

乳幼児期の未発達な腸管免疫系に対する プロバイオティクスの効果の検証 —成熟期の免疫系に対する効果との比較—

井 上 亮

京都市立大学大学院生命環境科学研究科動物機能学研究室 講師

緒 言

腸管は栄養吸収器官であると共に体内最大の免疫器官でもある。腸管にはおよそ450種類の腸内細菌が定着しており、その総数は約 10^{14} 個とされている¹⁾。また、生体は呼吸や飲食によって日々莫大な量・種類の微生物や抗原を取り込んでおり、腸管の粘膜面はそれらの抗原に絶えず接している。そのため、腸管は病原体の侵入を受けやすく、絶えず感染に備える必要がある。そこで腸管には、有害か無害かを判断し有害な抗原(病原菌)のみを効率的に排除するための防御システムが備わっており、これを腸管免疫系と呼ぶ。

腸管免疫系は出生児には抗原感作を受けていない未熟な状態である。腸管免疫系の発達には腸内細菌叢による刺激が不可欠であることが無菌マウス等を使用した研究により明らかになっている。例えば、腸内細菌を持たない無菌マウスでは通常マウスと比較して、小腸および大腸粘膜固有層のIgA産生細胞が少なく腸管腔へのsIgA分泌が少ない²⁾ことが知られている。一方、無菌マウスの腸内に細菌を定着させると、小腸および大腸粘膜固有層のIgA産生細胞数が増加する³⁾。

発達過程にある乳幼児期の腸管免疫系は、T細胞やIgA産生細胞数をはじめ、IgA分泌量や抗菌ペプチド発現量など多くの点で成熟した腸管免疫系と異なっている。例えば、ヒトでは、1歳半の幼児の糞便中IgA濃度は、成人のおよそ半分である(Inoue et al. 未発表データ)。マウスの場合では、哺乳期(2週齢)のマウス小腸におけるT細胞(CD3陽性細胞)数は5週齢のもの約半分であり⁴⁾、IgA産生細胞数に至っては1/10以下である⁵⁾。

プロバイオティック乳酸菌は、乳幼児から老人まで幅広い年齢層に利用(処方)されており、近年では新生児にも利用ははじめられている。例えば、*Lactobacillus rhamnosus* strain GGを5ヵ月齢のアトピー性皮膚炎乳

児に摂取させたところ、皮疹スコアの改善が見られたことが報告されている⁶⁾。

上述のように、腸管免疫系は発達過程である乳幼児期と成熟後では免疫細胞数など多くの点で異なっている。そのため、同量のプロバイオティック乳酸菌を摂取しても効果が異なる可能性が高い。しかし、プロバイオティック乳酸菌の免疫刺激・調節効果について乳幼児期、成熟期の各時期をターゲットにそれぞれに多くの研究がなされているものの、両者を包括的に研究した報告はほとんどない。プロバイオティック乳酸菌の研究を進めるうえで乳幼児期、成熟期の効果や差異を包括的に研究することは、各時期のより適切な摂取量や効果を知るうえで重要な要素である。

そこで本研究では、異なる免疫刺激能を持つ2種類のプロバイオティック乳酸菌を哺乳期と成熟後のマウスに投与し、その腸管免疫系への影響をDNAマイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析することで、幼少期・成熟期の腸管免疫系に対するプロバイオティック乳酸菌の免疫刺激効果の差異を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

供試動物

日本SLCより哺乳期マウスとして7日齢のBalb/cマウスを雌雄各15頭、成熟マウスとして7週齢のBalb/cマウス雌雄15頭を購入した。導入後、1週間の馴致期間を設け、哺乳期マウスは14日齢で、成熟マウスは56日齢(8週齢)で実験に使用した。

マウスへの投与試験

哺乳期、成熟マウスの両方で対照群、*Lactobacillus gasseri* LD (LD: Low Dose) 群、*L. gasseri* HD (HD: High Dose) 群、*L. plantarum* LD群、*L. plantarum*

表1 各実験群名、本文中の略記、投与菌株および投与量

群名	略記	投与菌株	投与量 (体重100g当たり)
哺乳期 マウス (Suckling)	Control	S-Control	—
	<i>Lactobacillus gasseri</i> LD	S-LG-LD	<i>Lactobacillus gasseri</i> A株
	<i>Lactobacillus gasseri</i> HD	S-LG-HD	<i>Lactobacillus gasseri</i> A株
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LD	S-LP-LD	<i>Lactobacillus plantarum</i> B株
	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD	S-LP-HD	<i>Lactobacillus plantarum</i> B株
成熟 マウス (Adult)	Control	A-Control	—
	<i>Lactobacillus gasseri</i> LD	A-LG-LD	<i>Lactobacillus gasseri</i> A株
	<i>Lactobacillus gasseri</i> HD	A-LG-HD	<i>Lactobacillus gasseri</i> A株
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LD	A-LP-LD	<i>Lactobacillus plantarum</i> B株
	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD	A-LP-HD	<i>Lactobacillus plantarum</i> B株

HD群の計5群を設定した(表1)。1群当たり6頭とし、哺乳期マウスは各群の平均体重が均等になるように7日齢で腹仔間で仔の入れ替えを行い、雌雄混合の群とした。成熟マウスは各群それぞれ雄雌3頭ずつとした。投与期間は7日間とし、体重に応じて乳酸菌濃度を調整し、哺乳期マウスには100 μ lを成熟マウスには200 μ lを毎日16時に投与した。

剖検および試料採取

幼少期マウスは21日齢、成熟マウスは63日齢(9週齢)で解剖を行った。マウスを全身麻酔下におき、頸部切開により脱血後、開腹し、回腸を摘出した。回腸は開裂後内容物を除去し、スライドグラスでスクレイプして腸管粘膜を採取した。回腸粘膜はRNAlaterに浸潤し、4℃で一晩静置した後、-80℃で実験使用時まで保存した。

腸管粘膜からの全RNA抽出

QuickGene RNA tissue kit S II (KURABO) を用いてRNAlater中で凍結保存した回腸粘膜から全RNAを抽出した。抽出方法は添付プロトコルに準拠し、QuickGene-Mini 80を用いて全RNAを抽出・DNase処理を行った。

DNA マイクロアレイ解析

抽出したRNA100 ngを使用してcRNA合成およびラベル化反応を行った。操作は全てLow Input Quick Amp Labeling Kit, one color (Agilent) のプロトコルに従った。得られたcRNAサンプルは増幅効率およびラベル化効率を確認した後、SurePrint G3 Mouse GE 8x60Kの各アレイに添加し、65℃で一晩ハイブリダイズした。ハイ

表2 *L. gasseri*投与群において対照群に対して統計的有意 ($p<0.05$) な変動がみられた遺伝子数 (全55,622遺伝子中)

	成熟マウス	哺乳期マウス	共通
LD群	2698	1598	114
HD群	2046	1695	40

表3 *L. plantarum*株投与群において対照群に対して統計的有意 ($p<0.05$) な変動がみられた遺伝子数 (全55,622遺伝子中)

	成熟マウス	哺乳期マウス	共通
LD群	3424	4568	626
HD群	2435	2432	89

ブリダイゼーション後のアレイスライドは、洗浄後、専用スキャナで各プローブの蛍光値を測定した。

マイクロアレイデータはCLC MainWork Bench 6 (CLC bio) で標準化を行い、アレイ間の蛍光値の差を補正した。その後、パスウェイ解析 (GeneGO) に供するため同ソフトウェアを使用して統計解析を行った。パスウェイ解析は2群間比較の統計解析結果を元にするため、哺乳期マウス、成熟マウスそれぞれで対照群と各乳酸菌投与群で2群間比較を行った。各群におけるプローブごとの蛍光値の平均値の差はt-testにより解析した。

結 果

変動遺伝子数

DNA マイクロアレイ解析の結果、各群で発現が対照群に対して有意に ($p<0.05$) 変動した遺伝子の数を表2、3に示す。

哺乳期マウスに*L. gasseri*を投与した場合を除き、どちらの乳酸菌株、投与時期においても高濃度 (HD) 投与群よりも低濃度 (LD) 投与群の方がより多くの遺伝

子が有意に変動した。

哺乳期マウスに*L. plantarum*を低濃度投与した群(S-LP-LD群)では、対照群(S-Control群)に対して変動した遺伝子数が5,194個と投与群の中で最も多くの遺伝子が増加した。成熟マウスに同株を低濃度投与した群(A-LP-LD群)では対照群(A-Control群)に対して4,050遺伝子の変動がみられ、そのうち哺乳期の投与でも変動がみられたものは、626個であった。

パスウェイ解析

文章量の観点から、本項では*L. plantarum* LD群についてのみを示す。

対照群と各乳酸菌投与群で1.5倍以上($p < 0.05$)変動した遺伝子を対象として、哺乳期マウス、成熟マウスそれぞれでパスウェイ解析を行った。 p 値の低い順に10個のパスウェイを挙げたものを表4~7に示す。

様々なパスウェイが、S-LP-LD群で対照群(S-Control群)に対して上方制御された遺伝子が関わるものとして確認された。細胞骨格に関わるパスウェイや、細胞接着に関わるパスウェイに加え、Immune response_MIF-induced cell adhesionといった免疫反応のパスウェイや、成長ホルモンが関与するパスウェイがみられた。

A-LP-LD群では、補体に関わるパスウェイが挙げられ、また、Immune response_Immunological synapse formationのように抗原提示・細胞遊走に関わるパスウェイもみられた。A-LP-LD群でも、S-LP-LD群と共通して上方制御されるパスウェイは見られなかった。

下方制御された遺伝子が関わるパスウェイとしては、S-LP-LD群では、細胞周期に関わるパスウェイであるCell cycle_Cell cycle (generic schema)などがみられた。一方、S-LP-LD群で上方制御されていた細胞骨格に関わるパスウェイは、A-LP-LD群では下方制御されるものとして確認された。しかし、MyHC遺伝子がS-LP-LD群で上方制御される遺伝子として共通してみられた以外は、共通して変動する遺伝子は確認されなかった。

考 察

変動遺伝子数

DNAマイクロアレイ解析の対象遺伝子は5万以上と非常に多数にわたるため、プロバイオティック乳酸菌の投与効果の概要を掴むことを目的に、上方、下方制御を問わず各群で発現量が対応する日齢の対照群に対して有意に異なる遺伝子数を算出した。

*L. plantarum*を低用量で投与した場合を除き、全ての乳酸菌投与群で対照群に対して1,700から3,000遺伝子の発現に有意差がみられた。*L. plantarum*を低用量で投与した場合は、哺乳期で5,194遺伝子、成熟期で4,050遺伝子が対応する日齢の対照群に対し発現量に有意差がみられ、他の群と比較して顕著に多数の遺伝子の発現に変動が確認された。これにより、変動遺伝子だけで判断すると*L. plantarum*の低用量投与が哺乳期、成熟期共に最も効果が高いことが示唆される。また、成熟マウスに*L. gasseri*を高用量(HD)、低用量(LD)投与した場合でも、低用量投与群のほうがより多数の遺伝子が有意な発現変動がみられた。このことから、高用量の投与よりも低用量のほうがより多くの遺伝子の発現が変動する傾向がある、つまり変動遺伝子数からみると低用量投与のほうが乳酸菌の投与効果が高い可能性が考えられる。これは、高用量投与の場合、投与菌に対する免疫的無応答(寛容)が成立しやすいためではないかと考えられる。これは同時に、短期間投与の場合は高用量投与の方が高い効果が得られる可能性を示唆しているが、この点は今後検討が必要である。

同じ菌株を同一用量投与した哺乳期、成熟マウスで、対応する日齢の対照群に対して有意に発現量が異なる遺伝子のうち、共通するものを確認したところ、どちらの菌株、投与量でも2-5%程度の遺伝子しか共通しておらず、ほとんどの遺伝子は投与時期特有に変動する遺伝子であることがわかった。また、共通している場合でも、哺乳期では上方制御されるが成熟後では下方制御されるHSP70のような遺伝子も存在した。このことから、同じ菌株を同用量投与したとしても哺乳期と成熟マウスでは変動する遺伝子が全く異なることが示された。

パスウェイ解析

パスウェイ解析の結果、日齢、菌株、用量の違いで多くの異なるパスウェイが変動することが明らかになった。特に、哺乳期と成熟マウスで変動するパスウェイは、投与菌の種類、投与用量を問わず共通するものはほとんど認められなかった。一方で、成熟マウスではA-LG-LD群を除く3群で補体に関わるパスウェイの上方制御が見られた。補体は感染に対する初期防御に必要な要素である。また、胆汁酸代謝に関わるパスウェイはどちらの菌株でも高用量投与をした場合に共通して下方制御され、低用量を投与した場合には多機能性サイトカインであるオンコスタチンMに関わるパスウェイが共

表4 哺乳期マウスの*L. plantarum* LD群が対照群 (S-Control) に対して1.5倍以上高い発現を示した遺伝子に関わるパスウェイ

Pathways	p値	総遺伝子数	変動遺伝子数	変動遺伝子
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	1.969E-06	102	12	TRIO, Talin, MLCp (reg), Filamin A, eIF4G1/3, MyHC, Tcf (Lef), c-Src, TGF-beta receptor type II, eIF4G3, MRLC, c-Jun
Reproduction_GnRH signaling	3.159E-06	72	10	EGRI, AP-1, HDAC4, ATF-3, c-Src, PKC-epsilon, Adenylate cyclase, c-Jun, MKP-1, FosB
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	4.845E-06	111	12	Talin, MLCp (reg), Tcf (Lef), c-Src, Dsh, WNT, Actin, TGF-beta receptor type II, MRLC, TCF7 L2 (TCF4), Frizzled, c-Jun
Development_WNT signaling pathway. Part 2	1.679E-05	53	8	Casein kinase I epsilon, Tcf (Lef), Dsh, WNT, TCF7 L2 (TCF4), Frizzled, c-Jun, WNT1
Blood coagulation_GPCRs in platelet aggregation	2.127E-05	71	9	Talin, MLCp (reg), G-protein alpha-z, SNAP-23, ITGB3, G-protein alpha-i family, G-protein alpha-2, Adenylate cyclase, MRLC
Development_Growth hormone signaling via PI3K/AKT and MAPK cascades	2.955E-05	42	7	EGRI, IRS-2, Elk-4, IRS-1, C/EBPbeta, c-Src, c-Jun
Cell adhesion_Gap junctions	3.800E-05	30	6	Tubulin beta, Tubulin alpha, PKC, c-Src, Actin, Tubulin (in microtubules)
Immune response_MIF-induced cell adhesion, migration and angiogenesis	5.446E-05	46	7	AP-1, CCL2, c-Src, G-protein alpha-i family, c-Jun, MKP-1, IL8RB
Cell adhesion_Chemokines and adhesion	6.016E-05	100	10	TRIO, Talin, Filamin A, CCL2, Tcf (Lef), c-Src, Actin, G-protein alpha-i family, c-Jun, IL8RB
Cytoskeleton remodeling_Regulation of actin cytoskeleton by Rho GTPases	1.140E-04	23	5	MLCP (reg), Filamin A, MyHC, Actin, MRLC

井上

表5 成熟マウスの*L. plantarum* LD群が対照群 (A-Control) に対して1.5倍以上高い発現を示した遺伝子 ($p < 0.05$) に関わるパスウェイ

Pathways	p値	総遺伝子数	変動遺伝子数	変動遺伝子
Cholesterol Biosynthesis	6.474E-09	88	14	CYP51A1, SCAMOL, FDFT1, PMVK, HMGCS1, MVD, FDPS, LSS, ERG1, MVK, HMDH, NSDHL, ER24, IDH1
Immune response_BCR pathway	2.300E-07	54	10	Syk, PKC-beta, CD79 complex, PI3K cat class IA, Calcineurin A (catalytic), CD45, AKT (PKB), CD21, CD19, VAV-1
Immune response_PIP3 signaling in B lymphocytes	2.516E-07	42	9	Syk, PKC-beta, CD79 complex, PI3K cat class IA, CD45, AKT (PKB), PLC-beta, CD19, VAV-1
Immune response_Lectin induced complement pathway	1.014E-06	49	9	C2, C4a, CD21, C2b, C4, C2a, C3 convertase (C2aC4b), C4b, Clusterin
Immune response_Classical complement pathway	1.715E-06	52	9	C2, C4a, CD21, C2b, C4, C2a, C3 convertase (C2aC4b), C4b, Clusterin
Immune response_NFAT in immune response	1.407E-05	51	8	Syk, MHC class II, CD79 complex, PI3K cat class IA, Calcineurin A (catalytic), AKT (PKB), VAV-1, NF-AT
Apoptosis and survival_APRIL and BAFF signaling	1.975E-05	39	7	TACI (TNFRSF13B), Calcineurin A (catalytic), CD21, CD23, TRAF5, BAFF-R, NF-AT2 (NFATC1)
Immune response_Immunological synapse formation	4.213E-05	59	8	MHC class II, PI3K cat class IA, Rac2, ICAM2, SKAP55, CD2, VAV-1, CXCR4
Immune response_NF-AT signaling and leukocyte interactions	6.029E-05	46	7	MHC class II, CD79 complex, Calcineurin A (catalytic), CD40 (TNFRSF5), cPLA2, NF-AT2 (NFATC1), NF-AT
Immune response_MIF-the neuroendocrine-macrophage connector	6.029E-05	46	7	cPKC (conventional), MHC class II, PKC, PLC-beta, PLA2, cPLA2, Adenylate cyclase type VII

亮

表6 哺乳期マウスの *L. plantarum* LD群が対照群 (S-Control) に対して1.5倍以上低い発現を示した遺伝子 ($p < 0.05$) が関わるパスウェイ

Pathways	p値	総遺伝子数	変動遺伝子数	変動遺伝子
Regulation of CFTR activity (normal and CF)	2.586E-06	58	11	Casein kinase II, alpha chains, PRKAR2A, PP2A regulatory, PKA-reg type II (cAMP-dependent), PKA-reg (cAMP-dependent), PP2C, AMPK alpha 1 subunit, PDE4D, Filamin B (TABP), PP2A structural, AMPK beta subunit
DNA damage_Role of SUMO in p53 regulation	1.755E-04	17	5	CBP, PIAS1, PIAS2, AKT (PKB), SAE1
Transcription_Sin3 and NuRD in transcription regulation	2.184E-04	38	7	TR-alpha, CBP, MBD2, PCAF, MTA3, NRSF, MTA1
Cell cycle_Cell cycle (generic schema)	5.173E-04	21	5	E2F5, DP1, p107, CDK2, CDK6
G-protein signaling_RhoA regulation pathway	7.898E-04	34	6	IGF-1 receptor, Fyn, G-protein alpha-12 family, DBS, Ephrin-A receptors, Ephrin-A
G-protein signaling_Cross-talk between Ras-family GTPases	8.100E-04	23	5	DBS, MR-GEF, B-Raf, AKT (PKB), RalA
Development_Leptin signaling via PI3K-dependent pathway	8.428E-04	47	7	AMPK alpha subunit, CPT-1A, AKT2, PKA-reg (cAMP-dependent), AKT (PKB), AMPK beta subunit, C/EBPalpha
Signal transduction_PKA signaling	1.385E-03	51	7	PP2A regulatory, PKA-reg type II (cAMP-dependent), G-protein alpha-12 family, PKA-reg (cAMP-dependent), AKAP11, PDE4D, G-protein alpha-13
Cell cycle_Regulation of G1/S transition (part 2)	1.459E-03	26	5	AKT (PKB), DP1, p107, CDK2, CDK6
Apoptosis and survival_NGF signaling pathway	1.459E-03	26	5	AKT (PKB), ICAD, GAB1, Nucleophosmin, DFF40 (CAD)

表7 成熟マウスの *L. plantarum* LD群が対照群 (A-Control) に対して1.5倍以上低い発現を示した遺伝子 ($p < 0.05$) が関わるパスウェイ

Pathways	p値	総遺伝子数	変動遺伝子数	変動遺伝子
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	4.358E-06	111	10	VEGFR-2, MMP-13, SOS, ERK2 (MAPK1), MELC, MYLK1, Dsh, WNT, MLCK, ERK1/2
Androstenedione and testosterone biosynthesis and metabolism p. 2/ Rodent version	1.137E-05	36	6	UGT1A1, AKR1C4, UGT2A1, SRD5A1, UGT1A10, UGT1A7C
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	1.588E-05	102	9	VEGFR-2, MMP-13, SOS, ERK2 (MAPK1), MELC, MyHC, MYLK1, MLCK, ERK1/2
Cell adhesion_Integrin-mediated cell adhesion and migration	6.213E-05	48	6	ERK2 (MAPK1), MELC, MyHC, MYLK1, MLCK, ERK1/2
Androstenedione and testosterone biosynthesis and metabolism p. 2	1.368E-04	35	5	UGT1A1, AKR1C4, UGT2A1, SRD5A1, UGT1A10
Immune response_Oncostatin M signaling via MAPK in mouse	1.368E-04	35	5	MMP-13, SOS, ERK2 (MAPK1), C/EBPbeta, ERK1/2
Immune response_Oncostatin M signaling via MAPK in human cells	1.795E-04	37	5	MMP-13, SOS, ERK2 (MAPK1), C/EBPbeta, ERK1/2
Translation_Non-genomic (rapid) action of Androgen Receptor	2.617E-04	40	5	SOS, ERK2 (MAPK1), SRD5A1, Dsh, WNT
Transcription_Androgen Receptor nuclear signaling	4.586E-04	45	5	SOS, ERK2 (MAPK1), SRD5A1, Dsh, WNT
Signal transduction_Activation of PKC via G-Protein coupled receptor	8.997E-04	52	5	PKC-theta, PLC-beta, MELC, MLCK, ERK1/2

通して下方制御された。哺乳期マウスでも、同じように Ras ファミリーの GTPases が様々な生理反応を誘導する際に変動するパスウェイがどちらの菌株でも低用量を投与した際に下方制御された。

これらのことは、乳酸菌株、用量が同じであっても腸管免疫の成熟度が異なれば、全く異なる影響がでることを示唆しており、同時に、菌株が異なっても日齢が同じであれば共通の反応が誘導され得ることも示唆している。同じ菌株を発達過程と成熟後に投与しても、異なる菌株を同じ日齢に投与するよりも大きく効果が異なると考えられる。

まとめ

本研究により、発達過程にある腸管免疫系と、成熟した免疫系では同じプロバイオテック乳酸菌を摂取しても効果が大きく異なることが示された。この理由として、緒言でも述べたように、哺乳期と成熟後では免疫細胞の数をはじめとして、抗原を取り込む器官であるパイエル板の成熟程度など多くの点で免疫系の状態が異なっていることが挙げられる。プロバイオテック乳酸菌は年齢層に関わらず日常的に利用されているものの、腸管免疫系が未発達である乳幼児に対する効果が大人とどの

程度異なるのかは用法・用量も含めほとんど知見がなかった。本研究の成果は、時期に応じた適切な用法・用量を知るための最初の科学的知見であり、これは新生児・小児医療現場における効果的なプロバイオテックスの利用方法や新たな利用方法の探索への第一歩であると期待される。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団平成25年度学術研究奨励金の助成により実施されました。助成して頂きました公益財団法人三島海雲記念財団および関係者の方々に深謝致します。

参考文献

- 1) P. B. Eckburg, et al.: *Science*, **308**, 1635–1638, 2005.
- 2) Y. Umesaki, H. Setoyama: *Microbes Infect.*, **2**, 1343–1351, 2000.
- 3) Y. Umesaki, et al.: *Infect Immun.*, **67**, 3504–3511, 1999.
- 4) J. C. A. Ter Steege, et al.: *Dev. Immunol.*, **5**, 121–128, 1997.
- 5) D. M. V. Parrott, T. T. MacDonald: The Ontogeny of the mucosal immune system in rodents. In MacDonald T. T., (ed.), *Ontogy of the Immune System of the Gut*, p. 51. CRC Press, 1990.
- 6) M. Kalliomäki, et al.: *Lancet*, **361**, 1869–1871, 2003.