

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850190

研究課題名(和文) 乳酸菌の皮膚角化細胞炎症応答抑制に基づくアトピー性皮膚炎改善効果の検証

研究課題名(英文) Verification of ameliorating effect of lactic acid bacteria on atopic dermatitis based on the suppression of proinflammatory response of keratinocytes

研究代表者

河原 岳志 (KAWAHARA, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30345764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乳酸菌の炎症シグナル調節作用に着目し、皮膚角化細胞を通じた炎症応答制御の可能性について検討を行ったものである。細胞培養系での検討により、一部のLactobacillus族乳酸菌株にヒト皮膚角化細胞からのTARC(胸腺および活性化制御ケモカイン)発現を抑制する働きがあることを明らかにした。TARC抑制作用の強い乳酸菌株の生体塗布による症状の発症に及ぼす効果についてアトピー性皮膚炎モデルマウスで確認を行ったところ、菌体破碎後抽出物の塗布により、皮膚炎の発症に有意な抑制効果が観察された。以上の結果から乳酸菌の皮膚炎予防剤としての利用の可能性につながる研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at evaluating the regulatory effect of lactobacillus strains on the proinflammatory responses in keratinocytes. Cell culture study showed that some Lactobacillus strains suppressed the expression of TARC (thymus and activation-regulated chemokine) in human keratinocyte cell line. Significant inhibitory effect on the development of dermatitis was observed by topical application of an extract obtained from disrupted bacterial body of the TARC-suppressive strain in atopic dermatitis model mice. The study showed that a possibility of novel usage of a lactobacillus strains as a prevention material against the development of atopic dermatitis.

研究分野：動物生命科学

キーワード：乳酸菌 皮膚角化細胞 アトピー性皮膚炎 ケモカイン TARC

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は種々のパターン認識受容体を介して生体細胞の応答に調節的な役割を果たすことが明らかとなってきた。研究代表者らは過去に、即時型アレルギー症状に深く関わる免疫細胞であるマスト細胞のアレルギー性応答の指標となる炎症応答(脱顆粒反応や炎症性サイトカイン応答など)が、Toll様受容体2(TLR2)を介する乳酸菌刺激により、長時間抑制されることを報告した。このような調節作用はマスト細胞にとどまらず、より多くの細胞においてシグナル伝達さらにはそれが深く関与する疾病症状の緩和にも役立つ可能性がある。

皮膚角質細胞におけるTLR2発現ならびにそれらが産生するケモカインの誘導のアトピー性皮膚炎発症への関与という近年明らかになってきた知見に基づくと、TLR2を介して炎症を抑制する機能性をもつ乳酸菌との接触により、ケモカインの抑制が起こりうるか、またこれが実際に皮膚炎の症状の改善に応用できるのかが焦点となる。本研究課題はこのような背景をもとに行われた。

2. 研究の目的

本研究課題では、免疫細胞に対して病原体関連分子パターンを認識する受容体であるTLR2を介して他の炎症応答の抑制状態を誘導する機能性をもつ乳酸菌が、皮膚角化細胞のケモカイン産生応答に対して抑制作用を有するか、またこの作用が生体において実際にケモカインが関与する皮膚炎症状の改善に応用できるかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞

皮膚角化細胞への直接的な作用を評価するため、自発的不死化性で非腫瘍形成性ヒト皮膚角化細胞株であるHaCaT細胞をCell Lines Service社より購入し使用した。細胞の継代培養には、10%非働化ウシ胎児血清を添加した高グルコース含有DMEMに抗生物質としてペニシリン-ストレプトマイシンを加えたものを用い、5% CO₂、37 °Cの条件下で培養を行った。

(2) 乳酸菌

Lactobacillus 属乳酸菌株は、理化学研究所バイオリソースセンター(茨城)より購入した。個々の乳酸菌株はMRS増殖培地を用い、29 °Cで培養した。増殖を確認後、培養液を3000 × gで10分間遠心分離して沈殿物を得た。得られた沈殿物から完全に培地成分を除

去するために超純水で3回遠心分離を行った。この沈殿物を-80 °Cで保存し、凍結乾燥を行った。

検討には、この凍結乾燥菌体をエンドトキシンプリーの超純水に懸濁してサーマルサイ클ラーを用いて70 °Cで30分間加熱処理したものを使用した。

(3) TARC誘導試験

HaCaT細胞を、10% FBS添加完全DMEM培地に懸濁し、24ウェル培養用マイクロプレートに播種した。まずHaCaT細胞に対し各種乳酸菌をそれぞれ100 µg/mLで24時間作用させ、既報にないヒトTNF-αとヒトIFN-γをそれぞれ終濃度10 ng/mLで添加しTARCを誘導した。6時間後の細胞を回収してTRI ReagentでRNAを調製し、TARC発現状態について定量RT-PCR法で確認を行った。

(4) RT-PCR法

RNA 1 µgに対してRandomプライマー、M-MLV Reverse Transcriptaseを加えてサーマルサイ클ラーPTC-200により42 °Cで50分間反応させて逆転写反応を行った。得られたcDNAにプライマーとSYBR Premix Ex Taqを加え、製品のプロトコールに従いEco Real-Time PCR Systemにより定量PCRを行った。HaCaT細胞のPCRはすべて95 °Cで15秒、60 °Cで10秒、72 °Cで20秒を40サイクルの条件で行った。得られた各結果の数値はSystem TP800ソフトウェアを用いてΔΔCT法により解析を行い、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量をもとに標準化を行った。

(5) RNA干渉試験

実験前日にHaCaT細胞を抗生物質不含の10%FBS入りDMEM培地に懸濁し、24ウェル培養用マイクロプレートに0.5 × 10⁵ cells/ウェルとなるように1 mLずつ播種した。当日に、1ウェルあたり100 µLのOpti-MEM Reduced Serum Medium、3 µLのTLR2 siRNA、1.5 µLのLipofectamine RNAiMAX Transfection Reagentを混合し、siRNA溶液を調製した。またコントロールとして、同量のOpti-MEM培地を用意した。その後培地を捨て、新鮮な抗生物質不含DMEM培地を200 µL/ウェルずつ分注し、そこに上記のsiRNA溶液を100 µL/ウェルずつ添加した。そして37 °C CO₂インキュベーターで48時間培養後、TLR2とGAPDHのmRNA発現量について定量RT-PCR法で確認を行った。TLR2のmRNA発現ならびにタンパク質は発現量に抑制がみられることを確認し、乳酸菌のTARC発現に及ぼす影響を評価した。

(6) 乳酸菌破碎後水抽出物(LW)の分画

乳酸菌分画物を調製するにあたり、ビーズ式ホモジナイザーBead-Beaterの容器に25

mL容積ほどの0.1 mmガラスビーズを加え、乳酸株を50 mL程度の氷冷した0.1 M クエン酸緩衝液(pH4.7)に懸濁したものを50 mL加えた。容器を機器にセットして15,800 rpmの条件で1分間の破碎処理を3回行った。その後、破碎液を50 mL遠心管に回収し、3000 rpmで10分間遠心してビーズを取り除いた。そこに1-ブタノールを加え手で激しく懸濁したのち、30分間氷上に静置した。その後3000 rpmで20分間遠心して得られた水相を透析し、凍結乾燥したものを乳酸菌破碎後水抽出物(LW)として塗布試験に使用した。

(7) マウス

NC/Nga系マウス(8週齢、♂)は日本エスエルシー(静岡、日本)より入手し、 23 ± 3 での12時間の点灯・消灯サイクルの条件下で飼育を行った。動物試験の実施にあたっては、信州大学動物実験委員会の示すガイドラインに従った。

(8) 塗布試験

市販マウス用固形資料で飼育したマウスをコントロール群ならびに1回あたり0.1 mgのLWを塗布する群(0.1 mg LW群)、同じく1 mgのLWを塗布する群(1 mg LW群)の試験区に振り分け、28日間の塗布試験を行った。塗布試験開始日にイソフルラン麻酔下で背部および耳介部を毛刈りし、4% SDS水溶液を背部および耳介部に滴下しながら均一に塗布し、3時間後に一匹当たり80%エタノールに溶解させたLW(コントロール群には80%エタノールのみ)を背部および耳介部に均一に塗布した。さらに試験開始8日目からは同量のLWをコナヒョウヒダニ抗原入り軟膏剤のピオスタAD 100 mgとともに、週に2回の塗布を行った。試験期間中は、7日おきに写真撮影、皮膚炎症スコア測定を行い、初日から14日おきに尾静脈より採血を行った。また試験開始28日目に、マウスを安楽死させ、炎症誘導を行った背部病変皮膚を採取した。

(9) 皮膚症状スコアの測定

皮膚症状の測定は、4% SDS水溶液塗布の直前に行った。皮膚症状は発赤・出血、浮腫、擦創・びらん、痂皮形成・乾燥の4項目について、無症状、軽度、中等度、高度の4段階で評価し、それぞれを0, 1, 2, 3点とスコアリングしてその合計点を算出し評価を行った。

(10) 皮膚解析

試験期間最終日に安楽死させたマウスから炎症を誘導した背上部皮膚を採取し、10%中性ホルマリン緩衝液中で固定した。その後、組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、キムザ染色による組織学的解析を行った。

また背部皮膚のTARC遺伝子発現量は、マウスより回収した背部皮膚の一部をTRI

Reagentに溶解させたものを使用し、定量RT-PCR法にてTARCの発現状況について確認を行った。

(11) 統計分析

得られた結果の統計分析はスチューデントt検定により行った。RT-PCRは両側検定、アレルギースコアは片側検定の条件でそれぞれ行った。P値が0.05より小さい場合を有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) TARC誘導試験

HaCaT細胞における胸腺および活性化ケモカイン(TARC)発現はTNF- α とIFN- γ による誘導において、非誘導時と比較して約4.4倍の増加を示した。検討した乳酸菌株のうち、*Lactobacillus reuteri* JCM 1112株において最も強い抑制効果が観察され、菌体無添加時のTARC発現と比べ約68.4%の抑制率であった。この結果を受け、これ以降JCM 1112株を用いた詳細な検討を行うこととした。

(2) 抑制メカニズムの解析

抑制メカニズムをより詳しく解析するため、抑制作用が最も強かったJCM 1112株を用いてTNF- α とIFN- γ をそれぞれ単独でHaCaT細胞に作用させた条件での検討を行った。その結果、TNF- α とIFN- γ は単独でもTARCの発現を誘導した。それぞれの条件でJCM 1112株で前処理を行ったところ、未処理の条件と比較しTNF- α によるTARC誘導に約25.4%の抑制効果が示され、IFN- γ によるTARC誘導には影響しないことが明らかとなった。

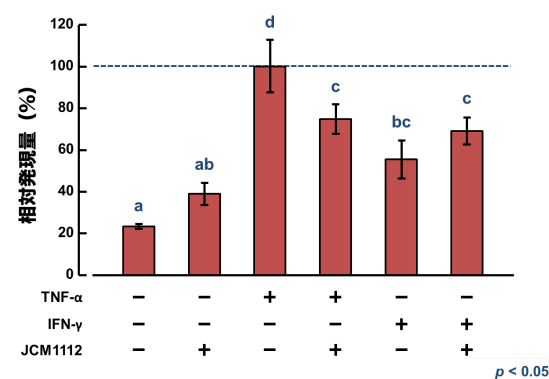


図1. サイトカインで誘導したTARC発現にJCM 1112株が及ぼす影響

(3) RNA干渉試験

JCM 1112株の抑制作用に対するTLR2の関与を検討するため、TLR2をTLR2 siRNAの導入でノックダウンさせた状態でJCM 1112株を作用させ、TNF- α によるTARC誘

導を行った。その結果、TLR2 をノックダウンするとJCM 1112株のTARC発現抑制効果が消失することが明らかとなった(図2)。IFN- γ によるTARC発現に対しても同様の検討を行ったが、TLR2発現下での乳酸菌添加の状態と有意な変化はみられなかった。

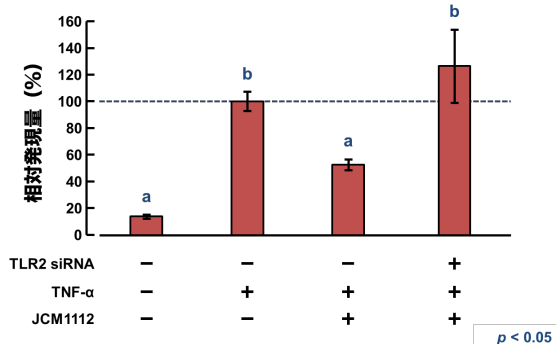


図2. TLR2 ノックダウン条件下におけるTARC発現にJCM 1112株が及ぼす影響

(4) 皮膚症状

LWを塗布したNC/Nga系マウスの試験期間中における皮膚症状スコアの変化を図3に示した。皮膚スコアは塗布試験開始21日目の1 mg LW群においてコントロール群と比較して優位に低下した。21日目から1 mg LW群を除くすべての群において背上部皮膚の痂皮・乾燥が顕著に表れ、皮膚症状スコアに統計上の有意差がみられた。なお、試験期間中を通じて0.1 mg LW群と1 mg LW群のマウスの体重はコントロール群と比較して統計上の有意差はなかった。

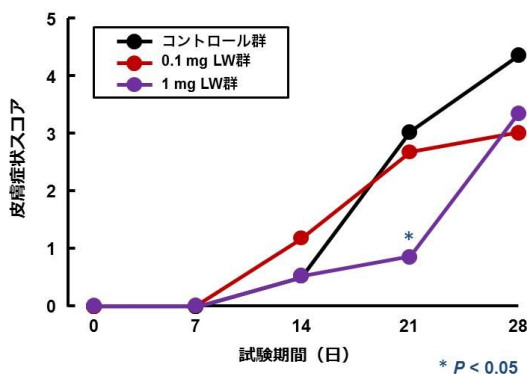


図3. JCM 1112株LW塗布のNC/Nga系マウス皮膚症状に及ぼす影響

(5) 背上部皮膚の組織学的変化

試験終了後、ヘマトキシリン・エオジン染色により炎症を誘導した皮膚部位断片の観察を行ったところ、コントロール群では痂皮形成、表皮の肥厚、潰瘍形成、真皮の好中球を主体とした炎症性細胞浸潤、繊維芽細胞および膠原繊維の増生が認められた。しかし、

0.1 mg LW群では痂皮形成がコントロール群より弱く、表皮の潰瘍形成は見られなかった。また、1 mg LW群においては皮下組織の炎症性細胞浸潤が軽度認められた程度であった。また同皮膚部位のキムザ染色の結果、コントロール群および0.1 mg LW群において好酸球の浸潤が軽度に見られたが、1 mg LW群はごく軽度で生理的範囲の浸潤であった。また、肥満細胞の浸潤はすべての群において真皮および皮下組織で軽度認められた。

(6) 背上部皮膚におけるTARC発現量

アトピー性皮膚炎のLWによる軽減作用を検討するため試験後の背上部皮膚におけるTARCの発現量を定量RT-PCR法により解析した結果を図4に示した。1 mg LW群の背上部皮膚TARC遺伝子発現がコントロール群と比較して52%低下し、統計上の有意差がみられた。

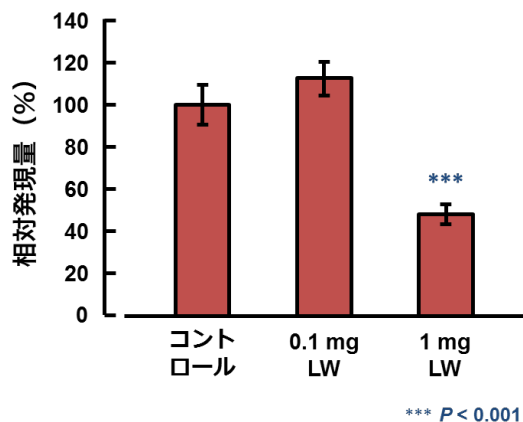


図4. JCM 1112株LW塗布の炎症誘導部位TARC発現に及ぼす影響

以上本研究を通じて、TLR2リガンドとして作用することで知られる*Lactobacillus*属乳酸菌の新たな機能性として、皮膚角化細胞単独の培養系におけるTARC発現抑制作用が明らかとなった。

またアトピー性皮膚炎モデルNC/Nga系マウスにおいて、TARCを抑制する乳酸菌株のLWは、塗布部位のTARC産生を抑制することで、アトピー性皮膚炎の発症を軽減する可能性が示された。これらは皮膚角化細胞培養系で確認された効果が生体においても機能することを示唆するものであり、アトピー性皮膚炎モデル動物と位置づけられるNC/Nga系マウスでの効果が実証されたことにより、ヒトのアトピー性皮膚炎においてもLWの塗布が症状の予防や改善に有効である可能性が示された。この菌体塗布により懸念された、副作用的なアレルギー応答や炎症の誘導を示す兆候は観察されなかった。

課題としては、NC/Nga系マウスへの塗布試験により1 mg LW塗布による皮膚スコアの減少やアトピー性皮膚炎の有意な抑制作

用は確認されたものの、試験期間終盤において作用が弱まる傾向がみられたことが挙げられる。この要因をさらに追求したところ、LW のエタノールへの溶解性が、長期の動物試験期間中に低下してくることが明らかとなった。より深部の皮膚角化細胞まで有用乳酸菌株の成分が到達させることを可能にする長期に安定的な浸透性を確保するための菌体画分調製方法のさらなる開発が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Kawahara, T., Nakayama, D., Tanaka, K., Yasui H.,
Food Science and Technology Research, **21**(2):223-230 2015, 査読有,
Effect of oral administration of the IgE-suppressive wild yeast strain *Saccharomyces paradoxus* P01 on the development of atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice

Kawahara, T., Tomono, T., Hamauzu, Y., Tanaka, K., Yasui, H.,
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014:365831 2014, 査読有,
Inhibitory effect of a hot-water extract of Japanese big-leaf magnolia (*Magnolia obovata*) on rotavirus-induced diarrhea

Kawahara, T., Nakayama, D., Toda, K., Inagaki, S., Tanaka, K., Yasui, H.,
Food Science and Technology Research, **19**(6):1019-1027 2013, 査読有,
Suppressive effect of wild *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains on IgE production of mouse spleen cells

〔学会発表〕(計 7件)

Lactobacillus 属乳酸菌抽出物塗布のアトピー性皮膚炎発症に及ぼす効果,
河原岳志, 杉山 京, 伊藤綾花, 田口 丈,
日本畜産学会第 121 回大会, 平成 28 年 3 月 29 日, 東京.

乳酸菌の皮膚角化細胞における脱ユビキチン化酵素誘導による TARC 発現抑制の可能性,
原 大貴, 杉山 京, 河原岳志,
日本酪農科学会 2015 年度大会, 平成 27 年 9 月 25 日, 北海道.

Lactobacillus 属乳酸菌の皮膚角化細胞ケモカイン抑制機構の解析,
河原岳志, 杉山 京,
日本畜産学会 第 119 回大会, 平成 27 年 3 月 29 日, 栃木.

酒造用野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S03 株の NC/Nga 系マウスにおけるアトピー性皮膚炎抑制作用,
河原岳志, 渡辺毅哉, 中山大地, 保井久子,
日本農芸化学会 中部支部 第 171 回例会, 平成 26 年 10 月 11 日, 名古屋.

Lactobacillus 属乳酸菌の皮膚角化細胞 TARC 発現に対する抑制効果,
河原岳志, 半澤七海,
日本酪農科学会 2014 年度大会, 平成 26 年 9 月 12 日, 東京.

朴葉熱水抽出物中に存在する ロタウイルス感染抑制成分の解析,
河原岳志, 友野拓真, 瀧渦康範, 田中勝已, 保井久子,
日本農芸化学会 2014 年度大会, 平成 26 年 3 月 29 日, 神奈川.

Lactobacillus 属乳酸菌の皮膚角化細胞ケモカイン発現に対する抑制効果,
河原岳志, 半澤七海,
日本畜産学会 第 118 回大会, 平成 26 年 3 月 28 日, 茨城.

〔産業財産権〕
取得状況 (計 1件)

名称: マルメロ抽出物
発明者: 瀧渦康範, 河原岳志, 井ノ上利文
権利者: 株式会社ジューボンインターナショナル, 国立大学法人 信州大学
種類: 特許
番号: 特許第 5896368 号
出願年月日: 平成 26 年 9 月 4 日
取得年月日: 平成 28 年 3 月 11 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者
河原 岳志 (KAWAHARA, Takeshi)
信州大学・学術研究院農学系・准教授
研究者番号: 30345764