

推奨研究

腸内共生菌及びプロバイオティクスによる マスト細胞の機能の制御

笠倉和巳

日本大学大学院 生物資源科学研究科・日本学術振興会特別研究員 DC

〒 252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866

【腸管免疫と腸内共生細菌 - プロバイオティクス】

食品の消化、吸収の場である腸管には生体最大の免疫系である腸管免疫系が備わっている(図1)。食品抗原は免疫学の自己・非自己の概念では非自己であり、経口摂取された食品抗原に対しては経口免疫寛容と呼ばれる現象が誘導され、過剰な免疫応答は誘導されない。一方、腸管には食品以外にも病原菌が侵入する機会が多く、これらの抗原に対しては積極的に排除するようにIgA抗体の産生をはじめとする免疫応答が作動する。すなわち、腸管免疫系は我々の生命維持に重要な食品成分は安全とみなし、排除せず、病原菌などの有害なものだけを排除するという正と負の相反する免疫機構が備わっている。このように、腸管免疫は我々が生きていく中で必須のシステムを備えているが、ひとたびこの巧みに制御されたシステムが破綻するとアレルギーや炎症性腸疾患など様々な疾患が引き起こされる。

腸管にはパイエル板、孤立リンパ小節、腸間膜リンパ節などから成る腸管関連リンパ組織(GALT)が存在する。そして、そこには全末梢リンパ球の約7割にも相当するリンパ球が集積しているといわれており、脾臓、骨髄、末梢リンパ節などの全身免疫とは異なる免疫応答を誘導している。

さらに、腸管には、500～1000菌種、100兆個に及ぶ細菌が生息し、いわゆる腸内細菌叢を構成している。腸内共生菌は腸管の組織発達

に作用し、腸管免疫系の維持に働くことが報告されている。また、プロバイオティクスは腸内細菌叢を整える食品成分として知られており、プロバイオティクスの摂取により良好な腸内細菌叢を維持できれば疾病の予防・治療へアプローチができることを示唆している。

腸内共生菌及びプロバイオティクスの腸管免疫系に対する作用経路には、それらが直接腸管免疫系の細胞に作用する経路とプロバイオティクスが腸内細菌叢を整えることで間接的に作用する経路があることが示唆されており、プロバイオティクス(食品成分)－腸内細菌－免疫系というように三者を結びつけることができるが三者の相互関係には解明されていない点が多く存在する(図2)。

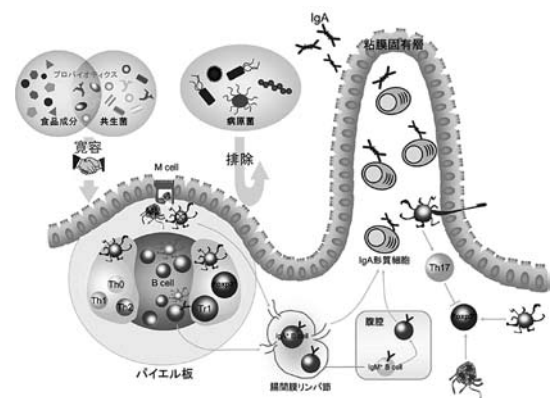


図1 腸管免疫系

腸管は食品や共生細菌のほか有害な病原菌に曝されている。しかしながら、そこには生体最大の免疫系が備わっており、生体にとって安全なものや有害なものを識別し、適切な免疫応答を誘導している。

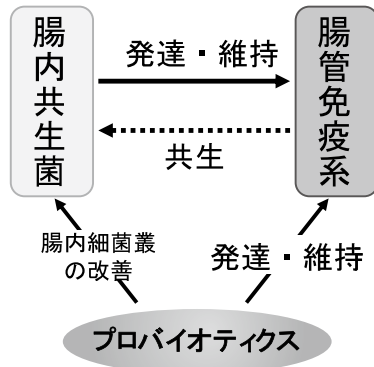


図2 腸管免疫系と腸内共生菌-プロバイオティクス

【マスト細胞のアレルギー応答に対するプロバイオティクスの効果】

食物アレルギーに代表されるI型アレルギー疾患を有する人は、厚生労働省の調査によると国民の30%以上にも上るうえ、今後も増加することが予想され社会問題になっており、治療、予防法の開発が世界中で望まれている。そこで、最近では、食品の持つアレルギーの予防・症状の軽減効果が注目され、その利用に対する期待が高まっている。

I型アレルギーにおける炎症症状の誘導にはマスト細胞が関与している(図3)。マスト細胞の細胞膜上に発現するFcεRIにIgEが結合し、そこに多価の特異的抗原が侵入しIgEを架橋することによりFcεRIが凝集し、細胞内にシグナルが伝達され、細胞が活性化される。その結果、あらかじめ細胞内の顆粒に蓄えられたヒスタミンなどのケミカルメディエーターが抗原結合後5~10分以内という短時間で放出される。同時に細胞膜のリン脂質からロイコトリエンやプロスタグランジンといったアラキドン酸代謝産物が合成・放出される。その結果、血管の拡張や透過性の亢進、平滑筋の収縮が惹起され、喘息などが誘発される。また、数時間後にはIL-4やIL-13といったTh2型サイトカインやTNF-αやIL-6などの炎症性サイトカインが合成・放出され、炎症部位に好酸球や好中球といった炎症細胞が遊走され、アレルギー炎症

が増悪される。このようにマスト細胞はアレルギー応答を誘導するエフェクター的役割以外にアレルギー応答の増悪サイクルを駆動するコンダクターとしても重要な役割を果たしている。このようにアレルギー炎症を誘導する標的が明らかにされ、その分子メカニズムの研究が進められているが、アレルギー疾患の免疫システム、病態は十分に解明されておらず、効果的な対症療法はあるものの、根治的な治療法は確立されていない。そのため、患者のQOL(Quality of life)の低下が問題になっている。そこで、患者のQOL維持、向上を図れるように発症機序、悪化因子など様々な観点から研究が進められている。特に食品による抗アレルギー作用への関心が高く、プロバイオティクスもそのひとつである。これまで、プロバイオティクスの抗アレルギー作用としてTh1/Th2のバランスの改善[1]、制御性T細胞の誘導[2]などが報告されているが、臨床試験において、Th1/Th2バランスが改善されないのにも関わらず、アレルギー炎症が軽減したという報告もあり[3-5]、プロバイオティクスの抗アレルギー作用機序は十分明らかにされていない。

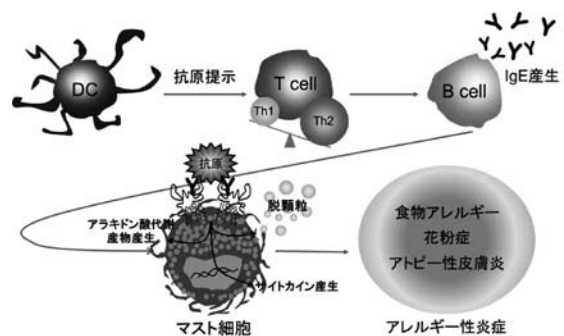


図3 I型アレルギー炎症の発症機序

B細胞から産生されたIgEがマスト細胞上に発現するFcεRIに結合し抗原により架橋されることで活性化し、放出されたケミカルメディエーターにより炎症が引き起こされる。

Toll-like receptor (TLR) という菌体成分を認識する受容体が発見されて以来、腸内共生菌やプロバイオティクスの腸管免疫系に対する作用の多くがTLRによる認識を介するということが説明されてきた。例えば、グラム陽性菌のリポプロテインやリポテイコ酸はTLR2により認識され、グラム陰性菌の構成成分であるリポ多糖はTLR4により認識される。

最近、マスト細胞にもTLRが発現していることが報告され[6-8]、菌体成分によりマスト細胞の機能が直接調節されることが示唆された。プロバイオティクスの多くはBifidobacteriaやLactobacilliなどのグラム陽性菌であることから、グラム陽性菌の菌体成分を認識するTLR2を介してマスト細胞のアレルギー応答を制御している可能性がある。そこで我々は、新たなプロバイオティクスの抗アレルギーの作用機序を明らかにするために、アレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞におけるプロバイオティクスの効果を解析した。

まず、ビフィズス菌 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM7041 (Bp) 超音波破碎物のマスト細胞のアレルギー応答への直接的な作用をマスト細胞の性質を有するラット細胞株 RBL-2H3 及びマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) を用いて *in vitro* で評価した。その結果、Bp 菌体超音波破碎物で前処理することにより IgE/ 抗原刺激による RBL-2H3 及び BMMC の脱顆粒応答が抑制された (図 4a)。さらに、Bp より調製したペプチドグリカン画分を用いた場合にも同様の効果が観察されたことから、この抑制効果が TLR2 を介する可能性が示された (図 4b)。そこで、合成 TLR2 リガンド Pam3CSK4 を用いて同様の実験を行ったところ、Pam3CSK4 で前処理することにより、IgE/ 抗原刺激による RBL-2H3 細胞の脱顆粒が Pam3CSK4 の濃度依存的に抑制された (図 4c)。また、Pam3CSK4 処理に

より LTC₄ 産生、Th2 型サイトカイン IL-13 及び炎症性サイトカイン TNF- α の産生が抑制された (図 4d-f)。IL-13 産生は Pam3CSK4 の濃度依存的に抑制された。一方、TNF- α 産生の抑制効果は、高濃度の Pam3CSK4 を添加した場合に認められ、低濃度の Pam3CSK4 を添加した場合には認められなかった。

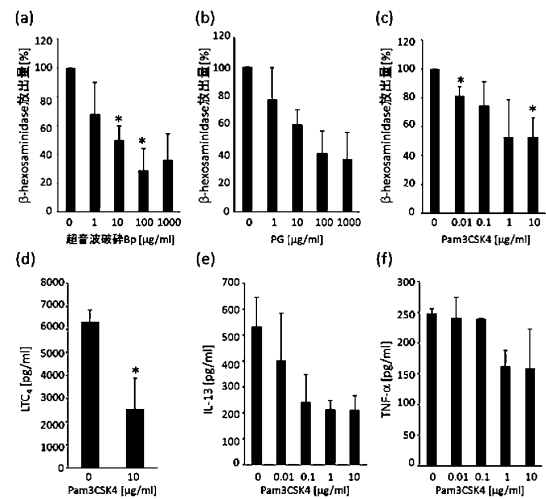


図 4 マスト細胞のアレルギー応答に及ぼす効果
超音波破碎 Bp, Bp 由来 PG 及び Pam3CSK4 が RBL-2H3 の脱顆粒に及ぼす効果 (a,b,c)。Pam3CSK4 が RBL-2H3 の LTC₄, IL-13, TNF- α 産生に及ぼす効果 (d,e,f)。* : 未処理に対して有意差あり (p < 0.05)

次にこれらの *in vitro* での抑制効果が実際にマスト細胞が誘導する *in vivo* での炎症反応を抑制し得るものかを評価するために、マスト細胞欠損マウス W/W^v に Pam3CSK4 存在下あるいは非存在下で IgE 感作した BMMC を移入する系を用いて抗原投与による血管透過性の亢進を測定した。その結果、Pam3CSK4 で処理した BMMC を移入した場合には無処理の BMMC を移入した場合に比べて血管透過性の亢進が抑制された (図 5b)。また、これらの抑制効果が TLR2 依存的かを TLR のシグナル伝達に必須のアダプター分子である MyD88 欠損マウスを用いて解析した結果、MyD88 依存的な抑制であることを明らかにした (図 4a,b)。

したがって、TLR2 を介した刺激によりマスト細胞のアレルギー応答が抑制されることが明らかとなった。

さらに Pam3CSK4 のマスト細胞のアレルギー応答抑制機序を明らかにするため、細胞内のシグナル分子の活性化を解析した。全リン酸化チロシンをウエスタンブロットにより解析した結果、Pam3CSK4 処理による顕著な効果はなかった。次に Erk1/2 の活性化に及ぼす Pam3CSK4 の効果を解析した。Pam3CSK4 処理することにより、抗原刺激 1 分後の Erk1/2 のリン酸化が顕著に抑制され (図 6a)、バンドを数値化した結果、Pam3CSK4 処理により Erk1 は 23.1%、Erk2 は 30.2% までリン酸化が抑制されていた。さらに、細胞内 Ca²⁺ 濃度に及ぼす効果についても解析した。細胞内 Ca²⁺ 濃度は抗原刺激後すぐに上昇し、その後緩やかに減少した。一方、Pam3CSK4 で前処理することにより抗原刺激により上昇した細胞内 Ca²⁺ 濃度の保持の低減が観察された (図 6b)。特に、未処理では Ca²⁺ 濃度がピークに達した後徐々に減少したのに対して Pam3CSK4 で処理した場合にはピークに達した後より速やかに減少した。このメカニズムをさらに詳しく解析した。まず、Ca²⁺ のキレート剤である EGTA を用いて小胞体からの Ca²⁺ 放出を解析した。Pam3CSK4 で前処理することにより小胞体からの Ca²⁺ 放出が抑制された

(図 6c)。次に、Thapsigargin (Tg) を用いて小胞体の Ca²⁺ を枯渇させ、その後の細胞外からの Ca²⁺ 流入を解析した結果、Pam3CSK4 の前処理による顕著な変化はみられなかった (図 6d)。このことから Pam3CSK4 は小胞体からの Ca²⁺ 放出を抑制することにより、その後の細胞外からの Ca²⁺ 流入が抑制されたためであることが示唆された。よって Pam3CSK4 による抑制にはこれらの細胞内シグナル分子の活性化の抑制が寄与していると考えられた。

以上のことから、プロバイオティクス菌体などのグラム陽性菌に含まれる TLR2 リガンドが直接マスト細胞の活性化を抑制することによりアレルギー抑制作用を示す可能性が示された [9]。

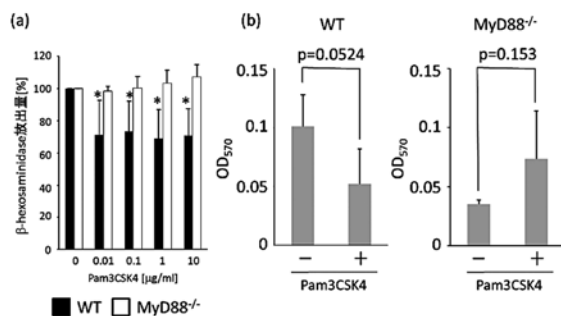


図 5 MyD88 依存性の評価
Pam3CSK4 が WT 及び MyD88^{-/-} マウス由来 BMMC の脱顆粒に及ぼす効果 (a). Pam3CSK4 が血管透過性の亢進に及ぼす効果 (b).

* : 未処理に対して有意差あり (p<0.05)

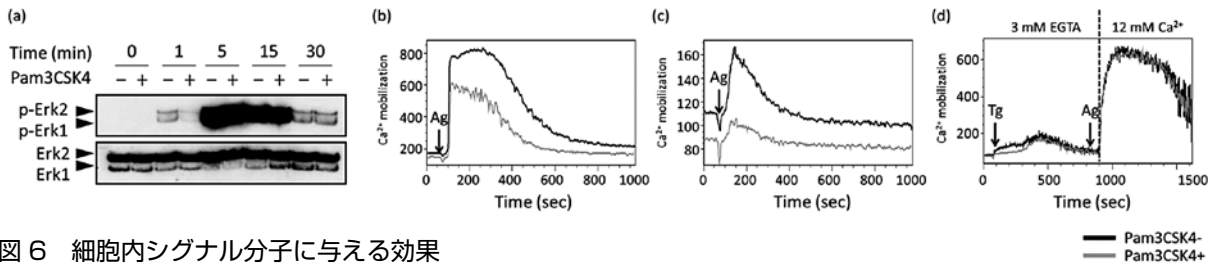


図 6 細胞内シグナル分子に与える効果

IgE/ 抗原による RBL-2H3 の Erk 1/2 の活性化に及ぼす Pam3CSK4 の効果 (a)。

Pam3CSK4 が RBL-2H3 の細胞内 Ca²⁺ 動態に及ぼす効果 (b) . Pam3CSK4 が RBL-2H3 の小胞体からの Ca²⁺ 放出に及ぼす効果 (c)。Pam3CSK4 が RBL-2H3 の細胞外からの Ca²⁺ 流入に及ぼす効果 (d)。

【マスト細胞の終末分化における腸内共生菌の効果】

さらに、近年、プロバイオティクスの抗アレルギー作用に加えて腸内共生菌とアレルギーとの関係が注目されている。これまでに、アレルギー児と非アレルギー児との間に腸内細菌叢の構成に違いがあることが明らかにされている。Bjorkstenらはアレルギーの発症率が低いエストニアと発症率が高いスウェーデンで小児の腸内細菌叢を比較した結果、アレルギー疾患児では好気性菌である *Staphylococcus aureus* が有意に多く、*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* が少ないことを示している [10]。また、マウスモデルにおいて、腸内共生菌のいない無菌マウスでは通常マウスに比べて、免疫後に遅れがあるものの IgE がより高いレベルに上昇し、アレルギーを発症しやすいという報告がある [11]。また、無菌マウスでは、腸管組織中の IgA 量が通常マウスに比べて極めて低いことが示されており [12]、ヒト及びマウスにおいて IgA のレベルが低いことと食物アレルギーには関係があることが示されている。さらに無菌マウスでは経口免疫寛容が誘導されにくいことが報告されている [11,13]。このように、腸内共生菌はアレルギー炎症につながる T 細胞応答を抑え、IgA 産生誘導することにより抗原除去を高めるといったことを介してアレルギーの制御に関わると考えられている。しかしながら、これらの機構は未だ未解明な点が多くあり、腸内共生菌とアレルギーの関係についてははっきりとした証拠は十分ではない。

マスト細胞は、骨髄中で幹細胞から分化し、未成熟な細胞として放出され、定着した末梢組織で各組織特異的なマスト細胞へと分化・成熟をする [14,15]。したがって、多量の腸内共生菌が生息する腸管では、腸内共生菌がマスト細胞の終末分化を制御することでアレルギー炎症

を制御している可能性が考えられる。実際にマスト細胞の分化・成熟は局所環境による刺激が重要であることが示されており、腸内共生菌またそれが形成する腸管特異的な要因がマスト細胞の終末分化に重要な働きをしていることが予想される。腸内細菌叢の構成がアレルギーの罹患リスクに影響すると言われているが、その一部は共生細菌あるいはその成分がこのような機構によりマスト細胞の機能を調節することに起因するかもしれないと考えられる。

そこで、我々は、マスト細胞の終末分化に及ぼす腸内共生菌の作用を明らかにすることを目的とした。

野生型及び MyD88^{-/-} マウス由来骨髄細胞を IL-3 含有培地で 3 週間培養し、未成熟なマスト細胞を得た。未成熟な BMMC をマウス腸内共生菌の優勢菌種である *Lactobacillus* (LA) または *Bacteroides* (BA) の超音波破碎菌体で 2 週間刺激した。LA として *Lactobacillus casei* JCM1134、BA として *Bacteroides acidifaciens* typeA43 を用いた。

転写因子 C/EBP α の mRNA 発現は、BMMC の分化に伴い低下した。一方、LA で二週間刺激することで、分化に伴う C/EBP α 発現の抑制が MyD88 依存的に抑えられた。この効果は BA 刺激ではみられなかった。C/EBP α は好中球やマクロファージなどのミエロイド系の細胞の分化に重要な転写因子であることから [16,17]、LA 刺激によりマスト細胞の自然免疫系の機能が強化された可能性がある。顆粒形成における菌体刺激の効果をトルイジンブルー染色により測定した。LA で 2 週間刺激することでトルイジンブルーによる染色が弱くなったことから、顆粒形成が MyD88 依存的に抑制されたことが示された。BA では効果がなかった。

以上のことから、腸内共生菌はマスト細胞の終末分化を調節している可能性が考えられた。

特に、C/EBP α 発現の上昇によるマスト細胞の機能への効果はまだ明確ではないが、自然免疫系の機能を強化することにより、感染防御に貢献している可能性が示唆された。

マスト細胞は、アレルギー発症のエフェクター細胞としてよく知られているが、その生理的役割は生体防御にあるといわれている。皮膚や粘膜など外界と接する組織に多く存在していることから感染防御の第一線で機能しているといえる。実際に、マスト細胞欠損マウスでは感染時に病原体の排除ができないことがあることから、マスト細胞が自然免疫に重要な役割を果たしていることが明らかになった。このようにマスト細胞は2つの局面を持っているが、そのバランスがどのように保たれているのかは明らかにされていない。特に腸管は、食物アレルギーのアレルゲンが吸収される場である一方、外界からの細菌が侵入してくる場でもあるため、腸管におけるマスト細胞の機能のバランスが重要であると予想される。腸管でこのバランスを支えている要因のひとつは腸内共生菌である可能性が十分考えられる。

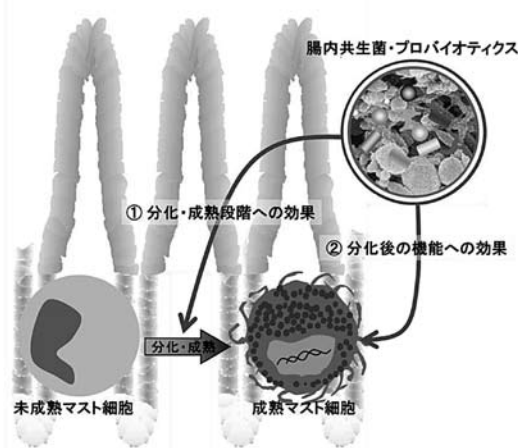


図7 腸内共生菌及びプロバイオティクスと腸管粘膜マスト細胞

腸内共生菌及びプロバイオティクスは腸管粘膜マスト細胞の分化・成熟及び成熟後のマスト細胞の機能を修飾する可能性が示唆された。

以上をまとめると、腸内共生菌及びプロバイオティクスはマスト細胞の終末分化及び分化後のアレルギー応答を制御している可能性が示唆された。今後は、さらにその作用機序を明らかにし、マスト細胞の機能のバランスを整えるためにより良い腸内細菌叢の解明、またそのような腸内細菌叢を保つためのプロバイオティクスの同定が期待される。

【引用文献】

1. Nonaka, Y., T. Izumo, F. Izumi, T. Maekawa, H. Shibata, A. Nakano, A. Kishi, K. Akatani, and Y. Kiso. 2008. Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145:249-257.
2. Feleszko, W., J. Jaworska, R.D. Rha, S. Steinhausen, A. Avagyan, A. Jaudszus, B. Ahrens, D.A. Groneberg, U. Wahn, and E. Hamelmann. 2007. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 37:498-505.
3. Rosenfeldt, V., E. Benfeldt, S.D. Nielsen, K.F. Michaelsen, D.L. Jeppesen, N.H. Valerius, and A. Pærregaard. 2003. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:389-395.
4. Ishida, Y., F. Nakamura, H. Kanzato, D. Sawada, H. Hirata, A. Nishimura,

- O. Kajimoto, and S. Fujiwara. 2005. Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Dairy Sci.* 88:527-533.
5. Tamura, M., T. Shikina, T. Morihana, M. Hayama, O. Kajimoto, A. Sakamoto, Y. Kajimoto, O. Watanabe, C. Nonaka, K. Shida, and M. Nanno. 2007. Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar pollen: randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143:75-82.
 6. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167:2250-2256.
 7. Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada. 2004. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* 173:531-541.
 8. Qiao, H., M.V. Andrade, F.A. Lisboa, K. Morgan, and M.A. Beaven. 2006. FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* 107:610-618.
 9. Kasakura, K., K. Takahashi, T. Aizawa, A. Hosono, and S. Kaminogawa. 2009. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150:359-369.
 10. Bjorksten, B., P. Naaber, E. Sepp, and M. Mikelsaar. 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy* 29:342-346.
 11. Sudo, N., S. Sawamura, K. Tanaka, Y. Aiba, C. Kubo, and Y. Koga. 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* 159:1739-1745.
 12. Umesaki, Y., and H. Setoyama. 2000. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* 2:1343-1351.
 13. Ishikawa, H., K. Tanaka, Y. Maeda, Y. Aiba, A. Hata, N.M. Tsuji, Y. Koga, and T. Matsumoto. 2008. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 153:127-135.
 14. Galli, S.J. 2000. Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* 7:32-39.
 15. Arinobu, Y., H. Iwasaki, and K. Akashi. 2009. Origin of basophils and mast cells. *Allergol. Int.* 58:21-28.
 16. Arinobu, Y., H. Iwasaki, M.F. Gurish, S. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D.G. Tenen, K.F. Austen, and K. Akashi. 2005. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages

- in adult murine hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:18105-18110.
17. Wang, D., I. Paz-Priel, and A.D. Friedman. 2009. NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production. *J. Immunol.* 182:5757-5762.

Regulation of the function of mast cells by commensal bacteria and probiotics

Kazumi Kasakura

Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University · Research Fellow of the
Japan Society for the Promotion of Science
(1866 Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252-0880, Japan)