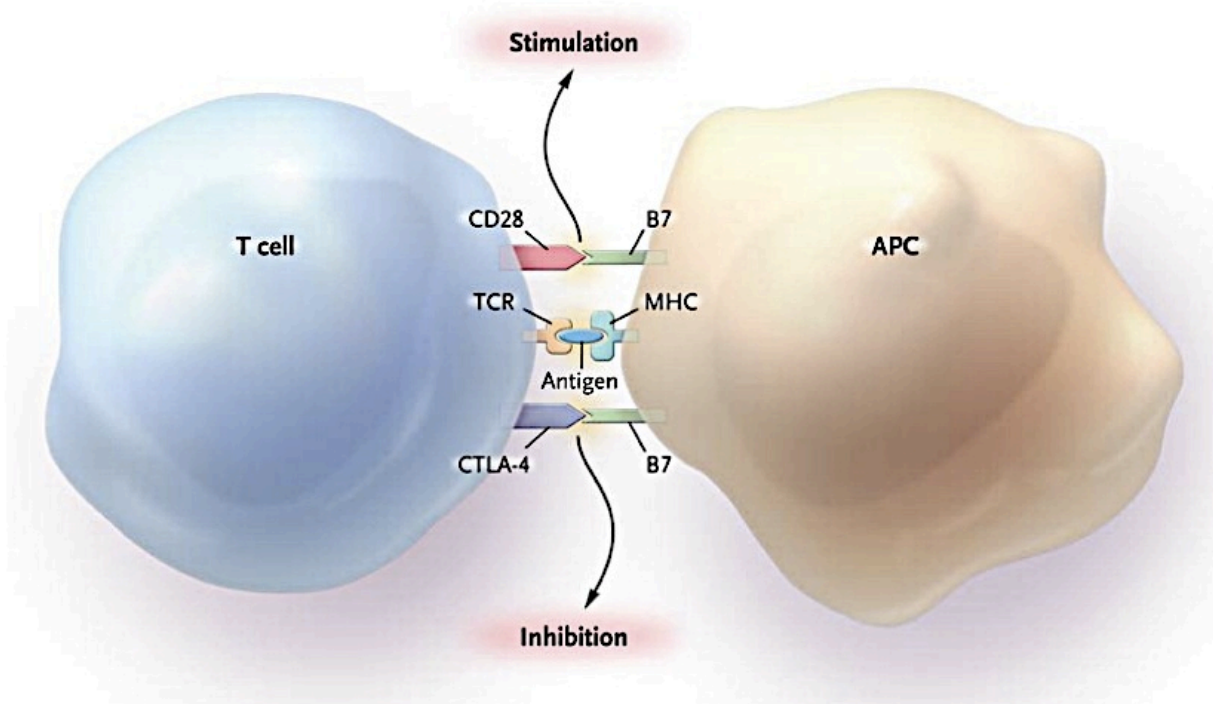


Figure 1-6 Activation of T cell by antigen-presenting cell (APC) (cited from reference 29)

T cell activation requires two signals. The first signal is provided by interaction of the T cell receptor (TCR) with antigenic peptide presented on major histocompatibility complex (MHC) molecules. The interaction of costimulatory molecules, such as CD28 and B7, provide the second signal.

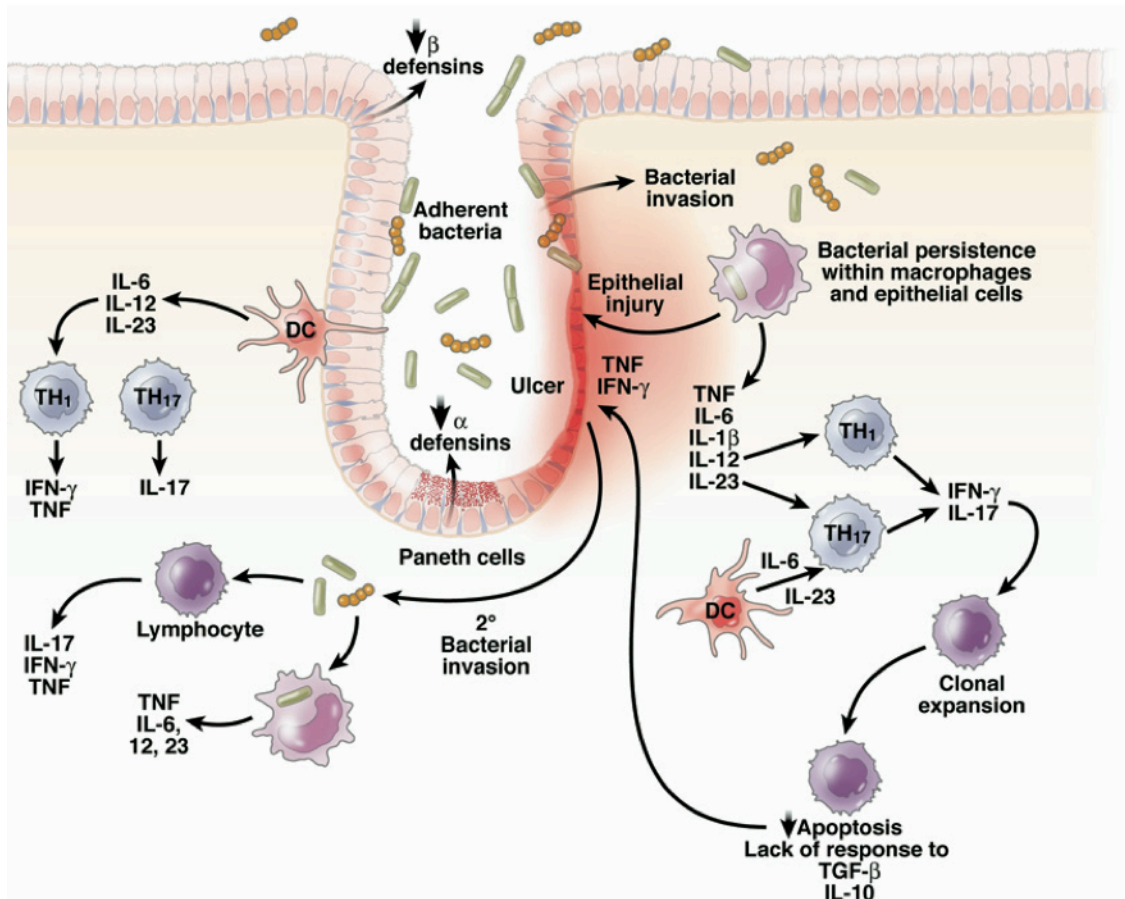


Figure 1-7 Relationship between intestinal barrier dysfunction and abnormal immune responses (cited from reference 43)

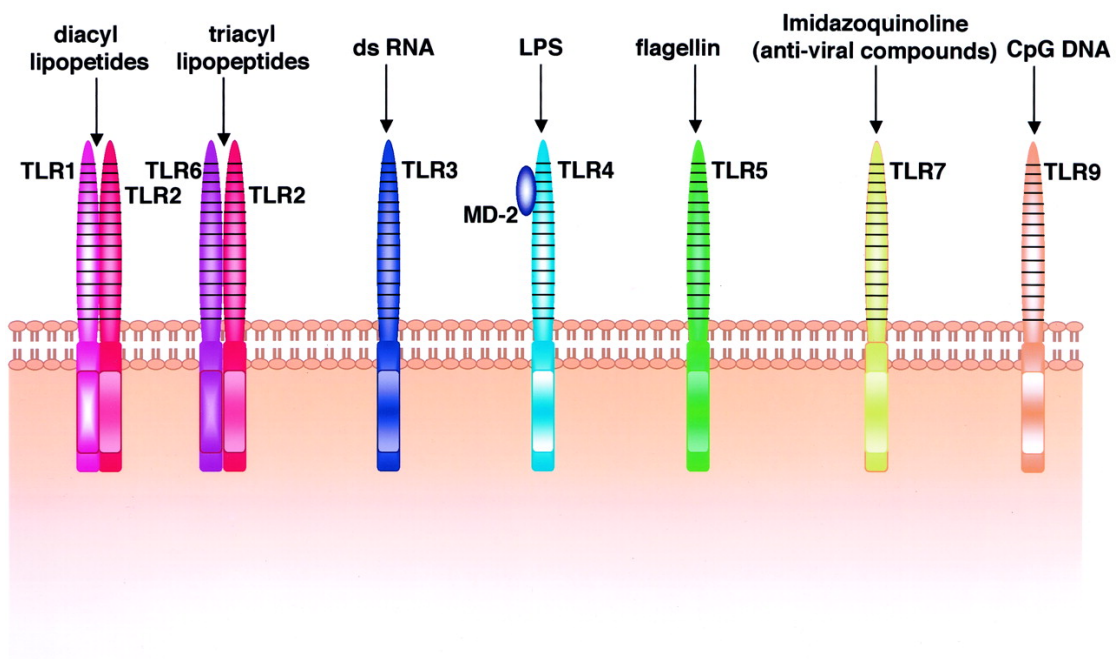


Figure 1-8 Toll-like receptor (TLR) family (cited from reference 60)

Table 1-1 Expression of Toll-like receptor (TLR) family in human intestinal epithelium
(modified from reference 61)

	Small intestine		Colon	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein
TLR1	●		●	
TLR2	●	●	●	●
TLR3		●	●	●
TLR4	●	●	●	●
TLR5		●	●	●
TLR6			●	
TLR7	●		●	
TLR8	—	—	●	
TLR9		●	●	
TLR10			—	—
TLR11				

● : Expression was observed at mRNA and/or protein level.

— : Absent expression was confirmed.

blank : Expression has not been tested

第2章

乳酸菌による腸管バリア保護効果の解析

1 序論

第1章で述べたように、ある種の乳酸菌が炎症性腸疾患の症状を緩和する作用を有することが近年明らかとなってきた(43)。乳酸菌の腸炎抑制効果については、ヒトでの臨床試験の他、炎症性腸疾患モデルマウスやラットを用いた動物実験により評価されており、メカニズムの解明も盛んに行われてきている。このような *in vivo* 試験では、乳酸菌による炎症性サイトカインの産生抑制効果、抗炎症性サイトカインの産生促進効果などの免疫調節作用が明らかになっているものの、乳酸菌の腸管バリア保護効果が腸炎抑制効果に寄与するか否かについては、*in vivo* 試験で詳細な検討はなされていなかった。

乳酸菌の中でも *Lactobacillus* 属は、ヨーグルトなどの乳発酵食品に広く用いられており、その安全性から機能性食品の開発に適した菌といえる。そこで本章では、tight junction のイオン透過性の指標として経上皮電気抵抗 (transepithelial electric resistance; TER) 値を測定することにより(69)、*Lactobacillus* 属 4 菌株のバリア保護効果を *in vitro* 試験で比較した。また、炎症性腸疾患モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate; DSS) 誘導性腸炎マウスを用いて *in vivo* でのバリア保護効果を解析することを目的とした。さらに、tight junction 構成・調節タンパク質の発現変化を解析することにより、*Lactobacillus rhamnosus* による腸管バリア保護メカニズムの解明を試みた。

2 材料および方法

2-1 乳酸菌の培養

(株) 明治乳業保有の *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* no. 3、*Lac-*

tobacillus casei no. 9、*Lactobacillus gasseri* no. 10、および *L. rhamnosus* OLL2838 を試験に供した。各乳酸菌は MRS 培地 (Becton Dickinson) で 37°C、嫌気条件下 (アネロパック、三菱ガス化学) で 18 時間培養した。菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) で 3 回洗浄後、 10^8 cells/ml となるように PBS に懸濁し、試験に用いるまで -80°C で保存した。加熱死菌体は、蒸留水に懸濁した乳酸菌を 75°C で 1 時間加熱後、凍結乾燥することにより調製した。

2-2 Caco-2 細胞培養

In vitro 試験には Caco-2 細胞 (ATCC HTB-37, American Type Culture Collection (ATCC)) を用いた。細胞培養用の培地として、10% 牛胎仔血清 (ICN Biochemicals, Inc.)、1% 非必須アミノ酸 (Life Technologies)、100IU/ml ペニシリン (Life Technologies)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Life Technologies) および 50 μ g/ml ゲンタマイシン (Life Technologies) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (以下 DMEM, Life Technologies) を用いた。まず Caco-2 細胞を、75cm² の組織培養フラスコで約 70~80% コンフルエントになるまで培養した。次いで、12 穴トランズウェル (Transwell) 細胞培養チャンバー (直径 12mm、孔径 0.4 μ m、透過性膜を有する) に Caco-2 細胞を 2×10^5 cells/cm² の濃度で接種し、5% CO₂、37°C にて約 14~21 日間培養して Caco-2 単層細胞を得た。

上記の方法にて作成した Caco-2 単層細胞において、十分に tight junction が形成されているかどうかを確認するために、Caco-2 単層細胞の経上皮電気抵抗 (transepithelial electric resistance; TER) を測定した。Ag/AgCl 電極を用いた抵抗値測定システム (Millicell-ERS, Merck) を用い、経上皮電気抵抗が約 300 Ω · cm² 以上のものをアッセイに用いた。各ウェルをクラスタープレート上に設置し、外側培養液 (基底側、1.5ml) と内側培養液 (管腔側、0.5ml) を満たした。

Caco-2 単層細胞は 48 時間毎に新鮮な培地に交換して培養した。

2.3 腸管バリア保護効果の評価

調製した Caco-2 単層細胞の各ウェルの内側 (apical 側) 培養液に 2×10^5 cells/ml の濃度の被検菌株懸濁液を 500 μ l 添加し、1 時間後に Son ら (2005) の方法に従って Caco-2 細胞の刺激を行なった。すなわち、外側 (basal 側) 培養液に、最終濃度が 100ng/ml になるように TNF- α (Sigma -Aldrich) を添加して、さらに 48 時間培養を行った。その後下記に腸管バリア保護効果の評価を行った。このとき、被検菌株懸濁液を添加せず TNF- α のみを添加したウェル、および被検菌株懸濁液も TNF- α も添加しないウェル (以降、コントロールともいう) も設けた。乳酸菌の腸管バリア保護効果の比較は、TER 値 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) および interleukin-8 (IL-8) 産生 (pg/ml) を指標に行なった。TER 値は、TNF- α を添加後 0、24 および 48 時間の値を測定した。さらに、各ウェルの TER 値をコントロールの TER 値で除して TER 相対値 (Relative TER) を算出した。TNF- α 添加 48 時間培養後に外側培養液中の IL-8 濃度を ELISA 法により測定した。測定には、市販の ELISA キット (Duo Set ELISA development system human CXCL8/IL-8, R&D Systems) を用い、添付のプロトコルに従って IL-8 濃度の測定を行った。即ち、捕捉抗体 (mouse anti-human IL-8, 4 μ g/ml) を 96well microplate (Nunc) に 100 μ l ずつ添加し、室温で一晩インキュベートした。液を捨て、水分をよく除いた後、wash buffer (0.05% Tween-PBS) 400 μ l ずつで洗浄した。これを 3 回繰り返した後、blocking buffer (1% BSA-PBS) を 300 μ l ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後 buffer を捨て、同様に 3 回 washing buffer で洗浄し、上清サンプルあるいは IL-8 standard (0, 31.3, 62.5, 125, 250, 250, 500, 1000pg/ml) を 100 μ l ずつ添加し、室温で 2 時間インキュベートした。同様に 3 回洗浄し、検出抗体 (biotinylated goat anti-human IL-8, 20ng/ml) を 100 μ l ずつ入れ、室温で 2 時間インキュベート

した。3 回洗浄の後、暗所にてストレプトアビジン-horseradish peroxidase (HRP) を 100 μ l ずつ添加し、室温で 20 分間インキュベートした。3 回洗浄し、暗所にて基質 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB) 溶液を 100 μ l ずつ添加し、インキュベートした。反応が進み十分に発色した時点で、反応停止液(1N H₂SO₄)を 50 μ l ずつ添加して混合し、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad) にて 450nm の吸光度を測定した。IL-8 濃度は作成した検量線より算出した。

2.4 動物実験

Wirtz ら(63)の方法に準じて、DSS 投与により腸炎を発症するマウスモデルを作成した。6 週齢の Balb/c 雌性マウスを日本チャールズリバーより購入した。室温 (24 \pm 1 $^{\circ}$ C)、12 時間明暗サイクルに制御された部屋で飼育し、飼育期間中は飼料 (MF, オリエンタル酵母) と飲み水を自由摂取させた。急性腸炎は 3.5% (wt/vol) DSS (分子量 36,000-50,000 ; MP Biomedicals) を飲み水に加え、5 日間自由摂取させることにより誘導した。なお、本実験は、広島大学動物実験等規則に従って行った (承認 No. C10-17)。

マウスをランダムに 4 つのグループ (n=3~4) に分けた。Group 1 (None) に、1 日目から 3 日目に PBS を経口投与した。Group 2 (DSS) には 3.5% DSS を飲み水として与え、PBS を経口投与した。Group 3 (DSS+*Lr*) と 4 (DSS+HK (heat-killed) -*Lr*) には、ともに 3.5% DSS を飲み水として与え、DSS 投与開始 24 時間後から 3 日間、*L. rhamnosus* 生菌または死菌 (10⁷ cells/mouse/day) をそれぞれ経口投与した (Figure 2-1)。

体重測定を毎日同じ時刻に行った。DSS 投与から 5 日目にジエチルエーテル麻酔下で解剖した。盲腸から直腸までの大腸全体を摘出し、炎症の指標として大腸の萎縮を評価した。

2.5 ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase; MPO) 活性を、空腸、回腸、盲腸、結腸上部、および結腸下部について測定した。組織サンプルを冷 PBS で洗浄した後、水分を除き、直ちに液体窒素により凍結した。これらは測定まで -80°C で保存した。MPO 活性を Krieglstein ら(64)の方法に準じて、*o*-dianisidin 法にて測定した。凍結サンプルを融解し重量を測定した後、0.5%水酸化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) にサンプルを懸濁し、ホモジナイズした。ホモジネーターは 4°C 、 $200 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、20mg/ml *o*-ジアニジン二塩酸塩、20mM 過酸化水素と 20°C で反応させた。5分後、2% アジ化ナトリウムを添加し反応を終了させ、分光光度計 (460nm) で吸光度の変化を測定した。MPO 活性 1unit は 1M の過酸化物を 1 分で分解する酵素の量と定義した。

2.6 マウスにおける腸管透過性の評価

腸管透過性の評価を Cario ら(65)の方法に準じて行った。DSS 投与から 5 日目に、フルオレセインイソチオシアナート (fluorescein isothiocyanate; FITC) 標識されたデキストラン (分子量 4000) を 0.6mg/体重 g 経口投与した。4 時間後に、血中の FITC-デキストラン濃度を蛍光光度計 (励起波長 495nm、検出波長 520nm) により測定した。

2.7 大腸上皮細胞の単離

DSS 投与から 5 日目に、マウスを屠殺し、直腸から 5cm までの結腸を摘出しサンプルとした。Lee ら(66)の方法に準じて、大腸サンプルから上皮細胞の単離を行った。サンプルを PBS で洗浄後、縦に開き約 5mm 幅で裁断した。サンプル片を 1mM ジチオトレイトール (dithiothreitol; DTT) を含む PBS で 3 回洗

浄し、5mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) および 0.1mM DTT を含むハンクス平衡塩溶液 (Hanks' balanced salt solution; HBSS) 中で 37°C、1 時間インキュベートした。サンプル切片から上皮細胞を剥離するため、ボルテックスで激しく懸濁した後、1 分間静置して組織塊を沈殿させた。上清を回収し、800 x g で遠心分離して上皮細胞を得た。

2.8 SDS-PAGE および Western blotting

Caco-2 単層細胞および大腸上皮細胞を PBS で 3 回洗浄後、RIPA バッファー (150mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、1% SDS および 1% phosphatase inhibitor カクテル (Pierce) を含む 25mM Tris-HCl pH7.4) に懸濁し、氷上で超音波処理を行った。その後、4°C、14,000g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。これを細胞抽出液とし、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、10%グリセロールおよび 0.004% bromophenol blue を含む 0.125M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) を 2:1 の割合で加え、ボルテックス後、沸騰水浴中で 10 分間熱した。その後、10 秒間遠心分離し、上清を SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、Laemmli の方法(67)に従い、泳動用緩衝液 (192mM グリシン および 1% SDS を含む 25mM Tris-HCl) 中でゲル板 (アクリルアミド濃度 7.5%) 1 枚当たり 20mA の電流をかけ 90 分間電気泳動を行った。SDS-PAGE 後、下(陽極側)から順にブロッキング用ろ紙 (CB13A、アトー) 4 枚、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) 1 枚、SDS-PAGE 後のゲル、ブロッキング用ろ紙 4 枚の順で重ねて、0.2% SDS を含む Tris-HCl (pH8.3) を用いてタンパク質の転写を行った。ゲルに対して 0.75mA/cm² の電流をかけ、3 時間転写を行った。転写後の PVDF 膜を、0.1% Tween-20/PBS に 20 分間以上浸した後、1% BSA を含む 0.1% Tween-20/PBS に 1 時間以上浸し、ブロッキングした。その後、PVDF 膜を 1 次抗体 (rabbit anti-ZO-1, ZYMED Lab または mouse anti-myosin light chain kinase (MLCK) 抗体、Sigma-Aldrich) で 1 時間インキュベート

した。0.1% Tween-20/PBS で 5 分間、3 回洗い、2 次抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体, Kirkegaard & Perry Lab または anti-mouse IgG, Sigma-Aldrich) を用い、1 時間反応を行った。再び 0.1% Tween-20/PBS で 5 分間、3 回洗った。ECL 試薬(1:1, GE ヘルスケア)により発色させ、X 線フィルムに感光させた後、現像し、バンドを検出した。Western blotting のバンド定量解析には、Scion Image (Scion) を用いて解析を行った。

ZO-1 あるいは MLCK 発現の解析後、プロットを rat anti- α -tubulin 抗体 (Chemicon) でリプローブし、 α -tubulin の発現量でタンパク量補正を行った。

2.9 統計処理

結果は全て平均値 \pm 標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVA により行い、post-hoc test には Tukey 法を用いた。 p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

3 結果および考察

3.1 *Lactobacillus* 属の腸管バリア保護効果の比較

腸管上皮様 Caco-2 細胞を炎症性サイトカイン TNF- α で刺激することにより、バリア機能低下モデルを作成した。IBD 患者の腸管組織、血中で産生増加が確認されている TNF- α は、組織の炎症や腸管バリア機能の低下において中心的な役割を果たしている(68)。

Caco-2 細胞への TNF- α 添加により、48 時間後には TER 値が無刺激群に比べ約 20% 低下した (Figure 2-2 A)。TER 値の変化は主に細胞間隙のイオン透過性の亢進を反映している(69)。したがって、TNF- α による TER 値の低下は、Caco-2 細胞の腸管バリア機能の低下と正相関すると考えられる。一方、*L. rhamnosus* を添加した場合、TER 値の減少は有意に抑制された (Figure 2-2 A)。*L. bulgaricus*、*L. casei*、および *L. gasseri* を添加した場合、TER 値低下抑制

効果は確認できなかった (Figure 2-2 A)。

また、TNF- α 添加により、Caco-2 細胞の IL-8 産生量は顕著に増加した (Figure 2-2 B)。IL-8 は好中球などを組織へ誘導するケモカインであり、IL-8 濃度が上昇することにより、組織への好中球の浸潤が促進される(70)。組織へ浸潤した好中球は、酵素や活性酸素を産生、放出する。そのため、過剰な好中球の浸潤は組織に障害を与え、腸管バリア機能低下を誘導すると考えられる。*L. rhamnosus* は TNF- α による IL-8 産生増加を有意に抑制した (Figure 2-2 B)。しかし、TER 値低下抑制効果に比べ、*L. rhamnosus* の IL-8 産生抑制効果は小さかった。その他の菌株についても、IL-8 産生抑制傾向がみられたが、有意な抑制効果は認められなかった (Figure 2-2 B)。

以上の結果から、最も高いバリア保護効果を示した *L. rhamnosus* を用いて以降の解析を行うことにした。

3.2 *L. rhamnosus* による腸炎抑制効果

DSS 誘導性腸炎モデルは、最も広く用いられている炎症性腸疾患の動物モデルの一つである(71)。DSS が腸炎を誘導するメカニズムとして、マクロファージの活性化(72)、腸管透過性の亢進(73)、大腸細菌叢の変化(74)などが考えられている。

DSS 投与により急性腸炎を誘導した結果、体重の減少および大腸の萎縮が確認された (Figure 2-3, 2-4)。これらの現象は、腸炎重症度の指標として用いられている(63)。また、所見観察では、DSS 投与群で下痢、血便、肛門病変が確認された (data not shown)。このことから、DSS 投与群では大腸炎が発症していることが確認された。

L. rhamnosus の生菌または死菌を投与した場合、ともに体重の減少および大腸の萎縮が抑制された (Figure 2-3, 2-4)。また、好中球が組織へ浸潤していることの指標となる MPO 活性は、DSS 投与により結腸下部において上昇した

(Figure 2-5)。炎症状態の上皮細胞が産生するケモカインなどにより、好中球は炎症部位へ浸潤する。また、好中球は細胞内に MPO を有することから、MPO 活性の上昇が見られた結腸下部において炎症が起こっていることが示された。*L. rhamnosus* を投与した群では、生菌の投与で結腸下部の MPO 活性が抑制され (Figure 2-5)、生菌が炎症反応を抑制したことが示唆された。一方、死菌の投与では、有意な MPO 活性抑制効果は確認できなかった。

なお、生菌投与群では、回腸における MPO 活性の上昇が見られた。これは、*Lactrobacillus* 属の生菌投与により小腸での免疫賦活効果が報告されている (75)ことから、生菌投与により *L. rhamnosus* が回腸に定着し、小腸において免疫賦活作用をもたらしたためかもしれない。

3.3 *L. rhamnosus* による腸管バリア保護効果

次に、これらのマウスの腸管バリア機能を評価するために FITC-デキストランを経口投与し、4 時間後の血中濃度を測定した。FITC-デキストランは分子量 4400 の高分子であり、通常は tight junction によるバリア機能により体内に吸収されにくい。従って、血中の FITC-デキストラン濃度は、腸管バリア機能低下の指標として評価することができる。

DSS 投与により、血中の FITC-デキストラン濃度は著しく上昇した (Figure 2-6)。DSS 誘導性の腸炎は大腸に特異的と報告されており (71)、さらに MPO 活性の結果から結腸下部でのみ炎症が起こったことが示されたことから、結腸下部における腸管バリア機能が損傷していることが示唆された。一方、*L. rhamnosus* 生菌、死菌を投与した群では、血中 FITC-デキストラン濃度の増加は見られず、健常マウスと同等であった (Figure 2-6)。このことから、*L. rhamnosus* は DSS による大腸バリア機能損傷を抑制したことが示唆された。

3.4 *L. rhamnosus* による腸管バリア保護メカニズム

L. rhamnosus による腸管バリア保護メカニズムを解明するために、tight junction 構成・調節タンパク質に着目し、*in vitro* および *in vivo* でのこれらのタンパク質発現量の変化を解析した。

Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 試験において、TNF- α 刺激により tight junction 構成タンパク質である ZO-1 発現が減少し、tight junction 調節タンパク質の MLCK 発現が増加した。また、*L. rhamnosus* は TNF- α 刺激による ZO-1 発現減少、および MLCK 発現増加を有意に抑制した (Figure 2-7)。なお、claudin-1 や occludin についても検討を行ったが、これらの発現量には変化が見られなかった (data not shown)。これらの結果から、*L. rhamnosus* の TER 値低下抑制メカニズムとして、少なくとも一つは、ZO-1 および MLCK 発現制御が関与していることが示唆された。Claudin-1 や occludin などの膜貫通タンパク質は ZO-1 を介してアクチン細胞骨格と連結しており (Figure 1-4)、これにより、膜貫通タンパク質は tight junction に局在することができる。これらのことから、ZO-1 の発現減少は、他の tight junction 構成タンパク質の局在変化、さらにはバリア機能低下に直接寄与すると考えられる。また、TNF- α 刺激により MLCK 発現が増加した。MLCK は細胞骨格であるアクチン/ミオシンフィラメントを収縮させる酵素であり、MLCK の活性化により tight junction 透過性が亢進する (76, 77)。従って、MLCK 発現の増加は、TNF- α 刺激による TER 値低下に直接寄与すると考えられる。

DSS を投与したマウスの結腸下部上皮細胞においても、ZO-1 発現の減少がみられた (Figure 2-8 A)。また、DSS 投与により MLCK 発現も減少した (Figure 2-8 B)。この結果は、*in vitro* 試験の結果 (Figure 2-7 B) とは一見矛盾するように思える。DSS 誘導性腸炎マウスなどの炎症性腸疾患モデルにおいて、MLCK の発現変化を解析した報告はこれまでに無い。しかし近年、Feighery ら (78) は、MLCK 阻害剤は Caco-2 細胞における透過性亢進を抑制するが、DSS 腸炎マウ

スでは抑制しないということを明らかにした。その原因については明らかになっていないが、MLCK の腸管透過性に対する働きは、Caco-2 細胞と DSS 腸炎マウスとは異なることが考えられる。また、DSS は腸管上皮細胞にアポトーシスを誘導することが報告されており(79)、さらに MLCK 阻害により細胞のアポトーシスが誘導される(80, 81)ことから、本実験で見られた DSS 投与による MLCK の発現減少が、腸管上皮細胞のアポトーシスを引き起こした可能性がある。 *L. rhamnosus* のような乳酸菌が、MLCK 発現を制御することにより腸管バリア機能を保護することを、動物実験で初めて証明した。 *L. rhamnosus* は MLCK 発現を制御することにより腸管上皮細胞のアポトーシスを抑制している可能性もあり、この点については今後さらなる検討が必要である。

4 要約

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた実験から、*L. rhamnosus* は腸管バリア保護効果を発揮することにより大腸炎を抑制することが示された。また、腸管バリア保護メカニズムを解析した結果、*L. rhamnosus* は tight junction 構成・調節タンパク質である ZO-1、MLCK 発現を制御することにより、腸管バリア機能の低下を抑制していることが示唆された。

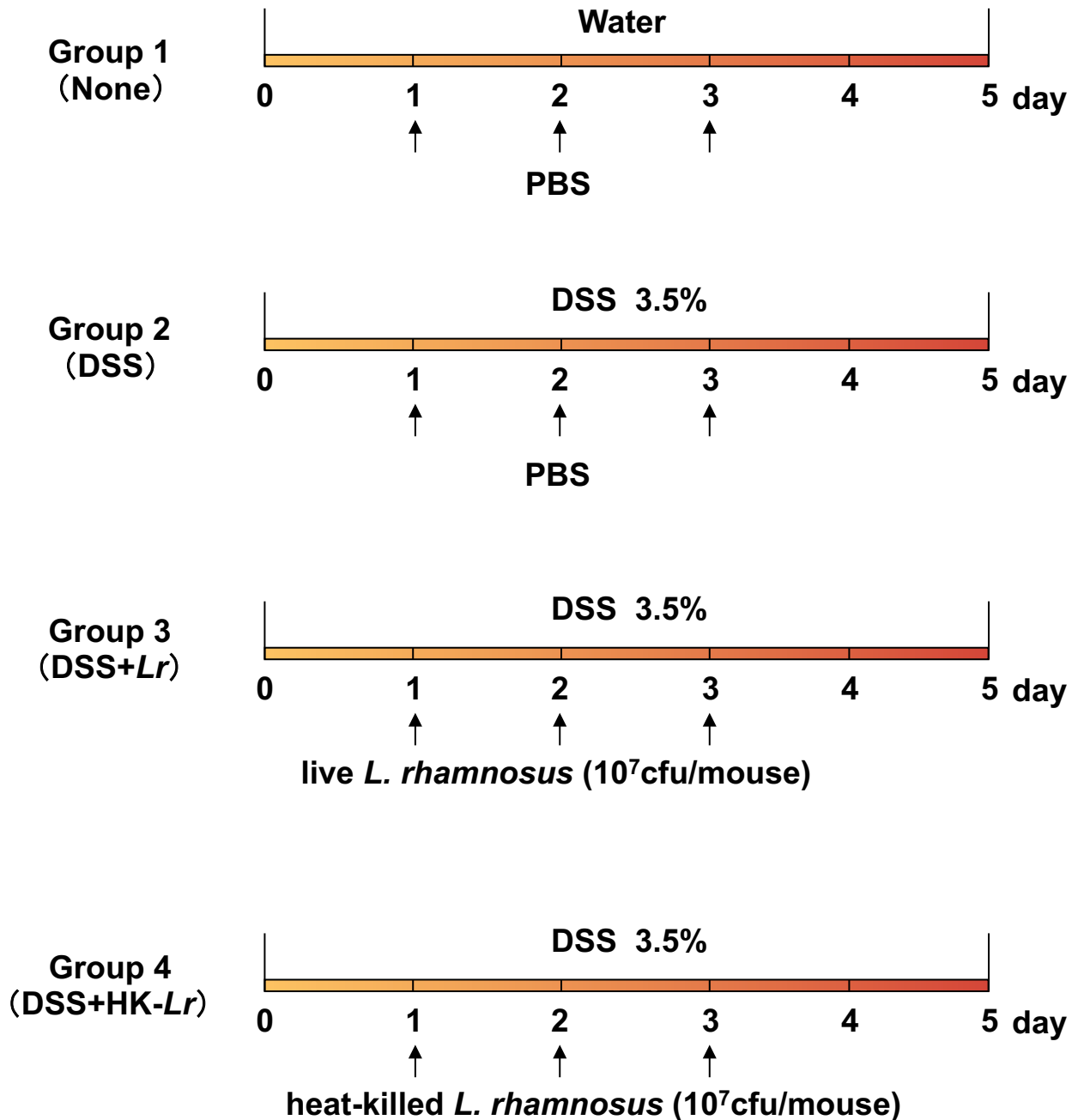


Figure 2-1. Study design of *in vivo* DSS-induced colitis in mice. Group 1 (None) mice were treated orally with PBS from day 1 to 3; group 2 (DSS) mice received drinking water with 3.5% DSS and were orally administered PBS. Groups 3 and 4 also received drinking water with 3.5% DSS, and 24 h after the start of DSS administration, mice were orally administered 10^7 cfu/day of live or heat-killed *L. rhamnosus* for 3 consecutive days.

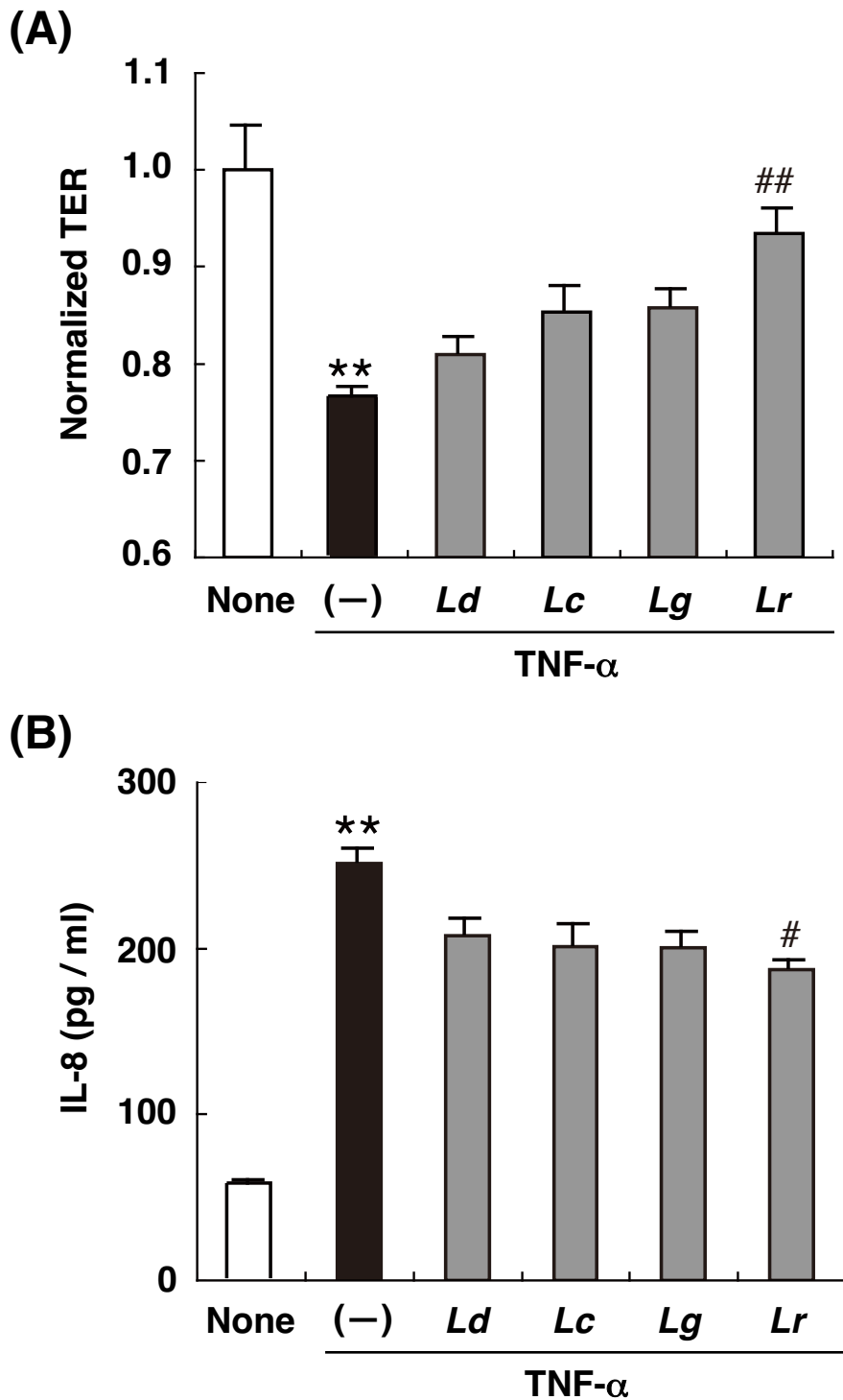


Figure 2-2. Protective effect of 4 lactobacilli on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes in A) transepithelial resistance (TER) and B) IL-8 secretion by Caco-2 cells. Caco-2 cell monolayers were treated with each species (10^5 cfu/well) or with medium alone (control) for 1 h, and the monolayers were exposed to TNF- α . Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-). Ld = *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* no. 3; Lc = *Lactobacillus casei* no. 9; Lg = *Lactobacillus gasseri* no. 10; Lr = *Lactobacillus rhamnosus* OLL2838.

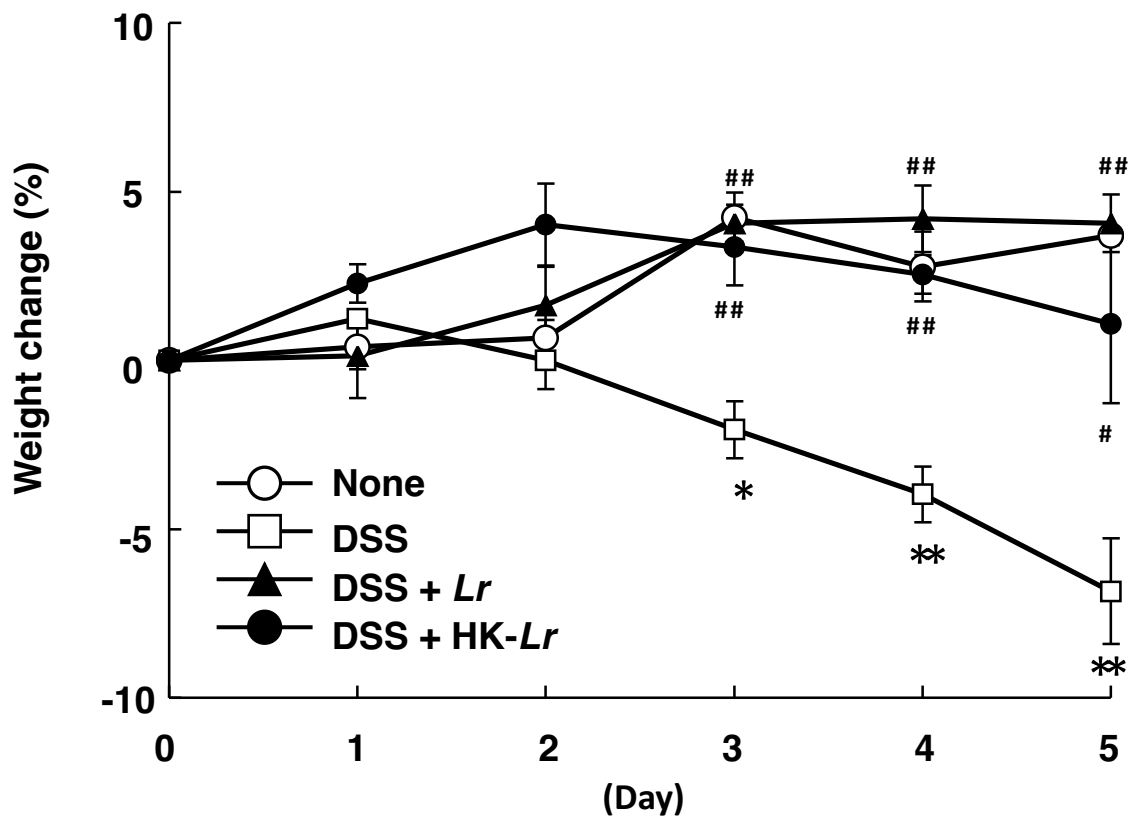


Figure 2-3. Changes in body weight of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error ($n = 4$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus controls (none); # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus DSS- treated mice (DSS). DSS+*Lr* = mice treated with DSS and *live L. rhamnosus*; DSS+HK-*Lr* = mice treated with DSS and heat-killed *L. rhamnosus*.

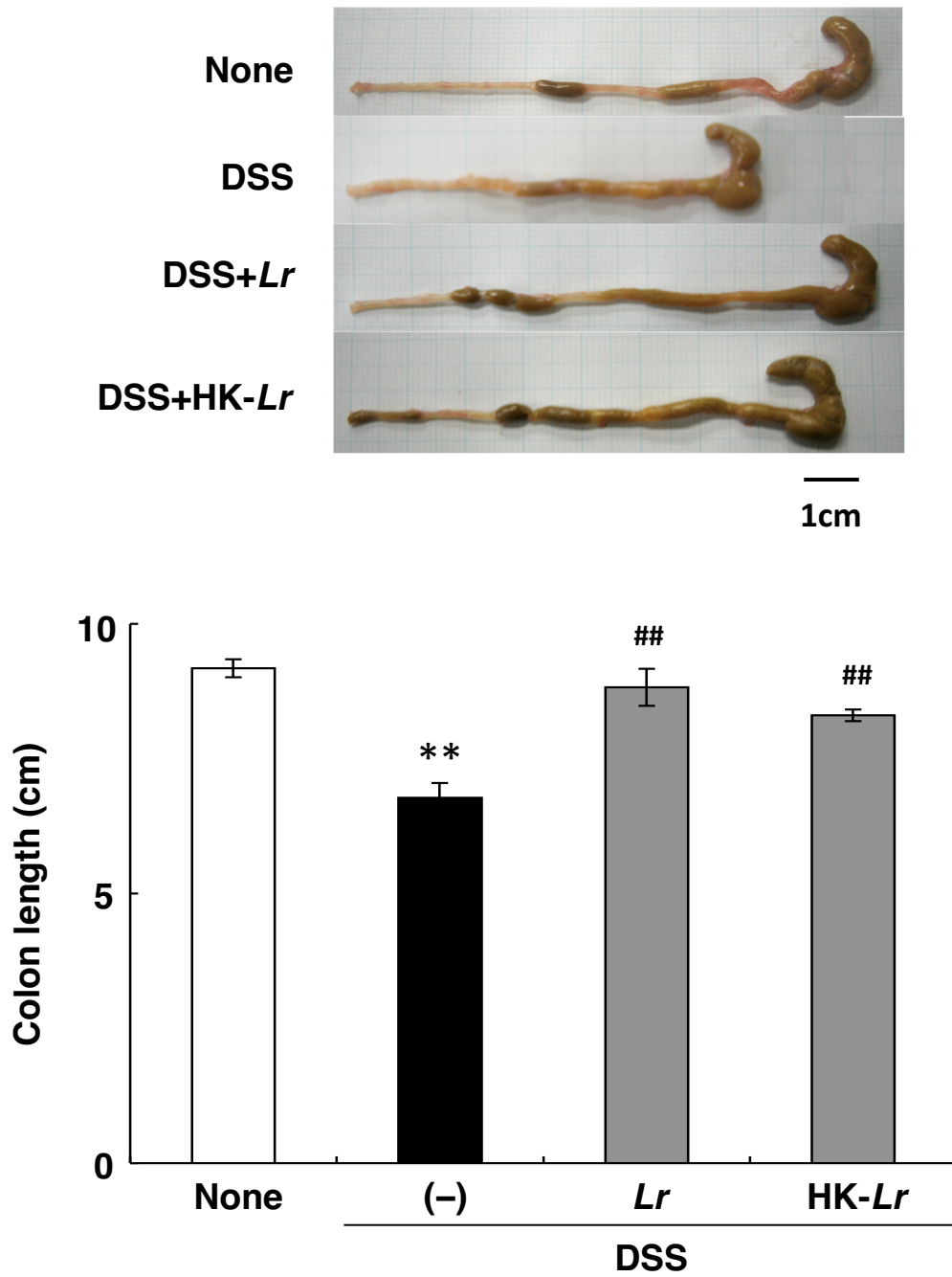


Figure 2-4. Changes in colon length of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** $P < 0.01$ versus controls (none); ## $P < 0.01$ versus DSS-treated mice (DSS). DSS+*Lr* = mice treated with DSS and *live L. rhamnosus*; DSS+HK-*Lr* = mice treated with DSS and heat-killed *L. rhamnosus*.

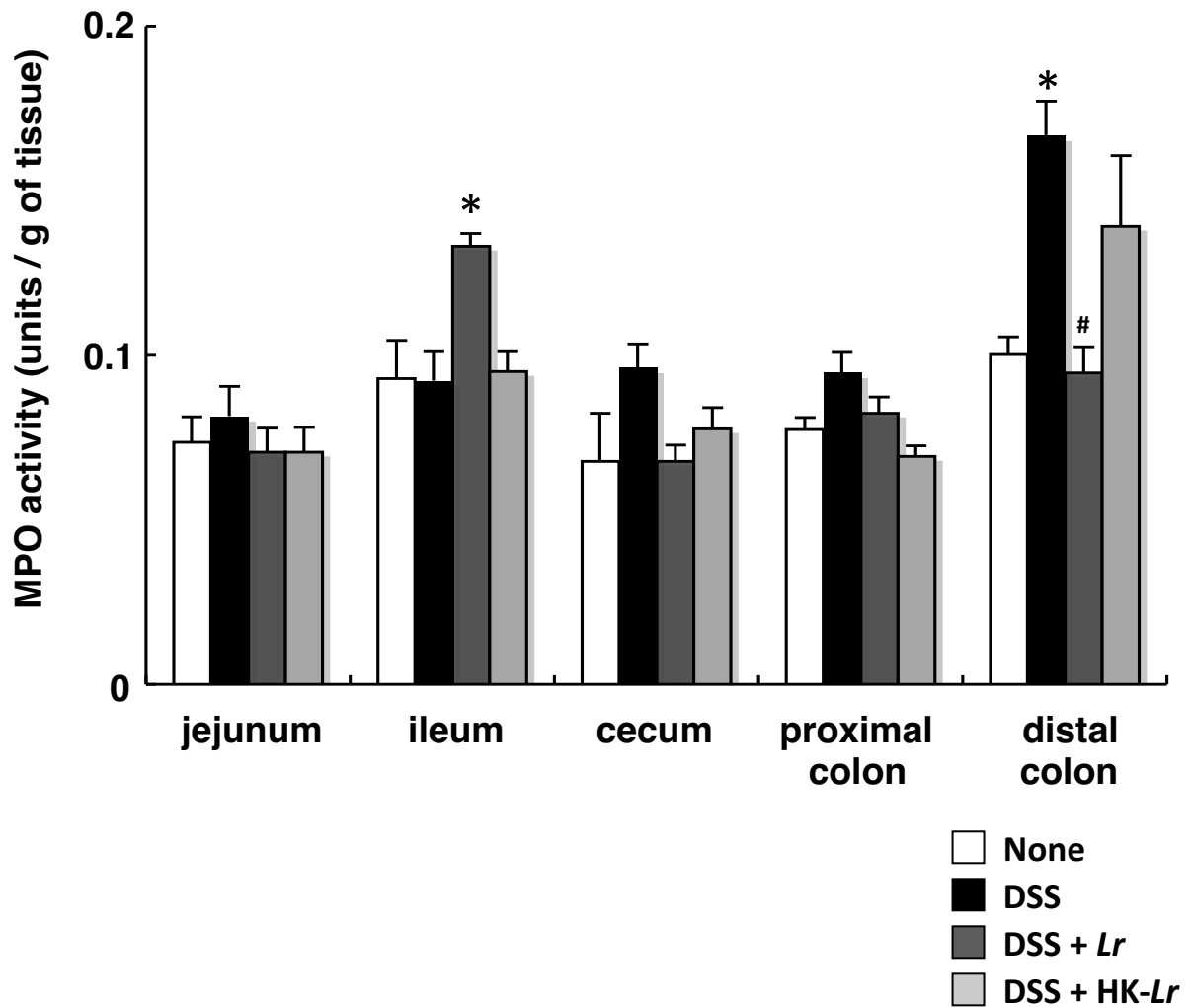


Figure 2-5. Myeloperoxidase (MPO) activity in the jejunum, ileum, cecum, proximal colon and distal colon of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). * $P < 0.05$ versus control mice (none); ## $P < 0.01$ versus DSS-treated mice (DSS). DSS + *Lr* = mice treated with DSS and *live L. rhamnosus*; DSS+HK-*Lr* = mice treated with DSS and heat-killed *L. rhamnosus*.

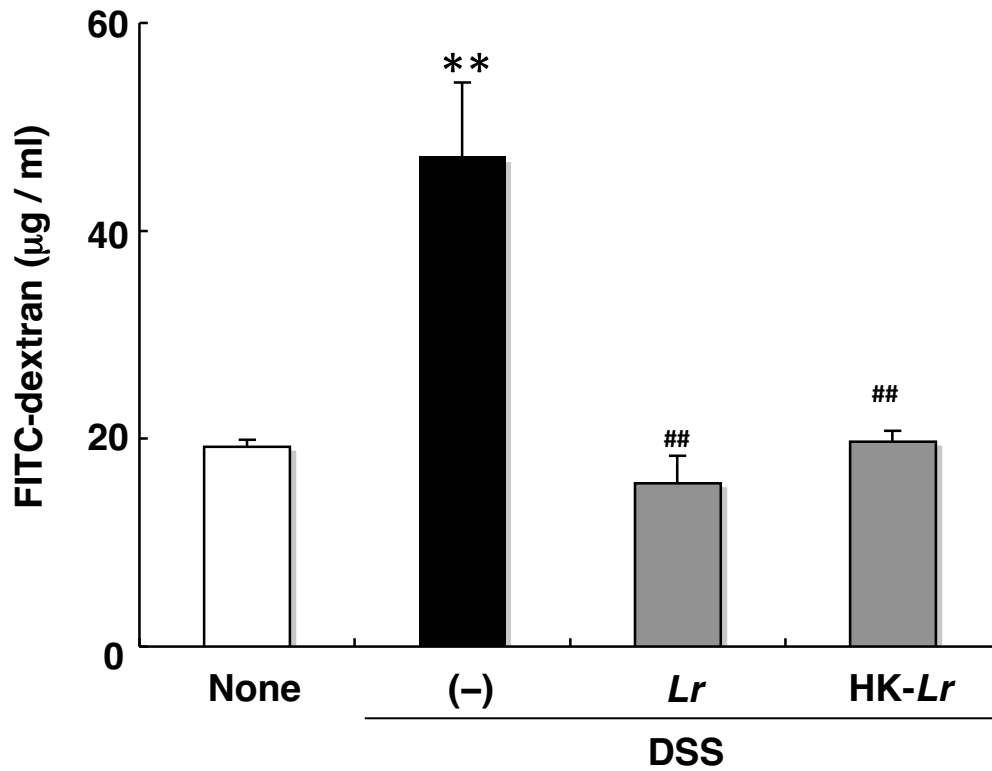


Figure 2-6. Intestinal permeability of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error. ** $P < 0.01$ versus control mice (none); ## $P < 0.01$ versus DSS-treated mice (-). DSS+*Lr* = mice treated with DSS and *live L. rhamnosus*; DSS+HK-*Lr* = mice treated with DSS and heat-killed *L. rhamnosus*.

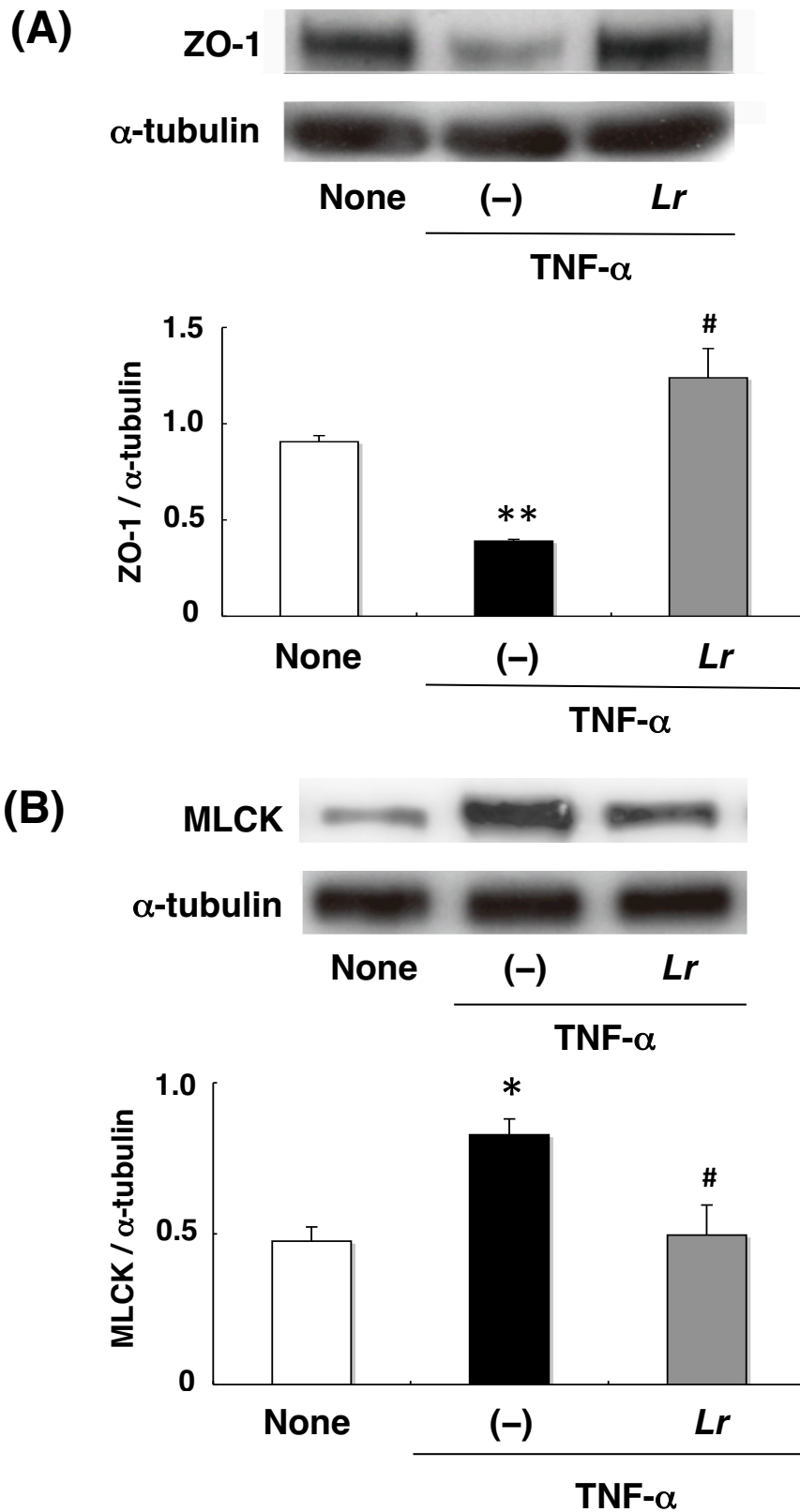


Figure 2-7. Expression of A) zonula occludens-1 (ZO-1) and B) myosin light-chain kinase (MLCK) in Caco-2 cells. The expression of ZO-1, MLCK, and α -tubulin was detected by Western blotting of the cellular lysates. Images are representative of 3 independent experiments. Results are expressed as means \pm standard error ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus the controls (none); # $P < 0.05$ versus TNF- α alone (-).

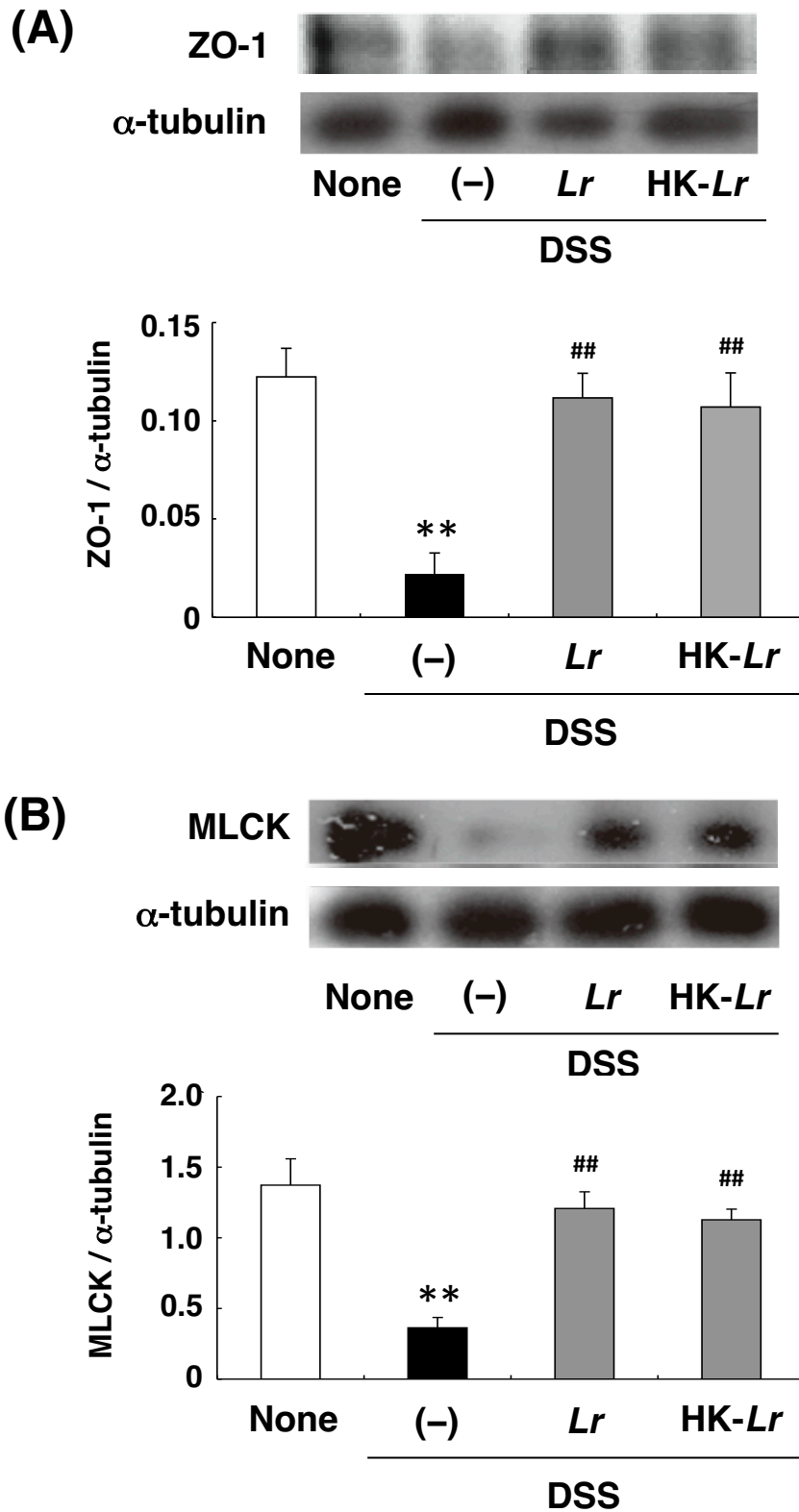


Figure 2-8. Colonic expression of A) zonula occludens-1 (ZO-1) and B) myosin light-chain kinase (MLCK) in mice with DSS-induced colitis. The expression of ZO-1, MLCK, and α -tubulin was detected by Western blotting of the cellular lysates. Images are representative of 3 independent experiments. Results are expressed as means \pm standard error. ** $P < 0.01$ versus control mice (none); ## $P < 0.01$ versus DSS-treated mice (-).

第3章

腸管バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の同定

1 序論

第2章では、Caco-2細胞を用いた *in vitro* 評価系および DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いた *in vivo* 評価系で乳酸菌の腸管バリア保護効果を示した。腸管バリア保護効果を有する機能性食品開発には、乳酸菌中の活性成分を同定することが非常に重要である。そこで本章では、腸管バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の同定を目的とした。

2 材料および方法

2.1 乳酸菌の培養

L. rhamnosus OLL2838 は第2章の方法に準じて培養した。また、*L. rhamnosus* 懸濁液 (DMEM 培地・ 2×10^5 cells/ml) を調製し、5%CO₂、37°Cにて48時間培養後、上清を回収し0.22 μ mのセルロースメンブレンフィルターにかけたものを菌代謝産物として試験に用いた。*Enterococcus hirae* ATCC 9790^Tは trypticase soy broth (Becton Dickinson) で37°C、嫌気条件下で18時間培養した。菌体を、滅菌水で洗浄し、75°Cで1時間インキュベート後、凍結乾燥した。これを加熱死菌体として試験に用いた。

2.2 腸管バリア保護効果の評価

第2章の方法に準じ、Caco-2細胞の培養およびTNF- α 刺激を行った。*L. rhamnosus* (生菌、 2×10^5 cells/ml)、*L. rhamnosus* 代謝産物、*E. hirae* (加熱死菌、 2×10^6 cells/ml)、*E. hirae* 酵素処理菌体 (後述、 2×10^5 cells/ml)、リポテイコ酸 (Sigma-Aldrich, 10 μ g/ml)、または Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (Sigma-Aldrich, 10 μ g/ml) を Transwell の apical 側に添加し1時間プレインキュベート後、

TNF- α (100ng/ml) を basal 側に添加し、TER 値および IL-8 産生量を測定し、腸管バリア機能を評価した。

2.3 菌体の酵素処理

タンパク質の分解を目的としてアクチナーゼ処理を行った。*Streptomyces griseus* 由来の酵素（科研製薬）を使用した。乳酸菌体を最終濃度 0.5mg/ml の酵素溶液に懸濁し 37°C、2 時間処理した。

脂質の分解を目的としてリパーゼ処理を行った。ブタ由来の酵素（TypeII(Crude)、EC 3.1.1.3、30-90units/mg protein、Sigma-Aldrich）を使用した。乳酸菌体を最終濃度 0.5mg/ml の酵素溶液に懸濁し、37°C、2 時間処理した。

細胞壁の分解を目的としてムタノリシン処理を行った。*Streptomyces globisporus* ATCC 21553 由来の酵素（Sigma-Aldrich）を使用した。乳酸菌体を最終濃度 0.025mg/ml の酵素溶液に懸濁し、37°C、2 時間処理した。

2.4 SDS-PAGE および Western blotting

第 2 章の方法に準じ、ZO-1 および MLCK の発現量を解析した。

2.5 統計処理

結果は全て平均値 \pm 標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVA により行い、post-hoc test には Tukey 法を用いた。 p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

3 結果および考察

3.1 *L. rhamnosus* 菌代謝産物および酵素処理菌体の腸管バリア保護効果

L. rhamnosus の腸管バリア保護効果に関与する活性成分を探索する目的で、

菌分泌物の腸管バリア保護効果を評価した。Caco-2 細胞への TNF- α 添加により、TER 値の低下および IL-8 産生の増加が見られた (Figure 3-1)。菌代謝産物 (*Lr*-CM) は、TER 値に影響を与えなかったが (Figure 3-1. A)、IL-8 産生増加を抑制した (Figure 3-1. B)。近年、*L. rhamnosus* GG 株の菌代謝産物が IL-8 産生を抑制すると報告された(82)。我々とは菌株が異なるが、同様な菌代謝産物が IL-8 産生抑制に寄与しているのかもしれない。しかし、菌の代謝産物は TER 値には影響を与えなかったことから、主要な活性成分は細胞壁成分など菌体成分であることが示唆された。

次に、菌体中の活性成分の性質を明らかにするために、*L. rhamnosus* をアクチナーゼまたはリパーゼで処理し、それらの処理菌体の腸管バリア保護効果を評価した。その結果、*L. rhamnosus* の TER 値低下抑制効果は、リパーゼ処理 (*Li-Lr*) により弱くなった (Figure 3-2)。一方、アクチナーゼ処理 (*Ac-Lr*) は *L. rhamnosus* の TER 値低下抑制効果に影響を与えなかった (Figure 3-2)。このことから、*L. rhamnosus* の活性成分は菌体中の脂質成分であることが示唆された。

また、Caco-2 細胞を TLR2 中和抗体で処理した後に、*L. rhamnosus* および TNF- α を添加し、TER 値および IL-8 濃度を測定した結果、TLR2 中和抗体の添加により *L. rhamnosus* による TER 値の減少抑制効果は減弱した (Figure 3-3 A)。この減弱は抗 TLR2 抗体の添加濃度依存的であった。また、IL-8 産生増加抑制効果についても、抗 TLR 抗体の添加濃度依存的に減弱した (Figure 3-3 B)。このことから、*L. rhamnosus* は Caco-2 細胞の TLR2 シグナルを活性化することにより、腸管バリア保護効果を発揮することが示唆された。従って、*L. rhamnosus* の活性成分は、TLR2 リガンドであると考えられた。

これらの結果をもとに、*L. rhamnosus* の活性成分候補としてグラム陽性菌細胞壁の主要な脂質成分であり、TLR2 のリガンドであるリポテイコ酸 (LTA) に着目した。LTA は両親媒性分子で、様々な活性を有している(83)。LTA は

lactobacilli の腸管上皮への接着に寄与しているだけでなく(84)、TLR2 を介して免疫調節作用を有する(85)。LTA を含むグラム陽性菌のテイコ酸は、宿主の TLR2 に認識されることがよく知られている(85)。また、腸管上皮細胞にも、TLR2 を含むいくつかの TLR ファミリーが発現している(60)。また、今回用いた Caco-2 細胞にも、少なくとも TLR2 をはじめ 4、5 および 9 の mRNA 発現を確認している (data not shown)。このことから、LTA が腸管バリア保護効果を有するのではないかと仮説を立て、解析を進めた。

L. rhamnosus からの LTA の精製を試みたが、夾雑物のコンタミネーションを完全に防ぐことが困難であった。そこで、市販のヒト腸内常在乳酸菌 *Enterococcus hirae* ATCC 9790^T 由来 LTA (Sigma-Aldrich) を用いることにした。まず、同菌株の腸管バリア保護効果について検討を行った。

3.2 *E. hirae* の腸管バリア保護効果の評価

E. hirae の生菌を Caco-2 細胞に添加し、腸管バリア保護効果を評価したが、菌の増殖が非常に速いため、培地が酸性となり Caco-2 細胞は well から剥がれてしまった。この結果から、生菌での評価は不可能であると判断し、以降の実験では加熱死菌体を用いることにした。*E. hirae* の加熱死菌体 (10^5 、 10^6 または 10^7 cells/well) の腸管バリア保護効果を、第 2 章の方法に準じて、Caco-2 細胞にて評価を行った。その結果、TER 値低下および IL-8 産生抑制効果は、*E. hirae* 添加濃度 10^6 cells/well で最も高かった (data not shown)。従って、以降の実験ではこの菌体濃度で試験を行うことにした。

3.3 *E. hirae* 酵素処理菌体の腸管バリア保護効果

E. hirae の活性成分を解析する目的で、アクチナーゼ、リパーゼおよびムタノリシンでそれぞれ酵素処理した菌体の腸管バリア保護効果を評価した。その結果、ムタノリシン処理 (Mu-*Eh*) により *E. hirae* の腸管バリア保護効果は完

全に消失した (Figure 3-4)。ムタノリシンはグラム陽性菌の細胞壁を分解する酵素であり、*E. hirae* の活性成分が細胞壁成分であることが示唆された。また、リパーゼ処理 (Li-*Eh*) でも、効果は顕著に減少した (Figure 3-4)。これらの結果から、*E. hirae* の腸管バリア保護効果に関与する活性成分は細胞壁に存在する脂質成分であることが示唆された。このことは、*L. rhamnosus* の活性成分探索の結果と同様であり、*E. hirae* の活性成分も LTA であると予想された。そこで、*E. hirae* 由来 LTA の腸管バリア保護効果の評価を行った。

3.4 *E. hirae* 由来 LTA および TLR2 リガンドの腸管バリア保護効果

E. hirae 由来 LTA の腸管バリア保護効果を検討するため、LTA を Caco-2 細胞の apical 側に添加し、TER 値および IL-8 濃度を測定した。その結果、*E. hirae* 菌体と同様に、LTA 単独でも TNF- α による TER 値低下を抑制した (Figure 3-5 A)。また、LTA は TNF- α による IL-8 産生増加も抑制した (Figure 3-5 B)。これらの結果から、LTA は腸管バリア保護効果を有することが明らかとなり、*E. hirae* の活性成分の一つは LTA であることが示唆された。

先に述べたように、LTA は TLR2 リガンドの一つである。そこで、TLR2 を介したシグナルが腸管バリア保護に重要な役割を担っているのではないかと考え、TLR2 の合成リガンド Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSK) を Caco-2 細胞に添加し、腸管バリア保護効果を評価した。その結果、PCSK も LTA と同様に、TNF- α による TER 値低下および IL-8 産生増加を抑制した (Figure 3-5)。このことから、TLR2 のシグナルが腸管バリア保護効果に関与していることが明らかとなった。

なお、TNF- α 無刺激 Caco-2 細胞に *E. hirae*、LTA または PCSK を添加し、これらが平常時の腸管上皮細胞にどのような影響を与えるのか検討した結果、PCSK 添加によりわずかに TER 値が上昇したものの、*E. hirae* と LTA は TER 値や IL-8 産生に全く影響を与えなかった (Figure 3-6)。このことから、*E. hirae*

およびその LTA は、平常時には腸管上皮細胞に影響を与えず、炎症時に限って腸管バリア保護効果を発揮し、腸管上皮細胞層のホメオスタシス維持に寄与していることが示唆された。

3.5 *E. hirae*、LTA および PCSK の tight junction に及ぼす影響

第 2 章で、*L. rhamnosus* は tight junction 構成タンパク質 ZO-1、および tight junction 調節タンパク質 MLCK の発現を制御していることが明らかとなった。そこで、*E. hirae* およびその LTA も同様に、ZO-1 や MLCK などのタンパク質発現を制御するのではないかと考え、解析を試みた。また、これらの作用に TLR2 シグナルが関与するのかを検討するため、PCSK の作用についても同様に解析した。

E. hirae は *L. rhamnosus* と同様に、TNF- α による ZO-1 の発現減少を抑制し、MLCK の発現増加を抑制することが明らかとなった (Figure 3-7)。即ち、この 2 つの菌株の腸管バリア保護効果は、同じメカニズムを介していることが示唆された。また、*E. hirae* の活性成分と考えられる LTA も菌体と同様の効果を示した (Figure 3-7)。さらに、PCSK でも同様の効果が得られた (Figure 3-7) ことから、*E. hirae* の LTA が、Caco-2 細胞に発現した TLR2 を介して ZO-1 および MLCK の発現を制御していることが示唆された。なお、claudin-1 や occludin についても検討を行ったが、これらの発現量には変化が見られなかった (data not shown)。

4 要約

Caco-2 細胞を用いた実験から、腸管バリア保護効果を担う *L. rhamnosus* の活性成分は脂質成分であり、TLR2 を介して Caco-2 細胞に作用することが示された。また、腸内常在乳酸菌 *E. hirae* を用いた実験から、活性成分の一つは LTA であることが明らかとなった。*E. hirae* とその LTA は、*L. rhamnosus* と同様

に、tight junction 構成・調節タンパク質である ZO-1 および MLCK の発現量を調節することが明らかとなった。LTA は TLR2 のリガンドであることから、TLR2 シグナルが腸管バリア保護に関与していることが明らかとなり、TLR2 シグナルが ZO-1 および MLCK 発現量調節に寄与していることが示唆された。

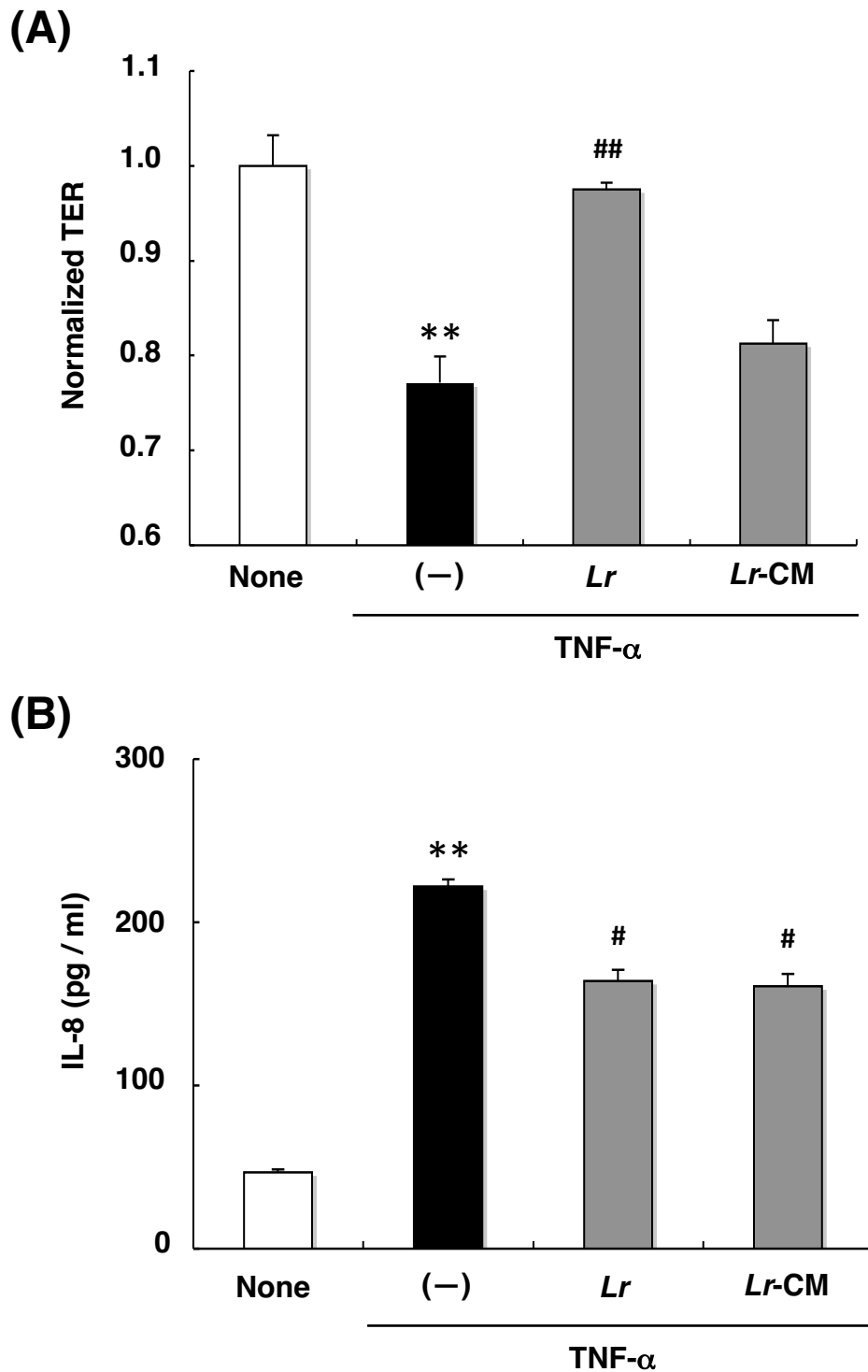


Figure 3-1. Protective effect of *L. rhamnosus* (*Lr*) and *L. rhamnosus*-conditioned medium (*Lr-CM*) on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes in A) transepithelial resistance (TER) and B) IL-8 secretion by Caco-2 cells. Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-).

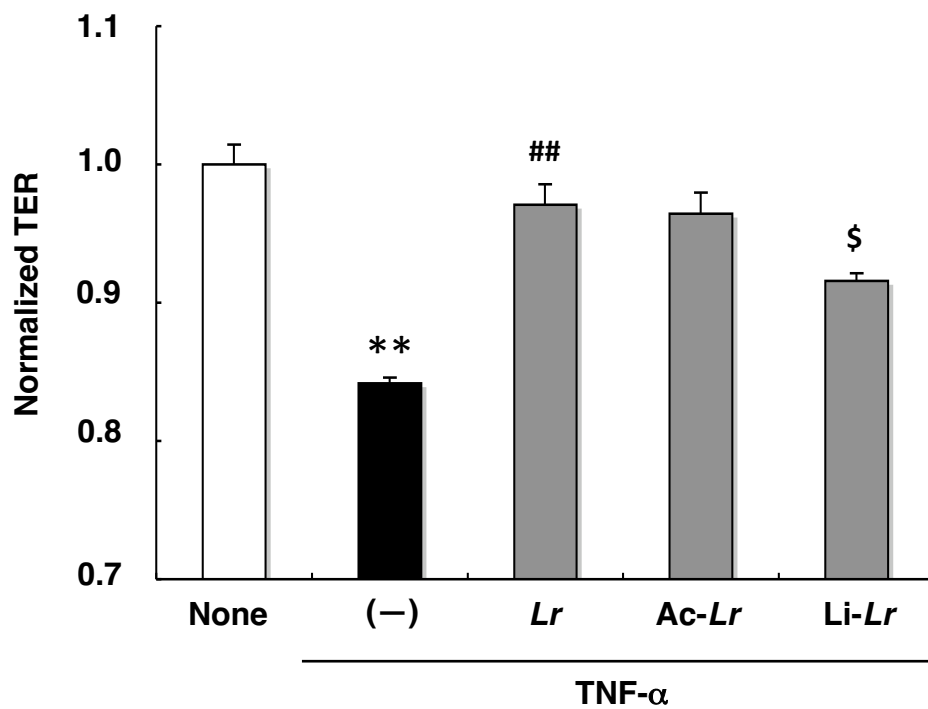


Figure 3-2. Protective effect of *L. rhamnosus* (*Lr*), actinase-treated *L. rhamnosus* (*Ac-Lr*), and lipase-treated *L. rhamnosus* (*Li-Lr*) on tumor necrosis factor- α (TNF- α)–induced changes in transepithelial resistance (TER). Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-); \$ P < 0.05 versus TNF- α +*L. rhamnosus* (*Lr*).

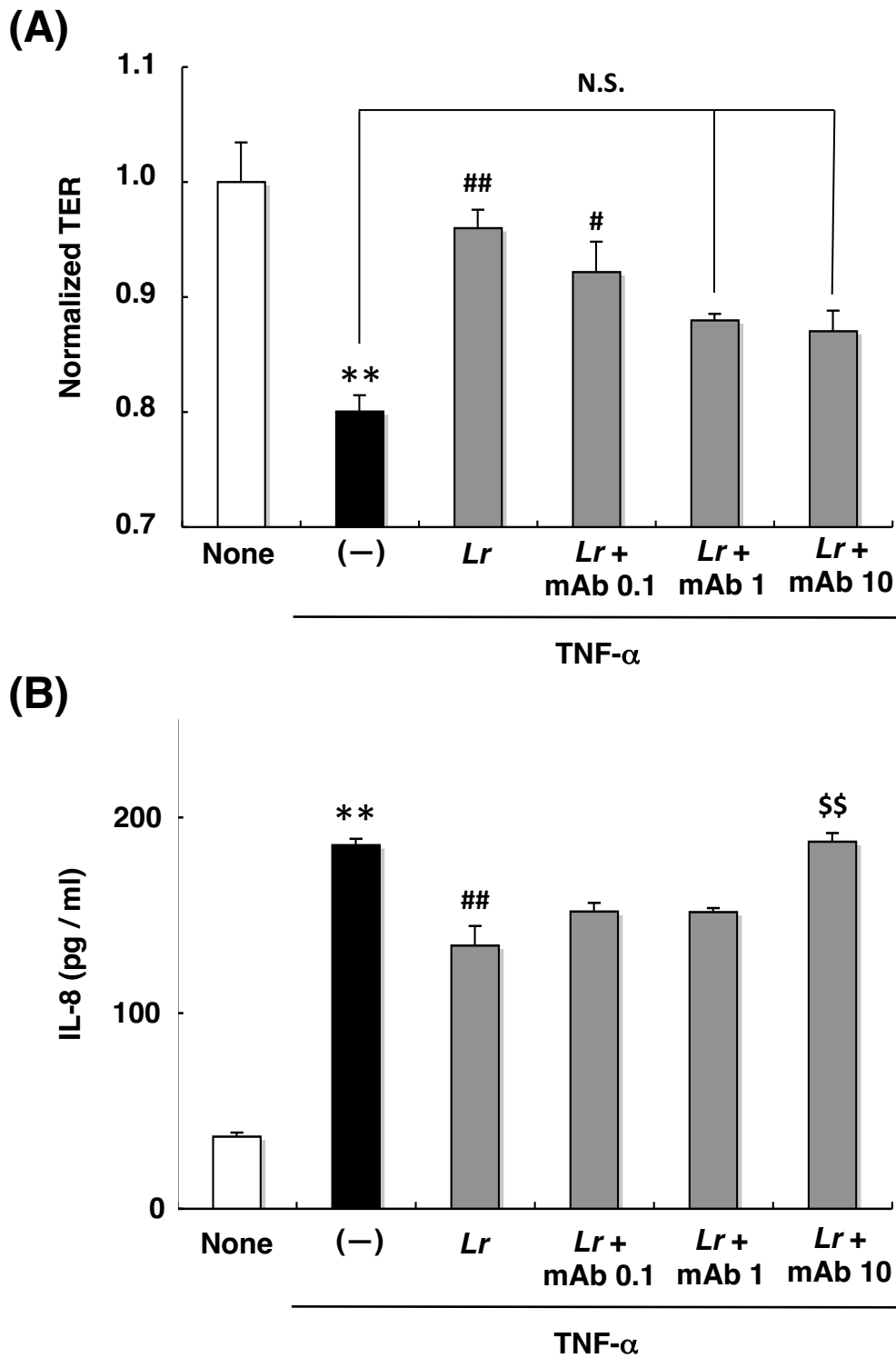


Figure 3-3. Inhibitory effects of anti-TLR2 antibody (0.1-10 μ g/ml) on the protective effect of *L. rhamnosus* (*Lr*) on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes in A) transepithelial resistance (TER) and B) IL-8 secretion by Caco-2 cells. Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-); \$\$ P < 0.01 versus TNF- α +*L. rhamnosus* (*Lr*).

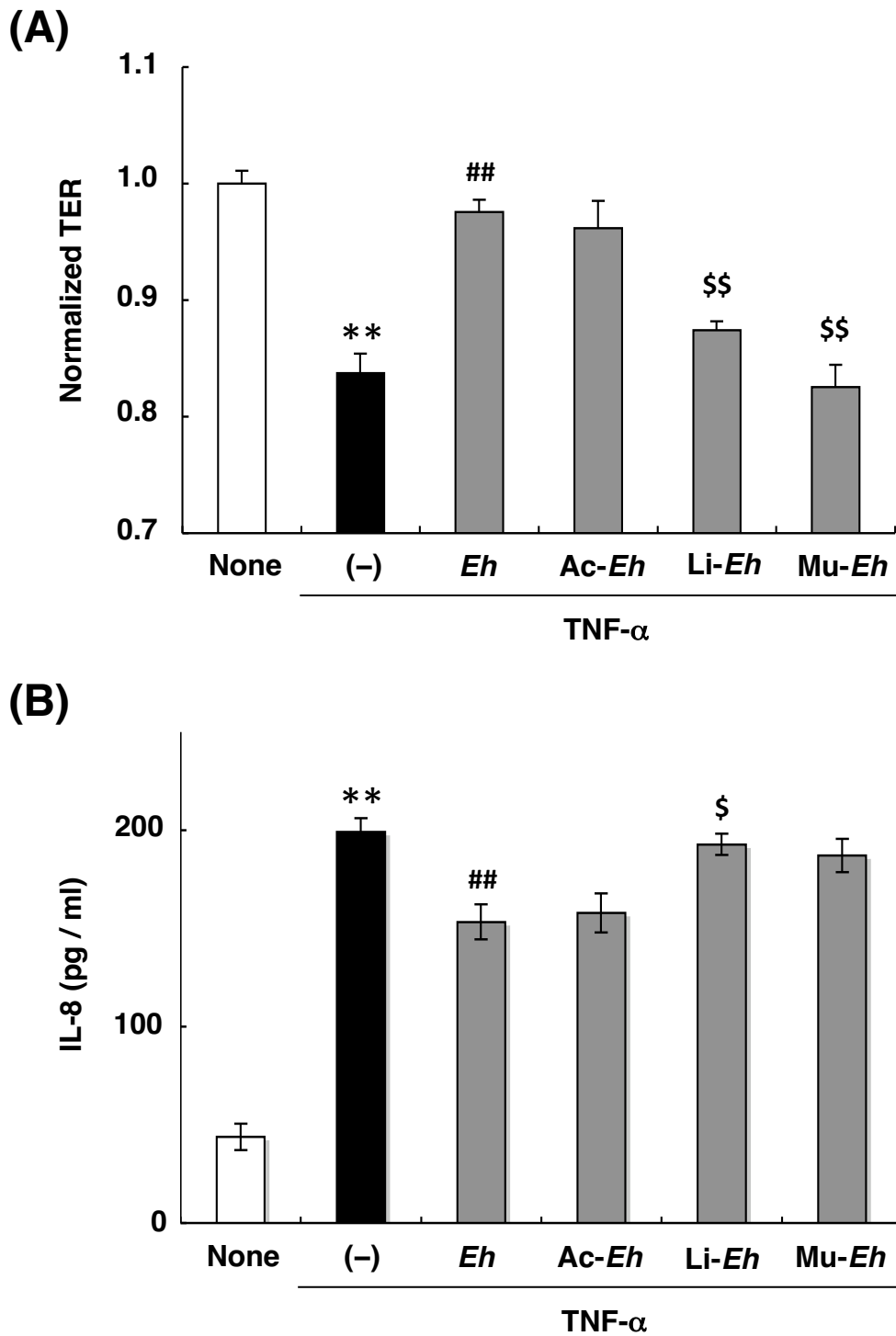
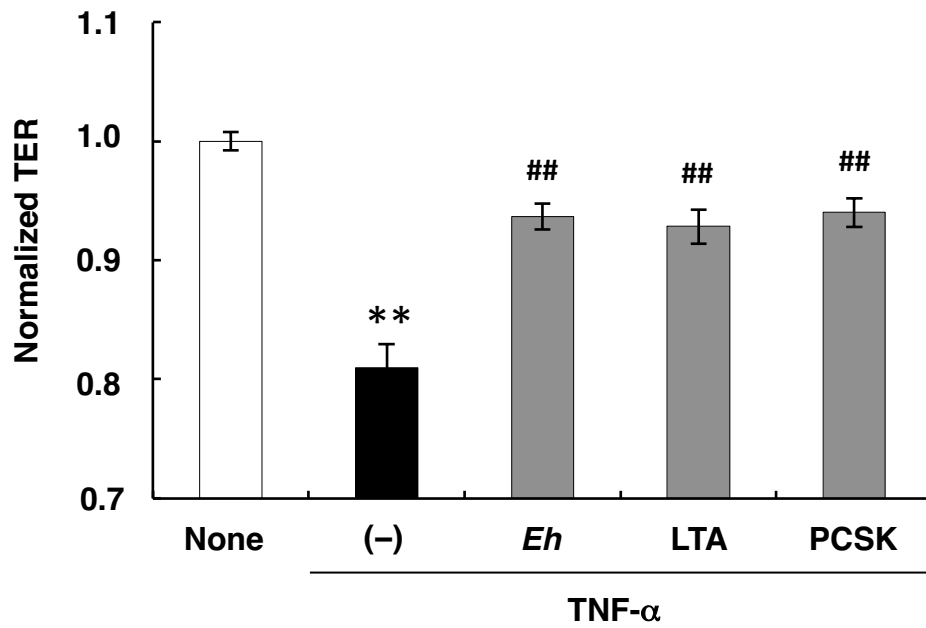


Figure 3-4. Protective effect of *E. hirae* (*Eh*), actinase-treated *E. hirae* (*Ac-Eh*), and lipase-treated *E. hirae* (*Li-Eh*), and mutanolysin-treated *E. hirae* (*Mu-Eh*) on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes in A) transepithelial resistance (TER) and B) IL-8 secretion by Caco-2 cells. Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-); \$ P < 0.05 versus TNF- α +*E. hirae* (*Eh*).

(A)



(B)

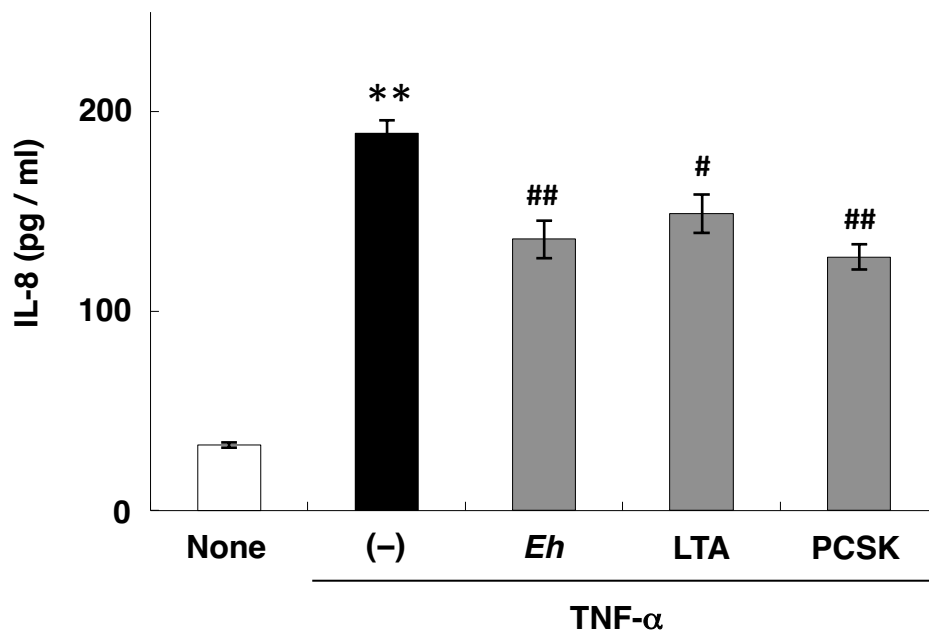
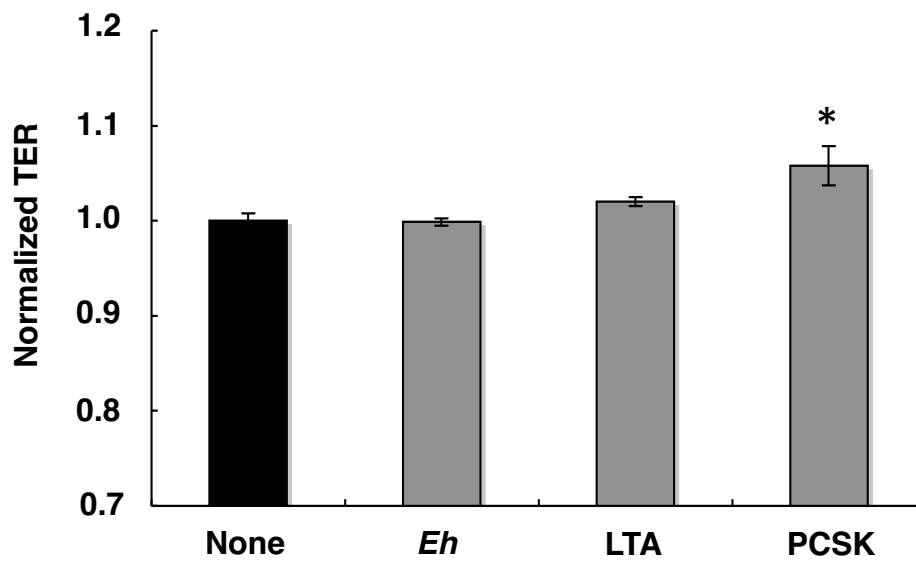


Figure 3-5. Protective effect of *E. hirae* (*Eh*), lipoteichoic acid (LTA), and of Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (PCSK) on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes in A) transepithelial resistance (TER) and B) IL-8 secretion by Caco-2 cells. Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). ** P < 0.01 versus controls (none); # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus TNF- α alone (-).

(A)



(B)

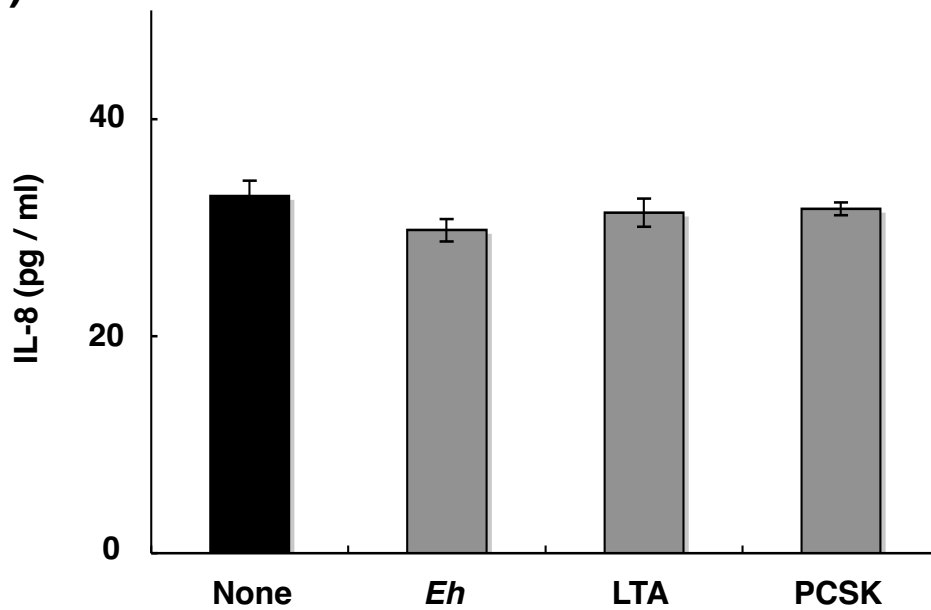


Figure 3-6. Effect of *E. hirae* (*Eh*), lipoteichoic acid (LTA), and of Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (PCSK) on Caco-2 cells not treated with tumor necrosis factor- α (TNF- α). In this experiment, the cells were not exposed to TNF- α to mimic normal (uninflamed) conditions. TER (a) and IL-8 secretion (b) were measured after 48-h incubation. Results are expressed as means \pm standard error (n = 3). * P < 0.01 versus controls (none).

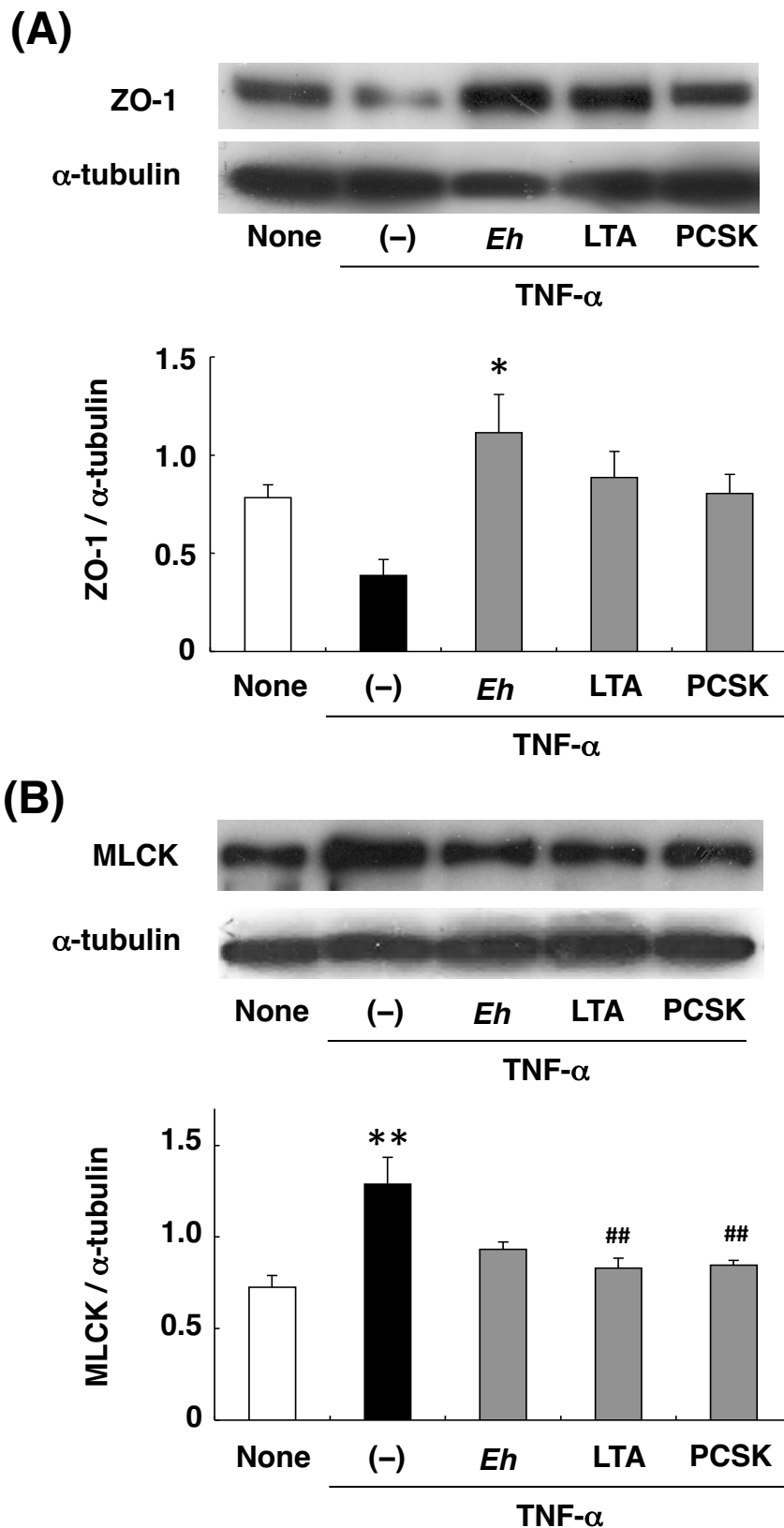


Figure 3-7. Expression of A) zonula occludens-1 (ZO-1) and B) myosin light-chain kinase (MLCK) in Caco-2 cells. The expression of ZO-1, MLCK, and α -tubulin was detected by Western blotting of the cellular lysates. Images are representative of 3 independent experiments. Results are expressed as means \pm standard error ($n = 3$). ** $P < 0.01$ versus the controls (none); ## $P < 0.01$ versus TNF- α alone (-).

第4章

腸管バリア保護効果を高める乳酸菌培養法の確立

1 序論

第3章では、腸管バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の一つとして LTA を同定した。LTA を含むテイコ酸は、その構造の違いにより機能が異なることが報告されている。特に、テイコ酸側鎖は D-alanine (D-Ala) や D-glucose により修飾されており、D-Ala 修飾の度合いが、菌のバイオフィーム形成(86)、上皮細胞への接着(87, 88)、または免疫調節機能(89-92)に影響を与えることが報告されている。しかし、テイコ酸の D-Ala 修飾が腸管バリア保護効果にどのような影響を与えるか、これまでに検討されていない。

そこで本章では、テイコ酸の D-Ala 修飾と腸管バリア保護効果との関係性を解析した。さらに、得られた結果をもとに、腸管バリア保護効果を増強させる乳酸菌培養条件の解析を試みた。

2 材料および方法

2.1 乳酸菌の培養

Streptococcus thermophilus ATCC 19258^T は 4.5% M17 broth (Merck) で 37°C、嫌気条件下で培養した。グリセロールストックしていた本菌を M17 培地に接種後、18 時間の前培養を行なった。菌培養液を OD600 = 10⁻⁴ となるように希釈し、本培養を行なった。いくつかの実験では、菌株を MgSO₄ (50mM) あるいは L-alanine (L-Ala) (3mM) を添加した 4.5% M17 培地、または異なる培地濃度 (2%、10% M17 培地) や培養温度 (30°C、37°C) で培養した。菌数は、菌培養液の吸光度を測定することにより算出した (OD600 of 1.0 = 2.82 × 10⁸ cfu/ml)。

2.2 テイコ酸中D-alanineの定量

乳酸菌細胞壁に存在するテイコ酸中のD-Alaは、Kristianら(87)の方法に準じて定量した。回収した*S. thermophilus*を滅菌水で2回洗浄後、10分間煮沸した。菌体を0.1M NaOHで37°C、1時間インキュベートし、テイコ酸中のD-Alaを遊離させた。遠心分離後、HClで中和した上清をサンプルとした。このような緩やかなアルカリ加水分解条件下では、ペプチドグリカン由来のD-Alaと区別して、エステル結合で結合しているテイコ酸由来のD-Alaのみを抽出できる(93)。

調製したサンプル、または500nmol/mlのアミノ酸標準溶液(D-Glu、L-Thr、L-His、L-Arg、L-Ala、L-Lys、およびD-Ala)を1% N^α-(5-Fluoro-2,4-dinitro-phenyl)-L-alaninamide (FDAA)と混合し、40°C、1時間インキュベートすることでアミノ酸の誘導化・ラベル化を行い、HPLC分析に供した。分析にはInertsil C18カラム(4.6mm × 150mm, GL Science)を用いた。移動相A(20mMリン酸ナトリウム, pH 5.7)と移動相B(20mMリン酸ナトリウム: アセトニトリル=2:3)を用い、移動相B濃度を0~100%にリニアグラジエントに40分間で変化させ、流速1 ml/minで溶出を行い、340 nmの吸光度で検出した。

2.3 Real-time PCR

菌培養液に2倍量のRNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen)を添加し、菌RNAの安定化を行った。遠心分離により菌体を回収し、10mg/mlリゾチーム(Wako Pure Chemicals)と50U/mlムタノリシン(Sigma-Aldrich)で溶菌した。Total RNAは、RNeasy kit (Qiagen)を用いて精製後、DNase I (Life Technology)で処理した。cDNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies)を用いて合成した。Real-time PCR反応は、KAPA SYBR Fast ABI Prism qPCR kit (Kapa Biosystems)を用い、Applied Biosystems 7700 Sequence Detection Systemを使用して行った。使用したプライマーとその配列をTable 4-1に示した。発現解析には、相対定量法として $\Delta\Delta Ct$ 法(94)を用いた。

各遺伝子の発現量は、内在性コントロールである16S rRNA発現量で補正後、コントロール群に対する相対値で示した。

2.4 腸管バリア保護効果の評価

第2章の方法に準じ、Caco-2細胞をTranswell上で分化させた。*S. thermophilus*の加熱死菌体 (2×10^5 cells/well) をTranswellのapical側に添加し12時間プレインキュベート後、TNF- α (20ng/ml) をbasal側に添加し、TER値を測定した。

2.5 統計処理

結果は全て平均値 \pm 標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVAにより行い、post-hoc testにはTukey法を用いた。*p*値が0.05未満の場合、統計的に有意とした。

3 結果および考察

第3章までは、主として*L. rhamnosus*を用いて検討を行った。それは、比較に用いた*Lactobacillus*属4菌株の中で、最も腸管バリア保護効果が高かったからであった (Figure 2-2)。しかし、*L. rhamnosus*は、ヨーグルトスターターとしては、*L. rhamnosus* GG株を除き、あまり頻用されていない。

そこで、機能性食品への応用を目指すため、本章では*S. thermophilus*を用いた。*S. thermophilus*は*Lactobacillus bulgaricus*とともにヨーグルト製造に用いられる菌種であり、機能性食品の開発に非常に適している。予備検討において、本菌株は前章までに用いた*L. rhamnosus*や*E. hirae*と同等のバリア保護効果を有することを確認している (data not shown)。

3.1 HPLC による D-Ala の定量

Marfey(95)が報告した FDAA 試薬でアミノ酸をジアステレオマー誘導体化・ラベル化し、その反応生成物を逆相 HPLC に供することにより、D 体と L 体のアミノ酸異性体を区別してできると考えた。そこで、グラム陽性菌の細胞壁構成アミノ酸として知られる D-Glu, L-Thr, L-His, L-Arg, L-Ala, L-Lys, および D-Ala を混合し、FDAA と反応させた。Figure 4-1. A に示したように、FDAA でジアステレオマー誘導体化・ラベル化したアミノ酸はそれぞれ異なる溶出時間で検出され、D-Ala とはっきりと区別することができた。また、D-Ala の濃度とピーク長により検量線を作成した結果、高い相関係数 ($r^2 = 0.995$) を示した (Figure 4-1 B)。従って、この HPLC 条件および検量線を用いて D-Ala の定量を行うことにした。

3.2 菌培養条件の違いによるテイコ酸 D-Ala 量の変化

菌の細胞壁構造は、増殖期や培養条件に大きな影響を受ける(96)。そこで、テイコ酸の D-Ala 修飾が菌の増殖期や培養温度に依存するか、検討を行った。*S. thermophilus* を誘導期、対数期、定常期移行期、定常期、および死滅期に回収し (Figure 4-2 A)、テイコ酸中の D-Ala 量を定量した。その結果、D-Ala 量は誘導期から対数期に増加し、定常期移行期に最大値を示した後、定常期から死滅期にかけて減少した (Figure 4-2 B)。この結果は、*Bacillus subtilis* を用いた過去の研究結果と一致している(93)。本研究における定常期以降の D-Ala 量減少にも、同様のメカニズムが関与しているかもしれない。

次に、*S. thermophilus* を低温 (30°C)、適温 (37°C)、または高温 (43°C) で培養し、D-Ala 量を定量した。*S. thermophilus* を低温で培養した場合、適温で培養した場合より長い誘導期を示したが、定常期での細胞濃度はいずれの条件でも同じであった (Figure 4-3 A)。*S. thermophilus* を高温で培養した場合、D-Ala 量は顕著に減少した (Figure 4-3 B)。低温で培養した場合も、有意差は

認められないものの、D-Ala 量の減少傾向が見られた (Figure 4-3 B)。高温培養によるテイコ酸 D-Ala 量の減少は、他のグラム陽性菌でも確認されている(97, 98)。

これらの結果を踏まえて、以降の実験では *S. thermophilus* を 37°C で培養し、定常期移行期に細胞を回収することにした。

3.3 テイコ酸の D-Ala 修飾と腸管バリア保護効果の関係

テイコ酸の D-Ala 修飾が腸管バリア保護効果に影響を与えるか否かを検討するために、*S. thermophilus* のテイコ酸 D-Ala 量を変化させ、それに伴う腸管バリア保護効果の変化を解析した。

テイコ酸の D-Ala 修飾は、*dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*, および *dltX* を含む遺伝子群にコードされたタンパク質により制御される(99)。*dltA*, *dltB*, *dltC*, または *dltD* を不活化した場合、テイコ酸の D-Ala 残基が欠損することから(87, 90, 100, 101)、テイコ酸の D-Ala 修飾にこれらの遺伝子群が必須であると考えられる。

S. aureus において、MgSO₄ は *dlt* 遺伝子群の mRNA 発現を抑制することが報告されている(102)。*S. thermophilus* においても、培地に MgSO₄ を添加することにより *dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*, および *dltX* の mRNA 発現量が減少した (Table 4-2)。なお、MgSO₄ 添加により *S. thermophilus* の増殖速度はやや低下したが

(Figure 4-4 A)、顕著な毒性は認められなかった (Figure 4-4 A)。*dlt* 遺伝子群の mRNA 発現減少と相関して、MgSO₄ 添加により D-Ala 量は顕著に減少した (Figure 4-4 B)。次に、MgSO₄ による D-Ala 量の低下が、腸管バリア保護効果に影響を与えるか検討した。Figure 4-4 C に示したように、37°C で定常期移行期まで培養した *S. thermophilus* は、TNF- α による TER 値低下を抑制した

(Figure 4-4 C, control)。しかし、*S. thermophilus* を MgSO₄ 添加培地で培養した場合、TER 値低下抑制効果は見られなかった (Figure 4-4 C, MgSO₄)。こ

これらの結果から、テイコ酸 D-Ala 量の変化が、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果に影響を与えることが示唆された。

3.4 テイコ酸の D-Ala 修飾促進による腸管バリア保護効果の増強

上記の実験により、テイコ酸の D-Ala 量と腸管バリア保護効果が相関することが示唆された。したがって、テイコ酸の D-Ala 修飾を促進させることにより、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果を増強できる可能性が考えられた。微生物の細胞壁構造および成分は、培地成分の影響を受ける。そこで、M17 培地中の成分がテイコ酸 D-Ala 量の増加、および *S. thermophilus* の腸管バリア保護効果の増強に寄与するか否かを検討するために、同菌を異なる濃度の M17 培地で培養し、D-Ala 量および TER 値低下抑制効果を解析した。

M17 培地濃度の違いは、*S. thermophilus* の増殖に影響を与えなかった (Figure 4-5 A)。M17 培地の濃度を 4.25% から 2% に減少させた場合、テイコ酸の D-Ala 量は顕著に減少した (Figure 4-5. B)。また、D-Ala 量の減少に伴い、2% M17 培地で培養した *S. thermophilus* では TER 値低下抑制効果は見られなかった (Figure 4-5 C)。一方、M17 培地濃度を 10% に増加させた場合、テイコ酸 D-Ala 量および TER 値低下抑制効果は有意に増加した (Figure 4-5 B, C)。以上の結果から、M17 培地中の成分がテイコ酸 D-Ala 量を増加させることが示された。さらに、テイコ酸 D-Ala 量の増加に伴い、*S. thermophilus* の腸管バリア保護が増強されることが示唆された。

次に、M17 培地中の L-Ala がテイコ酸 D-Ala 量増加に寄与しているのではないかと仮定し、3mM L-Ala を 4.25% M17 培地に添加して解析を行った。4.25% および 10% M17 培地中の L-Ala 濃度は、それぞれ 2.35mM および 5.53mM であり、その差は 3.18mM である。従って、4.25% M17 培地に 3mM L-Ala を添加することにより、10% M17 培地中の L-Ala 濃度とほぼ同等となる。解析の結果、M17 培地に L-Ala を添加することにより、*S. thermophilus* の増殖に影響

を与えずにテイコ酸 D-Ala 量を増加させることができた (Figure 4-6 A, B)。さらに、L-Ala 添加により *S. thermophilus* の TER 値低下抑制効果も増強された (Figure 4-6 C)。微生物において、D-Ala は Ala のラセミ化を触媒する酵素である Ala racemase (Alr) を介して合成される。*S. aureus* の *alr* 遺伝子を欠損させた場合、テイコ酸中の D-Ala が欠損することが報告されている(103)。このことから、L-Ala を基質とした D-Ala 合成がテイコ酸の D-Ala 修飾に必須であると考えられ、L-Ala 添加によるテイコ酸 D-Ala 量の増加は、Alr を介した D-Ala 合成量の増加に伴うものと示唆される。

以上の結果から、L-Ala 添加はテイコ酸の D-Ala 修飾を促進し、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果を増強させることが示された。

4 要約

LTA を含むテイコ酸の D-Ala 修飾は、菌の増殖期、培養温度を含む培養条件に大きな影響を受けることが明らかとなった。MgSO₄によりテイコ酸の D-Ala 修飾を抑制した場合、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果が減少した。このことから、テイコ酸の D-Ala 修飾が *S. thermophilus* の腸管バリア保護効果に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、L-Ala を添加した培地で *S. thermophilus* を培養することにより、テイコ酸の D-Ala 修飾が促進され、腸管バリア保護効果を増強することができた。

Table 4-1. Primer sequences used in this study.

Gene	Sequence	
<i>dltA</i>	Forward	5'-GCTCAATCACAACCCGACTT-3'
	Reverse	5'-CTATCCGAATCGGCTTTCAA-3'
<i>dltB</i>	Forward	5'-TATCGAGATGCGTGATGGAG-3'
	Reverse	5'-TCAATGGGACCACTTGTGAA-3'
<i>dltC</i>	Forward	5'-ATTCGTGTCCCAGTTTCAGA-3'
	Reverse	5'-CTCCGTTACCCCTTCAACAA-3'
<i>dltD</i>	Forward	5'-ATGGCAGATTTTGGTCCAG-3'
	Reverse	5'-TCATTCGTCAGCGTACTGC-3'
<i>dltX</i>	Forward	5'-TGTCCCTCGTCTTTTTAGGACA-3'
	Reverse	5'-CTTGACCTTGTCCCTAGGTAATTG-3'
16S	Forward	5'-AGCGTTGTCCGGATTTATTG-3'
	Reverse	5'-CACTCTCCCCTTCTGCACTC-3'

Table 4-2. Effects of MgSO₄ on *dlt* mRNA expression.

	Control	MgSO ₄ (50mM)
<i>dltA</i>	1.00±0.07	0.34±0.08**
<i>dltB</i>	1.00±0.11	0.38±0.11*
<i>dltC</i>	1.00±0.13	0.34±0.11*
<i>dltD</i>	1.00±0.02	0.56±0.10*
<i>dltX</i>	1.00±0.29	0.27±0.08

Levels of *dlt* mRNA were normalized to 16S rRNA, and expressed relative to the sample incubated in control broth. Results are expressed as means ± SE (n = 3). **P* < 0.05 versus control, and ***P* < 0.01 versus control.

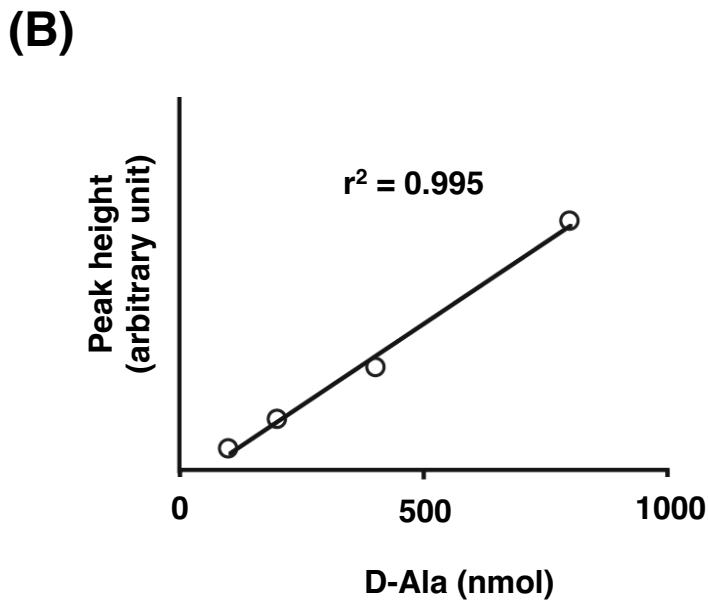
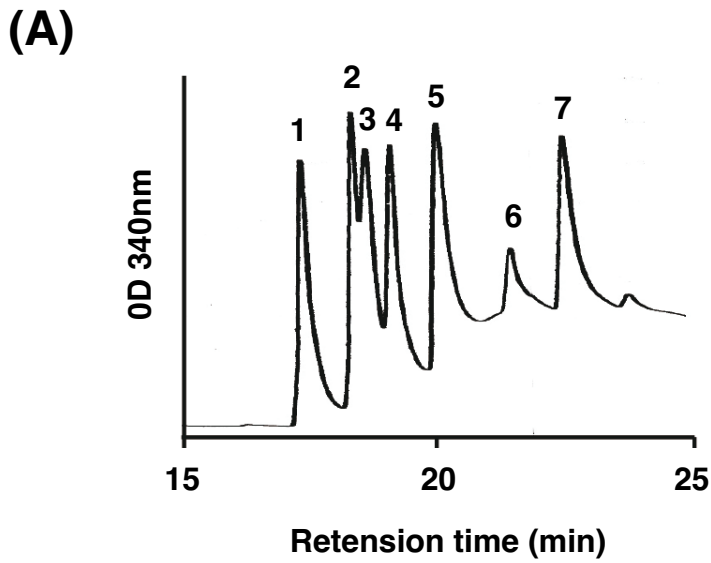
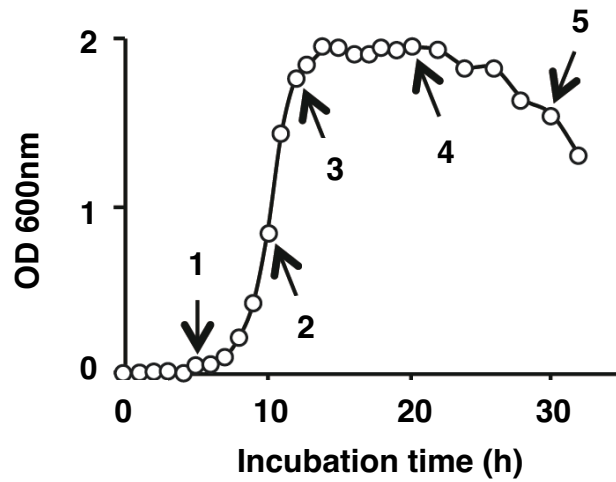


Figure 4-1. Quantification of D-Ala by HPLC. (A) The standard amino acids (D-Glu, L-Thr, L-His, L-Arg, L-Ala, L-Lys, and D-Ala) were coupled with 1% FDAA, and the mixture (500nmol each) was applied to HPLC. Peak 1, D-Glu and L-Thr; peak 2, L-Lys; peak 3, L-His; peak 4, L-Arg; peak 5, L-Ala; and peak 6, L-Lys; peak 7, D-Ala. (B) The regression line was constructed with serial dilution (100, 200, 400, and 800nmol/l) of D-Ala coupled with FDAA.

(A)



(B)

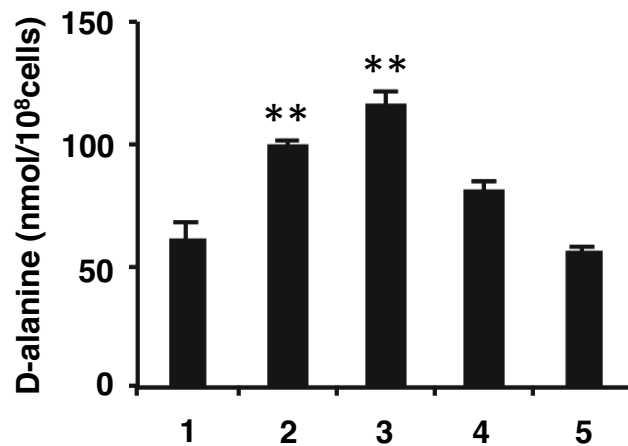
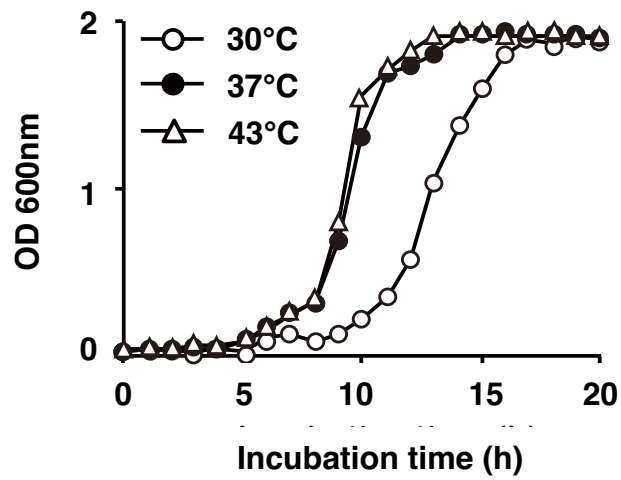


Figure 4-2. D-Ala content was growth phase-dependent. (A) *S. thermophilus* was cultured, and the growth was measured spectrophotometrically at 600nm. Representative growth curve was shown. The bacterial cells were harvested at five time points, indicated by arrows (1, lag-phase; 2, exponential-phase; 3, early-stationary-phase; 4, stationary-phase; and 5, death-phase). (B) The bacterial cells were harvested at the five points during growth, and the D-Ala content was quantified. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). ** $P < 0.01$ versus lag-phase (1).

(A)



(B)

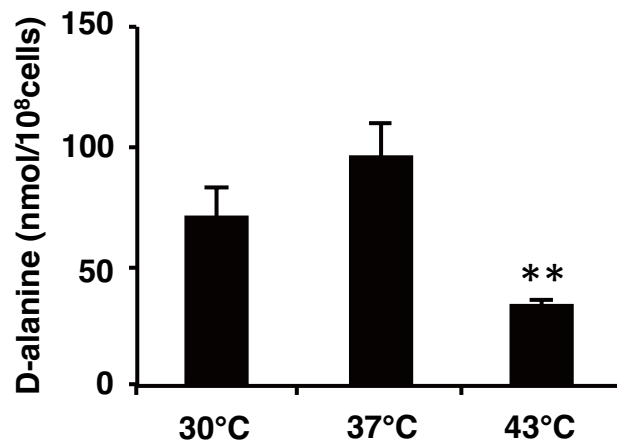


Figure 4-3. D-Ala content was growth temperature-dependent. (A) *S. thermophilus* was cultured at 30°C, 37°C, and 43°C and the cell growth was measured spectrophotometrically at 600nm. Representative growth curve was shown. (B) The bacterial cells were harvested at the early-stationary-phase, and the D-Ala content was quantified. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). ** $P < 0.01$ versus *S. thermophilus* incubated at 37°C.

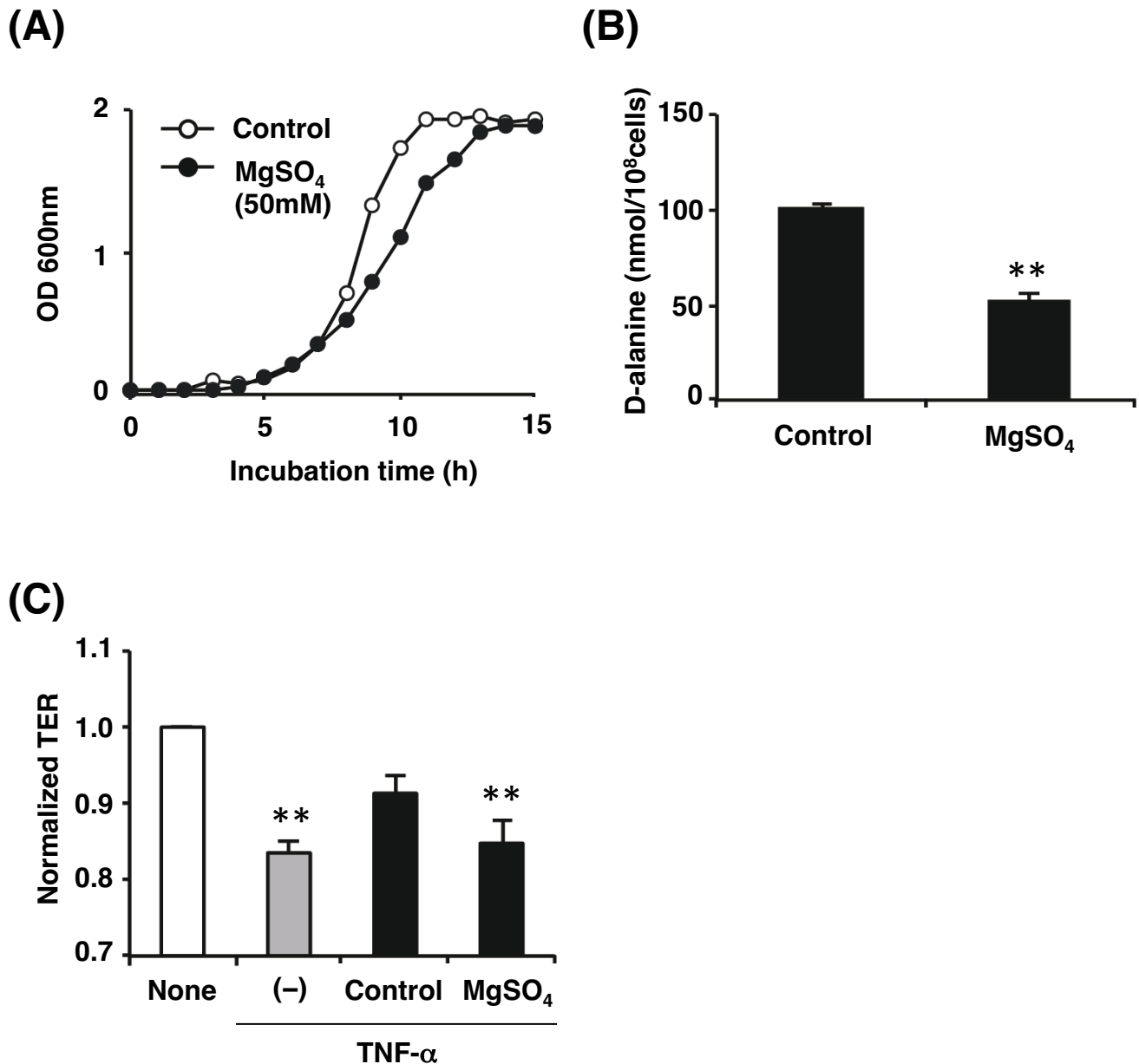


Figure 4-4. Effects of MgSO₄ on D-Ala content, and barrier-protecting activity of *S. thermophilus*. *S. thermophilus* was cultured in M17 broth or M17 broth supplemented with 50mM MgSO₄. (A) The cell growth was measured spectrophotometrically at 600nm. Representative growth curve was shown. (B) The bacterial cells were harvested at the early-stationary-phase, and the D-Ala content was quantified. Results are expressed as means ± SE (n = 3). ***P* < 0.01 versus control. (C) Caco-2 cell monolayers were treated *S. thermophilus* and TNF-α. TER was measured 48h after TNF-α treatment. Results are expressed as means ± SE (n = 3). ***P* < 0.01 versus non-treated monolayers (None).

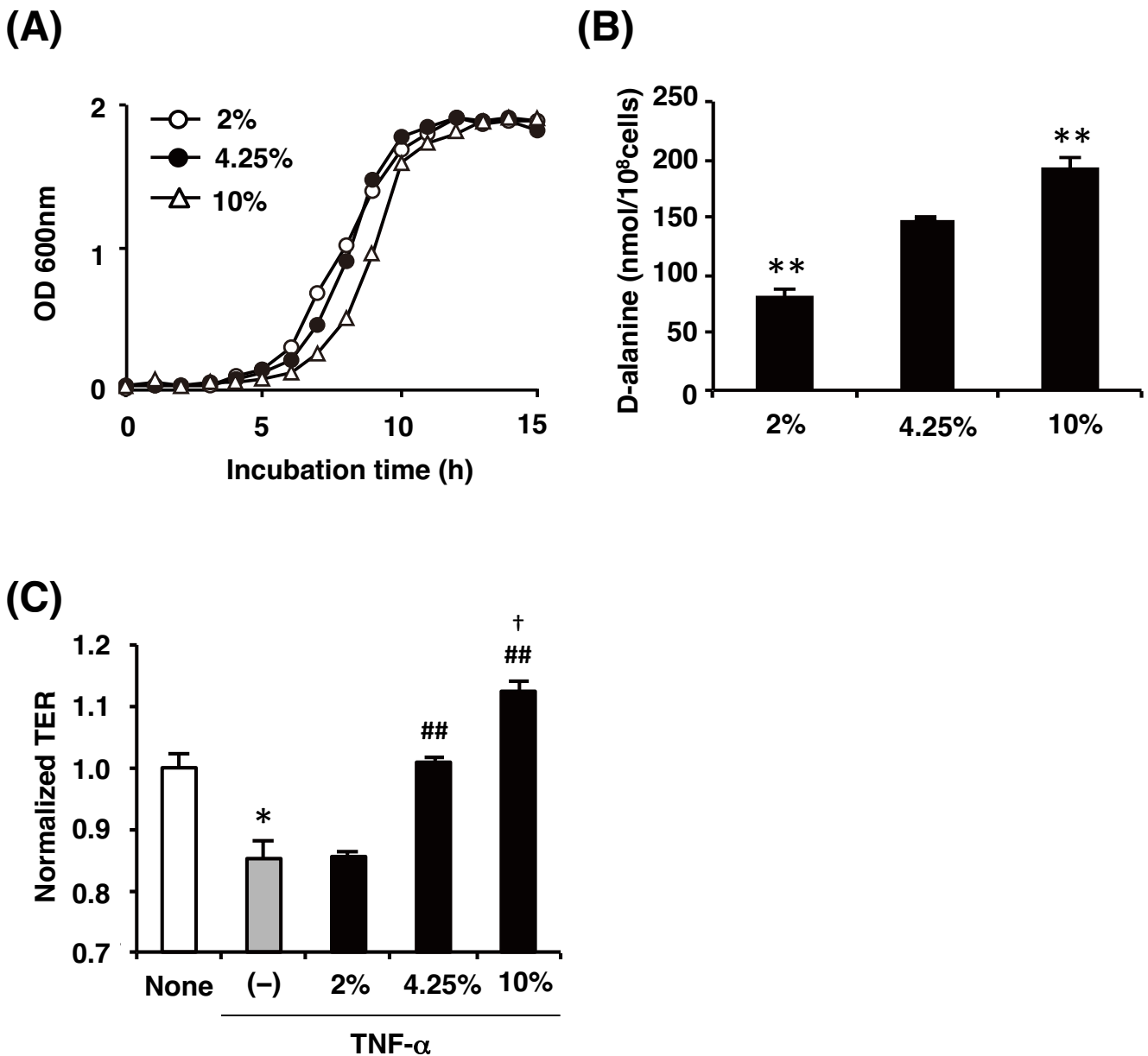


Figure 4-5. High concentration of culture medium increases D-Ala content and the barrier-protecting effect of *S. thermophilus*. *S. thermophilus* was cultured in 2, 4.25, or 10% M17 broth. (A) The cell growth was measured spectrophotometrically at 600nm. Representative growth curve was shown. (B) The bacterial cells were harvested at the early-stationary-phase. The D-Ala content was quantified. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). ***P* < 0.01 versus *S. thermophilus* cultured in 4.25% M17 broth (4.25%). (C) Caco-2 cell monolayers were treated *S. thermophilus* and TNF- α . TER was measured 48h after TNF- α treatment. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). **P* < 0.05 versus non-treated monolayers (None). ; ##*P* < 0.01 versus TNF- α alone (-); †*P* < 0.05 versus *S. thermophilus* cultured in 4.25% M17 broth (4.25%).

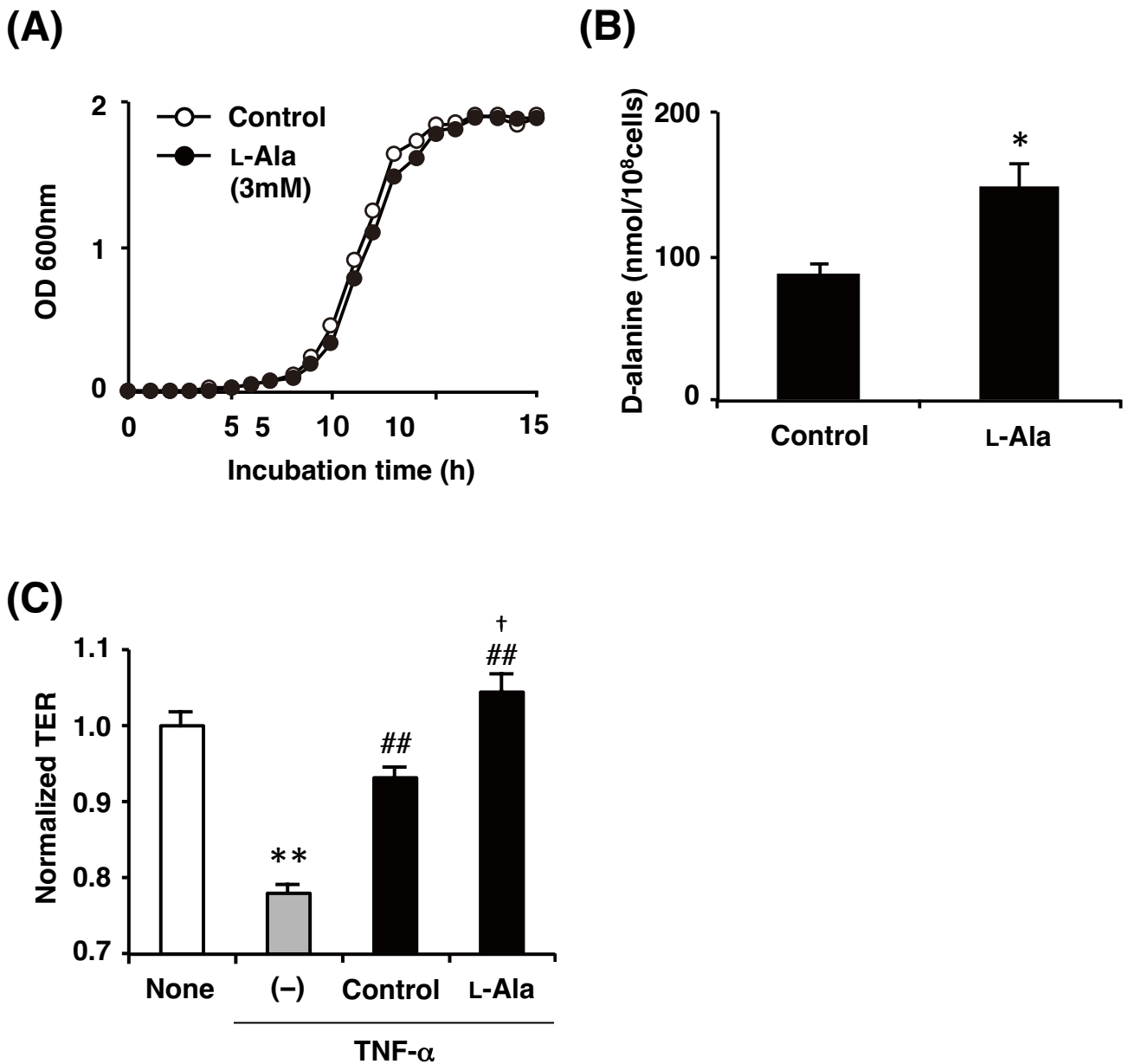


Figure 4-6. Effects of L-Ala on D-Ala content, and barrier-protecting activity of *S. thermophilus*. *S. thermophilus* was cultured in M17 broth or M17 broth supplemented with 3mM L-Ala. (A) The cell growth was measured spectrophotometrically at 600nm. Representative growth curve was shown. (B) The bacterial cells were harvested at the early-stationary-phase, and the D-Ala content was quantified. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). ** $P < 0.01$ versus control. (C) Caco-2 cell monolayers were treated *S. thermophilus* and TNF- α . TER was measured 48h after TNF- α treatment. Results are expressed as means \pm SE (n = 3). ** $P < 0.01$ versus non-treated monolayers (None).

第5章

乳酸菌による炎症性 T 細胞分化抑制効果

1 序論

乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持メカニズムとして、腸管バリア保護とともに腸管免疫細胞の制御が挙げられる。特に IBD などの腸管炎症疾患においては、Th1 や Th17 などの炎症性 Th 細胞の活性化が病因に深く関与している。これらの細胞が活性化される原因などは不明な点が多く残されているが、Th1 や Th17 が産生する炎症性サイトカインは、腸管バリア機能の低下を誘導するとともに、組織の炎症反応を促進する。従って、これらの炎症性 Th 細胞の活性化を抑制することは、腸管ホメオスタシス維持において非常に重要である。

当研究室の先行研究によって、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (以下 *B. infantis*) が腸管 Th17 細胞を抑制することを見いだされている(104)。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多く残されている。また、第 2-4 章で用いた lactobacilli や streptococci に比べ、bifidobacteria は大腸に定着・生息しやすい菌であり、大腸炎の予防・緩和に、より適切ではないかと考えた。そこで本章では、DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いて、Th1 や Th17 細胞の活性化メカニズムを解析するとともに、*B. infantis* による大腸炎抑制効果の評価、および腸管 Th17 細胞の抑制メカニズムの解明を試みた。

2 材料および方法

2.1 乳酸菌の培養

B. longum subsp. *infantis* JCM1222^T は GAM broth (日水製薬) で 37°C、嫌気条件下で 16 時間培養した。菌体を PBS で 3 回洗浄後、10⁸ cells/ml となるように PBS に懸濁し、試験に用いるまで -80°C で保存した。

2.2 動物実験

第2章の方法に準じて、DSS投与により腸炎を発症するマウスモデルを作成した。6-8週齢の雌性BALB/cマウスをランダムに3つのグループ(n=4-6)に分けた。Group 1 (None)に、0日目から5日目にPBS(菌体のかわり)を経口投与した。Group 2 (DSS)には3.5% DSSを飲み水として与え、PBSを経口投与した。Group 3 (DSS+Bi)には、3.5% DSSを飲み水として与え、*B. infantis* 生菌(10⁷ cells/mouse/day)をそれぞれ経口投与した。

体重測定を毎日同じ時刻に行った。DSS投与から5日目に頸椎脱臼によりマウスを屠殺し解剖を行った。盲腸から直腸までの大腸全体を摘出し、炎症の指標として大腸の長さを測定した。

2.3 大腸組織のサイトカイン量測定

マウスの結腸下部(5cm)をサンプルとして用いた。結腸を水平方向に開き、腸内容物を取り除いた後に、100IU/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシン、および50µg/ml ゲンタマイシンを含有する冷PBSで洗浄した。結腸を5mmほどの切片にカットし、24 well プレートで24時間培養した。培地は、10% 牛胎仔血清(ICN Biochemicals, Inc.)、10mM 2-メルカプトエタノール(関東化学)、100IU/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシン、50mg/ml ゲンタマイシン、および0.01M 4-(2-ヒドロキシジメチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(Wako Pure Chemicals)を含有するRPMI1640(Invitrogen)を用いた。24時間後に培地上清を回収し、IFN-γ, IL-17, IL-4, およびIL-10産生量をELISA法で測定した。また、使用した腸管組織のタンパク質濃度を測定し、各サンプル間のサイトカイン産生量を組織タンパク質濃度で補正した。

2.4 大腸上皮細胞の単離

上記と同様にマウスの結腸下部を摘出・洗浄し、1mM DTT を含む PBS 中で室温、10 分間振盪させた。結腸を 30mM EDTA を含有する PBS に移し、37°C、10 分間インキュベートした。1 分間ボルテックスして上皮細胞を剥離し、残った組織片を取り除いた。得られた上皮細胞を冷 PBS で 2 回洗浄後、2mg/ml ディスパーゼ (Life Technologies) および 50mg/ml DNase I (Roche) を含有する PBS に再懸濁した。細胞懸濁液を 2 分間おきに 10 秒間ボルテックスしながら、37°C、30 分間インキュベートした。上皮細胞を新たな 2mg/ml ディスパーゼおよび 50mg/ml DNase I を含有する PBS に再懸濁し、同様の操作をもう一度繰り返すことで単細胞化した。得られた上皮細胞は 20%パーコール (GE Healthcare) に再懸濁し、40%パーコール上に重層後、600g で 15 分間遠心分離した。20%/40%パーコールの境界層から精製された上皮細胞を回収した。

2.5 脾細胞および T 細胞の単離

6 週齢の雌性 BALB/c マウスを頸椎脱臼で屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓を滅菌ナイロンメッシュで挟み、5ml の RPMI 完全培地中でシリンジのプランジャー裏側を用いて押しつぶした。得られた脾細胞を red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich) に再懸濁し、氷上で 5 分間静置することで溶血処理を行った後、冷 PBS で 2 回洗浄し、脾細胞サンプルとして以降の実験に用いた。

脾細胞からの T 細胞単離には、pan T cell isolation kit (miltenyi) を用いた。マニュアルに従って脾細胞中の非 T 細胞を磁気ビーズで標識し、磁場に設置したカラムに通すことで、T 細胞をネガティブセレクション法により得た。

CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の単離には、CD4⁺ Microbeads (miltenyi) を用いた。マニュアルに従って T 細胞中の CD4⁺ T 細胞を磁気ビーズで標識し、磁場に設置したカラムに通すことで、CD4⁺ T 細胞をポジティブセレクション法、CD8⁺ T 細胞をネガティブセレクション法によりそれぞれ得た。

2.6 共培養

上記のように単離した大腸上皮細胞を、脾細胞、T細胞、CD4⁺T、またはCD8⁺T細胞と共培養した。大腸上皮細胞は 2×10^5 cells/wellとなるように、また、脾細胞、T細胞、CD4⁺T、あるいはCD8⁺T細胞は 1×10^6 cells/wellとなるようにそれぞれ調製し、96 well プレートに播種した。培地は、上記のRPMI培地を用いた。T細胞、CD4⁺T、またはCD8⁺T細胞を用いる場合は、細胞懸濁液に抗CD3 ϵ 抗体(miltenyi)を最終濃度5mg/mlとなるように添加した。いくつかの実験では、大腸上皮細胞を抗CD80抗体(10mg/ml; Abcam)または抗CD86抗体(10mg/ml; Abcam)で37°C、30分間前処理した後、CD4⁺T細胞と共培養した。また、他の実験では、CD4⁺T細胞を抗CD40抗体(10mg/ml; Abcam)で37°C、30分間前処理した後、大腸上皮細胞と共培養した。5日間共培養後、培養上清を回収し、IFN- γ , IL-17, IL-4, およびIL-10産生量をELISA法で測定した。

2.7 フローサイトメトリー

上記のように精製した大腸上皮細胞を、 1×10^6 cells/mlとなるように2%牛胎仔血清を含有するPBSに懸濁した。細胞の固定および透過処理は、IntraPrep試薬(Beckman Coulter)を用いてマニュアルに従って行った。細胞を固定後、phycoerythrin (PE)/Cyanine (Cy) 5 抗CD80抗体(eBioscience)、allophycocyanin (APC)抗CD86抗体(eBioscience)、またはAPC抗CD40抗体(eBioscience)を細胞懸濁液に加え4°C、30分間インキュベートし表面抗原を標識した。細胞を透過処理後、FITC抗pan cytokeratin抗体(Sigma-Aldrich)を細胞懸濁液に加え4°C、30分間インキュベートしサイトケラチン(上皮細胞のマーカー)を標識した。また、細胞を各抗体のアイソタイプコントロール抗体で同様に処理し、コントロールサンプルとして用いた。フローサイトメーター(Guava EasyCyte HT flow cytometry systems, Merck)を用いて、単離し

た上皮細胞の精製度、または CD80, CD86, および CD40 発現細胞の割合を解析した。

2.8 *in vitro* 細胞実験

マウス腸管上皮様株化細胞である colon-26 は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより入手した。細胞培養用の培地として、10%牛胎仔血清、1%非必須アミノ酸、100IU/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、および 50mg/ml ゲンタマイシンを含有する RPMI1640 培地を用いた。細胞を 75cm² の組織培養フラスコで約 70~80%コンフルエンスになるまで培養し、5 \times 10⁴ cells/well となるように 24 well プレートに播種した。一晩培養後、*B. infantis* (生菌) を 1 \times 10⁵ cells/well となるように添加し、2 時間プレインキュベートした。その後、100IU/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加して *B. infantis* の増殖を停止させ、IFN- γ (20ng/ml) を添加し、6、24、48、および 72 時間インキュベートした。Trizol (Life Technologies) で細胞を回収し、サンプルを-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

2.9 Real-time PCR

上記のように精製した大腸上皮細胞から、 μ MACS mRNA Isolation Kit (miltenyi) を用い、マニュアルに従って mRNA を抽出した。Trizol で回収した colon-26 細胞から、マニュアルに従って total RNA を抽出した。

cDNA の合成および real-time PCR 反応は、第 4 章の方法に準じて行った。使用したプライマーとその配列を Table 5-1 に示した。発現解析には、相対定量法として $\Delta\Delta$ Ct 法を用いた。各遺伝子の発現量は、内在性コントロールである β -actin 発現量で補正後、コントロール群に対する相対値で示した。

2.10 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で表した。平均値の比較を、one-way ANOVAにより行い、post-hoc testにはTukey法を用いた。p値が0.05未満の場合、統計的に有意とした。

3 結果および考察

3.1 *B. infantis*による腸炎抑制効果

第2章で、*L. rhamnosus*がDSS誘導性大腸炎を抑制することを示した。*B. infantis*も同様な腸炎抑制抑制効果を有するか、検討を行った。その結果、*B. infantis*を経口投与することにより、DSSによる体重減少および大腸の萎縮が抑制された(Figure 5-1, 5-2)。このことから、*B. infantis*も腸炎抑制効果を有することが示された。

Caco-2細胞を用いた腸管バリア機能評価系において、*B. infantis*は第2~4章で用いた他の菌株ほど高いTER値低下抑制効果を示さなかった(data not shown)。また、本菌株は、*Escherichia coli* O157による腸管バリア機能の低下を抑制できないことも報告されている(105)。さらに、本菌株はTh17細胞が産生するIL-17の産生増加を抑制することが報告されている(104)。これらの知見から、*B. infantis*による腸炎抑制効果は、腸管バリア保護によるものではなく、炎症性Th細胞の抑制によるものと予想された。

そこで、マウス大腸組織のサイトカイン産生量を測定した。IFN- γ 、IL-17、およびIL-4は、炎症性Th細胞であるTh1、Th17、およびTh2細胞がそれぞれ産生する主要なサイトカインである。また、IL-10はTreg細胞(制御性Th細胞)が産生する主要なサイトカインである。DSS投与によりIL-4産生量に変化は見られなかったが、IFN- γ とIL-17の産生量が増加した(Figure 5-3)。また、抗炎症性サイトカインIL-10の産生量も増加した(Figure 5-3)。これらの結果は過去の報告と一致している(106, 107)。従って、DSS投与により、大腸でTh1

および Th17 細胞が活性化されたと示唆された。また、IL-10 産生が増加していたことから、炎症反応を抑制するために Treg 細胞が誘導された可能性が考えられた。一方、*B. infantis* を投与した群では、IFN- γ と IL-17 の産生増加が抑制された。これに伴い、IL-10 産生量も抑制された。これらの結果から、*B. infantis* は大腸の Th1 および Th17 細胞の活性化を抑制することが示唆された。

3.2 炎症上皮細胞による IFN- γ および IL-17 産生誘導

3.2.1 脾細胞からの IFN- γ および IL-17 産生誘導

IBD 患者の腸管上皮細胞は、炎症性サイトカインや T 細胞共刺激分子を異常発現しており、免疫細胞からの炎症性サイトカイン産生を促進することが報告されている(32, 33, 108)。そこで、DSS 誘導性腸炎における IFN- γ と IL-17 産生増加に、大腸上皮細胞が関与しているのではないかと仮定し、解析を試みた。

無処理マウスおよび DSS 投与マウスから大腸上皮細胞を単離し、無処理マウス由来の脾細胞と共培養した。脾細胞は T 細胞、B 細胞、樹状細胞やマクロファージなど、腸管免疫細胞と同様の細胞集団を有する。これらを 5 日間共培養後に IFN- γ と IL-17 産生量を測定した結果、DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞は、脾細胞からの IFN- γ と IL-17 の産生量を増加させた (Figure 5-4 B, C. ③)。一方、無処理マウス由来の大腸上皮細胞は、脾細胞からの IL-17 産生を誘導したが、DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞に比べ、その影響は小さかった (Figure 5-4 B, C. ②)。これらの結果から、DSS 投与により炎症状態にある大腸上皮細胞は、免疫細胞からの IFN- γ と IL-17 産生を誘導することが示唆された。

次に、炎症上皮細胞による IFN- γ と IL-17 産生誘導メカニズムの解明を試みた。メカニズムとして、炎症上皮細胞が産生するサイトカインなどの液性因子が関与することが考えられたため、大腸上皮細胞と脾細胞を Transwell 上で共培養した。Figure 5-4 A. ④のように、大腸上皮細胞を Transwell のフィルター上に、脾細胞を底ウェル上に播種した。この場合、大腸上皮細胞と脾細胞は直接接触

することはできないが、サイトカインなどの液性因子などにより相互作用することはできる。Figure 5-4 B, C. ④で示したように、Transwell 上で共培養することにより、DSS 投与マウス由来大腸上皮細胞による IFN- γ と IL-17 産生誘導が阻害された。このことから、炎症上皮細胞による IFN- γ と IL-17 産生誘導には、免疫細胞との直接接触が必須であることが明らかとなった。

3.2.2 CD4⁺T 細胞からの IFN- γ および IL-17 産生誘導

先に述べたように、脾細胞には T 細胞、B 細胞、樹状細胞やマクロファージなど様々な免疫細胞が存在する。そこで、炎症上皮細胞がどの免疫細胞群に作用し、IFN- γ や IL-17 産生を誘導するのかを検討した。無処理マウス由来の脾細胞を T 細胞と非 T 細胞とに分け、上記と同様に、無処理マウスおよび DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞と共培養した。大腸上皮細胞を非 T 細胞と共培養した場合、いずれのサイトカイン産生量も変化は見られなかった (data not shown)。また、無処理マウス由来 (None-IEC) と DSS 投与マウス由来 (DSS-IEC) の大腸上皮細胞からのサイトカイン産生量に差は見られなかった (Figure 5-5)。DSS マウス投与マウス由来の大腸上皮細胞は、T 細胞からの IFN- γ と IL-17 産生を顕著に増加させた (Figure 5-5 A, B. DSS-IEC/T)。IL-10 についても同様の傾向が見られた (Figure 5-5 D. DSS-IEC/T)。一方、無処理マウス由来の大腸上皮細胞は、これらのサイトカイン産生にほとんど影響を与えなかった (Figure 5-5. None-IEC/T)。このことから、炎症上皮細胞は T 細胞からの IFN- γ と IL-17 産生を誘導することが明らかとなった。また、これらの結果は大腸組織のサイトカイン産生量 (Figure 5-3) と同様の傾向を示したことから、DSS 投与による大腸の IFN- γ と IL-17 の産生増加に、大腸上皮細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、T 細胞を CD4⁺T 細胞 (ヘルパー T (Th) 細胞) と CD8⁺T 細胞 (キラー T 細胞) に分け、上記と同様に、無処理マウスおよび DSS 投与マウス由来の

大腸上皮細胞と共培養した。DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞は、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の両方から IFN- γ と IL-17 産生を誘導した (Figure 5-6. DSS-IEC/T)。一方、無処置マウス由来の大腸上皮細胞は、これらのサイトカイン産生にほとんど影響を与えなかった (Figure 5-6. None-IEC/T)。また、DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞は主に CD4⁺T 細胞からの IFN- γ と IL-17 産生を誘導することが明らかとなり、Th1 および Th17 細胞を活性化することが示唆された。

3.3 *B. infantis* による Th1/Th17 細胞抑制効果

上記の結果から、DSS 投与マウス由来の炎症上皮は、CD4⁺T 細胞と相互作用し、Th1/Th17 細胞を活性化することが示唆された。*B. infantis* はこのような炎症上皮の作用を抑制することにより DSS 誘導性大腸炎を抑制するのではないかと考え、検討を行った。無処理マウス、DSS 腸炎マウス、および DSS 腸炎下に *B. infantis* を経口投与マウスからそれぞれ大腸上皮細胞を単離し、CD4⁺T 細胞と共培養を行い、IFN- γ と IL-17 産生量を測定した。*B. infantis* の投与により、炎症上皮の IFN- γ /IL-17 産生誘導能が顕著に減少した (Figure 5-6. DSS+*Bi*-IEC/T)。この結果から、*B. infantis* は炎症上皮の Th1/Th17 活性化能を抑制することにより、大腸炎を抑制することが示唆された。

3.4 *B. infantis* による共刺激分子発現の制御

炎症上皮による Th1/Th17 活性化には、上皮細胞と CD4⁺T 細胞との直接接触が必須であると考えられる (Figure 5-4)。T 細胞の分化・活性化には、サイトカインの他に MHC 分子や共刺激分子によるシグナルが影響を与える。MHC 分子や共刺激分子は主に樹状細胞などの抗原提示細胞が発現しており、これらの細胞が T 細胞と直接接触することで T 細胞にシグナルを伝える。これまでに、Th1 や Th17 の分化・活性化に関わる共刺激分子がいくつか報告されている

(109-111)。IBD 患者の腸管上皮細胞は、MHC 分子や共刺激分子を異常発現しており、抗原提示細胞のような機能を有することが確認されている(32, 108, 112, 113)。

そこで、無処理マウス (None-IEC)、DSS 投与マウス (DSS-IEC)、および *B. infantis* と DSS 投与マウス (DSS+*Bi*-IEC) から大腸上皮細胞をそれぞれ単離し、MHC 分子や共刺激分子の mRNA 発現量を比較した。その結果、DSS 投与により、大腸上皮細胞の CD80, CD40, CD54, B7-DC, および B7-H3 などの共刺激分子 mRNA 発現量が増加していた (Figure 5-7)。マウス MHC 分子である H-2Ab1 と H-2Eb1 の mRNA 発現量は変化が見られなかった (Figure 5-7)。さらに、*B. infantis* の投与により DSS 投与による CD80, CD40, CD54, および B7-H3 の mRNA 発現量増加が抑制された (Figure 5-7)。これらの共刺激分子のうち、最も研究が進んでいる CD80 および CD40(29)に着目し、フローサイトメトリーによりタンパク質発現を解析した。その結果、mRNA 発現変化と同様に、DSS 投与により大腸上皮細胞の CD80 および CD40 タンパク質発現が増加した (Figure 5-8)。また、*B. infantis* 投与によりこれらの発現増加は抑制された。

次に、*B. infantis* の腸管上皮細胞への直接作用を調べるために、マウス腸管上皮様 colon-26 細胞を用いて、*B. infantis* の CD80 と CD40 発現抑制効果を検討した。炎症性サイトカインである IFN- γ が腸管上皮細胞の CD80 と CD40 発現を増加させることが報告されている(32, 113)。予備検討として、colon-26 細胞を IFN- γ で刺激し、CD80 と CD40 の mRNA 発現量変化を経時的に測定した結果、CD80 と CD40 の mRNA 発現量は、IFN- γ 刺激 6 時間後および 72 時間後にそれぞれ増加した (Figure 5-9)。そこで、IFN- γ 刺激 6 時間後および 72 時間後の CD80 と CD40 それぞれの mRNA 発現量を測定した。その結果、*B. infantis* は IFN- γ 刺激による CD80 と CD40 発現を有意に抑制した (Figure 5-10)。このことから、*B. infantis* は腸管上皮細胞に直接作用し、CD80 と CD40

発現を抑制することが明らかになった。

3.5 CD80 と CD40 を介した Th1/Th17 細胞の活性化

上記の結果から、*B. infantis*は大腸上皮細胞の CD80 と CD40 発現増加を抑制することにより Th1/Th17 細胞の活性化を抑制するのではないかと考えた。CD80 は、T 細胞に発現する CD28 と結合することにより T 細胞にシグナルを伝達する(29)。CD40 は、T 細胞に発現する CD40L のレセプターであり、CD40-CD40L の相互作用により上皮細胞にシグナルが伝達される(29)。そこで、炎症上皮による Th1/Th17 細胞の活性化に、CD80-CD28 および CD40-CD40L 相互作用が関与するのか否かを解析した。

DSS 腸炎マウスから大腸上皮細胞 (DSS-IEC) を、無処理マウスから CD4⁺T 細胞をそれぞれ単離し、共培養を行った。その際に、CD80 阻害抗体を添加し、CD80-CD28 相互作用をそれぞれ阻害した。その結果、CD80 阻害抗体は炎症上皮による IFN- γ と IL-17 産生誘導を抑制できなかった (Figure 5-11)。CD80 と同様に、CD86 も CD28 と結合することから、CD86 阻害抗体の影響についても検討を行った。その結果、CD80 阻害抗体と CD86 阻害抗体を同時に添加した場合、炎症上皮による IFN- γ と IL-17 産生誘導が抑制された (Figure 5-11)。

DSS 投与による CD86 mRNA 発現増加は確認できなかったが、腸管上皮細胞は定常的に CD86 を発現していることが報告されている(114)。従って、CD80 阻害抗体で CD80-CD28 相互作用を阻害しても、CD86-CD28 相互作用により CD28 シグナルが活性化されたと考えられる。CD28 シグナルは CD4⁺T 細胞の活性化において主要な役割を果たしており(115)、抗 CD28 抗体は CD4⁺T 細胞を用いた *ex vivo* 実験において活性化因子として凡用されている。

また、炎症上皮による IFN- γ と IL-17 産生誘導は、CD40L 阻害抗体の添加により抑制された。CD40-CD40L 相互作用は、樹状細胞による Th17 細胞の分化誘導において重要な役割を果たしていることが報告されており(116)、今回の結

果から、炎症上皮においても同様の役割を果たしていることが示唆された。

これらの結果から、炎症上皮による IFN- γ と IL-17 産生誘導には、CD80/CD86-CD28 あるいは CD40-CD40L の相互作用の両方が重要であることが明らかとなった。

3.6 CD80 と CD40 を介した Th1/Th17 細胞活性化メカニズムの解明

CD40 シグナルは樹状細胞の IL-6 産生を誘導し、産生された IL-6 が Th17 細胞の分化を誘導する(116)。IBD 患者の腸管上皮細胞においても、CD40 が異常発現していることが確認されている(113)。しかし、腸管上皮細胞における CD40 シグナルがどのような作用を持つのか、未だ明らかになっていない。そこで、炎症上皮における CD40 シグナルは、上皮細胞からの IL-6 産生を誘導して Th17 細胞の分化を誘導するのではないかと考え、解析を試みた。無処理マウス (None-IEC)、DSS 投与マウス (DSS-IEC)、および DSS と *B. infatis* 投与マウス (DSS+*Bi*⁻ IEC) の大腸上皮細胞をそれぞれ単離し、CD40 アゴニスト抗体により CD40 シグナルを活性化した。24 時間後に培養上清を回収し、上清中の IL-6 産生量を測定した。CD40 アゴニスト抗体は、DSS 投与マウス由来の大腸上皮細胞 (DSS-IEC) からの IL-6 産生を顕著に増加させた (Figure 5-12)。一方、無処理マウス由来 (None-IEC)、および DSS と *B. infatis* 投与マウス由来 (DSS+*Bi*⁻ IEC) の大腸上皮細胞は、CD40 アゴニスト抗体の影響を受けなかった (Figure 5-12)。これらの結果から、CD40 発現が増加した炎症上皮は、CD40 シグナルが活性化されることにより IL-6 を高産生することが明らかになった。CD40 シグナル活性化による炎症上皮からの IL-6 産生増加が Th17 分化誘導に寄与していることが示唆された。

一方、CD80 と CD40 を介した IFN- γ 産生誘導のメカニズムについては明らかにできなかった。Th1 細胞の分化は、炎症性サイトカイン IL-12 により誘導される。しかし、腸管上皮細胞は IL-12 を発現しないことが報告されており(117)、

IL-12 非依存的なメカニズムが関与している可能性がある。近年、IFN- γ と IL-17 の両方を産生する CD4⁺T 細胞サブセットが同定され(118)、大腸炎モデル動物の腸管においても、本サブセットの増加が確認されている(119)。従って、炎症上皮による CD4⁺T 細胞からの IFN- γ 産生誘導は、IFN- γ /IL-17 double positive CD4⁺T 細胞の増殖によるものかもしれない。これについては更なる解析が必要である。

4 要約

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた実験により、*B. infantis* は腸管の Th1/Th17 活性化を抑制することによって大腸炎を緩和することが示された。DSS マウスの大腸上皮細胞は、CD80 や CD40 などの共刺激分子を高発現しており、CD4⁺T 細胞と相互作用して Th1/Th17 細胞の分化を誘導することが明らかになった。*B. infantis* はこれらの共刺激分子の発現増加を抑制し、Th1/Th17 活性化を抑制することが示唆された。このように、*B. infantis* は免疫細胞に直接作用するのではなく、大腸上皮細胞に作用することで Th1/Th17 細胞を抑制するという、乳酸菌の新たな免疫調節作用機序を見出すことができた。

Table 5-1. Primer sequences used in this study.

Gene		Sequence
<i>CD80</i>	Forward	5'-GCCTTGCCGTTACAACCTCTC-3'
	Reverse	5'-TTCCCAGCAATGACAGACAG-3'
<i>CD86</i>	Forward	5'-GGGTGGAAGAAAGGTAAAGC-3'
	Reverse	5'-AAGGAAATGAGAGAGACAGGTG-3'
<i>CD40</i>	Forward	5'-GGCTTCGGGTTAAGAAGGAG-3'
	Reverse	5'-CCAAAGCCAGGGATACAGG-3'
<i>CD54</i>	Forward	5'-TTCCAGCTACCATCCCAAAG-3'
	Reverse	5'-CTTCAGAGGCAGGAAACAGG-3'
<i>B7h</i>	Forward	5'-GTTGGCAGCTACAGCAAACA-3'
	Reverse	5'-GGCATCAGGGAGACCACTAA-3'
<i>B7-H1</i>	Forward	5'-TGTGGTTTAGGGGTTTCATCG-3'
	Reverse	5'-CCAGGTTCCATTTTCAGTGC-3'
<i>B7-DC</i>	Forward	5'-GCAATGTGACCCTGGAATG-3'
	Reverse	5'-ACGGTGTGGGGATGTATCA-3'
<i>B7-H3</i>	Forward	5'-CCTGAGGCTCTGTGGGTAAC-3'
	Reverse	5'-GGTCGTCTTTGCCTTCTTTG-3'
<i>B7-H4</i>	Forward	5'-ACCTCAGCTGGAAACATTGG-3'
	Reverse	5'-GGTCGTCTTTGCCTTCTTTG-3'
<i>H-2Ab1</i>	Forward	5'-TCCGTCACAGGAGTCAGAAA-3'
	Reverse	5'-TTCGGAGCAGAGACATTCAG-3'
<i>H-2Eb1</i>	Forward	5'-CCTGGTCTGCTCTGTGAGTG-3'
	Reverse	5'-TCCTGTTTTCTCCTCCTTGC-3'

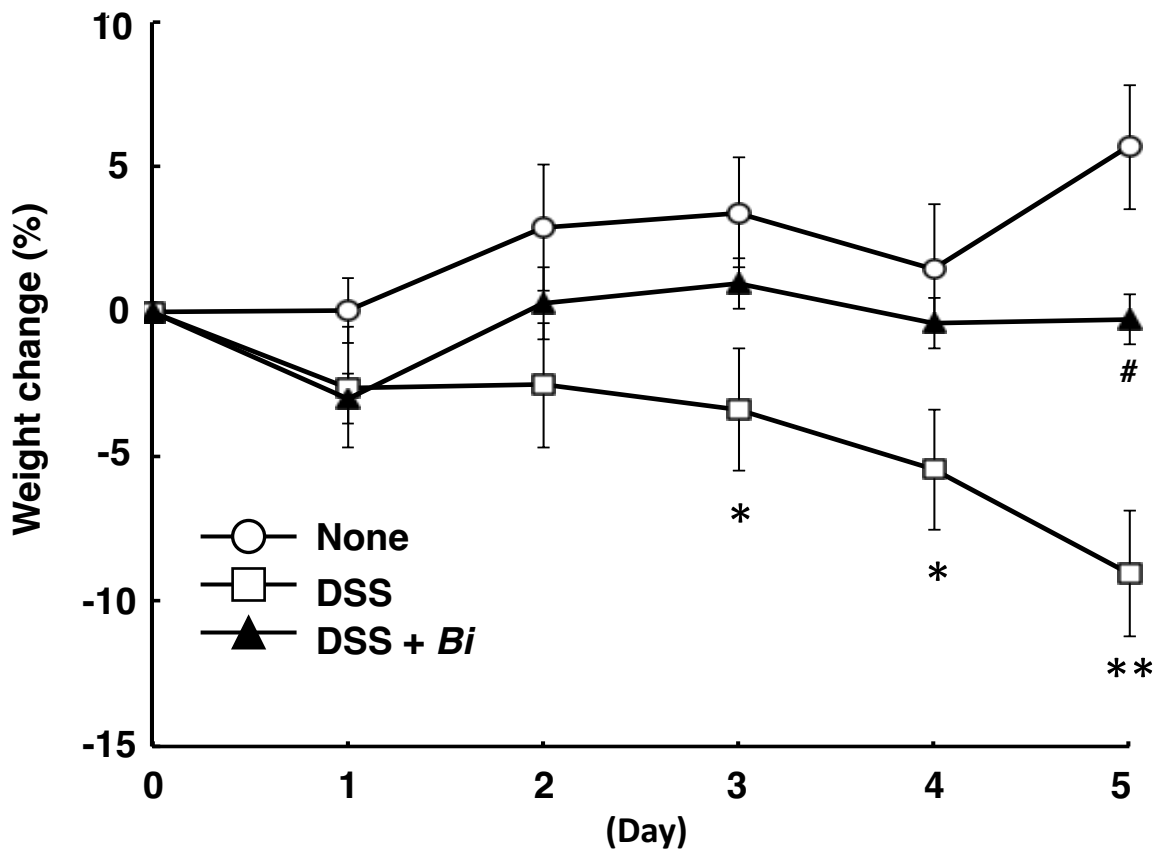


Figure 5-1. Changes in body weight of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). * P < 0.05 and ** P < 0.01 versus controls (none); # P < 0.05 versus DSS-treated mice (DSS).

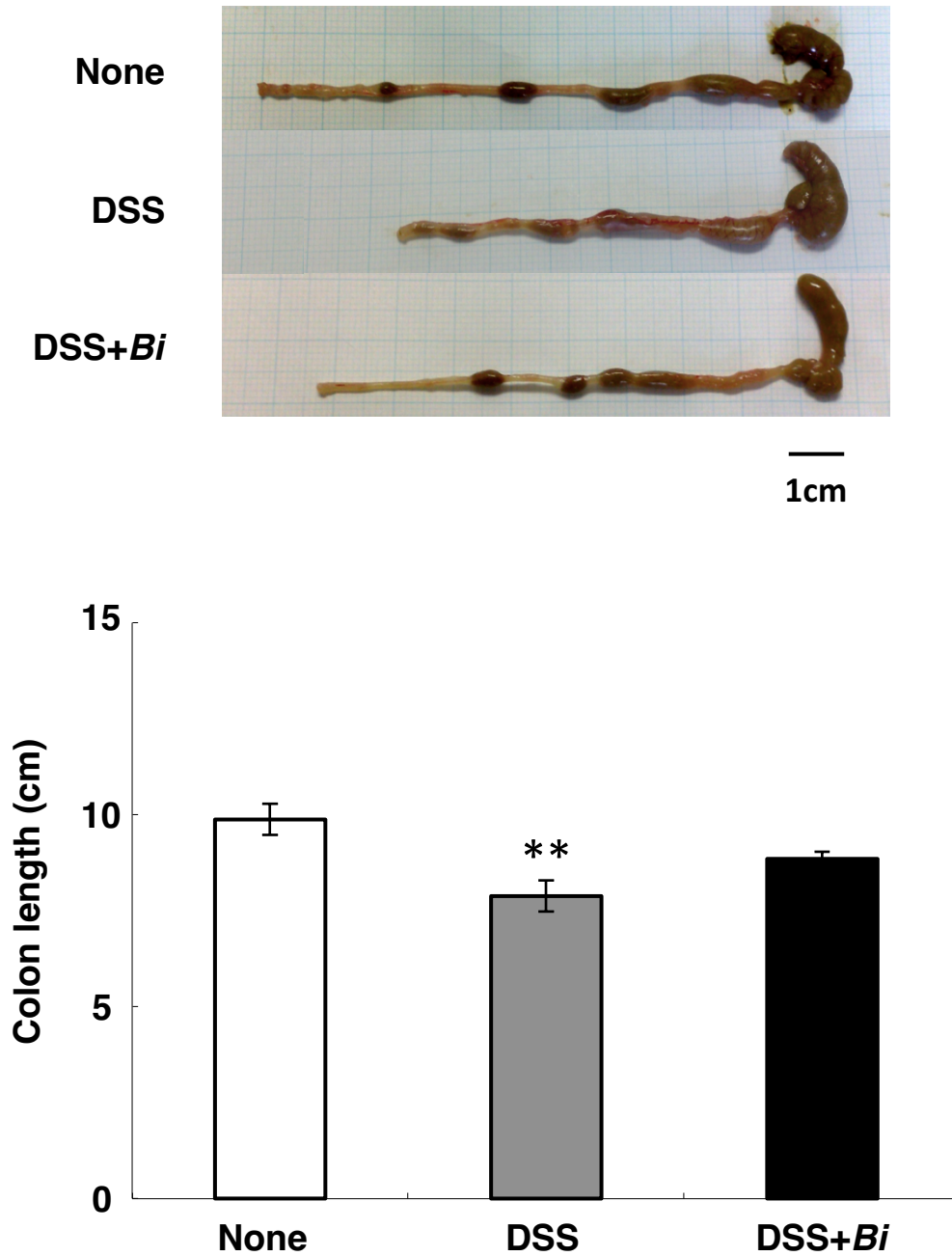


Figure 5-2. Changes in colon length of mice with DSS-induced colitis. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** P < 0.01 versus controls (none); ## P < 0.01 versus DSS-treated mice (DSS).

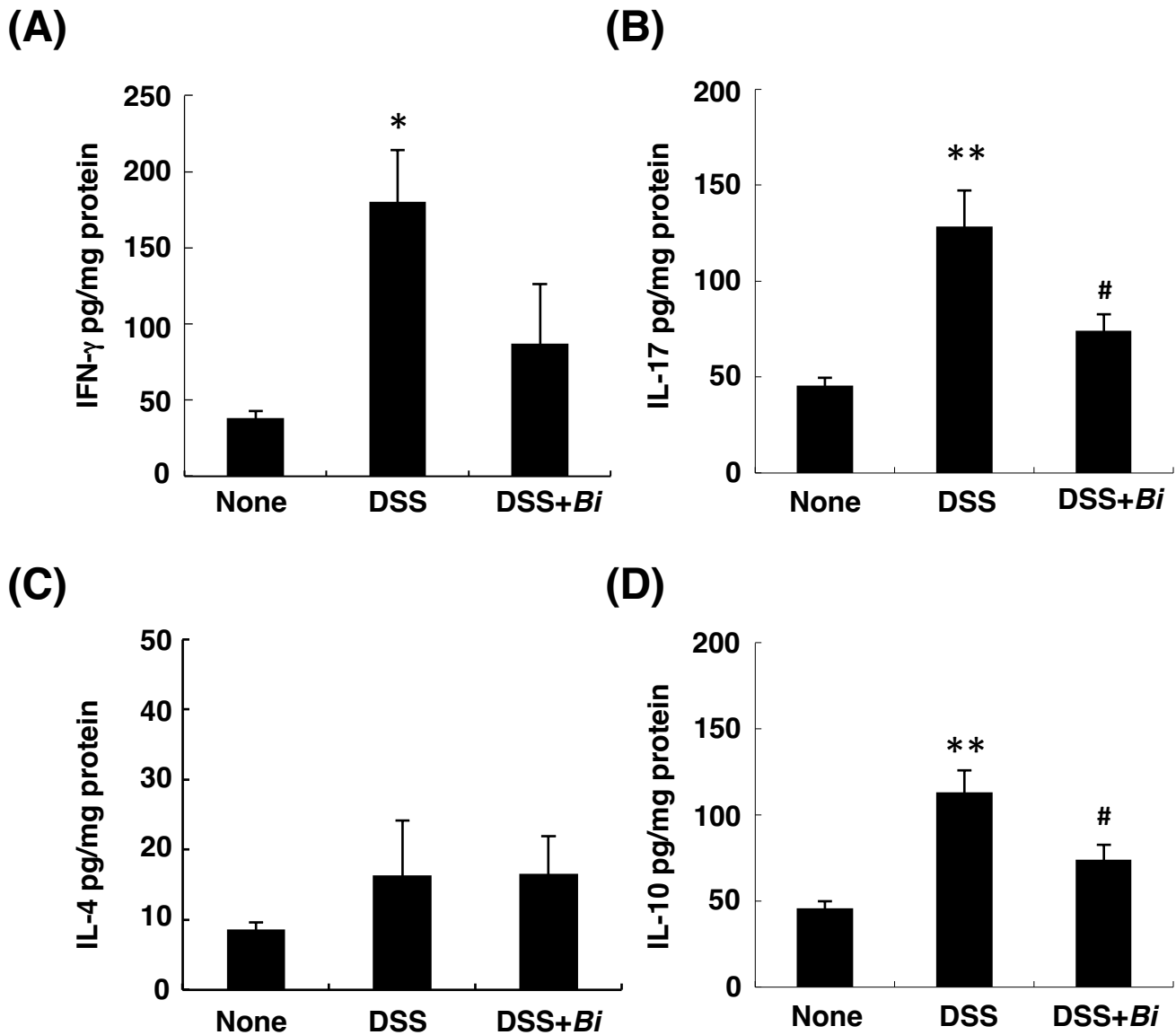
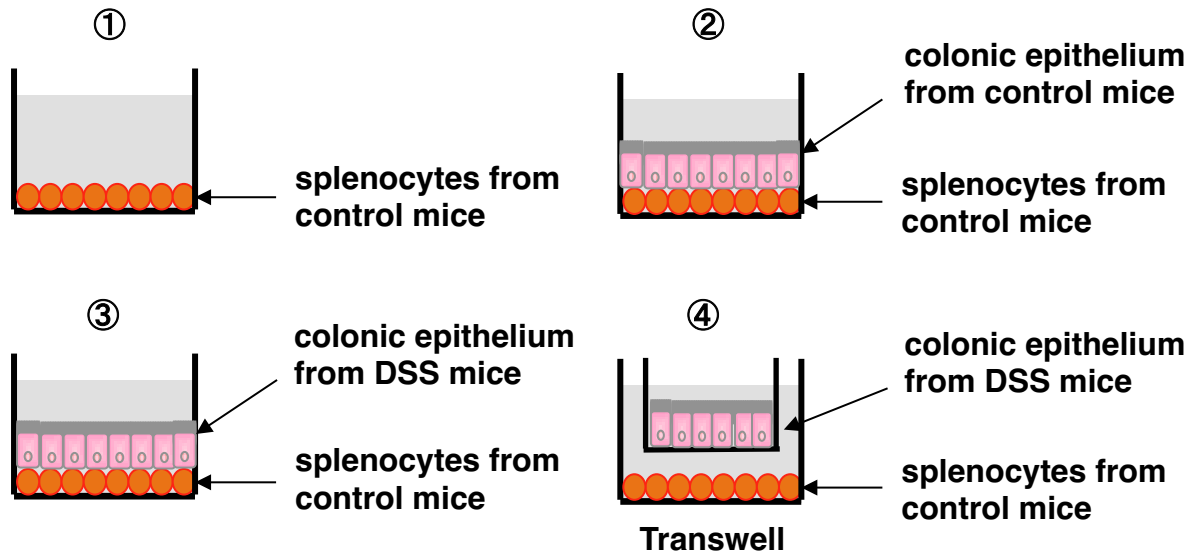
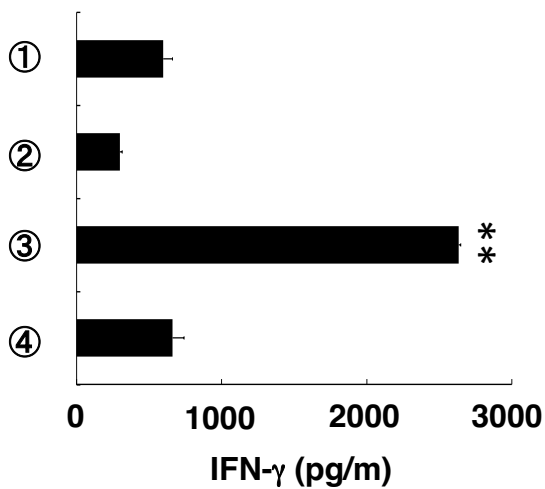


Figure 5-3. Levels of IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-4 (C), and IL-10 (D), expressed in pg/mg protein, in the supernatants of colon tissue. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** P < 0.01 and * P < 0.05 versus controls (None); # P < 0.05 versus DSS- treated mice (DSS).

(A)



(B)



(C)

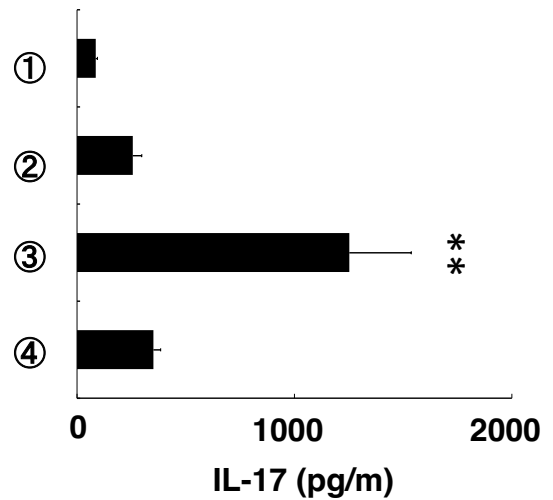


Figure 5-4. *Ex vivo* coculture of colonic epithelial cells and splenocytes. Experimental design of coculture (A). Secretion of IFN- γ (B) and IL-17 (C) were measured 5 days after coculture. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** $P < 0.01$ versus controls (splenocytes alone).

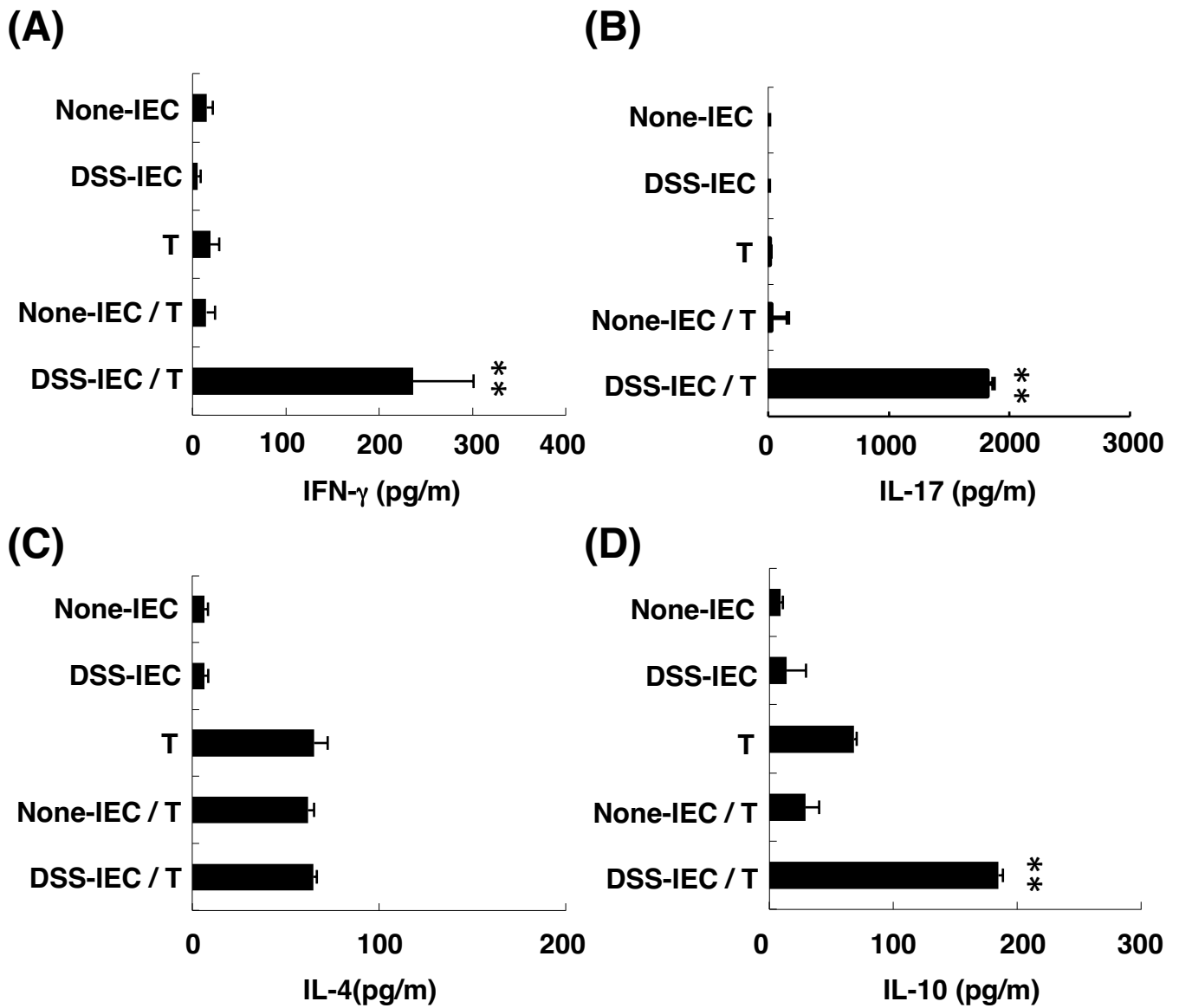


Figure 5-5. Secretion of IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-4 (C), and IL-10 (D) from coculture of intestinal epithelial cells (IEC) and T cells (T). Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** $P < 0.01$ versus T cells alone (T).

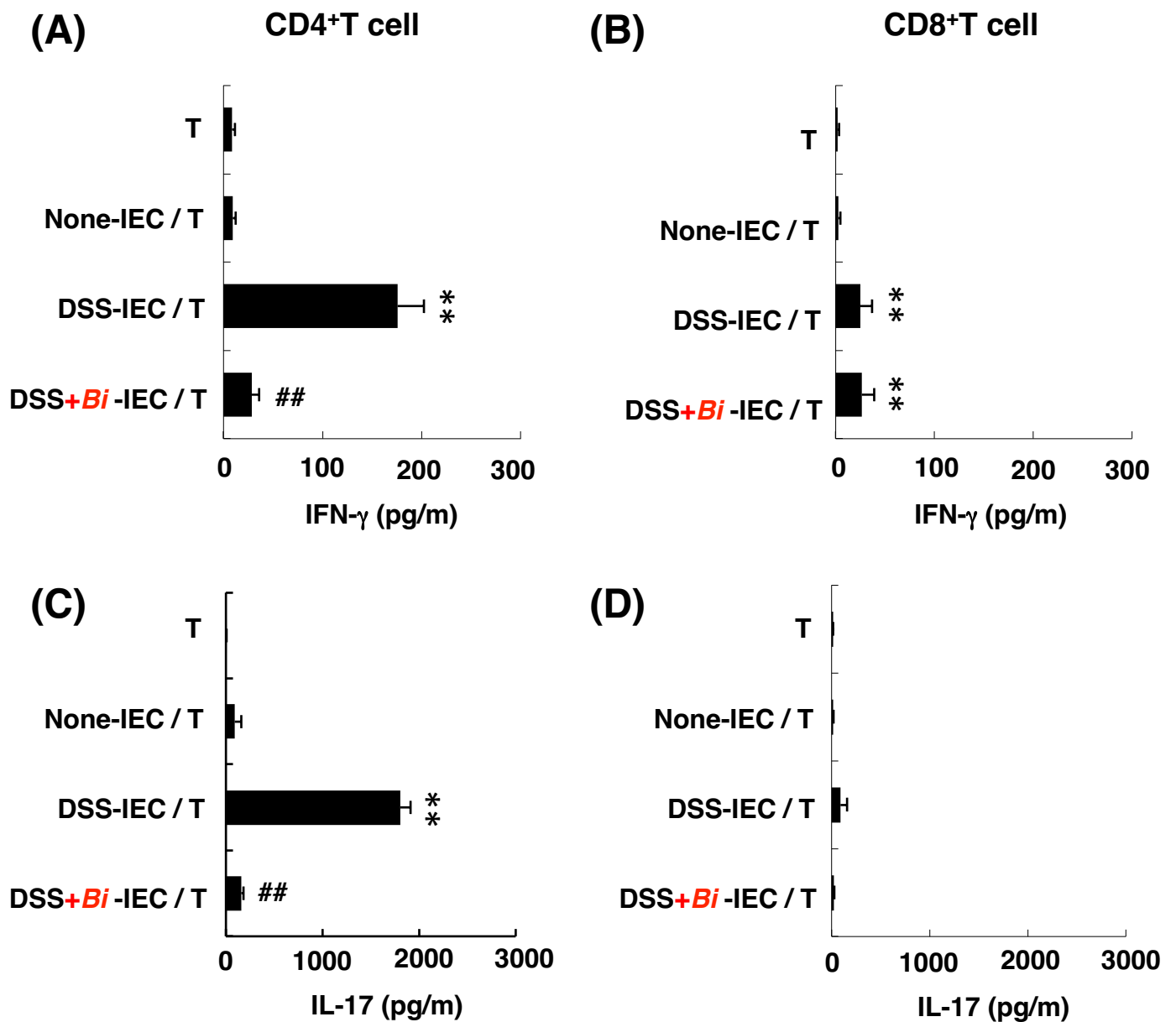


Figure 5-6. Secretion of IFN- γ (A, B) and IL-17 (C, D) from coculture of intestinal epithelial cells and CD4⁺T cells (A, C) or CD8⁺T cells (B, D). Intestinal epithelial cells were isolated from control mice (None-IEC), DSS-treated mice (DSS-IEC), or DSS- and *B. infantis*-treated mice (DSS+*B.i*-IEC). CD4⁺T cells and CD8⁺T cells were isolated from control mice and cocultured with IEC for 5 days. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ***P* < 0.01 versus T cells alone (T). ##*P* < 0.01 versus coculture of IEC from DSS-treated mice and T cells (DSS-IEC / T).

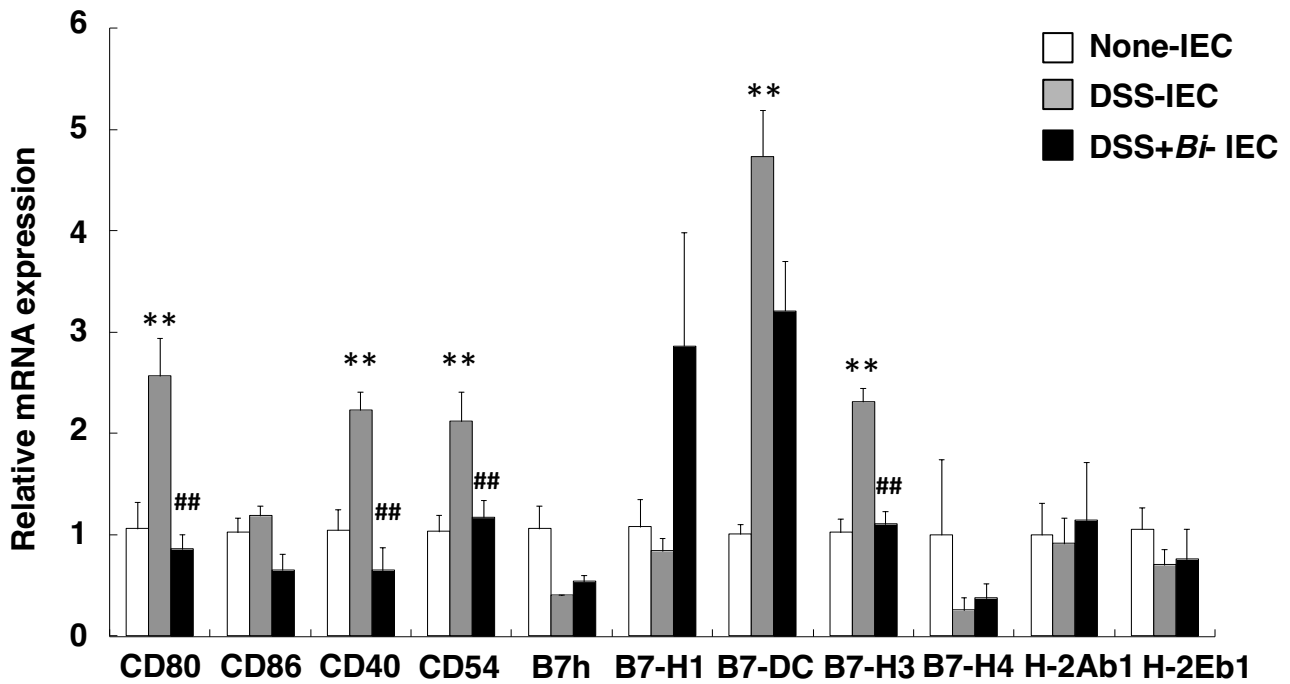


Figure 5-7. Relative mRNA expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40, CD54, B7h, B7-H1, B7-DC, B7-H3, and B7-H4) and MHC molecules (H-2Ab1 and H-2Eb1) in intestinal epithelial cells isolated from control mice (None-IEC), DSS-treated mice (DSS-IEC), or DSS- and *B. infantis*-treated mice (DSS+B.i-IEC). Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** P < 0.01 versus control mice (None-IEC). ## P < 0.01 versus DSS-treated mice (DSS-IEC).

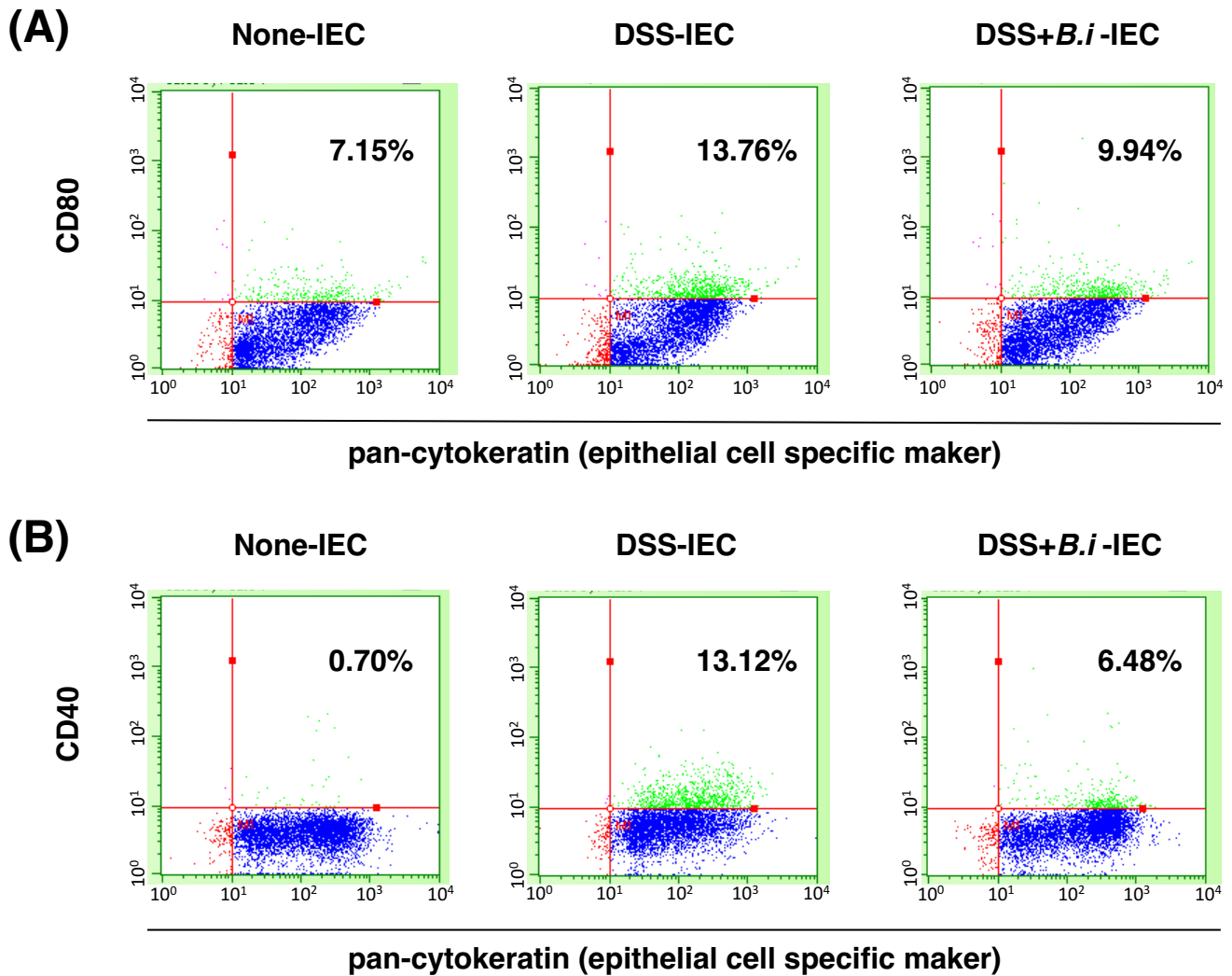


Figure 5-8. Expression of CD80 (A) and CD40 (B) in intestinal epithelial cells isolated from control mice (None-IEC), DSS-treated mice (DSS-IEC), or DSS- and *B. infantis*-treated mice (DSS+*B.i*-IEC). Freshly isolated IEC were analysed by flow cytometry using antibodies specific for the epithelial cell specific marker pan-cytokeratin and costimulatory molecules CD80 and CD40. The quadrants were drawn based on isotype. Percent values in the figures indicate the proportion of cells that were CD80⁺ or CD40⁺/pan-cytokeratin double-positive (green plots) . Results are representative of those obtained from 6 independent experiments.

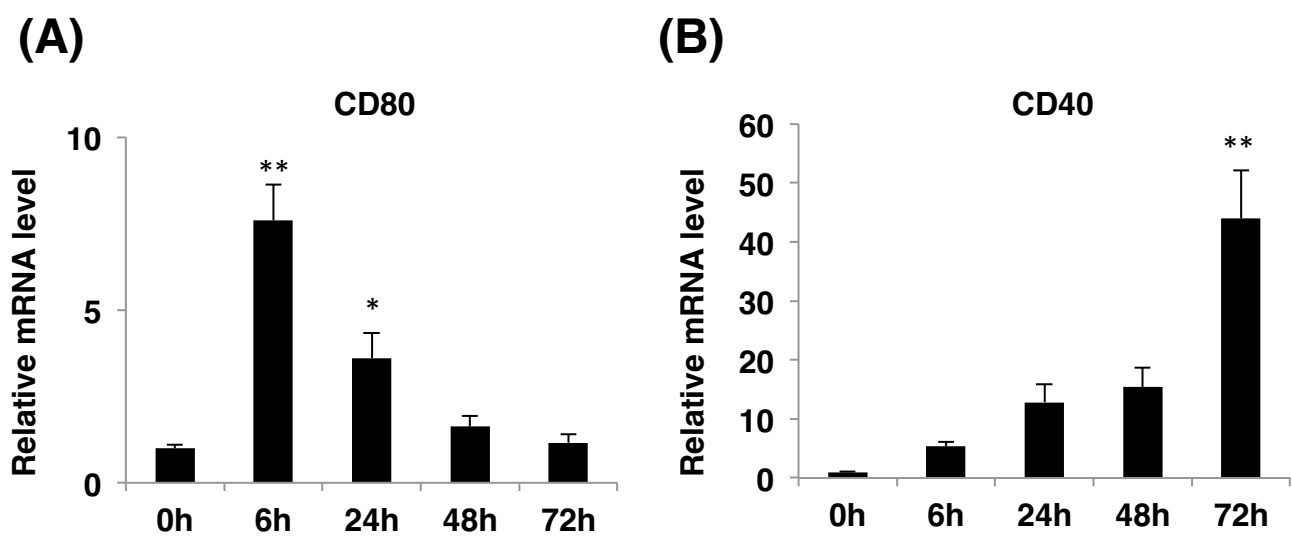


Figure 5-9. Relative mRNA expression of CD80 (A) and CD40 (B) in colon-26 cells after IFN- γ stimulation. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). * P < 0.05 and ** P < 0.01 versus untreated cells (0h).

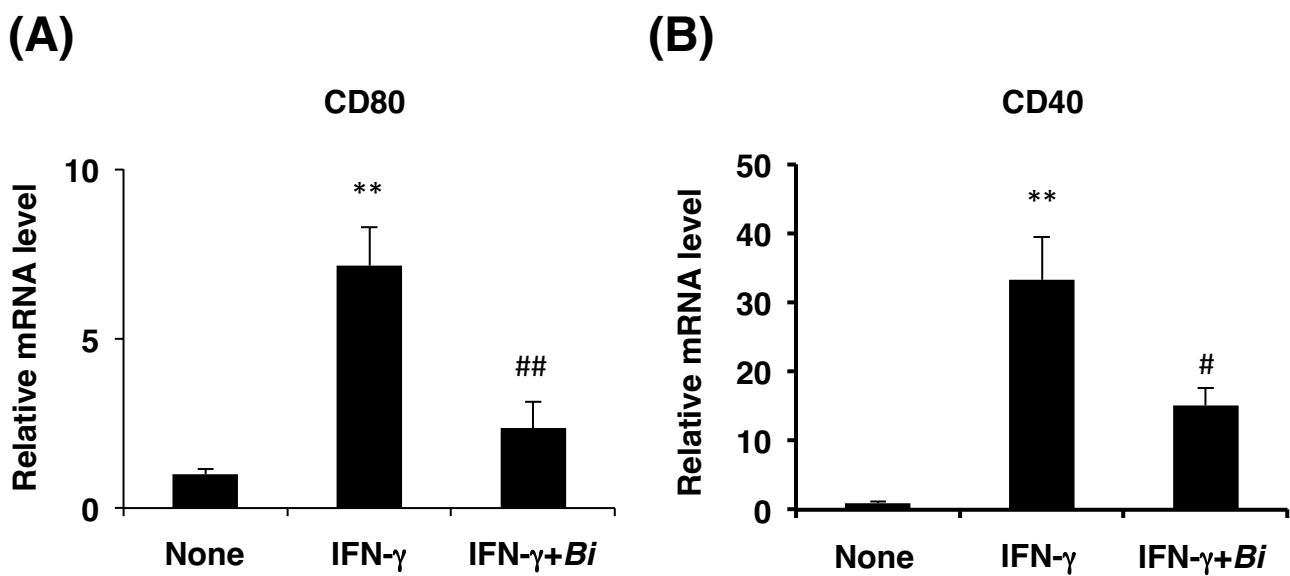
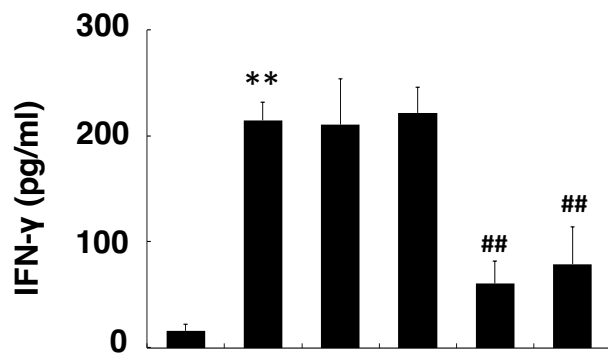
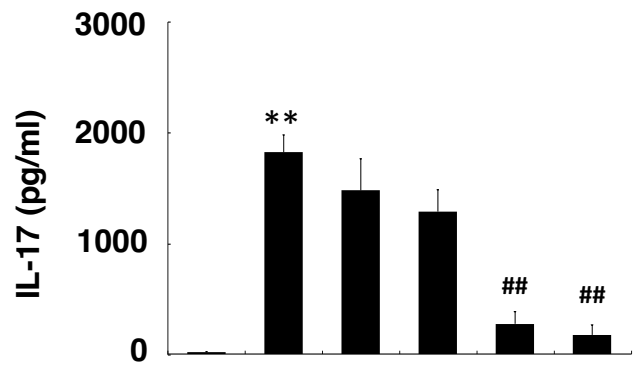


Figure 5-10. Suppressive effects of *B. infantis* on mRNA expression of CD80 (A) and CD40 (B) in IFN- γ -stimulated colon-26 cells. Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** $P < 0.01$ versus control (None). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus IFN- γ .

(A)

CD4 ⁺ T	+	+	+	+	+	+
DSS-IEC	-	+	+	+	+	+
CD80Ab	-	-	+	-	+	-
CD86Ab	-	-	-	+	+	-
CD40LAb	-	-	-	-	-	+

(B)

CD4 ⁺ T	+	+	+	+	+	+
DSS-IEC	-	+	+	+	+	+
CD80Ab	-	-	+	-	+	-
CD86Ab	-	-	-	+	+	-
CD40LAb	-	-	-	-	-	+

Figure 5-11. Effects of blocking antibodies for CD80, CD86, and CD40L on secretion of IFN- γ (A) and IL-17 (B) from coculture of intestinal epithelial cells from DSS-treated mice (DSS-IEC) and CD4⁺T cells. Results are expressed as means \pm standard error ($n = 4$). ** $P < 0.01$ versus CD4⁺T cells alone. ## $P < 0.01$ versus coculture of intestinal epithelial cells from DSS-treated mice (DSS-IEC) and CD4⁺T cells without blocking antibodies.

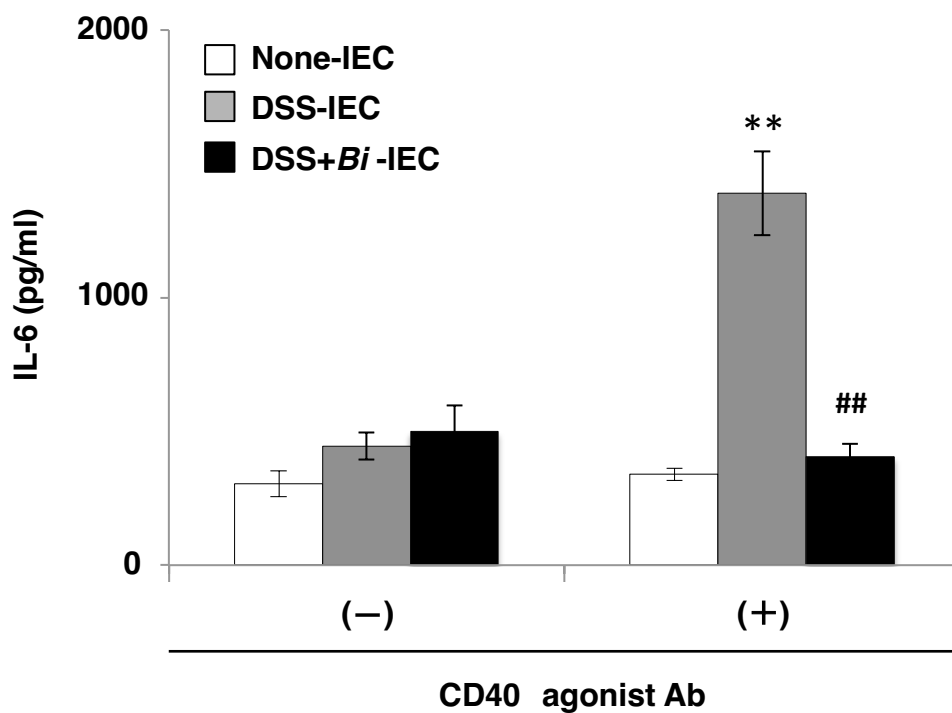


Figure 5-12. Secretion IL-6 from intestinal epithelial cells stimulated with CD40 agonist antibody (CD40 agonist Ab). Intestinal epithelial cells were isolated from control mice (None-IEC), DSS-treated mice (DSS-IEC), or DSS- and *B. infantis*-treated mice (DSS+*B.i*-IEC). Results are expressed as means \pm standard error (n = 4). ** $P < 0.01$ versus control mice (None-IEC). ## $P < 0.01$ versus DSS-treated mice (DSS-IEC).

第6章

総括

本研究では、乳酸菌の腸管バリア保護因子を同定し、その作用メカニズムを解明するとともに、腸管バリア保護効果を高める菌培養法を提起した。また、大腸上皮細胞を介して炎症性 T 細胞を抑制するといった、乳酸菌の新たな免疫調節機序を解明した。以下に、本研究で得られた結果を総括する。

1 *L. rhamnosus* による腸炎抑制効果 (第2章)

大腸炎モデルマウスに *L. rhamnosus* を経口投与することにより、体重減少、大腸萎縮、および MPO 活性の増加が抑制された (Figure 2-3, 2-4, 2-5)。これらは大腸炎の指標であり、*L. rhamnosus* 投与により大腸炎が抑制されたことを示している。また、*L. rhamnosus* の投与により、腸管の物質透過性亢進が抑制された (Figure 2-6)。これは、腸管バリア機能低下を緩和したことを示しており、この機序は腸炎抑制に大きく寄与すると考えられる。腸炎抑制効果は生菌・死菌ともに確認されたことから、菌は必ずしも生きて腸に届く必要はないことが示唆された。即ち、本菌株を用いた機能性食品を創製する際、加熱殺菌処理をしても効果は維持されると考えられる。また、本菌株の活性成分は細胞壁平成分の LTA であることから、胃酸耐性も考慮する必要はないと考えられる。しかし、加熱条件を含めた殺菌条件の違いにより活性が変化することも考えられ、この点についてはさらなる詳細な検討が必要である。

2 *L. rhamnosus* の腸管バリア保護メカニズムの解明 (第2章)

腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いて、*L. rhamnosus* の腸管上皮細胞への直接的な作用について解析した。腸管バリア保護効果の詳細なメカニズムを解析するため、Caco-2 細胞の tight junction 構成・調節タンパク質発現量を解析した結

果、*L. rhamnosus* は、TNF- α 刺激による ZO-1 の発現減少を抑制することが明らかとなった (Figure 2-7)。腸炎モデルマウスの結腸上皮細胞においても、同様の効果が確認された (Figure 2-8)。さらに、tight junction 調節タンパク質 MLCK の発現変化を解析した結果、Caco-2 細胞においては、TNF- α 刺激により発現が増加していたが (Figure 2-7)、腸炎モデルマウスの結腸上皮細胞においては、MLCK の発現量が減少していた (Figure 2-8)。MLCK の発現減少は細胞のアポトーシスに繋がることから、炎症時の MLCK の役割は *in vivo* と *in vitro* とで異なることが示唆された。いずれにせよ、*L. rhamnosus* は、*in vivo* と *in vitro* どちらにおいても、MLCK の発現量を正常に保つということが出来る。これらの結果から、*L. rhamnosus* は、腸管バリア機能を保護することで腸管上皮細胞のホメオスタシスを維持し、そのメカニズムの一つとして、ZO-1 と MLCK 発現量の調節が関与していることが示唆された。

我々はこれらの結果をまとめ、*in vivo* 評価系における乳酸菌の tight junction 構成・調節タンパク質発現制御作用を、世界に先駆けて報告した(120)。その後、他の乳酸菌株も *in vivo* で tight junction 構成・調節タンパク質発現を制御することが報告されている(121-125)。今後、臨床試験による更なる解析が望まれる。

3 *L. rhamnosus* および *E. hirae* の腸管バリア保護効果に関わる活性成分 (第3章)

L. rhamnosus の腸管バリア保護効果に関わる活性成分の同定を試みた。その結果、活性成分は菌代謝産物中ではなく、菌体成分中に存在することが明らかとなった (Figure 3-1)。また、酵素処理試験の結果から、脂質成分であることが示唆された (Figure 3-2)。さらに、TLR2 中和抗体により *L. rhamnosus* の効果が阻害されたことから、活性成分は TLR2 リガンドであることが示唆された (Figure 3-3)。これらの結果から、グラム陽性菌細胞壁の脂質成分であり、TLR2 リガンドである LTA が活性成分の一つであることが示唆された。

LTA が乳酸菌の腸管バリア保護効果の活性成分であることを確認するために、*E. hirae* 由来 LTA を用いて試験を行った。*E. hirae* は、*L. rhamnosus* と同様に腸管バリア保護効果を有しており (Figure 3-4)、活性成分についても同様に脂質成分であることが示唆された (Figure 3-4)。*E. hirae* 由来 LTA の腸管バリア保護効果について検討した結果、菌体と同様の活性を有することが明らかとなった (Figure 3-5)。また、そのメカニズムは菌体と同様に、ZO-1 と MLCK の発現量を制御することにあると結論された (Figure 3-7)。

LTA は TLR2 のリガンドであることが知られている。TLR2 合成リガンドである PCSK は、菌体あるいは LTA と同様に ZO-1 と MLCK 発現量を制御することにより腸管バリア保護効果を有することが明らかとなった (Figure 3-5, 3-7)。これらの結果から、*E. hirae* による腸管バリア保護の活性成分の少なくとも一つは LTA であり、LTA は腸管上皮細胞上に発現した TLR2 を介して作用することが示唆された。

Cario らは、*in vitro* において TLR2 合成リガンドである PCSK が ZO-1・MLCK 発現量を制御することにより腸管バリアを保護することのみならず、大腸炎モデルマウスに PCSK を投与することにより、腸管バリア機能低下を緩和し、腸炎を抑制することを報告している(65)。本研究結果ともあわせ、TLR2 を介して腸管上皮細胞に作用することができる乳酸菌は、腸炎の緩和に非常に有効であると言える。一方、LTA はグラム陽性菌細胞壁の主要成分の一つであり、他のグラム陽性菌もある程度の腸管バリア保護効果を有するかもしれない。実際、病原菌である *Staphylococcus aureus* 由来の LTA も TER 値低下抑制効果を有していた (data not shown)。さらに、我々の報告(126)に続いて、他の乳酸菌も TLR2 を介して腸管バリア保護効果を発揮することが報告されている(123)。しかし、LTA 含有量、LTA 構造、または細胞壁構造の違いにより、各菌株の TLR2 刺激能は異なると予想される。TLR2 刺激能とバリア保護効果に相関性が見られるか、今後解析を行う必要がある。

さらに、乳酸菌由来のゲノム DNA や分泌ペプチドも腸管バリア保護効果を有することが報告されており(61, 127)、乳酸菌の腸管バリア保護メカニズムおよび活性成分は 1 つとは限らず、複数の成分が多種の経路を介して上皮細胞に作用していることが考えられる。今後、それぞれの活性成分について詳細な解析を行うことにより、腸管バリア保護効果の高い乳酸菌株の特徴を把握することができると考えられる。

4 乳酸菌の腸管バリア保護効果を高める培養法 (第 4 章)

活性成分として同定した LTA の情報をもとに、乳酸菌の腸管バリア保護効果を高める培養法を探索した。LTA を含むテイコ酸側鎖の D-alanine (D-Ala) 修飾度合いは、菌の免疫調節機能に大きく影響することが知られている。このことから、テイコ酸中の D-Ala 修飾が乳酸菌の腸管バリア保護効果にも影響を与える可能性が考えられた。ここでは、機能性食品への応用を目的とするため、ヨーグルト製造に最も一般的に用いられる *Streptococcus thermophilus* を用いて解析を行った。

S. thermophilus のテイコ酸 D-Ala 量を HPCL で定量した結果、D-Ala 量は菌の増殖期、および培養温度に応じて変化した (Figure 4-2, 4-3)。MgSO₄によりテイコ酸 D-Ala 修飾に関わる *dlt* 遺伝子群を抑制した場合、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果が減少した (Figure 4-4)。また、菌培養に用いる M17 培地は 4.25%が基本濃度であるが、2%に薄めた培地、あるいは 10%に濃くした培地で *S. thermophilus* を培養した場合、テイコ酸 D-Ala 量は培地濃度依存的に増加した (Figure 4-5)。さらに、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果はテイコ酸 D-Ala 量とよく相関し、テイコ酸 D-Ala 量を増加させることにより、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果が高まることを見出した (Figure 4-5)。培地に L-Ala を添加して *S. thermophilus* を培養したところ、テイコ酸 D-Ala 量が増加し、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果が増強された (Figure 4-6)。

これらの結果から、菌の培養時間、温度を最適化し、菌培養・発酵時に L-Ala を添加することにより、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果を高めることができると考えられた。近年、乳酸菌の機能性を高めるために、遺伝子組換え菌株の開発が進められており、機能性の評価も行われている(128-131)。それに対し、我々が提起する手法は、遺伝子組換えを行うことなく腸管バリア保護効果を高めることができ、機能性食品への応用が非常に容易である。さらに、他の乳酸菌株についても、上記のような培養条件の最適化をすることにより腸管バリア保護効果を高めることができるかもしれない。これにより、発酵食品製造に用いられる様々な乳酸菌株の腸管バリア保護効果を高めるなど、従来の発酵食品に新たな機能性を付加できる可能性がある。

5 乳酸菌による炎症性 T 細胞抑制効果 (第 5 章)

当研究室の先行研究により、*Bifidobacterium infantis* が炎症性 T 細胞である Th17 細胞の産生する IL-17 産生を抑制することを見出している(104)。本菌株の大腸炎抑制効果を検討した結果、*B. infantis* を経口投与することにより、DSS 摂取による体重減少および大腸萎縮が抑制された (Figure 5-1, 5-2)。さらに、*B. infantis* は DSS 摂取による大腸組織での IFN- γ と IL-17 産生亢進を抑制した (Figure 5-3)。これらのサイトカインは、それぞれ Th1 細胞および Th17 細胞が主に産生する炎症性サイトカインである。そこで、*B. infantis* の作用ターゲットとして、Th1 細胞および Th17 細胞に着目し、解析を進めることにした。しかし、DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける Th1/Th17 細胞活性化機序は未だに不明瞭な点が多いため、そのメカニズム解析も行うことにした。

5.1 DSS 誘導性腸炎モデルマウスにおける Th1/Th17 細胞活性化メカニズム

DSS 摂取マウスの大腸上皮細胞は、脾細胞と直接接触することにより、IFN- γ /IL-17 産生を誘導した (Figure 5-4)。さらに、この炎症上皮細胞は脾細

胞中の CD4⁺T 細胞と相互作用することで IFN- γ /IL-17 産生を誘導することが明らかとなり、炎症上皮細胞が Th1/Th17 細胞を活性化することが示唆された (Figure 5-5)。DSS 摂取マウス由来の炎症上皮細胞は、CD80 や CD40 などの共刺激分子を高発現していた (Figure 5-7, 5-8)。また、阻害抗体を用いた試験により、これらの共刺激分子が炎症上皮細胞による Th1/Th17 細胞の誘導に必須であることが明らかとなった (Figure 5-11)。そのメカニズムとして、CD40 シグナルを受けた炎症上皮細胞が、Th17 細胞分化に必要な IL-6 を過剰産生することが示唆された (Figure 5-12)。

5.2 *B. infantis* による Th1/Th17 細胞抑制メカニズム

B. infantis 投与マウス由来の大腸上皮細胞は、Th1/Th17 細胞活性化を誘導できなかった (Figure 5-5)。*B. infantis* は DSS による大腸上皮細胞の CD80 や CD40 発現増加を抑制しており (Figure 5-7, 5-8)、それにより、Th1/Th17 細胞活性化が誘導されなかったと考えられる。マウス腸管上皮様 colon-26 細胞を用いた *in vitro* 試験においても、*B. infantis* は IFN- γ 刺激による CD80, CD40 発現増加を抑制した (Figure 5-10)。これらの結果から、*B. infantis* は大腸上皮細胞に作用し、CD80, CD40 発現増加を抑制することで、炎症性 T 細胞の活性化、さらには大腸炎を抑制することが示唆された。

乳酸菌の大腸上皮を介した炎症性 T 細胞抑制効果は、これまでに全く報告はなく、新たな乳酸菌の大腸炎抑制メカニズムである。活性成分の同定を含め、今後、さらなるメカニズム解析が求められる。

6 まとめおよび今後の展望

腸管ホメオスタシス破綻は、あらゆる疾病の発症に繋がると考えられるが、なかでも、IBD は腸管ホメオスタシス破綻が関与する代表的な疾患である。そこで本研究では、乳酸菌の腸炎抑制効果を評価するとともに、そのメカニズム

として、腸管バリア保護効果 (Figure 6-1) と炎症性 T 細胞抑制効果 (Figure 6-2) に着目して解析を行った。

IBD において、腸管バリア機能低下は炎症性 T 細胞活性化をもたらし、逆に、炎症性 T 細胞が産生するサイトカインは腸管バリア機能低下に大きく関わっている。従って、これらの腸管機能異常を抑制することは、IBD 発症予防・緩和に非常に有効である。本論文で用いた菌株のうち、*B. infantis* は小腸よりも大腸に定着・生息する特性があり、大腸炎の予防・緩和に適していると考えられる。*B. infantis* は炎症性 T 細胞抑制効果を有するが、その腸管バリア保護効果は他の菌株よりも低かった (data not shown)。したがって、*B. infantis* と腸管バリア保護効果の高い *L. rhamnosus* を組み合わせることにより、大腸炎に対して相乗的な効果を得ることができるかもしれない。

腸管バリア保護効果や炎症性 T 細胞抑制効果を有する乳酸菌を用いた乳発酵食品は、日常的に腸管組織のホメオスタシスを維持することができ、腸炎の抑制に非常に有効であると考えられる。また、乳発酵食品は安価かつ極めて安全性が高い食品であるため、日常的に摂取する上で最適である。このことは、IBD 患者のみに限定されない。「健康」に見える人においても、局所的に軽微な炎症は起こり得るのであり、その予防・早期回復のために日常的に乳酸菌を摂取することは、全ての人において好ましいことであると言える。

このような腸炎抑制効果の高い乳発酵食品の創製には、効果の高い乳酸菌を用いる必要がある。しかし、これまで乳酸菌の腸炎抑制成分やその作用メカニズムには不明な点が多く、効果の高い乳酸菌の特徴付けは困難であった。本研究によって、乳酸菌の活性成分の一つとして LTA が同定され、腸管上皮細胞上の TLR2 を介して作用することが明らかとなった。また、テイコ酸 D-Ala 量を増加させることにより乳酸菌の効果が高まること、さらには D-Ala 量を増加させる菌培養法を明らかにした。これにより、腸管バリア保護効果の高い乳酸菌の条件が明確となり、探索が容易になると考えられる。今後、乳酸菌の LTA 含

有量およびテイコ酸 D-Ala 量と腸管バリア保護活性との相関などをさらに検討することにより、菌株を一株ずつ細胞試験に供することなく、LTA 含有量およびテイコ酸 D-Ala 量から有効な菌株を探索することが可能になるかもしれない。加えて、大腸上皮細胞を介する炎症性 T 細胞抑制効果は、乳酸菌の新規腸炎抑制機序であり、今後、この作用機序をターゲットとして、炎症性 T 細胞抑制効果の高い菌株のスクリーニングが進むと期待される。

以上のように、本研究は乳酸菌の腸炎抑制メカニズムを解明したのみにとどまらず、将来的には IBD に対するプロバイオティクス療法の確立に具体的に寄与すると考えられる。今後、ヒトにおいても本研究と同様のメカニズムで乳酸菌が作用するのか、さらなる検討が期待される。

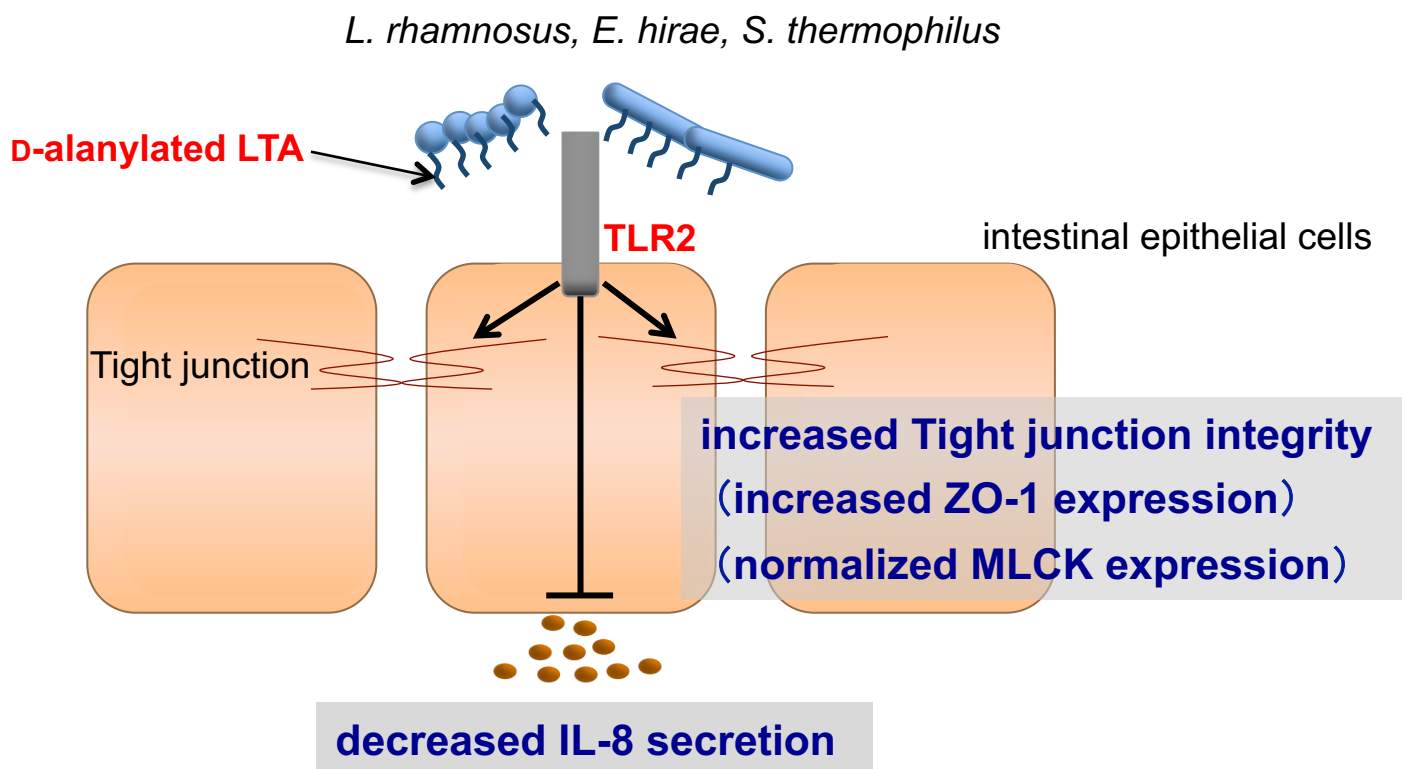


Figure 6-1. Mechanisms by which lactic acid bacteria (LAB) protect intestinal barrier function. LAB increase Tight junction integrity by regulating expression of ZO-1 and MLCK. LAB decrease IL-8 secretion from intestinal epithelial cells. These protective effects of LAB are mediated by D-alanylated LTA. TLR2 signaling is essential in mediating the protective effects of LAB.

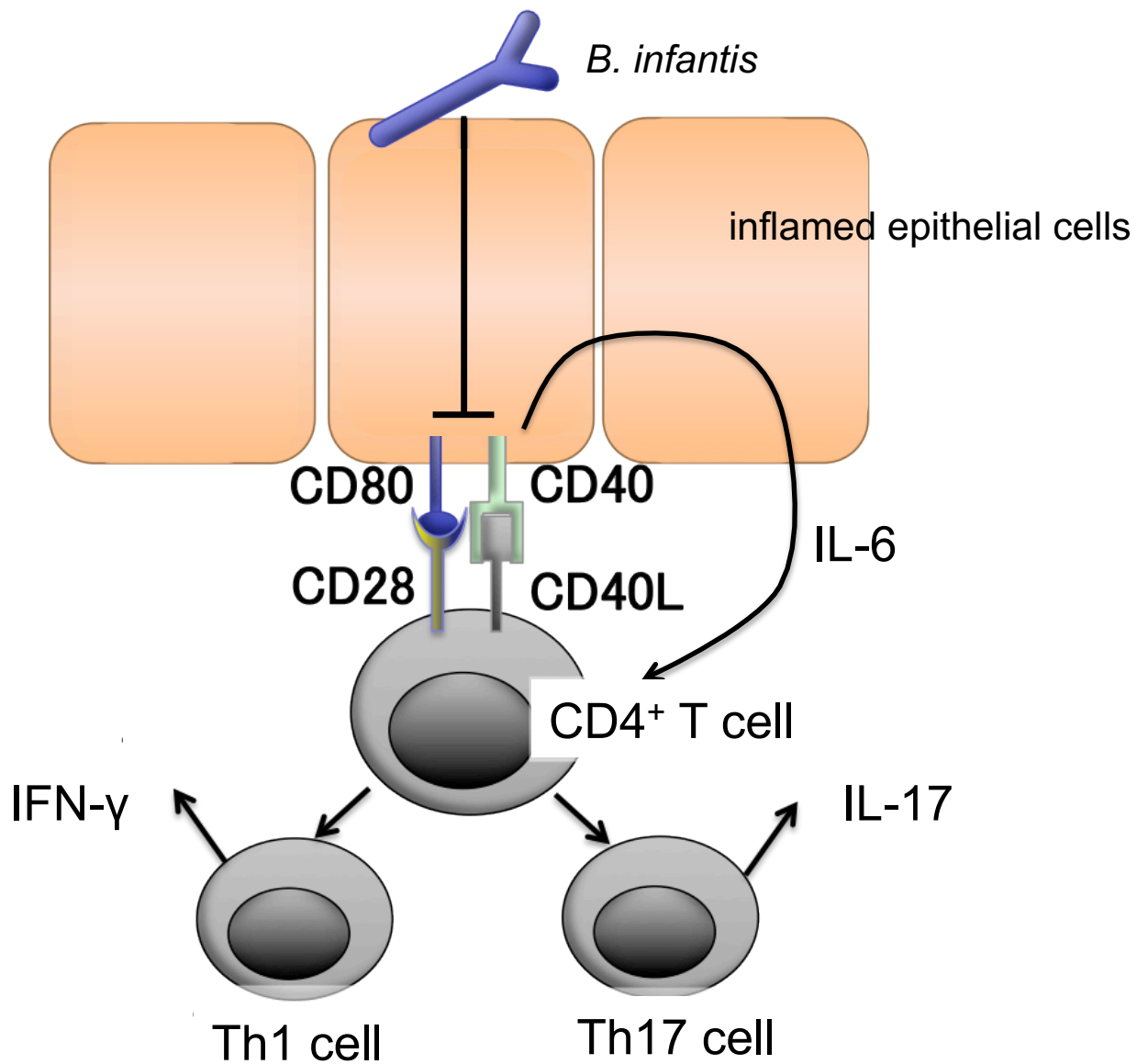


Figure 6-2. Mechanisms by which lactic acid bacteria (LAB) downregulate Th1/Th17 cells. Inflamed intestinal epithelial cells express increased levels of CD80 and CD40. CD80 and CD40 interact with CD28 and CD40L expressed in CD4⁺ T cells, respectively, and these interactions are essential for inflamed intestinal epithelial cells-induced Th1/Th17 differentiation. LAB suppress the expression of CD80 and CD40 in intestinal epithelial cells, resulting in downregulation of Th1/Th17 cells.

参考文献

1. Fagarasan S, Honjo T (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat. Rev. Immunol.* 3:63-72.
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474:307-317.
3. Madara JL (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60:143-159.
4. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9:799-809.
5. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273:29745-29753.
6. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147:1351-1363.
7. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC (2011) Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* 141:769-776.
8. Shimizu M (2010) Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci. Biotech. Bioch.* 74:232-241.
9. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52:439-451.
10. Al-Sadi R, Boivin M, Ma T (2009) Mechanism of cytokine modulation

- of epithelial tight junction barrier. *Front. Biosci.* 14:2765-2778.
11. Salim SY, Soderholm JD (2011) Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17:362-381.
 12. Piche T, Barbara G, Aubert P, Stanghellini V, De Giorgio R, Galimiche JP, Neunlist M (2007) Impaired intestinal barrier permeability in irritable bowel syndrome: Role of soluble factors. *Gastroenterology* 58:196-201
 13. Perrier C, Corthesy B (2011) Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy* 41:20-28.
 14. Pike MG, Heddle RJ, Boulton P, Turner MW, Atherton DJ (1986) Increased intestinal permeability in atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 86:101-104.
 15. Bruewer M, Samarin S, Nusrat A (2006) Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072:242-252.
 16. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999) Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116:301-309.
 17. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Overmuller N, Otto HF, Autschbach F (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G216-G228.
 18. Marin ML, Greenstein AJ, Geller SA, Gordon RE, Aufses AH, Jr. (1983) A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am. J.*

- Gastroenterol.* 78:537-547.
19. Poritz LS, Harris LR, 3rd, Kelly AA, Koltun WA (2011) Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig. Dis. Sci.* 56:2802-2809.
 20. Mankertz J, Schulzke JD (2007) Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr. Opin. Gastroen.* 23:379-383.
 21. Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta JI, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T, Yamaguchi T, Morise K, Ieda M, Iokawa H, Ishihara A, Sarai S (1995) Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage and epithelial cell-dependent. *Dig. Dis. Sci.* 40:949-959.
 22. Woywodt A, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Ludwig D, Stange EF, Kirchner H (1994) Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 5:387-395.
 23. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR (1997) A role for TNF- α and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J. Immunol.* 159:6276-6282.
 24. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H (2000) IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.* 164:4878-4882.
 25. Juuti-Uusitalo K, Klunder LJ, Sjollem KA, Mackovicova K, Ohgaki R, Hoekstra D, Dekker J, van Ijzendoorn SC (2011) Differential effects of

- TNF (TNFSF2) and IFN- γ on intestinal epithelial cell morphogenesis and barrier function in three-dimensional culture. *PLoS One* 6:e22967.
26. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY (2011) Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 β modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J. Cell. Mol. Med.* 15:970-982.
 27. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S (2011) Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 286:31263-31271.
 28. Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.
 29. Zygmont B, Veldhoen M (2011) T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv. Immunol.* 109:159-196.
 30. Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT (1998) Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 102:792-803.
 31. Campbell N, Yio XY, So LP, Li Y, Mayer L (1999) The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol. Rev.* 172:315-324.
 32. Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tsushima F, Azuma M, Mayer L (2004) The expression and function of costimulatory molecules B7h and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 126:1347-1357.
 33. Nakazawa A, Watanabe M, Kanai T, Yamazaki M, Yajima T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T (1999) Expression and functional role of a

- costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. *Gastroenterology* 116:A782-A782.
34. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
 35. Rahman A, Isenberg DA (2008) Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 358:929-939.
 36. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201:233-240.
 37. Park H, Li ZX, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133-1141.
 38. Olsen T, Rismo R, Cui G, Goll R, Christiansen I, Husebekk A, Florholmen J (2011) TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine* 56:633-640.
 39. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Goke B, Brand S (2008) Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel Dis.* 14:204-212.
 40. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB,

- Kastelein RA (2007) Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132:2359-2370.
41. Leppkes M, Becker C, Ivanov, II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Becher B, Littman DR, Neurath MF (2009) RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136:257-267.
 42. Sartor RB (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134:577-594.
 43. Miyauchi E, Xiao JZ, Tanabe S (2010) Chapter 8: Interaction of bifidobacteria with the intestinal mucosa with a focus on immuno-modulating effects. *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*, (Caister Academic Press), pp 145-162.
 44. Joos S, Rosemann T, Szecsenyi J, Hahn EG, Willich SN, B. B (2006) Use of complementary and alternative medicine in Germany - a survey of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Complement. Altern. Med.* 6:19.
 45. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
 46. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK (1999) Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.* 10:107-110.
 47. Uronis JM, Arthur JC, Keku T, Fodor A, Carroll IM, Cruz ML, Appleyard CB, Jobin C (2011) Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17:289-297.

48. Gaudier E, Michel C, Segain JP, Cherbut C, Hoebler C (2005) The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J. Nutr.* 135:2753-2761.
49. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, Sirard JC, Pot B, Grangette C (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One* 2:e313.
50. Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF (2006) Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int. J. Clin. Pract.* 60:284-288.
51. Schlee M, Harder J, Koten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K (2008) Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin. Exp. Immunol.* 151:528-535.
52. Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K (2007) The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292:G315-G322.
53. McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Sonnenberg MS, Hecht G (2001) Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J. Clin. Invest.* 107:621-629.
54. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Kelly WJ, Roy NC (2010) *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiol. Lett.* 309:184-192.
55. Resta-Lenert S, Barrett KE (2006) Probiotics and commensals reverse

- TNF- α - and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 130:731-746.
56. Donato KA, Gareau MG, Wang YJJ, Sherman PM (2010) *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology* 156:3288-3297.
 57. Gomez-Llorente C, Munoz S, Gil A (2010) Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc. Nutr. Soc.* 69:381-389.
 58. Coombes JL, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:435-446.
 59. Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278:38105-38108.
 60. Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, Hackam DJ (2008) The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 83:493-498.
 61. Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK (2008) Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294:G1060-G1069.
 62. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27:104-119.
 63. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2:541-546.

64. Krieglstein CF, Anthoni C, Cerwinka WH, Stokes KY, Russell J, Grisham MB, Granger DN (2007) Role of blood- and tissue-associated inducible nitric-oxide synthase in colonic inflammation. *Am. J. Pathol.* 170:490-496.
65. Cario E, Gerken G, Podolsky DK (2007) Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132:1359-1374.
66. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell. Biol* 8:1327-U1327.
67. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
68. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT (1993) Location of tumour necrosis factor α by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 34:1705-1709.
69. Schneeberger EE, Lynch RD (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* 262:L647-L661.
70. Struyf S, Gouwy M, Dillen C, Proost P, Opdenakker G, Van Damme J (2005) Chemokines synergize in the recruitment of circulating neutrophils into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* 35:1583-1591.
71. Geier MS, Tenikoff D, Yazbeck R, McCaughan GW, Abbott CA, Howarth GS (2005) Development and resolution of experimental colitis in mice with targeted deletion of dipeptidyl peptidase IV. *J. Cell. Physiol.* 204:687-692.

72. Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Krieglstein CF, Granger DN (2004) Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 49:556-564.
73. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M (1999) Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp. Anim.* 48:137-143.
74. Araki Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T (2001) Alterations in intestinal microflora, faecal bile acids and short chain fatty acids in dextran sulphate sodium-induced experimental acute colitis in rats. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:107-112.
75. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T (2007) Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J. Nutr.* 137:798S-802S.
76. Ma TY, Hoa NT, Tran DD, Bui V, Pedram A, Mills S, Merryfield M (2000) Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G875-885.
77. Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M, Tarnawski A (2000) Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc. Res. Tech.* 51:156-168.
78. Feighery LM, Cochrane SW, Quinn T, Baird AW, O'Toole D, Owens SE, O'Donoghue D, Mrsny RJ, Brayden DJ (2008) Myosin light chain kinase inhibition: correction of increased intestinal epithelial permeability in vitro. *Pharm. Res.* 25:1377-1386.
79. Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E (2002) Increased

- proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 47:1447-1457.
80. Fazal F, Gu L, Ihnatovych I, Han Y, Hu W, Antic N, Carreira F, Blomquist JF, Hope TJ, Ucker DS, de Lanerolle P (2005) Inhibiting myosin light chain kinase induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 25:6259-6266.
 81. Connell LE, Helfman DM (2006) Myosin light chain kinase plays a role in the regulation of epithelial cell survival. *J. Cell Sci.* 119:2269-2281.
 82. Choi CH, Il Kim T, Lee SK, Yang KM, Kim WH (2008) Effect of *Lactobacillus* GG and conditioned media on IL-1 beta-induced IL-8 production in Caco-2 cells. *Scand. J. Gastroenterol.* 43:938-947.
 83. Ginsburg I (2002) The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 110:753-770.
 84. Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, Brassart D (1999) Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1071-1077.
 85. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J. Intern. Med.* 261:511-528.
 86. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J (2006) Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid

- play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 74:4164-4171.
87. Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V (2005) D-alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* 187:6719-6725.
 88. Abachin E, Poyart C, Pellegrini E, Milohanic E, Fiedler F, Berche P, Trieu-Cuot P (2002) Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43:1-14.
 89. Deininger S, Stadelmaier A, von Aulock S, Morath S, Schmidt RR, Hartung T (2003) Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J. Immunol.* 170:4134-4138.
 90. Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf J, Pot B, Hartung T, Hols P, Mercenier A (2005) Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:10321-10326.
 91. Morath S, Geyer A, Hartung T (2001) Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* 193:393-397.
 92. Duncker SC, Wang L, Hols P, Bienenstock J (2008) The D-alanine content of lipoteichoic acid is crucial for *Lactobacillus plantarum*-mediated protection from visceral pain perception in a rat colorectal distension model. *Neurogastroenterol. Motil.* 20:843-850.

93. Hyyrylainen HL, Vitikainen M, Thwaite J, Wu HY, Sarvas M, Harwood CR, Kontinen VP, Stephenson K (2000) D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 275:26696-26703.
94. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
95. Marfey P (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* 49:591-596.
96. Shockman GD, DaneoMoore L, Kariyama R, Massidda O (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.* 2:95-98.
97. Novitsky TJ, Chan M, Himes RH, Akagi JM (1974) Effect of temperature on the growth and cell wall chemistry of a facultative thermophilic *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 117:858-865.
98. Hurst A, Hughes A, Duckworth M, Baddiley J (1975) Loss of D-alanine during sublethal heating of *Staphylococcus aureus* S6 and magnesium binding during repair. *J. Gen. Microbiol.* 89:277-284.
99. Neuhaus FC, Baddiley J (2003) A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:686- 723.
100. Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Kiriukhin MY, Debabov DV, Neuhaus FC, Hamilton IR (2000) Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J.*

- Bacteriol.* 182:6055-6065.
101. Debabov DV, Kiriukhin MY, Neuhaus FC (2000) Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-alanylation. *J. Bacteriol.* 182:2855-2864.
 102. Koprivnjak T, Mlakar V, Swanson L, Fournier B, Peschel A, Weiss JP (2006) Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188:3622-3630.
 103. Kullik I, Jenni R, Berger-Bachi B (1998) Sequence of the putative alanine racemase operon in *Staphylococcus aureus*: insertional interruption of this operon reduces D-alanine substitution of lipoteichoic acid and autolysis. *Gene* 219:9-17.
 104. Tanabe S, Kinuta Y, Saito Y (2008) *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *Int. J. Mol. Med.* 22:181-185.
 105. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543-547.
 106. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW (2000) Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 62:240-248.
 107. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X (2009) Distinct cytokine patterns identified from

- multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15:341-352.
108. Dotan I, Allez M, Nakazawa A, Brimnes J, Schulder-Katz M, Mayer L (2007) Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+T cells to proliferate and secrete interferon- γ . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292:G1630-G1640.
 109. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK (2009) The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* 10:167-175.
 110. Katzman SD, Gallo E, Hoyer KK, Abbas AK (2011) Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-antigen. *J. Immunol.* 186:4668-4673.
 111. Harris NL, Ronchese F (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* 77:304-311.
 112. Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L (1991) Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100:3-12.
 113. Borchering F, Nitschke M, Hundorfean G, Rupp J, von Smolinski D, Bieber K, van Kooten C, Lehnert H, Fellermann K, Buning J (2010) The CD40-CD40L pathway contributes to the proinflammatory function of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 176:1816-1827.
 114. Framson PE, Cho DH, Lee LY, Hershberg RM (1999) Polarized

- expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 116:1054-1062.
115. Debabov DV, Kiriukhin MY, Neuhaus FC (2000) Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of DltD in D-alanylation. *J. Bacteriol.* 182:2855-2864.
 116. Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M (2009) CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:876-881.
 117. Kagnoff MF, Eckmann L (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* 100:6-10.
 118. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204:1849-1861.
 119. Feng T, Qin HW, Wang LF, Benveniste EN, Elson CO, Cong YZ (2011) Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J. Immunol.* 186:6313-6318.
 120. Miyauchi E, Morita H, Tanabe S (2009) *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase *in vivo*. *J. Dairy Sci.* 92:2400-2408.
 121. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M (2009) Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial

- barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296:G1140-G1149.
122. Chen HQ, Yang J, Zhang M, Zhou YK, Shen TY, Chu ZX, Zhang M, Hang XM, Jiang YQ, Qin HL (2010) *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299:G1287-G1297.
123. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJM, Wells JM (2010) Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298:G851-G859.
124. Liu ZH, Zhang P, Ma YL, Chen HQ, Zhou YK, Zhang M, Chu ZX, Qin HL (2011) *Lactobacillus plantarum* prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Mol. Biol. Rep.* 38:1353-1361.
125. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Yajima M, Dvorak B (2009) *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297:G940-G949.
126. Miyauchi E, Morita H, Okuda J, Sashihara T, Shimizu M, Tanabe S (2008) Cell wall fraction of *Enterococcus hirae* ameliorates TNF- α -induced barrier impairment in the human epithelial tight junction. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:469-476.
127. Ghadimi D, de Vrese M, Heller KJ, Schrezenmeir J (2010) Effect of

- natural commensal-origin DNA on toll-like receptor 9 (TLR9) signaling cascade, chemokine IL-8 expression, and barrier integrity of polarized intestinal epithelial cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 16:410-427.
128. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289:1352-1355.
129. Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat. Biotechnol.* 21:785-789.
130. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryneck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L (2004) Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127:502-513.
131. Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, Van Huysse J, Demetter P, Steidler L, Remaut E, Cuvelier C, Rottiers P (2010) Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 3:49-56.

謝辞

本研究は、広島大学大学院生物圏科学研究科 田辺創一先生のご指導のもとで遂行されました。心より厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、有益なるご指導・ご助言をいただきました広島大学大学院生物圏科学研究科 中野宏幸先生、三本木至宏先生、鈴木卓弥先生、奥田潤先生（現、京都薬科大学大学院薬学研究科）、西村敏英先生（現、日本獣医生命科学大学応用生命科学部）、ならびに諸先生方に深く感謝致します。また、研究協力を賜りました、清水誠先生（東京大学大学院農学生命科学研究科）、森田英利先生（麻布大学獣医学部）、ならびに明治乳業株式会社 研究本部 食機能科学研究所の皆様にご御礼申し上げます。

動物資源化学研究室の卒業生、また在校生の皆様には、公私共に大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。最後に、研究生生活を支えてくれた我が家族に感謝致します。