

一般演題 18**小腸と大腸の免疫系細胞応答は部位や腸内環境により異なる特徴をもつ****Immunoresponses of the Intestinal Lymphocytes are Different between the Small Intestine and the Large Intestine**

○細野 朗¹, 今野拓馬¹, 笠倉和巳¹, 鈴木あみ¹, 百瀬愛佳², 伊藤喜久治², 高橋恭子¹, 上野川修一¹

¹日本大学生物資源科学部食品生命学科, ²東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

【目的】 腸管には莫大な数の腸内細菌が共生しているが、小腸と大腸ではその内部構造や酸素濃度の違いから構成している細菌叢や細菌数がそれぞれ異なっていることが知られている。特に、大腸においては小腸に比べて常在する細菌数も圧倒的に多いことから、腸内での細菌と宿主との共生系を維持するための腸管免疫系についても、その特徴が小腸と大腸では異なっていることが予想される。そこで本研究では小腸パイエル板、盲腸リンパ節細胞のフェノタイプや細胞応答の特徴を明らかにすることをめざした。

【方法】 通常環境で飼育されているBALB/cマウス（♀, 7週齢）より脾臓細胞、小腸パイエル板細胞、盲腸リンパ節細胞を採取し、細胞表面分子に注目したフェノタイプをフローサイトメトリーにより解析を行った。また、それぞれ磁気細胞分離法によりT細胞除去画分（Thy1.2⁻細胞）を分離して総RNAを抽出し、定量PCR法にてToll様受容体（TLR）のmRNA発現を解析した。さらに、それぞれのThy1.2⁻細胞と腸内共生菌の菌体成分との共培養を行い、サイトカイン産生などに与える影響を検討した。

【結果】 盲腸リンパ節細胞と小腸パイエル板細胞ではB220⁺細胞やCD11c⁺細胞の構成割合には顕著な差はなく、Thy1.2⁻細胞画分におけるTLR2およびTLR4のmRNA発現も差がみられなかった。しかし、盲腸リンパ節細胞は小腸パイエル板細胞に比べてCD4⁺CD69⁺細胞の割合が低く、一方で微生物抗原刺激に対するIL-12p40産生は低応答性である特徴がみられた。

【考察】 大腸では小腸に比べて腸内共生菌に対する強い免疫応答が制御されている可能性があり、これにより腸管部位における免疫応答の違いが腸内における細菌と宿主との共生系に強く関与していると考えられた。

一般演題 19

TNF α converting enzyme 誘導型腸内細菌による大腸粘膜樹状細胞の活性化が colitis-associated cancer の発症に關与する

The Activation of Lamina Propria Dendritic Cells Induced by Commensal Bacteria Contributes to the Pathogenesis of Colitis-associated Cancer

○山本真悠子¹, 内藤智昭¹, 長岡紀子¹, 船橋英行¹, 南野昌信¹, 光山慶一², 松本 敏¹¹株式会社ヤクルト中央研究所, ²久留米大学医学部内科

【目的】我々は、Colitis-associated cancer (CAC) モデルを用いた解析により、IL6 *trans*-signaling を介した Stat3 の活性化が CAC 発症に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、慢性腸炎粘膜領域での IL6 *trans*-signaling 発生機序における粘膜固有層樹状細胞 (LPDC) 及び腸内細菌の役割を解析した。

【方法】1. CAC 誘導 BALB/c マウスより単離した LPDC サブセットにおける TACE, IL6R α の発現を解析した。2. LPDC サブセットのサイトカイン mRNA の発現並びにナイーブ T 細胞に対する Th17 細胞分化誘導能を解析した。3. クローンライブラリ法を用いて、CAC マウスの LPDC サブセットに貪食された腸内細菌を調べた。4. CAC モデル (TCR β /p53KO マウス: β DKO) より樹立した F4/80⁺ LPDC 細胞株を用いてヒト由来腸内細菌株の TNF α converting enzyme (TACE) 誘導活性を解析した。5. TACE 誘導活性の異なるヒト由来腸内細菌株 (TACE 誘導菌又は非誘導菌, 各7菌株) を無菌 β DKO に定着させ TACE 誘導菌の CAC 誘導能を解析した。

【結果】1. CAC 粘膜の LPDC は、F4/80⁺ LPDC 及び F4/80⁻ LPDC に大別された。F4/80⁺ LPDC は F4/80⁻ LPDC に比べ、TACE 及び IL6R α を強く発現し、PMA 刺激で可溶性 IL6R α を生成した。2. F4/80⁺ LPDC は TNF α , IL10, IL23p19 等の mRNA 発現量が高く、F4/80⁻ LPDC は IL6 mRNA の発現量が著しく高かった。両 LPDC を共培養することにより、IL6 *trans*-signaling 依存的な Th17 細胞分化が強く誘導された。3. クローンライブラリ解析の結果、CAC 由来 F4/80⁺ LPDC は、腸内細菌を貪食していることが明らかとなった。4. *C. coccoides*, *B. fragilis* 及び *Prevotella* 群には TACE 誘導菌株が存在し、*C. leptum*, *C. ramosum*, *Bifidobacterium* 群は非誘導菌であった。従って、腸内細菌の菌株により TACE 誘導活性が異なることが示唆された。5. TACE 誘導菌を定着させた β DKO の大腸発癌率は 60% であったのに対し、非誘導菌定着群では大腸癌は誘発されなかった。また、TACE 誘導菌群の大腸発癌は TACE⁺ F4/80⁺ LPDC の浸潤を伴っていた。

【考察】TACE 誘導型腸内細菌により活性化された F4/80⁺ DC に由来する可溶性 IL6R α と F4/80⁻ DC に由来する IL6 により IL6 *trans*-signaling が惹起され、炎症からの大腸発癌が誘導される可能性が推定された。

一般演題 20

乳酸菌経口投与後のラット回腸パイエル板内における
投与菌数の経時的变化と、それに伴う免疫学的パラメーターの挙動Progressive Change in the Number of Dietary Lactic Acid Bacteria and
in Immunological Variables in Rat Ileal Peyer's Patch○塚原隆充^{1,2}, 松川典子¹, 井上 亮², 牛田一成²¹栄養・病理学研究所, ²京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 動物機能学

【目的】 乳酸菌投与による腸管免疫亢進が知られている。パイエル板は腸管内の異物認識を司り、投与した乳酸菌を含め多くの抗原を盛んに取り込んでいると考えられている。一方で投与した乳酸菌のパイエル板内の菌数及び免疫応答の経時的变化は殆ど検討されていない。パイエル板は小腸の部位によって乳酸菌に対する応答性が異なることから (Yoshikawa et al, 2009), 今回は回腸パイエル板 (iPP) に限定して乳酸菌の経時的な菌数と、それに伴う免疫応答の変化を検討した。

【方法】 投与菌は *Lactobacillus casei* JCM 1134 を用いた。Wistar 系成雄ラットを 36 匹導入し、1 週間施設馴化を行った。試験期間を通して AIN93G カゼイン 20% 半精製飼料を給餌した。飲水及び飼料は試験期間を通して自由摂取とした。無作為に 12 匹ずつ 3 群に分け、1 群を生理食塩水投与 (C) 群、2 群を *L. casei* 1.7×10^{11} 個/kg 投与 (LL) 群、3 群を *L. casei* 5.0×10^{12} 個/kg 投与 (LH) 群とした。1 週間毎朝 10 時に *L. casei* を所定量生理食塩水に懸濁して強制経口投与した。その後、5 日間投与休止期間を設けた後、朝 10 時に再び所定量を強制経口投与した。投与後 2.5 時間、6 時間及び 24 時間に各群無作為に 4 匹ずつ剖検を行い、回腸パイエル板を採取した。PBS で 3 回洗浄し、total RNA を抽出後、逆転写し、炎症性サイトカインを中心に mRNA 発現を real-time PCR を用いて解析した。また、*L. casei* 特異的 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーを設計し、real-time PCR を行うことで PP に取り込まれた *L. casei* 菌数を推定した。

【結果】 投与後 2.5 時間では、LL 群の TNF- α , CD86 及び CD69 mRNA 発現が C 群よりも有意に高値を示した。この時の PP 内 *L. casei* 菌数は、LL 群で 4.6 log cells/mg tissue, LH 群で 5.5 log cells/mg であった。投与後 6 時間では、LH 群の IL-12 mRNA 発現が高値を示した。この時の *L. casei* 菌数は、LL 群で 2.5 log cells/mg, LH 群で 3.5 log cells/mg であった。投与後 24 時間では *L. casei* 投与による有意な変化は認められなくなった。

【考察】 *L. casei* 投与菌数や投与後時間によって iPP の反応が異なる可能性が示唆された。

一般演題 21

Lactobacillus gasseri OLL2809投与による粘膜固有層における
経口免疫寛容誘導の促進Facilitation of Oral Tolerance in Lamina Propria by Oral Administration of
Lactobacillus gasseri OLL2809

○吉田綾子¹, 山田 潔², 八村敏志³, 指原紀宏⁴, 池上秀二⁴, 清水 誠¹, 戸塚 護¹
¹東大院農生科・応生化, ²日大歯, ³東大院農生科・食の安全研セ, ⁴株式会社 明治研究本部

【背景・目的】*Lactobacillus gasseri* OLL2809 (LG2809) の経口投与が, DO11.10マウスへの卵白アルブミン (OVA) 含有水の投与で誘導される経口免疫寛容を強化することを報告してきた。LG2809投与は, DO11.10マウスの経口免疫寛容誘導時の脾臓において誘導される抑制性T細胞集団である CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T細胞集団の割合を増加し, その細胞集団自身のIL-10産生と未感作T細胞に対する抑制活性を増強することが判明している。本研究では, LG2809投与が粘膜固有層 (LP) の樹状細胞やT細胞機能に与える影響を解析した。

【方法】DO11.10マウスにLG2809生菌体を毎日1 mg, 7, 10, 12日間胃内強制投与し, 最後の0, 3, 5日間, 20% OVA水を自由摂取させて経口免疫寛容を誘導した。投与終了時のLPにおけるT細胞及び樹状細胞の表面抗原マーカーをフローサイトメトリー解析した。また, LPのCD3⁺ T細胞の培養上清中IL-10量をELISAにより測定し, さらにCD3⁺ T細胞の, 未感作T細胞のIL-2産生に対する抑制活性を検討した。BALB/cマウスにLG2809生菌体を7日間経口投与後, CD3⁻ LP細胞を調製し, 樹状細胞の表面抗原マーカーを解析した。さらに, その細胞で抗原提示し, 分化誘導したCD4⁺ T細胞の未感作T細胞のIL-2産生に対する抑制活性を検討した。

【結果】LG2809投与により, LPに存在するCD3⁺ T細胞がOVA水投与開始後, より早い段階で抑制活性を獲得し, さらにLPのCD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺ T細胞集団の割合がより早く増加した。また, CD3⁺ T細胞のIL-10産生はLG2809投与によりOVA水投与3日目に対照群より高くなる傾向を示した。LG2809投与により, LPにおいて形質細胞様樹状細胞 (pDC) の割合が増加し, LG2809を投与したLPのCD3⁻ 細胞で分化誘導したCD4⁺ T細胞は強い抑制活性を示した。

【考察】LG2809の投与は, LPにおけるpDCの割合を増加させ, LG2809を投与したマウス腸管由来のCD3⁻ LP細胞で抗原提示することにより抑制能の強いCD4⁺ T細胞の分化誘導を促進し, LPにおける経口免疫寛容誘導を促進している可能性が考えられた。

一般演題 22

プロピオン酸菌乳清発酵物の消化管における
I型インターフェロン関連遺伝子の発現上昇効果には
消化管内のビフィズス菌が重要である

Bifidobacterium longum Plays A Key Role
in Up-Regulation of Interferon Type I Related Gene Expression
by *Propionibacterium freudenreichii*-Fermented Milk Whey Product

○浅見幸夫, 小山(村治)里美, 樋口智子
株式会社 明治 研究本部 食機能科学研究所

【目的】プロピオン酸菌乳清発酵物は消化管を介して、アレルギーや感染防御などの宿主免疫反応に影響を与えると推定されるが、そのメカニズムについては明らかになっていない。本研究は消化管を介したプロピオン酸菌乳清発酵物の感染防御効果を、マウス消化管における遺伝子発現変化から推定することを目的とした。さらに感染防御効果発現における消化管内のビフィズス菌の重要性についても検討を行った。

【方法】無菌 (GF) マウス (IQI [GF] ;Jic) および同マウスに *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217^T を定着させたノトバイオート (GB) マウスに対してプロピオン酸菌乳清発酵物の7日間経口投与を行い、8日目の投与2時間後に組織を採取した。より複雑な系としてビフィズス菌が検出される SPFマウス (SLC) と検出されない SPFマウス (Crj) を用いて同様な投与試験を行った。盲腸、回腸および結腸のDNAマイクロアレイ解析を行い、各群間の比較を行った。

【結果】JCM1217^T を定着させたGBマウスでは、プロピオン酸菌乳清発酵物投与後の盲腸、回腸および結腸の何れの組織においても、I型インターフェロンで誘導される複数の遺伝子の発現上昇が認められた。この中には (2'-5') オリゴアデニル酸合成酵素、eIF-2A protein kinase 2やmyxovirus resistance 1, 2など、生体のウイルス感染防御反応としてI型インターフェロンの作用により発現が上昇する遺伝子が多く含まれていた。同時にNK細胞への抑制性シグナル分子であるMHCクラスIやIFN受容体シグナル伝達に関わるSTAT2などの遺伝子発現にも影響が認められた。またウイルス感染に伴うI型インターフェロン誘導に関わるTLR-3やIFN γ の発現上昇も認められた。これに対して、GFマウスにおけるI型インターフェロン関連遺伝子発現への影響は、GBマウスと比べて小さかった。さらにSPFマウスを用いた検討においても、ビフィズス菌が定着しているマウスの方がプロピオン酸菌乳清発酵物投与で、より多くのI型インターフェロン関連遺伝子の発現上昇が認められた。

【考察】プロピオン酸菌乳清発酵物は消化管を介して宿主の感染防御機構、特にI型インターフェロンによるウイルス防御機構を活性化することが示唆された。またこの活性化には、消化管内にビフィズス菌が存在していることが重要であると考えられた。