The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The Lactic Acid Bacterium Pediococcus acidilactici Suppresses Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing IL-10-Producing Regulatory T Cells
Author(s)	髙田, 和城
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59004
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【58】

氏　　名	髙　田　和　城（たか　た　かず　しろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５１０４　号
学位授与年月日	平成24年３月22日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	The Lactic Acid Bacterium Pediococcus acidilactici Suppresses Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing IL-10-Producing Regulatory T Cells （腸管免疫を利用した乳酸菌によるEAEの治療）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　望月　秀樹 （副査） 教　授　山下　俊英　　教　授　宮坂　昌之

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目的　〕

多発性硬化症の発症要因には環境要因が関与していることが知られている。中でも食習慣の変化に伴う腸内細菌叢、腸管免疫の変化が重要ではないかと考え、腸管免疫に好影響を及ぼすことが期待される乳酸菌のEAEにおける効果と作用機序の解析をおこなった。

〔　方法と成績　〕

EAE は C57/BL6 マウスに myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG $_{35\text{-}55}$)ペプチドと完全フロイントアジュバンド(CFA)を皮下注射後、百日咳毒素(PT)を 2 回(同時および 48 時間後)腹腔内注射をおこなった。SJL/J マウスには proteolipid protein (PLP$_{139\text{-}151}$)ペプチドと CFA の皮下注射をおこなった。乳酸菌は培養後、回収し 80℃30 分にて殺菌処理した後に凍結乾燥を行い 4℃で保存したものを用いた。予防投与実験として免疫 2 週間前から実験終了まで乳酸菌（Pediococcus acidilactici R037）の投与を行った。C57/BL6 マウスには乳酸菌 4mg/day を経口ゾンデを用いて投与し、SJL/J マウスには給水ボトルにて乳酸菌 0.8mg/ml(1 日投与量約 4mg)の投与を行った。コントロール群には水のみを投与した。C57/BL6 マウス及び、免疫抗原の異なる SJL/J マウス共に R037 投与群において EAE のピーク時のクリニカルスコアの有意な軽減を認めた(C57/BL6 マウス 3.6±0.3 vs. 4.9±0.3; p =0.013, SJL/J マウス 1.5±0.2 vs. 2.9±0.4; p =0.012)。また治療的投与実験として C57/BL6 マウス免疫 11 日目より実験終了まで給水ボトルにて乳酸菌 0.8mg/ml 投与をおこなった。乳酸菌において投与開始 2-7 日目のクリニカルスコアの area under curve の有意な改善を認めた(18.0±1.9 vs. 24.3±2.2; p =0.039)。

中枢神経への細胞浸潤を評価するためにC57/BL6マウスのEAE免疫22日後のマウスをPFA還流後、脊髄腰膨大を採取し凍結切片を作製した。HE染色をおこない細胞浸潤の程度を半定量的評価を用いて行い、乳酸菌群での有意な細胞浸潤の低下を認めた。

EAE誘導後の抗原特異的な免疫反応を調べるため、C57/BL6マウスを用いて全身の免疫動態を反映するとされている発症時(免疫11日後)の所属リンパ節、脾細胞よりリンパ球を採取しMOGペプチド100μg/mlで再刺激を行った。72時間後の細胞上清のIL-17, IFN-γ, IL-10をELISAで測定をおこなったところ所属リンパ節ではIL-17、脾臓ではIL-17, IFN-γの有意な低下を認めた。

乳酸菌による腸管免疫の変化を明らかにするため C57/BL6 マウスに乳酸菌を 2 週間投与した段階での脾細胞、腸管膜リンパ節、小腸粘膜下層よりリンパ球を採取した。CD3 抗体および CD28 抗体を用いて T 細胞への非特異的刺激を行い 72 時間後のサイトカイン産生の評価をおこなった。IL-17, IFN-γ 産生は 2 群間で差を認めなかったものの、有意な IL-10 産生増加を腸間膜リンパ節、脾臓において認めた。また同部位での IL-10 産生細胞を調べるために採取したリンパ球の PMA/ionomycin による刺激後の CD4 および IL-10, FoxP3 の FACS 解析を行ったところ、腸間膜リンパ節、脾臓において CD4 陽性 FoxP3 陰性 IL-10 産生細胞(Tr-1 細胞)の比率の増加を認めていた。

〔　総括　〕

乳酸菌のR037経口投与により発症時の抗原特異的なIL-17, IFN-γの産生を低下させ、中枢神経への細胞浸潤および症状の改善を認めることを示した。またR037の投与のみで腸管膜リンパ節、脾臓でのCD4陽性細胞中のTr-1の比率が増加しており、症状の改善に関与している可能性があると考えられた。

腸内環境を制御することが多発性硬化症の発症予防や治療につながる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

腸管免疫の制御による多発性硬化症の治療を目的とし、腸管免疫動態に影響を及ぼすことが期待される乳酸菌のEAE (experimental autoimmune encephalomyelitis)における効果と作用機序の解析をおこなった。

C57BL/6マウス、SJL/Jマウスに免疫2週間前から実験終了まで乳酸菌群（Pediococcus acidilactici:R037）には菌体 4 mg/day、コントロール群には蒸留水を投与した上でEAEを誘導した。乳酸菌投与時、発症時のT細胞刺激時のサイトカイン産生の解析および乳酸菌投与による腸管膜リンパ節、粘膜固有層のリンパ球のFACS解析を行った。

R037投与群においてEAEのクリニカルスコアの軽減と脊髄炎症細胞浸潤の減少を認めた。乳酸菌投与時およびEAE発症時のリンパ球の解析を行ったところ、R037を2週間投与した時点での腸管膜リンパ節、脾臓でのCD4陽性IL-10産生細胞の増加を認め、EAE発症時では所属リンパ節、脾臓の抗原再刺激によるIL-17、IFN-γの産生低下を認めた。

R037投与によりEAEの症状は改善し、乳酸菌投与により腸管膜リンパ節でのCD4陽性FoxP3陰性IL-10産生細胞を増加させることから、R037は誘導した抑制性T細胞を介してEAEの症状を改善している可能性があり、腸管免疫を用いた多発性硬化症の可能性を示した研究であり、学位に値すると考える。