

# 腸内細菌およびプロバイオティクスによるマスト細胞のアレルギー反応の制御

高橋 恭子

日本大学 生物資源科学部

## 研究の目的

近年、アレルギー症状を有する人が劇的に増加しており、大きな社会問題となっている。アレルギー炎症の責任細胞として広く知られるマスト細胞は、高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を発現し、この受容体が IgE 抗体とアレルゲンにより架橋されると細胞内へ活性化シグナルが伝達される。これにより、細胞内の顆粒中に蓄えられていたヒスタミンなどの炎症性物質の放出（脱顆粒）をはじめとするアレルギー炎症反応が誘導される。

マスト細胞は、骨髄中で分化した後血中へと放出されるが、この時点ではまだ未成熟な状態であり、粘膜や皮膚に到達した後それらの末梢組織で最終分化、成熟する。なかでも腸管は、広大な粘膜面積を有するため生体内のマスト細胞のリザーバーとして機能するのみでなく、その管腔内に莫大な数の腸内細菌が生息するという特徴的な組織である。本研究では、マスト細胞と腸内細菌の相互作用の分子機構を解明し、腸内細菌の抗アレルギー作用について新規なメカニズムを明らかにすることにより、食によるアレルギーの予防・症状緩和の方法の確立に応用することを目的とした。

## 方法

### ① 腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成の制御

これまでに、マスト細胞に *Lactobacillus casei* JCM<sup>1134</sup>(LC)菌体が作用し、転写因子 C/EBPα の発現上昇を介して顆粒形成を抑制することを明らかにしてきた<sup>1</sup>。この分子機構を明らかにするために、以下の実験を行った。6 週令の雌性 C57BL/6 マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、IL-3 含有培地で 4~8 週間培養して骨髄由来マスト細胞(BMMC)を得た。BMMC を LC 菌体にて刺激し、顆粒形成に関わる分子(HDC, Serglycin, Ctr2, Mcpt4, Mcpt5, Mcpt6, Galnac4S6ST, Cpa3, NDST-2, C4ST-1)の発現量を定量 RT-PCR により解析した。また、BMMC に C/EBPαの発現プラスミドをエレクトロポレーションにより導入し、同様の測定を行った。さらに、本菌株の菌体成分を図 1 のように分画し、各画分を BMMC に添加して 24h 培養後、定量 RT-PCR にて C/EBPαの発現を測定した。

### ② 腸内細菌によるマスト細胞の IgE 受容体の発現制御

これまでに BMMC に様々な腸内細菌の加熱死菌体を添加して培養し、細胞表面の

FcεRI の発現に及ぼす影響を解析した結果、*Bacteroides acidifaciens* type A43(BA)に FcεRI の発現を抑制する作用が認められた。本菌株による抑制機構を明らかにするために、FcεRI 各サブユニットの mRNA 発現と細胞内も含めた全タンパク発現、FcεRI の細胞表面の発現をそれぞれ定量 RT-PCR、ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリーにより測定した。また、MAPK 等シグナル分子の活性化に及ぼす影響をウェスタンブロットティングにより解析した。

## 結果

### ① 腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成の制御

BMMC を LC 菌体にて刺激することにより、HDC、serglycin、Ctr2 の発現の低下が観察された。また、BMMC に C/EBPα を過剰発現させることにより、serglycin の mRNA 発現の低下が認められたが、HDC、Ctr2 の発現は低下しなかった。したがって、LC 菌体の刺激により発現が低下した分子のうち、serglycin は C/EBPα の発現上昇に依存して発現が抑制されるのに対して、HDC および Ctr2 の発現抑制は C/EBPα には依存しないことが示された。これらの結果を表 1 にまとめた。したがって、菌体刺激による顆粒形成の抑制は、顆粒を構成するコンドロイチン硫酸やヘパリンといったプロテオグリカンの骨格タンパクの減少が関わる可能性が考えられた。また、LC の菌体成分を分画した結果、細胞壁画分に C/EBPα の発現を上昇させる活性が認められ、なかでもタイコ酸画分が強い活性を示した。

### ② 腸内細菌によるマスト細胞の IgE 受容体の発現制御

BMMC を BA 菌体で長期間刺激することにより、細胞表面上の FcεRI の発現が減少することが確認された。一方、FcεRIα鎖およびβ鎖の mRNA 発現は刺激初期に一過性に減少する傾向が観察されたものの、有意差は認められなかった。また、刺激期間中、β鎖の細胞内も含めた全タンパク発現量に変動は認められなかった。さらに、Erk のリン酸化が刺激初期に抑制される傾向が示された。一方、Erk の阻害剤を BMMC に添加して培養することにより、細胞表面上の FcεRI の発現低下が観察された。以上の結果を合わせると BA 菌体は Erk の活性化を抑制することでマスト細胞の FcεRI の発現を抑制し、その抑制作用は主に翻訳後段階の制御によるものである可能性が考えられた。

## 結論

本研究では、腸内細菌によるマスト細胞のアレルギー反応の制御機構として、以下の 2 点を明らかにした。(1) 特定の菌体成分がマスト細胞の顆粒を構成するプロテオグリカンの生成を転写因子 C/EBPα 依存的に抑制することにより、顆粒形成を抑制することが示された。(2) 特定の腸内細菌が Erk の活性化を抑制することにより、高親和性 IgE 受容体の細胞表面上の発現を主に翻訳後段階で抑制することが示

唆された。これらの作用機序は、プロバイオティクスの抗アレルギー作用の評価指標として応用できる可能性が期待される。

## 文献

1. Kasakura, K. *et al.* (2014) C/EBP $\alpha$  controls mast cell function. *FEBS Lett.* **588**: 4645-4653.

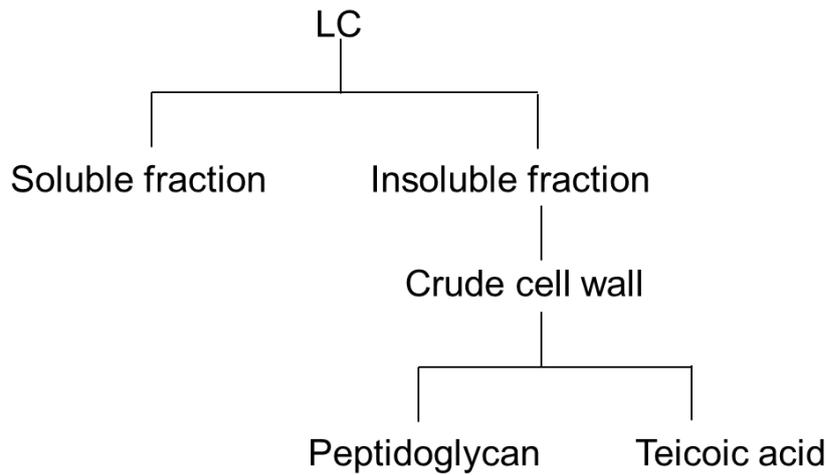


図1 LC菌体の分画

LC菌体を超音波破碎後、遠心分離し、可溶性画分と不溶性画分を得た。不溶性画分を脱脂およびプロナーゼ・ヌクレアーゼ処理し、粗細胞壁画分を得た。粗細胞壁画分からさらに、ペプチドグリカン画分とタイコ酸画分を調製した。

	LC stimulation	C/EBP $\alpha$ overexpression	C/EBP $\alpha$ dependency
HDC	↓	→	-
serglycin	↓	↓	+
Ctr2	↓	→	-

表1 LC刺激およびC/EBP $\alpha$ 過剰発現が顆粒形成関連分子の発現に及ぼす影響

BMMCをLC菌体にて刺激、あるいはC/EBP $\alpha$ 発現プラスミドを導入し、顆粒形成関連分子のmRNA発現に及ぼす影響を解析した。

↓: 発現低下

→: 変化なし

-: 非依存的

+: 依存的