

安心・安全な牛乳生産の免疫技術向上を目指した プロバイオティクス利用の社会的貢献

東北大学大学院農学研究科：北澤 春樹

要旨

乳資源として極めて重要なウシなどの家畜は、幼若期に大腸菌、ロタウイルスおよび原虫による腸管感染性下痢症に罹患し慢性炎症が誘導され易い。その予防と成長促進のために抗菌剤の大量使用を余儀なくされ、結果として、健康危害のリスク増大が懸念されている。近年、腸管免疫調節機能を有するプロバイオティクスとしてイムノバイオティクスという概念が生まれ、抗菌剤代替としての利用性が期待されている。しかしながら、現在のところ、ウシ対応型のイムノバイオティクスを選抜する確かな評価系がない。そこで本研究では、健康危害リスクの低減による消費者の安心を確保する社会貢献を目指し、ウシ腸管上皮細胞株(Bovine Intestinal Epitheliocyte cell line; BIE cell line)を用いて、ウシ対応型のイムノバイオティック評価系の構築を行い、その利用性を追求した。

その結果、以下の結果が得られた。

- ① BIE 細胞は、自然免疫受容体として知られる Toll 様受容体(TLR)1-10 全ての mRNA を発現し、TLR2, 4 のタンパク質発現を検証したことから、下痢原性大腸菌刺激によるイムノバイオティクスの抗炎症性評価に有用であることが期待された。さらに、BIE 細胞における炎症応答解析により、IL-6, IL-8 および MCP-1 が評価系に有効な免疫パラメータとして選抜された。
- ② BIE 細胞を用いて、イムノバイオティクスによる最適刺激時間を決定し、イムノバイオティクス候補を含むいくつかの乳酸菌株のうち高い抗炎症性が期待される菌株を選抜した。
- ③ BIE 細胞において、選抜菌株や TLR2 リガンドの前刺激により、いくつかのネガティブレギュレーターが発現が誘導された。また、ウエスタンブロッティングによる細胞内炎症シグナルの解析から、イムノバイオティクスの前刺激により、下痢原性大腸菌誘導型の炎症シグナルの進行が抑制された。

以上の結果から、本評価系で選抜したウシ対応型のイムノバイオティクスについて、TLR2 などによる認識から細胞内シグナル調節分子を介する炎症応答調節機構の一端が解明された。本研究により、BIE 細胞を用い、世界に先駆けてウシ対応型のイムノバイオティック評価系が提案でき、抗菌剤代替あるいは軽減による家畜の健全育成から、安全な畜産食品の持続的供給による安心社会の構築に大きく貢献することができる。

緒言

腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) は哺乳動物に感染性を示す病原性細菌であり、ウシなどの家畜において、感染性炎症による死亡率の増加および成長不良から、経済的損失は増加し大きな社会問題となっている¹⁾。ETEC は、腸上皮細胞 (IECs) に定着し、分泌するエンテロトキシンによる急性下痢症や炎症を誘導する^{2,3)}。その感染や毒素による細胞損傷に加えて、ETEC は、感染時の細胞および組織損傷に関与するリポ多糖 (LPS) の様な病原性パターン分子を介して炎症応答を誘導することができる^{2,4)}。ETEC は、Toll 様受容体 (TLR) -4 の活性化を誘発し、IECs からのサイトカイン誘導と炎症性細胞の動員と活性化を促す。しかしこのメカニズムは、重要な初期生体防御ではあるが、長期的あるいは過剰なサイトカイン生産は、組織損傷および上皮のバリア機能障害につながる可能性がある^{1,4,5)}。したがって、宿主の組織を損なうことなく保護を達成するためには、ETEC 感染の間に、病原体に対する十分かつ効率的な炎症反応の誘導が不可欠となる。

プロバイオティクスは、“十分量投与された場合宿主に健康上有益な効果をもたらす生きた微生物”として定義されている⁶⁾。いくつかの乳酸菌 (LAB) 株は、宿主に有益と考えられており、プロバイオティクスとして使用され、それらを含む幾つかの機能性食品が開発されている。宿主免疫の調節は、プロバイオティクスの有益性として最も一般的に認知されている。プロバイオティクスの中でも特に粘膜免疫を介して効果を発揮するものをイムノバイオティクスと提案されている⁷⁾。乳酸菌により、ETEC に対する免疫応答を調節する研究報告がある⁸⁻¹¹⁾。Roselli ら⁸⁾ は、*Bifidobacterium animalis* MB5 と *Lactobacillus rhamnosus* GG が、Caco-2 細胞において、部分的に病原体の接着や好中球遊走を減少させることにより、ETEC K88 による炎症関連応答を調節することを報告した。また、*L. rhamnosus* GG の Caco-2 細胞における実験で、ETEC 誘発性のインターロイキン (IL) -1 β 、および腫瘍壊死因子 (TNF) - α のアップレギュレーションや、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β 1 のダウンレギュレーションを調節する他、サイトカイン調節解除をブロックすることが知られている⁹⁾。また、*L. rhamnosus* GG と *B. animalis* MB5 の比較研究により、個々のプロバイオティック菌株は、IECs において誘導される炎症反応に異なる影響を及ぼすものと考えられている⁹⁾。その他、プロバイオティック酵母の研究では、*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 が、F4+ ETEC で刺激したブタ腸管上皮細胞 (IPI-2I) において、炎症性メディエーターとして知られる IL-6, IL-8, Chemokine (C-C motif) ligand (CCL) 20, Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 2 および CXCL10 の発現を抑制することが知られている¹⁰⁾。さらに、CNCM I-3856 株は、ETEC 誘発性の炎症性サイトカインやケモカインの転写産物やタンパク質を阻害することと、この阻害は ERK1/2 および p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) のリン酸化抑制と抗炎症性ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体- γ mRNA の増強と関連することが証明されている¹¹⁾。

近年、産業動物における病原体感染および消化管疾病の軽減のため、プロバイオティクスの利用性に関する研究が行われるようになった¹²⁻¹⁵⁾。幾つかのプロバイオティクスで、ETEC に対するインビボ効果が試験されているが、その多くがブタ試験であり、ウシに関する研究は遅れている¹²⁾。インビボ試験には、コストと労力がかかるため、インビトロ試験による有用なプロバイオティクスの選抜が考えられており、我々も、幾つかのインビトロ選抜・評価システムを提案してきた。例えば、ブタ TLR2 強制発現細胞における核内転写因子のレポーターアッセイや、ブタ腸管免疫担当細胞の活性化とブタ腸管上皮 (PIE) 細胞における抗炎症性試験の組み合わせ等である¹³⁾。さ

らに、PIE 細胞は、腸管炎症性ダメージにおける免疫バイオフィクスの保護作用機構の解明にも有用であることから、ブタの離乳関連炎症を含む炎症性腸疾患の予防に貢献する新たな免疫機能性飼料の開発に有益であるものと期待されている^{14,15)}。それ故、消化管における生残性、阻害物質生産性や抗生物質感受性などの機能性や安全性に関するインビトロスクリーニング^{12,16)}は、家畜飼料におけるプロバイオフィクスの利用性拡大に必要不可欠となる。ウシにおけるプロバイオフィクスの利用性は、これまでに構築が遅れているウシ対応型のインビトロシステムの開発により、飛躍的に進むものと期待される。

最近になって、麻生らは、世界に先駆けて仔ウシ腸管上皮細胞(BIE)株の樹立に成功した¹⁷⁾。これにより、ウシIECsと病原体との相互関係を基礎として、ウシに有用な免疫バイオフィクスの選抜からIECsにおけるその腸管免疫調節機構の解明が飛躍的に進むものと期待される。そこで、本研究では、BIE細胞株を用い、仔ウシに対応したETECに対する有用な免疫バイオフィクスの選抜・評価系の構築を行い、薬剤に頼らないウシの健全育成から、安心・安全な牛乳生産の免疫技術向上に貢献する。本研究成果は、消費者の畜産食品に対する安心感を確保するための社会貢献につながり大変有意義である。

研究方法

1. 仔ウシ腸管上皮細胞

BIE細胞は、コラーゲンコート φ90mm シャーレ (SUMILON, TOKYO, JAPAN) を用いて、DMEM (10% FCS, 1% streptomycin/penicillin, 100 U/ml streptomycin, high glucose, L-glutamine, 0.11 mg/ml sodium pyruvate; GIBCO) により培養した。コンフルエントに達したところで、PBSにより2回洗浄し、上皮buffer (0.1M Na₂HPO₄/12H₂O, 0.45M Sucrose, 0.36% EDTA/4Na, BSA) による処理 (37°C, 5min) をし、トリプシン溶液 (0.25% trypsin, 0.02% EDTA in PBS) を用いてプレートから細胞を剥がし (37°C, 5min) 、細胞を遠心した (1,200rpm, 5min) 。上清をアスピレートし、適量のDMEM培地 (10% FCS, 1% streptomycin/penicillin) に懸濁して細胞数を計測後、3x10⁵cells/φ90mmシャーレとなるように播種した。24時間後、培養上清をアスピレートし、新たにDMEM培地 (10% FCS, 1% streptomycin/penicillin, high glucose, L-glutamine, 0.11 mg/ml sodium pyruvate; GIBCO) を添加し培養した。

2. 毒素原性大腸菌 (ETEC)

毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) 987P 株 (血清型 09: H-: 987P+: STa+) は、(独) 農業・生物系特定産業技術研究機関、動物衛生研究所 (旧家畜衛生試験場) 安全性研究部、中澤宗生博士より譲渡された。-80°Cで凍結保存された ETEC 987P 株を 5%ヒツジ脱繊維血液添加寒天培地に画線し、37°C、2 時間培養した。出現したコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、5ml の Tryptic soy broth (Becton) に接種し、37°C、5~8 日間静置培養した (繊毛復帰培養)。上部に明確に形成された菌膜を画線棒により釣菌し、1L の Tryptic soy broth に接種し、37°C、20 時間振とう培養した。培養後遠心集菌し、PBS で3回洗浄後、100°C、15 分で熱殺菌処理した。殺菌後、PBS で洗浄し、DMEM 培地 (10% FCS, 100 mg/ml penicillin) に懸濁した。菌数は Petroff-Hausser 細菌計算版を用いて計測し、5x10⁷cells/ml となるように調製後、-80°Cで保存した。

3. 乳酸菌

ヒト糞便由来18菌株 (*Lactobacillus reuteri* MEP221101 and MEP221102, *Lactobacillus casei* MEP221103, OLL2768, MEP221104, MEP221105, MEP221106, MEP221107, MEP221108, MEP221109, MEP221114 and MEP221115, *Lactobacillus rhamnosus* MEP221110, MEP221111, MEP221112 and GG, *Lactobacillus salivarius* MEP221113, *Lactobacillus jensenii* TL2937, *Lactobacillus gasseri* MEP221117) を用いた。全ての菌株は MRS 培地 (Difco, Detroit, USA) で3回継代培養後 (37°C, 16h)、十分にPBSで洗浄した。洗浄後56°C、30分間熱殺菌に供した。さらに PBSで2回洗浄後、DMEM培地に再懸濁しその後の試験に使用した。

4. 免疫染色

カラーゲンtype IコートガラスDisk (Iwaki Glass Co., Tokyo, Japan) を置いた12wellプレート上にBIE細胞を 3×10^4 cells/wellとなるように播き、DMEM培地にて3日間培養した (37°C, 5%CO₂)。PBS (含2% FCS, pH7.2) で洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド/PBSで室温、5分間固定した。PBS-T (含0.2% Triton X-100) で室温、5分間処理後、PBSで洗浄した。BIE細胞は、Can Get Signal solution 1 (NKB-201, TOYOCO Co., Ltd., Osaka, Japan) で50倍希釈した一次抗体Alexa 488 conjugated rabbit anti-TLR2 polyclonal antibody (bs-1019R-Alexa488, Bioss Inc., Wobum, MA, USA) ないし Alexa 488 conjugated rabbit anti-TLR4 antibody (bs-1021R-Alexa488, Bioss) を添加し静置した (4°C, 一晚)。なおアイソタイプコントロールとして、Alexa 488 conjugate rabbit IgG (20304AF488, IMGEX, San Diego, CA, USA) を使用した。PBS-Tで3回洗浄後、蒸留水でリンスし、FLUOROSHIELD with DAPI (AR-6501-01, ImmunoBioScience Corp, Mukilteo, WA, USA) を用いてスライドガラスに封入した後、MRC-1024 confocal laser microscope (LSM 700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) により免疫蛍光画像を取得した。

5. BIE細胞におけるToll様受容体の定量的発現解析

BIE細胞ウエルに1mlのTRIzol Reagentを添加し、ピペッティングにより細胞液を1.5mlのマイクロチューブに回収した。200 μ lのクロロホルムを加え激しく攪拌し、3分放置後、遠心した (15,000rpm, 15min, 4°C)。上清の水層部分のみを回収し、同量の2-プロパノールを加え10分放置後、遠心した (15,000rpm, 15min, 20°C)。得られたペレットに1mlの75%エタノールを加え遠心洗浄し (15,000rpm, 15min, 4°C)、上清を除去し乾燥させたペレットにDEPC処理水 (Invitrogen) を加え溶解させ、Total RNAを得た。濃度および純度はNanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) で測定した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用い、逆転写反応により1 μ gのTotal RNAからcDNAを合成した。

ウシ各種遺伝子特異的プライマーは、T_m値60°C付近でPrimer Express software version 3.0 (Applied Biosystems) により作製した。House keeping geneとしてはウシ β -actinを採用した。

合成したplasmidをtemplate (negative controlとしてtemplateを含まないものも含める) として、PCR反応溶液中の最終濃度1pg/ μ Lから5段階1/10ずつ段階希釈したものをPCR反応に供し、得られた5段階の増幅曲線より、指数関数的増幅領域でのCt (Threshold cycle) 値と蛍光強度から算出した標準曲線 (検量線) を作製した (Fit point法)。同様に β -actinにおいても

行った。

得られたcDNAを用いてReal-time PCRを行った。Real-Time PCR用96well plateの各wellに2.5 μ lのcDNA、各0.125 μ lのreverse・forwardプライマー (20pmol/ μ l)、2.25 μ lの水、5 μ lのPlatinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) を分注し、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Lincoln, CDF, USA) を用い分析及び解析を行った。得られた増幅曲線群より、指数関数的増幅領域の任意の蛍光値でのCt (Threshold cycle) から標準曲線を算出した。この標準曲線より、各試料における各種サイトカインのmRNA発現量を算出し、その値を各試料における β -actinのmRNA発現量で割り、TLR1の発現量に対するRelative Indexとして算出した。測定したTLR及び使用したプライマーの塩基配列は表1に示した。

6. BIE細胞における乳酸菌の抗炎症機能評価

コラーゲンtype Iコート12 wellプレートに 3×10^4 cells/mL濃度の細胞液を1 wellあたり1 mLとなるように添加し、3日間培養後、培地交換を行い、さらに2日間培養した。培地交換を行った後、乳酸菌を 5×10^7 cells/mLとなるように播種し、前刺激を48時間行った。PBSで3回洗浄後、12時間ETEC(5×10^7 cells/mL)で刺激した。BIE細胞における各種サイトカイン、ケモカインおよびTLRネガティブレギュレーターの発現をリアルタイムRT-PCR法で解析した。また、p38, JNK, ERKおよびNF- κ Bの活性化についてウエスタンブロット法で7に示す方法で解析した。前刺激には、TLR2のアゴニストであるPam3CSK4もあわせて検討した。

7. ウエスタンブロット解析

コラーゲンTypeIコート ϕ 60シャーレに 1.8×10^5 cell/ ϕ 60シャーレとなるように撻いた後、3日間培養した。培地交換を行った後、*Lactobacillus casei* OLL2768 (5×10^7 cells/mL) あるいはPam3CSK4 (最終濃度200ng/ml) で前刺激を48時間行った。PBSで4回洗浄後、任意時間ETEC(5×10^7 cells/mL)で刺激した。

刺激後、CellLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma)にタンパク質分解阻害剤(complete Mini (Roche))と脱リン酸化阻害剤(PhosSTOP (Roche))を規定量(1錠ずつ)添加した細胞溶解液200 μ Lを添加し、細胞を可溶化した。セルスクレーパーを用いて可溶化した細胞液を回収し、15,000 rpm, 5 min 遠心した後、上清を回収した。回収した上清120 μ LにSample Buffer Solution(2ME+)(\times 4) (Wako)を40 μ L添加し、95°C, 5min加熱処理後サンプルとして使用した。

細胞溶解液(CBB未添加)中のタンパク質含量の測定をBCA protein assay kit (Pierce)を用いて行った。BSAのスタンダードと上記細胞溶解液の上清にBCA試薬を添加し、37°C, 30 min 振とうさせた。反応後、Multilabel Reader ARVO™ X3 (Perkin Elmer)を用いて560 nmで吸光度を測定することによりタンパク質含量を算出した。

SDS 処理を行ったサンプルのタンパク質含量を一定(2 μ g/1 lane, 同容量)にし、SDS-PAGEに供した。ゲル濃度は10%もしくは12.5%を用い、泳動は125 V, 90 min 行った。泳動終了後、100%メタノールで親水化したPVDF膜にタンパク質を転写した。

PVDF膜をTBS-T (pH7.5)で洗浄し、2% BSA/TBS-T (w/v)で室温2時間振とうさせブロッキングを行った。TBS-Tで洗浄後、Can Get Signalで1000倍希釈した一次抗体(Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibody (p-p38, Cat. #9211); p38 MAPK antibody (p38, Cat. #9212);

Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody (p-JNK, Cat. #9251); SAPK/JNK antibody (JNK, Cat. #9252); Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Thy204) antibody (p-ERK, Cat. #9101); p44/42 MAP (Erk 1/2) antibody (ERK, Cat. #9102) and; I kappaB antibody (IkBa, Cat. #9242); Cell Signaling) を添加し、室温で一晩振とうした。TBS-Tで洗浄後、Can Get Signalで2000倍希釈した二次抗体 (Alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG (Cat. #A3937, Sigma)) で室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECF基質 (GE Healthcare, UK) を添加し、室温で5分間反応 (暗下) させ、Attophos (Ex; 440nm, Em; 560nm) をMolecular Imager FX (Bio Rad) により検出した。

バンド強度は、画像解析ソフトImage J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて数値化した。I κ Bに関してはI κ B/ β actinの値を算出し、無刺激区の値を1とした相対値で表し、それ以外については抗リン酸化抗体処理/抗タンパク処理の値を算出した後、無刺激区の値を1とした相対値で表した。

8. ELISA法によるサイトカインの定量

BIE細胞を*Lactobacillus casei* OLL2768, MEP221108 (5×10^7 cells/mL) あるいはPam3CSK4 (最終濃度200ng/ml) で48時間刺激後、ETECで刺激した。BIE細胞が分泌したIL-6およびMCP-1の量をELISAキット (bovine IL-6 [ESS0029, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA] および bovine CCL2/MCP-1 [E11-800, Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, TX, USA]) でそれぞれ定量した。

9. 統計解析

リアルタイムRT-PCRの結果は、Normalized relative expression を算出し、コントロールを1とした相対値で評価した。標準化には以下の式を用いた。

$$Z(x_i) = (x_i - x_{(\text{control})} - \sigma_x) / \sigma_x$$

Z(x_i): all adjusted data; x_i: ith experimental data,

x(control): a mean of repeated control data;

σ_x : standard deviation of repeated control or trial data.

統計処理は、SASのコンピュータプログラム (Ver. 6) とGLM procedureを用い、fold expressionの平均値間で多重比較は、Fisher's least significance differential test, LSD法により行った。5%水準で有意であった場合グラフ上に上付き文字 (平均値間の多重比較) またはアスタリスク (コントロールに対する有意差) で示した。

結果

1. BIE細胞におけるTLRsの発現

試験したTLR1-10までの全ての受容体の遺伝子発現が認められた (図1A)。中でも、TLR1, 3, 4, 6の発現が強く、次いでTLR5, 8, 9, 10, 2, 7の順であった。本試験で乳酸菌やETECの受容体として興味深いTLR2とTLR4に注目し、それぞれの抗体により免疫染色した結果、それぞれの受容体のタンパク発現を確認することができた (図1B)。

2. BIE 細胞における ETEC に対する乳酸菌の抗炎症活性

BIE細胞をETECで刺激すると、炎症性サイトカインである、MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 およびIFN- β の顕著な発現が認められた(図2A).また、IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8およびMCP-1は、ETEC刺激12時間で比較的強く発現することがわかった(図2B)。一方、TNF α は、ETEC刺激3時間と早い段階でその発現が増強された。これらの結果より、ETEC刺激の最適時間を12時間と決定した。

3. BIE 細胞における抗炎症性乳酸菌の選抜

我々の最近の研究により、*Lactobacillus jensenii* TL2937 がブタ腸管上皮(PIE)細胞において、熱安定性のETECパターン分子あるいはリポ多糖刺激によるIL-6, IL-8およびMCP-1産生を抑制することがわかった¹⁴⁾。さらに、同菌のPIE細胞における免疫調節には一部TLR2を介することも判明した¹⁴⁾。そこで、同菌がBIE細胞において同様な効果を発揮するかどうか検討した。その結果、同菌あるいはPam3CSK4でBIE細胞を12時間刺激した場合、IL-8の産生が有意に増強され、48時間刺激では、その産生が有意に抑制された(図3A)。MCP-1の発現レベルは、12時間のPam3CSK4刺激あるいは24時間の菌体刺激により対照より有意に増強された。また、IL-6の発現は、菌体あるいはPam3CSK4の24時間刺激により有意に抑制された(図3A)。

これらの結果から、乳酸菌によりBIE細胞における炎症応答を調節できる可能性が示唆された。そこで、次に乳酸菌20菌株についてBIE細胞における抗炎症性を評価し、高い活性を有する菌株の選抜を試みた。その結果、OLL2768, MEP221101, MEP221105およびMEP221111株の刺激により、MCP-1, IL-6並びにIL-8の発現を有意に抑制することが認められた(補足図1)。それ以外の菌株では、効果が弱いか全く認められなかった。*L. casei* OLL2768株とMEP221111株で、最も高い抑制効果が認められた。そこで以降の研究では、*L. casei* OLL2768株を使用することにした。その抑制効果は、ELISAによる検討からタンパクレベルでも検証することができた(図3B)。またその効果は、TLR2のリガンドであるPam3CSK4でも認められた。

4. *L. casei* OLL2768のBIE細胞におけるMAPKおよびNF- κ B経路に対する影響

次に炎症に関わる細胞内シグナル経路に対する影響について検討したところ、*L. casei* OLL2768あるいはPam3CSK4によるBIE細胞の前刺激で、その後のETEC刺激によるI κ B α の分解が有意に抑制されることがわかった(図4)。BIE細胞においてETEC刺激によりp38やERKのリン酸化が増強されたが、*L. casei* OLL2768あるいはPam3CSK4の前刺激により、p38のリン酸化が抑制された(図5A, B)。また、JNKのリン酸化については、菌体の前刺激によりETECの10分間刺激までは増強され、20分間では減少する傾向が認められた(図5C)。

5. *L. casei* OLL2768のBIE細胞におけるTLRシグナル経路のネガティブレギュレーター発現調節

まず始めにETEC刺激のない状態で、*L. casei* OLL2768あるいはPam3CSK4刺激12, 24, 36および48時間後のネガティブレギュレーター(single immunoglobulin IL-1-related receptor (SIGIRR), Toll interacting protein (Tollip), A20-binding inhibitor of nuclear factor kappa B activation 3 (ABIN-3), B-cell lymphoma 3-encoded protein (Bcl-3), mitogen-activated protein kinase 1 (MKP-1) and interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M))の発

現を解析したところ、SIGIRR, ABIN-3あるいはIRAK-M の発現変化は認められなかった(図6A)。また、*L. casei* OLL2768あるいはPam3CSK4で24時間刺激した場合、MKP-1の発現が1.5倍程度増強されたが、その効果は持続的ではなかった。一方、48時間刺激において、Tollipの顕著な発現増強が認められ、Pam3CSK4の36時間刺激あるいは、*L. casei* OLL2768やPam3CSK4の48時間刺激により、Bcl-3の顕著な発現増強が認められた(図6A)。次いで、ETECの後刺激を行った場合のネガティブレギュレーター発現について解析した。その結果、IRAK-MおよびABIN-3の発現に影響はなかったが、ETEC 6時間刺激時にMKP-1の発現増強が認められ、Pam3CSK4刺激では、ETEC 6時間刺激時にSIGIRRおよびTollipの発現が増強された(図6B)。一方、*L. casei* OLL2768の刺激により、ETEC刺激のどの時間においてもBcl-3およびTollipの顕著な発現増強が認められた(図6B)。

考察

腸管上皮は、単なる物理的バリアーだけでなく、腸管における恒常性維持に極めて重要な役割を演じている。生体内に侵入する細菌に対して、腸管上皮細胞は様々なサイトカインやケモカインを産生し、腸管における自然免疫と獲得免疫を誘導する²⁰⁾。本研究では、生体の免疫において極めて重要な粘膜免疫におけるウシ腸管上皮細胞の機能的役割を理解する目的で、BIE細胞におけるTLRsの発現と共に、熱安定性のETECパターン分子が誘導するシグナル伝達とサイトカイン誘導について解析した。腸管上皮細胞は、TLRを代表とするパターン認識受容体を発現することで、病原性細菌に対し応答性を示すことが知られている。本研究により、BIE細胞においてTLR4が最も強く発現している事がわかった。他の種においても、TLR4の顕著な発現が認められている²¹⁾が、BIE細胞においても同様な発現パターンが確認されたことになる。

腸管上皮において、TLR4を介する活性化により誘導される炎症応答は、グラム陰性の病原細菌に対する生体防御にとって重要となる。本研究の結果から、987P株由来の熱安定性のETECパターン分子が、BIE細胞においてNF- κ BやMAPKを介し、IL-6, IL-8, IL-1 α およびMCP-1の発現を有意に増強させることが判明した。これらの結果は、ブタ腸管上皮細胞において、フラジェリンを持たないETEC987P株が、LPSによりTLR4を介し炎症誘導する結果²¹⁾と一致するものであった。さらに本結果は、他の動物種における腸管上皮細胞の免疫応答を共通する点を多く示すものであった。また、NF- κ BやMAPKが、ヒト(HT29やT84)、マウス(CMT93)およびブタ腸管上皮(PIE)細胞株において、ETECやLPSの重要なメディエーターとなることが報告されている^{14, 22)}。

BIE細胞におけるサイトカイン発現誘導は、ETEC感染に対し極めて重要な役割を演じている。IL-8の分泌により、ETEC感染の際に良く見られる粘膜固有層への好中球の浸潤が増強され、炎症応答増強につながる²³⁾。一方、ETEC感作により、腸管上皮細胞によるMCP-1の産生誘導が認められる。このケモカインは、顕著な単球の活性化など、腸管炎症において重要な役割を演じている²⁴⁾。我々の知見は、BIE細胞は優れた細胞株であり、*in vitro*でTLR4を介する炎症応答の詳細を解明する上で、大変有意義である。さらに炎症応答は、腸の病原体によって左右されるが、IEC₃シグナリングにおいて、膜障壁の完全性の破壊を引き起こす⁵⁾。BIE細胞は、熱安定性のETECパターン分子によって誘導され、炎症ダメージを予防する鍵となる。

幾つかの報告により、イムノバイオティック乳酸菌は病原体に対する抵抗性を増強し、感染によって誘導される炎症ダメージに対し、保護作用を有することが判明している²⁵⁻²⁷⁾。それ故、本研究では、イムノバイオティック乳酸菌株が、BIE細胞において、熱安定性のETECパターン分子

による炎症応答を調節できるかどうか評価することとした。我々は、以前の研究により、*L. jensenii* TL2937 株が、PIE 細胞における熱安定性の ETEC パターン分子ないし LPS 刺激に対する免疫応答による IL-6 および IL-8 産生を下方調節する作用を有することを見出した¹⁴⁾。そこで先ず初めに、BIE 細胞における *L. jensenii* TL2937 株の抗炎症機能性について評価した。その結果、*L. jensenii* TL2937 株が IL-6 や IL-8 の発現を抑制することが判明した。しかしながら本効果は、ブタ腸管上皮における本菌の免疫調節能力に比べ低かった¹⁴⁾。腸管上皮は、*L. jensenii* TL2937 株の刺激により、熱安定性の ETEC パターン分子による IL-6 と IL-8 の発現誘導が、それぞれ 35% および 30% 抑制された¹⁴⁾。BIE 細胞における *L. jensenii* TL2937 の効果は、ブタ腸管上皮細胞における以前の我々の知見より低い、乳酸菌が BIE 細胞においても、熱安定性の ETEC パターン分子により誘導される炎症ダメージを調節することができることが示された。従って次に、BIE 細胞において ETEC により誘導される炎症を下方調節する乳酸菌について検討した。先に構築した評価系により、炎症性サイトカインの発現を有意に低下させる菌株が認められ、中でも *L. casei* OLL2768 株は特に強い抗炎症作用を示した。興味深いことに、BIE 細胞における *L. casei* OLL2768 株の抗炎症作用は *L. jensenii* TL2937 株でみられる抗炎症作用よりも強力なものであり、一方ブタ IECs での *L. casei* OLL2768 株の抗炎症効果はそれと比較すると低いものであった¹⁴⁾。つまり、我々の研究成果は特定の宿主を対象とした適切な乳酸菌選抜を可能にするものである。このような点で、我々の構築したウシを対象とした *in vitro* での選抜評価系は、ウシに対応した適切なイムノバイオティク乳酸菌を探索する上で有用であると言える。BIE 細胞において、*L. casei* OLL2768 株は ETEC による炎症応答を軽減する作用を有しており、この作用は同菌株の持つ NF- κ B および p38 シグナル伝達抑制作用と相関性があるものと考えられる。この結果は、先の報告で示された IECs でのプロバイオティクスによる TNF- α および *S. typhimurium* により誘発される IL-8 の遺伝子発現を抑制する効果を支持するものとなった^{28,29)}。さらに、本試験により乳酸菌が ETEC による刺激を受けたウシ IECs における p38 シグナル伝達を抑制しうることも証明することができた。JNK および p38 MAPK シグナルは上流に存在する共通の調節因子を有しており、従って両シグナルは共通の刺激因子を持つ。そこで我々は p38 シグナルで見られた効果が JNK においても見られるか検討したところ意外にも正反対の効果を示した。これは p38 MAPK シグナルが JNK の活性化に対して負の働きを行ったのではないかと示唆される^{30,31)}。実際、このクロストークは先行報告がなされており、その報告では p38 α および p38 β の化学的制御が JNK の強い活性化につながり、これが IL-1 の発現誘導といった現象につながることを示されている³¹⁾。さらに、経時的解析を行ったところ ETEC 刺激後 5-10 分で p-p38 の上方調節が行われ、一方刺激後 10-20 分で p-JNK の下方調節が行われていた。従って、*L. casei* OLL2768 株は直接的に p38 シグナルに影響を及ぼしたのではないかと推測されるが、詳細な機構解明についてはさらなる探究が必要である。一方、TLR シグナルを調節する調節性タンパクの存在が確認されている³²⁾。そこで我々は BIE 細胞における *L. casei* OLL2768 株の持つ抗炎症作用と TLRs ネガティブレギュレーターとの関連について検討した。その結果、同菌株は BIE 細胞において Tollip および BCL-3 といったタンパクの発現を上昇させることで TLR4 シグナル伝達を抑制していることが判明した。BCL-3 は DNA 結合状態での抑制型 NF- κ B ホモダイマーの安定化および転写性活性型二量体の結合抑制などにより NF- κ B の活性化を抑制する作用を有する。実際、BCL-3 発現誘導による抑制型複合体の安定化は LPS トランスに通ずるものがある³³⁾。一方、Tollip の過剰発現は TLR4 を介する NF- κ B および MAPK シグナル

伝達を障害し、Tollip による TLR シグナル抑制は IRAK の活性化抑制効果により媒介されることが証明されている^{34,35)}。さらに、LPS といった TLR リガンドの IECs への前刺激が TLR リガンドの後刺激に対する反応性の低下を示し、炎症応答の選択的制限が行われる。従って、BIE 細胞での *L. casei* OLL2768 株の BCL-3 および Tollip の発現上昇は ETEC に対するトレランスに重要な働きとなる。現在、我々は BIE 細胞における *L. casei* OLL2768 株の抗炎症機構の全容を示すことはできないが、仮定的な機構図を想定することは可能である (図 7)。本研究により、BIE 細胞において乳酸菌前刺激を行うことが ETEC による炎症応答緩和およびダメージ軽減につながることを示された。さらに BIE 細胞において TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 刺激を行ったところ Tollip の発現上昇が認められたことから、*L. casei* OLL2768 株による炎症抑制作用も同受容体を介して行われているものと考えられる。また、LPS クロストレランスが TLR2 アゴニストであるリポペプチドの前刺激により誘導されることが判明した。しかしながら、*L. casei* OLL2768 株により活性化されるネガティブレギュレーターと PRR の関係性についてはさらなる探究が必要である。

まとめ

我々は、本研究により TLR4 を介した炎症応答に対し、抗炎症活性を有するイムノバイオティクスの選抜に BIE 細胞が非常に有益な細胞株であることを初めて報告することができた。BIE 細胞による選抜・評価系を用いることで *in vitro* におけるウシ対応型の有用菌の選抜が可能となり、それを応用することで腸管免疫に有益な機能を発揮する新規「イムノバイオティック飼料」の開発につながるものと考えられる。

加えて、*L. casei* OLL2768 株がウシ腸管において ETEC により誘導される NF- κ B および MAPK シグナル伝達の抑制に有益な作用をもたらすことが明らかとなり、*in vivo* における同菌の使用が大いに期待される。

本研究により、世界に先駆けてウシ対応型のイムノバイオティック評価系が提案でき (図 8)、抗菌剤代替あるいは軽減による家畜の健全育成における応用を通じて、安全な畜産食品の持続的供給による安心社会の構築に大きく貢献することができる。

謝辞

本研究は、平成24年度「乳の社会文化」学術研究助成（Jミルク）により遂行することができました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、BIE細胞をご提供頂き、また研究に対する有益なご助言を頂きました麻生 久教授（東北大学大学院農学研究科）並びに、実験実施の補助を頂きました Julio Villena (CERELA-CONICET)、高梨直也、村田 梢、千葉絵里子、友定洋介 各諸氏および齋藤忠夫教授（東北大学大学院農学研究科）並びに須田義人准教授（宮城大学食産業学部）に深く感謝申し上げます。また乳酸菌株をご提供頂きました（株）明治様に御礼申し上げます。さらに、本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金（基盤研究B No. 21380164, 24380146 並びに挑戦的萌芽研究 No. 23658216）の援助も受けることで飛躍的に発展させることができました。

文献

1. Foster DM, Smith GW: Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2009, 25: 13-36.
2. Zhou C, Liu Z, Jiang J, Yu Y, Zhang Q: Differential gene expression profiling of porcine epithelial cells infected with three enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 2012, 13: 330.
3. Ondrackova P, Alexa P, Matiasovic P, Volf J, Faldyna M: Interaction of porcine neutrophils with different strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2012, 60:108-116.
4. Geens MM, Niewold TA: Preliminary characterization of the transcriptional response of the porcine intestinal cell line IPEC-J2 to Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, and *E. coli* lipopolysaccharide. *Comp Funct Genomics*, 2010, 469583.
5. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G: Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003, 52:439-451.
6. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (FAO/WHO, London, Canada, 2002).
7. Clancy R: Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 38: 9-12.
8. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos W, Mengheri E: The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr* 2007, 137:2709-2716.
9. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri E: Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr* 2006, 95:1177-1184.
10. Zanello G, Meurens F, Berri M, Chevaleyre C, Melo S, Auclair E, Salmon S: *Saccharomyces cerevisiae* decreases inflammatory responses induced by F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in porcine intestinal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2011, 141:133-138.
11. Zanello G, Berri M, Dupont J, Sizaret PY, D'Inca R, Salmon H, Meurens F: *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2011, 6:e18573.
12. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 2010, 141:S15-28.
13. Fujie H, Villena J, Tohno M, Morie K, Simazu T, Aso H, Suda Y, Iwabuchi N, Xiao J, Iwatsuki K, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H: Toll-like receptor-2 activating bifidobacteria strains differentially regulate inflammatory cytokines in porcine intestinal epithelial cell culture system: finding new anti-inflammatory immunobiotics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, 63:129-139.
14. Shimazu T, Villena J, Tohno M, Fujie H, Hosoya S, Shimosato T, Aso H, Suda Y, Kawai Y, Saito T, Makino S, Ikegami S, Itoh H, H. Kitazawa H: Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicit anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun* 2012, 80:276-288.
15. Villena J, Suzuki R, Fujie H, Chiba E, Takahashi T, Shimazu T, Aso H, Ohwada S, Suda Y, Ikegami S, Itoh H, Alvarez S, Saito T, Kitazawa H: Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* modulates toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen presenting cells. *Clin Vaccine Immunol* 2012, 19:1038-1053.
16. Maldonado NC, Silva de Ruiz C, Otero MC, Sesma F, Nader-Macias ME: Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Res Vet Sci*

2012, 92:342-349

17. Miyazawa K, Hondo T, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Itani W, Rose MT, Kitazawa H, Yamaguchi T, Aso H: Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochem Cell Biol* 2010, 133:125-134.
18. Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H: Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780:134-144.
19. Yamamoto T, Nakazawa M: Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J Clin. Microbiol* 1997, 35:223-227.
20. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P: Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108:4607-4614.
21. Lee JD, Mo JH, Shen C, Rucker AN, Raz E: Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007, 23:27-31.
22. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK, Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000, 164:966-972.
23. Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, Madara JL: Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* 2001, 107:861-869.
24. Warhurst AC, Hopkins SJ, Warhurst G: Interferon gamma induces differential up-regulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 1998, 42:208-213.
25. Alvarez S, Villena J, Tohno M, Salva S, Kitazawa H: Modulation of innate immunity by lactic acid bacteria: impact on host response to infections. *Curr Res Immunol* 2009, 3:87-126, Research Media (Ed), India.
26. Salva S, Villena J, Alvarez S: Differential immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *Int J Food Microbiol* 2010, 141:82-89.
27. Villena J, Racedo S, Agüero G, Bru E, Medina M, Alvarez S: *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *J Nutr* 2005, 135:1462-1469.
28. O' Hara AM, O' Regan P, Fanning A, Mahony C, Macsharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony F: Shanahan, Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunol* 2006, 118:202-215.
29. Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J: Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005, 135:1752-1756.
30. Cheung PC, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P: Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38 α . *EMBO J* 2003, 22:5793-5805.
31. Muniyappa H, Das KC: Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 2008, 20:675-683.
32. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA: Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:446-458.
33. Wessells J, Baer M, Young HA, Claudio E, Brown K, Siebenlist U, Johnson PF: Bcl-3 and NF- κ B p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem* 2004, 279:49995-50003.

34. Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F: Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2000, 2:346-351.
35. Zhang G, Ghosh S: Negative regulation of toll-like receptor- mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002, 277:7059-7065.
36. Otte JM, Cario E, Podolsky DK: Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2004, 126:1054-1070.

本研究に関する公表

1. 原著論文

- 1) Takanashi, N., Y. Tomosada, J. Villena, K. Murata, T. Takahashi, E. Chiba, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, Y. Kawai, T. Saito, S. Alvarez, H. Kitazawa. Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated inflammation. *BMC Microbiol.*, 13(54), 1-16 (2013).
- 2) Murata, K., J. Villena, Y. Tomosada, R. Hara, E. Chiba, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, N. Iwabuchi, J.-z. Xiao, T. Saito, H. Kitazawa. Bifidobacteria upregulate expression of toll-like receptor negative regulators counteracting enterotoxigenic *Escherichia coli* mediated inflammation in bovine intestinal epitheliocytes. *Open J. Vet. Med.*, 3(2), 143-155 (2013).

2. 学会発表

- 1) Tomosada, Y., N. Takanashi, K. Murata, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, S. Ikegami, H. Itoh, T. Saito, H. Kitazawa. Advanced application of bovine intestinal epitheliocytes for evaluating regulatory effect of immunobiotics against enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated inflammation. IDF World Dairy Summit 2013, Oct. 28 – Nov. 1, Yokohama, Japan.

表1 本研究で使用したプライマー配列

Primer	Sense primer	Antisense primer	Accession number
β-actin	TGG ATT GGC GGC TCC AT	GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA	NM_173979
TLR1	CAT TCC TAG CAG CTA CCA CAA GCT	TGG GCC ATT CCA AAT AAG TTC T	NM_001046504
TLR2	GGG TGC TGT GTC ACC GTT TC	GCC ACG CCC ACA TCA TCT	NM_174197
TLR3	GGG CAC CTG GAG GTC CTT	TTC CTG GCC TGT GAG TTC TTG	NM_001008664
TLR4	AGC ACC TAT GAT GCC TTT GTC A	GTT CAT TCC GCA CCC AGT CT	NM_174198
TLR5	GTC CCC AAC ACC ACC AAG AG	GCG GTT GTG ACT GTC CTG ATA TAG	NM_001040501
TLR6	TTT ACC CTC AAC CAC GTG GAA	GGG CCA AAG GAA CTG AAA AAC	NM_001001159
TLR7	CAC CAA CCT TAC CCT CAC CAT T	GTC CAG CCG GTG AAA GGA	NM_001033761
TLR8	TGT GTT TAG AGG AAA GGG ATT GG	TCT GCA TGA GGT TGT CGA TGA	NM_001033937
TLR9	CAG TGG CCA GGG TAG TTT CTG	CCG GTT ATA GAA GTG ACG GTT GT	NM_183081
TLR10	TCT ACT GCA TCC CTA CCA GAT ATC C	GGG CCA TTC CAA GTA TGC TTT	NM_001076918
MCP-1	CAC CAG CAG CAA GTG TCC TAA A	CAC ATA ACT CCT TGC CCA GGA T	NM_174006
TNF-α	CGC ATT GCA GTC TCC TAC CA	GGG CTC TTG ATG GCA GAC A	NM_173966
TGF-β	CGT GGA GCT GTA CCA GAA ATA TAG C	CGA GCA GCC GGT TGC T	NM_001166068
IFN-α	GGT GGC AGC CAG TTA CAG AAG	TGC TGG GTC ACC TCA TGG A	Z46508
IFN-β	CGA TGG TTC TCC TGC TGT GTT	GAG CAA GCT GTA GCT CCT GGA A	EU276065
IFN-γ	GGA GGA CTT CAA AAA GCT GAT TCA	GGC TTT GCG CTG GAT CTG	NM_174086
LIF	CTG TCC CAG CAA CCT CAT GA	TGG CAC TGC TGT TGA GTT GTC	NM_173931
IL-1α	CAG TTG CCC ATC CAA AGT TGT T	TGC CAT GTG CAC CAA TTT TT	NM_174092
IL-1β	GAG CCT GTC ATC TTC GAA ACG	GCA CGG GTG CGT CAC A	NM_174093
IL-4	GCC ACA CGT GCT TGA ACA AA	TGC CAA GCT GTT GAG ATT CCT	NM_173921
IL-6	CCA CCC CAG GCA GAC TAC TTC	CCA TGC GCT TAA TGA GAG CTT	NM_173923
IL-7	CAA GCT TCA CCT ATC AAC AGT TTC A	CCC TTG CTG GTG CAG TTC A	NM_173924
IL-8	TGC TCT CTT GGC AGC TTT CC	TCT TGA CAG AAC TGC AGC TTC AC	NM_173925
IL-10	GGC GGT GGA GAA GGT GAA	GGC TTT GTA GAC ACC CCT CTC TT	NM_174088
IL-12	CAG CAA GCC CAG GAA GGA	TGA CAG CCC TCA GCA GGT TT	NM_174355
MKP-1	CGCAGCGCGCAAATCT	CGGGTAGGAAGCAGAAAAAGC	NM_001046452
IRAK-M	ACAGCGGAGCGGCTTTC	CTTGGTCTACATATTTTCAATGTGA	NM_001190299
SIGIRR	GGCAGTGAAGTGATGTGTCA	TCCGTGCGGGCACTGTA	NM_001082443
BCL3	CATGGAACACCCCTGTCA	GGCGTATCTCCATCCTCATCA	NM_001205993
Tollip	CGGGCGTGGACTCTTCTAC	GATGCGGTCTCCATGGA	NM_001039961
ABIN-3	CGCAGAACGAATTGCTGAAA	CACTACGCTCCCTCTGGAAGTC	BC102932

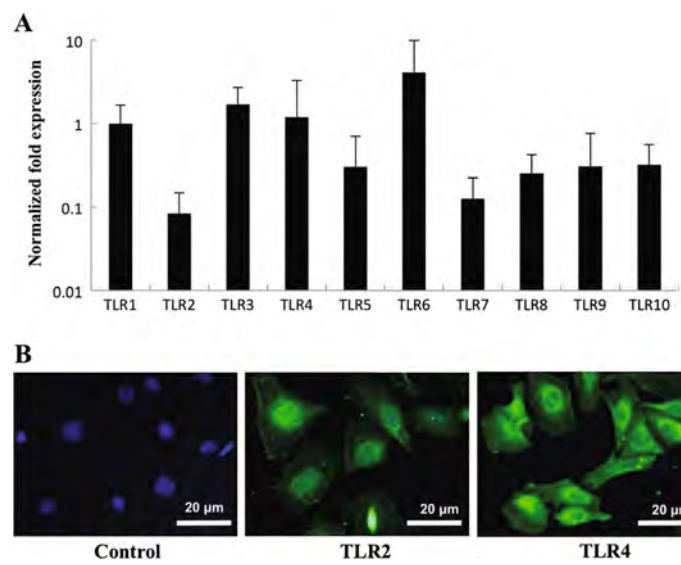


図1 ウシ腸管上皮(BIE)細胞におけるToll様受容体(TLR)発現解析
 (A) BIE細胞におけるTLR1-10のmRNA発現。(TLR1を1とした時の相対発現強度)
 (B) BIE細胞におけるTLR2およびTLR4のタンパク発現。(青が核、緑がTLR2, TLR4を示す)

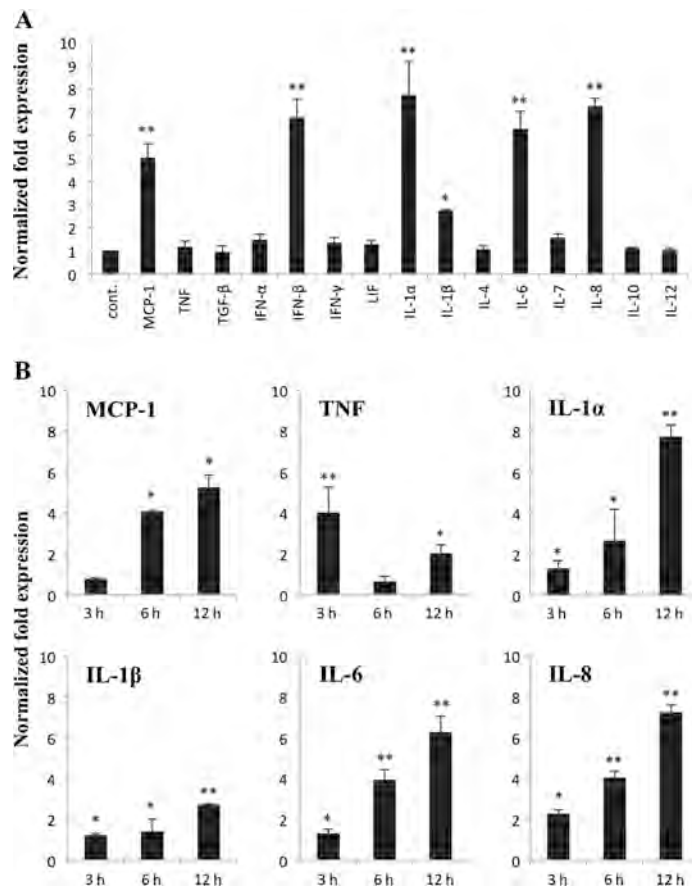


図2 毒素原性大腸菌(ETEC)刺激ウシ腸管上皮(BIE)細胞におけるサイトカインの発現解析
 (A) ETEC刺激12時間後のBIE細胞における各種サイトカイン発現。
 (無刺激を1とした時の相対発現強度、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 無刺激に対する有意差)
 (B) ETECの各種刺激時間におけるBIE細胞からのサイトカイン発現。
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; ETEC刺激0時間に対する有意差)

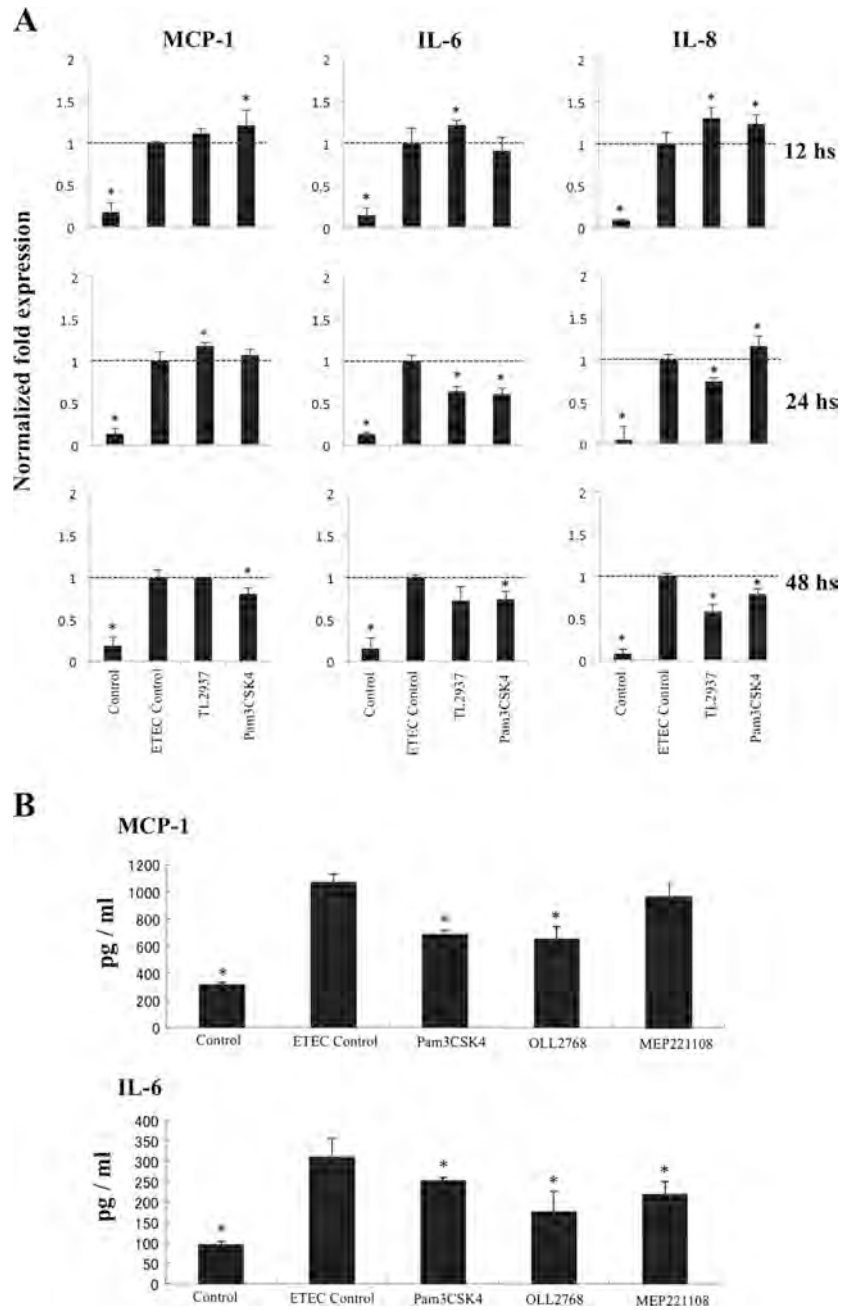
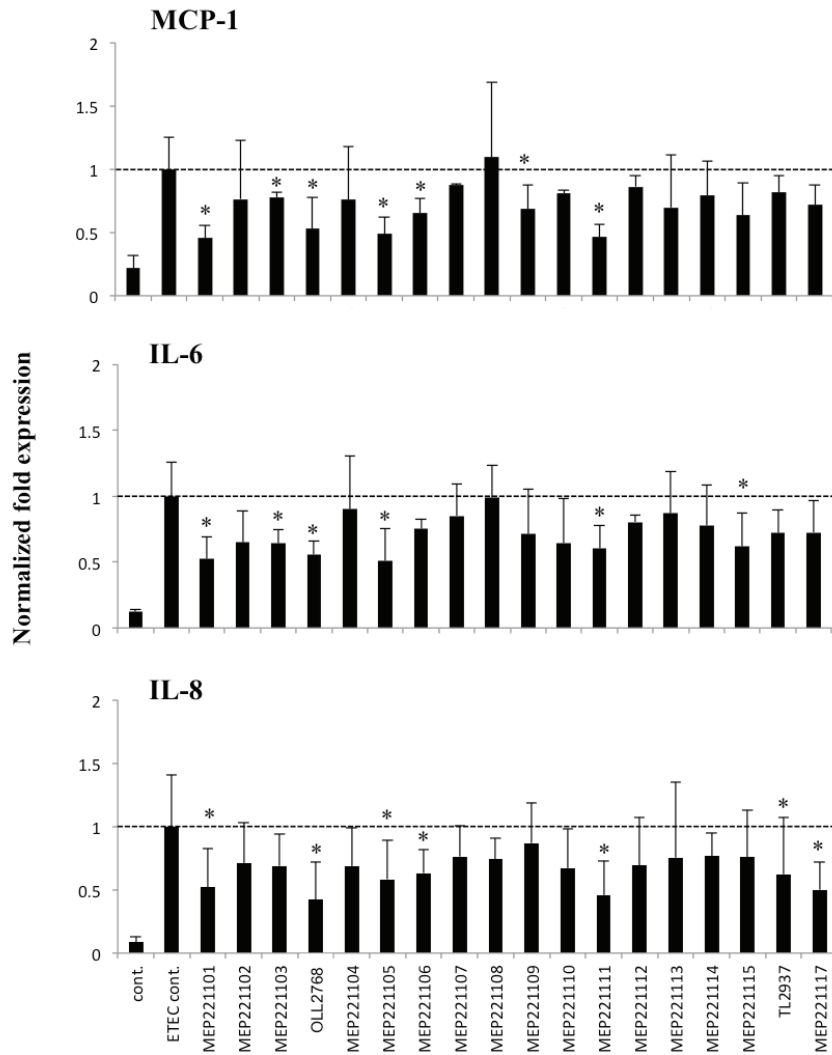


図3 乳酸菌の炎症免疫調節能の評価

(A) *Lactobacillus jensenii* TL2937あるいはPam3CSK4前刺激によるBIE細胞のETECに対する炎症誘導に対する効果(ETEC対照区を1とした時の相対発現強度、* $p < 0.05$; ETEC対照区に対する有意差)

(B) MCP-1およびIL-6のタンパクレベルの解析($p < 0.05$; ETEC対照区に対する有意差)



補足図1 抗炎症性乳酸菌の選抜

(A) 異なる乳酸菌の48時間前刺激によるBIE細胞のETECに対する抗炎症効果 (ETEC対照区を1とした時の相対発現強度、 $p < 0.05$; ETEC対照区に対する有意差)

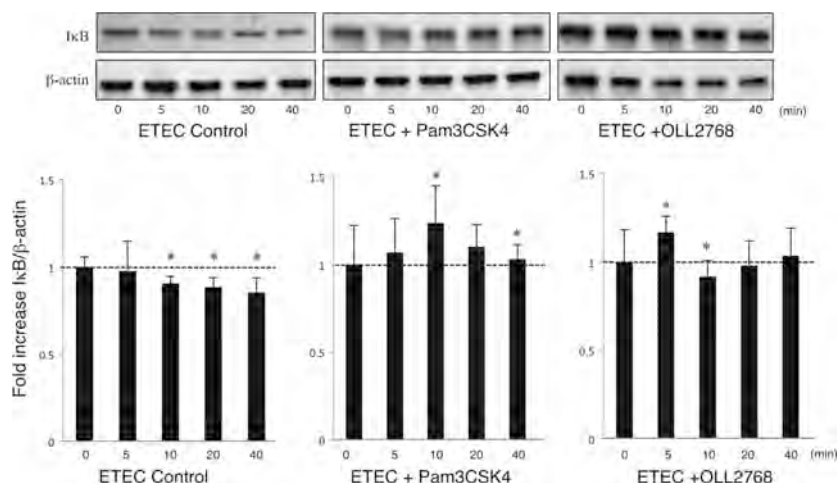


図4 IκBの分解に対する抑制効果

(A) *Lactobacillus casei* OLL2768あるいはPam3CSK4前刺激によるBIE細胞のETEC刺激におけるIκBの分解に対する効果 (ETEC刺激0時間を1とした時の相対強度、*p<0.05; ETEC刺激0時間に対する有意差)

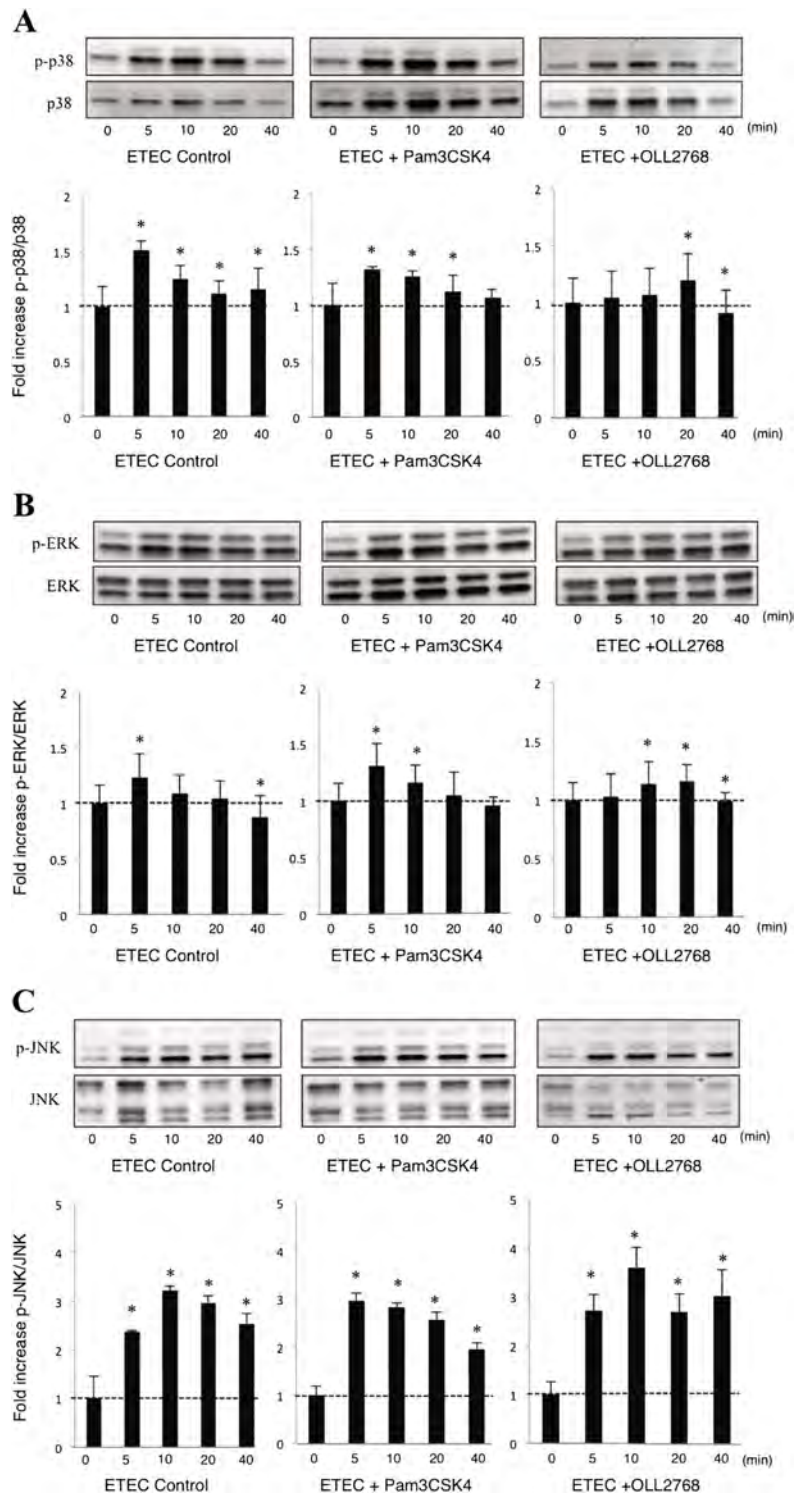


図5 ETEC刺激BIE細胞における炎症シグナル分子(p38, ERKおよびJNK)のリン酸化に対する効果
 (A) p-38, (B) ERK, (C) JNKのETEC刺激後のリン酸化の経時的変化
 (ETEC刺激0時間を1とした時の相対強度、* $p < 0.05$; ETEC刺激0時間に対する有意差)

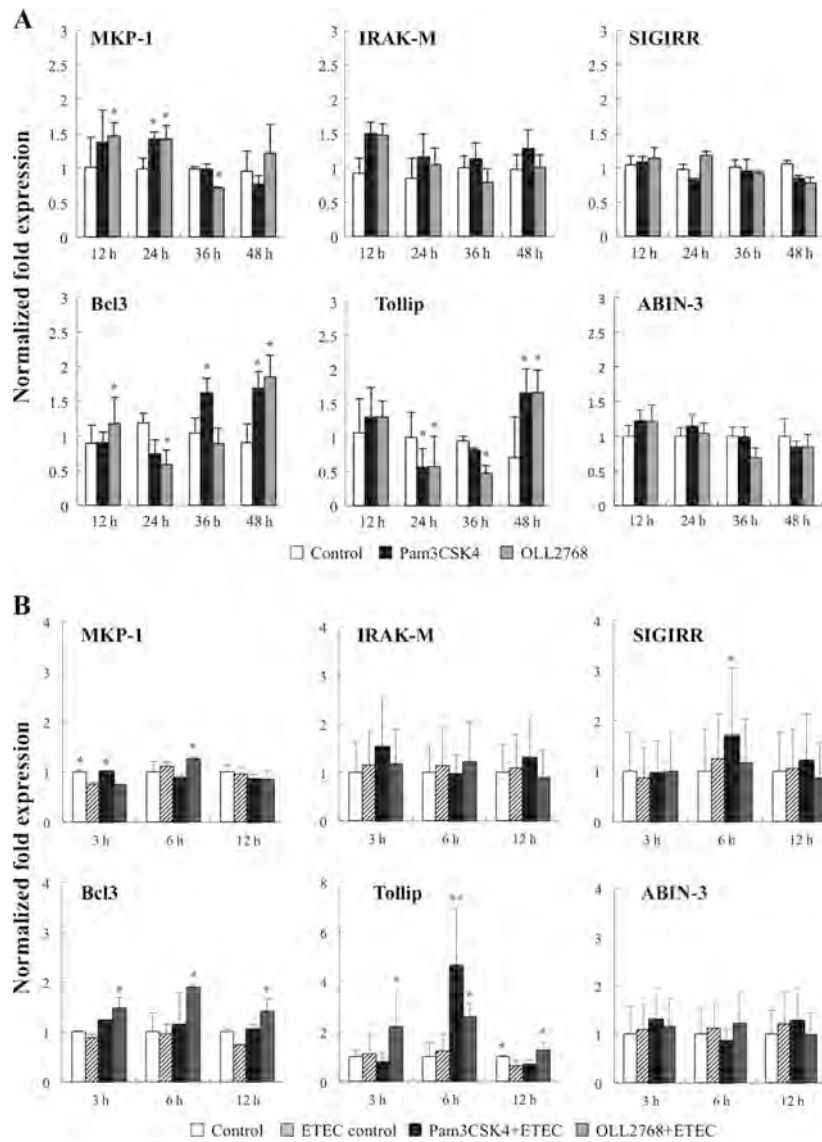


図6 BIE細胞におけるTLRネガティブレギュレーターの発現解析

(A) *Lactobacillus casei* OLL2768あるいはPam3CSK4の刺激によるTLRネガティブレギュレーターの発現 (* $p < 0.05$; 各種時間の無刺激対照区に対する有意差)

(B) *Lactobacillus casei* OLL2768あるいはPam3CSK4前刺激48時間のBIE細胞におけるETEC刺激に対するTLRネガティブレギュレーターの発現

(* $p < 0.05$; 各種刺激時間におけるETEC刺激対照区に対する有意差)

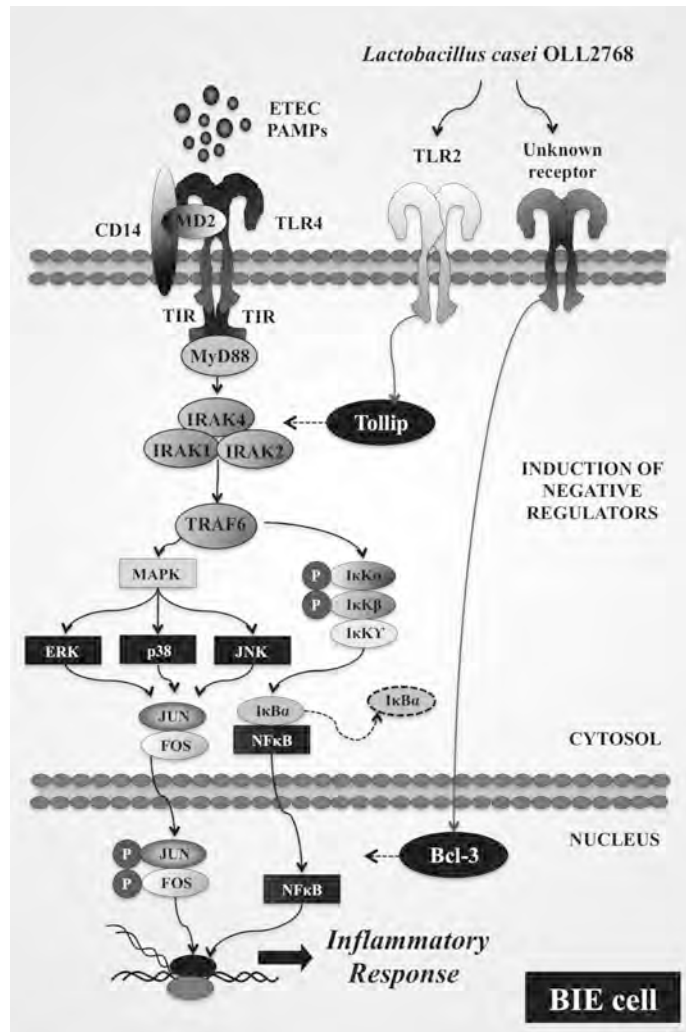


図7 *Lactobacillus casei* OLL2768のBIE細胞におけるETEC刺激に対する抗炎症の推定機構

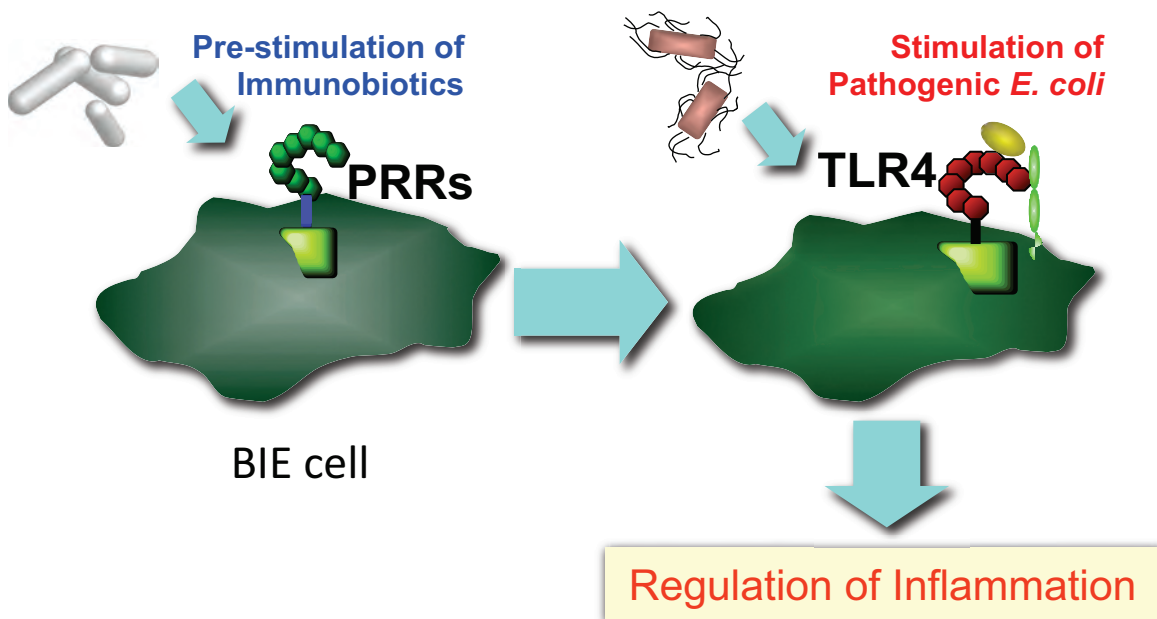


図8 BIE細胞における抗炎症性イムノバイオティクスの評価系構築