

乳酸菌による多発性硬化症治療への試み

中 辻 裕 司

大阪大学医学部神経内科 講師

緒 言

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) は中枢神経系の代表的炎症性脱髄疾患であり、若年期に発症した後、長期に渡って再発・寛解を繰り返しながら増悪する難病である。欧米で非常に多く世界的に若年成人の身体障害を来す筆頭疾患である。日本では従来希少疾患であったが、近年その患者数が特に日本において急増している。そこで急増の原因を究明し、適切な予防・治療法を講じることが急務である。MS の発症要因として遺伝要因と環境要因が考えられるが、短期間で遺伝要因は不変であることから、環境要因の変化が日本における MS 急増につながっていると推定される。

MS の病態に関しては、主にモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) を用いた研究により CD4 陽性 IL-17 産生 T 細胞(Th17 細胞)や制御性 T 細胞(Treg 細胞)が重要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。一方、近年腸管粘膜下層、腸管膜リンパ節における Th17 細胞、Treg 細胞に腸内細菌叢が影響を及ぼし、腸内環境の変化に伴う免疫動態の変化が炎症性腸疾患のみならず膠原病をはじめとする様々な自己免疫性疾患に重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁾。そこで我々は患者数増加の原因と推定される環境要因の変化の中でも食習慣の変化が特に重要ではないかと考え、炎症性腸疾患や食物アレルギーなどにおいて免疫動態に好影響を与えることが示唆されている乳酸菌を用い、MS のモデル動物である EAE に対する効果と作用機序の解析を行った。

方 法

1. EAE 作成と乳酸菌投与

EAE は C57/BL6 マウスでは myelin oligodendrocyte glycoprotein MOG (35-55) ペプチドと完全フロイントアジュバンド (CFA) を投与後、百日咳毒素を腹腔内に 2

回投与し免疫することにより作成した。SJL/J マウスでは proteolipid protein PLP (139-151) ペプチドと CFA を投与し作成した。

実験に使用した乳酸菌 (*Pediococcus acidilactici* R037, *Lactobacillus delbruekii* LAB4) は培養後遠心洗浄し、80℃にて 30 分間熱殺菌を行い、その後凍結乾燥を行い使用まで 4℃にて保存した。乳酸菌の予防的効果を検証するために、免疫 2 週間前から実験終了まで乳酸菌群 (R037, LAB4) には菌 4 mg/day を、コントロール群には PBS を投与し、EAE 重症度評価、脊髄の組織学的解析、免疫学的解析を行った。

また治療的効果を検証するために乳酸菌 R037 を C57/BL6 マウスに免疫後 11 日目より投与を開始し、EAE の重症度を評価した。

2. 組織学的解析

免疫後 22 日目に C57/BL6 マウスを 4%PFA で還流固定後、凍結切片を作製し、HE 染色にて脊髄への細胞浸潤の評価を行った。

3. サイトカイン測定

EAE 誘導後の全身の免疫動態を調べるため C57/BL6 マウス免疫後 11 日目の所属リンパ節、脾臓より MNCs (mononuclear cells) を採取し MOG ペプチドで 72 時間再刺激を行い細胞上清の IL-10、IL-17、IFN- γ を ELISA を用いて測定した。また乳酸菌による腸管免疫の変化を明らかにするためナイーブマウスに乳酸菌を 2 週間経口投与し、腸管膜リンパ節、脾臓細胞を CD3/CD28 抗体にて 72 時間刺激時の細胞上清中 IL-10、IL-17、IFN- γ の産生を測定した。

4. FACS 解析

C57/BL6 マウスに乳酸菌を 2 週間投与し、腸管膜リンパ節、脾臓における Treg 細胞 (CD4 陽性 Foxp3 陽性

T細胞)、CD4陽性IL-10産生T細胞の比率をFACS解析を用いて調べた。

結 果

1. 乳酸菌 *P. acidilactici* R037 予防的投与の EAE に対する効果

免疫2週間前から実験終了までC57/BL6マウスに乳酸菌群としてR037もしくはLAB4を、コントロール群としてPBSを投与したところ、乳酸菌群においてEAEのピーク時の症状の軽減を認めた(図1A)。次にSJL/Jマウスにおいても同様の検討をおこなったが、やはり症状の軽減を認めた(図1B)。EAEの症状軽減を組織学的に検証するために脊髄への炎症細胞浸潤をHE染色を用いて細胞浸潤の評価を行ったが乳酸菌R037投与群にお

いて明らかな浸潤細胞の抑制が認められた(図2)。これらのことより乳酸菌R037の予防的投与は中枢神経系への細胞浸潤を軽減しEAEの症状を軽減させることが示された。

2. 乳酸菌 R037 の抗原特異的なサイトカイン産生に対する影響

乳酸菌R037の抗原特異的なサイトカイン産生に対する影響を調べるために、C57/BL6マウス免疫後11日目の鼠径リンパ節、脾細胞を採取し、MOGペプチドで再刺激を行い72時間後の細胞上清のサイトカインの測定を行った。R037投与群において鼠径リンパ節ではIL-17の有意な産生低下を認め、脾細胞ではIL-17、IFN- γ 共に有意な産生低下を認めた。IL-10に関しては

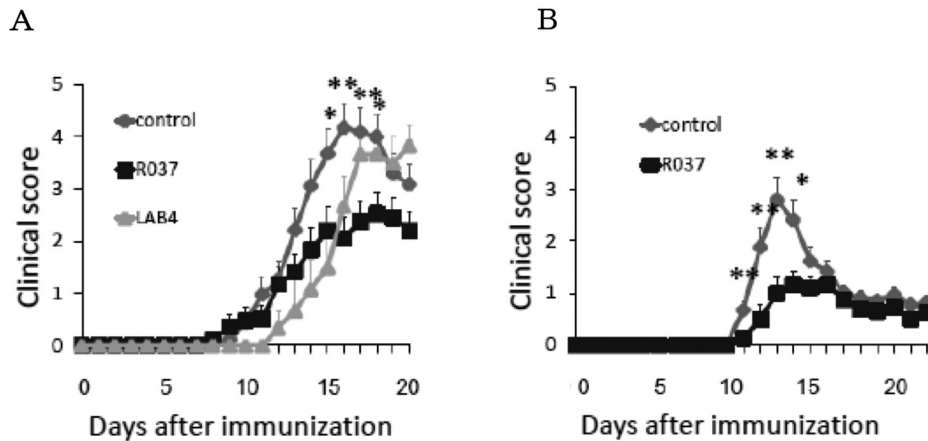


図1

P. acidilactici R037 の予防的経口投与は EAE を軽減する

- A. C57/BL6 マウスでは R037 投与群において EAE のクリニカルスコアの有意な低下を認めた
- B. SJL/J マウスにおいても R037 投与群においてピークスコアの軽減を認めた

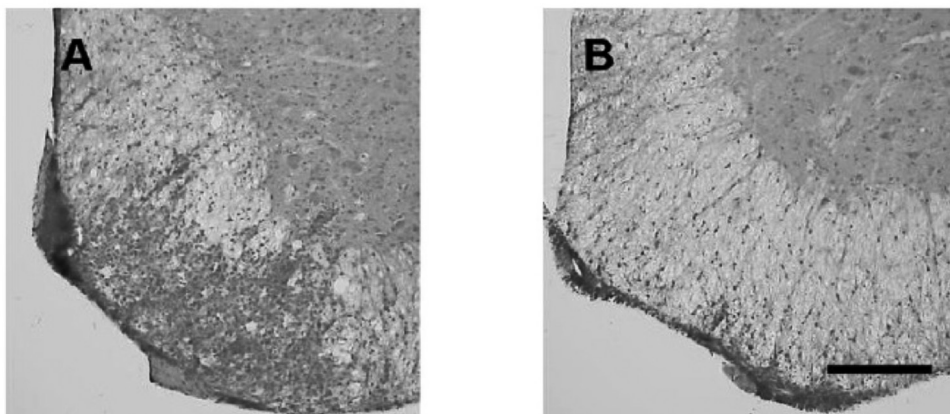


図2

Pediococcus acidilactici R037 投与群において中枢への細胞浸潤は減少している

- A. コントロール群
- B. R037 群

両群で有意な差は認めなかった。このことより乳酸菌 R037 の予防的投与は抗原特異的な炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された (図 3)。

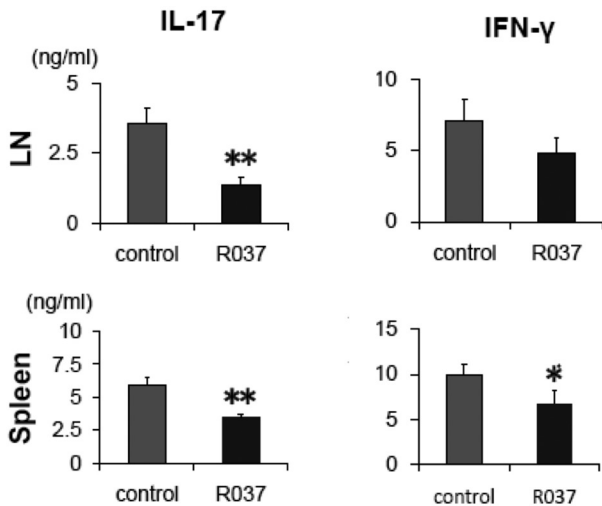


図 3

乳酸菌 R037 の予防的投与は所属リンパ節 (LN)、脾細胞 (Spleen) からの抗原特異的 IL-17, IFN-γ 産生を低下させる

3. 乳酸菌 R037 の CD4 陽性 IL-10 産生細胞に対する影響

R037 の経口投与のみによる免疫動態への影響を調べるために、乳酸菌 R037 を 2 週間投与した時点で C57/BL6 マウスから腸管膜リンパ節、脾細胞を調製し、CD3/CD28 抗体にて刺激を行い 72 時間後の細胞上清のサイトカイン測定を行った。IL-17、IFN-γ の産生は 2 群間で有意な差を認めなかったものの、IL-10 の産生は乳酸菌群において有意な上昇が認められた。

次に代表的な制御性 T 細胞である Foxp3 陽性 T 細胞の比率を調べたが腸管膜リンパ節、脾臓での比率では差を認めなかった。しかし CD4 陽性 IL-10 産生 T 細胞の比率を調べたところ腸管膜リンパ節、脾細胞において増加を認めていた (図 4)。

4. 乳酸菌 R037 の治療的投与の EAE に対する効果

R037 の治療的投与による効果を評価するために C57/BL6 マウスに対し発症直後である免疫 11 日目より R037 を投与し、重症度を評価した。ピークスコアでは有意な差は認めなかったものの、area under the curve (AUC) では投与後 2-7 日において乳酸菌群でコントロール群に比べ有意な低下を認めた (図 5)。

考 察

本研究において乳酸菌 *P. acidilactici* R037 経口投与が EAE の症状を予防的、治療的に軽減することが明らかになった。他の乳酸菌である *Lactobacillus delbrueckii* LAB4 株では効果は認められなかった。更に R037 の経

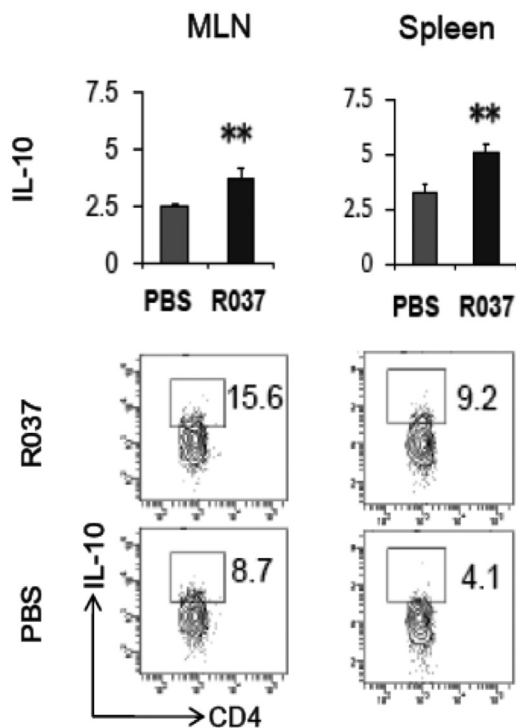


図 4

R037 投与により腸管膜リンパ節 (MLN)、脾細胞 (Spleen) での CD4 陽性 IL-10 産生細胞が増加する

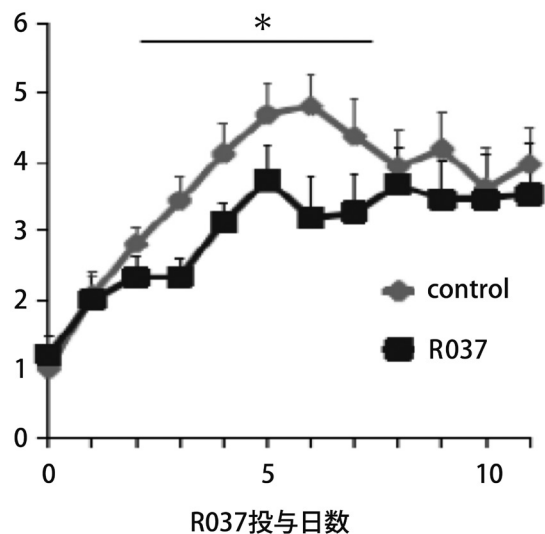


図 5

R037 の治療的投与も EAE を軽症化させる

口投与の効果は異種の SJL/J マウスを、異なる抗原 PLP ペプチドで誘導した EAE に対しても確認できたことからマウスの種によらず抗原非特異的と考えられる。

近年様々な自己免疫性疾患や多発性硬化症において IL-17 の病態への関与を示唆する報告が数多く見られている。今回の実験において、EAE 発症時における所属リンパ節、脾細胞の抗原特異的刺激による IL-17 産生は R037 投与群において低下していた。R037 投与により全身での炎症反応が抑制され、中枢神経系への細胞浸潤の低下も認められた。またナイーブマウスへの乳酸菌経口投与のみにより腸間膜リンパ節、脾細胞の MNCs の CD3/CD28 抗体刺激による細胞上清中の IL-10 産生増加が認められた。更に CD4 陽性細胞における IL-10 産生細胞比率の増加を認めていたが、CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞の比率は乳酸菌群、コントロールの 2 群間では差がなかった。制御性 T 細胞としては CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞や LAP (lactency-associated protein) 陽性細胞、CD4 陽性 Foxp3 陰性であり IL-10 を産生する Tr-1 細胞が知られている。今回 Foxp3 陽性細胞や LAP 陽性細胞の比率は乳酸菌群、コントロール群において差を認めず IL-10 産生細胞のみに差を認めたことから CD4 陽性 Foxp3 陰性 IL-10 産生細胞が R037 経口投与により誘導され、炎症に抑制的に働いていると考えられる。

先行研究として抗生剤による腸内細菌の除去や *Bacteroides fragilis* の菌体成分である Polysaccharide A が EAE に効果的であったとの報告があり、EAE、多発

性硬化症と腸内環境には密接な関係があると考えられる^{3,4)}。今後詳細な分子メカニズムを検討することにより、より効果的な菌株の探索や菌体成分などの検索を行うことにより、腸管免疫を利用した多発性硬化症に対するより安全で安価な治療法を開発してゆきたいと考えている。

要 約

乳酸菌 *P. acidilactici* R037 の経口投与は CD4 陽性 Foxp3 陰性 IL-10 産生細胞を誘導し、抗原特異的な炎症性サイトカインの産生を抑制し EAE を抑制することが示唆された。乳酸菌を用いた腸管免疫の制御は多発性硬化症の有効な治療法となりうることが示唆された。

謝 辞

最後に公益財団法人三島海雲記念財団よりご助成頂きましたことにより、上記研究を推進することが可能となりました。ここに厚く御礼申し上げます。なお、本研究報告書の内容は現在投稿準備中であることを申し添えます。

参 考 文 献

- 1) Bettelli E et.al. : *Nat Immunol*, **8**, 345-350, 2007.
- 2) Strober W et.al. : *Immunity*, **31**, 377-388, 2009.
- 3) Yokote H et.al. : *Am J Pathol* **173**: 1714-1723, 2008.
- 4) Ochoa-Reparaz J et al. : *J Immunol* **185**: 4101-4108, 2010.