

DNA マイクロアレイ法による発酵食品製造用微生物の免疫調節機能の探索

藤井 恵輔* 飛田 啓輔*

1. はじめに

発酵には、微生物やそれらが作り出す酵素の作用によって、食品素材の保存性や栄養価の向上、あるいは香味の付与といった利点がある。近年では伝統的な発酵食品から分離される微生物の様々な健康維持機能についても報告されるようになった。とりわけ、納豆は江戸時代の医学書「本朝食鑑」に「腹中を整え、食を進め、毒を解す」と示されるなど、古くから整腸効果を中心に健康維持機能が経験的に知られてきた¹⁾。納豆は、茨城県の特産品の一つであり、蒸した大豆を納豆菌によって発酵させた伝統的な発酵食品であることは周知のとおりである。

発酵漬物は、全国各地で古くから郷土食の1つとして食されている。すぐき漬やしぼ漬のように乳酸発酵を経て作られる発酵漬物には、多くの乳酸菌が含まれていることから、香味や保存性の向上が期待できるだけでなく、その健康維持機能に対する関心も高い。増田ら²⁾はすんき漬から分離した乳酸菌をアレルギー発症モデルマウスに投与すると、そのアレルギー症状を軽減できることを明らかにしている。このように、発酵漬物から分離される乳酸菌は、アレルギー性疾患の症状を軽減するなど、免疫調節作用を有することが報告されている。

近年、アレルギー性疾患やウイルス感染症など、様々な免疫系が関与する疾患が世界的に蔓延しており、深刻な社会問題となっている。アレルギー性疾患は自己免疫疾患の一つであり、国民の半数が何らかのアレルギー性疾患に罹患していると言われている。その発症メカニズムの違いによりI型～IV型の4つに大別されるが、花粉症などアレルギー罹患者の大半を占めるI型アレルギーの発症原因は、ヘルパーT細胞のTh1細胞やTh2細胞への選択的な分化、すなわちTh1/Th2バランスがTh2優位であることに起因すると考えられている³⁾。インターロイキン (IL-)10は過剰になった免疫応答を制御することにより免疫寛容を導くことが明らかにされ、アレルギーの発症抑制や抗炎症作用に関与する⁴⁾。また、ウイルス感染症は、高熱、倦怠、発疹、関節痛、肺炎などの様々な症状を伴うことが一般的だが、乳児、高齢者、あるいは基礎疾患を持つ患者では重篤な症状を引き起こすことがある。2019年に報告された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) では感染者数は累計4億人以上、死者数は500万人以上となり (2022年2月15日時点)、世界的なパンデミックを引き起こした。このような観点からも、I型アレルギー性疾患やウイルス感染症を予防・改善する技術開発は極めて重要なテーマと言える。

2. 目的

発酵食品の製造に用いられる納豆菌や乳酸菌には様々な健康維持機能が期待できると考えられる。これまでに、当センターでは納豆や発酵漬物の製造のために新たな納豆菌株や乳酸菌株を分離、選抜、あるいは

育種を行い、保存してきた。本研究は、これらの発酵食品の製造に用いられる微生物が有する免疫調節機能を網羅的に調査することを目的とした。すなわち、ヒト由来マクロファージ細胞培養系にこれらの微生物を添加して培養後、DNAマイクロアレイ法によってマクロファージ細胞の遺伝子発現を解析することで、I型アレルギー性疾患やウイルス感染症の予防・改善効果の可能性を調査したので、以下に報告する。

3. 研究内容

3.1 試験デザイン

免疫系を司るマクロファージは、その役割の違いからM1マクロファージとM2マクロファージに分類される。M1マクロファージは、病原体の感染により活性化され、炎症性サイトカインを強く誘導することで病原体を殺傷する役割を有する⁵⁾。M2マクロファージは、組織修復やTh2分化におけるアレルギー応答にも関与するとされる⁵⁾。

ウイルスは、おもに核酸とそれを包むタンパク質の膜から構成され、核酸の種類によってDNAウイルスとRNAウイルスに大別される。近年、パンデミックが危惧されたエボラウイルス、デングウイルスなどは一本鎖RNAウイルスに分類される。このようなウイルスに由来する一本鎖RNAは、我々の体内に侵入した後、M1マクロファージに発現するトール様受容体 (TLR) 7やTLR8によって認識されることで、炎症反応をはじめとする免疫応答が開始される。本調査で用いたウイルス感染症モデルは、TLR7/8の合成リガンドであるResiquimod (RSQ) を疑似RNAウイルス成分とし⁶⁾、M1マクロファージにRSQで刺激を与えることで、RNAウイルス感染時と類似した免疫応答を誘導させるというものである。

一方、マクロファージはTh2サイトカインであるIL-4やIL-13の作用を受けることで、M2マクロファージへと分化する⁵⁾。アレルギー性疾患においては、M2マクロファージの関与が強く示唆されている。本調査で用いたアレルギー性疾患モデルは、IL-4とIL-13の刺激を与えて作成したM2マクロファージを用いることで、細胞レベルでアレルギー性疾患の発生機構の一部を再現するというものである。

このような2つの細胞モデルを用いることで、納豆菌および乳酸菌がこれら細胞の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすか調べた。

3.2 納豆菌および乳酸菌の培養と試料調製

納豆菌および乳酸菌は、当センターにおいて継代培養されているものを試験に供した。納豆菌としては納豆の製造利用を目的として分離・確立した納豆菌1株～4株 (以下、納1～4) の計4菌株を、乳酸菌としては同様に発酵漬物の製造利用を目的として分離・確立した菌種の異なる乳酸菌1株～5株 (以下、乳1～5) の計5菌株を用いた。また、枯草菌 (*B. subtilis* NBRC3134)

は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（千葉県）から購入した。

納豆菌および枯草菌は、LB液体培地（日本Becton Dickinson(株)製）において、37°C、24時間振盪培養後、芽胞形成寒天培地（Schaeffer's sporulation medium）に塗抹して37°Cで48時間培養した。次いで、培地上に生育したコロニーを回収し、精製水で遠心洗浄した後、凍結乾燥したものを納豆菌および枯草菌試料として試験に供した。なお、得られた試料については、位相差顕微鏡ECLIPSE 80i（(株)ニコン製）の観察において、全細胞のうち芽胞細胞が99%以上を占めることを確認した。

乳酸菌は、MRS液体培地（日本Becton Dickinson(株)製）を用いて30°C、24時間静置培養した。次いで、遠心分離によって得られた菌体を精製水で遠心洗浄し、凍結乾燥したものを乳酸菌試料として試験に供した。

3.3 ヒト由来マクロファージの培養と分化誘導

ヒト由来単球細胞株であるTHP-1細胞は、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンク（大阪府）から購入した。THP-1細胞は、1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液（富士フィルム和光純薬株式会社製）を含む10%ウシ胎児血清（HyClone社製）添加RPMI-1640培地（RPMI-1640基礎培地）に懸濁し、5%CO₂、37°Cの条件下において細胞培養フラスコ内で培養した。

培養したTHP-1細胞は、100ng/mL濃度のホルボールミリステートアセテート（PMA）を含むRPMI-1640基礎培地に、1×10⁶個/mLになるように懸濁し、6ウェルプレートに3 mLずつ播種し、5% CO₂、37°Cの条件下で48時間培養した。その後、プレート底面に接着した細胞が剥がれないようにRPMI-1640基礎培地に置換し、さらに24時間培養することでマクロファージへと分化させた。

分化したマクロファージは、100 ng/mL濃度の犬腸菌0111由来リポポリサッカライドおよび20 ng/mL濃度のインターフェロンγ（IFNγ）を含むRPMI-1640基礎培地、あるいは各20 ng/mL濃度のIL-4およびIL-13を含むRPMI-1640基礎培地に置換し、5% CO₂、37°Cの条件下で48時間培養した。その後、RPMI-1640基礎培地に置換したものをM1マクロファージまたはM2マクロファージとして、それぞれ実験に供した（図1）。

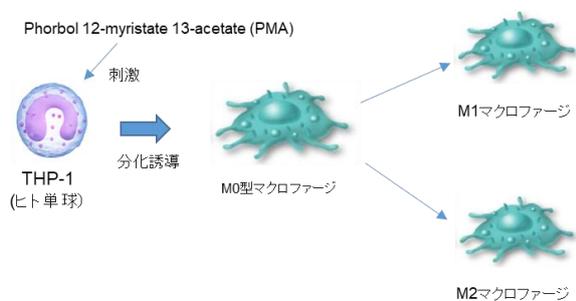


図1 M1/M2マクロファージの分化

3.4 M1/M2マクロファージの培養

納豆菌、枯草菌、または乳酸菌試料は、リン酸緩衝液（PBS、pH7.2）に懸濁し、菌体試料液とした。M1およびM2マクロファージは、最終濃度10 μg/mLになるように菌体試料液を添加したRPMI-1640基礎培地に置換

した。加えて、M1マクロファージの培養液には最終濃度が1 μg/mLになるようにRSQを添加した。各細胞培養液は、5% CO₂、37°Cの条件下で3時間培養した。次いで、PBSで細胞を洗浄し、セルスクレーパーを用いて丁寧に細胞を掻き取った。回収した細胞は、液体窒素を用いて直ちに凍結した。

3.5 マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析

マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析は、(株)マクロジェン・ジャパン社（京都府）に委託した。凍結細胞から TRIzol Reagent のプロトコルに従ってトータル RNA を抽出し、NanoDrop (Thermo Scientific(株)製)を用いて RNA 濃度を確認した。さらに、Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies (株)製)にて蛍光標識し、標識されたプローブを Agilent Technologies (株)製の DNA チップである SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60k v3 Microarray スライドに滴下し、Agilent Technologies(株)製のプロトコルに沿ってハイブリダイゼーションを行った。次いで、スライドを洗浄し、ハイブリダイズしたプローブ蛍光を Agilent Microarray Scanner により計測した。データは Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1)にて処理した。遺伝子発現データの統計的有意差は、倍率変化によって決定した。有意差が検出されたプローブリストのエンリッチメント解析と機能アノテーション解析結果の視覚化には、Gene Ontology と KEGG データベースを使用した。なお、発現遺伝子に関するデータ分析と視覚化には、統計処理ソフト R3.3.2 を使用した。

4. 研究結果と考察

4.1 納豆菌と乳酸菌がマクロファージの遺伝子発現の変動に及ぼす影響

納豆菌あるいは乳酸菌を添加して培養したM1およびM2マクロファージについて、DNAマイクロアレイ法によってトランスクリプトーム解析を行った。その結果、それぞれコントロールであるRSQで刺激したM1マクロファージでは23,853個、M2マクロファージは23,505個の遺伝子が検出された。表1に示したとおり、コントロールと比較して各乳酸菌を添加した場合において、M1マクロファージでは248から808個、M2マクロファージでは472から819個の遺伝子発現量が変動していた。また、各納豆菌を添加した場合において、M1マクロファージでは1,319から1,769個、M2マクロファージでは943から2,298個の遺伝子発現量が変動していた。このように、納豆菌や乳酸菌を添加することで、各マクロファージの遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかになった。

4.2 マクロファージにおける遺伝子発現の多次元尺度構成法

次いで、各マクロファージの遺伝子発現に対する多次元尺度構成法（MDS）を行った。MDSはサンプルの正規

化された値からサンプル間の類似性がプロットされたもので、外れ値のサンプルやサンプルグループ間の発現パターンを識別する手法である。M1マクロファージの遺伝子発現に関するMDSの結果を図2に示した。

表1 納豆菌と乳酸菌によるマクロファージの遺伝子変動数

	M1 マクロファージ +RSQ 刺激	M2 マクロファージ
納豆菌添加	1,319 ~ 1,769	943 ~ 2,298
乳酸菌添加	248 ~ 808	472 ~ 819

M1マクロファージはRSQのみを添加した場合、M2マクロファージは無添加の場合をコントロールとした。遺伝子発現比が、コントロールと比較して、±1.5倍以上の変動のものをカウントした。

また、M2マクロファージの遺伝子発現に関するMDSの結果を図3に示した。これらの結果から、各マクロファージの遺伝子発現において、納豆菌群と乳酸菌群とに大別できるとともに、納豆菌群と枯草菌 (*B. subtilis*) には明らかな違いが見られた。これらの結果から、納豆菌と乳酸菌ではマクロファージの遺伝子発現に対して、異なる影響を及ぼすことが示唆される。

4.3 納豆菌と乳酸菌がマクロファージの免疫関連遺伝子発現に及ぼす影響

各マクロファージの発現遺伝子のうち、KEGGパスウェイ解析によって免疫系に関連した遺伝子群の発現比を調べた。図4及び図5において、横軸は比較した菌株の種類、縦軸は免疫関連遺伝子群の種類を示す。また、プロットは比較サンプルの遺伝子発現を1とした場合の対象サンプルの遺伝子発現比であり、プロットした円が大きいほど遺伝子発現比が大きいことを表す。

納豆菌と乳酸菌がRSQで刺激したM1マクロファージの免疫関連遺伝子発現比に及ぼす影響を図4に示した。RSQ刺激のみの場合と比較して、乳酸菌や納豆菌と共に培養した場合は、ウイルススタンパク相互作用といったウイルス免疫に関わる遺伝子群、サイトカイン-サイトカイン相互作用、NF-κB、あるいはNOD様受容体といった免疫関連遺伝子群の発現量に変動することがわかった。

納豆菌と乳酸菌がM2マクロファージの免疫関連遺伝子発現比に及ぼす影響を図5に示した。無添加の場合と比較して、納豆菌や乳酸菌添加の場合において、トル様受容体、サイトカイン-サイトカイン相互作用、NF-κB、あるいはNOD様受容体といった免疫関連遺伝子群の発現量に変動していることがわかった。

以上の結果から、M1あるいはM2マクロファージでは納豆菌や乳酸菌との培養によって、免疫関連遺伝子群、とりわけサイトカイン-サイトカイン相互作用に関する遺伝子発現量に変動していることがわかった。さらに、納豆菌や乳酸菌の菌株によっても遺伝子発現比に差異が認められたことから、菌種や菌株レベルで遺伝子発現に及ぼす影響は異なることが示唆される。

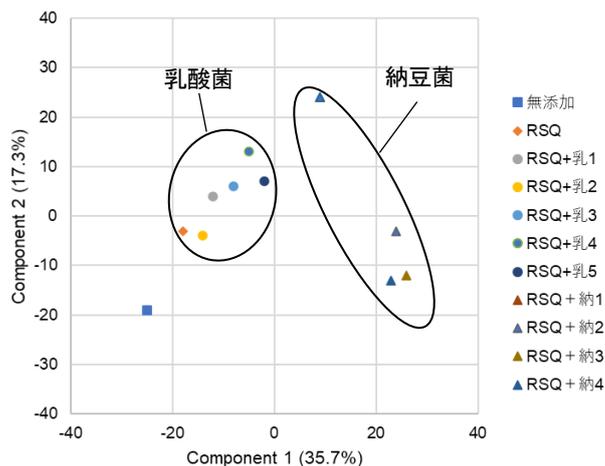


図2 納豆菌と乳酸菌によるM1マクロファージの遺伝子発現のMDS

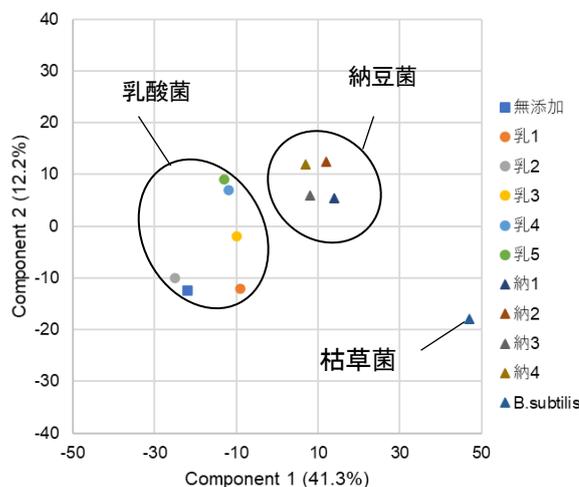


図3 納豆菌と乳酸菌によるM2マクロファージの遺伝子発現のMDS

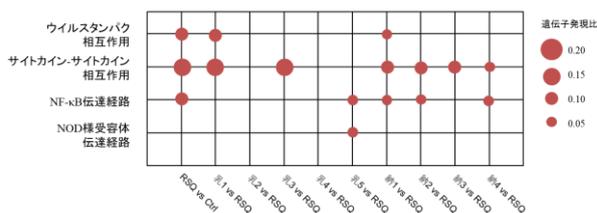


図4 納豆菌と乳酸菌がM1マクロファージの免疫関連遺伝子発現に及ぼす影響

M1マクロファージのみの場合をコントロール (Ctrl)、CtrlにRSQのみ添加の場合をRSQとした

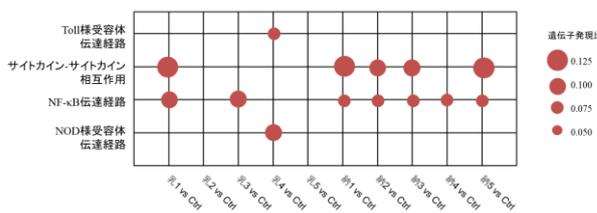


図5 納豆菌と乳酸菌がM2マクロファージの免疫関連遺伝子発現に及ぼす影響

M2マクロファージのみの場合をコントロール (Ctrl) とした

4.4 納豆菌と乳酸菌がIL-10またはIL-4受容体遺伝子発現比に及ぼす影響

納豆菌と乳酸菌によりM1またはM2マクロファージの遺伝子発現が顕著に変動したサイトカイン-サイトカイン相互作用に関する遺伝子発現比を解析した。図6に示すとおり、納豆菌はM1マクロファージのIL-10遺伝子発現比を高めることがわかった。IL-10は、免疫抑制性の特徴を持ち、過剰な炎症反応を抑制するサイトカインである⁷⁾。したがって、納豆菌は感染症などが招く過剰な炎症状態を抑制することが示唆される。

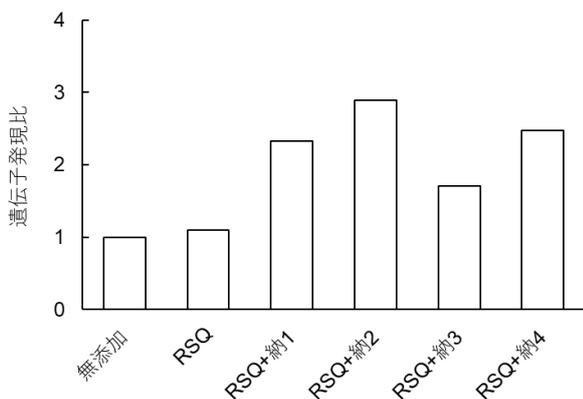


図6 納豆菌がM1マクロファージのIL-10遺伝子発現比に及ぼす影響
無添加の場合を1とした

図7に示すとおり、いくつかの乳酸菌はM2マクロファージのIL-4受容体遺伝子発現比を低下させることがわかった。IL-4は、細胞表面のIL-4受容体に結合することでTh2免疫応答によるIgE産生を促し、I型アレルギー反応を惹起する⁸⁾。したがって、乳酸菌はそのIL-4受容体を減少させることで、I型アレルギー症状を抑制することが示唆される。

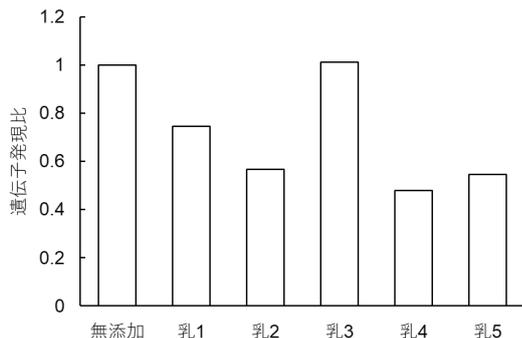


図7 乳酸菌がM2マクロファージのIL-4受容体の遺伝子発現比におよぼす影響
無添加の場合を1とした

5. まとめ

1. トランスクリプトーム解析により、乳酸菌あるいは納豆菌がマクロファージの遺伝子発現に異なる影響を及ぼすことが示唆された。
2. 乳酸菌や納豆菌によって免疫関連遺伝子発現量に変動し、その作用は菌種や菌株によって異なることが示唆された。
3. 乳酸菌や納豆菌は、I型アレルギー性疾患あるいは

はウイルス感染症の予防・改善効果を有することが示唆された。

6. 今後の課題

トランスクリプトーム解析で顕著に変動が観察された免疫関連遺伝子について、リアルタイムRT-PCRを用いて個別に遺伝子発現比の詳細を調べる予定である。

7. 参考文献等

- 1) 須見 洋行：納豆の機能性. 日本醸造協会誌、85巻、8号、518-524 (1990).
- 2) 増田 健幸、中田 雅也、岡田 早苗、保井 久子： *Pediococcus pentosaceus* Sn26株のアレルギー性下痢症抑制作用及びその作用機序解析. 日本乳酸菌学会誌、21巻、1号、42-49 (2010).
- 3) Strachan DP.: Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*, 55, S2-S10 (2000).
- 4) Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA.: Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117, 433-442 (2006)
- 5) 中野 千裕、松瀬 厚人：M1/M2型マクロファージ. 70巻 9号. 1235-1236 (2021).
- 6) Sciorati C, Monno A, Doglio MG, Rigamonti E, Ascherman DP, Manfredi AA, Rovere-Querini P.: Exacerbation of Murine Experimental Autoimmune Myositis by Toll-Like Receptor 7/8. *Arthritis Rheumatol.*, 70, 1276-1287 (2018).
- 7) Bromberg JS.: IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.*, 7, 639-643 (1995).
- 8) Riedl MA and Casillas AM.: Adverse drug reactions: types and treatment options. *Am. Fam. Physician.*, 68, 1781-1790 (2003).