



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	チーズスターター乳酸菌Lactobacillus helveticus SBT2171の免疫制御作用に関する研究
Author(s)	山下, 舞亜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7051号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7051
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70188
Type	doctoral thesis
File Information	Maya_Yamashita.pdf



チーズスターター乳酸菌
Lactobacillus helveticus SBT2171 の
免疫制御作用に関する研究

山下 舞亜

学位論文名：

チーズスターター乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* SBT2171 の免疫制御作用に関する研究

目次	...p.1
略語一覧	...p.2
緒言	...p.4
第1章 チーズスターター乳酸菌 <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 による免疫細胞の 増殖抑制作用、及びサイトカイン産生抑制作用	...p.9
第2章 マウスのコラーゲン誘導性関節リウマチモデルに対する <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 の緩和効果	...p.33
第3章 マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する <i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171 の緩和効果	...p.63
結語	...p.94
引用文献	...p.98
文献目録	...p.117
謝辞	...p.119

略語一覧

CCL ; CC chemokine ligand (CC ケモカインリガンド)

CCR ; CC chemokine receptor (CC ケモカイン受容体)

CFA ; Complete Freund's Adjuvant (完全フロイントアジュバント)

cfu ; colony forming unit (コロニー形成単位)

CIA ; Collagen-induced arthritis (コラーゲン誘導性関節リウマチ)

CII ; Type II collagen (II型コラーゲン)

CII-IgG ; Type II collagen specific Immunoglobulin G (II型コラーゲン特異的免疫グロブリン G)

CNS ; Central nervous system (中枢神経系)

DSS ; Dextran sulfate sodium (デキストラン硫酸)

EAE ; Experimental autoimmune encephalomyelitis (実験的自己免疫性脳脊髄炎)

ELISA ; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FACS ; Fluorescence-activated cell sorting

IgA ; Immunoglobulin A (免疫グロブリン A)

IgG ; Immunoglobulin G (免疫グロブリン G)

IL- ; Interleukin-

INF- γ ; Interferon- γ

LAB ; Lactic acid bacteria

LC1185^T ; *Lactobacillus crispatus* JCM1185^T

LG1131^T ; *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T

LH1120^T ; *Lactobacillus helveticus* JCM1120^T

LH2171 ; *Lactobacillus helveticus* SBT2171

LN ; Lymph nodes (リンパ節)

LPS ; Lipopolysaccharide (リポ多糖)

MLN ; Mesenteric lymph node (腸間膜リンパ節)

MS ; Multiple sclerosis (多発性硬化症)

PP ; Peyer's patch (パイエル板)

RA ; Rheumatoid arthritis (関節リウマチ)

SP ; Spleen (脾臓)

^T ; Type strain (基準株)

Tfh cell ; Follicular T cell (濾胞ヘルパーT細胞)

Tfr cell ; Follicular regulatory T cell (制御性濾胞ヘルパーT細胞)

TGF- β ; Transforming growth factor- β (トランスフォーミング増殖因子- β)

TNF- α ; Tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)

Treg cell ; Regulatory T cell (制御性 T 細胞)

緒言

厚生労働省によると、日本の人口は近年（2017 年）、横ばいから人口減少局面を迎えており、2060 年には総人口が 9000 万人を割り込むこと、高齢化率は 40%近い水準になることが推計されている。こうした超高齢社会がもたらす課題として、働き手の主力とされる 15 歳以上 65 歳未満の「生産年齢人口」の減少や、介護負担の増大などが挙げられる。同省が平成 25 年度から 10 年間計画で、21 世紀において日本に住む一人ひとりの健康を実現するための、国民健康づくり運動として実施している“健康日本 21”においては、高年期の QOL の向上やそれを支える障害の減少のために、運動習慣や“適切な食生活の確保”が推奨されている。このような背景から、健康に対して食が果たすべき役割はますます大きくなると考えられる。

また、近年、生活習慣病やがんを含む加齢関連疾患には、総じて生体内での慢性炎症が深く関与していることが報告されている（真鍋, 2017）。高齢者では加齢に伴う免疫系自体の変化（免疫老化）、組織の変化や全身的な代謝や内分泌系の変化など、多様な要因により慢性炎症が起こりやすくなっており、生じた慢性炎症が加齢関連疾患の発症や進展に寄与すると言われている。慢性炎症においては、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素など、炎症や発がんを促進する様々な因子の過剰な分泌が起こることから、“慢性炎症は万病の元”と言われている（Ohtani, 2014）。したがって、炎症を抑制すること、それも医薬に頼るのではなく、日常的摂取できる食品によって予防的に抑制す

ることは、今後、超高齢社会に突入していく日本が抱える様々な問題（医療費の増大や労働力の減少など）を解決する、一つの有力な手段となると考えられる。

乳酸菌は、代謝活動により乳酸を産生する微生物の総称である。古くから、ヨーグルトや乳酸菌飲料、漬物など様々な発酵食品に用いられ、食品の保存性や栄養価、嗜好性を向上することで、人々の豊かな食生活に貢献してきた。また、ある種の乳酸菌は元々、小腸や大腸などの消化管や腔に生息し、病原性微生物を制御し、体内の環境を整えるなどして人々の健康にも貢献してきた（Parvez *et al.*, 2006; Murooka and Yamshita, 2008; Kabak and Dobson, 2011）。

近年、その健康機能として、乳酸菌が腸内環境を改善するだけでなく、免疫機能にも影響を与えることが報告されている。例えば、*Lactobacillus gasseri* SBT2055 のマウスへの経口投与により、抗ウイルス遺伝子の発現が上昇し、インフルエンザウイルスの感染による死亡率や炎症状態が軽減された（Nakayama *et al.*, 2014; Miyazaki, 2015）。さらに、SBT2055 の経口摂取により健常人のインフルエンザウイルスのワクチン接種後の抗体産生が促進され、ワクチンの効果が高まった（Nishihira *et al.*, 2016）。*Bifidobacterium longum* BB536 は自然免疫で主要な役割を担う natural killer cell（NK 細胞）の活性を向上し、高齢者のインフルエンザウイルス感染を予防した（Namba *et al.*, 2010; Akatsu *et al.*, 2013）。*Lactobacillus rhamnosus* GG 由来のタンパク質は宿主防御に重要な IgA 産生をマウスの小腸上皮細胞で誘導した（Wang *et al.*, 2017）。このように乳酸菌による免疫賦活作用が数多く報告されるのに対し、

アレルギーや自己免疫疾患などの過剰な免疫応答を制御する、免疫制御作用に関する報告は少なく、これは元々、乳酸菌がヒトにとって非自己であり、異物であることによるのかも知れない。なお、本研究では、過剰な免疫応答を抑える、抑制的な乳酸菌の作用を免疫“制御”作用と述べることとする。

Lactobacillus helveticus SBT2171 (LH2171) は乳製品から分離された乳酸菌であり、高いプロテアーゼ活性を有することから、ゴーダチーズの製造にスターター乳酸菌として広く用いられている (Sasaki *et al.*, 1996)。これまでの研究で、LH2171 を含有するチーズをマウスに摂取させることにより、制御性 T 細胞の誘導、炎症性サイトカインの産生抑制、DSS 誘発大腸炎の緩和といった作用が認められることを報告した (Hosoya *et al.*, 2012)。他の研究においても、ヒト (Ibrahim *et al.*, 2010) やラット (Lollo *et al.*, 2012) におけるチーズの免疫制御作用が報告されている。しかしながら、チーズの製造に用いられるスターター菌が免疫制御作用を有するかどうかは検証されていない。

そこで、第 1 章において、LH2171 菌体そのものに免疫制御機能があるか否かを、*in vitro* において様々な乳酸菌 40 株と比較しながら検証した。マウスの脾臓、および腸管免疫組織から調製した初代培養免疫細胞に乳酸菌を添加し、免疫指標として一般的に用いられる免疫細胞の増殖、および炎症性サイトカインの産生について評価した。

第 2 章では、*in vitro* において顕著な免疫制御作用を示した LH2171 が *in vivo* においてもその作用を発揮するのか検証するため、過剰な免疫反応の動物モデルとして、自己免疫疾

患の一つである関節リウマチ（Rheumatoid arthritis; RA）のモデルマウスを用いた動物試験を実施した。自己免疫疾患とは、本来、異物を認識し排除するための役割をもつ免疫系が、自己の正常な細胞や組織に対してまで過剰に反応し、傷害することで症状を起こす疾患の総称である。RA の場合には自己のコラーゲンやタンパク質を抗原として認識し反応することで発症すると考えられており、その患者は人種にかかわらず世界中に分布し、世界人口の約 1%を占める（Verstappen, 2013）。日本でも 70 万人程度の患者がいるとみられる深刻な疾患である。RA モデルマウスへの効果を評価することで、LH2171 が生体に与える影響を把握し、ヒトの RA をはじめとした、過剰な免疫応答が引き起こす各種炎症疾患への LH2171 の臨床応用の可能性を示すことを目的とした。

第 3 章では、関節リウマチと同じく、自己免疫疾患の一つである多発性硬化症（Multiple sclerosis; MS）のモデルマウスに対する LH2171 の緩和効果を検証した。MS とは、運動機能、視覚、認知機能等に異常をきたす脱髄性脳脊髄炎である。MS モデルマウスは、RA モデルマウスと並んで、免疫分野の研究で非常によく用いられる免疫疾患モデルであり、その発症メカニズムも詳細に研究されている。発症機序の異なる 2 つのモデルを検証することで、LH2171 の作用をより深く理解することが可能である。また、本章では動物に加えて、培養細胞株を用いた試験を行い、LH2171 の作用メカニズムについてより詳細に解析した。

第 1 章

チーズスターター乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* SBT2171 による

免疫細胞の増殖抑制作用、及びサイトカイン産生抑制作用

■緒言

Lactobacillus helveticus SBT2171 (LH2171) は高いプロテアーゼ活性を有し (Tan *et al.*, 1995)、ゴーダチーズの製造にスターター菌として用いられる乳酸菌である。これまでに LH2171 を含有するチーズをマウスに摂取させることにより、制御性 T 細胞の誘導、炎症性サイトカインの産生抑制、DSS 誘発大腸炎の緩和といった作用が認められることを報告した (Hosoya *et al.*, 2012)。他の研究においても、ヒト (Ibrahim *et al.*, 2010) やラット (Lollo *et al.*, 2012) におけるチーズ摂取による免疫調節作用が報告されている。しかしながら、チーズ製造に用いられるスターター菌そのものが免疫調節作用を有するかどうかは検証されていない。チーズ中のどの成分が調節作用を担っているのかは不明であるが、ここでは乳酸菌に着目して研究を行った。

乳酸菌による免疫調節作用としては、細菌やウイルスの外的侵入や腫瘍に対する免疫応答を活性化するだけでなく、例えば、炎症性腸疾患 (IBD) および関節リウマチ (RA) のようなある種の異常性をもった過剰な免疫反応を制御する作用も知られている。このような乳酸菌の免疫制御作用は、抗原提示細胞のアポトーシス誘導 (Kanzato *et al.*, 2008) や免疫細胞の増殖抑制 (Peluso *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2011) のような、乳酸菌の免疫細胞への作用によるものである。乳酸菌によって、炎症や自己免疫疾患の原因となる炎症性サイトカインの産生 (Atreya *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000) が抑制されることも報告されている (Matsumoto *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Philippe *et al.*, 2011)。

本章では、*in vitro* において抗 CD3/CD28 抗体や Lipopolysaccharide (LPS) といった、免疫細胞の刺激剤で処理したマウスの免疫細胞の細胞増殖や炎症性サイトカイン産生に、LH2171 菌体が与える影響を評価した。

■実験方法

1. 実験動物

雄性 C57BL/6J マウス (5~6 週齢) は日本チャールスリバー (横浜、日本) から購入し、1 週間以上、固形飼料 (CE-2 ; クレアジャパン、東京、日本) の自由摂取、自由飲水下で馴化飼育した。マウスを温度 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($50 \pm 10\%$)、光 (12 時間の明暗周期) が制御された条件下で飼育し、全ての動物実験を、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals NRC (National Research Council) (1996) に従って実施した。

2. 免疫細胞の調製

マウスを 7~10 週齢で、イソフルランによる麻酔下にて解剖し、腸間膜リンパ節 (MLN)、パイエル板 (PP)、及び脾臓 (SP) を細胞培養用培地 (RPMI1640 培地に、10%非働化済みウシ胎児血清、10 mM HEPES 緩衝液、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、0.05 mM 2-メルカプトエタノールを添加したもの) 中に採取し、小ハサミで細かく刻んだ。組織破碎液を 70- μm 細胞ストレーナー (BD Biosciences、San Jose、

CA) でろ過し、細胞分散液を得た。脾臓の細胞分散液中の赤血球は、Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories、Burlington、Ontario、Canada) を用いた密度勾配遠心分離法によってメーカーのプロトコルに従って除去した。細胞を 2 回洗浄し、培地中に再分散し、培養実験の開始まで氷上で保持した。

3. 菌株の調製

乳製品やヒトの腸管から分離された、LH2171 株を含む乳酸菌 41 菌株を実験に供した (Table 1)。*Lactobacillus kefiranofaciens*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactococcus lactis* は 30°C、これらを除く *Lactobacillus* 属、及び *Streptococcus thermophilus* は 37°C で 16 時間、de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 培地 (Difco Laboratories、Detroit、MI) で培養した。*Bifidobacterium* 属は 37°C で、*Leuconostoc* 属は 30°C で 16 時間、1% グルコース添加 GAM 培地 (Nissui Seiyaku、東京、日本) で培養した。培養は静置培養とした。遠心分離 (8500 ×g、10 分、4°C) により集菌し、滅菌した超純水で 2 回洗浄し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥菌体は滅菌した超純水に 10 mg/ml の濃度で懸濁し、80°C で 30 分間加熱処理した。

4. 細胞増殖アッセイ

マウスの MLN、PP、SP から調製した免疫細胞 (5×10^4 cells/well) の分散液に、加熱処理した乳酸菌菌体 (10 µg/ml) と、抗 CD3/CD28 抗体ビーズ (Life Technologies、Gaithersburg、

MD ; 5×10^4 beads/well)、あるいは *Escherichia coli* 0111:B4 由来の LPS (Sigma-Aldrich Japan、東京、日本 ; 10 μ g/ml) を添加し、96 ウェル丸底プレート (Asahi Glass、横浜、日本) で、5%CO₂、37°C の条件下で 3 日間培養した。培養後、PrestoBlue Cell Viability Reagent (Life Technologies) をメーカーのプロトコルに準拠して各ウェルに添加し、7 時間培養した。培養後、各ウェルの蛍光強度 (Excitation : 530 nm、Emission : 580 nm) を測定した。

PrestoBlue Cell Viability Reagent は、生細胞がもつ還元力を利用して、生細胞の数や活性を測定する試薬である。すなわち、試薬に含まれる細胞膜透過性の非蛍光物質 (レサズリン) が、生細胞の細胞質内に存在する乳酸脱水素酵素の補酵素 NADH をはじめとした還元酵素によって還元され、蛍光物質 (レゾルフィン) に変化することから、その蛍光値は、生細胞の数やその代謝活性、増殖活性を反映する。本研究では、増殖活性の測定試薬として用いた。

5. 細胞生存率の測定

マウスから分離した免疫細胞 (5×10^4 cells/well) を細胞増殖刺激剤で刺激せずに、加熱処理した乳酸菌菌体 (10 μ g/ml) を添加して 96 ウェル丸底プレート (Asahi Glass) で、5%CO₂、37°C の条件下で 3 日間培養した。培養後に、CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay Kit (Life Technologies) をメーカーのプロトコルに準拠して添加し、1 時間培養した。培養後、各ウェルの蛍光強度 (Excitation : 485 nm、Emission : 530 nm) を測定し、メーカーのプロトコル

に従って生細胞数を算出した。

CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay Kit は、細胞の生死にかかわらず、細胞膜を透過し、DNA に結合する蛍光核酸染色剤と、死細胞にのみ透過して、蛍光を抑制するバックグラウンド抑制色素の 2 つの成分を含む。このことから、生細胞の DNA 量依存的に蛍光を発する。すなわち、前述の PrestoBlue Cell Viability Reagent とは異なり、蛍光値は単純に生細胞の数を反映し、生細胞の代謝量によらない。

6. 炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 β 、及び TNF- α の測定

マウスの MLN、PP、SP から分離した免疫細胞 (5×10^4 cells/well) に、加熱処理した乳酸菌菌体 (10 μ g/ml) と、LPS (10 μ g/ml) を添加し、96 ウェル丸底プレート (Asahi Glass) で、5%CO₂、37°C の条件下で 2 日間培養した。培養後、培養上清を回収し、サイトカイン測定に用いるまで -30°C で保存した。上清中の IL-6、IL-1 β 、tumor necrosis factor α (TNF- α) をメーカー (R&D systems、Minneapolis、MN) のプロトコルに準拠して ELISA 法にて測定した。

7. 抗炎症性サイトカイン IL-10 の測定

マウスの MLN、PP、SP から分離した免疫細胞 (5×10^5 cells/well) に、加熱処理した乳酸菌菌体 (100 μ g/ml) と、LPS (10 μ g/ml) を添加し、96 ウェル丸底プレート (Asahi Glass)

で、5%CO₂、37°C の条件下で 24 時間培養した。培養後、培養上清を回収し、サイトカイン測定に用いるまで−30°C で保存した。上清中の IL-10 をメーカー（eBioscience）のプロトコルに準拠して ELISA 法にて測定した。

なお、本試験の細胞終濃度 5.0×10^5 cells/well、乳酸菌菌体終濃度 100 µg/ml は、前述の試験（“細胞増殖アッセイ”、“細胞生存率の測定”、“炎症性サイトカイン IL-6、IL-1β、及び TNF-α の測定”）で用いた濃度（細胞終濃度 5.0×10^4 cells/well、乳酸菌体終濃度 10 µg/ml）に比べて高い。これらを高めた理由は、前述の試験条件の培養上清では IL-10 が検出限界以下であったためである。新たな濃度で試験を行うにあたり、(1) 刺激剤により細胞増殖が起ること、(2) その増殖が LH2171 添加で抑制されること、(3) LG1131^T では抑制は起らないことの 3 点を予備試験にて確認した。

8. Foxp3⁺T 細胞誘導能の評価

マウスの MLN から分離した免疫細胞を 5×10^4 cells/well の密度で、96 ウェル丸底プレート（Asahi Glass）に播種した。各ウェルに細胞と同数の抗 CD3/CD28 抗体ビーズ（Life Technologies）を加え、さらに LH2171（終濃度 10 µg/ml）、あるいは Foxp3⁺T 細胞誘導のポジティブコントロールとして TGF-β1（フナコシ）（終濃度 3 ng/ml）を加えて、5%CO₂、37°C の条件下で 48 時間培養した。

培養した MLN 細胞における Foxp3⁺T 細胞の割合を測定するため、細胞表面の CD4 抗原

と細胞内の転写因子 Foxp3 を蛍光染色した。プレートから培養後の細胞を回収し、Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience) を用いてメーカープロトコルに従い、抗 CD4 抗体、及び抗 Foxp3 抗体で細胞を染色した。データは、FACSCanto II flow cytometer を用いて取得し、FACSDiva software (BD Biosciences) を用いて解析した。

9. 統計解析

乳酸菌を添加していない場合の増殖活性を 100 とした基準値と、各々の菌株を添加した場合の増殖活性に有意差があるか否かの統計解析には、1-sample *t*-test を用いた。多重検定には Tukey-Kramer test を用いた。なお、統計解析には、StatView version 5.0 (SAS institute, Cary, NC, USA) を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

■結果

<LH2171 が免疫細胞の増殖に与える影響>

はじめに、MLN 由来の免疫細胞を抗 CD3/CD28 抗体ビーズで刺激し、LH2171、及びその他の乳酸菌 40 株 (Table 1) を添加、培養して、生細胞の持つ還元能を測定することで免疫細胞の増殖を評価した。抗 CD3/CD28 抗体ビーズは、抗 CD3 と抗 CD28 抗体をビーズ表面に結合させたもので、抗原提示細胞の代わりに細胞を刺激し、活性化させ、増殖させる (人工的抗原提示細胞)。Figure 1-1 に示すように、41 株のうち、16 株は乳酸菌を添加していな

い場合と比較して、有意に免疫細胞の増殖を抑制した。抑制作用を示した 16 株は、*Lactobacillus helveticus* (LH2171 を含めた 5 株; 生乳、発酵乳、及びチーズ由来)、*Lactobacillus acidophilus* (4 株; ヒト腸管、及び発酵乳由来)、*Lactobacillus kefiranofaciens* (4 株; 発酵乳、及び生乳由来)、及び異なる種の 3 株 (*Lactobacillus gasseri* (ヒト腸管由来)、*Lactobacillus delbrueckii* (発酵乳由来)、及び *Lactobacillus paracasei* (市販の乳製品由来)) であった。

さらに、MLN、PP、SP の免疫細胞を、抗 CD3/CD28 抗体ビーズ、あるいは、グラム陰性菌細胞壁成分である LPS で刺激し、LH2171、及びその比較対照とした 3 菌株が免疫細胞の増殖に与える影響を評価した。3 菌株は、*L. gasseri* JCM1131^T (LG1131^T) (Figure 1-1 に示すように免疫細胞の増殖を抑制せず、また、その 16s rRNA 配列から分類学上、*L. helveticus* に近い菌株)、*L. crispatus* JCM1185^T (LC1185^T) (細胞増殖に有意に影響を与えた菌株のうち、*Lactobacillus* 属の中で最も増殖を促進した菌株)、*L. helveticus* JCM1120^T (LH1120^T) (LH2171 と同程度に細胞増殖を抑制した菌株) を選抜した。なお、^T (Type strain) は、その種の基準株であることを示す。基準株とは、種の記載された性質を満たす株で、最初にその種の記載をした者、すなわちその学名 (種名) の著者が定める (Suzuki, 2000)。

結果として、LH2171、及び LH1120^T は抗 CD3/CD28 抗体ビーズ刺激による MLN、PP、SP の免疫細胞の増殖を抑制した (Figure 1-2)。一方、LG1131^T 及び LC1185^T はこれらの細胞増殖を抑制しなかった。LPS 刺激下では、LH2171 及び LH1120^T は、LG1131^T 及び LC1185^T に比べてより顕著に免疫細胞の増殖を抑制した。

<LH2171 が免疫細胞の生存率に与える影響>

免疫細胞に対する増殖抑制作用を有する LH2171 が、免疫細胞の生存率に影響を与えるのか否かを評価するため、免疫細胞を LH2171 と共に培養し、生細胞数を測定した。測定に用いた CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay Kit は生細胞の DNA 量依存的に蛍光を発する試薬であるため、前項の増殖能測定試薬と異なり、蛍光値は生細胞の代謝量に依存せず、純粋に生細胞の数を反映する。結果として、LH2171 は MLN、PP、SP の免疫細胞の生存率を有意に低下させなかった (Figure 1-3)。LH2171 の比較対照として用いた LG1131^T (抗 CD3/CD28 抗体ビーズ刺激、あるいは LPS 刺激による免疫細胞に対して、LH2171 のような顕著な増殖抑制作用を示さなかった菌株) は、乳酸菌非添加と比べて、MLN、PP の免疫細胞の生存率に有意な影響を与えず、SP の細胞に対しては有意に増殖を促進した。

<LH2171 が IL-6、及び IL-1 β 産生に与える影響>

続いて、LH2171 が炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 β 、及び TNF- α) の産生を抑制するかを検証した。結果として、LH2171 は LPS 刺激により誘導された MLN、PP、SP の免疫細胞からの IL-6 産生を抑制した (Figure 1-4a)。一方、LG1131^T (LH2171 に比べて免疫細胞の増殖に殆ど影響を与えない菌株) は IL-6 産生を抑制しなかった。さらに、LH2171 は LPS により誘導された SP の免疫細胞からの IL-1 β 産生も抑制した (Figure 1-4b)。MLN、PP では

LPS 刺激により IL-1 β 産生は誘導されなかった（データは省略）。LH2171 が TNF- α 産生に与える影響は、3 回の独立した試験において試験回ごとに異なり、安定した結果は得られなかった（データは省略）。

<LH2171 による IL-10 産生、及び Foxp3⁺T 細胞の誘導能の評価>

乳酸菌による免疫細胞の増殖抑制のメカニズムとして知られている、抗炎症サイトカイン IL-10 の産生、ならびに抗炎症性の免疫細胞である Foxp3⁺T 細胞の誘導を、LH2171 について評価した。IL-10 産生誘導能を評価した結果、LH2171 を添加した際の培養上清は、MLN 由来の免疫細胞において、乳酸菌非添加に比べて、IL-10 濃度が増加したものの、MLN、PP、SP のいずれの組織由来の免疫細胞においても、免疫細胞の増殖抑制作用をもたない LG1131^T の培養上清に比べて、IL-10 濃度が有意に低かった（Figure 1-5）。また、Foxp3⁺T 細胞の誘導能を評価したところ、ポジティブコントロールとして用いた TGF- β は（Fu *et al.*, 2004）、CD4⁺T 細胞に対する Foxp3⁺T 細胞の割合を約 5% から約 40% まで有意に上昇させた（Figure 1-6）。一方、LH2171 添加による Foxp3⁺T 細胞の増加は認められなかった。

■ 考察

哺乳類の細胞に対する *L. helveticus* の免疫制御作用についての報告は極めて少ないが、例えば、*L. helveticus* 菌体の経口投与により、LPS 刺激された腹腔マクロファージの炎症性サ

イトカインの発現と nuclear factor κ B の活性化が抑制された (Joo *et al.*, 2012)、あるいは、*L. helveticus* による大豆由来発酵物、及び乳由来発酵物によって急性炎症に関わるケモカインである IL-8 のヒトの小腸上皮細胞からの産生が抑制された (Wagar *et al.*, 2009) という報告がある。本章では、さらに研究を推し進めるかたちで、加熱処理した LH2171 菌体と PP、MLN、SP 由来の免疫細胞を用いて、*L. helveticus* の免疫制御作用を検証し、LH2171 が様々な乳酸菌種 41 株の中で非常に強く免疫細胞の増殖を抑制すること、幾つかの炎症性サイトカインの産生を抑制することを明らかにした。増殖抑制作用に関しては、*L. helveticus* の基準株である LH1120^T にも同様の作用が認められた。

アポトーシスを含めた細胞死は、増殖抑制のメカニズムの一つとしてよく知られている。*L. acidophilus* L-92 株はアポトーシスを誘導することで、抗原刺激による CD4⁺T 細胞の増殖を抑制する (Kanzato *et al.*, 2008)。一方、LH2171 は免疫細胞の生存率に影響を与えないことから、アポトーシスを誘導せず、L-92 株とは異なるメカニズムで細胞増殖を抑制しているものと考えられる。

乳酸菌の代謝物が免疫細胞の増殖を抑制することも知られている。Peluso らは、*L. paracasei* ssp. *paracasei* B21060 の生菌体がヒトの CD4⁺T 細胞の増殖を直接的に阻害し、この阻害は B21060 が産生する乳酸によるものであることを報告した (Peluso *et al.*, 2007)。しかしながら、本研究は洗浄し、加熱処理した死菌体を用いているため、LH2171 による増殖抑制作用は乳酸を含め、LH2171 の代謝物によるものとは考え難い。

リンパ球の増殖に対する乳酸菌の加熱死菌体の抑制作用は、Yoshida らが *L. gasseri* OLL2809 について報告している (Yoshida *et al.*, 2011)。彼らは、OLL2809 の RNA が細胞増殖抑制作用を有し、その作用には哺乳類の細胞上に発現する、微生物の一本鎖 RNA を認識する toll-like receptor 7 が関与することを報告した。さらに、OLL2809 株菌体とその RNA により、乳酸菌による免疫細胞の増殖抑制のメカニズムとして知られている、アポトーシスの誘導、IL-10 産生 (Smits *et al.*, 2005; Asarat *et al.*, 2015)、あるいは制御性 Foxp3⁺細胞数の増加・誘導 (Thakur *et al.*, 2016) は起こらないことを報告した。本研究においても、LH2171 の IL-10 産生誘導能は、免疫細胞の増殖抑制作用をもたない LG1131^T に比べて有意に弱かったことから、LH2171 による免疫細胞の増殖抑制作用に IL-10 が関与する可能性は低いと考えられた。さらに、LH2171 は Foxp3⁺細胞を誘導しなかった。これらのことから、LH2171 による細胞増殖抑制のメカニズムは OLL2809 と同じようなものであるかもしれない。

続いて、LH2171 が IL-6、IL-1 β 、及び TNF- α といった LPS で非常に強く誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制するか否かを検証した。LPS は炎症性疾患と関連が深い。例えば、*Bacteroides* (細胞壁成分として LPS を有するグラム陰性細菌) の腸管での異常増殖はラットにおいて深刻な腸炎を引き起こす (Rath *et al.*, 1999)。LPS を認識する遺伝子 (マウスの 4 番染色体上にある *Lps* 遺伝子) を欠損したマウスでは腸炎が緩和される (Lange *et al.*, 1996)。IL-6、IL-1 β 、及び TNF- α といった炎症性サイトカインもまた、炎症性疾患に強く関与し、これらのサイトカインは正常マウスに比べて腸炎のマウスでより強く誘導される

(Philippe *et al.*, 2011)。本章では、LH2171 が LPS 刺激により誘導される MLN、PP、SP 由来の細胞からの IL-6 産生を非常に強く抑制することを明らかにした。加えて、LH2171 は SP 由来の細胞からの IL-1 β 産生も抑制した。一方、これらのサイトカインの産生抑制作用は、16s rRNA 配列による分類上、*L. helveticus* に近く (Felis and Dellaglio, 2007)、対照菌株として用いた LG1131^Tには認められなかった。これらのことから *L. helveticus* は *Lactobacillus* 属の中で非常に有用である可能性が示唆された。近年、*Lactobacillus* 属の細胞壁の表層タンパク質の違いにより病原性細菌の腸管接着に対する阻害作用が異なること (Mukai, 2008)、また、細胞壁の厚みの違いによってサイトカインの産生誘導の強さが異なること (Izumo *et al.*, 2013) が報告されており、今回認められた *L. helveticus* と LG1131^Tの効果の違いも、細胞壁をはじめとした菌体構成成分の質や量の違いによるものと思われる。

今回認められた LH2171 の作用のなかでも、IL-6 の産生抑制は非常に意義深いと考えられる。なぜならば、リンパ球からの IL-6 産生は炎症性腸疾患 (IBD) や関節リウマチ (RA) といった炎症性疾患と非常に関連が深く、IBD や RA の患者では健常者に比べて多くの IL-6 が産生されており (Reimund *et al.*, 1996; Hosokawa *et al.*, 1999; Hashizume and Mihara 2011; Oranskiy and Yelisseyeva, 2012)、IL-6 遺伝子を欠損したマウスでは薬剤誘導性の腸疾患 (Suzuki *et al.*, 2001) や RA (Alonzi *et al.*, 1998) に対して抵抗性が認められている。これまでに、いくつかの乳酸菌やプロバイオティクス菌による IL-6 産生抑制や炎症性疾患の緩和が報告されている (Matsumoto *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2008)。例えば、*L. casei* シロタ

株は大腸の粘膜固有層の単核球の IL-6 産生を抑制し、マウスの腸炎を緩和する (Matsumoto *et al.*, 2005)。本研究においては、LH2171 は *in vitro* において MLN、PP、及び SP 由来の免疫細胞からの IL-6 産生を著しく抑制しており、*in vivo* での更なる効果の検証が期待される。

LH2171 は免疫細胞の増殖と IL-6 及び IL-1 β の産生を顕著に抑制した。これらの結果は独立した複数回の試験で再現性を確認している (なお、一回の試験につき、細胞は各水準 3 ウェル (n=3) で培養し、ウェル毎に免疫細胞の増殖、あるいは培養上清中を回収し、サイトカイン濃度を測定した。各ウェルから回収した培養上清中のサイトカインは duplicate で測定した)。一方、TNF- α については複数回の実験を通して一貫した結果が得られていない (データは省略)。すなわち、免疫細胞の増殖抑制は IL-6 と IL-1 β の産生抑制に関与している可能性があるが、TNF- α とは無関係と考えられる。このことは、サイトカイン産生量の減少が必ずしも免疫細胞の増殖抑制 (免疫細胞数の減少) によるものではないことを示している。LH2171 が細胞増殖、及びサイトカイン産生を抑制するシグナル経路は今後の検討課題である。

■ 結論

LH2171 は抗 CD3/CD28 抗体ビーズ、及び LPS 刺激による MLN、PP、SP 由来の免疫細胞の増殖を著しく抑制した。さらに、LH2171 は LPS 刺激により誘導される炎症性サイトカイン産生 (MLN、PP、SP 由来の免疫細胞からの IL-6 産生、SP 由来の免疫細胞からの IL-1 β

産生)を抑制した。また、これらの作用は細胞毒性によるものではなかった。LH2171 がチーズスターター菌としての食経験を有することを踏まえると、LH2171 の細胞増殖、及びサイトカイン産生の抑制による負の影響は少ないものと考えられる。よって、LH2171 は摂取可能な有用な乳酸菌株であることが示唆された。

Table 1. Lactic acid bacteria (LAB) used in the present study

No.	LAB	Strain ¹
1	<i>Lactobacillus helveticus</i>	SBT0064
2	<i>Lactobacillus helveticus</i>	SBT0621
3	<i>Lactobacillus helveticus</i>	JCM1120 ^T
4	<i>Lactobacillus helveticus</i>	SBT2161
5	<i>Lactobacillus helveticus</i>	SBT2171
6	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefiranofaciens</i>	JCM6985 ^T
7	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefirgranum</i>	JCM8572 ^T
8	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefirgranum</i>	SBT11088
9	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	SBT11223
10	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	SBT11295
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SBT1372
12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SBT1921
13	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SBT2062
14	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SBT2068
15	<i>Lactobacillus. gasseri</i>	JCM1131 ^T
16	<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM1025
17	<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM5813
18	<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM8788
19	<i>Lactobacillus buchneri</i>	JCM1115 ^T
20	<i>Lactobacillus. paracasei</i>	NCFB151 ^T
21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCFB1752 ^T
22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	JCM1002 ^T
23	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	JCM1248 ^T
24	<i>Lactobacillus. rhamnosus</i>	JCM1136 ^T
25	<i>Lactobacillus zeae</i>	JCM11302 ^T
26	<i>Lactobacillus crispatus</i>	JCM1185 ^T
27	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	JCM1126 ^T
28	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	JCM2010 ^T
29	<i>Lactobacillus reuteri</i>	JCM1112 ^T
30	<i>Lactobacillus fermentum</i>	JCM1173 ^T
31	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	JCM16167 ^T
32	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	JCM5805 ^T
33	<i>Bifidobacterium longum</i>	SBT2497

34	<i>Bifidobacterium longum</i>	SBT10841
35	<i>Bifidobacterium infantis</i>	SBT10258
36	<i>Bifidobacterium breve</i>	SBT10522
37	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC25527 ^T
38	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	SBT10830
39	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	JCM6124 ^T
40	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	JCM9696 ^T
41	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC19258 ^T

¹ T: Type strain, JCM: Japan Collection of Microorganisms (Saitama, Japan), SBT: Snow Brand Type culture collection (Saitama, Japan), ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, USA), NCFB: National Collection for Food Bacteria (Reading, UK).

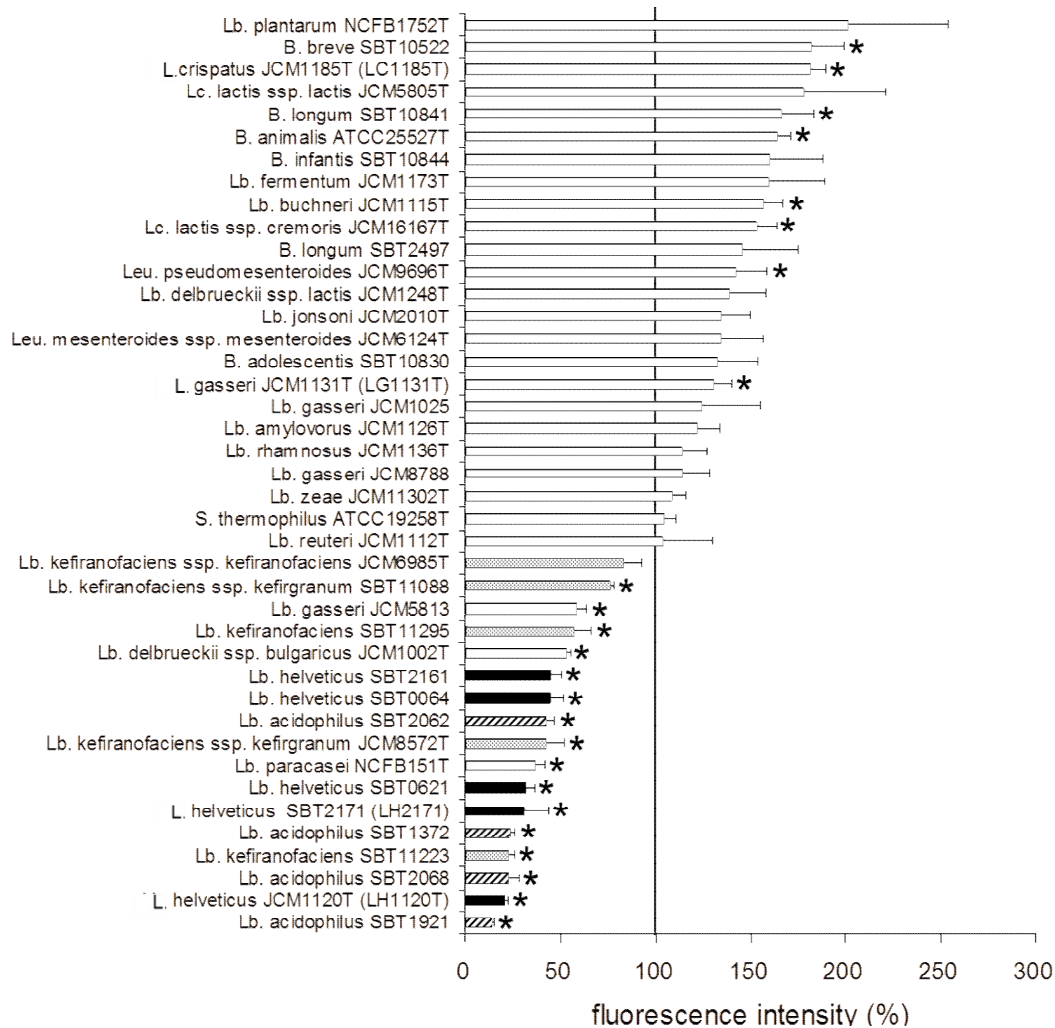


Figure 1-1. Effect of heat-treated lactic acid bacteria (LAB) on the proliferation of mesenteric lymph node cells stimulated with anti-CD3/CD28 antibody beads

Proliferation was represented as fluorescence intensity (%), in which the control value obtained by the anti-CD3/CD28 stimulation alone was set to 100. Data are shown as means $\pm$ SD (n=3).

Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$, one sample t -test) from the control. The top three LAB species in terms of the number of strains that showed a significant suppression are marked as follows: *L. helveticus* (■), *L. acidophilus* (▨) and *L. kefirifaciens* (▤).

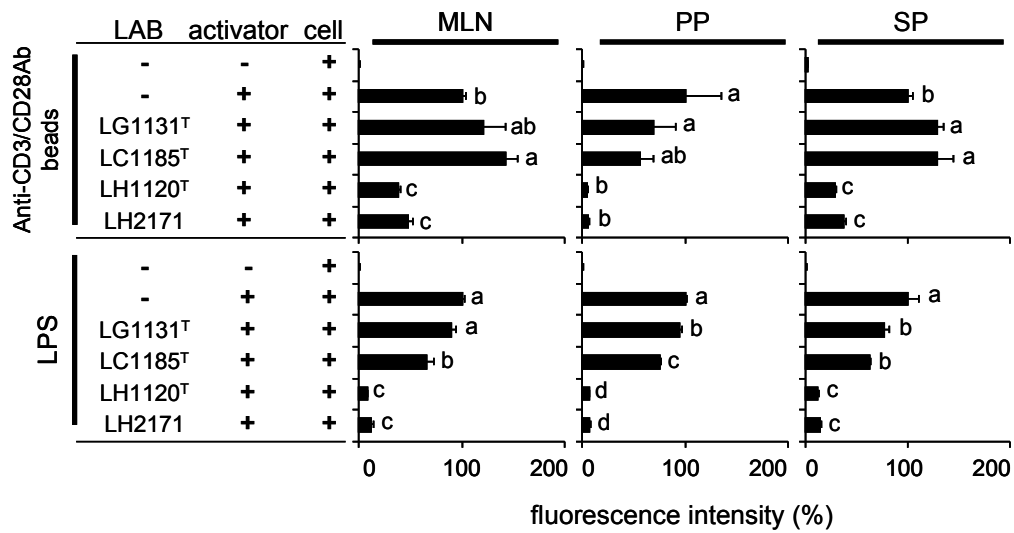


Figure 1-2. Effect of heat-treated lactic acid bacteria (LAB) on the proliferation of mesenteric lymph node (MLN), Peyer's patch (PP) and spleen (SP) cells stimulated with anti-CD3/CD28 antibody beads or lipopolysaccharide (LPS)

Proliferation was represented as fluorescence intensity (%), in which the control value obtained by the anti-CD3/CD28 or LPS stimulation alone was set to 100. Data are shown as means $\pm$ SD (n=3).

Statistical difference between the groups was analyzed by Tukey-Kramer, and significance ($P < 0.05$) was represented as different alphabets. LG1131^T: *L. gasseri* JCM1131^T, LC1185^T: *L. crispatus* JCM1185^T, LH1120^T: *L. helveticus* JCM1120^T, LH2171: *L. helveticus* SBT2171. (^T: Type strain).

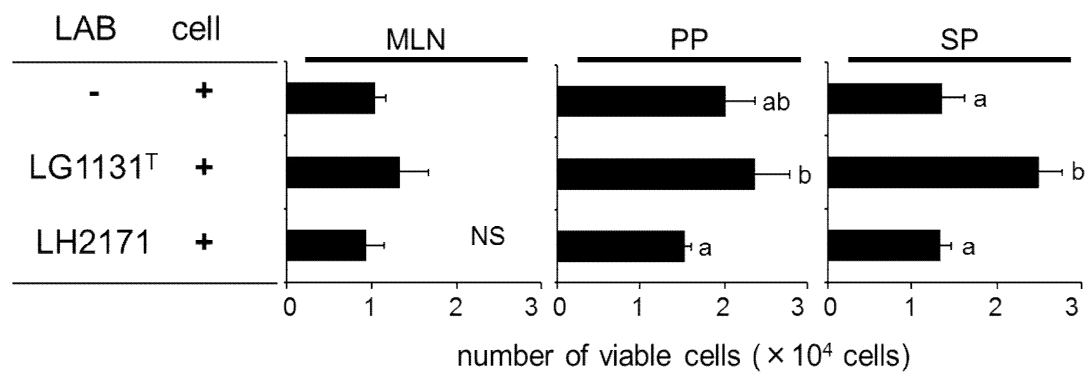


Figure 1-3. Effect of heat-treated lactic acid bacteria (LAB) on the viability of mesenteric

lymph node (MLN), Peyer's patch (PP) and spleen (SP) cells

Viability was determined as the number of viable cells. Data are shown as means $\pm$ SD (n=3).

Statistical difference between the groups was analyzed by Tukey-Kramer, and significance ($P <$

0.05) was represented as different alphabets. LG1131^T: *L. gasseri* JCM1131^T, LH2171: *L. helveticus*

SBT2171.

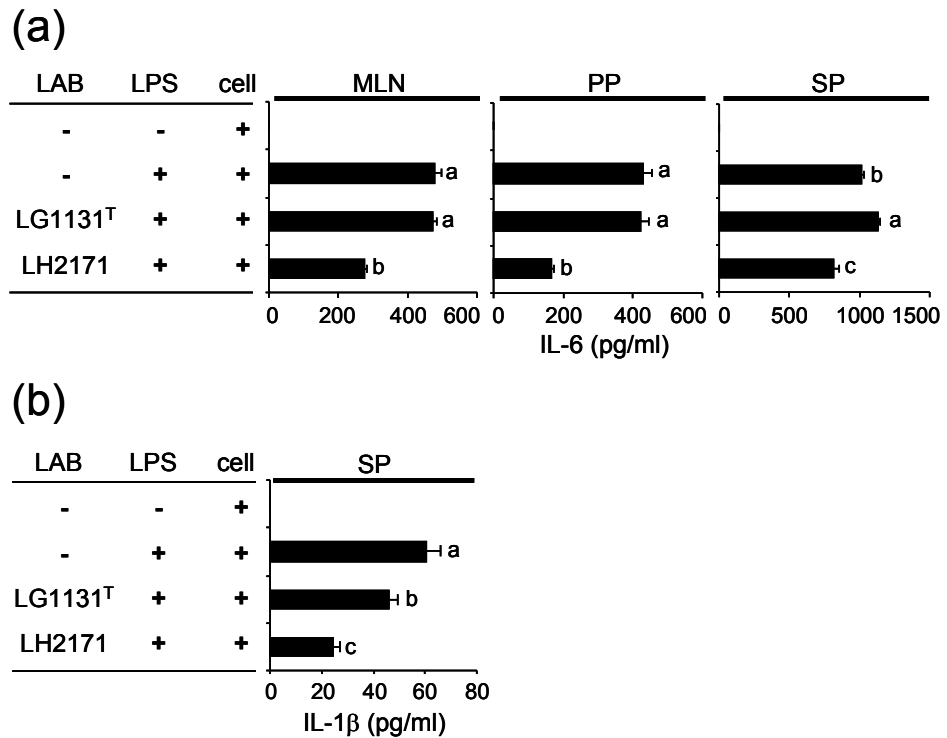


Figure 1-4. Effect of heat-treated lactic acid bacteria (LAB) on the pro-inflammatory cytokines (IL-6 (a), IL-1 β (b)) produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated immune cells of mesenteric lymph node (MLN), Peyer's patch (PP) and spleen (SP)

Data are shown as means $\pm$ SD (n=3). Statistical difference between the groups was analyzed by

Tukey-Kramer, and significance ($P < 0.05$) was represented as different alphabets. LG1131^T: *L.*

gasseri JCM1131^T, LH2171: *L. helveticus* SBT2171.

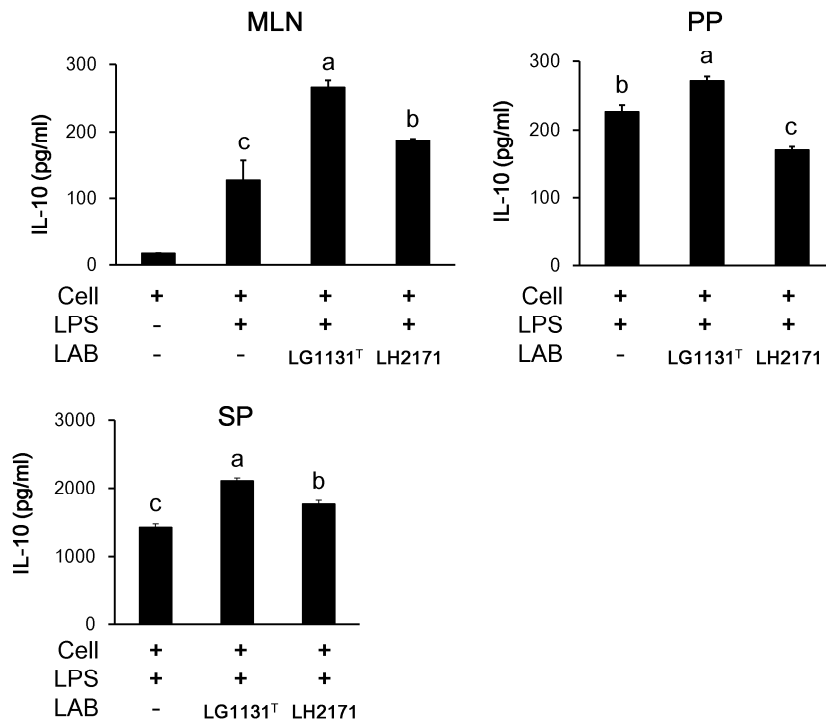


Figure 1-5. Effect of heat-treated lactic acid bacteria (LAB) on the anti-inflammatory cytokines, IL-10, produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated immune cells of mesenteric lymph node (MLN), Peyer's patch (PP) and spleen (SP)

Data are shown as means $\pm$ SD (n=3). Statistical difference between the groups was analyzed by

Tukey-Kramer, and significance ($P < 0.05$) was represented as different alphabets. LG1131^T: *L.*

gasseri JCM1131^T, LH2171: *L. helveticus* SBT2171.

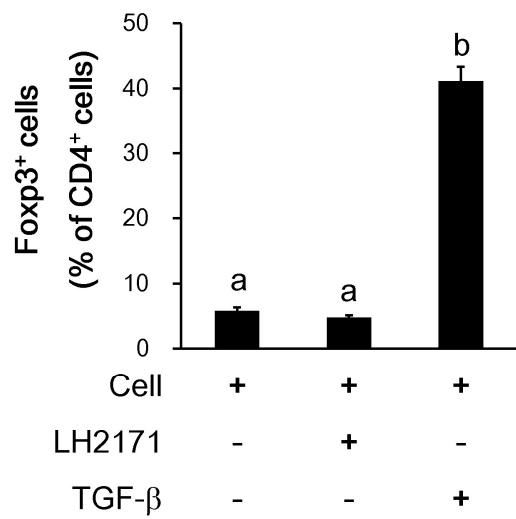


Figure 1-6. Effect of heat-treated LH2171 and TGF-β on the Fxp3⁺ cells induction in immune cells of mesenteric lymph node

TGF-β was used as a “positive control” to induce Fxp3⁺ cells. Data are shown as means ± SD (n=3).

Statistical difference between the groups was analyzed by Tukey-Kramer, and significance ($P <$

0.05) was represented as different alphabets. LH2171: *L. helveticus* SBT2171.

第 2 章

マウスのコラーゲン誘導性関節リウマチモデルに対する

Lactobacillus helveticus SBT2171 の緩和効果

■緒言

第 1 章の研究結果より、LH2171 は *in vitro* において抗 CD3/CD28 抗体ビーズ、及び LPS 刺激による MLN、PP、SP 由来の免疫細胞の増殖を著しく抑制し、さらに、炎症性サイトカイン産生の産生も抑制することが示された (Yamashita *et al.*, 2014)。そこで本章では、*in vitro* で発揮された LH2171 の免疫制御作用が、*in vivo* においても有効であるか、また作用機序はどのようなものであるかを検証した。

これまでの研究では、自己免疫疾患の一つである関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; RA) のモデルマウスを用いて、その発症前に LH2171 を腹腔内に投与することで、発症率、及び臨床スコアが低減することを報告した (Hosoya *et al.*, 2014)。用いた RA モデルはコラーゲン誘導性関節リウマチモデル (Collagen-induced arthritis ; CIA) で、RA の研究で非常によく用いられているモデルである。アジュバントで活性化したコラーゲンをマウスの皮下に投与することで関節の腫れや破壊、歩行障害などの RA 様の症状を呈するようになる (Billiau and Matthys, 2011)。RA や CIA の発症、進行には、血液中や関節内の II 型コラーゲン (type II collagen ; CII) 特異的抗体 (Nandakumar *et al.*, 2003) や炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α (Choy and Panayi, 2001; Koch, 2005) が深く関与することが知られている。

今回の研究では、LH2171 の腹腔内投与ではなく、より食品として応用可能な経口投与の効果の評価するとともに、LH2171 の作用をより詳細に明らかにするため、CIA の発症や悪化に関与する抗体価、炎症性サイトカイン、免疫細胞のポピュレーションについて、経口

投与と腹腔内投与という異なる 2 つの投与経路の効果を比較し、検証することとした。これらの知見は、乳酸菌がどのようなメカニズムで免疫機能に作用するかを明らかにする有効な手がかりになるとともに、免疫疾患に対する予防薬、予防食品としての乳酸菌研究の発展に寄与するものと考えられる。

■実験方法

1. 乳酸菌株

LH2171 は雪印メグミルク株式会社（東京、日本）が提供し、MRS 培地（BD Biosciences、San Jose、CA、United States）を用いて 16 時間 37°C で培養された。培養後、培養液を 8000 ×g で 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。菌体を生理食塩水で 2 回、超純水で 1 回洗浄し、凍結乾燥した。

腹腔内投与のために、凍結乾燥菌体粉末を PBS（－）に 10 mg/ml の濃度で懸濁し、80°C で 30 分間加熱処理を行った。経口投与のために、凍結乾燥菌体粉末（ 2×10^{10} cfu/g）を胃酸中和剤である重曹溶液（0.35 M NaHCO₃/PBS（－））に、100 mg/ml の濃度で懸濁した。

2. 抗体

フローサイトメーター（FACSCanto II flow cytometer）による FACS（Fluorescence-activated cell sorting）解析には、以下に示す蛍光色素標識された抗マウス

抗体を用いた。anti-B220 (RA3-6B2)、anti-CD138 (281-2)、anti-GL7 (GL7)、anti-CD3 (145-2C11)、anti-CD4 (GK1.5)、anti-CD8 (53-6.7)、anti-IL-17A (TC11-18H10.1)、anti-IFN- γ (XMG1.2)、anti-PD-1 (RMP1-30)、anti-CXCR5 (L138D7) (BioLegend、San Diego、CA、United States) ; anti-CD25 (3C7) (BD Biosciences) ; anti-Foxp3 (FJK-16s) (eBioscience、San Diego、CA、United States)。

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) には以下の抗体を用いた。Biotinylated anti-mouse antibodies anti-IgG1 (RMG1-1)、anti-IgG2a (RMG2a-62) (BioLegend)、peroxidase-conjugated anti-mouse IgG polyclonal antibody (Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、United States)。

3. 実験動物

DBA/1J マウス (日本 SLC、静岡、日本) には滅菌水、及び標準飼料 (Labo MR stock ; 日本農産工業株式会社、横浜、日本) を自由摂取させた。動物実験を含めた全ての実験は、北海道大学動物実験実施マニュアルに基づき、国立大学法人北海道大学動物実験委員会で承認された。

4. コラーゲン誘導性関節リウマチモデルの作成、及び LH2171 の投与

コラーゲン誘導性関節リウマチモデル (Collagen-induced arthritis ; CIA) に対する LH2171

の緩和効果の評価には、雄性 DBA/1J マウス（8 週齢）（n=8~12）を用いた。実験スケジュールを Figure 2-1 に示す。CIA を誘導するために (Hosoya *et al.*, 2014; Billiau and Matthys, 2011; Kanayama *et al.*, 2011)、マウスの尾根部の皮下に、100 μ g ウシ II 型コラーゲン (type II collagen (CII) ; Chondrex, Redmond, WA, United States) (0.05M 酢酸溶液 50 μ l に溶けている) を 50 μ l Complete Freund's Adjuvant (CFA ; Chondrex) (加熱殺菌した *Mycobacterium tuberculosis* H37RA を 250 μ g 含む) でエマルジョン化したものを投与し、免疫を行った。初回の免疫から 21 日後に再度 CII と CFA による免疫を行った。CIA マウスは 2 群、すなわち (1) LH2171 を投与する群、(2) ビークル (LH2171 の懸濁に用いた PBS、あるいは 0.35 M NaHCO₃/PBS) のみを投与する群 (対照群) に分けた。

LH2171 の腹腔内投与を評価するための実験では、初回の免疫以降は週 3 回、2 回目の免疫以降は毎日 1 回、1 mg の凍結乾燥加熱菌体を含む PBS 100 μ l をマウスの腹腔内に投与した。対照群には同様の頻度で PBS のみを腹腔内に投与した。LH2171 の経口投与を評価するための実験では、初回の免疫以降、30 mg の凍結乾燥菌体 (1.2×10^{10} cfu/g) を含む NaHCO₃/PBS 溶液 300 μ l を、胃ゾンデを用いてマウスに強制投与した。対照群には同様の頻度で NaHCO₃/PBS 溶液のみを経口投与した。

2 つの実験 (腹腔内投与実験、経口投与実験) とともに、CIA の発症率 (arthritis incidence)、臨床症状 (clinical score)、後肢の肥厚 (hind paw thickness)、体重 (changes in body weight) を 2 回目の免疫以降、21 日間評価した。各々の肢の臨床症状は、Kanayama らの方法 (2011)

に従い、0～4 点で以下のように評価した。0, 正常、1, 1 本の指が僅かに腫れる、あるいは赤みを帯びている、2, 2 本以上の指が中程度に腫れる、あるいは紅斑がある、3, 明らかに肢が腫れている、あるいは紅斑がある、4, 最大限の腫れ、紅斑、関節の変形、あるいは強直がある。各マウスの最大スコアは脚 4 本の合計で 16 点となる。

5. 病理組織学的評価

免疫後 42 日目の CIA マウスから後肢の関節組織を採取した (n=4; 無作為に選抜)。組織を 10%パラホルムアルデヒドで固定し、エチレンジアミン四酢酸 (Sigma-Aldrich、東京、日本) で脱灰処理を行い、パラフィンで包埋した。パラフィン包埋から切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン (H&E; Merck Millipore、Guyancourt、France)、あるいはサフラニン O (WALDECK GmbH & Co Division Chroma、Münster、Germany) により染色を行った。H&E 染色では、パネツス形成の程度を 0～4 点で評価した (0; 正常、1; 軽度の白血球の滑膜への浸潤、2; 中程度の滑膜の異常な過剰増殖、3; 関節内への滑膜浸潤、4; 関節の繊維性強直)。サフラニン O 染色では軟骨破壊の程度を 0～4 点で評価した (0; 正常、1; 軽度の軟骨の侵食、2; 中程度の軟骨の侵食、3; 軟骨下骨の部分的な侵食、4; 軟骨下骨の全面的な侵食)。後肢 2 本のスコアの平均値を各マウスのスコアとした (最大で 4 点となる)。

6. コラーゲン特異的 IgG、及び総 IgG の測定

初回の免疫から 42 日後に CIA マウスから採血し、血清を得た。総Ⅱ型コラーゲン特異的 IgG (CII-IgG)、そのサブクラスである CII-IgG1、CII-IgG2a、及び CII-IgG2b を ELISA 法にて測定した。簡潔に説明すると、イムノプレート (Nunc、Thermo Fisher Scientific、Hudson、NH、United States) に 5 mg/ml の CII 溶液 (Chondrex) を添加し、4°C で一晩静置することで、CII をプレートにコーティングし、0.05% Tween/PBS で各 well を 5 回洗浄後、1%BSA/PBS で各 well をブロッキングした。血清サンプルを添加し、室温で 2 時間反応させ、0.05% Tween/PBS で各 well を 5 回洗浄後、HRP が結合した抗マウス IgG 抗体、ビオチン化抗マウス IgG1 抗体、ビオチン化抗マウス IgG2a 抗体、あるいはビオチン化抗マウス IgG2b 抗体を添加し、室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、ビオチン化抗体を用いたサブクラスの場合は、0.05% Tween/PBS で洗浄を行い、その後、アビジン HRP 溶液 (BioLegend) を添加して室温で 30 分間反応させた。各 well を 0.05% Tween/PBS で 5 回洗浄後、各 well にテトラメチルベンジジン (TMB ; Kirkegaard & Perry Laboratories、Gaithersburg、MD、United States) を添加し反応させ、1N HCl で反応を停止させた後、450 nm (主波長)、及び 630 nm (副波長) の吸光度を測定した。血清サンプル中の総 IgG は、Mouse IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX、United States) を用いてメーカーのプロトコルに従って測定した (Johansen *et al.*, 1999)。

7. サイトカインの測定

初回の免疫から 42 日後の血清中の IL-6、及び TNF- α は、Mouse IL-6 ELISA MAXTM Standard、及び Mouse TNF- α ELISA MAXTM Standard キット (BioLegend) を用いてメーカーのプロトコルに従って測定した (Patole *et al.*, 2005; Stolk *et al.*, 2006)。

8. 細胞染色、及びフローサイトメーター解析

初回の免疫から 42 日後に、マウスの脚の付け根にある鼠径リンパ節を採取し、RPMI 1640 培養培地 (RPMI 1640 培地に、10%非働化済みウシ胎児血清 (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States)、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States)、0.05 mM 2-メルカプトエタノールを添加したもの) 中で破碎した。得られた細胞分散液を 100- μ m セルストレイナー (BD Bioscience) でろ過し、培地で 2 回洗浄した後、培地で再懸濁した。

各種免疫細胞の検出には、以下のマーカーを用いた。B 細胞 (B220⁺)、胚中心 B 細胞 (GL7⁺ B220⁺)、形質細胞 (CD138⁺ B220⁻)、CD4⁺T 細胞 (CD3⁺CD4⁺)、CD8⁺T 細胞 (CD3⁺CD8⁺)、Th1 細胞 (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺)、Th17 細胞 (CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺)、制御性 T 細胞 (Treg; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)、濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺Foxp3⁻)、制御性濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfr) (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺Foxp3⁺)。FACS 解析に用いたこれらのマーカーを Table 2-1 に示した。

Th1、Th17、Treg、及び Tfr 染色の際には、brefeldin A (1 μ g/ml) (GoldiPlug; BD Biosciences、

Heidelberg, Germany) 存在下で、phorbol-12-acetate (50 ng/ml)、イオノマイシン (500 ng/ml) で細胞を刺激した。続いて、BD Cytofix/Cytoperm reagents (BD Biosciences)、あるいは Foxp3 Fix/Perm buffer (BioLegend) を用いてメーカープロトコルに従い、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-17A 抗体、あるいは抗 Foxp3 抗体で細胞を染色した。データは、FACSCanto II flow cytometer を用いて取得し、FACSDiva software (BD Biosciences) を用いて解析した。

9. 遺伝子発現解析

CIA マウスの鼠径リンパ節より、TRIzol reagent (Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてトータル RNA を抽出した。RNA より、ReverTra Ace qPCR kit (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, MA, USA) を用いてメーカーのプロトコルに従ってリアルタイム PCR に供し、各種遺伝子の発現を解析した。実験に用いたプライマーを Table 2-2 に示す。*Gapdh* を内在性コントロール遺伝子とした。

10. 統計解析

臨床症状、後肢の厚さ、体重変化率の統計解析には、二元配置反復測定分散分析を用いた。CIA の発症率には log-rank test、その他の項目には Mann-Whitney *U*-test を用いた。なお、log-rank test の統計解析には、EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉、

日本)を用い、他の解析には StatView version 5.0 (SAS institute、Cary、NC、USA)を用いた。 $P<0.05$ を有意差ありとした。

■結果

<LH2171 投与がコラーゲン誘導性関節リウマチ症状に与える影響>

ビークルとして PBS (ー) のみを投与した対照群に比べて、LH2171 を腹腔内に投与した群では、関節リウマチの発症率 (arthritis incidence ; Figure 2-2A i.p.)、体重減少 (changes in body weight ; Figure 2-2B i.p.) が有意に抑制され、後肢の肥厚 (hind paw thickness ; Figure 2-3A i.p.)、及び臨床スコアの上昇 (clinical score ; Figure 2-3B i.p.) が有意に低減された。加えて、関節の病理組織的解析において、対照群の CIA マウスで見られた肢の炎症 (pannous formation) や関節のダメージ (cartilage degeneration) が、LH2171 を投与した CIA マウスでは認められなかった (Figure 2-3C)。

経口投与試験では、胃酸の影響を軽減する目的で重曹 (NaHCO_3) 溶液に LH2171 を懸濁し、マウスに投与した。対照群には重曹溶液のみを投与した。結果として、対照群に比べて、LH2171 を経口投与した群では、体重減少 (changes in body weight ; Figure 2-2B p.o.)、及び後肢の肥厚 (hind paw thickness ; Figure 2-3A p.o.) といった CIA 症状の悪化が有意に抑制された。一方、CIA の発症率 (arthritis incidence ; Figure 2-2A p.o.)、及び臨床スコア (clinical score ; Figure 2-3B p.o.) は有意には低減されなかった。

<LH2171 投与が血清中Ⅱ型コラーゲン特異的抗体価に与える影響>

初回の免疫から 42 日後の血清を解析したところ、LH2171 を経口投与 (Figure 2-4A)、あるいは腹腔内投与 (Figure 2-4B) したマウスでは対照群のマウスに比べて、有意に CII 特異的 IgG、及び CII 特異的 IgG1 が低下した。一方、CII 特異的 IgG2 に有意差は認められなかった。血清中の総 IgG (CII 特異的な抗体ではない) は、LH2171 の経口投与により減少傾向を示し、腹腔内投与では有意に増加した。

<LH2171 投与が血中の炎症性サイトカインに与える影響>

免疫後 42 日目の血清中の IL-6、及び TNF- α を ELISA 法にて測定したところ、対照群に比べて、LH2171 を腹腔内に投与したマウスでは IL-6 のレベルが有意に低下した (Figure 2-5A)。一方、TNF- α のレベルは両群間で有意差は認められなかった。また、LH2171 の経口投与は、IL-6、及び TNF- α のレベルを低下させなかった (Figure 2-5B)。

<LH2171 投与が病態形成に関与する鼠径リンパ節の免疫細胞数、遺伝子発現に与える影響>

LH2171 を投与した CIA マウスの鼠径リンパ節から免疫細胞を分離し、LH2171 が免疫細胞の数や機能に与える影響を、フローサイトメーター解析によって評価した。結果として、

鼠径リンパ節における総細胞数、B 細胞数、及び CD4⁺T 細胞数は LH2171 の腹腔内投与により、対照群に比べて、有意に低下した (Figure 2-6)。一方、CD8⁺T 細胞の数に有意差は認められなかった。一方、LH2171 の経口投与は、鼠径リンパ節における、これらの免疫細胞の数に影響を与えなかった (Figure 2-7)。

LH2171 を腹腔内投与したマウスの B 細胞について更に解析を進めたところ、胚中心 B 細胞 (Germinal center B cell) の数が対照群に比べて有意に低下し、形質細胞 (Plasma cell) には群間差がないことがわかった (Figure 2-8A)。ヘルパー T 細胞について詳細な解析を行ったところ、有意な差ではないものの、濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) の数が LH2171 投与群で低下傾向を示すことがわかった ($P=0.074$; Figure 2-8B)。関節リウマチの発症に関わる炎症性のサブセットである Th1 細胞、及び Th17 細胞の数は LH2171 投与による影響を受けなかった。また、抗炎症性のサブセットとして知られる、制御性 T 細胞 (T_{reg})、及び制御性濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{fr}) の数も LH2171 投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

加えて、LH2171 を腹腔内投与したマウスの鼠径リンパ節における各種サイトカインの遺伝子発現を解析したところ、LH2171 を摂取したマウスで炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子発現が低下傾向を示し ($P=0.059$; Figure 2-9A)、Th1 サイトカインである INF- γ に対する、Th2 サイトカインである IL-4 の比率 (*Il4*/*Ifng*) が僅かに減少した ($P=0.093$; Figure 2-9B)。

■ 考察

これまでの研究において、LH2171 の腹腔内投与により CIA マウスの関節炎が緩和されることを報告した (Hosoya *et al.*, 2014)。本章では、LH2171 投与による CIA の発症や炎症の抑制についてより詳細に解析するとともに、経口投与の効果についても検証を行った。結果として、LH2171 の経口投与は CIA により生じる関節の腫れや体重減少を抑制すること、さらに、LH2171 の経口投与と腹腔内投与はいくつかの共通のメカニズムを介して CIA 症状を抑制している可能性が示された。

これまでに、いくつかの乳酸菌が RA のマウスモデルに対する緩和効果を有することが報告されている (Kato *et al.*, 1998; Kano *et al.*, 2003; Amdekar *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015)。*L. casei* strain シロタ株は CIA の発症を抑制し、血清中の CII 特異的抗体価を低下させた (Kato *et al.*, 1998)。*L. helveticus* HY7801 は抗原特異的 IgG と炎症反応の低減により、CIA の発症と悪化を抑制した (Kim *et al.*, 2015)。類似の作用は乳酸菌を含む製品でも報告されている。例えば、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 で発酵させた脱脂乳培養物は、CIA の症状と炎症性サイトカインの産生を抑制した (Kano *et al.*, 2003)。しかしながら、このように乳酸菌の効果に関する多数の報告があるにも関わらず、そのメカニズムには不明な点が多い。

RA は慢性的な滑膜炎、及び関節の進行的破壊を伴う多臓器的で複雑な疾患であり、その発症と悪化には様々な種類の細胞が関わっている。RA 患者や CIA モデル動物において、B

細胞除去が有効な治療法の一つであることから、疾患の発症や進行において B 細胞が重要であると考えられる (Svensson *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2006; Yanaba *et al.*, 2007)。また、RA 患者 (Weyand and Goronzy, 2003) や CIA マウス (Endo *et al.*, 2015) では滑膜組織にリンパ濾胞状の組織が認められる。加えて、RA 患者の血清中にはリウマトイド因子やシトルリン化抗体といった自己抗体、CIA マウスの血清中には CII 抗原特異的抗体が多くみられ (Svensson *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2006; Yanaba *et al.*, 2007; Mullazehi *et al.*, 2012)、マウスにおいては CII 特異的抗体の静脈投与により RA 様の症状が生じる (Nandakumar *et al.*, 2003)。これらのことから、RA、及び CIA の病態形成にはリンパ濾胞や胚中心の形成、それに伴う自己抗体の産生が重要であることが示唆される。胚中心は、抹消リンパ組織のリンパ濾胞にある小構造で、B 細胞の増殖、分化、体細胞高頻度突然変異、様々な抗原に対応する抗体のクラススイッチが盛んに起こる部位である (Vinuesa *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2015)。胚中心の形成、維持には、胚中心 B 細胞から形質細胞、あるいはメモリー B 細胞への分化を制御する、リンパ濾胞や胚中心内の濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) が必須である (Vinuesa and Cyster, 2011)。RA を含めた自己免疫疾患の進行には、CD4⁺T 細胞、特に T_{fh} と、B 細胞による自己抗体の産生が深く関与する。T_{fh} がリンパ濾胞と胚中心において B 細胞の増殖、成熟、抗体産生を促進するという報告もある。RA に加えて、これらの細胞は、全身性エリテマトーデスのような、他の自己免疫疾患においても重要な役割を果たす (King *et al.*, 2008; Linterman *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2010)。

本研究では、LH2171 の経口、あるいは腹腔内投与は、CIA の発症率や病状（関節のダメージ、体重減少）の悪化、血清中の CII 特異的抗体価の上昇を抑制した。加えて、本研究で用いた CIA マウスは、尾根部に抗原（CII）を投与するため、脚の付け根にある鼠径リンパ節が所属リンパ節であるが（所属リンパ節：抗原投与部位の下流にあり、同部位からの抗原がリンパ系を経て流入するリンパ節を指し、抗原に対する免疫細胞の増殖や、抗原提示細胞による T 細胞の活性化等が起こる場所（Murphy *et al.*, 2010））、LH2171 の腹腔内投与により、鼠径リンパ節における総 B 細胞、胚中心 B 細胞、CD4⁺T 細胞の数が有意に低下し、濾胞ヘルパー T 細胞（Tfh）数が低下傾向を示した。さらに、CII 特異的 IgG1 が LH2171 の腹腔内投与により有意に低下した。IgG1 は他のサブクラスに比べて、CIA の発症にとって重要であるとの報告があり（Nandakumar *et al.*, 2003; Thorvaldson *et al.*, 2006）、この低下は LH2171 による CIA 症状の抑制に寄与していると考えられる。IgG1 は一般的に Th2 免疫反応を介して産生されることから（Kato *et al.*, 1998）、今回の結果は LH2171 が Th2 細胞の活性化を抑制する作用を有する可能性を示す。Th2 サイトカインである IL-4 の、Th1 サイトカインである INF- γ に対する遺伝子発現比率（*Il4*/*Ifng*）が LH2171 投与により低下傾向を示した結果も、この可能性を支持するものである。ただし、総 IgG は LH2171 の腹腔内投与により有意に増加しており、この増加は、CIA に関与する CII 抗原特異的な免疫反応は LH2171 腹腔内投与で抑制される一方で、乳酸菌という異物を腹腔内に投与したことによる免疫の活性化が一部で生じていることを反映しているのかもしれない。

以上より、LH2171 は B 細胞 (抗体産生を担う胚中心 B 細胞を含む)、及び CD4⁺T 細胞 (抗体産生を促進する Tfh 細胞を含む) の増殖を抑制することで、濾胞形成や抗体産生を阻害し、結果として CIA マウスの関節炎の発症、及び炎症状態を緩和していることが示唆された。

抗 RA 薬には、B 細胞や T 細胞を標的とするものだけでなく、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインを標的とするものも存在する (Choy and Panayi, 2001; Koch, 2005)。IL-6 は T 細胞の活性化、B 細胞の増殖、急性期反応の開始、破骨細胞の分化といった様々な免疫プロセスを促進し、関節破壊に深く関与する。IL-6 レセプターを標的とするヒト化モノクローナル抗体であるトシリズマブは、RA の治療薬として承認されている。トシリズマブの臨床試験は、RA の発症に関わる複数のプロセスにおいて、IL-6 が重要な役割を果たしていることを示している (Fujimoto *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2014)。本研究では、LH2171 の腹腔内投与が CIA マウスの血清中の IL-6 レベルを有意に低下させることを示し、第 1 章の *in vitro* の研究では、LH2171 がマウスの初代培養免疫細胞からの IL-6 を含む炎症性サイトカインの産生を抑制することを示した (Yamashita *et al.*, 2014)。他の研究においても、乳酸菌が *in vitro* や *in vivo* において炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている (Griet *et al.*, 2014; Novotny Núñez *et al.*, 2015)。これらの知見に基づくと、LH2171 による IL-6 レベルの低減は CIA 緩和と非常に密接に関わっていると考えられる。LH2171 は IL-6 の主な産生細胞である、マクロファージや樹状細胞のような免疫細胞や滑膜細胞からの IL-6 産生を下方制御することで CIA の症状を緩和、抑制しているのかもしれない。

また、関節炎の発症に関わる炎症性のサブセットとして、Th1 細胞、及び Th17 細胞、抗炎症性のサブセットとして、制御性 T 細胞 (Treg) (Afzali *et al.*, 2007)、及び制御性濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfr) (Vanderleyden *et al.*, 2014) が広く知られているが、本試験においてこれらの細胞に対する LH2171 の作用は認められず、この点に関しては他の動物モデルを用いるなどして、更に詳細な研究を行う必要があるだろう。

本章の結果から、LH2171 は経口投与においても、CIA に伴う後脚の肥厚や体重減少を顕著に抑制し、CIA 緩和効果を発揮することが明らかとなった。さらに、経口投与は腹腔内投与同様、血液中の CII 特異的抗体価の上昇を抑制し、この抑制は症状緩和のメカニズムの一つと考えられた。しかしながら、腹腔内投与で認められた CIA の発症率、及び臨床スコア上昇の抑制作用、血液中の炎症性サイトカインの低下、免疫細胞への影響は認められず、その緩和効果は、腹腔内投与に比べてやや緩慢であった。

これまでの *in vitro* 試験において、LH2171 はマウスの脾臓から分離した初代培養 T 細胞および B 細胞の LPS 刺激に対する増殖を抑制しており (Hosoya *et al.*, 2014)、このことから LH2171 はこれらの細胞に直接接触できれば、細胞の過剰増殖を抑制できるものと思われる。よって、本章において、2 つの投与経路に効果の強弱が認められた理由の一つとして、経口投与では、LH2171 菌体に含まれる CIA 緩和の活性成分が胃や腸で分解されて活性を失う、あるいは消化管で吸収されにくいことが考えられる。実際、細菌の菌体成分の一つであるオリゴデオキシヌクレオチドは胃液や消化酵素による影響を受け、免疫賦活活性を失うこ

とが報告されている (Wang *et al.*, 2015)。

これらの知見を考え合わせると、LH2171 の経口投与により、LH2171 の活性成分の中の一部が活性を保ったまま体内に吸収され、標的組織であろう、免疫細胞の活性化の場である鼠径リンパ節に到達し、抗原特異的抗体の産生抑制、ひいては CIA 症状の緩和効果をもたらしたものと考えられる。腹腔内投与の場合は、より多くの活性成分が標的組織に到達し、免疫細胞数の制御や炎症性サイトカインの産生抑制までも引き起こし、より高い症状緩和効果が得られたものと推察される。

■ 結論

LH2171 の経口投与は、CIA に伴う炎症症状や体重低下、及び CIA の増悪因子である CII 特異的抗体価の上昇を抑制することが明らかとなった。さらに、腹腔内投与による検討から、LH2171 は CIA の発症および悪化に関与する、炎症性サイトカイン IL-6 の血中上昇、B 細胞や T 細胞のような免疫細胞の過剰増殖を抑制する作用を有することが新たに示された。このことから、LH2171 は RA をはじめとした自己免疫疾患に対して緩和効果を発揮する有用な乳酸菌であることが示唆された。

Table 2-1. Molecular markers used in the FACS analysis

Type of immune cells	molecular markers
B cells	B220+
Germinal center B cells	GL7+ B220+
Plasma cells	CD138+ B220-
CD4+ T cells	CD3+ CD4+
CD8+ T cells	CD3+ CD8+
Th1 cells	CD3+ CD4+ IFN- γ +
Th17 cells	CD3+ CD4+ IL-17A+
Regulatory T (Treg) cells	CD4+ CD25+ Foxp3+
Follicular T (Tfh) cells	CD4+ CXCR5+ PD-1+ Foxp3-
Follicular regulatory T (Tfr) cells	CD4+ CXCR5+ PD-1+ Foxp3+

Table 2-2. Primers used in the gene expression analysis

Gene Symbol	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 5'→3'
<i>Gapdh</i>	AAGGGCTCATGACCACAGTC	GGATGCAGGGATGATGTTCT
<i>Il6</i>	CGTGGAATGAGAAAAGAGTTGTGC	TGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
<i>Tnfa</i>	AGCCCACGTCGTAGCAAACCAC	CGGGGCAGCCTTGTCCCTTG
<i>Ifng</i>	CTGCAGAGCCAGATTATCTC	CCTGTGGGTGTTGACCTCA
<i>Il17a</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	CTTTCCCTCCGCATTGACA
<i>Il4</i>	CGAGCTCACTCTCTGTGGTG	TGAACGAGGTCACAGGAGAA
<i>Il10</i>	GCCCCAGGCAGAGAAGCATGG	GGGGAGAAATCGATGACAGCGCC

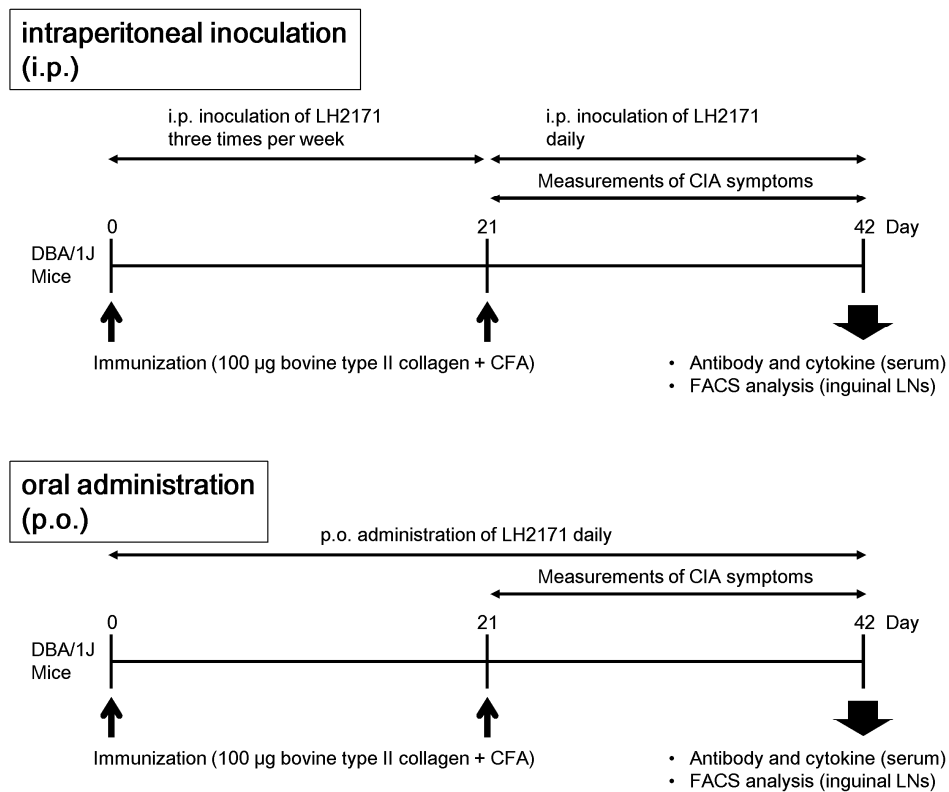


Figure 2-1. Experimental schedule

Male DBA/1J mice (8 weeks old) were immunized by intradermal injection with 100 µg of bovine type II collagen emulsified with Complete Freund's Adjuvant (CFA). For assessment of the intraperitoneal inoculation of *L. helveticus* SBT2171 (LH2171), the mice were injected with 100 µl of PBS containing 1 mg of LH2171 cells intraperitoneally three times per week after the first immunization, and daily after the second immunization. For oral administration of LH2171, 300 µl of an NaHCO₃/PBS solution containing 30 mg of freeze-dried bacterial cells was administered daily after the first immunization.

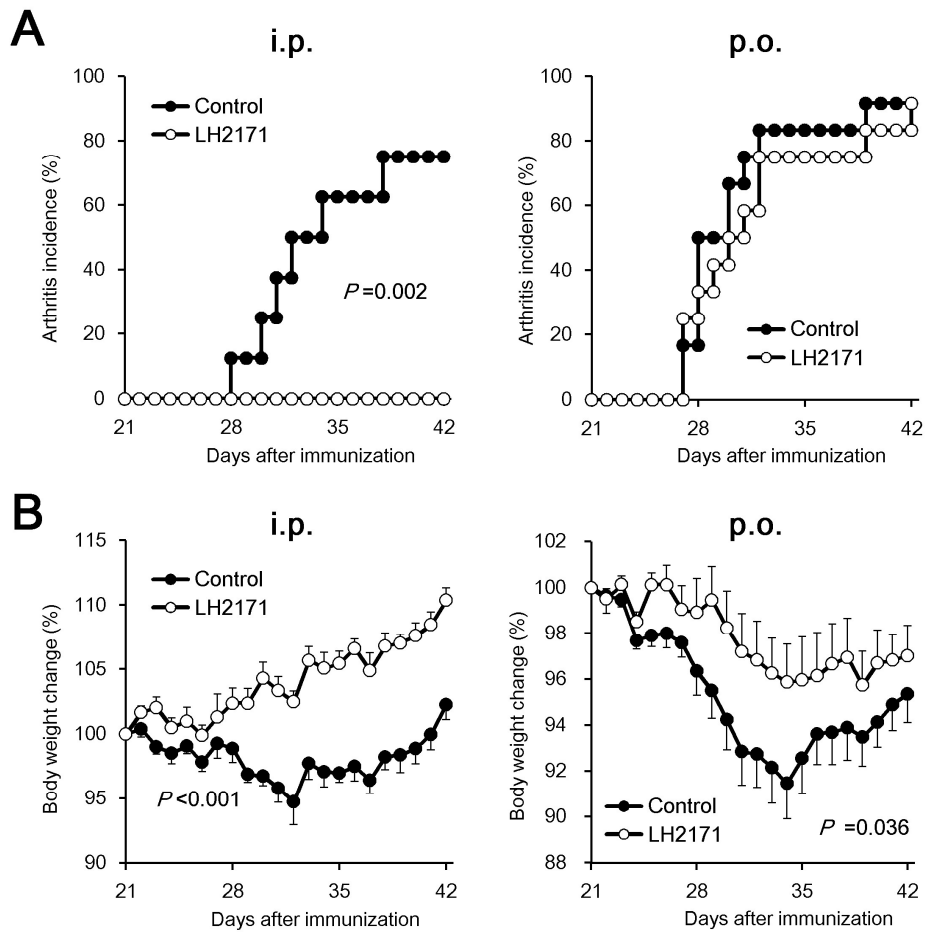
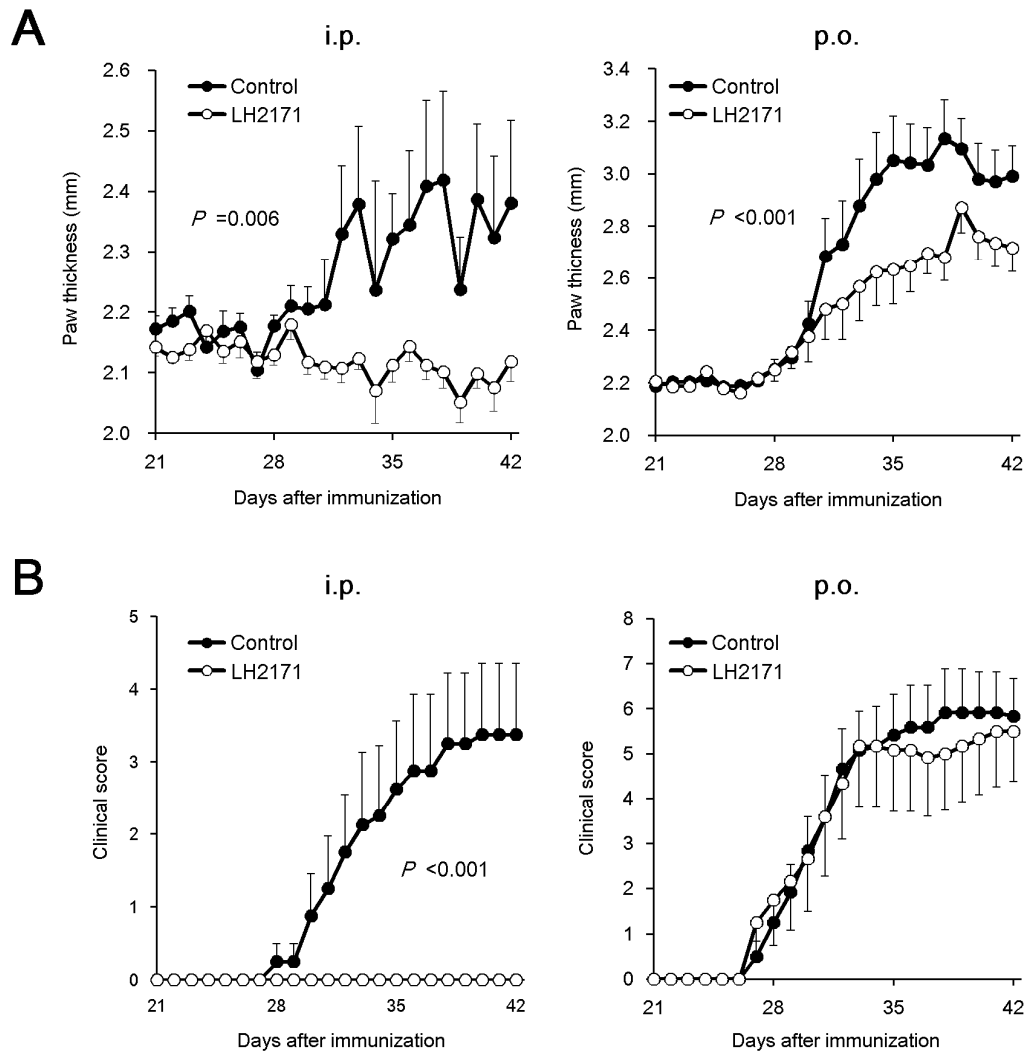


Figure 2-2. Effects of oral administration and intraperitoneal inoculation of LH2171 on arthritis incidence and body weight loss

CIA was induced in DBA/1J mice by immunization with bovine type II collagen twice, on days 0 and 21. Mice were given LH2171 or vehicle control intraperitoneally (i.p.) (left) or orally (per os; p.o.) (right). Arthritis incidence (A) and changes in body weight (B) were monitored after the second immunization. Data are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 8-12$). The data of the group given LH2171 were compared to those of the control group by a log-rank test (A) or two-way repeated-measures analysis of variance (group $\times$ time interaction) (B).



(Figure 2-3A, 2-3B)

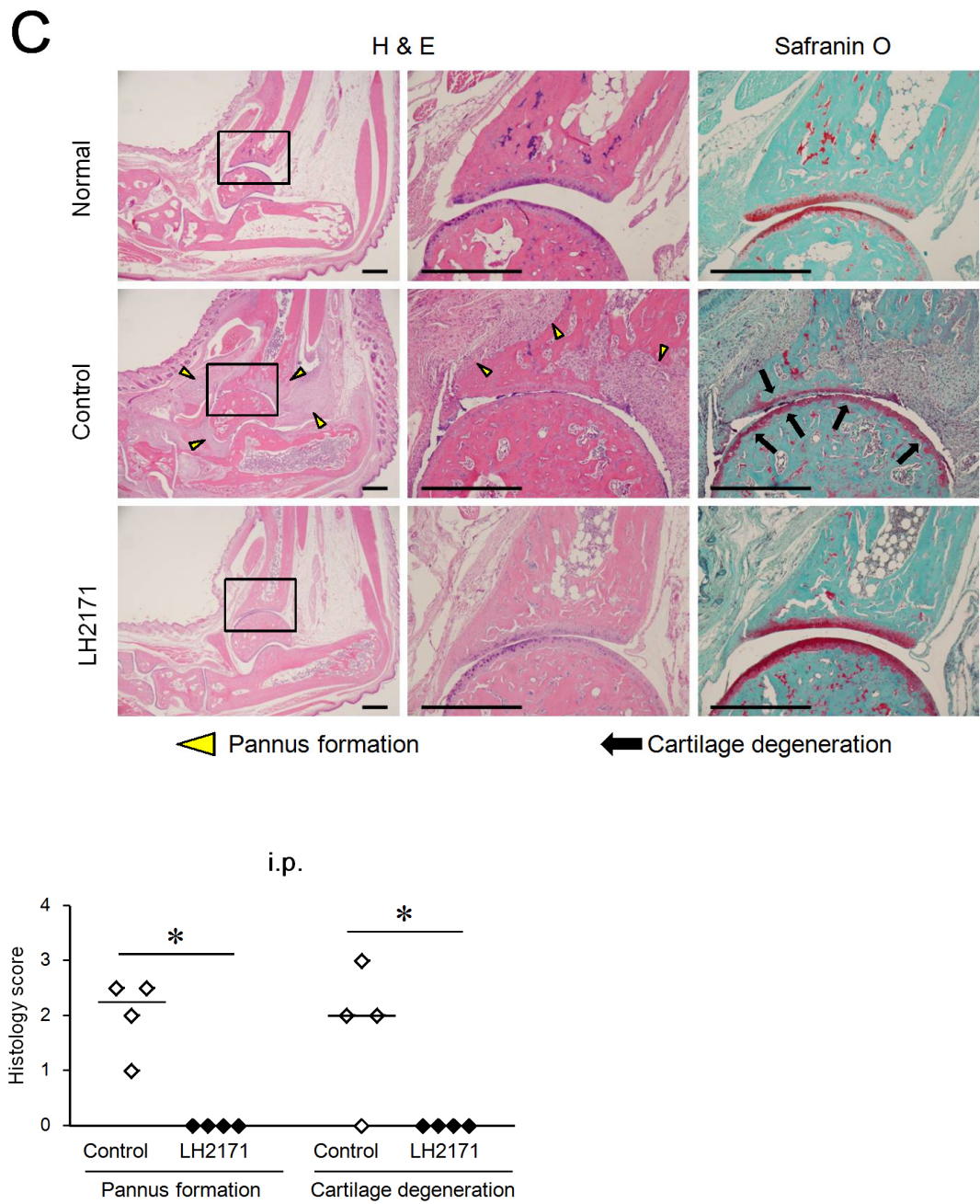


Figure 2-3. Effects of oral administration and intraperitoneal inoculation of LH2171 on arthritic symptoms

Hind paw thickness (A) and clinical score (B) were determined in CIA mice given LH2171 intraperitoneally (i.p.) (left) or orally (p.o.) (right). Data are presented as the mean $\pm$ SEM (n = 8–12).

Histology of the joints (C) of normal and CIA mice receiving vehicle only (control) or intraperitoneal inoculation of LH2171 were determined. Representative H&E and Safranin O images (left) and histology scores (right) are shown. Bars = 500 μ m. Data are presented as dot plots ($n = 4$) and the line represents the median. Data between groups were compared by two-way repeated-measures analysis of variance (group $\times$ time interaction) (A, B) or the Mann-Whitney U test ($*P < 0.05$) (C).

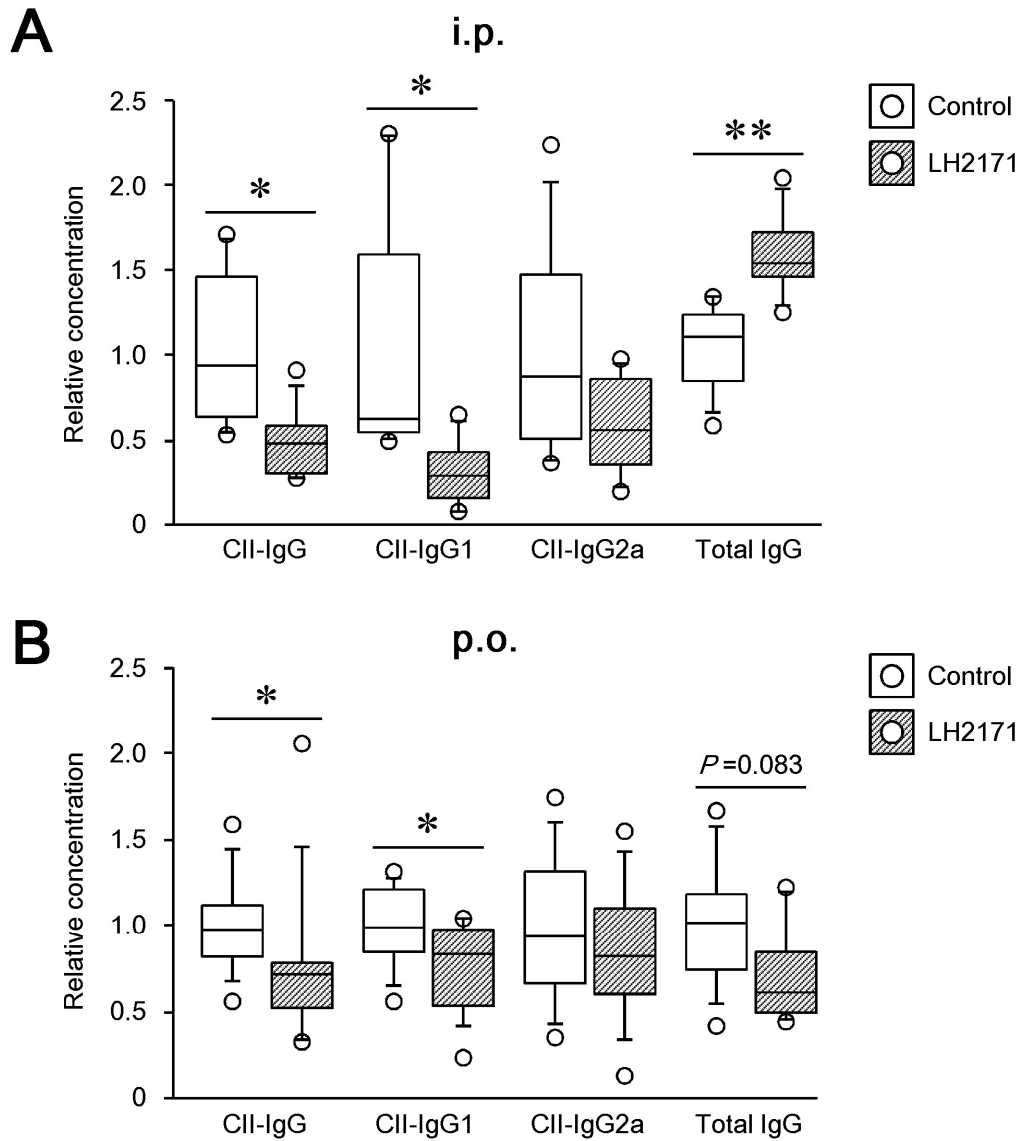


Figure 2- 4. Effects of LH2171 on the serum level of CII-specific IgG and total IgG

The level of antibodies in the serum of CIA mice given LH2171 intraperitoneally (i.p.) (A) or orally (p.o.) (B) was measured at day 42. Data are presented as dot plots (n = 8–12); center line, median; box, 25th–75th percentile of the data; error bars, 10th–90th percentile of the data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to the control by the Mann-Whitney U test.

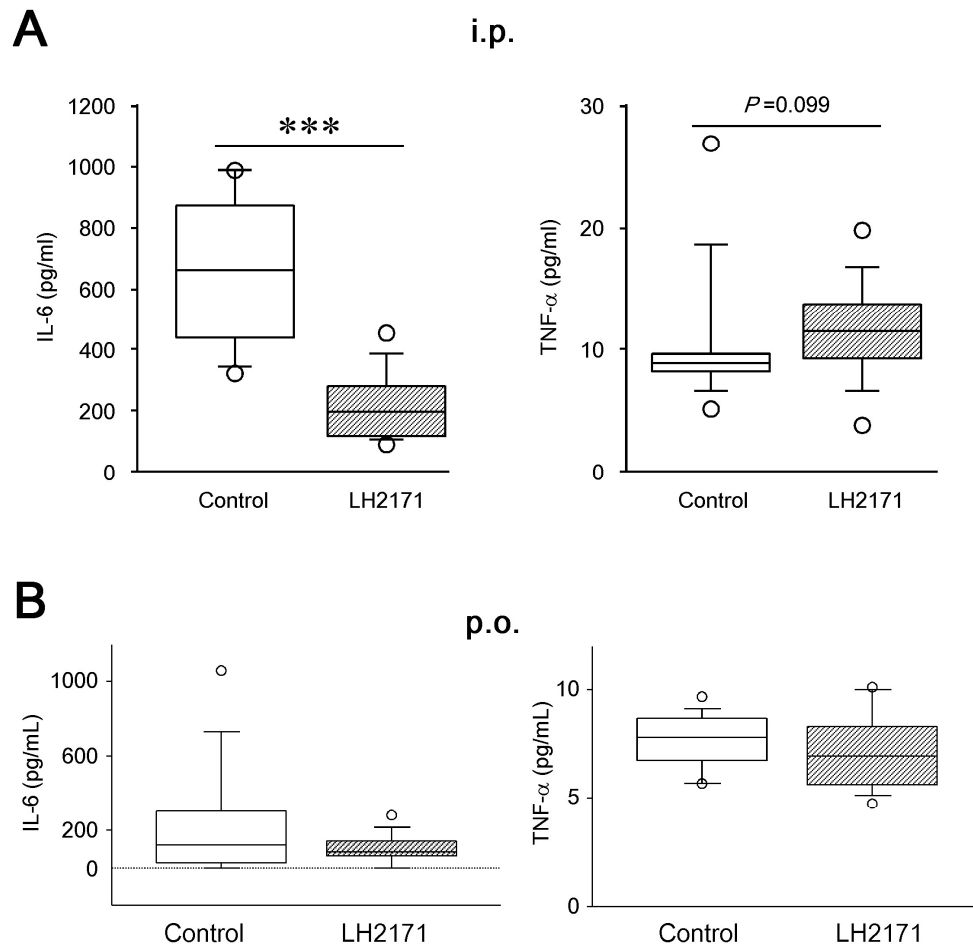


Figure 2-5. Effects of LH2171 on the serum level of IL-6 and TNF- α

The levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the serum of CIA mice given LH2171 or PBS (control) intraperitoneally (i.p.) (A) or orally (p.o.) (B) were measured at day 42 after the first immunization. Data are presented as box plots ($n = 9-12$), as described in the legend to

Fig. 2-4. *** $P < 0.001$, compared to the control group by the Mann-Whitney U test.

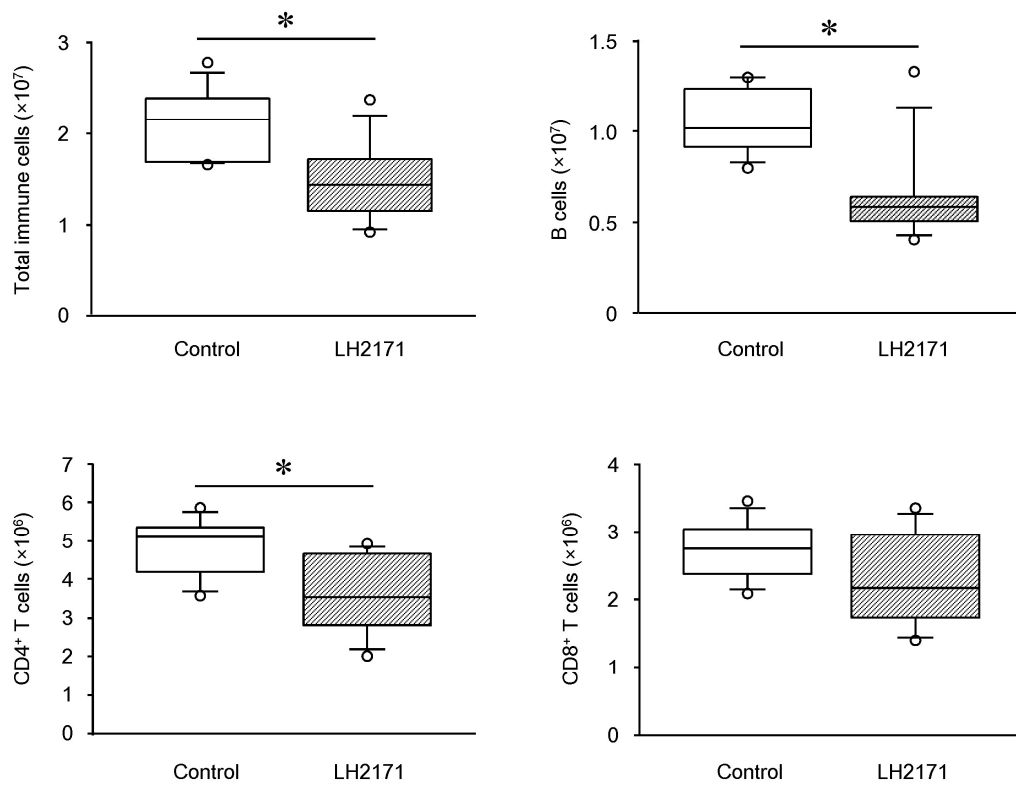


Figure 2-6. Effects of intraperitoneal inoculation of LH2171 on the number of immune cells in the lymph nodes

Inguinal lymph nodes were collected at day 42 from CIA mice given LH2171 or PBS (control) intraperitoneally. Immune cells were isolated from the lymph nodes and the numbers of total immune cells, B cells, CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells were analyzed by flow cytometry. Data are presented as box plots (n = 8), as described in the legend to Fig. 2-4. * $P < 0.05$, compared to the control group by the Mann-Whitney U test.

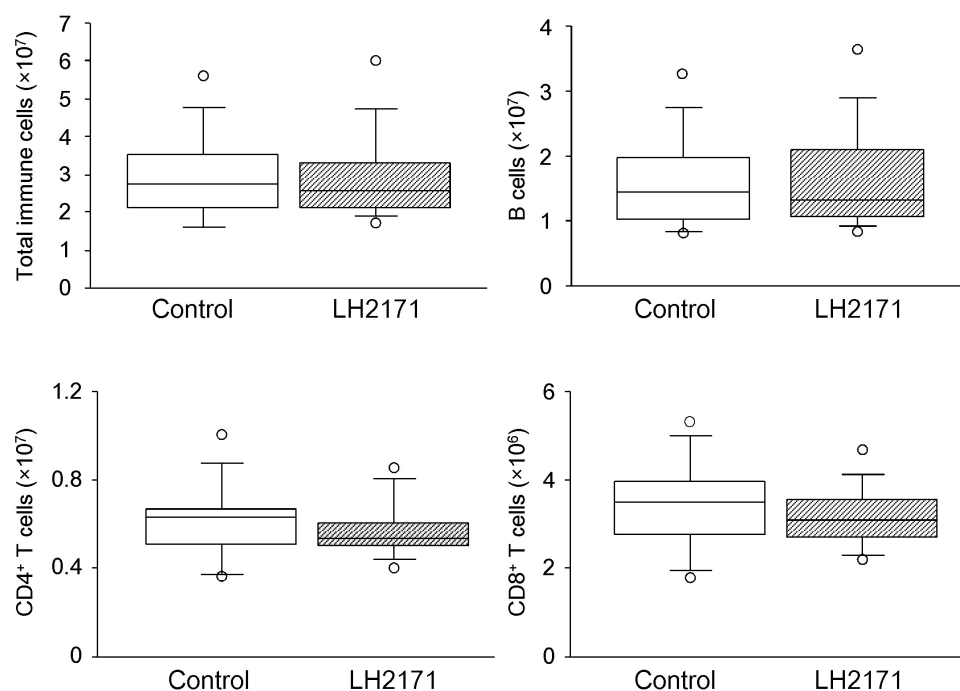


Figure 2-7. The numbers of immune cells in the lymph nodes of the mice orally administered

LH2171

The numbers of total immune cells, B cells, CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells in the inguinal lymph nodes of CIA mice given LH2171 or PBS (control) orally were measured at day 42 after the first immunization. Data are presented as box plots (n = 12), as described in the legend to Fig. 2-4.

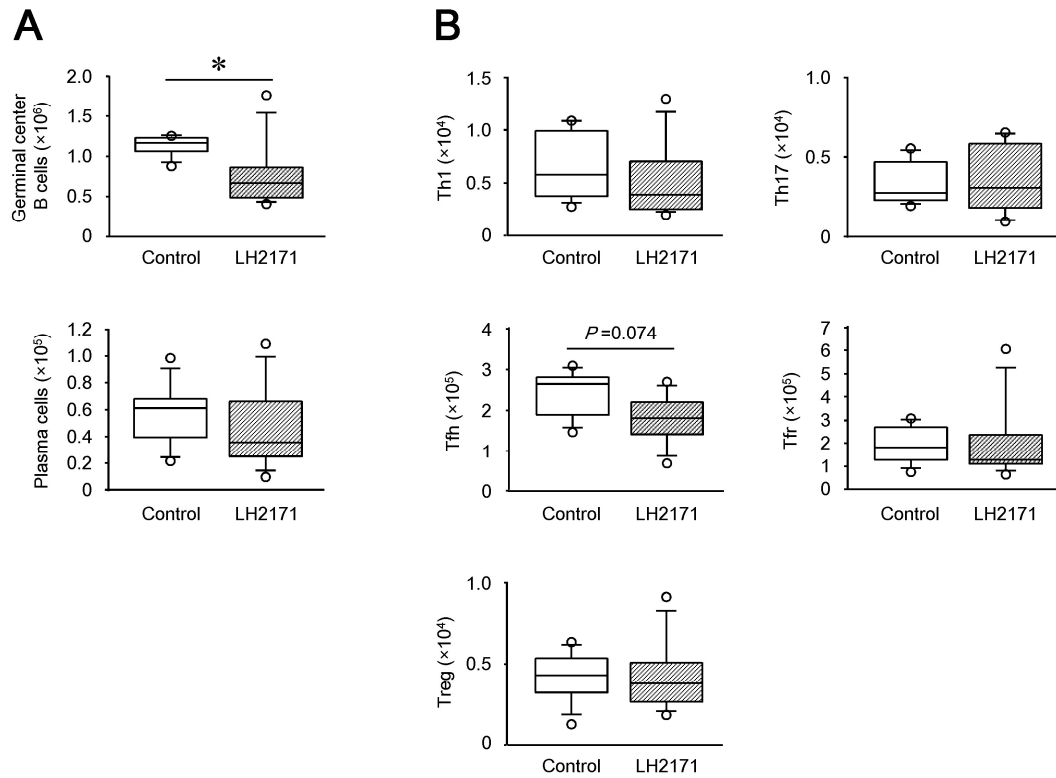


Figure 2-8. Effects of intraperitoneal inoculation of LH2171 on germinal center B cells and follicular helper T cells in the lymph nodes

Inguinal lymph nodes were collected at day 42 from CIA mice given LH2171 or PBS (control) intraperitoneally. Immune cells were isolated from the lymph nodes and the number of germinal center B cells, plasma cells (A), Th1 cells, Th17 cells, follicular T (Tfh) cells, follicular regulatory T (Tfr) cells, and regulatory T (Treg) cells (B) were analyzed by flow cytometry. Data are presented as box plots ($n = 8$), as described in the legend to Fig. 2-4. * $P < 0.05$, compared to the control group by the Mann-Whitney U test.

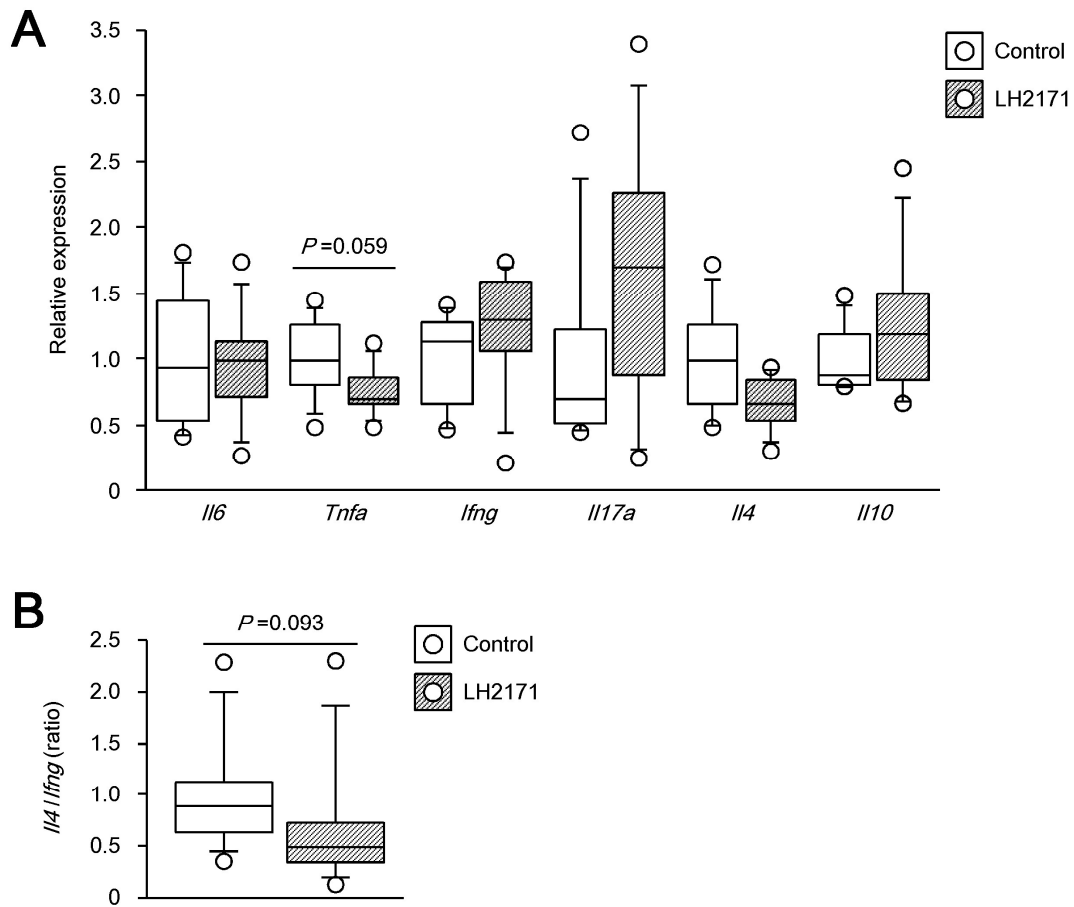


Figure 2-9. Effects of intraperitoneal inoculation of LH2171 on cytokine gene expression levels and the ratio of Th2 and Th1 cytokines in the lymph nodes of CIA mice

The inguinal lymph nodes of CIA mice given LH2171 intraperitoneally or PBS only (control) were collected at day 42. Relative cytokine gene expression levels (A) and the ratio of *Il4* to *Ifng* (B) were determined. Data are shown as box plots ($n = 8$), as described in the legend to Fig. 2-4. The data of the group inoculated with LH2171 were compared to those of the control group using the Mann–Whitney U test.

第 3 章

マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する

Lactobacillus helveticus SBT2171 の緩和効果

■緒言

第2章の研究結果より、LH2171の投与は、CIAに伴う炎症症状を抑制し、さらに血清中のCII特異的抗体価および炎症性サイトカインであるIL-6を低下させ、B細胞やT細胞のようなCIAを悪化させる免疫細胞の過剰増殖を抑制することが明らかとなった（Yamashita *et al.*, 2017）。このことから、LH2171はRAをはじめとした自己免疫疾患に対して予防効果を発揮する有用な乳酸菌であることが示唆された。

そこで、第3章では他の免疫疾患に対してもLH2171は緩和効果を示すのかを検証した。発症機序の異なる2つの免疫疾患モデルを検証することで、LH2171の作用をより深く理解すること、LH2171の応用の幅を知ることが可能となる。

本章では、多発性硬化症モデルを研究対象とした。多発性硬化症（Multiple sclerosis; MS）は、脱髄、炎症性病変、軸索損傷を特徴とする中枢神経系（Central nervous system; CNS）の炎症性脱髄性自己免疫疾患であり、インターフェロン（IFN）- γ 産生性ヘルパーT細胞（Th1細胞）およびインターロイキン（IL）-17産生性ヘルパーT細胞（Th17細胞）の活性化、自然免疫系の免疫細胞（マクロファージ、樹状細胞、好中球、およびミクログリア）の過剰な活性化、およびサイトカインやケモカインの異常な産生等を伴う（Ryu *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Serada *et al.*, 2016）。MSはCNSの病変部位に応じて様々な症状を生じ、患者のQOLを著しく低下させる（Brownlee *et al.*, 2017; Ontaneda *et al.*, 2017）。例えば、視覚喪失に至る視神経障害、歩行不足に至る小脳障害、腹部および胸部のしびれに至る脊髄の障害、

ならびに運動障害や認知機能障害に至る脳病変が MS によって起こりうる (Gensicke *et al.*, 2012; Lee and Han, 2015)。MS の発生率は年々上昇しており、2013 年の全世界の有病者数は 230 万人で、その 5 年前からの増加数は 20 万人と推定されており (Ontaneda *et al.*, 2017)、若年層の神経障害の主要原因となっている (Compston and Coles, 2002)。

MS の主な治療方法はステロイド薬や免疫抑制薬の経口投与であるが、これらの長期間使用により、深刻な感染症やある種の癌の発症などの重大な副作用のリスクを負う可能性がある。さらに、これらの薬は MS の発症後にのみ有効であり、予防薬ではない。したがって、日常的に安全に摂取できる食品やサプリメントで MS を予防することが出来れば、その意義は非常に大きい。

Th1 細胞および Th17 細胞は、MS、および MS の動物モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) の進行に深く関係している (Goverman, 2009)。MS および EAE の病因として、IL-12、IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 、IL-21 および IL-23 等のサイトカインの過剰発現が知られており、これらのサイトカインは Th1 細胞および Th17 細胞の分化を促進する (Bhat and Steinman, 2009; Goverman, 2009; Domingues *et al.*, 2010; Segal, 2010)。特に、Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 は血液脳関門の健全性を破綻させ、体内を循環している免疫細胞の CNS への進入を可能にし、アステロサイトやミクログリアといった神経細胞を刺激して炎症性メディエーターを産生させる (Ransohoff and Brown, 2012)。EAE モデルにおいて、所属リンパ節である鼠径リンパ節で

活性化された Th17 細胞が、他の免疫細胞に先んじて、CNS で増加することも報告されている (Ito *et al.*, 2014)。また、EAE マウスにおいて IL -17A の遺伝子の欠損により、発症が著しく抑制されることは、IL -17A が EAE の病態形成に重要な役割を果たしていることを示している (Ishigame *et al.*, 2009)。

一方、緒言ならびに前章で述べたように、近年、乳酸菌が様々な免疫賦活作用や免疫制御作用を有することが明らかになってきている。免疫制御作用としては、アレルギー (Shida *et al.*, 2002; Ivory *et al.*, 2008) やアトピー性皮膚炎 (Yamamoto *et al.*, 2016) に関する報告、さらに、MS および EAE を含めた自己免疫疾患に対する報告もあるが (Kato *et al.*, 1998; So *et al.*, 2008; Lavasani *et al.*, 2010; Amdekar *et al.*, 2011; Berer *et al.*, 2011)、乳酸菌が緩和効果を発揮する作用メカニズムには不明なところが多い。

本章では、過剰な免疫反応に対する LH2171 の有用性をさらに明らかにするため、EAE モデルに対する緩和効果を評価した。これらの知見は、乳酸菌が免疫機能を制御するメカニズムを解明する手がかりになるとともに、乳酸菌による免疫疾患の治療および予防の発展に貢献するものである。

■実験方法

1. 乳酸菌株

第 2 章の腹腔内投与の場合と同様に調製した。すなわち、雪印メグミルク株式会社（東

京、日本) が提供した LH2171 を、MRS 培地 (BD Biosciences, San Jose, CA, United States) を用いて 16 時間 37°C で培養し、培養液を 8000×g で 10 分間遠心分離して菌体を回収した。菌体を生理食塩水で 2 回、超純水で 1 回洗浄し、凍結乾燥した。凍結乾燥菌体粉末を PBS (一) に 10 mg/ml の濃度で懸濁し、80°C で 30 分間加熱処理を行った。

2. 実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスの作成、及び LH2171 の投与

雌性 SJL/J マウス (5 週齢) を実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) に対する LH2171 の免疫抑制作用の評価に用いた。マウス (日本チャールスリバー、横浜、日本) には滅菌水、及び標準飼料 (Labo MR stock ; 日本農産工業株式会社、横浜、日本) を自由摂取させた。動物実験を含めた全ての実験は、北海道大学動物実験実施マニュアルに基づき、国立大学法人北海道大学動物実験委員会で承認された。EAE モデルの作成においては、中枢神経系に存在するタンパク質由来のペプチドを抗原として、アジュバント (Adjuvant) とともに動物に免疫 (投与) した (Greer *et al.*, 1996; Stromnes and Goverman, 2006; Arima *et al.*, 2012)。結核死菌を含むアジュバント (完全アジュバント) の投与により、免疫細胞が投与部位に集積し、免疫細胞による投与抗原の取り込みと抗原提示がより効率的に行われる。その発症機序としては、抹消で活性化された抗原に反応する T 細胞が中枢神経系に浸潤し、様々なケモカインやサイトカインを産生して、マクロファージやミクログリア細胞を活性化し、脱髄や神経損傷などの組織障害を引き起こすと考

えられている (三宅と山村, 2008)。近年では、IFN- γ などを産生する Th1 細胞に加えて、IL-17 を産生する Th17 細胞がより強い病原性をもつことが報告されている (三宅と山村, 2008)。

なお、EAE 作成で投与する百日咳毒素は、血液脳関門を破壊することで、免疫細胞の中樞神経系への浸潤を促し、EAE の発症を促進する。

本研究においては、マウスの尾根部の皮下に、中枢神経系に存在するプロテオリピッドタンパク質の 139-151 残基に相当する合成ペプチド (PLP₁₃₉₋₁₅₁) (アミノ酸配列：HSLGKWLGHDPDKF) 100 μ g (100 μ l PBS (－) に溶解した) を、100 μ l Complete Freund's Adjuvant (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (加熱殺菌した *Mycobacterium tuberculosis* H37RA を 100 μ g 含む) でエマルジョン化したものを投与して免疫を行い、さらに 400 ng 百日咳毒素 (List Laboratories, Campbell, CA, USA) を、免疫当日とその 2 日後にそれぞれ腹腔内に投与した。EAE マウスを 2 群、すなわち (1) LH2171 を投与する群、(2) ビークルのみを投与する群 (対照群) に分けた。LH2171 投与群には、免疫前の 3 週間は週 3 回、免疫後は毎日 1 回、1 mg の凍結乾燥加熱菌体を含む PBS 100 μ l を腹腔内に投与した。対照群には同様の頻度で PBS (－) のみを腹腔内に投与した。Figure 3-1 に実験スケジュールを示す。

免疫以降、各マウスの EAE の発症の有無、及び臨床症状を評価した。臨床症状は 0～7 点で以下のように評価した。0, 症状なし、1, 尾の麻痺、2, 運動失調、3, 後肢の軽麻痺、4, 後肢の麻痺、5, 四肢麻痺であるが移動可能、6, 瀕死、7, 死亡。

なお、EAE モデルは、第 2 章の CIA モデルと同様に、抗原を尾根部に投与しているため、所属リンパ節は鼠径リンパ節である。

3. 病理組織学的評価

免疫後 42 日目の EAE マウスから脊髄を採取した。組織を 10%パラホルムアルデヒドで固定し、エチレンジアミン四酢酸（Sigma-Aldrich、東京、日本）で脱灰処理を行い、パラフィンで包埋した。パラフィン包埋から切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン（H&E ; Merck Millipore、Guyancourt、France）により染色を行った。

4. 遺伝子発現解析

EAE マウスの鼠径リンパ節より、TRIzol reagent（Life Technologies、Thermo Scientific、Waltham、MA、USA）を用いてトータル RNA を抽出した。RNA より、ReverTra Ace qPCR kit（TOYOBO、大阪、日本）を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit（KAPA BIOSYSTEMS、Boston、MA、USA）を用いてメーカーのプロトコルに従ってリアルタイム PCR に供し、Th17 細胞の分化に関連する各種遺伝子の発現を解析した。実験に用いたプライマーを Table 3 に示す。*Atcb* を内在性コントロール遺伝子とした。

5. 細胞染色、及びフローサイトメーター解析

鼠径リンパ節から単一細胞分散液を調製するために、マウスからリンパ節を採取し、RPMI 1640 培養培地 (Wako) (RPMI 1640 培地に、10%非働化済みウシ胎児血清 (GIBCO、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、United States)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、United States)、0.05 mM 2-メルカプトエタノールを添加したもの) 中で破碎した。得られた細胞分散液を 100-µm セルストレイナー (BD Biosciences, San Jose、CA、USA) でろ過し、培地で 2 回洗浄した後、培地で再懸濁した。

脊髄から単一細胞分散液を調製するために、PBS (－) で心臓灌流を行った後に脊髄を採取し、コラゲナーゼ D (2.5 mg/mL; Roche Diagnostics、Mannheim、Germany) および DNase I (50 µg/mL; Roche Diagnostics) で 37°C で 45 分間反応させた。細胞分散液からミエリンのデブリ (組織片、細胞片) を除くため、100-µm セルストレイナー (BD Bioscience) でろ過した後、Myelin Removal Beads II (Miltenyi-Biotec、Bergisch Gladbach、Germany) を用いてメーカープロトコルに従い、磁気分離を行った。各種免疫細胞を細胞マーカーにより以下のように検出した。CD4⁺T 細胞 (CD3⁺ CD4⁺)、Th1 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ IFN-γ⁺)、Th17 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺)、CCR2⁺Th17 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ CCR2⁺)、CCR4⁺Th17 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ CCR4⁺)、CCR6⁺Th17 細胞 (CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ CCR6⁺)。染色に用いた抗マウス抗体は、anti-CD3 (145-2C11)、anti-CD4 (GK1.5)、anti-IL-17A (TC11-18H10.1)、anti-IFN-γ (XMG1.2)、anti-CCR4 (2G12)、anti-CCR6 (29-2L17) (BioLegend、San Diego、CA、USA)、

anti-CCR2 (475301) (R&D systems) である。Th1、及び Th17 の染色の際には、brefeldin A (1 µg/ml) (GoldiPlug ; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 存在下で、phorbol-12-acetate (50 ng/ml)、イオノマイシン (500 ng/ml) で細胞を 5.5 時間刺激した。続いて、BD Cytofix/Cytoperm reagents (BD Biosciences) を用いてメーカープロトコルに従い、抗 IFN-γ 抗体、あるいは抗 IL-17A 抗体で細胞を染色した。データは FACSCanto II flow cytometer を用いて取得し、FACSDiva software (BD Biosciences) を用いて解析した。

6. 抗原提示細胞株（樹状細胞株、及びマクロファージ細胞株）の培養

マウスの樹状細胞株である DC2.4 細胞を、RPMI 1640 培養培地 (Wako) (RPMI 1640 培地に、10%非働化済みウシ胎児血清 (GIBCO)、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、10 mM HEPES、1 mM sodium pyruvate、100 µM minimal essential medium (MEM) non-essential amino acids (Sigma-Aldrich)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Wako) を添加したもの) で培養した。マウスのマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培養培地 (10%非働化済みウシ胎児血清、100 µM MEM non-essential amino acids (Sigma-Aldrich)、1100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) で培養した。DC2.4 細胞 (5×10^4 cells)、及び RAW264.7 細胞 (5×10^4 cells) を 96 ウェル平底培養プレート (DC2.4 細胞 : BD Biosciences, Cat. # 353072 ; RAW264.7 細胞 : IWAKI, Cat. # 3860-096) に各々播種し、5%CO₂ 濃度、37°C で一晩培養して接着させ

た。培養後、細胞に LH2171 を終濃度 10 µg/ml となるように添加し、4 時間インキュベートした。その後、DC2.4 細胞に対して *E. coli* 055:H5 由来の LPS (Sigma-Aldrich、Cat. # L2880) が終濃度 1 µg/ml となるように、RAW264.7 細胞に対して *E. coli* 0111:B4 由来の LPS (Sigma-Aldrich、Cat. # L4391) が終濃度 10 µg/ml となるように添加し、20 時間培養した。全ての実験は、細胞がウェルを覆う割合が 80-90%の状態 (サブコンフル) で行った。

7. サイトカインの測定

DC2.4 細胞、及び RAW264.7 細胞の培養上清を回収し、測定に用いるまで -80°C で保存した。培養上清中の IL-6 濃度を Mouse IL-6 ELISA MAXTM Standard キット (BioLegend) を用いてメーカーのプロトコルに従って測定した。

8. 統計解析

EAE の発症率には log-rank test を用いた。EAE の臨床症状には二元配置反復測定分散分析 (two-way repeated-measures analysis of variance) を用い、交互作用が認められたため、EAE 症状がピークとなる免疫後 14 日目、及び 32 日目において、post hoc analyses として Bonferroni-corrected Student's *t*-test を行った。LPS 刺激時の DC2.4 細胞および RAW264.7 細胞の IL-6 産生量の評価には、Tukey-Kramer test を用いた。その他の項目には、Student's *t*-test を用いた。なお、log-rank test の統計解析には、EZR (自治医科大学附属さいたま医療センタ

一、埼玉、日本)を用い、他の解析には StatView version 5.0 (SAS institute、Cary、NC、USA)を用いた。Bonferroni-corrected Student's *t*-test では $P < 0.025$ を有意差あり、その他の解析では $P < 0.05$ を有意差ありとした。

■結果

<LH2171 投与が実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスの発症率、及び臨床症状に与える影響>

LH2171 の腹腔内投与は、ビークルである PBS (一) のみを投与した対照群に比べて、EAE の発症率 (EAE incidence ; Figure 3-2a) を有意に抑制した。臨床スコア (clinical score ; Figure 3-2b) については、実験条件 (対照群・LH2171 投与群) × 時間 (days after immunization) の二元配置反復測定分散分析を行ったところ、条件の主効果が $P = 0.0727$ で有意傾向、交互作用が $P < 0.0001$ で有意であった。交互作用が認められたため、対照群の臨床スコアが最大のピークとなる免疫後 14 日目、及び 2 番目に高いピークとなる 32 日目において、下位検定 (Bonferroni-corrected Student's *t*-test) を行ったところ、それぞれのタイムポイントにおいて LH2171 群は対照群に比べて有意に低値となった ($P < 0.025$)。よって、LH2171 投与により EAE 症状の悪化が緩和されることが示された。また、全身の免疫系を司る脾臓 (Spleen) の重量は LH2171 投与群と対照群で有意差はなかった (Figure 3-2c) が、所属リンパ節である鼠径リンパ節 (Inguinal LNs) は LH2171 投与により、その肥大化が有意に抑制された (Figure 3-2d)。加えて、脊髄の病理組織学的評価から (Figure 3-2e)、LH2171 を投与された

マウスでは脊髄への単核細胞の浸潤が対照群に比べて少ないことがわかった。

<LH2171 投与が臨床症状のピーク時における脊髄中の免疫細胞数に与える影響>

続いて、EAE の発症と悪化に重要な役割を果たす Th1 細胞、及び Th17 細胞について、LH2171 を投与した EAE マウスの脊髄中のこれらの細胞のポピュレーションと数を評価した (Figure 3-3)。

LH2171 の投与は、EAE 症状がピークに達する、免疫後 14 日目の脊髄における CD4 陽性 T 細胞に対する Th17 細胞の割合を低下させた (Figure 3-3b)。一方、CD4 陽性 T 細胞に対する Th1 細胞の割合は低下しなかった。細胞数は、Th17 細胞、Th1 細胞ともに LH2171 投与マウスで対照群のマウスに比べて有意に低下した (Figure 3-3c)。

<LH2171 投与が発症前の鼠径リンパ節における Th17 細胞数に与える影響>

LH2171 が Th17 細胞や Th1 細胞の脊髄における数と割合を減少させ、EAE を緩和したメカニズムを明らかにするために、次なる実験として、鼠径リンパ節の免疫細胞を解析した。その結果、EAE 発症前の免疫後 7 日目において、LH2171 投与群で対照群に比べて CD4 陽性 T 細胞に対する Th17 細胞の割合が有意に低下した (Figure 3-4b 右)。一方、Th1 細胞の割合は対照群のマウスと有意差がなかった (Figure 3-4b 左)。加えて、サイトカインの遺伝子発現を解析したところ、CD4 陽性 T 細胞に対する Th17 細胞および Th1 細胞の割合と同様

の傾向を示した。すなわち、LH2171 投与群において *Il17a* の発現は低下したが、*Ifng* の発現は低下しなかった (Figure 3-4c)。これらの結果から、LH2171 は鼠径リンパ節においてナイーブ CD4 陽性細胞から Th17 細胞への分化を抑制している可能性が考えられた。

<LH2171 投与が発症前の鼠径リンパ節における、Th17 分化に関連するサイトカイン、および転写因子の遺伝子発現に与える影響>

LH2171 がどのように鼠径リンパ節の Th17 細胞の数を減少させるのかを明らかにするため、EAE 発症前の鼠径リンパ節において Th17 細胞の分化に関与するサイトカインおよび転写因子の発現レベルを評価した。その結果、Th17 細胞の分化を促進する、*Il6* および *Tgfb1* の遺伝子発現は LH2171 投与により有意に低下し、特に *Il6* の発現低下は顕著であった (Figure 3-5)。一方、Th17 細胞の分化を抑制する *Il10* および *Foxp3* の遺伝子発現は LH2171 投与により増加せず、*Foxp3* の遺伝子発現はむしろ減少した。また、鼠径リンパ節におけるケモカインレセプター (CCR) 2、CCR4、CCR6 の発現 (Figure 3-6a)、および脊髄におけるケモカインリガンド 20 (*Ccl20*) の遺伝子発現 (Figure 3-6b) は、LH2171 投与群と対照群の間に違いは認められなかった。

<LH2171 が抗原提示細胞株の LPS 誘導性 IL-6 産生に与える影響>

EAE マウスで認められた、IL-6 産生に対する LH2171 の抑制作用をより詳細に評価する

ため、LH2171 が主要な IL-6 産生細胞である樹状細胞（DC2.4 細胞株）およびマクロファージ（RAW264.7 細胞株）の IL-6 産生を抑制するか否かを評価した。これらの細胞に LH2171 を添加したのち、LPS で刺激を与え、培養上清中に含まれる IL-6 を測定した。その結果、LH2171 は添加濃度依存的に DC2.4 細胞（Figure 3-7a）、および RAW264.7 細胞（Figure 3-7b）からの IL-6 産生を有意に抑制した。

■考察

これまでに乳酸菌による EAE の緩和効果がいくつか報告されている (Lavasani *et al.*, 2010; Takata *et al.*, 2011)。例えば、*Pediococcus acidilactici*、および 乳酸菌 3 株の混合物 (*L. paracasei* DSM 13434、*L. plantarum* DSM 15312、*L. plantarum* DSM 15313) は、抗炎症性サイトカインとして広く知られる IL-10 の産生を誘導することで、EAE マウスの脊髄における炎症を抑制した (Lavasani *et al.*, 2010)。本章の結果より、LH2171 の投与は EAE の発症率を低下させ、その症状を軽減したが、IL-10 の発現には影響を与えなかった。このことから、LH2171 の緩和効果は上記の乳酸菌とは異なるメカニズムによって発揮されていることが強く示唆される。

本研究において、EAE マウスへの LH2171 投与は、T 細胞、特に Th17 細胞の脊髄への浸潤を有意に抑制した。Th17 細胞は、他の炎症性免疫細胞を活性化することで CNS の脱髄を引き起こすことが知られている。Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17 は血液

脳関門の健全性を破綻させ、体内を循環している免疫細胞の脳・脊髄への進入を可能にし、アステロサイトやミクログリアといった神経細胞を刺激して炎症性メディエーターを産生させる (Ransohoff and Brown, 2012)。ケモカイン受容体である CCR2、CCR4、CCR6、および CCR6 のリガンドの 1 つである CCL20 は、末梢組織からの CNS への Th17 細胞の浸潤において重要な役割を果たす (Kohler *et al.*, 2003; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Reboldi *et al.*, 2009; Arima *et al.*, 2012)。Th17 細胞は CCR2、CCR4、および CCR6 を高度に発現しており、CCL20 のようなリガンド群を発現している CNS 組織に引き寄せられて CNS へと浸潤する (Kohler *et al.*, 2003)。しかしながら、LH2171 投与は EAE 発症前の脊髄中の *Ccl20* の遺伝子発現、および鼠径リンパ節の Th17 細胞における CCR2、CCR4、CCR6 の発現に影響を与えなかった。これらの知見から、LH2171 は Th17 細胞の末梢組織から脊髄への移行を直接的に抑制するのではなく、Th17 細胞の分化を抑制することで末梢組織における Th17 細胞の数を減らし、結果として、間接的に脊髄への Th17 細胞の浸潤を抑制しているものと考えられる。この仮説を支持するように、LH2171 の投与は EAE 発症前の鼠径リンパ節における CD4 陽性 T 細胞に対する Th17 細胞の割合を有意に低下させており、これは LH2171 が末梢組織において Th17 細胞の分化を抑制していることを強く示唆する結果である。一方、CD4 陽性 T 細胞に対する Th1 細胞の割合増加も Th17 細胞と同様に EAE や MS に対する病原性が報告されているが (Goverman, 2009; Domingues *et al.*, 2010)、LH2171 投与はその割合を低下させることはなく、LH2171 は Th1 細胞の分化には影響を与えないものと考えられる。

Th17 細胞の分化には様々なサイトカインや免疫細胞が関与しており、これらは EAE および MS の発症や悪化を引き起こす (Nishikawa *et al.*, 2008; Bhat and Steinman, 2009; Goverman, 2009; Domingues *et al.*, 2010; Segal, 2010)。特に、IL-6 は Th17 分化において重要な役割を果たすことが知られており、ナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化に必須である (Leung *et al.*, 2010)。Th17 細胞の分化は、IL-6、TGF- β (transforming growth factor- β)、IL-23、IL-1 β 、そして、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) によって制御される一連のシグナル伝達経路の活性化によって起こる。IL-6 が IL-6 レセプターに結合することで下流の STAT3 が活性化され、ROR- γ t (RAR-related orphan receptor gamma) (Th17 細胞サブセットのみに発現する主要制御因子) の発現が誘導される (Jetten, 2009; Gaffen *et al.*, 2014; Nalbant and Eskier, 2016)。STAT3 シグナルは Foxp3 による ROR- γ t の発現阻害も抑制する。TGF- β はナイーブ T 細胞の ROR- γ t、及び IL-23R の発現を増加させる。ROR- γ t と STAT3 は IL-17A や IL-17F 等の Th17 サイトカインのプロモーターに結合し、それらの転写を促進する。より後期の段階において、TGF- β および IL-6 によって誘導される IL-23 / IL23R シグナルは、STAT3 シグナルおよび ROR- γ t 発現をさらに増幅させ、Th17 細胞の表現型を安定化させる。さらに、IL-6 は IL-1R の発現を誘導し、IL-1 β / IL-1R シグナルは ROR- γ t 発現を増幅する (Figure 3-8)。

そこで、Th17 細胞の分化を促進するサイトカインである IL-6、TGF- β 、IL-23、IL-1 β 、および Th17 分化を抑制するサイトカイン IL-10 および転写因子 Foxp3 (Zhang *et al.*, 2004) の

遺伝子発現を評価した。結果として、LH2171 は鼠径リンパ節における *Il6* および *Tgfb1* の遺伝子発現を抑制し、*Il23p19* および *Il1b* の発現には影響を与えなかった。*Il6* の発現低下が最も顕著であったことから、さらに LH2171 が IL-6 産生を抑制するか否かを *in vitro* において検証した。IL-6 の主要な産生細胞である樹状細胞株、およびマクロファージ細胞株に LH2171 菌体を添加し、LPS で刺激して IL-6 産生を誘導したところ、LH2171 は濃度依存的にこれらの細胞株からの IL-6 産生を抑制した。第 1 章の *in vitro* の研究において、LH2171 がマウスの初代培養免疫細胞の IL-6 を含めた炎症性サイトカインの産生を抑制することを示した (Yamashita *et al.*, 2014)。また、他の研究においても、乳酸菌が *in vitro* および *in vivo* で IL-6 産生を抑制することが報告されている (Griet *et al.*, 2014; Novotny Núñez *et al.*, 2015)。これらの知見に基づくと、LH2171 は EAE マウスにおいて IL-6 産生を抑制することで Th17 細胞の分化を阻害し、結果として Th17 細胞の脊髄への浸潤、およびそれに伴う他の病原性免疫細胞の浸潤を抑制していると考えられる。

本研究により、LH2171 の腹腔内投与が EAE マウスに対して緩和効果を示すことが明らかとなった。臨床への応用を考えると、近年、腸内細菌叢が EAE モデル (Lavasani *et al.*, 2010; Berer *et al.*, 2011) や MS 患者 (Miyake *et al.*, 2015) の症状に大きな影響を与えることが報告されているため、EAE マウスに対する LH2171 の経口投与の効果、およびその際の腸内細菌叢の変化を今後検証していく必要があるだろう。

■結論

本研究は、LH2171 の腹腔内投与が、脊髄における Th17 細胞をはじめとした病原性免疫細胞の数を減少させることによって、EAE の発生率を低下させ、EAE の症状を軽減することを示した。さらに、*in vivo* および *in vitro* における試験から、LH2171 が IL-6 のような Th17 細胞の分化を誘導するサイカインの発現レベルと産生量を低下させ、このことが EAE に対する LH2171 の緩和効果と密接に関連することを示した。これらの知見から、LH2171 が MS をはじめとする自己免疫疾患の患者に対し、予防、あるいは緩和効果を発揮する可能性が示された。

Table 3. Primers used in the gene expression analysis

Gene Symbol	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 5'→3'
<i>Actb</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Ifng</i>	CTGCAGAGCCAGATTATCTC	CCTGTGGGTTGTTGACCTCA
<i>Il17a</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	CTTTCCCTCCGCATTGACA
<i>Il6</i>	CGTGGAATGAGAAAAGAGTTGTGC	TGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
<i>Tgfb1</i>	CGGCAGTGGCTGAACCAAGGA	GACGTTTGGGGCTGATCCCGTT
<i>Il23p19</i>	GAGCAACTTCACACCTCCCT	TAGAACTCAGGCTGGGCAT
<i>Il1b</i>	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA	TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG
<i>Il10</i>	GCCCCAGGCAGAGAAGCATGG	GGGGAGAAATCGATGACAGCGCC
<i>Foxp3</i>	TTCATGCATCAGCTCTCCAC	CTGGACACCCATTCCAGACT
<i>Ccl20</i>	CAGAAGCAGCAAGCAACTACGA	CTGTCTTGTGAAACCCACTAGC

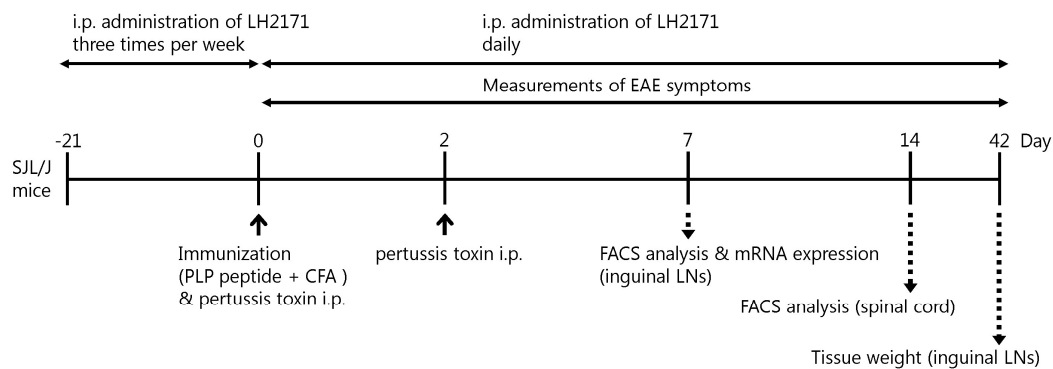


Figure 3-1. Experimental schedule

Female SJL/J mice (5 weeks old) were immunized by intradermal injection with 100 μ g of PLP₁₃₉₋₁₅₁ (HSLGKWLGHDPKF) emulsified with Complete Freund's Adjuvant (CFA), in addition to two intraperitoneal injections of 400 ng of pertussis toxin on days 0 and 2. For assessment of *L.helveticus* SBT2171 (LH2171), the mice were injected with 100 μ L of PBS containing 1 mg of LH2171 intraperitoneally three times a week from 3 weeks before immunization and then daily after the immunization.

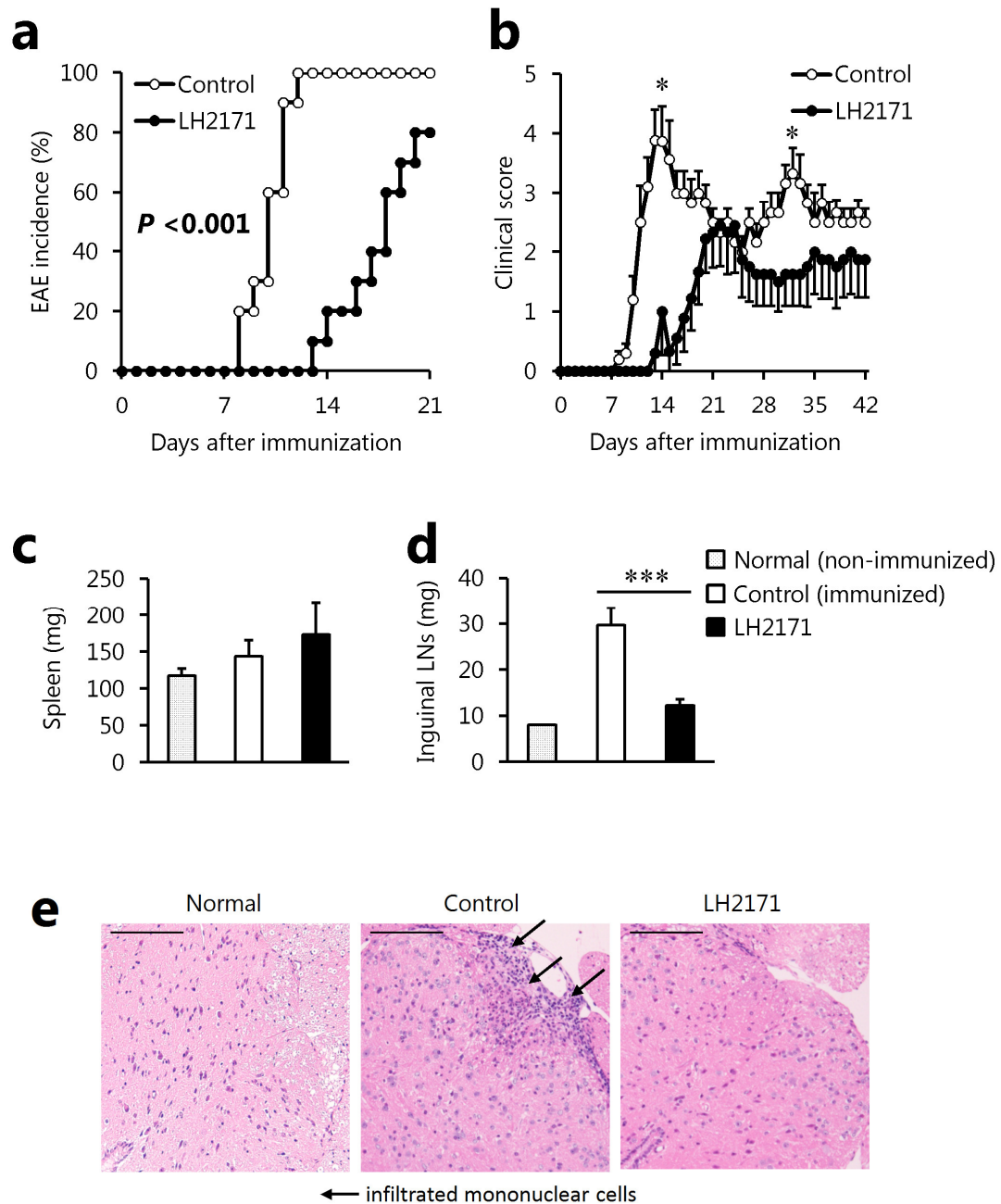


Figure 3-2. Alleviative effects of LH2171 on the incidence and symptoms of EAE in mice

EAE was induced in SJL/J mice by immunisation with a major myelin protein; proteolipid protein.

Mice were intraperitoneally injected with either *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) or PBS

as a vehicle (control). After the immunisation, mice were observed for measurement of EAE

incidence (a) and clinical score (b). On day 42 after immunisation, the spleen, inguinal lymph nodes (LNs), draining lymph nodes in this study, and spinal cord were collected from EAE mice; the weights of the spleen (c) and LNs (d) were measured. Data are shown as means $\pm$ SEM (normal group, n = 3; control group, n = 10; LH2171-administered group, n = 10). The EAE incidence between LH2171-administered mice and control mice was compared with the log-rank test. For the clinical score between groups, two-way repeated-measures analysis of variance (group $\times$ time interaction) was performed. Where a significant difference occurred, Bonferroni-corrected Student's *t*-test post hoc analyses were performed on day 14 (the first peak stage of EAE) and day 32 (the second peak stage of EAE) after immunization ($*P < 0.025$). The tissue weight were compared between groups with Student's *t*-test ($***P < 0.001$). (e) The spinal cord sections obtained from the mice on day 42 after immunisation were analysed by haematoxylin and eosin staining. Scale bar = 100 μ m.

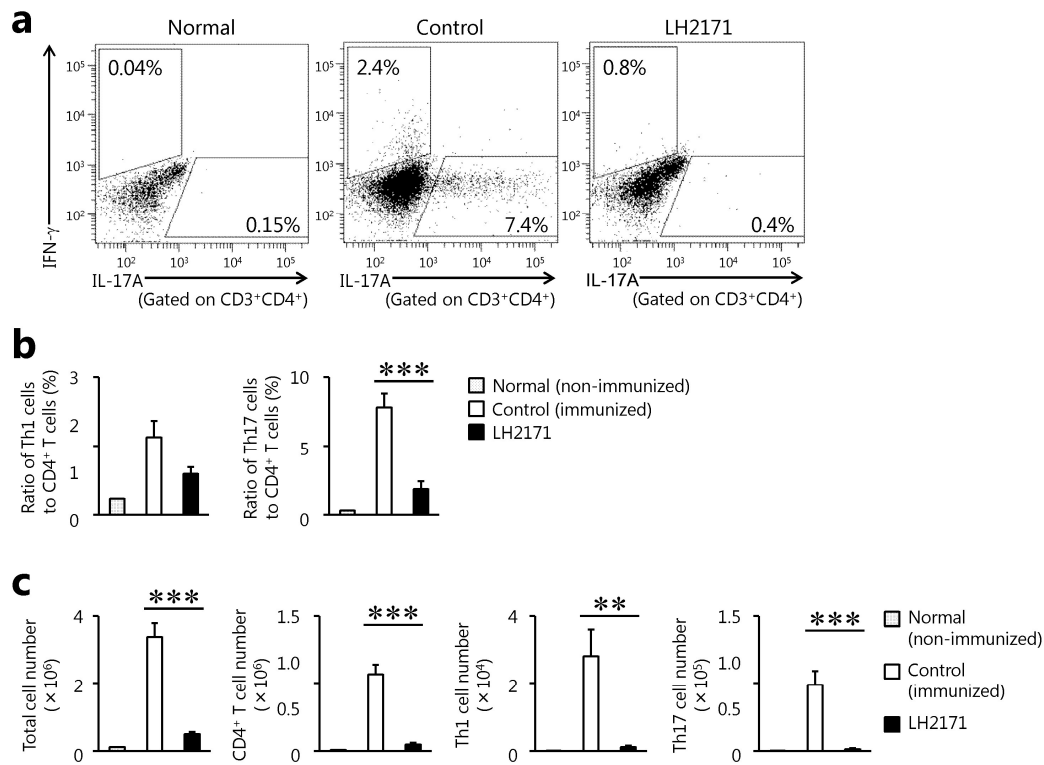


Figure 3-3. Reduction of the population of pathogenic immune cells in the spinal cord by LH2171 administration at the peak stage of EAE

The spinal cord was collected from normal mice and EAE mice treated with or without LH2171 on day 14, at the peak stage of disease activity. Immune cells isolated from the spinal cord were analysed by flow cytometry. CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells were identified as Th1 cells and gated with an upper-left trapezoid and CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ cells were identified as Th17 cells and gated with a lower-right trapezoid (a). The ratio of Th1 and Th17 cells to CD4⁺ T cells (b) or the numbers of total lymphocytes, CD4⁺ T cells, Th1 cells, and Th17 cells (c) were determined. Data are shown as a means $\pm$ SEM (normal group (non-immunized), n = 2; control group (immunized), n = 12;

LH2171-treated group, $n = 11$). LH2171-treated mice were compared with control mice by Student's t -test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

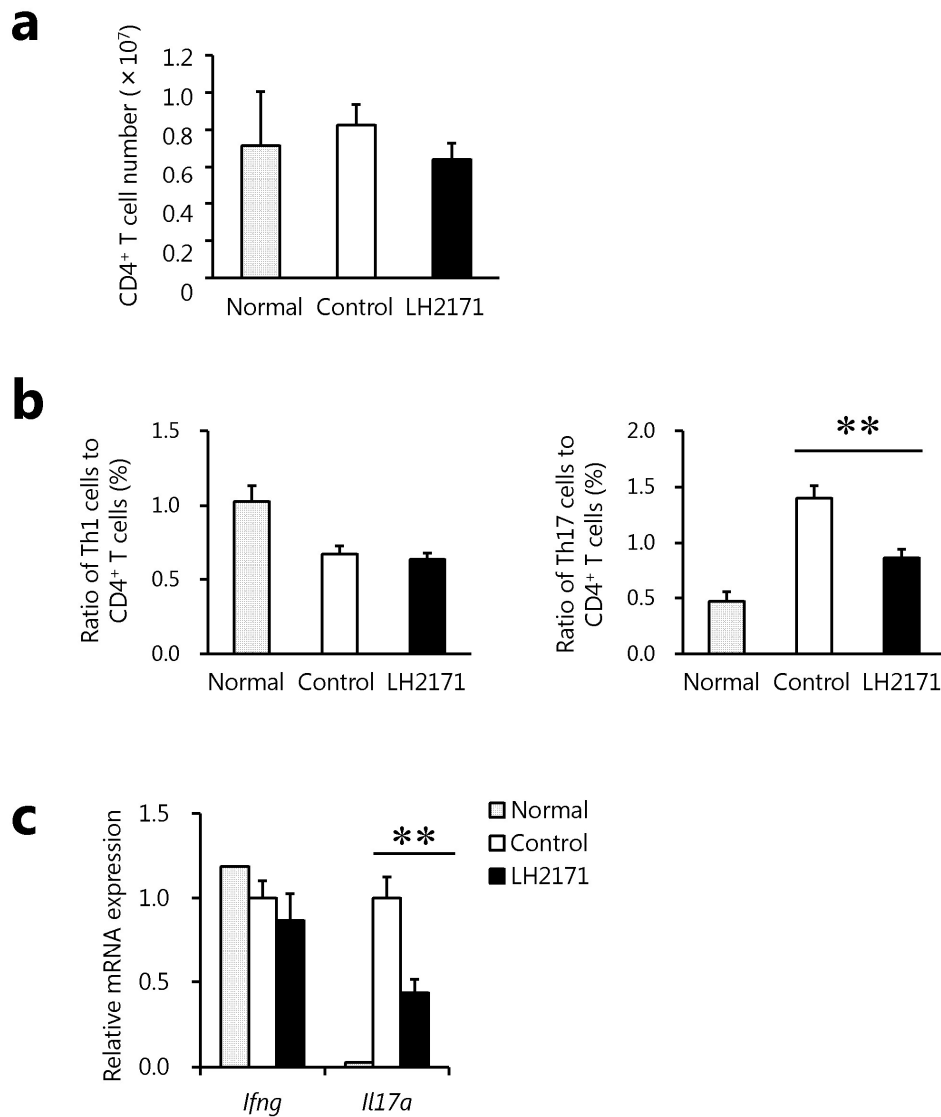


Figure 3-4. Reduction of the Th17 cell population in the inguinal lymph nodes by LH2171 administration before the onset of EAE

The inguinal LNs were collected from normal mice and EAE mice treated with or without LH2171 on day 7, before EAE onset. Immune cells isolated from the LNs were analysed by flow cytometry, and the number of CD4⁺ T cells (a) and the ratio of Th1 or Th17 cells to CD4⁺ T cells (b) were determined. Expression levels of cytokine genes in immune cells from the LNs were determined by

qRT-PCR (c). Data are shown as a means $\pm$ SEM (normal group (non-immunized), n = 2; control group (immunized), n = 12; LH2171-treated group, n = 10). LH2171-treated mice were compared with control mice by Student's *t*-test (** $P < 0.01$).

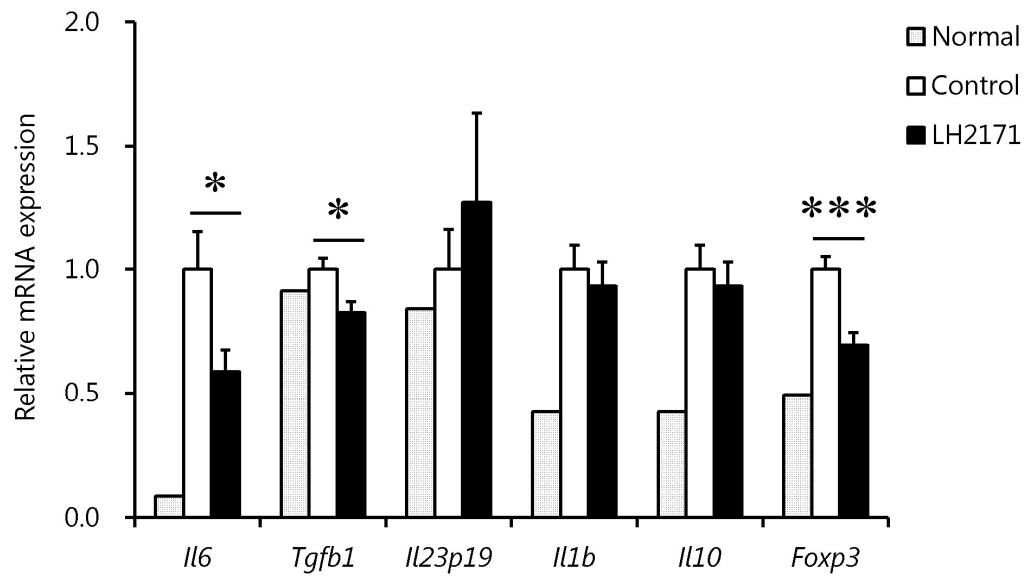


Figure 3-5. Regulation of the expression of cytokines and transcription factors involved in

Th17 differentiation in the inguinal lymph nodes by LH2171 administration before EAE onset

The inguinal LNs were collected from normal mice and EAE mice treated with or without LH2171 on day 7, before EAE onset. Data are shown as means $\pm$ SEM (normal group (non-immunized), n = 2; control group (immunized), n = 12; LH2171-treated group, n = 10). LH2171-treated mice were compared with control mice by Student's *t*-test (* P < 0.05, *** P < 0.001).

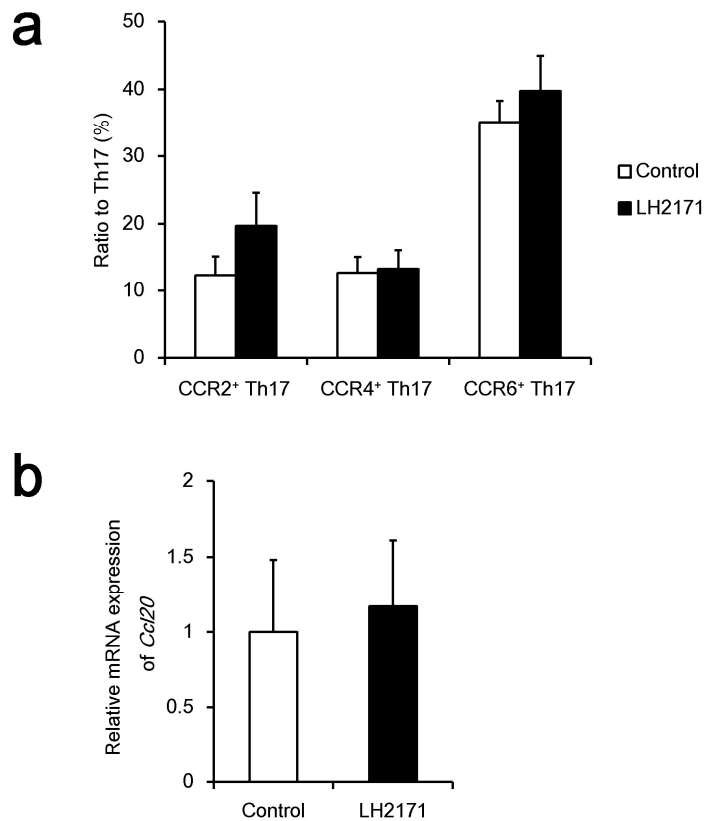


Figure 3-6. The ratio of CCR2⁺ Th17, CCR4⁺ Th17, and CCR6⁺ Th17 cells to Th17 cells population in inguinal lymph nodes, and relative expression of *Ccl20* in the spinal cord of LH2171-administrated EAE mice before the onset

The inguinal LNs and spinal cord were collected from EAE mice treated with or without LH2171 on day 7, before EAE onset. Immune cells isolated from the LNs were analyzed by flow cytometry, and a ratio of CCR2⁺ Th17, CCR4⁺ Th17, and CCR6⁺ Th17 cells to Th17 cells were determined (a). Expression of *Ccl20* genes in immune cells from the spinal cord were determined by qRT-PCR (b).

Data are shown as a means $\pm$ SEM (normal group (non-immunized); n=2, control group

(immunized); n=12, LH2171-administrated group; n=10). LH2171-treated mice were compared with control mice by Student's *t*-test.

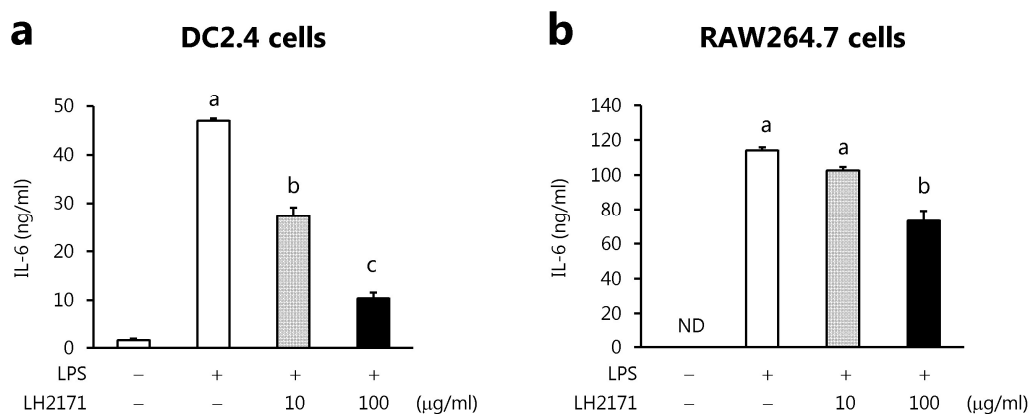


Figure 3-7. Inhibition of IL-6 production from LPS-stimulated DC2.4 and RAW264.7 cells by LH2171

DC2.4 cells (a) or RAW 264.7 cells (b) were incubated with or without LH2171 for 4 h, and then stimulated with LPS for 20 h. The amount of IL-6 produced was measured in the culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. Data are shown as means $\pm$ SEM (n = 3). Statistical differences between the groups were analysed using the Tukey-Kramer test and significant differences ($P < 0.05$) are represented by different letters (a–c).

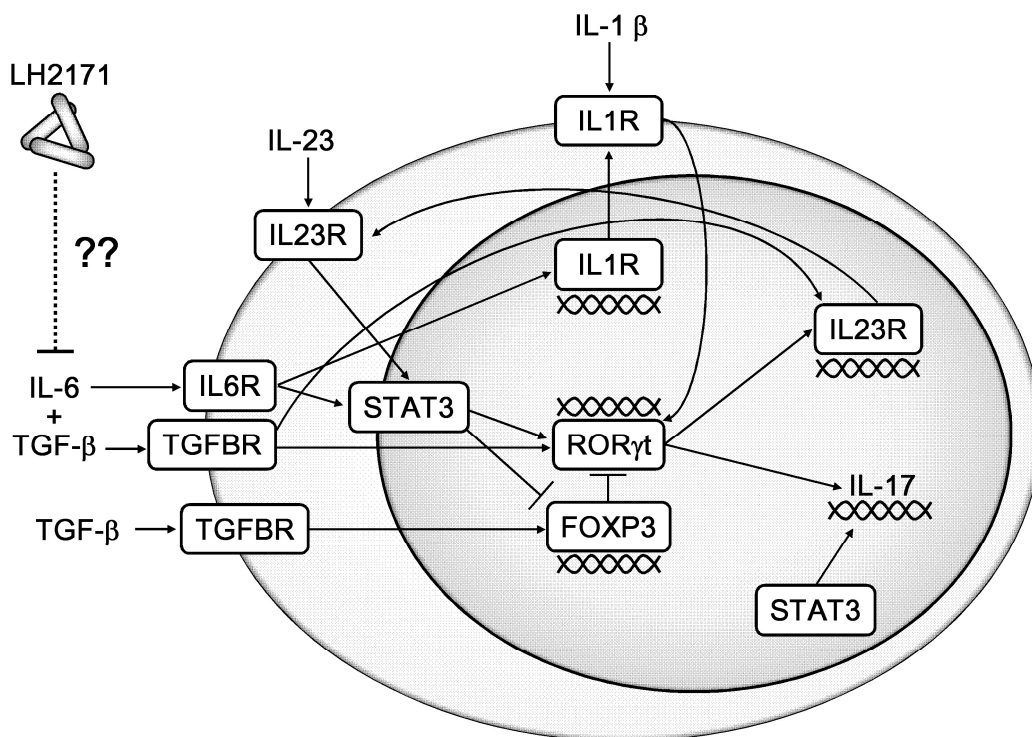


Figure 3-8. Cytokines and transcription factors that promote or inhibit Th17 cell development, and hypothetical mechanism of the suppressive effect of LH2171

結語

本研究では、チーズスターター乳酸菌である *Lactobacillus helveticus* SBT2171 (LH2171) の免疫制御作用に着目し研究を進めた。

これまでに LH2171 をスターターとしたゴーダチーズの摂取により、マウス腸炎モデルの過剰な免疫応答が抑制されることが報告されていたため、第 1 章では LH2171 の菌体自体に免疫制御作用があるか否かを、*in vitro* において他の乳酸菌 40 株とともに検証した。結果として、LH2171 はマウス初代培養免疫細胞の増殖、及び IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの産生を抑制し、LH2171 が他の乳酸菌と比べて、非常に強い免疫制御作用を有することが示された。また、その作用は細胞毒性によるものではなく、LH2171 がチーズスターター乳酸菌としての食経験を有することと合わせて、LH2171 は安全に摂取可能な有用な乳酸菌であると考えられた。

第 2 章では、第 1 章で示された LH2171 の免疫制御作用が *in vivo* においても発揮されるか検証するため、過剰な免疫反応の動物モデルとして関節リウマチ (RA) モデルマウス (CIA マウス) を用いた試験を実施した。これまでに、LH2171 の腹腔内投与により、CIA マウスの発症率及び症状が緩和されることが報告されていたため、本研究では、経口投与による効果の検証、及び緩和メカニズムの解明を主な目的とした。結果として、LH2171 の経口投与は、CIA 発症に伴う体重低下や後肢の肥厚を緩和した。さらに、LH2171 投与により、CIA や RA の増悪因子である血清中の抗原特異的抗体価と炎症性サイトカイン IL-6 の低下、抗体産生やサイトカイン産生を促進する B 細胞や T 細胞といった免疫細胞数のリンパ組織に

おける低下が認められた。これらの結果から、LH2171 は免疫細胞の過剰増殖を抑制することで、炎症疾患の増悪因子である抗体やサイトカインの産生を抑制し、炎症疾患を抑制することがモデル動物において示された。ヒトにおいても、これらの免疫細胞や増悪因子を制御することで、関節リウマチをはじめとした炎症疾患や過剰な免疫応答の緩和効果が期待される。

第 3 章では、新たに、多発性硬化症モデルマウスに対する効果を検証した。多発性硬化症は、脳や脊髄といった中枢神経系において自己のタンパク質に対して過剰な免疫反応が起こり、運動機能、感覚機能、認知機能等に支障をきたす脱髄性脳脊髄炎である。このモデルマウスである EAE マウスに LH2171 を投与したところ、発症率の低下、及び麻痺症状の緩和作用が認められた。その作用メカニズムとして、LH2171 が、病原性免疫細胞である Th17 細胞の分化を誘導する IL-6 等の炎症性サイトカインの発現レベルと産生量を低下させることで、脊髄に浸潤する病原性免疫細胞の数を減少させ、EAE を緩和していることが示唆された。これらの知見から、LH2171 は MS をはじめとする自己免疫疾患の患者に対し、予防効果、あるいは緩和効果を発揮する可能性が示された。

本研究では、LH2171 が *in vivo* において効果を発揮するかを明らかにすることを、まずは第一目的として、免疫学の分野で一般的に広く用いられている、関節リウマチモデル、多発性硬化症モデルを用い、LH2171 が生体においても過剰な免疫応答を抑制することを示した。今後は、より罹患者の多い、アレルギーやアトピー性皮膚炎、あるいは近年、慢性炎

症との関連が報告されている生活習慣病やがんを含む加齢関連疾患についても LH2171 の効果を検証し、LH2171 の摂取がより多くの人々の健康に貢献することを目指して研究を進める必要がある。加えて、LH2171 菌体のうち作用を示すものは何であるか、すなわち、その活性成分を明らかにすることによって、より活性成分を多く含み、効果の高い LH2171 が得られる培養条件や、より効果的な投与方法の確立（例えば、活性成分が酸の影響を受けるならば、カプセル化するなど）、さらに、成分同定による医薬品やサプリメントへの応用についても研究を進めていきたい。

以上のように、本研究において、チーズスターター乳酸菌である LH2171 は、免疫細胞に作用し、免疫細胞の増殖、炎症性サイトカインや抗体の産生を抑制することで、炎症性疾患の動物モデルの症状を緩和する、すなわち、過剰な免疫応答を制御することが明らかとなった。したがって、本研究は、慢性炎症に基づく生活習慣病やがんを含む加齢関連疾患が蔓延する現代において、食を介した人々の健康増進に大きく貢献するものであると考えられる。

引用文献

- Acosta-Rodriguez, EV., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A. *et al.* (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8(6), 1639-646.
- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I. and Lord, G. M. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* 148(1), 32–46.
- Akatsu, H., Iwabuchi, N., Xiao, JZ., Matsuyama, Z., Kurihara, R., Okuda, K. *et al.* (2013). Clinical effects of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 on immune function and intestinal microbiota in elderly patients receiving enteral tube feeding. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 37, 631–40.
- Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G. *et al.* (1998). Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 187(4), 461–68.
- Amdekar, S., Singh, V., Singh, R., Sharma, P., Keshav, P. and Kumar, A. (2011). *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines - *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. *J. Clin. Immunol.* 31(2), 147–54.
- Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, JH., Kawano, F., Yull, FE. *et al.* (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148(3),

447-457.

Asarat, M., Apostolopoulos, V., Vasiljevic, T. and Donkor, O. (2015). Short-chain fatty acids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66(7), 755-65.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S. *et al.* (2000). Blockade of Interleukin 6 Trans Signaling Suppresses T-cell Resistance Against Apoptosis in Chronic Intestinal Inflammation: Evidence in Crohn Disease and Experimental Colitis *in Vivo*. *Nat. Med.* 6(5), 583–88.

Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z.A., Boziki, M., Johner, C. *et al.* (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479(7374), 538-41.

Bhat, R. and Steinman, L. (2009). Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron* 64(1), 123-132.

Billiau, A. and Matthys, P. (2011). Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(5-6), 339–44.

Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F. and Miller, D. H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 389(10076), 1336-46.

Cheng, W. and Chen, G. (2014). Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis.

Mediators Inflamm. 659206.

Choy, E. and Panayi, G. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.

New Engl. J. Med. 344(12), 907–16.

Cohen, S. B., Emery, P., Greenwald, MW., Dougados, M., Furie, RA., Genovese, MC. *et al.* (2006).

Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 54(9), 2793–806.

Compston, A. and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet* 359(9313), 1221-31.

Domingues, H. S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H. and Krishnamoorthy, G. (2010). Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5(11), e15531.

Edwards, J. C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, DR. *et al.* (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350(25), 2572–81.

Endo, T., Ito, K., Morimoto, J., Kanayama, M., Ota, D., Ikesue, M. *et al.* (2015). Syndecan 4 regulation of the development of autoimmune arthritis in mice by modulating B cell migration and germinal center formation. *Arthritis Rheumatol.* 67(9), 2512–22.

- Felis, G. E. and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8(2), 44–61.
- Fitzpatrick, L. R., Small, J., Hoerr, R. A., Bostwick, E. F., Maines, L. and Koltun, W. A. (2008). *In vitro* and *in vivo* effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: Immunomodulation and attenuation of murine colitis. *Br. J. Nutr.* 100(3), 530–41.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen, D. *et al.* (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J. Transplant* 4(10), 1614-27.
- Fujimoto, M., Serada, S. and Naka, T. (2008). Role of IL-6 in the development and pathogenesis of CIA and EAE. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 31(2), 78–84.
- Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. and Cua, D. J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Rev. Immunol.* 14(9), 585-600.
- Gensicke, H., Leppert, D., Yaldizli, Ö., Lindberg, R. L., Mehling, M., Kappos, L. *et al.* (2012). Monoclonal antibodies and recombinant immunoglobulins for the treatment of multiple sclerosis. *CNS Drugs* 26(1), 11-37.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(6), 393-407.
- Greer, J. M., Sobel, R. A., Sette, A., Southwood, S., Lees, M. B. and Kuchroo, V. K. (1996). Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J. Immunol.*

156(1), 371-379.

Griet, M., Zelaya, H., Mateos, M.V., Salva, S., Juarez, G. E., de Valdez, G. F. *et al.* (2014). Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *PLoS One* 9(10), 1–11.

Hashizume, M, and M Mihara. (2011). The Roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2011, 765624.

Hosokawa, T., Kusugami, K., Ina, K., Ando, T., Shinoda, M., Imada, A. *et al.* (1999). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14(10), 987–96.

Hosoya, T., Ogawa, A., Sakai, F. and Kadooka, Y. (2012). A Cheese-containing diet modulates immune responses and alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J. Dairy Sci.* 95(6), 2810–18.

Hosoya, T., Sakai, F., Yamashita, M., Shiozaki, T., Endo, T., Ukibe, K. *et al.* (2014). *Lactobacillus helveticus* SBT2171 inhibits lymphocyte proliferation by regulation of the JNK signaling pathway. *PLoS One* 9(9), 1–9.

Ibrahim, F., Ruvio, S., Granlund, L., Salminen, S., Viitanen, M. and Ouwehand, A. C. (2010). Probiotics and immunosenescence: Cheese as a carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59(1), 53–9.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y. *et al.* (2009).

Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30(1), 108-19.

Ito, K., Morimoto, J., Kihara, A., Matsui, Y., Kurotaki, D., Kanayama, M. *et al.* (2014). Integrin $\alpha 9$ on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111(8), 3080-85.

Ivory, K., Chambers, S. J., Pin, C., Prieto, E., Arqués, J. L. and Nicoletti, C. (2008). Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 38(8), 1282-9.

Izumo, T., Hoshiko, H., Ida, M. and Maekawa, T. (2013). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. *Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*. 7, 151-162.

Jetten, A. M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, e003.

Johansen, F.E., Pekna, M., Norderhaug, IN., Haneberg, B., Hietala, M.A., Krajci, P. *et al.* (1999). Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J. Exp. Med.* 190(7), 915–22.

- Joo, H. M., Kim, K. A., Myoung, K. S., Ahn, Y. T., Lee, J. H., Huh, C. S. *et al.* (2012). *Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting fungal growth and NF- κ B activation. *Int. Immunopharmacol.* 14(1), 39-46.
- Kabak, B. and Dobson, A.D. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(3), 248–60.
- Kanayama, M., Morimoto, J., Matsui, Y., Ikesue, M., Danzaki, K., Kurotaki, D. *et al.* (2011). α 9 β 1 Integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. *J. Immunol.* 187(11), 5851–64.
- Kano, H., Mogami, O. and Uchida, M. (2003). Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Cytotechnology* 40(1-3), 67–73.
- Kanzato, H., Fujiwara, S., Ise, W., Kaminogawa, S., Sato, R. and Hachimura, S. (2008). *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces apoptosis of antigen-stimulated T cells by modulating dendritic cell function. *Immunobiology* 213(5), 399–408.
- Kato, I., Endo-Tanaka, K. and Yokokura, T. (1998). Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Life. Sci.* 63(8), 635–44.
- Kim, J. E., Chae, C. S., Kim, G. C., Hwang, W., Hwang, J., Hwang, S. M. *et al.* (2015).

- Lactobacillus helveticus* suppresses experimental rheumatoid arthritis by reducing inflammatory T cell responses. *J. Funct. Foods* 13, 350–62.
- King, C., Tangye, S. G. and Mackay, C. R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 741–66.
- Koch, A. E. (2005). Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: Future targets? *Arthritis Rheum.* 52(3), 710–21.
- Kohler, R. E., Caon, A. C., Willenborg, D. O., Clark-Lewis, I. and McColl, S. R. (2003). A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system. *J. Immunol.* 170(12), 6298-306.
- Lange, S., Delbro, D. S., Jennische, E. and Mattsby-Baltzer, I. (1996). The Role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. *APMIS* 104(11), 823–33.
- Lavasani, S., Dzhambazov, B., Nouri, M., Fåk, F., Buske, S., Molin, G. *et al.* (2010). A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS One* 5(2), e9009.
- Lee, H., Han, S., Bae E. A., Huh, C. S., Ahn, Y. T., Lee, J. H. *et al.* (2008). Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int. Immunopharmacol.* 8(4), 574–80.
- Lee, J. M. and Han, M. H. (2015). Patient experience and practice trends in multiple sclerosis -

- clinical utility of fingolimod. *Patient Prefer Adherence* 9, 685-93.
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T. and Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol. Immunol.* 7(3), 182-9.
- Linterman, M. A. Rigby, R. J., Wong, R. K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J. L., *et al.* Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. (2009). *J. Exp. Med.* 206(3), 561–76.
- Lollo, P. C. B., Cruz, A. G., Morato, P. N., Moura, C. S., Carvalho-Silva, L. B., Oliveira, C. A. F. *et al.* (2012). Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *J. Dairy Sci.* 95(7), 3549–58.
- 真鍋一郎 (2017). 慢性炎症と加齢関連疾患, 日老医誌 54, 105-13.
- Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N. *et al.* (2005). Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 140(3), 417–26.
- 三宅幸子、山村隆 (2008). 実験的自己免疫性脳脊髄炎, CRJ LETTERS 17(2), 1-8.
- Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T. *et al.* (2015). Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS One.* 10(9), e0137429.

- Miyazaki, T. (2015). Efficacy of probiotics in prevention of influenza. *Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications* 28, 131-47
- Mukai, T. (2008). Role of S-layer proteins in the adhesion of *Lactobacillus* to mucosal surface of intestine. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*. 19(1), 21-9.
- Mullazehi, M., Wick, M. C., Klareskog, L., van Vollenhoven, R., Rönnelid, J. *et al.* (2012). Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14(3), R100.
- Murooka, Y. and Yamshita, M. (2008). Traditional healthful fermented products of Japan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35(8), 791–8.
- Murphy, K.ら (著)、笹月健彦 (監訳) (2010). 免疫生物学 (原書第 7 版)
- Nakashima, Y., Kondo, M., Miyahara, H. and Iwamoto, Y. (2014). Drug delivery options to increase patient adherence and satisfaction in the management of rheumatoid arthritis - Focus on subcutaneous tocilizumab. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 913–9.
- Nakayama, Y., Moriya, T., Sakai, F., Ikeda, N., Shiozaki, T., Hosoya, T., *et al.* (2014). Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective for preventing influenza in mice. *Sci. Rep.* 10(4), 4638.
- Nalbant, A. and Eskier, D. (2016). Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function. *Front. Biosci.* 8, 427-435.

- Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M. and Suzuki, K. (2010). Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on influenza infection, influenza vaccine antibody titer, and cell-mediated immunity in the elderly. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 939–45.
- Nandakumar, K. S., Andrén, M., Martinsson, P., Bajtner, E., Hellström, S., Holmdahl, R. *et al.* (2003). Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *Eur. J. Immunol.* 33(8), 2269–77.
- Nishihira, J., Moriya, T., Sakai, F., Kabuki, T., Kawasaki, Y. and Nishimura, M. (2016). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 stimulates immunoglobulin production and innate immunity after influenza vaccination in healthy adult volunteers. *Functional Foods in Health and Disease* 6(9), 544-68.
- Nishikawa, T., Terabe, F., Ohkawara, T., Takahashi, T., Ripley, B., Kimura, A. *et al.* (2008). IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (26), 9041-46.
- Novotny Núñez, I., Maldonado Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc, A. and Perdígón, G. (2015). *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition* 31(7-8), 1000-7.
- Ohtani, N. (2014). Cellular senescence and chronic inflammation. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 37(5), 390-7.

- Ontaneda, D., Thompson, A. J., Fox, R. J. and Cohen, J. A. (2017). Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet* 389(10076), 1357-66.
- Oranskiy, S. P. and Yelisseyeva, L. N. (2012). Body composition and serum levels of adiponectin, vascular endothelial growth factor, and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Croat. Med. J.* 53(4), 350–6.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. and Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100(6), 1171–85.
- Patole, P. S., Zecher, D., Pawar, R. D., Gröne, H. J., Schlöndorff, D. and Anders, H. J. (2005). G-rich DNA suppresses systemic lupus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(11), 3273–80.
- Peluso, I., Fina, D., Caruso, R., Stolfi, C., Caprioli, F., Fantini, M.C. *et al.* (2007). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect. Immun.* 75(4), 1730–7.
- Philippe, D., Heupel, E., Blum-Sperisen, S. and Riedel, C.U. (2011). Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *Int. J. Food Microbiol.* 149(1), 45–9.
- Ransohoff, R. M., and Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164–1171.
- Rath, H. C., Ikeda, J. S., Linde, H. J., Schölmerich, J., Wilson, K. H. and Sartor, R. B. (1999).

- Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 116(2), 310–9.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S. *et al.* (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10(5), 514-23.
- Reimund, J. M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C. D., Baumann, R., Poindron, P. *et al.* (1996). Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Clin. Immunol.* 16(3), 144–50.
- Ryu, C.H., Park, K.Y., Hou, Y., Jeong, C.H., Kim, S.M. and Jeun, S.S. (2013). Gene therapy of multiple sclerosis using interferon β -secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res. Int.* 696738.
- Sasaki, M., Bosman, B. W. and Tan, P. S. T. (1996). A new, broad-substrate-specificity aminopeptidase from the dairy organism *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Microbiology* 142(4), 799–808.
- Segal, B. M. (2010). Th17 cells in autoimmune demyelinating disease. *Semin. Immunopathol.* 32(1), 71-7.
- Serada, S., Fujimoto, M., Mihara, M., Koike, N., Ohsugi, Y., Nomura, S. *et al.* (2016). Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* modulates

- immunoglobulin levels and cytokines expression in whey proteins sensitised mice. *J. Sci. Food Agric.* 96(9), 3180-7.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T. *et al.* (2002). *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin. Exp. Allergy*. 32(4), 563-70.
- Simpson, N., Gatenby, P. A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. A., Tangye, SG. *et al.* (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62(1), 234–44.
- Smits, H. H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E. C., Schipper, K., van Capel, T. M. *et al.* (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115(6), 1260-7.
- So, J. S., Lee, C. G., Kwon, H. K., Yi, H. J., Chae, C. S., Park, J. A. *et al.* (2008). *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Mol. Immunol.* 46(1), 172–80.
- Stolk, M., Leon-Ponte, M., Merrill, M., Ahern, G. P. and O'Connell, P. J. (2006). IP3Rs are sufficient for dendritic cell Ca²⁺ signaling in the absence of RyR1. *J. Leukoc. Biol.* 80(3), 651–8.
- Stromnes, I.M. and Goverman, J.M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* 1(4), 1810-9.

- Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T. *et al.* (2001). CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 193(4), 471–81.
- Suzuki, K. (2000). Nomenclature of bacteria based on the bacteriological code and the implications in the taxonomy of lactic acid bacteria. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria.* 11(2), 221-9
- Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R. and Jansson, L. (1998). B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* 111(3), 521–6.
- Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T., Honorat, J. A. *et al.* (2011). The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PLoS One* 6(11), e27644.
- Tan, P., Sasaki, M., Bosman, B.W. and Iwasaki, T. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(9), 3430–5.
- Thakur, B. K., Saha, P., Banik, G., Saha, D. R., Grover, S., Batish, V. K. *et al.* (2016). Live and heat-killed probiotic *Lactobacillus casei* Lbs2 protects from experimental colitis through Toll-like receptor 2-dependent induction of T-regulatory response. *Int. Immunopharmacol.* 36, 39-50.
- Thorvaldson, L., Fuchs, D., Magnusson, S. and Kleinau, S. (2006). IgG immune complex-binding in macrophages from arthritis-susceptible and arthritis-resistant mice following collagen type II

- immunization. *Scand. J. Immunol.* 63(5), 347–54.
- Vanderleyden, I., Linterman, M. A. and Smith, K. (2014). Regulatory T cells and control of the germinal centre response. *Arthritis Res. Ther.* 16(5), 471.
- Verstappen, S. M. (2013). Outcomes of early rheumatoid arthritis--the WHO ICF framework. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 27(4), 555-70.
- Vinuesa, C. G., Sanz, I. and Cook, M. C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(12), 845–57.
- Vinuesa, C. G. and Cyster, J. G. (2011). How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* 35(5), 671–80.
- Wagar, L.E., Champagne, C.P., Buckley, N.D., Raymond, Y. and Green-Johnson, J.M. (2009). Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74(8), M423-30
- Wang, Y., Yamamoto, Y., Shigemori, S., Watanabe, T., Oshiro, K., Wang, X. *et al.* (2015). Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol. Ther.* 23(2), 297–309.
- Wang, Y., Liu, L., Moore, D.J., Shen, X., Peek, R.M., Acra, S.A., *et al.* (2017). An LGG-derived protein promotes IgA production through upregulation of APRIL expression in intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 10(2), 373-84.

- Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (2003). Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 140–9.
- Yamamoto, K., Yokoyama, K., Matsukawa, T., Kato, S., Kato, S., Yamada, K. *et al.* (2016). Efficacy of prolonged ingestion of *Lactobacillus acidophilus* L-92 in adult patients with atopic dermatitis. *J. Dairy Sci.* 99(7), 5039–46.
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. and Ito, H. (2000). IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.* 164(9), 4878–82.
- Yamashita, M., Ukibe, K., Uenishi, H., Hosoya, T., Sakai, F. and Kadooka, Y. (2014). *Lactobacillus helveticus* SBT2171, a cheese starter, regulates proliferation and cytokine production of immune cells. *J. Dairy Sci.* 97(8), 4772–9.
- Yamashita, M., Matsumoto, K., Endo, T., Ukibe, K., Hosoya, T., Matsubara, Y. *et al.* (2017). Preventive Effect of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 on Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Front. Microbiol.* 8, 1159.
- Yanaba, K., Hamaguchi, Y., Venturi, G. M., Steeber, D. A., St Clair, E. W., Tedder, T. F. *et al.* (2007). B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 179(2), 1369–80.
- Yoshida, A., Yamada, K., Yamazaki, Y., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M. *et al.* (2011). *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4(+) T cells through a

MyD88-dependent signalling pathway. *Immunology* 133(4), 442–51.

Zhang, X., Koldzic, DN., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, RF., Sakaguchi, S. *et al.* (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16(2), 249-56.

論文目録

以下、本学位論文に関連する文献一覧を記す。

【参考文献】

1. Yamashita, M., Ukibe, K., Uenishi, H., Hosoya, T., Sakai, F., Kadooka, Y. (2014). *Lactobacillus helveticus* SBT2171, a cheese starter, regulates proliferation and cytokine production of immune cells. *J. Dairy Sci.* 97(8), 4772–9.
2. Yamashita, M., Matsumoto, K., Endo, T., Ukibe, K., Hosoya, T., Matsubara, Y., Nakagawa, H., Sakai, F., Miyazaki, T. (2017). Preventive Effect of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 on Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01159.
3. Yamashita, M., Ukibe, K., Matsubara, Y., Hosoya, T., Sakai, F., Kon, S., Arima, Y., Murakami, M., Nakagawa, H., Miyazaki, T. (2018). *Lactobacillus helveticus* SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.02596.

【関連文献】

4. Hosoya, T., Sakai, F., Yamashita, M., Shiozaki, T., Endo, T., Ukibe, K., Uenishi, H., Kadooka, Y., Moriya, T., Nakagawa, H., Nakayama, Y., Miyazaki, T. (2014). *Lactobacillus helveticus* SBT2171 inhibits lymphocyte proliferation by regulation of the JNK signaling pathway. *PLoS One* 9(9), 1–9.

謝辞

本学位論文の執筆にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご高配を賜りました北海道大学大学院農学研究院教授 原博先生、ならびに本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院教授 玖村朗人先生、北海道大学大学院農学研究院准教授 石塚敏先生に深甚なる謝意を表します。

本研究を進めるに当たり、適切にご指導とご助言を頂きました北海道大学大学院遺伝子病制御研究所プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門特任教授 宮崎忠昭先生、ならびに同特任助教 中川久子先生、同 松原由美氏、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野教授 村上正晃先生、同助教 有馬康伸先生、福山大学薬学部教授 今重之先生、北海道大学病院 遠藤努先生、北海道大学遺伝子病制御研究所プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門の皆様に厚くお礼申し上げます。

また、本研究の遂行に当たり、格別のご配慮を頂きました雪印メグミルク株式会社取締役常務執行役員 小西寛昭氏、同研究開発部長 芹澤篤氏、同研究開発部副部長 川崎功博博士、ならびに雪印ビーンスターク株式会社常務取締役 吉岡俊満博士、雪印メグミルク株式会社執行役員ミルクサイエンス研究所長 藤田孝博士、同ミルクサイエンス研究所副所長 畑本均氏、同ミルクサイエンス研究所主幹 加藤健博士、同ミルクサイエンス研究所上級主席研究員 門岡幸男博士、同ミルクサイエンス研究所主査 酒井史彦博士、同

ミルクサイエンス研究所主査 冠木敏秀博士に心よりお礼申し上げます。

そして、本研究にご協力頂きました雪印メグミルク株式会社研究開発部 上西寛司氏、
同一般社団法人 J ミルク出向 細谷知広博士、同名古屋工場 松本来海氏、同ミルクサイ
エンス研究所 浮辺健博士ならびに種々ご支援を頂きました雪印メグミルク株式会社ミル
クサイエンス研究所食品機能研究室の皆様方に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行ならびに本論文を取り纏めるにあたり、私を支えてくれた家族と
友人の皆様に深く感謝致します。