

# Th17細胞機能に及ぼす牛乳・乳発酵食品摂取の影響

広島大学大学院生物圏科学研究科：田辺 創一

## 1. 緒言

### 1-1. Th17細胞

免疫反応の制御にヘルパーT (Th) 細胞が深く関わっていることが示されてきた。Th細胞は高等生物にのみ存在する獲得免疫系において中心的な役割を担っている。Th細胞は胸腺で成熟した後、外来抗原と遭遇していないナイーブTh (Th0) 細胞として末梢のリンパ節などに分布する。Th0細胞は抗原提示細胞から外来抗原を提示される際に、共刺激分子や周囲のサイトカイン環境などに依存して、積極的な免疫応答を行うエフェクターTh細胞へと分化する。

エフェクターTh細胞には、主にインターフェロン (interferon, IFN)- $\gamma$  を産生するTh1細胞と、主にインターロイキン (interleukin, IL) -4, IL-5, IL-13を産生するTh2細胞が存在し、それぞれ細胞性免疫と液性免疫の獲得免疫機構を担っている。両者のバランスが免疫調節に重要であることから「Th1/Th2バランス」という概念が提唱された (Mosmann *et al.*, 1986)<sup>16)</sup>。その後、マウスだけでなくヒトにおいてもTh1/Th2バランスの当てはまることが判明し (Romagnani, 1991)<sup>20)</sup>、さらに、Th1とTh2のマスターレギュレータが発見された (Murphy *et al.*, 2000<sup>17)</sup>; Murphy and Reiner, 2002)<sup>18)</sup> ことで免疫学においてTh1/Th2バランスは隆盛を極めた。

自己免疫疾患とアレルギー疾患もTh1/Th2バランスで説明できるとされ、Th1細胞とTh2細胞の過剰な免疫応答によって、自己免疫疾患とアレルギー疾患がそれぞれ発症すると考えられていた。その後、1990年代に、制御性T細胞 (regulatory T cell, Treg細胞) と呼ばれる免疫抑制性のTh細胞が同定された (Chen *et al.*, 1994<sup>4)</sup>; Groux *et al.*, 1997<sup>9)</sup>) が、やはりTh1/Th2バランスは定説として根付いていた。

しかし、Th1/Th2セオリーとは矛盾した実験結果も増えてきた

自己免疫疾患の一つである関節リウマチや多発性硬化症の動物モデルとしてコラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) がそれぞれよく知られている。これらのモデルではTh1細胞分化に中心的な役割を担うIL-12の構成分子であるIL-12p40に対する中和抗体によって病態が緩和され、IL-12p40欠損マウスではCIAやEAEが発症しないことが知られている。このことから、これらの疾患ではTh1細胞が病原因子であると考えられてきた (Gately *et al.*, 1998)<sup>8)</sup>。しかし、Th1細胞が産生するIFN- $\gamma$  の中和抗体投与やIFN- $\gamma$  欠損マウスにおいては、CIAやEAEの病態が逆に悪化することも報告されていた (Ferber *et al.*, 1996<sup>7)</sup>; Matthys *et al.*, 1998<sup>14)</sup>)。このことからTh1細胞がこれらの疾患の病原因子か否かについては疑問がもたれ始めていた。そして、この矛盾は、IL-12p40がIL-12だけでなくIL-23も共通の構成分子であることから生じていることが分かった。事実、IL-12p35欠損マウスではCIAとEAEに感受性であるのに対し、IL-23p19欠損マウスでは抵抗性であった (Cua *et al.*, 2003)<sup>6)</sup>。このことからCIAとEAEの自己免疫応答に関与しているのはIL-12でなく、IL-23であることが証明された。

この事実はCIAやEAEにおけるサイトカインの病的役割を示しているだけでなく、病原因子としてのTh細胞サブセットの役割を覆した。2000年にTh1細胞でもTh2細胞でもない、IL-17A（以下、IL-17と表記）産生性のTh細胞が発見された（Infante-Duarte *et al.*, 2000）<sup>10)</sup>が、2005年、IL-23によって誘導されるIL-17産生細胞がEAEの病態に関わることが判明し、EAEの病原因子はTh1細胞でなく、IL-17産生Th細胞であることが立証された（Langrish *et al.*, 2005）<sup>12)</sup>。以後、IL-17産生Th細胞は新たなTh細胞サブセットである「Th17細胞」として同定されるに至った。

このように、Th1/Th2バランスの概念を根底から覆したTh17細胞について、この数年で多くの知見が得られてきた。Th17細胞は特徴的なサイトカインであるIL-17とIL-17Fの他に、IL-21、IL-22、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor, TNF）- $\alpha$ を産生するTh細胞である。さらに、マウスで発見されたTh17細胞はヒトにも存在することが確認され（Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007<sup>11)</sup>； Annunziato *et al.*, 2007<sup>2)</sup>）、その発生はマウスにおいてはTh0細胞にトランスフォーミング増殖因子（transforming growth factor, TGF）- $\beta$ とIL-6の刺激を加えることで分化されることが決定づけられた（Bettelli *et al.*, 2006<sup>3)</sup>； Mangan *et al.*, 2006<sup>13)</sup>）。また、マスターレギュレータとしてTGF- $\beta$ +IL-6刺激によって誘導されるレチノイン酸レセプター関連オーファンレセプター（retinoic acid receptor-related orphan receptor, ROR） $\gamma$ tが同定され（Ivanov *et al.*, 2006）<sup>11)</sup>、Th17細胞の独立なThサブセットとしての地位が確固たるものとして築かれてきた。

その後の動物実験や臨床実験の結果、EAEだけでなく、Th1/Th2バランスで説明されてきた多くの免疫疾患動物モデルやヒト免疫疾患でTh17細胞の関与が示されてきており（Oboki *et al.*, 2008<sup>19)</sup>； Mesquita *et al.*, 2009<sup>15)</sup>）、Th17細胞をターゲットとした免疫疾患の病態・治療の研究が医学分野において急速に進むとともに、Th1/Th2バランスにTreg細胞とTh17細胞を加えた包括的なTh細胞バランスを考える必要があると認識され始めている。

## 1-2. 本研究の目的

炎症性腸疾患などの自己免疫疾患やアレルギー性疾患に対して、牛乳・乳発酵食品などの摂取が有効であることが動物レベルのみならず臨床的にも明らかにされつつある。例えばヨーグルトの摂取がマウスの腸炎を抑制することが報告されている。とりわけヨーグルト製造に用いられるプロバイオティクス乳酸菌による腸炎抑制については報告が増えてきている。本研究では、ビフィズス菌と並ぶプロバイオティクス菌である乳酸菌のうち、ヨーグルト製造のスターターとして最も汎用的に用いられる*Streptococcus thermophilus*に着目した。*S. thermophilus*は耐熱性の高さからヨーグルト製造のスターターとして用いられてきただけでなく、ヨーグルトのテクスチャーや官能特性を向上させる意味でも重要である。*S. thermophilus*はその発酵産物も含めて種々の保健効果が報告されてきたが、Th17細胞への影響は未だ報告されていない。

我々は、Th17を抑制する食品因子として、ビフィズス菌体の効果について報告した（Tanabe *et al.*, 2008）<sup>21)</sup>。続いて本評価系を用いて、大麦発酵エキスやフラボノイドも同様の効果を有することを報告してきた（Iguchi *et al.*, 2009）。但し、これらはマウスの脾細胞を用いて検討したものであった。脾細胞と腸管免疫細胞とでは、微生物に対する応答が異なると考えられる。そこで、本研究では、腸管免疫細胞を用いて、牛乳・乳発酵食品・*S. thermophilus*菌体のTh17抑制効

果の確認とメカニズムの解明を行うとともに、経口投与時の有効性を判断するために腸炎モデルマウスを用いた検討を行うこととした。ここでは、結果のまとまった*S. thermophilus*について報告する。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 用いた菌と培養方法

*S. thermophilus* ST28をM17培地で37°C、17~65時間培養した。培養後の菌を1,500 ×gで5分間遠心分離し、培養上清を除去した。滅菌蒸留水を加えて懸濁後、再度1,500 ×gで5分間遠心分離し、洗浄した。この洗浄を3回繰り返し、培地を滅菌蒸留水で置換した後、沸騰中の湯浴で50分間加熱処理をした。これを凍結乾燥したものを、目的の菌数になるように細胞培養用の培地で希釈して用いた。

### 2-2. マウス全脾細胞を用いた評価

マウス (BALB/c、雌、6週齢) を頸椎脱臼した後、脾臓を摘出し、脾細胞を培養した。細胞培養培地の組成は、RPMI1640に、10%非働化ウシ胎児血清 (FBS)、10 μM 2-メルカプトエタノール、50 IU/mLペニシリン、50 μg/mLストレプトマイシン、0.01M 4-(2-ヒドロキシジメチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES) を加えたものとした。滅菌ナイロンメッシュと培地5 mLを予め入れておいた6cmシャーレに、摘出した脾臓を入れ、滅菌ナイロンメッシュで挟んだ。5mLシリンジのブランジャーの裏側を使って脾臓を押しつぶし15mL遠沈管に回収した。350×g で5分間遠心して上清を除去し、red blood cell lysing bufferを2mL/spleen加えて混合し、氷上で5分間静置した。washing buffer (50IU/mLペニシリン、50 μg/mLストレプトマイシン、3%非働化FBSを含むHBSS溶液) を10 mL/spleen加えて混合し、350×gで5分間遠心した。上清を除去し、10mL/spleenのwashing bufferで2回洗浄した。1×10<sup>7</sup> cells/mLになるように培地を懸濁し、96穴プレートに120 μL/wellずつ播種した。Th17細胞への分化を誘導するために2ng/mLのhuman TGF-βと20ng/mLのrecombinant mouse IL-6を添加し、*S. thermophilus* ST28 (1×10<sup>7</sup>cells/mL) とともに37°Cで72時間培養した。

### 2-3. サイトカイン濃度の測定

マウス脾細胞培養上清中のサイトカイン濃度は、IL-17を除き、Bio-Plexサスペンションアレイにより測定した。まず、フィルタープレートにcytokine assay bufferを各wellに100 μL添加し、吸引ろ過した。サイトカインに対するビーズ抗体を各wellに50 μL添加し、bufferを吸引ろ過した。各wellにcytokine wash bufferを100 μL加え、吸引ろ過した。この洗浄操作を2回行った。各wellにサンプルまたはスタンダードを加え、プレートをシールし、30分間振とうした (室温、遮光)。各wellにcytokine wash bufferを100 μL加え、吸引ろ過した。この洗浄操作を3回行った。二次抗体 (ビオチンラベル抗体) を25 μL添加し、プレートをシールし、30分間振とうした (室温、遮光)。各wellにcytokine wash bufferを100 μL加え、吸引ろ過した。この洗浄操作を3回行った。各wellにストレプトアビジン-フィコトリエン溶液を50 μL添加し、プレートをシールし、10分間振とうした (室温、遮光)。各wellにcytokine wash bufferを100 μL加え、吸引ろ過した。この洗

浄操作を3回行った。assay buffer を各wellに125 $\mu$ L加え、プレートをしールし、30秒間振とうした。しールを剥がし、array readerで測定した。

IL-17濃度は、ELISAキットを用いて測定した。各wellに一次抗体（ラット抗マウスIL-17抗体、2.0 $\mu$ g/mL）を100 $\mu$ L添加し、室温で一晩放置した。各wellにwashing buffer（0.05% Tween20 in PBS、pH 7.2~7.4）を400 $\mu$ Lずつ添加し、プレートの残余の水分を除去する操作を3回行った。以下、この操作を「3回洗浄した」と略した。各wellにblocking buffer（1% BSA in PBS）を300 $\mu$ L/well加え室温で1時間放置した。washing bufferで3回洗浄し、培養上清サンプルまたはスタンダード（マウスIL-17）を100 $\mu$ Lずつ加え室温で2時間放置した。washing bufferで3回洗浄し、各wellに二次抗体（ヤギ抗マウスIL-17抗体、200ng/mL）を100 $\mu$ L添加し、室温で2時間放置した。washing bufferで3回洗浄し、各wellにstreptavidin-HRPを100 $\mu$ L加え暗室で20分間放置した。washing bufferで3回洗浄し、各wellに基質溶液（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)）を100 $\mu$ L加え、遮光条件で20分間放置した。各wellに反応停止液（1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）を100 $\mu$ L加え、マイクロプレートリーダー（Model 680、Bio-rad）により450nmにおける吸光度を測定した。

#### 2-4. DSS大腸炎マウスへの*S. thermophilus* No. 28投与

デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）投与により腸炎を発症するマウスモデルを作成した。6週齢のBALB/cマウス雌性を購入した。一定室温、12時間明暗サイクルに制御された部屋で飼育し、飼育期間中は飼料と水道水を自由摂取させた。実験プロトコルをFigure 1に示した。急性大腸炎は3.5%（w/v）DSS（分子量、36,000-50,000; MP Biomedicals）を飲み水に混合し、5日間摂取させることで発症させた。

マウスはランダムに3つのグループに分けた（n=4）。Group1（control群）に、1日目から3日目にPBSを経口投与した。またGroup 2（DSS群）には3.5% DSSを飲み水として、自由摂取させ、control群と同様に1日目から3日目にPBSを経口投与した。Group 3（*S. thermophilus* ST28投与群）には、3.5% DSSを飲み水として自由摂取させ、DSS投与開始時間の24時間後から3日間*S. thermophilus* ST28死菌（ $1 \times 10^7$  CFU/mouse/day）をそれぞれ経口投与した。

体重測定を毎日同じ時刻に行い、DSS投与から5日目に頸椎脱臼により屠殺後、解剖した。小腸および盲腸から直腸までの大腸全体を摘出し、炎症の指標として大腸の長さを測定した。

#### 2-5. 腸管粘膜固有層リンパ球（LPL）の調製

マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、直ちに開腹して小腸と大腸の腸管を採取した。腸管に付着した脂肪を取り除き、冷却したPBSの入った5cmディッシュに入れた。腸管内の糞などを除去し、PBSで洗浄した。次に小腸にみられるパイエル板を除去した。腸管を開き、0.5cmに切断し、10mLのPBS入った遠心チューブで洗浄後、5分間600 $\times$ gで遠心した。上清を取り除き、5mM EDTA/1mM DTT-HBSSで37 $^{\circ}$ C 140rpm 振とう湯浴で30分間振とうした。滅菌ナイロンメッシュを入れた10mLシリンジでろ過後、残った腸組織を10mLの5%FBS-HBSSで洗浄し、5分間 600 $\times$ gで遠心した。上清を除去後、残った組織をさらに細かく切断した。組織は1 mg/mL collagenase Dと3 mg/mL dispase IIで37 $^{\circ}$ C 100rpm 振とう湯浴で30分間振とうした。上清はガラスウールの入った10mLシリンジでろ過し、5分間600 $\times$ gで遠心した。5%FBS-HBSSで3回洗浄した後、沈殿した細胞を40%パーコールに懸濁した。

別の50mL遠沈管に入れておいた80%パーコールの上に40%パーコールに懸濁した細胞液を重層し、20分間1000×gで遠心し、40%と80%パーコールの境界面に浮遊細胞が集積した細胞をLPLとし、回収した。回収後、HBSSで3回洗浄した。

また、パイエル板を小腸から切除し、5mLのRPMI培地が入ったシャーレに入れた。パイエル板をナイロンメッシュで挟み、シリンジのプランジャー部分で押しつぶした。溶液を15mL遠沈管に移し、5分間350×gで遠心後、上清を除去した。そこへ、1.5mg/mL Dispase II を5mL加え、30分間 37°C でインキュベートした。その後、5分間350×gで遠心し、RPMI培地で3回洗浄した。LPLは $5 \times 10^5$  cells/mL、PPは $1 \times 10^6$  cells/mLになるように培地を懸濁し、24穴プレートに1.2mL/wellずつ播種した。IL-17の発現を誘導するために50ng/mLのphorbol myristate acetateと1 $\mu$ g/mLのionomycinを添加し、*S. thermophilus* ST28 ( $1 \times 10^7$  cells/mL) とともに37°C で4時間培養した。

培養上清を回収後、プレートに付着した細胞にTRIzol1mLを加え、ピペットでこすって細胞を剥がし、マイクロチューブに回収した。これにクロロホルム200 $\mu$ L加え、20秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、室温で5分間静置した。8,800×g、4°Cで15分間遠心分離して層分離させた。RNA層（水層）を新しいエッペンチューブに回収した。等量のイソプロパノールを加えてボルテックスミキサーで攪拌し、室温で10分間インキュベートした。10分間遠心分離した後、沈殿を残して上清を慎重に除去した。75%エタノールを500 $\mu$ L加え、転倒混和しながら沈殿を洗浄した。2,200×g、4°Cで5分間遠心分離した後、沈殿を残して75%エタノールを除去し、total RNAを得た。

## 2-6. mRNA発現解析

抽出したtotal RNAからのcDNA合成にはhigh-capacity cDNA reverse transcriptionキットを用いた。PCRチューブにマスターミックス10 $\mu$ L（10×RT buffer 2.0 $\mu$ L、25×dNTP mix 0.8 $\mu$ L、10×RT random primers 2.0 $\mu$ L、Multiscribe™ reverse transcriptase 1.0 $\mu$ L、RNase inhibitor 1.0 $\mu$ L、ミリQ水3.2 $\mu$ L）と100ng/mLに調製したRNA溶液10 $\mu$ Lを入れ、サーマルサイクラーにて25°C 10分間、37°C 120分間、85°C 5分間でcDNA合成を行った。

リアルタイムPCR反応には、KAPA™ SYBR® Fast qPCRキットを用いた。8連チューブに、ミリQ水 10 $\mu$ L、2×KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 12.5 $\mu$ L、Rox High 0.5 $\mu$ L、forwardとreverse各プライマー（10 $\mu$ M）をそれぞれ0.5 $\mu$ Lずつ、テンプレートcDNA（10ng/ $\mu$ L）を1 $\mu$ L入れ、穏やかに混和した後、ABI PRISM® 7700 sequence detection systemにて反応を行った。まず95°Cで2分間、酵素の活性化を行った。続いて95°Cで3秒の熱変性、60°Cで30秒のアニーリングおよび伸張反応のサイクルを40サイクル繰り返し、目的のDNAを増幅させた。さらに、95°C 15秒間、60°C 15秒間で融解曲線分析を行い、単一のDNAのみが増幅されていることを確認した。使用したプライマーとその配列をTable 1に示した。

発現解析には、比較Ct法（ $\Delta\Delta$ Ct法）を用い、測定したい目的の遺伝子とハウスキーピング遺伝子のCt値の差（ $\Delta$ Ct）を比較して、相対定量した。

## 2-7. 腸間膜リンパ節（MLN）の調製とフローサイトメトリー解析

BALB/cマウスを頸椎脱臼により屠殺後、開腹し、腸間膜リンパ節（MLN）を切除した。付着した脂肪組織を取り除き、培地5mLを予め入れておいたシャーレに移した。MLNを滅菌ナイロンメッシ

ユで挟み、5mLシリンジのプランジャーの裏側を使って組織を押しつぶし、15mL遠沈管に回収した。350×g で5分間遠心して上清を除去し、培地で2回洗浄した。

調製したMLNを $2 \times 10^5$  cells/mLになるように5% FBS-HBSSに懸濁した。適量のfluorescein isothiocyanate (FITC) -抗マウスCD11c抗体およびFITC-Armenian hamster IgGを細胞懸濁液に加え、4°C暗所で30分間インキュベートした。細胞を5% FBS-HBSSで2回洗浄した後、300μLの5% FBS-HBSSに懸濁した。蛍光強度はGuava EasyCyte 6HT/2L flow cytometry systemを使用して測定した。

## 2-8. 統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差で表した。平均値の比較にはTukey-Kramer法を用い、p値が0.05未満の場合、統計的に有意とした。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 正常マウス脾細胞における*S. thermophilus* ST28のサイトカインバランス調節効果 (Table 2)

脾細胞をTGF-β+IL-6で刺激した結果、(一)のカラムにある通り、IL-17産生が顕著に亢進した。この時、検討したその他のサイトカイン、即ちIFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (p70), TNF-α, GM-CSFの変化はほとんど見られなかった。従って、TGF-β+IL-6刺激が特異的にIL-17産生のみを誘導し、Th17-skewed conditionとなったことが明らかとなった。

この培養液に*S. thermophilus* ST28を加えると、IL-17産生はほとんどコントロールレベルにまで大きく低下した。従って、本アッセイ系において*S. thermophilus* ST28がIL-17産生抑制能を有することが明らかとなった。比較のために、*S. thermophilus* のtype strainである ATCC 19258 株でも同様の検討を行ったが、IL-17産生抑制能はST28株の方が強かった。

ATCC株と比較すると、ST28株はIL-10を高産生し、IL-12をあまり誘導しなかった。抗炎症活性の評価には、しばしばIL-10/IL-12比が検討され、IL-10高産生なほど、即ちIL-10/IL-12比が高いほど炎症抑制活性が高いとされることもある。この点で、IL-10高産生なST28株の方が強く制御性T細胞を誘導し、Th17をより強く抑制した可能性が考えられた。

### 3-2. デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルマウスの症状変化 (Figure 1)

DSS誘導性大腸炎モデルは、最も広く用いられている炎症性腸疾患の動物モデルの一つである。DSSが腸炎を誘導するメカニズムは、マクロファージの活性化、腸管上皮への障害、大腸細菌叢の変化などが考えられている。

DSS処理により急性大腸炎を誘導した結果、体重減少および大腸の萎縮が確認された。これらの減少は腸炎重症度の指標として用いられる。また、所見観察では、3日目からDSS群の2匹で下痢を引き起こし、肛門周辺部が紅く腫れていた。このことから、DSS群では大腸炎が発症していることが確認された。

体重変化はDSS群で減少していたが、*S. thermophilus* ST28投与群した場合、若干の回復傾向が見られた (データ省略)。また、大腸萎縮もDSS群と比較して、*S. thermophilus* ST28投与群では

抑制されていた (Figure 1B)。これは、大腸において *S. thermophilus* ST28が大腸炎の発症を抑制したことを意味している。

なお、本試験では *S. thermophilus* ST28生菌ではなく、加熱死菌を用いた。従って、本試験で見られた大腸炎抑制効果は、*S. thermophilus* ST28が腸内で増殖し腸内細菌叢を直接的に変化させた結果ではないこと、炎症抑制効果は *S. thermophilus* ST28の菌体成分によることが示唆された。

### 3-3. 大腸炎マウス脾細胞における *S. thermophilus* ST28の炎症抑制効果 (Figure 2)

次に、炎症時の脾細胞からのサイトカイン産生を検証した。脾細胞に対して、サイトカイン産生を促す刺激 (例えば  $\text{TGF-}\beta + \text{IL-6}$ ) を行っていないことから、DSS群でも比較的IL-17産生は低かった。しかし、ST28投与によってDSS群の脾細胞からのIL-17産生を有意に抑制していることが証明された。これは、Table 2 (*in vitro*) 試験でST28がIL-17産生を抑制したことと一致した。その他のサイトカイン、即ちIFN- $\gamma$  (Th1), IL-4 (Th2), IL-10 (Treg) には大きな変化が認められなかった。

### 3-4. 大腸炎マウスLPLにおける *S. thermophilus* ST28の炎症抑制効果 (Figure 3)

炎症が起こっている腸管でのIL-17抑制を直接評価するため、real-time PCRによって大腸から単離したLPLにおけるTh17関連の遺伝子、IL-17およびROR- $\gamma$  tのmRNA発現変化を検証した。DSS群のLPLでは両者の発現がともに大幅に増加していたが、ST28投与群は著しくこれらの発現を抑制した。このことから、ST28がLPLにおいて、ナイーブT細胞からTh17細胞への分化を抑制したことが示唆された。さらにLPLにおけるCD11c<sup>+</sup>細胞発現も抑制していたことから、次に樹状細胞の解析をすることとした。

### 3-5. 大腸炎マウスMLNにおける *S. thermophilus* ST28の炎症抑制効果 (Figure 4)

MLNは炎症応答により活性化した粘膜固有層における免疫細胞の輸送経路として知られている。また、炎症時には粘膜固有層だけではなく、他の器官からも細胞が流入してくると考えられている。そこで、MLNにおけるCD11c<sup>+</sup>樹状細胞の割合をフローサイトメーターにより検討した。

その結果、ST28の経口投与によってCD11c<sup>+</sup>細胞が減少したことから、炎症による樹状細胞の活性化を抑制することが示唆された。ヒト潰瘍性大腸炎およびDSS誘導性大腸炎マウスのMLNにおいてCD11c<sup>+</sup>樹状細胞の割合が増加することが知られていることから (Cruickshank *et al.*, 2005)<sup>5)</sup>、ST28はIBDの症状軽減に役立つことが期待される。

### 3-6. 要約と今後の課題

*S. thermophilus* ST28の経口投与による炎症抑制効果を、DSS誘導性大腸炎マウスを用いて評価した。*S. thermophilus* ST28の経口投与は、DSS誘導性大腸炎マウスの脾細胞において、大幅にIL-17産生を減少させた。さらに、*S. thermophilus* ST28はLPLにおけるROR- $\gamma$  tのmRNA発現を抑制した。このことから、*S. thermophilus* ST28は炎症が起こっている腸でTh17細胞応答を抑えることが示

された。同時に、DSS処理したマウスのMLNではCD11c<sup>+</sup>細胞数の割合が上昇していた。これはDSS誘導性大腸炎の特徴でもあるが、ST28の経口投与によってCD11c<sup>+</sup>細胞は減少した。これらの結果より、ST28の摂取は炎症性腸疾患のようなTh17疾患の治療に役立つことが示唆された。

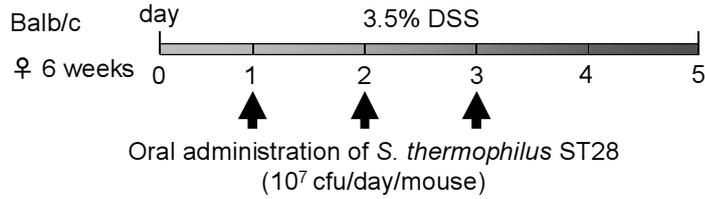
今後、ST28をはじめとする乳酸菌・ビフィズス菌によるTh17抑制作用をより詳細に検討することが望まれる。

## 文献

- 1 Acosta-Rodriguez E. V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Napolitani G., Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells., *Nat. Immunol.*, 8: 639-646 (2007)
- 2 Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S., Phenotypic and functional features of human Th17 cells., *J. Exp. Med.*, 204: 1849-1861 (2007)
- 3 Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L., Kuchroo V. K., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells., *Nature*, 441: 235-238 (2006)
- 4 Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A., Weiner H. L., Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalitis., *Science*, 265: 1237-1240 (1994)
- 5 Cruickshank S. M., English N. R., Felsburg P. J., Carding S. R., Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice, *World J. Gastroenterol.*, 11: 6338-6347 (2005)
- 6 Cua D. J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C. A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S. A., Gorman D., Kastelein R. A., Sedgwick J. D., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain., *Nature*, 421: 744-748 (2003)
- 7 Ferber I. A., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton D., Fathman C. G., Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)., *J. Immunol.*, 156: 5-7 (1996)
- 8 Gately M. K., Renzetti L. M., Magram J., Stern A. S., Adorini L., Gubler U., Presky D. H., The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses., *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 495-521 (1998)
- 9 Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J. E., Roncarolo M. G., A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis., *Nature*, 389: 737-742 (1997)
- 10 Infante-Duarte C., Horton H. F., Byrne M. C., Kamradt T., Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells., *J. Immunol.*, 165: 6107-6115 (2000)

- 11 Ivanov I. I., Atarashi K., Manel N., Brodie E. L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K. C., Santee C. A., Lynch S. V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D. R., Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria., *Cell*, 139: 485-498 (2009)
- 12 Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J. D., McClanahan T., Kastelein R. A., Cua D. J., IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation., *J. Exp. Med.*, 201: 233-240 (2005)
- 13 Mangan P. R., Harrington L. E., O' Quinn D. B., Helms W. S., Bullard D. C., Elson C. O., Hatton R. D., Wahl S. M., Schoeb T. R., Weaver C. T., Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage., *Nature*, 441: 231-234 (2006)
- 14 Matthys P., Vermeire K., Mitera T., Heremans H., Huang S., Billiau A., Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice., *Eur. J. Immunol.*, 28: 2143-2151 (1998)
- 15 Mesquita D. Jr., Cruvinel W. M., Câmara N. O., Kállas E. G., Andrade L. E., Autoimmune diseases in the TH17 era., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42: 476-486 (2009)
- 16 Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to proteins., *J. Immunol.*, 136: 2348-2357 (1986)
- 17 Murphy K. M., Ouyang W., Farrar J. D., Yang J., Ranganath S., Asnagli H., Afkarian M., Murphy T. L., Signaling and transcription in Thelper development., *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 451-494 (2000)
- 18 Murphy K. M., Reiner S. L., The lineage decisions of helper T cells., *Nat. Rev. Immunol.*, 2: 933-944 (2002)
- 19 Oboki K., Ohno T., Saito H., Nakae S., Th17 and allergy., *Allergol. Int.*, 57: 121-134 (2008)
- 20 Romagnani S., Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more., *Immunol. Today*, 12: 256-257 (1991)
- 21 Tanabe S., Kinuta Y., Saito Y., *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation., *Int. J. Mol. Med.*, 22: 181-185 (2008)

A: Experimental design



B: Colon length on day 5

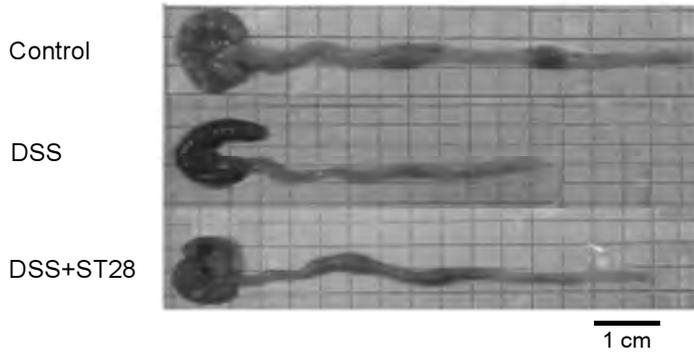


Fig. 1. マウスのデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎に対する *S. thermophilus* ST28 の効果

(A) 実験プロトコール

(B) DSS 腸炎マウスの腸長に対する *S. thermophilus* ST28 の効果

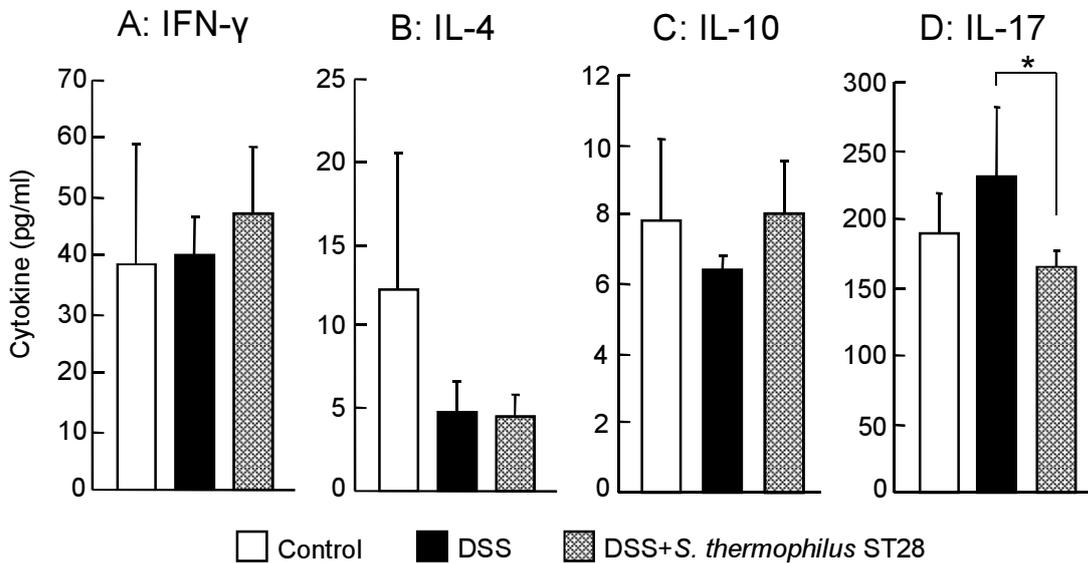
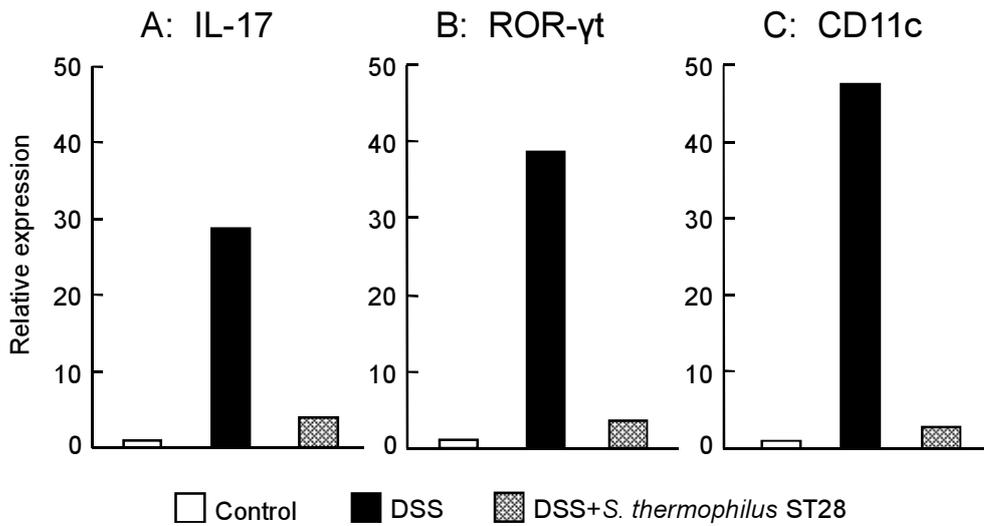


Fig. 2. DSS 腸炎マウスの脾細胞からのサイトカイン産生に対する *S. thermophilus* ST28 の効果

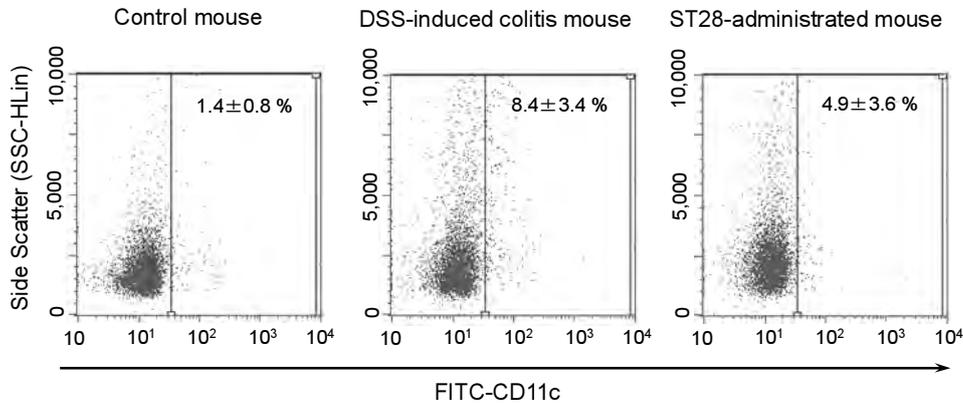
健常マウス、DSS 腸炎マウスおよび ST28 を投与した DSS 腸炎マウス (各  $n=4$ ) の脾細胞を、抗 CD3 および CD28 抗体の存在下で培養し、上清中の IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) および IL-17 (D) 濃度を測定した。

\*,  $p < 0.05$ .



**Fig. 3. DSS 腸炎マウスの粘膜固有層における IL-17 (A)、ROR- $\gamma$ t (B)および CD11c mRNA 発現に対する *S. thermophilus* ST28 の効果**

健常マウス、DSS 腸炎マウスおよび ST28 を投与した DSS 腸炎マウス (各 n=4) の粘膜固有層から RNA を単離し、mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。解析には  $\Delta\Delta Ct$  法を用い、健常マウスとの変化率で表した。



**Fig. 4. DSS 腸炎マウスの腸管間リンパ節中 CD11c 陽性樹状細胞割合に対する *S. thermophilus* ST28 の効果**

フローサイトメトリーにより、健常マウス、DSS腸炎マウスおよびST28を投与したDSS腸炎マウスの腸管間リンパ節中CD11c 陽性細胞割合を解析した。フローサイトメトリーデータは、各群 4 匹のうちの代表例を示した。図中の数値は、CD11c 陽性細胞割合 (平均±標準誤差) を示した。

Table1 本実験で用いたプライマーの配列

Gene	Sequence	
<i>b-actin</i>	Forward	5'-GATTACTGCTCTGGGCCTAGC-3'
	Reverse	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'
<i>Rorgt</i>	Forward	5'-GCAAATACGGTGGTGTGGA-3'
	Reverse	5'-CGCTGAGGAAGTGGGAAA-3'
<i>Il-17a</i>	Forward	5'-TGGATTTCAGAGGCAGATTCA-3'
	Reverse	5'-CAGTTTGGGACCCCTTTACA-3'
<i>Cd11c</i>	Forward	5'-TGTGACGGTGTCTAATGATGG-3'
	Reverse	5'-AGTTGATGCTGACTGGCACG-3'

Table 2. Th17誘導したマウス脾細胞培養液に *S. thermophilus* ST28 あるいは *S. thermophilus* ATCC 19258 を添加した時のサイトカイン産生パターンの変化

Cytokine (pg/ml)	Control	TGF-β + IL-6		
		(-)	<i>S. thermophilus</i> ST28	<i>S. thermophilus</i> ATCC 19258
IL-17	207±76	8,315±1,091	268±122*	835±196
IFN-γ	547±50	305±68	1,711±23*	1,060±161
IL-2	1,134±129	947±277	2.1±0.1*	4.3±0.7
IL-4	28±2	53±5	n.d.	n.d.
IL-5	52±8	58±10	1.7±0.9	1.8±0.7
IL-10	23±1	57±5	347±40**	90±4
IL-12(p70)	7.1±1.3	10±0.0	7.8±0.2**	23±3
TNF-α	176±28	194±26	4,705±72***	1,434±174
GM-CSF	482±17	502±22	110±6*	81±7

n.d., not detected. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (*S. thermophilus* ST28 vs *S. thermophilus* ATCC 19258)