

IL-12 発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析

薩 秀夫*, 梅谷華奈*, 日浦月穂**, 柴田奈那**,
鈴木政彦***, 辻川勇治***, 坂根 巖***

1 はじめに

現在の日本では、少子高齢化が急速に進んでおり、今後ますます高齢者の健康長寿や子どもの健やかな成長が望まれる。しかし、我々の生活は常にインフルエンザや新型コロナウイルスなど感染症の脅威と隣り合わせであり、特に免疫力の低下した高齢者にとって感染症は深刻な問題である。また、子どもにおいても感染症による学級閉鎖など感染症の流行は社会的な影響が大きい。このような背景から、毎日手軽に摂取できる食品による免疫力の強化、感染症の予防が望まれている。

インターロイキン 12 (IL-12) はマクロファージや樹状細胞から分泌されるサイトカインであり、免疫賦活作用が報告されている。すなわち分泌された IL-12 はナイーブ CD4T 細胞を CD4⁺T 細胞へと分化させ、さらにインターフェロン γ (IFN γ) の産生を亢進する。IFN γ はナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化することでウイルス感染細胞やがん細胞などに対する攻撃を増強し、生体防御能を高めることが知られている。一方で、乳酸菌・ビフィズス菌をはじめとするプロバイオティクスは近年整腸作用やアレルギー軽減など様々な機能が報告されており、NK 細胞の活性化などを介した感染防御能の亢進も報告されている¹⁾。そこで本研究では、NK 細胞活性化を誘導する IL-12 に注目することとし、マクロファージモデル細胞を用いて IL-12 の発現・分泌を亢進する新たなプロバイオティクスの探索・解析をおこなうこととした。

2 IL-12 発現・分泌を亢進するプロバイオティクスの探索・解析

2・1 マクロファージモデル J774.1 細胞の培養

マクロファージモデル細胞として、マウス腹水由来マクロファージ様細胞 J774.1 を用いた。10% の牛胎児血清と抗生物質を含む RPMI 培地を用いて 100 mm ディッシュに培養した。細胞が 80% 程度のコンフルエントの状態になると継代操作をおこなった。

2・2 IL-12 mRNA 発現量の測定

J774.1 細胞における IL-12 mRNA 発現量は、real-time PCR 法を用いて解析した。J774.1 細胞を 24-well plate に 2.5×10^5 cells/well で播種し、翌日に乳酸菌・ビフィズス菌を含む培地に置き換えた。菌体は、24 時間嫌気条件で培養し PBS で洗浄後、オートクレー

ブ処理した死菌体を用いた。菌体を含む培地で一定時間インキュベート後、RNAiso Plus を用いて RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。各種遺伝子の primer と TB Green Premix Ex Taq を用いて 7300 Real-Time PCR System により解析をおこなった。

2・3 J774.1 細胞における IL-12 分泌量の測定

J774.1 細胞からの IL-12 分泌量は、sandwich-ELISA 法を用いて測定した。96-well plate に J774.1 細胞を 1.0×10^5 cells/well で播種し、翌日に菌体を含む培地に置き換えた。一定時間インキュベート後、培養上清を回収し ELISA キットを用いて IL-12 分泌量を測定した。

2・4 IL-12 mRNA 発現を亢進するプロバイオティクスの探索

定常状態の J774.1 細胞では、IL-12 の mRNA は発現していないことが確認された。また IL-12 の発現を誘導することが知られるリポ多糖 (LPS) を 100 ng/ml の濃度で添加したところ、IL-12 の mRNA 発現亢進がみられた。これより、LPS 添加群の IL-12 mRNA 発現量をコントロールとして LPS 添加群との比較の形でスクリーニングをおこなうこととした。実際に乳酸菌・ビフィズス菌の死菌体を用いて、J774.1 細胞における IL-12 の mRNA 発現量を亢進するプロバイオティクスの探索をおこなった。その結果、*Lactobacillus* 属の BIC1302 株と *Bifidobacterium* 属の BIC1701 株が IL-12 の mRNA 発現量を 100 ng/ml LPS 以上に増加させることを見出した (図 1)²⁾。

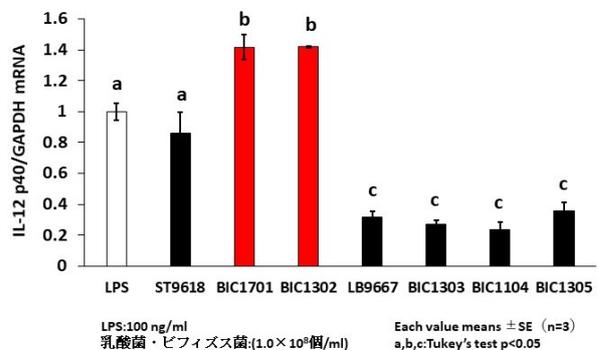


図 1 乳酸菌・ビフィズス菌が IL-12 mRNA 発現におよぼす影響

† 原稿受理 令和 4 年 2 月 28 日 Received February 28, 2022

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

** 生物学専攻 (Department of Biotechnology)

*** (株)伊藤園 中央研究所 (Central Research Institute, ITO EN Ltd.)

2・5 BIC1302 株による IL-12 mRNA 発現亢進の菌数依存性

BIC1302 株と BIC1701 株のうち、*Lactobacillus acidophilus* 種に属する BIC1302 株に注目することとし、その菌数を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 個/ml に変えて J774.1 細胞に添加した。その結果、添加した菌数依存的に IL-12 の mRNA 発現量は増加し、 1×10^8 個/ml で最も高い mRNA 発現量の増加がみられた (図 2)。

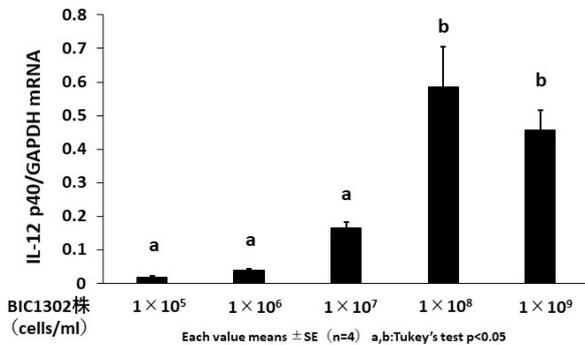


図 2 BIC1302 株による IL-12 mRNA 亢進の菌数依存性

2・6 BIC1302 株が IL-12 分泌量におよぼす影響

次に、BIC1302 株を J774.1 細胞に添加して 24 時間培養後の培地中の IL-12 量を sandwich-ELISA に供した。その結果、IL-12 分泌量は BIC1302 株添加によって増加することが確認された (図 3)。これより BIC1302 株は、IL-12 分泌を亢進することが示唆された。

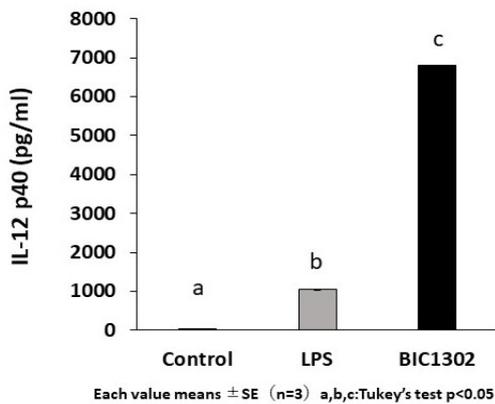


図 3 BIC1302 株が IL-12 分泌に及ぼす影響

2・7 IL-12 発現亢進に関与する菌体成分の解析

これまでに知られている IL-12 発現を亢進する乳酸菌株は、その核酸成分が亢進に関与することが報告されている³⁾。そこで次に、菌体のどのような成分が IL-12 mRNA 発現に関与しているのかを調べるため、BIC1302 株に酵素処理をおこなった。まず、DNase を 0,5,20U/ml 添加したところ、DNase 処理した BIC1302 株の IL-12 mRNA 発現は、酵素未処理群と比べて変化がみられなかった (図 4A)。これより、BIC1302 株の DNA は IL-12 mRNA 発現亢進に関与しないことが示唆された。続いて

BIC1302 株に RNase を 0,1,2U/ml 添加したところ、RNase 処理した BIC1302 株の IL-12 mRNA 発現は、酵素未処理群と比べて変化がみられなかった (図 4B)。これより、BIC1302 株の RNA は IL-12 mRNA 発現亢進に関与しないことが示唆された。

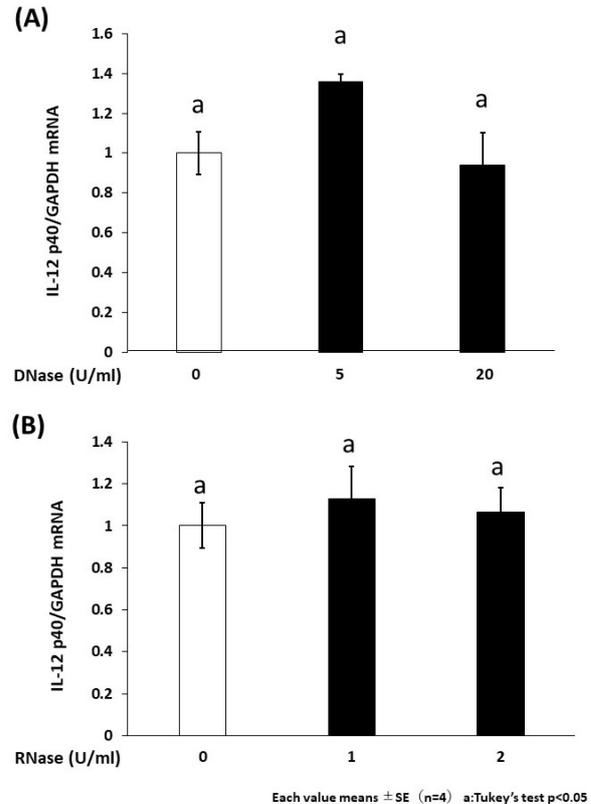


図 4 BIC1302 株による IL-12 mRNA 発現亢進に対する DNase (A) および RNase (B) の影響

3 まとめ

本研究より、マクロファージモデル細胞において乳酸菌の一種である BIC1302 株が IL-12 発現を亢進することが示された。またその亢進には BIC1302 株の DNA や RNA といった核酸は関与せず、その他の菌体成分が関与していることが示唆された。今後はさらに、IL-12 発現亢進に関与する菌体成分について、細胞壁成分などを中心に解析を進める予定である。

参考文献

- 1) 牧野聖也, 池上秀二, 狩野宏, 伊藤裕之, 免疫調節多糖類を産生する乳酸菌を活用した機能性ヨーグルトの開発, 化学と生物 Vol.53, No.10, pp.709-714, 2015.
- 2) 梅谷華奈: マクロファージにおける IL-12 発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析, 平成 29 年度前橋工科大学卒業論文.
- 3) 日浦月穂: IL-12 発現を亢進する乳酸菌の探索および解析, 令和 2 年度前橋工科大学修士論文.