

原著論文

# 細胞培養系を用いた腸管における酵母の免疫応答刺激活性の解析\*

三枝静江\*\*

東京都農林総合研究センター  
(東京都立食品技術センター)

キーワード：酵母，腸管上皮細胞，好中球，サイトカイン，Toll 様受容体  
東京都農林総合研究センター研究報告 7: 1-52, 2012

## 目次

第 1 章 序論	第 4 章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> および <i>Candida albicans</i> に対するヒト好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン産生応答
1.1 酵母の分類と性質	4.1 序
1.2 酵母の利用	4.2 材料と方法
1.3 酵母の病原性	4.3 結果
1.4 腸内フローラと酵母	4.4 考察
1.5 腸管の免疫機構	4.5 小括
1.6 培養細胞を用いた腸管の免疫機能の解析	第 5 章 ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞または好中球様 HL-60 細胞と酵母を共培養した際の酵母菌体成分認識受容体の遺伝子発現変化
1.7 酵母細胞の構造と宿主の受容体	5.1 序
1.8 酵母と食品，プロバイオティクス	5.2 材料と方法
1.9 本研究の目的	5.3 結果
第 2 章 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> および <i>Candida albicans</i> に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の各種サイトカイン産生応答	5.4 考察
2.1 序	5.5 小括
2.2 材料と方法	第 6 章 総合考察
2.3 結果	要旨
2.4 考察	謝辞
2.5 小括	引用文献
第 3 章 種々の酵母および菌体成分に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の応答	関連文献
3.1 序	
3.2 材料と方法	
3.3 結果	
3.4 考察	
3.5 小括	

\*東京大学大学院農学生命科学研究科学学位論文 \*\*連絡先: shizue-saegusa@food-tokyo.jp

## 第1章 序論

### 1.1 酵母の分類と性質

地球最初の生命である原核生物が地球上に誕生したのは今から約38億年前、続いて最初の真核生物が約18億年前、そして「酵母」は約10億年前に誕生したと考えられている。ヒトの祖先がわずか500万年前に誕生したことを考えると、想像も及ばないほどの長い年月を、酵母は地球上で生存し続けてきたことになる。

現在、地球上に存在する生物は一億種を超えるとされ、互いに影響を及ぼしあいながら、生命を維持している。これらの生物について、その遺伝的・機能的・形態的特徴から分類が試みられてきたが、その分類方法には諸説あり、古くは18世紀にCarl Linnaeusが生物を植物界と動物界に分ける2界説を唱えたことに始まる。その後、1866年にはHaeckelが原生生物界を加えて、3界説を提唱したが、20世紀になるとWhittakerが1969年に提唱した5界説(モネラ界, 原生生物界, 菌界, 動物界, 植物界)が主流となった(Whittaker, 1969)。現在では, Woeseによって発表された, 界のさらに上の分類として3つの超界, 真核生物, 真正細菌, アーキア(古細菌)を設けて分類する説が広く受け入れられている(Woese, 1994; Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990) (図1-1)。

酵母やカビ・キノコを含む菌類は, Woeseの説によれば, 真核生物超界に含まれることとなり, 5界説に従えば, 菌界(菌類, 真菌)に含まれることとなる。菌類の

細胞内には, 核膜で仕切られた核, ミトコンドリア, 小胞体, ゴルジ体, 液胞, 微小管などが存在する。菌類のうち, 主として単細胞の形態で増殖する一群を酵母と呼んでいる。

酵母は, 自然界に広く分布しており, 花や果実, 樹皮などの植物, 土壌, 淡水・海水などから分離されるとともに, 南極の土壌や2000~6500mの深海等の極限環境からの分離例も報告されている。また, ミミズや昆虫などの無脊椎動物や, 魚類, 鳥類, 哺乳類などの脊椎動物の消化器官, 呼吸器官, 体表などからも分離され, ヒトの真菌感染症発症時には, 血液や組織内等にも存在が認められる。

酵母は, 菌類の子囊菌門(*Ascomycota*)に属する子囊菌系酵母と, 担子菌門(*Basidiomycota*)に属する担子菌系酵母に分類される(図1-2)。この分類は, 個体間の交配を行う際の減数分裂により形成される有性胞子の形態に基づいている。子囊菌系酵母は, 細胞内に子嚢を持ち, その中に数個の胞子を形成するものであり, 有性世代が見つかっていない不完全菌類(不完全酵母)も子囊菌系酵母に含まれている。代表的な種類として, *Saccharomyces* 属や *Schizosaccharomyces* 属, *Candida* 属等が挙げられる。一方の担子菌系酵母は担子器を形成し, その外側に胞子を形成する酵母で, *Bullera* 属や *Sporobolomyces* 属のほか, *Cryptococcus* 属や *Malassezia* 属, *Rhodotorula* 属が含まれている(大隅・下田, 2007)。しかし, 酵母の分類は不完全な点も多く, 同じ属の酵母が違う目や綱にまたがって存在することも珍しくない。

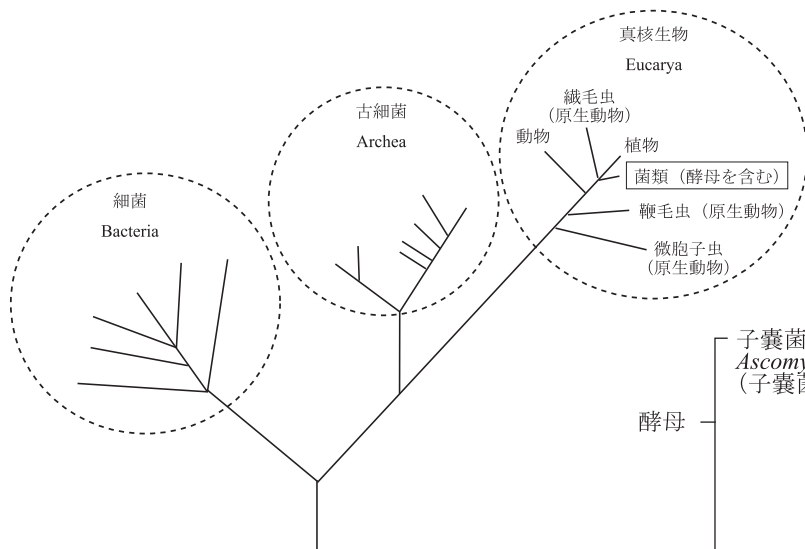


図1-1 Woeseによる生物三超界説

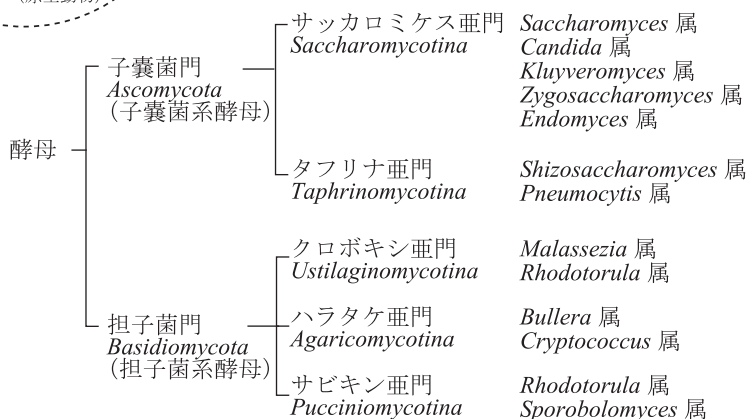


図1-2 酵母の分類と菌種の例

今後、ゲノム情報や遺伝子の機能が解明されることにより、分類体系がさらに整備されていくと考えられる。

また酵母をその無性世代の増殖形態から、*Saccharomyces cerevisiae* を代表とする「出芽酵母」と *Schizosaccharomyces pombe* を代表とする「分裂酵母」の2つのグループに分類することも可能である。出芽酵母では、母細胞から細胞質分裂により小さな芽細胞が形成され、続いて核分裂が起こり、娘細胞が形成される。その後、娘細胞は母細胞から切り離され、独立した細胞となる。一方、分裂酵母では、細胞内に横断隔壁が形成され、その隔壁が2枚に分かれることにより2個の新しい細胞が形成される。

## 1.2 酵母の利用

我々人類は、微生物の存在を認識する遙か以前より、酵母などの微生物を酒造などの醸造発酵に利用してきた。紀元前4000年以前には、メソポタミアでワインやビールが造られていたということを示す記録がある。日本においても「魏志倭人伝」に、酒に関する記述があり、それ以前からすでに醸造技術を有していたことがわかる。17世紀になって、A. van Leeuwenhoek は、自ら発明した顕微鏡を用いて酵母を含むさまざまな微生物を発見したが、醸造が酵母によってなされていることが分かったのは、19世紀になってからである。代表的な酵母として、日本酒などに用いられている *S. cerevisiae*、味噌や醤油に用いられる耐塩性酵母の *Candida versatilis* や *Zygosaccharomyces rouxii*、発酵乳ケフィアに乳酸菌と共に用いられる *Kluyveromyces marxianus* や *Candida kefir*、アフリカのポンベ酒に用いられる *S. pombe*、食飼料用の *Candida utilis* などが挙げられる。

以前は、原材料に自然に付着していたり製造環境中に存在したりする酵母を用いて醸造を行っていたが、現在では、それぞれの醸造に適した菌株を純粋培養したり、また育種によって作製したりして利用し、より効率のよい醸造が可能になっている。

近年では、微生物の遺伝子工学が進展し、真核生物のなかでも遺伝子操作を行いやすく、培養も容易である酵母は、さまざまな物質生産の場として利用されている。酵母は大腸菌や枯草菌と異なり、真核生物であることから、生産されるタンパク質が糖鎖修飾を受けて、高次構造をとり、ヒトタンパク質などと同様の活性を有するようなタンパク質を生産することが可能である。この性質を利用して、医学分野においても、酵母を用いた組み換えヒトタンパク質製剤が生産・利用されている。また、バイオエタノールの需要の高まりとともに、効率的なエタノール生産技術開発のための、酵母の選抜育種が進め

られている。

さらに、酵母は、産業上用いられるだけでなく、モデル実験生物としても利用されており、その価値は非常に高く、科学の進歩に大きな役割を果たしている。酵母の遺伝子機能、細胞内代謝経路、タンパク質発現などは、ヒト細胞と多くの共通点を持っているため、ヒト細胞での多くの現象を、酵母細胞を用いて解明することも可能である。また、哺乳類細胞よりも遺伝子改変が容易なために、さまざまな遺伝子破壊株を用いて、例えば、ヒトのガン発症機構の解明や治療薬開発に関する研究が行われている。

最近では、ゲノム解析技術の進展とともに、酵母のゲノム解析が進められており、実験室酵母の代表である出芽酵母 *S. cerevisiae* や分裂酵母 *S. pombe* に関しては、既に全ゲノムの解析が終了している (Goffeau et al., 1996)。さらには、ひとつひとつの遺伝子を破壊した株など、さまざまな酵母菌株も作製され、日本では文部科学省バイオリソースプロジェクト (酵母) で、約 10,000 株の *S. cerevisiae* と約 7,000 株の *S. pombe*、およびそれらの DNA ライブラリーが収集・保存・分譲されている。これらの酵母細胞は、生物学分野の研究において、生体機能の解明に利用されている。

## 1.3 酵母の病原性

酵母は、産業や科学の優れた材料として利用される一方で、ヒトをはじめとする哺乳類の口腔や鼻腔、腸管、皮膚などに常在していることが知られている。これらの酵母は、通常、健康な宿主の体表面・体内では無害であるが、生体防御機能が弱ったときには病原性を発揮し、日和見感染症を誘発することがある。また、通常環境中に浮遊・存在する菌種が感染を引き起こすこともある。特に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染時や自己免疫疾患等による好中球減少症の患者において、酵母感染が重篤な症状を示すことが多い。また、院内感染の原因菌としても酵母はときに問題となる。

日和見病原性酵母の代表的酵母が、*Candida albicans* である。通常は粘膜面に酵母形で存在するが、宿主の免疫が衰えてくると、組織内に侵入して発芽管を伸長させ、菌糸を形成する。細胞形態により、その細胞構成成分や代謝活動が異なるため、宿主の免疫系に及ぼす影響も変化する。菌糸形の *Candida* は、宿主細胞に貪食されにくくなり、細胞傷害性を示すプロテアーゼやリパーゼを産生するために治療が困難となりやすい。また、*C. albicans* 感染時には、炎症反応を示す一方で、免疫反応が抑制されることも報告されているが、その機構については未だ解明されていない点が多い。*Candida* 属では、*C. albicans*

以外に、*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*なども病原性を示すことが報告されている。

*Candida* 属以外では、環境中に生息する二形成酵母 *Blastomyces dermatitidis* や *Histoplasma capsulatum*, *Pracocidioides brasiliensis* が病原性を示す。これらの酵母は通常、*Candida* 属とは反対に、土壤中 (27°C) などでは菌糸形をとるが、ヒトなどの生体内 (37°C) に入ると酵母形で増殖する。そして、酵母形のまま、マクロファージに取り込まれ、全身に感染が広がる。また、土壌などから分離される *Cryptococcus neoformans* も病原性を有することが知られており、酸性ヘテロ多糖体からなる莢膜を有することで、感染した宿主の免疫機構から逃れやすくなり、肺や中枢神経系に感染する。そのほかにも、*Pneumocystis carinii* による肺炎、皮膚常在性酵母 *Malassezia furfur* によるカテーテルを介した感染例などが報告されている。いずれも、健康な免疫機能を有した宿主であれば、感染が起こっても自然治癒することが多いが、何らかの疾患等によって免疫機能に障害をきたしている場合には、感染が広がり重篤な症状を示すことが多い。

真菌症の治療には、薬剤を使った化学療法が一般的である。現在、日本で治療薬として利用されている抗真菌薬は、真菌の DNA 合成を阻害するフルオロピリミジン系、細胞壁成分の  $\beta$ -グルカン合成を阻害するエキノキャンディン (キャンディン) 系、細胞膜成分のエルゴステロールの合成を阻害するポエリン系とアゾール系の4種類に分類される。これらの抗菌スペクトルはそれぞれ異なっており、対象とする菌種に適した薬剤を選択することが重要である。また、酵母の発育ステージによっても、感受性が異なり、自然耐性 (一次耐性) を有している菌や、薬剤の使用により出現する獲得耐性 (二次耐性) 菌の存在も問題となっている。薬剤耐性の獲得は、抗真菌薬の標的となる分子の過剰発現や、薬剤との親和性の低下、薬剤の透過性の低下、ABCトランスポーターによる薬剤排出等が原因と考えられている。さまざまな抗真菌薬の開発が進められているが、真菌細胞とヒト細胞では、遺伝的・構造的にも共通部分が多く、類似したタンパク質合成装置を持っているため、真菌にのみ毒性を示す薬剤の開発は難しい。

#### 1.4 腸内フローラと酵母

哺乳類をはじめ、鳥類、昆虫等、広く動物の腸管内には、多くの細菌や真菌などの微生物が常在しており、この微生物群を腸内菌叢 (腸内フローラ) と呼んでいる。ヒトの腸管には、ヒトの細胞数以上の数の微生物が常在しているとされ、糞便 1 g あたり  $10^{11}$  個もの微生物が含

まれていることが知られている (光岡, 1990; 森下, 1990)。これらの微生物は強く排除されずに、宿主と共生しているともいえる状態を保持している。腸内菌叢の構成は、動物種や個体、食餌内容や、抗生物質の摂取、全身の健康状態、ストレス、年齢などの宿主側の要因によって変化するほか、クォーラムセンシング (細胞密度依存的制御機構) などの微生物同士の相互作用等によっても変化する。

近年、糞便から直接ゲノム DNA や RNA を抽出し、細菌に関しては、そのゲノム中に含まれる 16S rRNA 遺伝子領域のシーケンス解析を行うことにより、培養法では検出不可能な微生物の存在を知ることが可能となった。その結果、培養可能な既知の菌種は実際の 20% 程度ではないということが判明している。また、PCR によるバイアスがかからない糞便中微生物の全遺伝子を網羅的に調べるメタゲノム解析により、構成菌種や遺伝子組成がさらに一層詳細に明らかになりつつある (Gill et al., 2006; Kurokawa et al., 2007; Manichanh et al., 2006)。

酵母を含めた真菌も腸内フローラを形成する微生物の一部であり、細菌に比べると菌数レベルは低いものの、健康人の糞便中から  $0-10^6$  CFU/g 程度の菌数で検出される。そのほとんどが *Candida* 属で、その半分は *C. albicans* であると報告されている (Agirbasli et al., 2005)。しかしながら、最近の報告では、培養による検出を行うと、これまでの定説の通り、*C. albicans* や *C. parapsilosis* 等の *Candida* 属が検出されるものの、培養によらない 18S, 26S (28S) リボソーム RNA 遺伝子や internal transcribed regions (ITS) の情報に基づいた解析からは、*Gloeotinia*, *Paecilomyces*, *Galactomyces* 属が糞便中真菌の大部分を占めているとも報告されている (Scanlan and Marchesi, 2008)。これらの結果から、実際には、これまで知られているよりも多くの種および数の真菌が腸管内に存在していると予想される。

種々の微生物の腸内での作用は菌種・菌株ごとに異なり、宿主にとって有益な微生物、無害な微生物、病原性を示す微生物が存在していると考えられ、その構成や活動の差異が、それぞれの宿主に異なる影響を及ぼしている可能性が高い。例えば、腸内微生物による摂取した栄養成分の分解・吸収性の変化 (Turnbaugh et al., 2006)、腸疾患・肥満・腫瘍等の疾病発症への関与、腸内菌の代謝産物である短鎖脂肪酸 (酪酸、酢酸、プロピオン酸など) による宿主腸管細胞の生育・機能に対する作用、次に述べる腸管免疫および全身性免疫に対する作用などが挙げられる。

## 1.5 腸管の免疫機構

腸管には、常在する微生物に加えて、外界から取り込んだ食品成分や、病原菌を含む多くの微生物、様々な化学物質などが流入する。したがって、腸管は、食品からの有益な成分を吸収するという重要な役割を担うと同時に、外部から侵入してくる毒素や病原性微生物に対しては、迅速・的確に、防御・排除反応を行わなければならない。このような種々の物質それぞれに対応して複雑な免疫反応を示す腸管は、最大の免疫器官ともいわれている。

腸管の表層は一層の上皮細胞層から成り、小腸では絨毛と呼ばれる密生する小突起を形成している。上皮層の大部分を構成しているのは細胞の頂端側に微絨毛が密生している吸収上皮細胞で、そのほかに粘液を分泌する杯細胞、リゾチームやディフェンシンを分泌するパネート細胞がある。腸管の免疫系では、パイエル板 (Peyer's patch : PP) や孤立リンパ小節 (isolated lymphoid tissue : ILF), リンパ球小集積 (cryptopatch : CP) などの腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue : GALT) が免疫誘導組織としての働きを担っている。

パイエル板の上皮層は絨毛構造を形成しないドーム状のリンパ濾胞上皮 (follicle-associated epithelium : FAE) と呼ばれ、抗原を取り込む能力が高く、微絨毛を持たない M 細胞が高頻度に存在している。取り込まれた抗原は、その近傍に存在する好中球やマクロファージ、樹状細胞などを刺激して、食作用やサイトカイン産生などを促す。サイトカインは、標的細胞表面の受容体に結合して活性を示し、血球細胞の分化や免疫応答のほか、脂質代謝や神経細胞においても重要な働きを担う液性因子である。一般に、その受容体と作用は細胞特異的であり、同じサイトカインでも標的となる細胞の種類や状態、また共存する他のサイトカインの種類と量によって異なる応答を誘起することがある。また、マクロファージや樹状細胞は抗原提示細胞でもあり、それにより活性化された T 細胞や B 細胞は、粘膜固有層などの免疫実効組織に移動し、抗原特異的免疫応答を示す。最近の研究で、M 細胞がパイエル板のみならず腸管絨毛にも存在していることが明らかになった (Jang et al., 2004)。また、樹状細胞が、腸管管腔側へ突起を伸ばして直接抗原を取り込むことも報告されている (Rescigno et al., 2001)。

M 細胞以外の腸管上皮細胞は、通常、微生物を取り込むことはない。また上皮細胞間には、Occludin や Claudin, ZO-1 などのタンパク質によって構成されているタイトジャンクション (tight-junction) と呼ばれる細胞間接着装置により、細胞同士が密着しているため、ある種の病原性微生物を除いて、微生物や高分子量物質が細胞間を通

過することは難しい。さらにこれらの上皮細胞も、病原性および非病原性の微生物による刺激に対してサイトカインやケモカイン、成長因子などを分泌し、初期の免疫反応において、重要な役割を担っていることが示唆されている (Eckmann et al., 1993; Haller et al., 2000; Hosoi et al., 2003; Jung et al., 1995; Koyama et al., 2005; Lammers et al., 2002; Rodriguez-Juan et al., 2000; Vizoso Pinto et al., 2007)。同時に、抗原提示分子である主要組織適合遺伝子複合体 MHC class I および II を発現しており、抗原提示細胞としての役割も担っている。

腸管上皮細胞が分泌するサイトカインは多様であり、さまざまな細胞に作用することが知られている (図 1-3)。そのうち、インターロイキン-8 (interleukin-8 : IL-8/CXCL-8) は、好中球の遊走と活性化を促し、単球にも作用することが知られているケモカインである (Gerszten et al., 1999; Godaly et al., 1997)。IL-6 は B 細胞分化や抗体産生に関与する物質として発見されたが (Hirano et al., 1986)、最近の報告で、ヒトでは IL-1 とともに Th17 細胞への分化を調節していることが明らかになっている (Acosta-Rodriguez et al., 2007)。IL-12 は Th1 細胞の分化を誘導することが報告されており (Trinchieri, 2003)、アレルギー改善作用をもつプロバイオティクスのスクリーニングの指標となっている。また、IL-18 は IL-12 共存下で、NK 細胞や T 細胞、マクロファージ、樹状細胞などを刺激して、IFN- $\gamma$  の産生を促進し、いわゆる Th1 型免疫応答を誘導して、抗アレルギー作用が期待される一方 (Fukao et al., 2000; Munder et al., 1998; Yoshimoto et al., 1997)、気管支喘息や自然型アトピーの誘導因子であることも報告されている (Sugimoto et al., 2004; Terada et al., 2006)。TNF- $\alpha$  は、炎症性サイトカインの産生や接着因子の発現を誘導すると同時に、腫瘍細胞のアポトーシスやネクロトーシスを誘起することが知られている (中野, 1995)。TGF- $\beta$  は多くの細胞を標的とし、その標的細胞の種類によって異なった作用を示す (宮園, 1995; 中尾, 2010)。また、哺乳類の TGF- $\beta$  には 3 種類のアイソフォーム TGF- $\beta$ 1, 2, 3 が存在し、それぞれが異なった作用を有する。MCP-1/CCL2 は単球のほか、好酸球や T 細胞の遊走を促す。これらのサイトカインは、その産生細胞や標的細胞によって、さまざまな異なる働きを示し、特に免疫応答においては必要不可欠な物質であると同時に、その産生量のバランスが崩れることで疾病の原因ともなる。

脂質メディエーターであるアラキドン酸代謝物 (エイコサノイド) も、腸管上皮細胞が産生する免疫反応関連物質のひとつである (Laurent et al., 1998)。細胞膜のリン脂質からホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によって遊離した

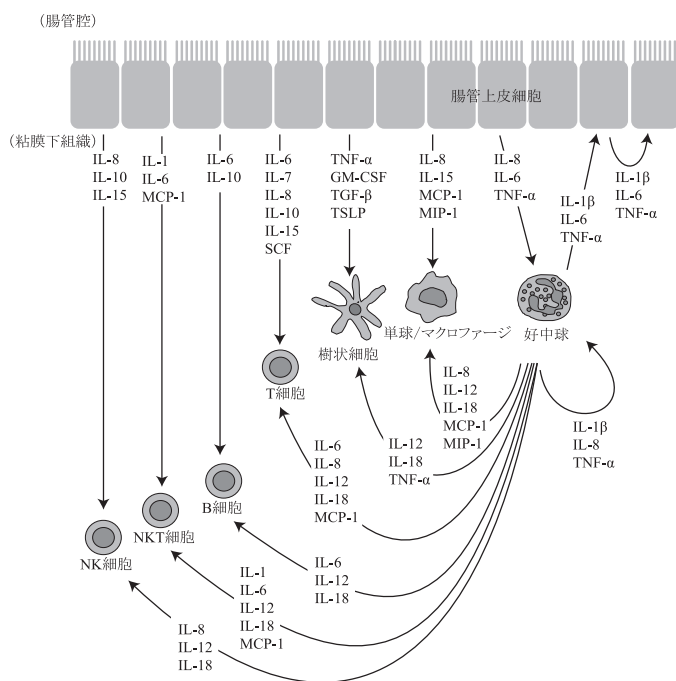


図 1-3 腸管上皮細胞と好中球が産生する主なサイトカインと標的免疫担当細胞

アラキドン酸が、シクロオキシゲナーゼ (COX) によってプロスタグランジン G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) へ変換され、さらに PGH<sub>2</sub> へ変化し、その後、さまざまな酵素によって PGE<sub>2</sub> などの各種プロスタグランジンが生成される。COX には、COX-1 と COX-2 が存在し、COX-1 は普遍的に、COX-2 は刺激によって発現誘導されることが一般に知られている。また、COX-1 は恒常性維持に関係するプロスタグランジンの生成を誘導するのに対し、COX-2 は病態に関わるプロスタグランジンの生成を誘導するという説もある。しかしながら、COX-2 欠損マウスでもさまざまな異常をきたすことから、COX-2 も生体にとって必要な物質であるとされる。一方で、アレルギーや炎症において、COXs の高発現がみられることから、適切な発現の調節が必要であると考えられる。

腸管上皮細胞が産生する IL-8 によって初期の段階に分泌部位に動員される細胞が好中球である (Godaly et al., 1997)。好中球は、血管内皮細胞上に発現したセレクチンにより、内皮細胞と弱い接着を起こし、遊走速度を落とす。続いて、内皮細胞自身や、他の細胞によって産生され内皮細胞によって輸送された IL-8 等のケモカインの作用により、好中球上のインテグリンが活性化し、内皮細胞上の Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、ICAM-2 などとの強固な接着と組織への細胞浸潤が誘導される。浸潤した好中球は、腸管上皮細胞上に発現する ICAM-1 や CD54 によって、上皮細胞と接着し、一部は腸管腔へ遊走することとなる。好中球は、微生物などの異物を貪食する食作用を持つと同時に、抗菌性タンパク質を含む顆粒を放出する機能を有する。また、さまざま

なサイトカインを産生することから、他の細胞への情報伝達機能を有すると考えられる (図 1-3)。

### 1.6 培養細胞を用いた腸管の免疫機能の解析

腸管における種々の細胞それぞれの、あるいは複合的な応答を解析するためには、生体より分離した細胞や、培養細胞を用いた実験が重要となる。

腸管上皮細胞については、生体より分離した細胞をその機能を保持させたままの状態でも長期間培養を行うことが非常に難しく、多くの場合、腸管上皮細胞様に分化可能なヒト大腸癌由来株化細胞 Caco-2 (Hidalgo et al., 1989), HT-29 (Augeron and Laboisse, 1984), T84 (Murakami and Masui, 1980) などが実験に用いられている。なかでも Caco-2 細胞は、微絨毛やタイトジャンクションの形成 (Traber et al., 1987)、栄養素輸送担体 (トランスポーター) の発現 (Brandsch et al., 1994; Harris et al., 1992; Hidalgo and Borchardt, 1990) などの点で、最も多くの腸管上皮細胞の特徴を有すると考えられており、腸管における薬物や食品成分の吸収解析実験 (Conradi et al., 1993; Konishi et al., 2002)、食品成分や細菌等の刺激に対するサイトカイン等の産生応答解析に用いられている (Haller et al., 2000; Hosoi et al., 2003; Jung et al., 1995; Koyama et al., 2005; Rodriguez-Juan et al., 2000; Weinstein et al., 1997)。

一方、好中球のモデル細胞としては、ヒト由来前骨髄球性白血病細胞 HL-60 が研究に多用されている。通常、レチノイン酸またはジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した培地を用いて培養することにより、HL-60 細胞を好中球様に分化させる (Breitman et al., 1980; Collins et

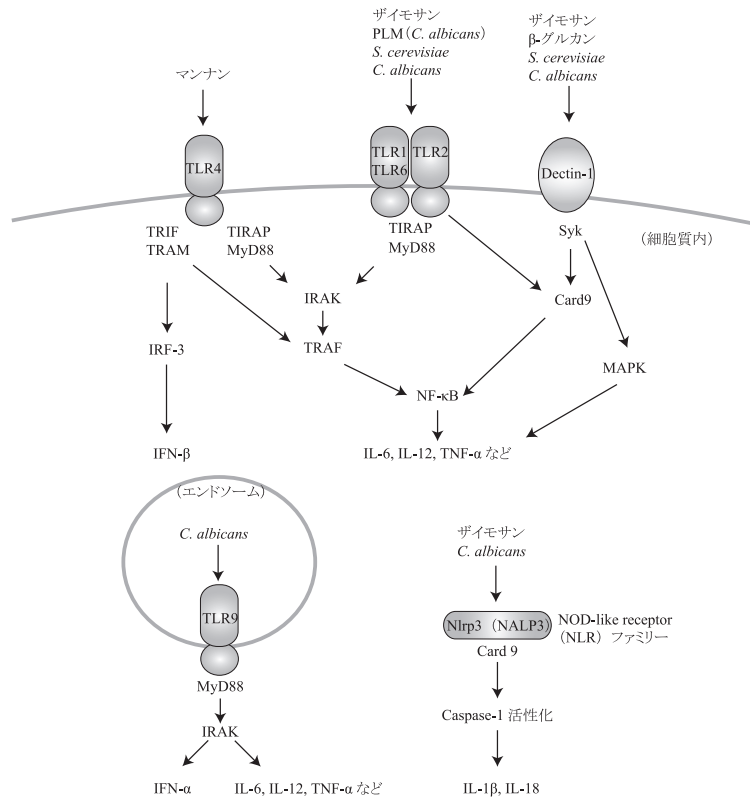


図 1-4 酵母とその菌体成分を認識する宿主側の受容体

al., 1978)。分化した HL-60 細胞は、好中球の形態的特徴を有し、さらに補体レセプターの発現、貪食作用や走化性、サイトカインの産生等を示す。このことから、HL-60 細胞は、*Ehrlichia* 属や *Anaplasma* 属細菌などの好中球自身への感染が原因となるエーリキア症の研究において、好中球のサイトカイン産生応答の解析に用いられることが多く (Kim and Rikihisa, 2000, 2002; Klein et al., 2000)、また、細菌のみならず酵母 *C. albicans* に対する応答解析にも用いられている (Mullick et al., 2004; Suzuki et al., 2000)。

### 1.7 酵母細胞の構造と宿主の受容体

酵母細胞の構造的特徴は細胞壁と細胞膜にみられる。細胞壁は、乾燥重量で酵母細胞の 20% 近くを占めており、その 80% が多糖類、3-20% がタンパク質、残りが脂質や無機塩、色素などで構成されている。酵母の細胞壁の骨格構造を成している多糖類はキチンと  $\beta$ -グルカンである。キチンは  $\beta$ -1,4-側鎖で結合した N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) から成るが、その細胞壁に占める量は少ない。含有量が最も多いのは  $\beta$ -グルカンで、 $\beta$ -1,3-または  $\beta$ -1,6-またはその両方の側鎖で結合したグルコースの重合体である。また、細胞壁には多数の無定形多糖類も存在し、そのうち最も多いのがマンノースを主成分とする糖タンパク質であるマンナンである。そのほかに、菌種によ

てもその含有量は異なるが、キトサンやニゲラン、 $\alpha$ -グルカンなどが含まれている。

細胞壁の内側の細胞膜には、細胞壁成分である  $\beta$ -グルカンやキチンの合成酵素や分解酵素、エルゴステロールなどが含まれている。また細胞内には、核膜を有する核と、ミトコンドリア、小胞体、液胞、ゴルジ囊やリボソームがある。また、染色体 DNA とは別に、プラスミドを有している。

哺乳類細胞においてこれらの酵母菌体成分を認識し、免疫応答を誘導する重要な役割を担っているのが、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern : PAMP) あるいは微生物分子パターン (microbe-associated molecular pattern : MAMP) と呼ばれる微生物に特徴的な分子パターンを認識する Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) などのパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor : PRR) である (Roeder et al., 2004; Romani, 2004)。当初、ショウジョウバエにおいて Toll と呼ばれる膜貫通タンパク質が同定され、この Toll を欠損した変異体が、真菌やグラム陽性菌の感染に対して強い感受性を示すことが明らかにされた。その後、哺乳類において、Toll に類似した TLR が同定され、これまでに、ヒトでは TLR1 から TLR10 まで報告されている。このうち、酵母の認識に関わっているのは、TLR1 または TLR6 と複合体を形成している TLR2、および TLR4

やTLR9である。TLR2は*S. cerevisiae*由来の細胞壁粗画分分子zymosanや*C. albicans*のホスホリポマンナン(phospholipomannan: PLM)を認識し(Ozinsky et al., 2000; Underhill et al., 1999), TLR4はマンナンを(Tada et al., 2002), TLR9は*C. albicans*由来の核酸を認識し(Miyazato et al., 2009), 免疫応答を誘導するとされている(図1-4)。また, TLRsのほか, マンノース受容体(mannose receptor), Dectin-1, Dectin-2, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin (DC-SIGN)などのC-typeレクチン受容体(lectin receptor), マンノース結合レクチン(mannose-binding lectin: MBL)やsurfactant protein A (SP-A)といった液性因子のコレクチン(collectin), NOD-like receptor (NLR)ファミリーのNlrp3 (NALP3)なども, 主に酵母の細胞壁成分の認識に関与すると報告されている(図1-4)(Willment and Brown, 2008)。これらの受容体は, 単独で機能すると同時に, 互いに影響を及ぼしあい, サイトカイン産生や食作用などの刺激を促す。

## 1.8 酵母と食品, プロバイオティクス

酵母は, 前述のとおり, 古くから発酵食品であるワイン, ビール, 日本酒などの酒類, パン, 味噌や醤油, ヨーグルトの一種であるケフィアなどの製造に用いられている。また最近では, 酵母エキスの食品への利用, 菌体成分の機能性食品としての利用, 家畜の餌への添加利用等も進んでいる。

酵母の生菌または死菌を経口摂取すると, 酵母菌体およびその成分が腸管を通過し, 腸管に接触または定着して, その過程で生体にさまざまな作用を及ぼしていると考えられる。食品製造に用いられる代表的な酵母*S. cerevisiae*の摂取時には, パイエル板細胞に酵母細胞が実際に取り込まれることがマウスで報告されており(Beier and Gebert, 1998; Martins et al., 2007), 酵母が腸管免疫系に作用していると予想される。またヒトでは, *S. cerevisiae*を経口摂取した場合に, 糞便中から*S. cerevisiae*が生菌のまま検出されることが報告されている(Pecquet et al., 1991)。

腸内環境を整え, 生体に有益な作用を及ぼす生きた微生物やその微生物を含む食品はプロバイオティクス probiotic(s)と定義づけられており(Fuller, 1989), プロバイオティクス製品も市場に多く出回るようになってきた。また, 微生物ではなく難消化性食品成分や特定のオリゴ糖のように, 腸内の有用菌の増殖を促進したり, その活性を高めることによって健康に有効に働く食品成分—プレバイオティクス—や(Gibson and Roberfroid, 1995), 腸内フローラを紹介することなく, 直接, 免疫賦活やコレス

テロール低下作用等生体に有益に働く作用を有する食品成分—バイオジェニクス—に関する研究開発も盛んとなっている(光岡, 1998)。

プロバイオティクスの分野では, とくに発酵乳やヨーグルト製造に利用される*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*などの乳酸菌や, *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *B. breve*などのビフィズス菌に関する報告が数多くなされており, *in vitro*や動物実験のみならず, ヒトによる摂取試験なども既に行われて, アレルギー疾患やアトピーの予防・改善効果, 感染症の予防効果が示唆されている。酵母にも, 健康維持に有用な効果を有するものがあると期待されるが, 乳酸菌に比べると研究例はわずかであるために不明な点が多く, 解明が待たれている。ヒトにおける酵母*Kluyveromyces marxianus*経口摂取によるコレステロール低減効果(Yoshida et al., 2005; Yoshida et al., 2004)や, 現在は*S. cerevisiae*と同一種とされている*Saccharomyces boulardii*を利用した下痢の改善効果などが報告されている(Surawicz et al., 1989)。家畜においても, *S. cerevisiae*摂取による牛の泌乳量の増加(Piva et al., 1993)や子豚の成長改善効果(van Heugten et al., 2003)などが, わずかではあるが, 報告されている。またマウスにおいては, *S. boulardii*や*S. cerevisiae*の特定菌株の経口摂取による分泌型IgAの産生促進, 血中*E. coli*の排除促進, *Salmonella enterica* serotype Typhimuriumのトランスロケーション抑制効果について報告が存在する(Martins et al., 2007; Rodrigues et al., 2000)。

## 1.9 本研究の目的

我々が食品等を介して摂取することのある, *Saccharomyces*属に代表される非病原性の酵母の作用に関しては, 1.8で述べたようにいくつかの報告はあるものの, 未解明な点が多い。酵母は, 真核生物であり, 細胞成分や代謝産物は細菌とは大きく異なり, また, 哺乳類に近い細胞構造を有することから, 酵母を摂取した際の生体に対する作用とその機構は, 細菌とは異なると予想される。

そこで, 本研究では, サプリメントや食品の素材成分としてのさらなる利用が期待される酵母*S. cerevisiae*を中心に, 細菌とは細胞構造が大きく性質が異なる酵母細胞に対して, 腸管の最上層を形成し, 腸管内の物質と最前線で多く接触する腸管上皮細胞の応答を解析するとともに, 続く免疫応答初期(自然免疫)段階に, 刺激局所に動員されて菌体の食食に重要な役割を担う好中球の応答解析を目的として実施した。

第2章では, *S. cerevisiae*刺激により, ヒト腸管上皮様Caco-2細胞が産生するとされるサイトカイン, IL-6, IL-8,



IL-18, GM-CSF, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 や、アラキドン酸カスケード関連酵素 COX-1, COX-2 の mRNA 発現量、およびサイトカインの細胞外へのタンパク質レベルでの分泌がどのような影響を受けるかについて検討した。同時に、ヒト常在性酵母 *C. albicans* についても検討を行い、*S. cerevisiae* と作用を比較した。

第3章では、第2章において酵母 *S. cerevisiae* および *C. albicans* によって分泌が促進された IL-8 について、酵母菌体数や、生菌体・死菌体の影響について検討を加えると共に、*S. cerevisiae* 細胞壁粗画分のザイモサン、細胞壁構成成分の  $\beta$ -グルカンおよびマンナンが腸管上皮様 Caco-2 細胞の IL-8 産生能に与える影響について検討した。また、*S. cerevisiae* や *C. albicans* 以外の種々の酵母が腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-8 分泌に与える影響についても比較検討した。

第4章では、腸管上皮細胞から産生される IL-8 により動員される好中球の酵母に対するサイトカイン応答を明らかにする目的で、*S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体および加熱死菌体による刺激に対し、ヒト好中球のモデル細胞 HL-60 からのサイトカイン IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, TNF- $\alpha$  の産生について検討した。

第5章では、酵母に対してサイトカイン産生応答を示した腸管上皮様 Caco-2 細胞および好中球様 HL-60 細胞において、酵母刺激時に、酵母認識に関与する受容体 TLR1, TLR2, TLR6, Dectin-1 等の mRNA 発現量がどのように変化するかについて検討を加えた。

## 第2章 *Saccharomyces cerevisiae* および *Candida albicans* に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の各種サイトカイン産生応答

### 2.1 序

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵醸造食品の製造や栄養補助食品の素材・成分に用いられており、それらの食品の摂取を介して、菌体成分や代謝物が腸管に達すると考えられる (Scevola et al., 2003; Wohlt et al., 1998)。*S. cerevisiae* は腸管常在菌ではないものの、ヒトやマウスにおいて、その生菌体を経口摂取すると、摂取後一定期間、糞便から検出されることが報告されている (Pecquet et al., 1991)。一方、ヒトの腸管には、細菌をはじめとして、酵母を含むさまざまな微生物が存在し、代表的な腸管常在性酵母として *Candida albicans* が挙げられる。*C. albicans* は健康人に常在しているとされるが、免疫不全などの易感染宿主においてカンジダ症を引き起こしたり、

アトピーや喘息の原因になるとも考えられている (Akiyama et al., 1996; Faergemann, 2002; 山口, 1999)。このような食品中の酵母や腸管常在性の酵母は、腸管上皮細胞への接触を契機として、腸管免疫システムに対して何らかの作用を及ぼすと予想される。

腸管上皮細胞は、微生物などの外来物質に対して、物理的バリアとして機能するのみならず、免疫応答を自ら示し、さらに他の免疫担当細胞の応答を誘導する役割も担っている。例えば、ヒト由来の腸管上皮細胞や、腸管上皮様細胞の Caco-2 や HT-29, T84 等は、病原性および非病原性細菌や食品成分に対して、IL-8 や、IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, TNF- $\alpha$  などのサイトカインを産生することが知られている (Eckmann et al., 1993; Haller et al., 2000; Hosoi et al., 2003; Jung et al., 1995; Koyama et al., 2005; Lammers et al., 2002; Rodriguez-Juan et al., 2000; Vizoso Pinto et al., 2007)。酵母に関しては、口腔上皮細胞や膈上皮細胞が *C. albicans* 刺激に対して、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 等を産生することが知られているが (Schaller et al., 2002; Steele and Fidel, 2002)、腸管上皮細胞の応答についてはこれまで報告が存在しなかった。

腸管上皮細胞が産生するこれらの物質は、それぞれ標的となる細胞とその作用が異なっており、生体の免疫応答の調節に重要な役割を担っている。IL-8 は好中球の遊走と活性化を誘導し、IL-6 は B 細胞の分化や抗体の産生を促したり、IL-1 と共に Th17 細胞への分化を促進することが報告されている。また、MCP-1 は単球やマクロファージのほか T 細胞や好酸球の遊走にも関与しており、SCF は T 細胞の分化において重要な役割を果たしている。TNF- $\alpha$  は、腸管上皮細胞自身や好中球などに働いて、IL-8 等の産生を促し、IL-18 は、IL-12 共存下で Th1 型免疫応答を誘導する。また、腸管上皮細胞は微生物刺激に対して、シクロオキシゲナーゼ (COX) -1 および COX-2 の作用によって産生されるプロスタグランジンなどのエイコサノイドも分泌する (Laurent et al., 1998)。

また、腸管においては、*Clostridium* 属、*Eurobacterium* 属、*Butyrivibrio* 属などの細菌による炭水化物の発酵によって酪酸が生成し (Barcenilla et al., 2000; Hespell et al., 1987; Sharp and Macfarlane, 2000)、腸管上皮細胞への作用が示唆されている。腸管上皮様細胞の Caco-2 や HT29 に対して、酪酸は細胞分化やアポトーシスを誘導し、サイトカインの産生や、NF- $\kappa$ B 活性、細胞周期、細胞分化、アルカリフォスファターゼの活性等を変化させることが報告されている (Fusunyan et al., 1999; Fusunyan et al., 1998; Harrison et al., 1999; Heerdt et al., 1994; Huang et al., 1997; Mariadason et al., 2001; Wu et al., 1999)。したがって、実際の腸管においても、酪酸が宿主の健康に対して影響

を及ぼしていると考えられる。

本章では、株化細胞の中で腸管上皮様機能を最も多く有していると考えられ、細菌や食品成分刺激によるサイトカイン産生応答解析にも多用されている Caco-2 細胞を用いて、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 刺激が、腸管上皮様細胞の各種サイトカインやシクロオキシゲナーゼの mRNA 発現・産生にどのような影響を及ぼすかについて検討した。また、それらの作用に対する培地中の酪酸とウシ胎児血清 (FBS) の効果についてもあわせて検討した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 酵母試料

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM ; 和光) より購入した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255<sup>T</sup> および *Candida albicans* JCM 1542<sup>T</sup> を、YM broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) にて、30°C、3 日間培養した後、1000×g、4°C で 10 分間遠心分離し、沈渣をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、必要な濃度に PBS で懸濁した。菌数はポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学、東京) を用いた平板混釈法にて、30°C、48 時間培養して測定した。

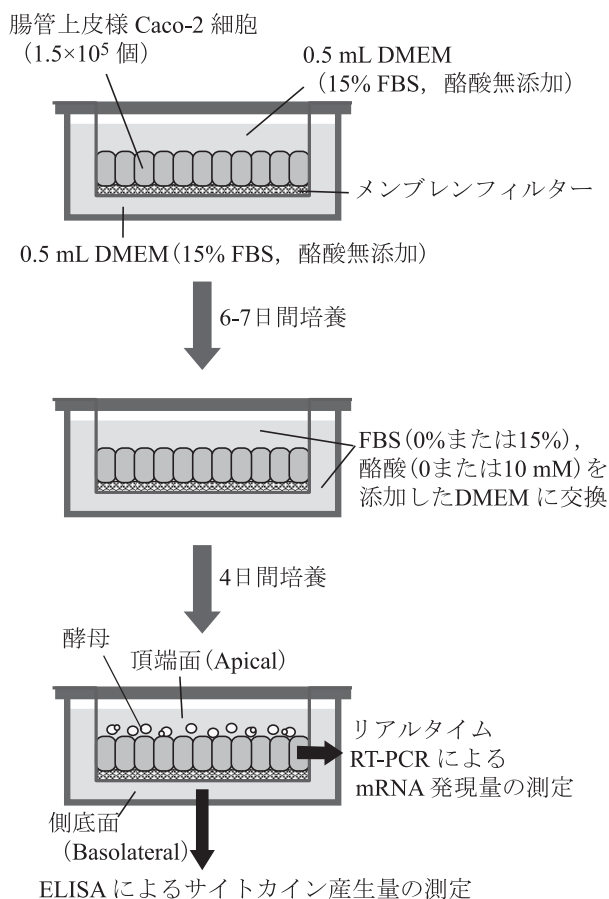


図 2-1 酵母と Caco-2 細胞の共培養実験

### 2.2.2 Caco-2 細胞と酵母の共培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターリソース基盤開発部細胞材料開発室 (つくば) より購入した Caco-2 細胞 (RCB0988) (Fogh et al., 1977; Kanda et al., 1998) を、1 mM L-グルタミン (和光純薬、大阪)、10 mM HEPES (同仁、熊本)、15% 非働化 FBS (PAA Laboratories, Linz, Austria) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM ; 日水製薬、東京) 中に懸濁し、6 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン、NJ, USA) で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。続いて、0.5 mL DMEM (15% FBS 含有) を注加した 24 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン) の各ウェルに 12-mm ミリセル HA フィルター (ミリポア、MA, USA) を静置し、培養・調製した Caco-2 細胞 (1.5 × 10<sup>5</sup> 個) を 0.5 mL DMEM (15% FBS 含有) と共にフィルター上に播種後、さらにフィルター下に 0.5 mL の同一の DMEM を注加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6-7 日間培養した (図 2-1)。その後、10 mM 酪酸および 15% FBS を添加または無添加の DMEM で、4 日間培養した。続いて、0.5 mL DMEM 中に懸濁した酵母生菌体を、Caco-2 細胞の頂端面側 (フィルター上) に添加し、フィルター下部の Caco-2 細胞側底面側には、新たに同一の培地 (0.5 mL) を加え、共培養を行った (図 2-1)。

### 2.2.3 Caco-2 細胞との共培養条件下における酵母生菌数変化の測定

2.2.1 に記した方法で、PBS による洗浄を行った酵母 *S. cerevisiae* および *C. albicans* を、Caco-2 細胞用培地である 1 mM L-グルタミン、10 mM HEPES、15% FBS を加えた 1 mL DMEM 中に懸濁し、24 ウェルマイクロプレートにて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養開始時および培養開始から 7 時間後、24 時間後の菌数を、ポテトデキストロース寒天培地を用いた平板混釈法にて測定した。

### 2.2.4 サイトカイン mRNA 発現量の測定

酵母との共培養前 (0 時間) および共培養後の Caco-2 細胞から、RNeasy mini kit (キアゲン、Hilden, Germany) および DNase (キアゲン) を用いて、全 RNA を抽出した。抽出した RNA から、Omniscript reverse transcriptase (キアゲン)、oligo d(T)<sub>12-18</sub> プライマー (GE ヘルスケアバイオサイエンス、NJ, USA) および RNaseOUT recombinant RNase inhibitor (インビトロジェン) を用いて、逆転写により cDNA を合成した。得られた cDNA から、mRNA 発現量を測定するため、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン) と、IL-6, IL-8, IL-18, GM-CSF, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, COX-1,

表 2-1 PCR のプライマー配列と反応条件

標的遺伝子	プライマー (5'-3')	アニーリング 温度 (°C)	伸長反応 時間 (秒)	増幅 サイズ (bp)	
GAPDH	sense	tgaacgggaagctcactgg	63	30	307
	antisense	tccaccacctgtgctgta			
IL-6	sense	cactcacctctcagaacga	60	30	258
	antisense	ctgttctggaggtactctagg			
IL-8	sense	tggtctcttggcagccttc	63	30	238
	antisense	tgcaccagtttctctggg			
IL-18	sense	aatttcaactctctctgtg	54	25	236
	antisense	tagatctatcccccaattca			
GM-CSF	sense	actacaagcagcactgcctt	60	25	228
	antisense	cttggtccctccaagatgac			
MCP-1	sense	ctcagccagatgcaatcaat	60	30	259
	antisense	agattcttgggtgtggagt			
SCF	sense	agccaagtctacaaggga	57	25	218
	antisense	tgtggtctgtcactccagaca			
TNF- $\alpha$	sense	agcccatgtttagcaaac	60	15	134
	antisense	tgaggtacagccctctgat			
TGF- $\beta$ 1	sense	aggactgcggatctctgtgt	60	20	196
	antisense	agtgcccaagggtgctcaata			
TGF- $\beta$ 2	sense	atgccctatttatggagtt	56	25	234
	antisense	attgtcattttgtcttggc			
TGF- $\beta$ 3	sense	agacacaacccacagcacgg	65	25	230
	antisense	gcagtcaggcagtggtggtt			
COX-1	sense	tctggctacgtgagcacaac	60	15	148
	antisense	ctcagctgctgcacgtactc			
COX-2	sense	atcacaggcttcattgacc	60	20	176
	antisense	caggatacagctccacagca			

PCR 反応は、95°C で 15 分間加熱した後、94°C で 15 秒間の変性反応、表中の温度で 20 秒間のアニーリング反応、72°C で表中の時間の伸長反応を 40 サイクル繰り返した。

COX-2 特異的プライマー（日本遺伝子研究所，仙台）を用いて，ライトサイクラー330 システム（ロシュ，Mannheim, Germany）により，リアルタイム PCR を行った。各プライマー配列および PCR 条件は表 2-1 に示す。各サンプルの GAPDH を内部標準とした。

## 2.2.5 サイトカイン分泌量の測定

共培養後，Caco-2 細胞の側底面側（フィルター下）の培地を回収し，1000×g，5 分間遠心分離後，上清を回収して，サイトカイン量測定時まで，-80°C で凍結保存した。上清中の IL-6，IL-8，MCP-1，TNF- $\alpha$  の測定は，酵素免疫吸着測定（ELISA）キット（Pierce, MA, USA）を用いて，SCF の測定は ELISA キット（R&D Systems, Minneapolis, USA）を用いて行った。

## 2.3 結果

### 2.3.1 Caco-2 細胞培養条件下における *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生育

Caco-2 細胞の培養条件下 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) , FBS と酪酸の濃度を変化させた DMEM において, Caco-2 細胞なしで *S. cerevisiae* および *C. albicans* それぞれを単独で培養したときの酵母の菌数変化を検討した。*S. cerevisiae* (初発菌数  $1.9 \times 10^2$  CFU/mL,  $1.9 \times 10^4$  CFU/mL,  $1.9 \times 10^6$  CFU/mL) を, FBS (0%または15%) および酪酸 (0 mM または 10 mM) 添加 DMEM を用いて 37°C で培養したところ, 全ての培地において, *S. cerevisiae* 生菌数は減少した (図 2-2A, B)。一方, *C. albicans* (初発菌数  $4.0 \times 10^1$  CFU/mL,  $4.0 \times 10^3$  CFU/mL,  $4.0 \times 10^5$  CFU/mL) は, 酪酸添加・無添加にかかわらず, FBS 15% 含有培地におい

て,  $3.0 \times 10^6 - 1.6 \times 10^7$  CFU/mL 程度まで増殖したが, FBS 非含有 DMEM 中では, *C. albicans* 生菌数は, 24 時間後にも増加がみられなかった (図 2-2C, D)。

### 2.3.2 酪酸および *S.cerevisiae* または *C.albicans* が Caco-2 細胞の各種サイトカインおよび COX の mRNA 発現に与える影響

酪酸および酵母が腸管上皮細胞の各種サイトカインおよび COX の mRNA 発現に及ぼす影響を検討するために, 酪酸 (0 mM または 10 mM) 添加, FBS (0%または15%) 添加の DMEM を用いて Caco-2 細胞を 4 日間前培養したのち, *S. cerevisiae* または *C. albicans* ( $1.0 \times 10^6$  CFU) 生菌体と 7 時間共培養した。

FBS (15%) 含有培地中では, 酪酸 (10 mM) 添加培地での 4 日間の前培養により, Caco-2 細胞の IL-6, IL-8,

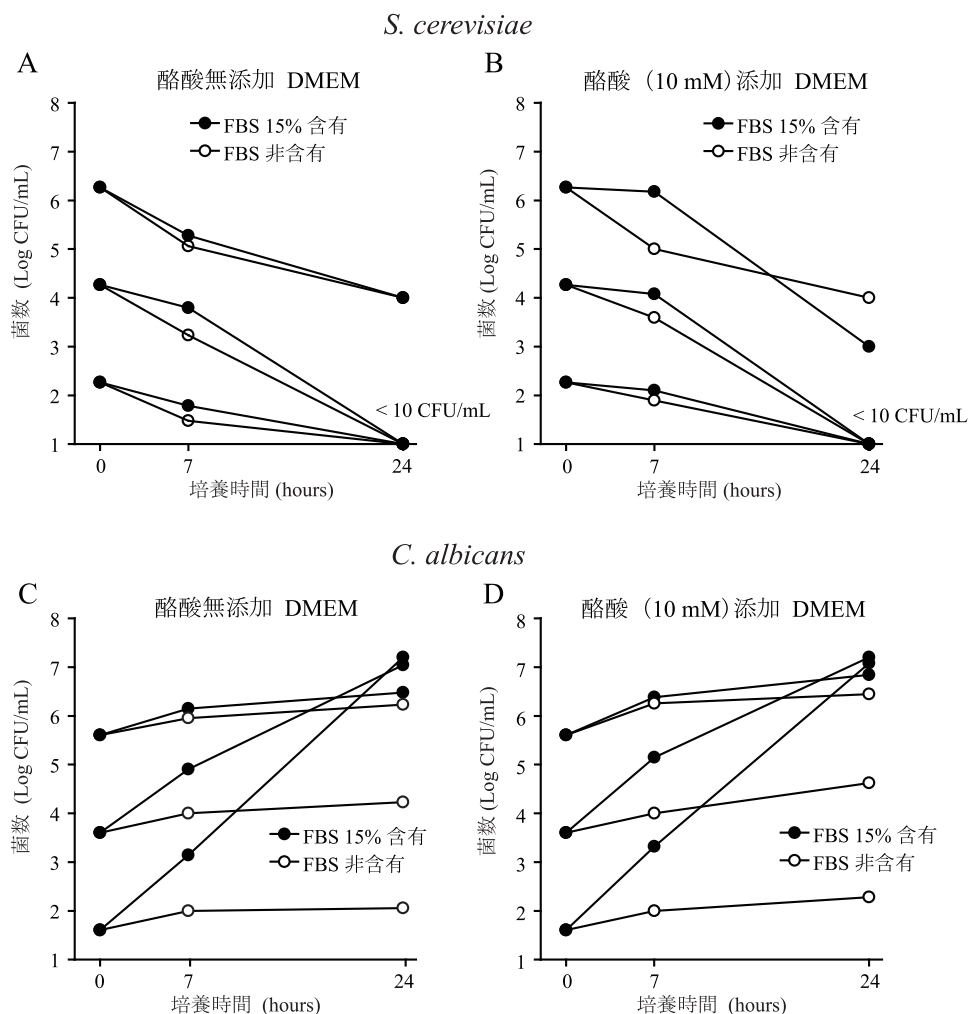


図 2-2 ウシ胎児血清 (FBS) および酪酸の有無による DMEM 培地における *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生菌数変化  
*S. cerevisiae* (初発菌数  $1.9 \times 10^2$  CFU/mL,  $1.9 \times 10^4$  CFU/mL,  $1.9 \times 10^6$  CFU/mL) (A, B) または *C. albicans* (初発菌数  $4.0 \times 10^1$  CFU/mL,  $4.0 \times 10^3$  CFU/mL,  $4.0 \times 10^5$  CFU/mL) (C, D) を, 酪酸無添加 (A, C) または 10 mM 添加 (B, D) および 15% FBS 含有 (●) または非含有 (○) DMEM 培地で, 37°C, 7 時間または 24 時間培養し, 生菌数を測定した。

表 2-2 ウシ胎児血清（FBS）含有培地における酪酸および酵母生菌体刺激が Caco-2 細胞の各種 mRNA 発現に与える影響

mRNA	FBS (15%)							
	酪酸 (0 mM)				酪酸 (10 mM)			
	0 時間		7 時間		0 時間		7 時間	
	無刺激	無刺激	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	無刺激	無刺激	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
IL-6	1.0	2.0	1.0	1.7	7.3	12.7	7.0	8.3
IL-8	1.0	1.9	2.0	2.2	151.2	230.3	917.4	1014.2
IL-18	1.0	1.0	1.1	1.1	7.7	8.2	11.2	7.2
GM-CSF	1.0	1.7	1.0	1.0	0.5	1.3	1.5	1.5
MCP-1	1.0	2.3	0.7	0.7	14.6	12.4	18.4	14.9
SCF	1.0	1.4	0.8	0.8	6.2	4.7	6.7	5.0
TNF- $\alpha$	1.0	1.0	0.6	1.3	43.2	10.1	24.5	35.0
TGF- $\beta$ 1	1.0	0.9	1.4	0.7	3.5	3.7	2.5	2.6
TGF- $\beta$ 2	1.0	1.7	1.8	2.9	1.0	0.9	0.6	1.3
TGF- $\beta$ 3	1.0	0.6	1.5	1.8	5.8	5.0	3.9	2.1
COX-1	1.0	1.2	0.7	2.2	93.7	192.0	205.1	103.4
COX-2	1.0	0.4	1.2	1.8	17.0	26.6	24.0	19.6

Caco-2 細胞数 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後、10 mM 酪酸添加・無添加、15%FBS 含有培地（フィルター上下に各 0.5 mL）で 4 日間培養し、さらに酵母生菌体 ( $1.0 \times 10^6$  CFU) と 7 時間共培養した。表中の値は、それぞれの GAPDH を内部標準とし、酪酸を添加しなかった培地中で培養した Caco-2 細胞の酵母刺激前（0 時間）での値を基準（1.0）とした際の相対値で表している（繰り返し 4 回の実験の代表的な結果）。

表 2-3 ウシ胎児血清 (FBS) 非含有培地における酪酸および酵母生菌体刺激が Caco-2 細胞の各種 mRNA 発現に与える影響

	FBS (0%)							
	酪酸 (0 mM)				酪酸 (10 mM)			
	0 時間		7 時間		0 時間		7 時間	
	無刺激	無刺激	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	無刺激	無刺激	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
IL-6	1.0	1.0	0.34	0.23	3.0	4.0	3.0	4.1
IL-8	1.0	1.0	0.7	1.1	296	206	429	298
IL-18	1.0	1.2	1.8	0.9	3.9	4.4	4.1	3.9
GM-CSF	1.0	1.3	1.6	1.1	1.1	0.7	0.9	0.3
MCP-1	1.0	1.0	0.5	0.6	35.4	18.1	23.65	19.3
SCF	1.0	1.1	0.8	0.9	3.5	3.3	1.3	1.6
TNF- $\alpha$	1.0	1.0	0.5	0.7	24.9	19.6	25.4	18.6
TGF- $\beta$ 1	1.0	1.5	0.5	1.2	9.7	8.1	4.7	7.0
TGF- $\beta$ 2	1.0	1.0	0.5	0.4	0.8	0.8	0.5	0.5
TGF- $\beta$ 3	1.0	1.8	1.2	1.7	2.3	4.9	3.9	2.1
COX-1	1.0	0.6	1.0	0.8	236	300	468	278
COX-2	1.0	0.7	1.6	1.5	12.5	12.1	14.3	10.3

Caco-2 細胞数 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後、10 mM 酪酸添加・無添加、FBS 非含有培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し、さらに酵母生菌体 ( $1.0 \times 10^6$  CFU) と 7 時間共培養した。表中の値は、それぞれの GAPDH を内部標準とし、酪酸を添加しなかった培地中で培養した Caco-2 細胞の酵母刺激前 (0 時間) での値を基準 (1.0) とした際の相対値で表している (繰り返し 4 回の実験の代表的な結果)。

表 2-4 酪酸 (10 mM) およびウシ胎児血清 (15%) 存在下, 酵母生菌体刺激が Caco-2 細胞の各種サイトカイン分泌に与える影響

酵母 (CFU)	IL-6 (pg/mL)		IL-8 (pg/mL)		MCP-1 (pg/mL)		SCF (pg/mL)		TNF- $\alpha$ (pg/mL)	
	7 時間	24 時間	7 時間	24 時間	7 時間	24 時間	7 時間	24 時間	7 時間	24 時間
	無刺激	ND	ND	40.1 $\pm$ 8.3	116.5 $\pm$ 10.6	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i>										
(1.9 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	ND	ND	45.8 $\pm$ 7.5	150.4 $\pm$ 13.7*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(1.9 $\times$ 10 <sup>6</sup> )	ND	ND	83.6 $\pm$ 9.5*	152.7 $\pm$ 5.1*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(1.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> )	ND	ND	86.4 $\pm$ 0.6*	149.1 $\pm$ 8.8*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans</i>										
(2.1 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	ND	ND	43.5 $\pm$ 3.9	170.8 $\pm$ 0.7*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(2.1 $\times$ 10 <sup>6</sup> )	ND	ND	79.9 $\pm$ 10.6*	172.3 $\pm$ 11.5*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(2.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> )	ND	ND	100.8 $\pm$ 10.6*	143.8 $\pm$ 4.7*	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Caco-2 細胞数 (1.5  $\times$  10<sup>5</sup> 個) をミリセル-HA フィルター上に播種し, 酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後, 10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し, 酵母生菌体 (1.0  $\times$  10<sup>6</sup> CFU) と 7 時間または 24 時間共培養した。値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=5)。ND, 定量限界以下。

\* 各共培養時間における無刺激時の IL-8 分泌量に対して有意差あり (P<0.05)。

IL-18, MCP-1, SCF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2 の mRNA の発現が増加したが, GM-CSF および TGF- $\beta$ 2 mRNA の発現量はほとんど変化しなかった (表 2-2)。酪酸 (10 mM) 添加培地で 4 日間の前培養を行い, さらに *S. cerevisiae* または *C. albicans* (1.0  $\times$  10<sup>6</sup> CFU) の生菌体と 7 時間共培養した実験区では, IL-8 mRNA の発現量は, 菌無刺激区と比較して, 一層促進されたが, 前述の他のサイトカイン mRNA の発現量は, 菌無刺激区と菌刺激区の間で顕著な変化は無かった (表 2-2)。一方, 酪酸無添加区では, 菌体刺激による IL-8 および他のサイトカイン mRNA の発現促進は認められなかった (表 2-2)。

FBS 非含有・酪酸 (10 mM) 添加培地での 4 日間培養

した Caco-2 細胞では, FBS 非含有・酪酸無添加培地で培養した場合に比べて, IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, SCF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2 の mRNA の発現が増加したが, その後の *S. cerevisiae* または *C. albicans* (1.0  $\times$  10<sup>6</sup> CFU) の生菌体との 7 時間共培養による IL-8 mRNA の発現量の顕著な増加はみられなかった (表 2-3)。

### 2.3.3 *S.cerevisiae* および *C.albicans* が Caco-2 細胞からの各種サイトカインの分泌に与える影響

酵母細胞および酪酸による Caco-2 細胞のサイトカイン mRNA 発現量の変化が, サイトカインの分泌を伴うか

調べるために、酵母による Caco-2 細胞の IL-8 mRNA 発現量の増加がみられた 10 mM 酪酸および 15% FBS 添加培地を用いて、酵母と共培養後の Caco-2 細胞の基底膜側の培地を採取し、ELISA により、IL-8, IL-6, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$  の濃度を測定した。その結果、intact な *S. cerevisiae* ( $1.9 \times 10^5$ ,  $1.9 \times 10^6$ ,  $1.9 \times 10^7$  CFU) および *C. albicans* ( $2.1 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^6$ ,  $2.1 \times 10^7$  CFU) による 7 時間または 24 時間の刺激に対し、Caco-2 細胞からの IL-8 分泌量が増加した (表 2-4)。しかし、そのほかのサイトカイン IL-6, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$  の濃度は定量限界以下であり、これらのサイトカインに関しては、分泌と遺伝子発現の変化の関係は明らかにできなかった。

## 2.4 考察

本章において、10 mM 酪酸および 15% FBS 添加培地で 4 日間培養した腸管上皮様 Caco-2 細胞に *S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体を加え、7 時間および 24 時間共培養を行うと、菌無刺激時と比較して、IL-8 産生量の増加が mRNA と実際のタンパク質のレベルで共にみられたが、他のサイトカインについては mRNA 発現量に変化はみられず、IL-6, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$  分泌量にも変化がみられなかった (表 2-2, 2-4)。

これまでの報告において、*C. albicans* や *Malassezia furfur* などの酵母による刺激は、膺上皮細胞やケラチノサイトから、IL-8 のみならず、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF などのサイトカインをも産生増強させると報告されている (Dongari-Bagtzoglou and Kashleva, 2003; 加納, 2004; Mostefaoui et al., 2004; Steele and Fidel, 2002)。哺乳類では、組織や細胞種ごとに発現している認識受容体の種類や量が異なるため、腸管上皮細胞の酵母に対する応答と、膺上皮細胞やケラチノサイトの酵母に対する応答では、差がみられると考えられる。また、腸管上皮様細胞に対しては、非病原性細菌の、*Lactobacillus plantarum* や *L. johnsonii* などのプロバイオティクス (Haller et al., 2000; Lammers et al., 2002; Vizoso Pinto et al., 2007) および *Bacillus subtilis* (natto) (Hosoi et al., 2003)、病原性細菌の *Salmonella enterica* や *Shigella dysenteriae*, 腸管侵襲性 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Eckmann et al., 1993; Jung et al., 1995) が、IL-8 に加え、様々なサイトカインやエイコサノイドの産生を促進することが報告されている。これらの違いは、各々の微生物が保持する応答誘導性物質の種類や量が異なるため、刺激される宿主側の認識受容体の種類とそれに続く情報伝達・制御系に差が生じた結果であると考えられる。

酪酸のヒトの大腸における濃度は、食餌内容等によっ

て異なるが、5–24 mM と報告されており、小腸ではさらに低いとされる (Cummings, 1981; Cummings et al., 1987)。細胞の状態によっても異なるが、酪酸はその濃度に依存して、腸管上皮細胞のサイトカイン産生や、細胞周期、アルカリフォスファターゼ活性等にさまざまな影響を及ぼすことが知られている (Fusunyan et al., 1999; Fusunyan et al., 1998; Harrison et al., 1999; Huang et al., 1997; Mariadason et al., 2001; Wu et al., 1999)。本章では、10 mM 酪酸添加培地での 4 日間の前培養が Caco-2 細胞における IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, SCF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$ , COX-1, COX-2 の mRNA 発現量を増強したが、GM-CSF および TGF- $\beta$ 2 の mRNA 発現量には変化がみられなかった。また、IL-8 産生に関して、Caco-2 細胞を 10 mM 酪酸添加培地で 4 日間前培養すると、IL-8 mRNA 発現量と実際の分泌の増加がみられ、さらに酵母刺激による Caco-2 細胞からの IL-8 分泌増加は酪酸添加培地での前培養を行った時のみにみられた。一方で、酵母の生菌数変化は、酪酸の影響を大きく受けなかった。これらのことから、酪酸は、その濃度に依存して Caco-2 細胞のいくつかのサイトカインの産生機構を増強させる働きがあることが明らかになったとともに、酵母の認識機構の増強にも関与しているのではないかと予想される。

培地に添加した FBS は、Caco-2 細胞の増殖や分化に対する作用を有し、正常腸管上皮細胞への分化に必要であることが報告されている (原ら, 1992)。今回の実験で、FBS の添加が Caco-2 細胞の酵母に対するサイトカイン産生応答や、酵母の増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。酵母に対する Caco-2 細胞の IL-8 分泌促進は、Caco-2 細胞を 15% FBS と 10 mM 酪酸の両方を添加した培地で培養した場合のみに認められた。また、*S. cerevisiae* の菌数は、FBS の有無にかかわらず増加しなかったが、*C. albicans* の菌数は FBS 添加培地でのみ増加がみられた (図 2-2)。*S. cerevisiae* の菌数減少の原因は、Caco-2 細胞との共培養条件である 37°C という温度が、*S. cerevisiae* の生育に適していないことが主要因と考えられる。FBS 無添加培地では、酪酸添加培地での前培養の有無に関わらず、Caco-2 細胞は、*S. cerevisiae* と *C. albicans* の両方の酵母生菌体に対して IL-8 産生応答を示さなかった。これらのことから、酵母に対する Caco-2 細胞の IL-8 産生応答に関しては、FBS と酪酸の両物質による分化誘導が必要であることが示された。

## 2.5 小括

本章では、酵母 *S. cerevisiae* および *C. albicans* が Caco-2 細胞からの様々なサイトカイン産生に及ぼす影響、さら



には、それらのサイトカイン産生誘導活性に対する培地中の 10 mM 酪酸および 15% FBS の影響を検討した。

解析の結果、15% FBS 含有 DMEM で培養した Caco-2 細胞では、培地への 10 mM 酪酸添加 (4 日間) により、サイトカイン IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, SCF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$  およびエイコサノイドの生成に必要な COX-1 および COX-2 mRNA の発現増加がみられたが、GM-CSF および TGF- $\beta$ 2 mRNA の発現量に変化はみられなかった。この Caco-2 細胞を、さらに *S. cerevisiae* および *C. albicans* 生菌体と 7 時間共培養して刺激することにより、IL-8 mRNA 発現量に一層の増加がみられたが、そのほかのサイトカインおよび COX の mRNA 発現量に変化はみられなかった。

細胞外へのタンパク質レベルでの Caco-2 細胞のサイトカイン分泌については、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 生菌体による刺激が IL-8 の分泌を mRNA の変化同様に促進したが、IL-6, MCP-1, SCF および TNF- $\alpha$  の分泌には影響を及ぼさなかった。Caco-2 細胞は、細菌の刺激に対しては本章で検討した IL-8 以外のサイトカインも分泌することが知られているものの、酵母に対しては、IL-8 を産生したのみであった。なお、このような酵母刺激によるさらなる Caco-2 細胞の応答変化は、15% FBS および 10 mM 酪酸の両方を添加した DMEM 培地で前培養した Caco-2 細胞のみでみられた。

### 第 3 章 種々の酵母および菌体成分に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の応答

#### 3.1 序

腸管には、食品等の摂取を介して *Saccharomyces cerevisiae* 等の酵母が一時的に存在しうるとともに、*Candida albicans* をはじめとする常在性酵母が存在し、腸管上皮細胞を刺激してサイトカイン産生等、さまざまな免疫応答を誘導していると予想される。第 2 章では、酵母刺激による腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-6, IL-8, MCP-1 などのサイトカインの産生を検討し、ケモカインの一種 IL-8 が産生されることを明らかにした。IL-8 は、貪食細胞である好中球の動員や、単球の血管内皮細胞への接着を促す働きがあり (Gerszten et al., 1999; Godaly et al., 1997), NK 細胞や T 細胞の遊走にも関与していることが報告されている (Burke et al., 2008; Escotte et al., 2006)。

第 2 章で試料に用いた *S. cerevisiae* は、一般に病原性は示さず食品製造にも用いられる代表的な酵母であり、そのほかにも、発酵乳製品ケフィアには *Kluyveromyces*

*marxianus* や *Candida kefyr*, 味噌には *Zygosaccharomyces rouxii* や *Candida versatilis* 等の菌種の酵母が含まれると報告されている。

一方、*C. albicans* は、免疫機能が低下している患者においてカンジダ症を発症させることから、その予防や治療のためによく研究されている菌種である。他の *Candida* 属菌種である *C. glabrata*, *C. parapsilosis* なども腸管内容物や糞便から検出されることがある。

以上のような、食品や腸管内に存在する酵母は、intact な生菌体のまま腸管上皮細胞を刺激する可能性があるとともに、死菌体や細胞構造がおおきく破壊された酵母細胞、菌体成分も、同様に腸管上皮細胞と接触・刺激している可能性がある。そのような刺激の違いに対する細胞応答の差異に関しては、不明な点が多い。

また腸管上皮細胞は、腸管腔の表層に、一層の上皮細胞層を形成して異物に対するバリアとして機能している。腸管上皮細胞の各細胞は互いに ZO-1 や Occludin, Claudin などのタンパク質からなるタイトジャンクション (tight junction : TJ) により密着しており、腸管腔から組織内への物質侵入を物理的に制御している。タイトジャンクションは、サイトカインなどの内因性因子 (Al-Sadi and Ma, 2007; Bruewer et al., 2003; Madara and Stafford, 1989) や食品成分 (Hashimoto et al., 1994; Hashimoto et al., 1995), ある種の微生物 (Chambers et al., 1997; Obert et al., 2000; Simonovic et al., 2000) によってその開閉が影響を受け、腸管腔側からの物質の吸収や微生物感染の防御において、重要な役割を担っている。培養細胞を用いてタイトジャンクションの変化を観察する際には、経上皮電気抵抗 (Transepithelial electrical resistance : TER) 値が指標とされる。TER 値が下がると、タイトジャンクションが開いて、物質の透過性が促進されていることを示す。このようなバリアに対して、酵母による刺激がどのような影響を与えるかについても、不明な点が多い。

そこで本章では、第 2 章で明らかとなった *S. cerevisiae* と *C. albicans* による Caco-2 細胞からの IL-8 産生促進の現象について、さらに詳細な検討を加えることとした。まず、*S. cerevisiae* と *C. albicans* に対する Caco-2 細胞の IL-8 産生応答が酵母菌体濃度依存的かどうかを検討し、続いて、死菌体や菌体成分では IL-8 産生促進活性がどのように変化するか、酵母の菌種の差異により IL-8 産生応答がどのように異なるか、さらに、TER 値の測定により酵母刺激が Caco-2 細胞層の透過性をどのように変化させるかを解析した。

表 3-1 実験に供した酵母菌株

菌株	由来 (分離源)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM 7255 <sup>T</sup>	ビール (上面発酵)
<i>Candida kefyr</i> NBRC 10287 <sup>T</sup>	ケフィア粒
<i>Candida utilis</i> NBRC 10707 <sup>T</sup>	酵母工場
<i>Candida versatilis</i> NBRC 10056 <sup>T</sup>	発酵きゅうり塩漬け (アメリカ)
<i>Kluyveromyces lactis</i> NBRC 1090 <sup>T</sup>	チーズ (イギリス)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1735 <sup>T</sup>	ヨーグルト (オランダ)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> NBRC 1628 <sup>T</sup>	不明
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NBRC 1130 <sup>T</sup>	ブドウもろみ (イタリア)
<i>Candida albicans</i> JCM 1542 <sup>T</sup>	皮膚疾患
<i>Candida glabrata</i> NBRC 0622 <sup>T</sup>	糞便
<i>Candida krusei</i> NBRC 1395 <sup>T</sup>	痰 (スリランカ)
<i>Candida parapsilosis</i> NBRC 1396 <sup>T</sup>	スプルー患者 (プエルトリコ)
<i>Candida tropicalis</i> NBRC 1400 <sup>T</sup>	気管支炎患者

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 酵母試料

*S. cerevisiae* JCM 7255<sup>T</sup> および *C. albicans* JCM 1542<sup>T</sup> は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM, 和光) より購入し, *C. glabrata* NBRC 0622<sup>T</sup>, *C. krusei* NBRC 1395<sup>T</sup>, *C. parapsilosis* NBRC 1396<sup>T</sup>, *C. tropicalis* NBRC 1400<sup>T</sup>, *C. kefyr* NBRC 10287<sup>T</sup>, *C. utilis* NBRC 10707<sup>T</sup>, *C. versatilis* NBRC 10056<sup>T</sup>, *Kluyveromyces lactis* NBRC 1090<sup>T</sup>, *K. marxianus* NBRC 1735, *Schizosaccharomyces pombe* NBRC 1628<sup>T</sup>, *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC 1130<sup>T</sup> は, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 生物遺伝資源部門 (NBRC ; 千葉) より購入した (表 3-1)。こ

れらの酵母を YM broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) にて, 30°C, 3 日間培養した後, 1000×g, 4°C で 10 分間遠心分離し, 沈渣をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し, 必要な濃度に PBS で懸濁した。酵母菌数はポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学, 東京) を用いて, 平板混釈法にて測定した。

加熱死菌体の懸濁液は, Caco-2 細胞用のダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM ; 日水製薬, 東京) に懸濁した菌体を, 65°C の湯浴で 30 分間加熱処理することにより調製した。また, 懸濁液 ( $1.0 \times 10^8$ – $3.0 \times 10^8$  CFU/mL) 100  $\mu$ l を, ポテトデキストロース寒天培地で混釈後, 30°C, 48 時間培養し, 加熱処理により菌が死滅したことを確かめた。

*S. cerevisiae* 由来細胞壁粗画分ザイモサン, 酵母細胞壁成

分のグルカンおよびマンナン (Sigma, St. Lois, MO) は、PBS に懸濁し、必要な濃度に DMEM で希釈して用いた。

### 3.2.2 Caco-2 細胞と酵母試料の共培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターリソース基盤開発部細胞材料開発室 (つくば) より購入した Caco-2 細胞 (RCB0988) (Fogh et al., 1977; Kanda et al., 1998) を、1 mM L-グルタミン (和光純薬, 大阪), 10 mM HEPES (同仁, 熊本), 15% 非働化ウシ胎児血清 (FBS; PAA Laboratories, Linz, Austria) を加えた DMEM 中に懸濁し、6 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン, NJ, USA) を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培地は、同一の培地を用いて、原則、毎日 1 回交換した。

酵母試料との共培養時のサイトカイン産生量を測定するために、0.5 mL DMEM (15% FBS 含有, 10mM 酪酸含有・非含有) を注加した 24 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン) の各ウェルに 12-mm ミリセル HA フィルター (ミリポア, MA, USA) を置き、培養・調製した Caco-2 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) を同上の 0.5 mL DMEM に懸濁し、フィルター上に播種後、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6-7 日間培養した。培地は、同一培地を用いて、原則、毎日 1 回交換した。

### 3.2.3 Caco-2 細胞からの IL-8 分泌量の測定

DMEM (15% FBS 含有, 10 mM 酪酸含有・非含有) にて Caco-2 細胞と酵母試料とを共培養後、Caco-2 細胞の側底面側 (フィルター下) の培地を回収し、1000×g, 5 分間遠心分離後、上清を回収して、サイトカイン量の測定時まで、-80°C で凍結保存した。上清中の IL-8 濃度の測定は、ヒト IL-8 酵素免疫吸着測定 (ELISA) キット (Pierce, MA, USA) を用いて行った。

### 3.2.4 Caco-2 細胞層の経上皮電気抵抗 (TER) 値の測定

DMEM (15% FBS 含有, 10mM 酪酸含有) を用いて 12-mm ミリセル HA フィルター (ミリポア, MA, USA) 上に培養した Caco-2 細胞を酵母生菌体と共培養し、Millicell-ERS 抵抗値測定システム (ミリポア) を用いて Caco-2 細胞の TER 値を測定した。

### 3.2.5 統計解析

統計解析は、SPSS ソフト (SPSS, IL, USA) を用いて行った。等分散が仮定できるとき、Dunnnett 両側検定を行った。P<0.05 のとき、有意差があるとみなした。

## 3.3 結果

### 3.3.1 Caco-2 細胞と *S.cerevisiae* あるいは *C.albicans* 生菌体を共培養した際の酵母菌濃度に依存した IL-8 分泌量の増加

Caco-2 細胞 (15% FBS 含有, 10 mM 酪酸添加・無添加培地で前培養実施) と濃度の異なる *S. cerevisiae* ( $1.9 \times 10^3$  -  $1.9 \times 10^7$  CFU) および *C. albicans* ( $8.0 \times 10^2$  -  $8.0 \times 10^6$  CFU) 生菌体を共培養した際の IL-8 分泌量を測定した。酪酸無添加培地で前培養した Caco-2 細胞では、*S. cerevisiae* または *C. albicans* と 7 時間または 24 時間共培養しても、IL-8 分泌量はいずれも定量限界以下であった。酪酸添加培地で前培養した Caco-2 細胞をそれぞれの酵母と 7 時間共培養したところ、*S. cerevisiae* (初発菌数  $\geq 1.9 \times 10^6$  CFU) および *C. albicans* (初発菌数  $\geq 8.0 \times 10^5$  CFU) 刺激区で、酵母菌濃度依存性の IL-8 分泌量の有意な増加がみられた (図 3-1A)。24 時間共培養した場合には、初発菌数が最高ではない実験区 (*S. cerevisiae* は初発菌数  $1.9 \times 10^5$  CFU, *C. albicans* は同  $8.0 \times 10^4$  CFU 添加区) において、最も IL-8 の分泌量の増加がみられた (図 3-1B)。

一方、酵母の加熱死菌体 (DMEM 中, 65°C, 30 分間加熱処理) と共培養した場合には、IL-8 分泌量の増加はみられなかった (図 3-2)。

### 3.3.2 *S.cerevisiae* 細胞壁由来ザイモサンおよびグルカンによる Caco-2 細胞からの IL-8 産生増強

酪酸 (10 mM) を含む培地で 4 日間前培養した Caco-2 細胞と *S. cerevisiae* 細胞壁由来成分であるザイモサン、グルカンおよびマンナン (0, 5, 50, 500  $\mu$ g) それぞれを同培地 0.5 mL にて 7 時間または 24 時間共培養し、培地中に分泌された IL-8 の濃度を ELISA により測定した。ザイモサン (50, 500  $\mu$ g) とグルカン (500  $\mu$ g) は、Caco-2 細胞からの IL-8 分泌を濃度依存的に有意に増強したが、マンナンは IL-8 分泌量に影響を及ぼさなかった (図 3-3)。

### 3.3.3 種々の酵母生菌体による Caco-2 細胞の IL-8 産生増強

*S. cerevisiae* と *C. albicans* 以外の種々の酵母について (表 3-1), 同様に Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進する働きがあるかどうかを検討した。Caco-2 細胞を 10 mM 酪酸添加培地で 4 日間前培養した後、各酵母の生菌体 ( $1.0 \times 10^7$  CFU) とそれぞれ 7 時間または 24 時間共培養した。

その結果、*S. cerevisiae*, *C. kefir*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. pombe*, *Z. rouxii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, いずれの酵母に対し

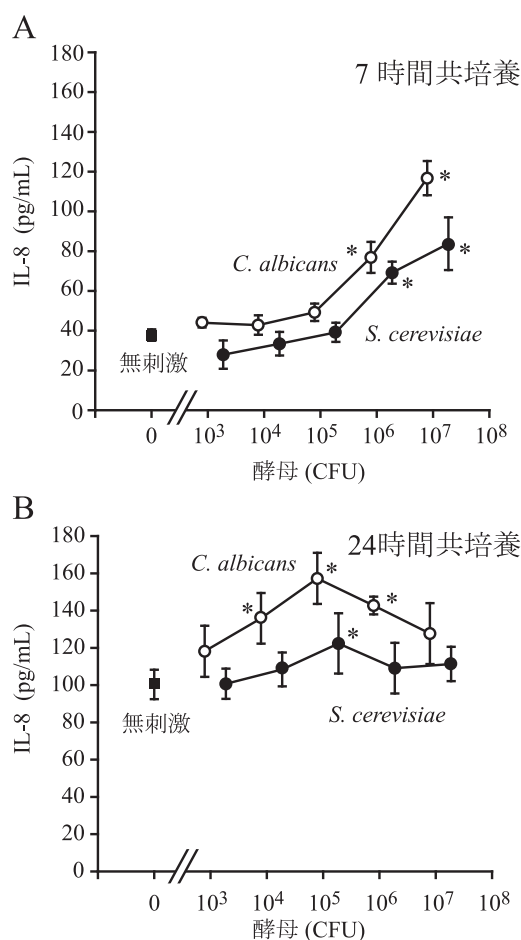


図 3-1 *Saccharomyces cerevisiae* または *Candida albicans* 生菌体との共培養による Caco-2 細胞からの IL-8 分泌変化

Caco-2 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養したのちに、10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養後、さらに酵母生菌体と表記の時間共培養した。値は平均値±標準偏差 (n=5)。

\* 各共培養時間における無刺激時の IL-8 分泌量に対して有意差あり (P<0.05)。

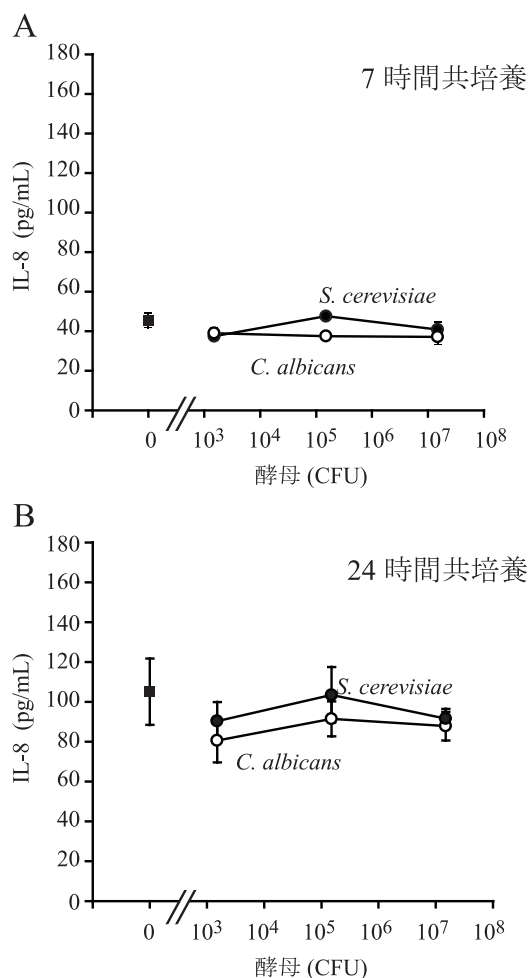


図 3-2 *Saccharomyces cerevisiae* または *Candida albicans* 加熱死菌体との共培養時の Caco-2 細胞からの IL-8 分泌

Caco-2 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後、10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し、60°C で 30 分間処理した酵母加熱死菌体と共培養した。値は平均値±標準偏差 (n=5)。

ても、Caco-2 細胞からの IL-8 分泌が促進された (図 3-4)。

### 3.3.4 *S.cerevisiae* および *C.albicans* 生菌体との共培養による Caco-2 細胞層の経上皮電気抵抗 (TER) の変化

*S. cerevisiae* または *C. albicans* 生菌体との共培養時の Caco-2 細胞の TER 値を測定し、*S. cerevisiae* (初発菌数  $1.9 \times 10^3 - 1.9 \times 10^7$  CFU) および *C. albicans* (初発菌数  $8.0 \times 10^2 - 8.0 \times 10^6$  CFU) が Caco-2 細胞層の透過性に及

ぼす影響について調べた。酪酸 (10 mM) 添加培地で前培養した Caco-2 細胞を *S. cerevisiae* と 7 時間の共培養を行った場合、Caco-2 細胞層の TER 値に顕著な変化はみられなかったが、*C. albicans* ( $\geq 8.0 \times 10^3$  CFU) との共培養では有意に減少した (図 3-5A)。24 時間の共培養では、両酵母が共に TER 値を減少させたが、*S. cerevisiae* のほうがより緩やかな減少をみせた (図 3-5B)。

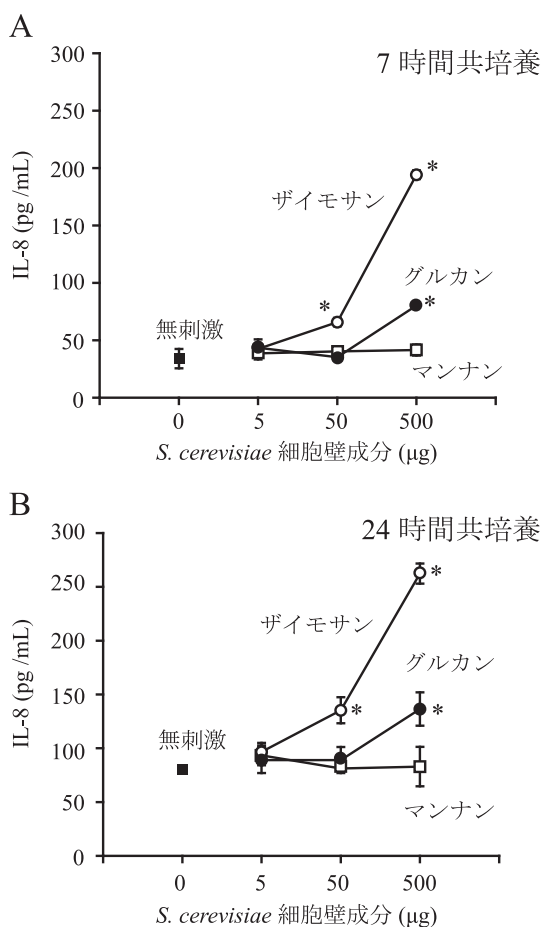


図 3-3 *S.cerevisiae* 由来ザイモサン, グルカン, マンナンとの共培養時の Caco-2 細胞からの IL-8 分泌

Caco-2 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し, 酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後, 10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し, 酵母生菌体と共培養した。値は平均値±標準偏差 (n=5)。

\* 各共培養時間における無刺激時の IL-8 分泌量に対して有意差あり (P<0.05)。

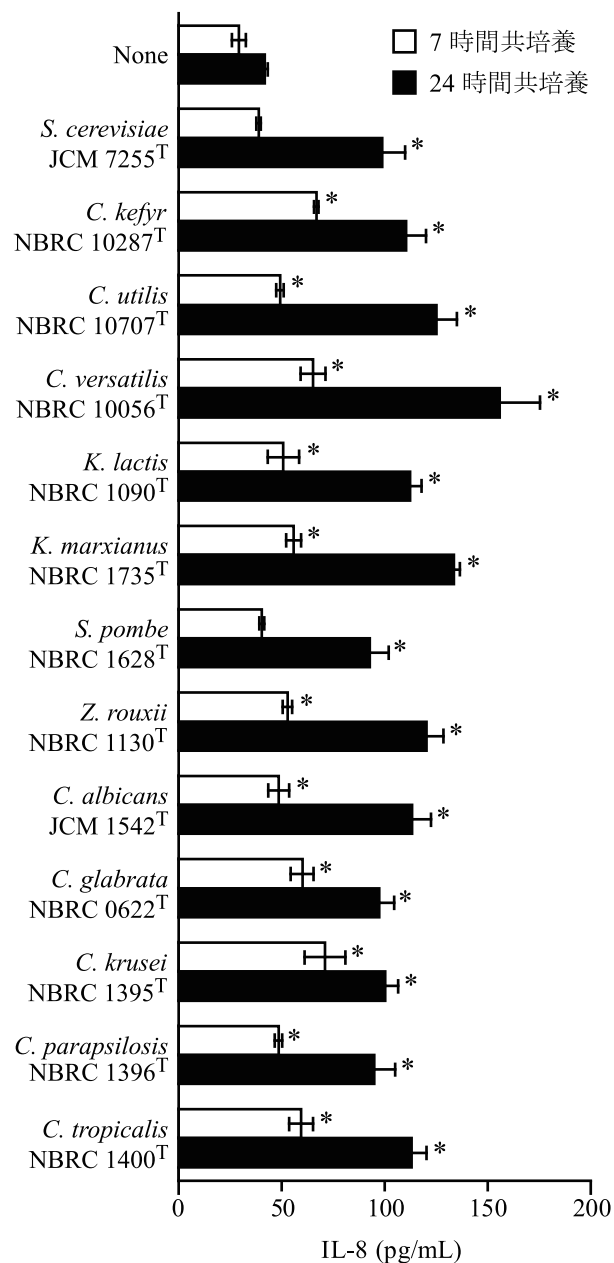


図 3-4 種々の酵母生菌体刺激による Caco-2 細胞からの IL-8 分泌

Caco-2 細胞数 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し, 酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後, 10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し, 酵母生菌体 ( $1.0 \times 10^7$  CFU) と共培養した。値は平均値±標準偏差 (n=5)。

\* 各共培養時間における無刺激時の IL-8 分泌量に対して有意差あり (P<0.05)。

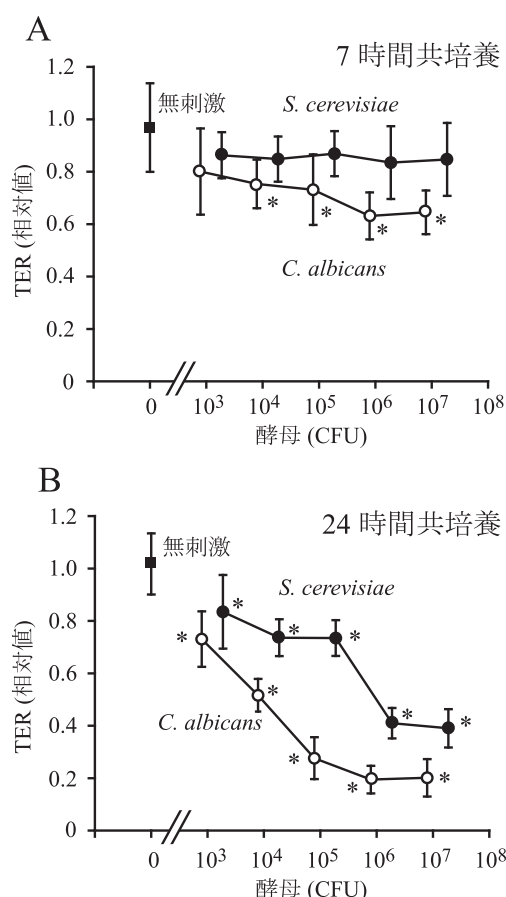


図 3-5 *S.cerevisiae* および *C.albicans* 生菌体との共培養時の Caco-2 細胞層の経上皮電気抵抗値 (TER 値) の変化

Caco-2 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後、10 mM 酪酸添加培地 (フィルター上下に各 0.5 mL) で 4 日間培養し、酵母生菌体と共培養した。値は平均値±標準偏差 (n=5)。

\* 各共培養時間における無刺激時の TER 値に対して有意差あり (P<0.05)。

### 3.4 考察

本章では、*S. cerevisiae* および *C. albicans* を含む種々の酵母生菌体が、10 mM 酪酸で前処置した腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進することを明らかにした。ケモカインの一種である IL-8 は、好中球の動員や単球の血管内皮細胞への接着を促す働きを有する物質である (Gerszten et al., 1999; Godaly et al., 1997)。

食品製造にも用いられる *S. cerevisiae* による IL-8 産生促進作用は、*C. albicans* よりも低く、細胞層の透過性の指標となる経上皮電気抵抗 (TER) 値を低下させる作用も緩やかであった (図 3-1 および 3-5)。しかしながら、その他の食品製造やプロバイオティクスに用いられる種々の酵母およびヒト常在性酵母についても解析したところ、10 mM 酪酸添加培地で前培養した腸管上皮様

Caco-2 細胞からの IL-8 分泌は、食品由来菌株と生体由来菌株との間で、作用の強度に一定の傾向を示すことなく促進された (図 3-4)。これらの結果は、食品などから摂取することで生体内に初めて存在するような酵母と生体内に常在する酵母の両方が、腸管上皮細胞の免疫応答を通して、腸管免疫系を刺激する作用を本質的には大差なく有していることを示唆している。

酵母の経口摂取については、宿主に有益な作用をもたらすと、いくつかの報告がこれまでになされている。例えば、*S. cerevisiae* の菌体成分の摂取により、牛の食欲増進や乳量増加が認められ (Besong et al., 1996; Dann et al., 2000)、また、*K. marxianus* 死菌体の摂取により、血中コレステロール濃度が低下するとされる (Yoshida et al., 2005; Yoshida et al., 2004)。本章の結果から、健常人においては、さまざまな酵母の摂取により、IL-8 産生などの免疫応答を誘導し、甚大で有害な作用を示さずに腸管免疫システムを刺激・発達させ、外来物質に対して迅速な免疫応答を示せるような状態に維持することができるのではないかと考えられる。また、酵母菌株間の競合により、腸内への病原性酵母の定着性を抑制したり排除しやすい環境を整えるといった有益な作用も得られるのではないだろうか。

本章では、酵母生菌体のみならず、加熱死菌体や菌体成分の IL-8 産生促進作用について検討を加えた。その結果、酵母生菌体は Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進したが、加熱死菌体では影響を及ぼさなかった (図 3-1 および 3-2)。他の報告でも、*C. albicans* 生菌体は IL-1 $\alpha$  や IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF, GM-CSF 等の口腔上皮細胞からの産生を促進したが、死菌体では促進しなかったとされる (Schaller et al., 2002; Steele and Fidel, 2002)。一方、酵母細胞壁粗画分ザイモサンおよびその一成分であるグルカンは IL-8 産生を促進したが、マンナンはその活性を有しなかった (図 3-3)。ザイモサンに関するこれまでの報告から、ザイモサン表面には  $\beta$ -グルカンが露出していると考えられ (DiCario and Fiore, 1958; Pillemer and Ecker, 1940)、本章で観察されたザイモサンによる IL-8 産生促進は、ザイモサン内の  $\beta$ -グルカンが関与しているものと考えられる。

加熱死菌体と、ザイモサン等の菌体成分とで、IL-8 産生促進作用に差異が認められたが (図 3-2 および 3-3)、試料として用いたザイモサンやグルカンは、本章での酵母細胞に対する加熱死菌体調製用の処理条件 (65°C の湯浴で 30 分間加熱処理) と異なり、90°C 以上での数時間の加熱処理と、酵素処理、物理的粉碎等を組み合わせて抽出した物質である。このことから、今回の実験の加熱処理条件では、酵母細胞表面の活性物質の変性や産生物質

の消失によりサイトカイン分泌誘導能を失ったとともに、細胞壁内部のグルカンなどの耐熱性を有する作用物質の露出は、サイトカイン分泌を誘導するほどはなかったと考えられる。

ところで、intactな酵母細胞は、マンナンを細胞壁成分として含有し細胞表層に発現しているとともに、 $\beta$ -グルカンをその細胞壁内層に有している。 $\beta$ -グルカンは、通常、表層では出芽痕のみに存在が認められる (Gantner et al., 2005)。本章で、グルカンによる Caco-2 細胞からの IL-8 分泌促進作用が示され、また、 $\beta$ -グルカンは、マクロファージの TNF- $\alpha$  産生を促進することが知られていることから (Olson et al., 1996)、*S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体による Caco-2 細胞からの IL-8 産生促進にも、この  $\beta$ -グルカンの関与が考えられる。一方、マンナンに関連する物質については、*C. albicans* のホスホリポマンナンがマウスマクロファージの TLR2 に認識されること (Jouault et al., 2003)、また、*C. albicans* 及び *S. cerevisiae* のマンナンがヒト単球において TLR4 及び CD14 を介した TNF- $\alpha$  産生を活性化することが知られている (Tada et al., 2002)。しかしながら、本章においては、*S. cerevisiae* 由来のマンナン単独では腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進しなかった。したがって、酵母生菌体刺激による Caco-2 細胞からの IL-8 産生にはマンナンが関与している可能性もあるが、実験に供した単独のマンナンとは構造や結合物質が異なり、IL-8 分泌促進作用に影響を及ぼしたとも予想される。

*S. cerevisiae* と *C. albicans* 以外の種々の酵母も IL-8 分泌促進活性を示したが (図 3-4)、これらの酵母も同様に、細胞壁成分として  $\beta$ -グルカンやマンナンなどを含むことから、これらの成分が Caco-2 細胞からの IL-8 産生に関与している可能性が考えられる。しかしながら、それぞれの酵母における詳細な細胞構造や含有量は、菌種や菌株、酵母の存在する環境 (温度、pH、栄養成分等) によって異なると予想される。また、酵母の種類により、実際の生体内では、生存能力や代謝活性、宿主細胞への接着性、侵襲性が異なり、それらが免疫応答を誘導する物質の種類や量の差と相まって、宿主への影響に違いを及ぼす可能性がある。

本章の最後の実験では、腸管における酵母生菌体の存在が腸管上皮細胞層の構造と機能の維持に及ぼす影響を検討する目的で、Caco-2 細胞層の透過性に関連する TER の変化を測定した。その結果、*S. cerevisiae* または *C. albicans* 生菌体と Caco-2 細胞の共培養時には、*S. cerevisiae* より *C. albicans* のほうがより急速な TER 値の減少を引き起こすことが判明した (図 3-5)。*S. cerevisiae* は、通常、卵形の酵母型の形態をとり、菌糸を形成する

ことはないが、*Candida* 属酵母、なかでも *C. albicans* は、温度や pH、血清成分等の生育環境によって、発芽管および菌糸を形成することが知られている (Barlow et al., 1974; Buffo et al., 1984; Casanova et al., 1997)。Caco-2 細胞に対しても、*C. albicans* は、菌糸形で Caco-2 細胞間および細胞内を通過し、頂端面から側底面へ移動することが報告されており (Weide and Ernst, 1999)、その際に Caco-2 細胞の構造と機能に傷害を与えると予想される。また、*C. albicans* は、ホスホリポマンナンや、分泌性アスパラギン酸タンパク質分解酵素 (secretory aspartic proteinase : SAP)、高親和性鉄透過酵素 (high-affinity iron permease) 等の組織傷害性を有する特徴的な病原性因子を産生する (Chaffin et al., 1998; Jouault et al., 1997; Ramanan and Wang, 2000)。*S. cerevisiae* もさまざまな酵素を産生するが、強い組織傷害性をもった因子は報告されていない。このような *S. cerevisiae* と *C. albicans* との違いが、本研究における Caco-2 細胞のサイトカイン産生および TER 低下の違いの原因となっている可能性があり、*C. albicans* より *S. cerevisiae* のほうが Caco-2 細胞層に、ひいては実際の腸管における腸管上皮細胞層に与える傷害は低いことを示唆している。

本章で検討したケモカインの一種である IL-8 に関して、しばしば炎症反応における IL-8 の産生増加が問題とされるが、微生物による IL-8 産生促進が必ずしも炎症疾患を誘起するとは限らない。IL-8 の産生は、物質の迅速な除去に必要な反応であり、また、過度の炎症を起こさない程度の非病原性微生物による免疫応答の誘引は、免疫系の発達を高めるとともに、病原性微生物が侵入してきた際の免疫応答に迅速に対応するよう備える働きもあるのではないかと考えられる。例えば、プロバイオティクスの *Streptococcus thermophilus* や非病原性 *E. coli* も、腸管上皮様 HT29/19A 細胞からの IL-8 産生を促進するという報告もあり (Lammers et al., 2002)、また、非病原性 *Lactobacillus sakei* が血球細胞と共培養した Caco-2 細胞の IL-8 mRNA 発現を促進したり (Haller et al., 2000)、口腔内常在性細菌 *Fusobacterium nucleatum* も IL-8 の産生を促進するという報告がみられる (Krisanaprakornkit et al., 2000)。本研究において観察された *S. cerevisiae* による IL-8 の産生促進活性は、その菌体の経口摂取時には通常、重篤な炎症を引き起こすようなものではなく、免疫機能の発達や、別の病原性微生物の侵入に対処するために、免疫機能を高めておく点で有益であると考えられる。

### 3.5 小括

酵母 *S. cerevisiae* とその菌体成分、および *C. albicans* が、ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-8 産生および Caco-2 細胞層の TER に与える影響を検討した。また、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 以外の種々の酵母についても同様に、IL-8 産生に及ぼす影響を検討した。Caco-2 細胞については、フィルター上にて極性を持たせて培養することにより、腸管上皮様細胞への分化を誘導し、さらに分化を誘導するとされる 10 mM 酪酸添加 DMEM を用いて前培養した後、酵母等との共培養試験を実施した。

Caco-2 細胞との共培養試験 (7 時間および 24 時間) の結果、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 生菌体、*S. cerevisiae* 由来の細胞壁成分のザイモサンとグルカンが、Caco-2 細胞からの IL-8 産生を増強したが、加熱死菌体 (65°C の湯浴で 30 分間加熱処理) やマンナンは IL-8 産生を増強しなかった。

さらに、種々の酵母 *C. kefir*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. pombe*, *Z. rouxii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* もそれぞれ、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 同様、Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進した。

*S. cerevisiae* による 7 時間刺激では、Caco-2 細胞層の TER 値に変化はみられなかったが、24 時間刺激では、Caco-2 細胞層の TER 値の低下を起し、その低下は *C. albicans* 刺激より緩やかであった。

以上の結果から、*S. cerevisiae* 等のように主に食品等と共に取り込まれ一過的に腸管に存在する酵母、および *C. albicans* 等の常在性酵母は共に、腸管上皮細胞を介して腸管免疫応答を誘導することが示唆された。

## 第 4 章 *Saccharomyces cerevisiae* および *Candida albicans* に対するヒト好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン産生応答

### 4.1 序

第 2 章および第 3 章では、*S. cerevisiae* をはじめとする種々の酵母菌体や、*S. cerevisiae* の細胞壁構成成分であるザイモサンおよびグルカンが、ヒト腸管上皮細胞様 Caco-2 細胞からの IL-8 分泌を促進することを明らかにした。分泌される IL-8 は好中球の動員を促すケモカインである (Gerszten et al., 1999; Godaly et al., 1997)。

好中球は、自然免疫反応のみでなく獲得免疫に対しても重要な役割を担っており、上皮細胞とは異なり、酵母や細菌などの微生物を積極的に取り込んで殺菌・分解す

るという貪食作用を有している。微生物は貪食される際に、好中球の細胞膜に包み込まれるように細胞内部に取り込まれ、細胞質内のファゴソームと呼ばれる膜小胞の中に入る。好中球細胞表面上やファゴソーム膜上には、TLRs や Dectin-1 等の酵母菌体成分受容体が発現していることが知られている (Flo et al., 2001; Hornef et al., 2002; Ozinsky et al., 2000; Underhill et al., 1999)。酵母を含めた真菌に対する生体の免疫応答においては、好中球が最も重要な役割を担っていることが報告されており (Fradin et al., 2005; Rubin-Bejerano et al., 2003)、真菌感染部位では、多数の好中球の集積が観察される (Netea et al., 1999)。その処理過程において、好中球はサイトカインや活性酸素種、次亜塩素酸を産生したり、細胞外捕捉構造物 (neutrophil extracellular traps : NETs) を形成したり、他の細胞への抗原提示能を示す (荒谷, 2006; Ishikawa and Miyazaki, 2005; Urban et al., 2006)。また、好中球減少患者において、カンジダ症などの真菌症が問題になっていることから、酵母に対する免疫応答における好中球の重要性が伺える。

好中球のモデル細胞として研究に多用されている前骨髄球性白血病細胞 HL-60 は、レチノイン酸またはジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した培地を用いて培養することにより、好中球様に分化する (Breitman et al., 1980; Collins et al., 1978)。分化した HL-60 細胞は、好中球の形態的特徴を有し、補体レセプターの発現、貪食作用や走化性、スーパーオキシドやサイトカインの産生、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の減少活性等を示す。

好中球や好中球様 HL-60 細胞は、*Anaplasma* 属、*Ehrlichia* 属、*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* などの細菌に対し、サイトカイン IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  を産生することが報告されている (Hachicha et al., 1998; Kim and Rikihisa, 2000, 2002; Klein et al., 2000)。一方、酵母に対しては、細菌に対する反応に比べると弱いものの、生体より分離した好中球が、*S. cerevisiae* 死菌体に対して IL-8 を、*C. albicans* 死菌体に対して IL-8 と MIP-1 $\alpha$  を分泌することが明らかになっている (Hachicha et al., 1998)。遺伝子発現レベルでは、好中球様 HL-60 細胞が、*C. albicans* 生菌体および死菌体に対して IL-1 $\alpha$  と IL-8 の mRNA 発現量を増加させ、*C. albicans* 死菌体に対してはさらに IL-6 mRNA 発現量を増加させることや (Suzuki et al., 2000)、*C. albicans* 生菌体に対し、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$  などの mRNA 発現量を増加させることが報告されている (Mullick et al., 2004)。このように、酵母に対する好中球のサイトカイン応答に関する解析例は、*C. albicans* を中心としたものであり、*S. cerevisiae* をはじめとする食品やサプリメント製造に



用いられる酵母に対する応答に関しては、詳細が明らかとなっていない。

本章では、第2章および第3章で明らかにした腸管上皮様 Caco-2 細胞によって分泌される IL-8 により動員される好中球に着目し、*S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体および加熱死菌体に対する好中球様 HL-60 細胞の種々のサイトカイン産生応答について検討した。また、HL-60細胞の分化誘導剤であるレチノイン酸と DMSO が HL-60 細胞の応答に及ぼす影響についても比較検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 酵母試料

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM; 和光) より購入した *S. cerevisiae* JCM 7255<sup>T</sup> および *C. albicans* JCM 1542<sup>T</sup> を YM broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) にて、30°C、3日間培養した後、1000×g、4°Cで10分間遠心分離し、沈渣を PBS で2回洗浄し、必要な濃度に懸濁した。菌数は、ポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学、東京) を用いた平板混釈法により、30°C、48時間培養して測定した。

加熱死菌体は、PBS に懸濁した菌体を、60°Cまたは100°Cの湯浴で30分間加熱することにより調製した。菌の死滅の確認は、菌懸濁液 ( $1.0 \times 10^8$ – $3.0 \times 10^8$  CFU/mL) 100  $\mu$ l をポテトデキストロース寒天培地で混釈し、30°C、48時間培養して行なった。

### 4.2.2 HL-60 細胞と酵母の共培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターリソース基盤開発部細胞材料開発室 (つくば) より購入した前骨髄球性白血病細胞 HL-60 (RCB0041) を 1 mM L-グルタミン (和光純薬、大阪)、10 mM HEPES (同仁、熊本)、10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS; PAA Laboratories, Linz, Austria) を加えた RPMI1640 培地 (日水製薬、東京) で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。ヒト好中球様への分化を促すため、24 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン、NJ, USA) に  $1.0 \times 10^6$  個ずつ播種し、1  $\mu$ M レチノイン酸または 1.25% DMSO 添加 RPMI1640 培地で6日間培養した。培地は一日おきに新しいものと交換した。その後、新たに *S. cerevisiae* または *C. albicans* の生菌体または加熱死菌体を含む同一の培地を加え、7時間または24時間共培養を行った。

### 4.2.3 サイトカイン分泌量の測定

共培養後、培養上清を回収し、1000×g、5分間遠心分離後、上清を回収し、サイトカイン量測定時まで、-80°C

で凍結保存した。上清中のサイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、MCP-1、TNF- $\alpha$  の測定は、酵素免疫吸着測定 (ELISA) キット (Pierce, MA, USA) を用いて、IL-18 の測定は ELISA キット (MBL, 名古屋) を用いて行った。

### 4.2.4 サイトカイン mRNA 発現量の測定

酵母との共培養前および共培養後の HL-60 細胞から、RNeasy mini kit (キアゲン、Hilden, Germany) および DNase (キアゲン) を用いて、全 RNA を抽出した。抽出した RNA から、Omniscript reverse transcriptase (キアゲン)、oligo d(T)<sub>12-18</sub> プライマー (GE ヘルスケアバイオサイエンス、NJ, USA) および RNaseOUT recombinant RNase inhibitor (インビトロジェン) を用いて、逆転写により cDNA を合成した。cDNA から mRNA 発現量を測定するため、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン) と、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12p40、IL-18、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE/caspase-1) 特異的プライマー (日本遺伝子研究所、仙台、表 4-1) を用いて、ライトサイクラー330 システム (ロシュ、Mannheim, Germany) により、PCR を行った。ICE は非活性型 IL-1 $\beta$  と IL-18 を活性型に変換する際に重要な役割を担っている物質である。各プライマー配列および PCR 条件は表 4-1 に示す。各サンプルの GAPDH を内部標準とした。

## 4.3 結果

### 4.3.1 *S. cerevisiae* 生菌体および加熱死菌体に対する HL-60 細胞のサイトカイン産生応答とレチノイン酸および DMSO の影響

*S. cerevisiae* 生菌体および 60°C、30分間加熱処理して得られた死菌体による刺激に対し、HL-60 細胞がどのようなサイトカイン分泌応答を示すか検討した。また、HL-60 細胞の好中球様細胞への分化誘導に用いた 1  $\mu$ M レチノイン酸および 1.25% DMSO の影響についても比較検討した。その結果、レチノイン酸添加培地で前培養した HL-60 細胞では、*S. cerevisiae* 生菌体 ( $1.0 \times 10^7$  CFU) および加熱死菌体刺激 (24時間共培養) に対して、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、MCP-1 および TNF- $\alpha$  の分泌量が増加した (図 4-1)。レチノイン酸添加培地で前培養した HL-60 細胞のこれらのサイトカインの分泌の程度は、DMSO 添加培地で前培養した HL-60 細胞に比べて強かった (図 4-1)。

表 4-1 PCR プライマー配列と反応条件

標的遺伝子	プライマー (5'-3')	アニーリング 温度 (°C)	伸長反応 時間 (秒)	増幅 サイズ (bp)	
GAPDH	sense	tgaacgggaagctcactgg	63	30	307
	antisense	tccaccacctgttgctgta			
IL-1β	sense	gatggcttattacagtggc	63	20	198
	antisense	atcttctcagcttgcca			
IL-6	sense	cactcacctcttcagaacga	60	30	258
	antisense	ctgttctggaggtactctagg			
IL-8	sense	tggtctcttggcagccttc	63	30	238
	antisense	tgaccaccagtttctctggg			
IL-12p40	sense	tcctgacattctgcgtt	55	16	160
	antisense	cccattcgctccaagat			
IL-18	sense	aatttcaactctctctgtg	54	25	236
	antisense	tagatctatccccaattca			
MCP-1	sense	ctcagccagatgcaatcaat	60	30	259
	antisense	agattcttgggtgtggagt			
TNF-α	sense	agcccatgtttagcaaacc	60	15	134
	antisense	tgaggtacaggccctctgat			
ICE	sense	ctgtgatgtggaggaaat	55	15	154
	antisense	cgcagacattcatacagttt			

PCR 反応は、95°Cで15分間加熱した後、94°Cで15秒間の変性反応、表中の温度で20秒間のアニーリング反応、72°Cで表中の時間の伸長反応を40サイクル繰り返した。

また、酵母刺激なしの場合にも、レチノイン酸添加培地で前培養した HL-60 細胞は、レチノイン酸や DMSO を加えていない場合に比べ、IL-1β と MCP-1 の分泌量が増加していたが、DMSO 添加培地で前培養した HL-60 細胞では、これらの増加はみられなかった (図 4-1)。

#### 4.3.2 濃度の異なる *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生菌体および加熱死菌体刺激に対するレチノイン酸処理 HL-60 細胞のサイトカイン分泌応答

*S. cerevisiae* に対する HL-60 細胞からのサイトカイン産生応答をさらに詳細に検討するために、さまざまな濃度 ( $1.0 \times 10^3$ – $1.0 \times 10^7$  CFU) の酵母生菌体および加熱死菌体 (60°Cまたは100°Cで30分間加熱) と、レチノイン酸含有培地で前培養した HL-60 細胞を共培養し、HL-60 細胞のサイトカイン分泌量を測定した。同様に、*C. albicans* についても検討した。その結果、*S. cerevisiae* 生菌体または加熱死菌体との共培養 (24 時間) により、HL-60 細胞からの IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1 および TNF-α 分泌量が増加し、その応答は酵母の濃度や

酵母細胞の状態 (生死・加熱処理条件) に依存していた (図 4-2)。これらのサイトカインのうち、IL-1β および IL-18 以外については、60°Cで30分間加熱処理した *S. cerevisiae* 死菌体による分泌量の最大値が、生菌体や 100°Cで30分間加熱処理した死菌体による分泌量よりも大きかった。一方、対照の 60°Cで30分間加熱処理した *C. albicans* 死菌体 ( $1.0 \times 10^7$  CFU) は、HL-60 細胞からの IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, TNF-α 産生を促進したが、IL-1β と IL-18 産生量に対しては影響を与えなかった。また、この作用は、100°Cで加熱した *C. albicans* 死菌体よりも強かった。*C. albicans* 生菌体は、IL-1β, IL-8 および IL-18 の分泌をわずかに促進したのみであった。

#### 4.3.3 *S.cerevisiae* および *C.albicans* 生菌体および加熱死菌体に対する好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン mRNA 発現量の変化と、それらの変化に対する HL-60 細胞分化誘導剤レチノイン酸または DMSO の影響

4.3.1 および 4.3.2 において、酵母との共培養により

*S. cerevisiae*

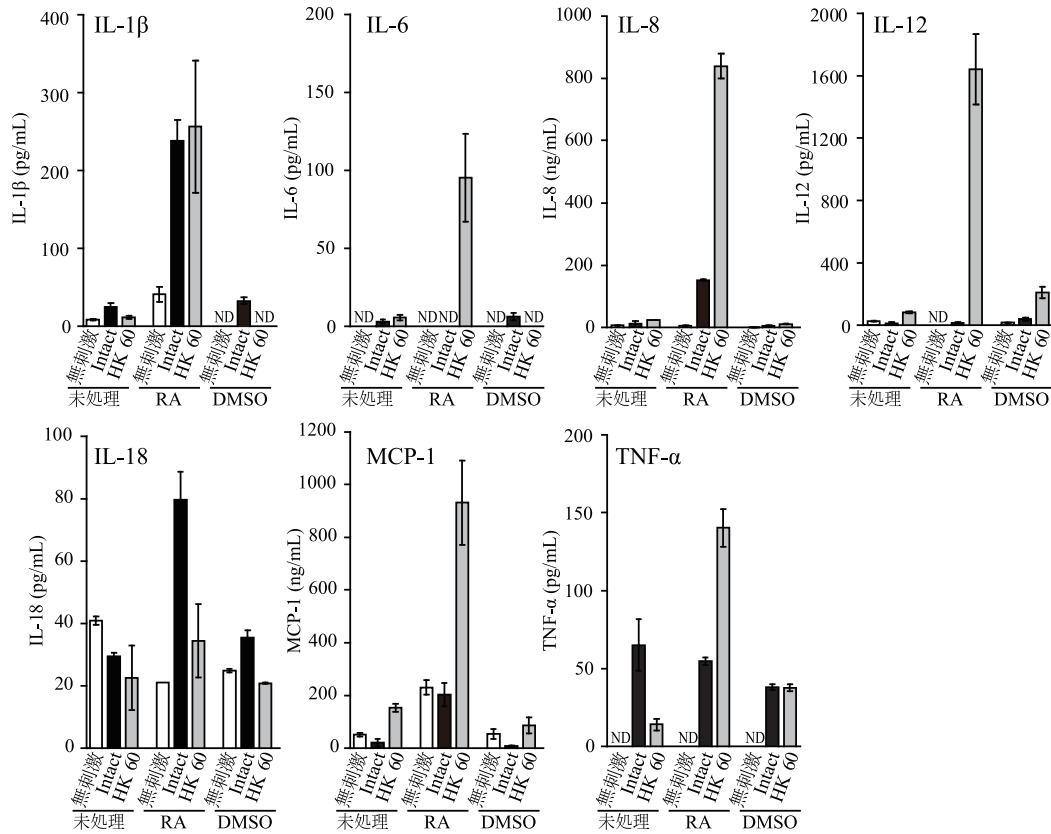


図 4-1 レチノイン酸または DMSO 添加培地で培養した HL-60 細胞を *S.cerevisiae* 生菌体または加熱死菌体と共培養した際のサイトカイン産生

HL-60 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  個) を、 $1 \mu\text{M}$  レチノイン酸 (RA) または 1.25% DMSO 添加 RPMI1640 培地 1 mL で 6 日間培養した後、*S. cerevisiae* 生菌体 (intact) ( $1.0 \times 10^7$  CFU), またはそれを  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱した加熱死菌体 (HK 60) と 24 時間共培養を行った。値は平均値±標準偏差 (n=3)。

HL-60 細胞からのサイトカイン分泌に変化が認められたため、これらの分泌が、関連する物質の mRNA 発現量の変化を伴うのか検討した。その結果、HL-60 細胞を *S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体または加熱死菌体それぞれと 7 時間共培養することにより、解析したうちの一部のサイトカインの mRNA 発現量に変化が認められ、また、HL-60 細胞の前培養に用いた分化誘導剤レチノイン酸または DMSO は、サイトカイン mRNA 発現量の変化に異なる影響を及ぼすことが判明した (図 4-3)。

レチノイン酸含有培地で前培養した HL-60 細胞では、 $60^\circ\text{C}$  で加熱処理した *S. cerevisiae* 死菌体での 7 時間の刺激により、HL-60 細胞の IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12p40, MCP-1, および TNF-α mRNA 発現量が増加し (図 4-3), 24 時間共培養した際のそれぞれのサイトカイン分泌量の変化 (図 4-1) と同様の傾向を示した。IL-18 および ICE mRNA 発現量については増加しなかったが (図 4-3), IL-18 分泌量は増加しており (図 4-1), 異なる傾向を示した。また、*S. cerevisiae* 生菌体との 7 時間共培養により、HL-60 細胞の IL-18, ICE および TNF-α mRNA 発現量は増加しなかったものの (図 4-3), 24 時間共培養後の IL-18 と

TNF-α のタンパク質レベルでの分泌量は増加していた (図 4-1, 4-2)。一方、 $60^\circ\text{C}$  で加熱処理した *C. albicans* 死菌体での 7 時間の刺激では、HL-60 細胞の IL-6, IL-8, IL-12p40 mRNA 発現量が増加し (図 4-3), 24 時間共培養後の IL-6, IL-8, IL-12 分泌量も増加した (図 4-2)。*C. albicans* 生菌体での 7 時間の刺激では、HL-60 細胞の IL-8 mRNA 発現量が増加し (図 4-3), 24 時間共培養後の分泌量も増加した (図 4-2)。

DMSO 含有培地で前培養した HL-60 細胞では、*S. cerevisiae* と 7 時間共培養した際の TNF-α mRNA 発現量が、レチノイン酸含有培地で培養した HL-60 細胞の場合に比べて大きく増加したが (図 4-3), TNF-α 分泌量にその傾向はみられなかった (図 4-1)。

4.4 考察

本章の結果より、酵母細胞は好中球を刺激してサイトカイン産生応答を誘導し、生体の免疫応答を誘起することが示唆された。代表的な酵母である *S. cerevisiae* は、家畜の飼料に添加されたり、発酵醸造食品やプロバイオティ

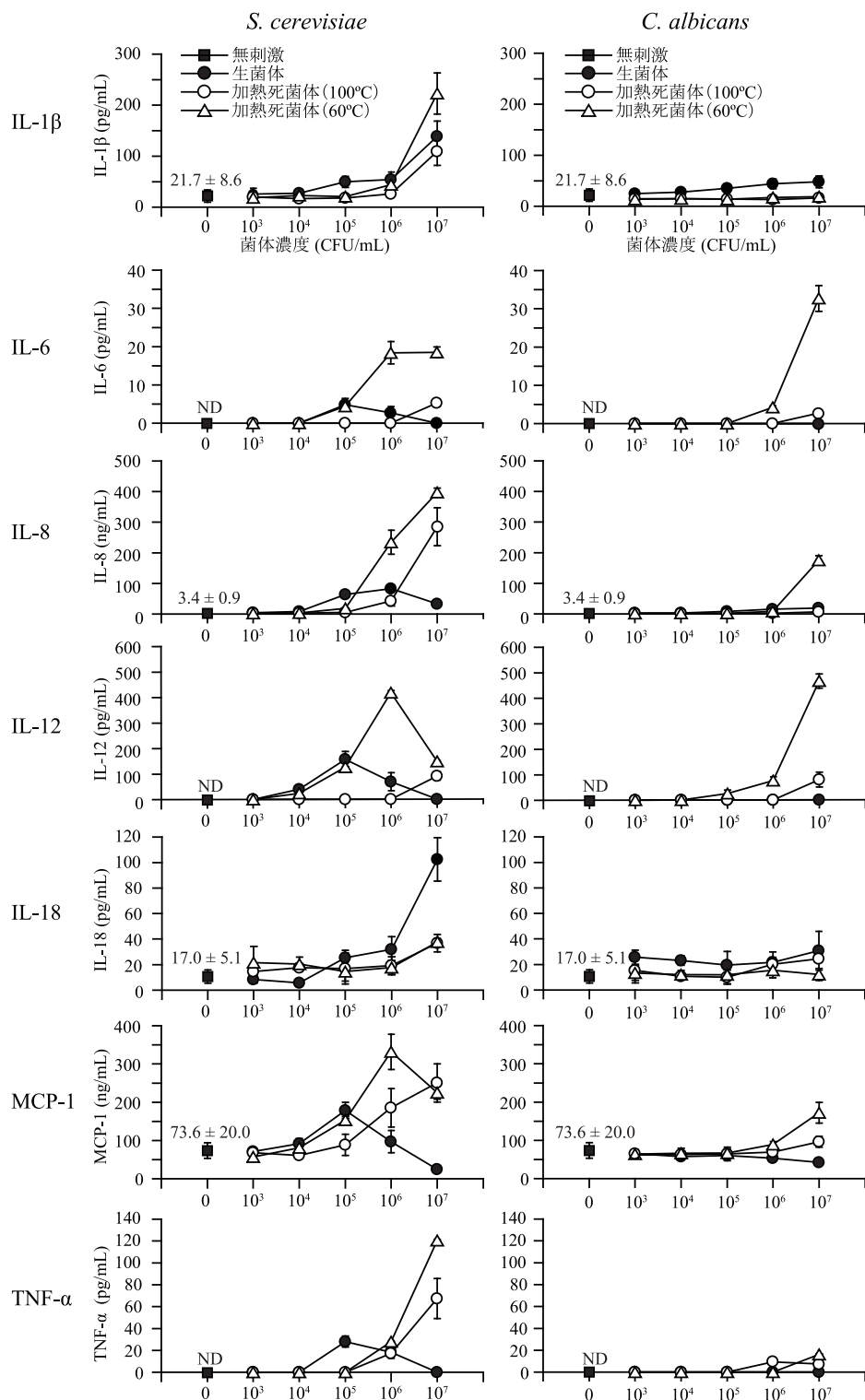


図 4-2 レチノイン酸添加培地で培養した HL-60 細胞を *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生菌体あるいは加熱死菌体と共培養した際のサイトカイン産生

HL-60 細胞 (1.0 × 10<sup>6</sup> 個) を, 1 μM レチノイン酸添加 RPMI1640 培地 1 mL で 6 日間培養した後, *S.cerevisiae* または *C.albicans* 生菌体, およびそれぞれを 100°C または 60°C で 30 分間加熱した加熱死菌体と 24 時間共培養を行った。値は平均値 ± 標準偏差 (n=3)。

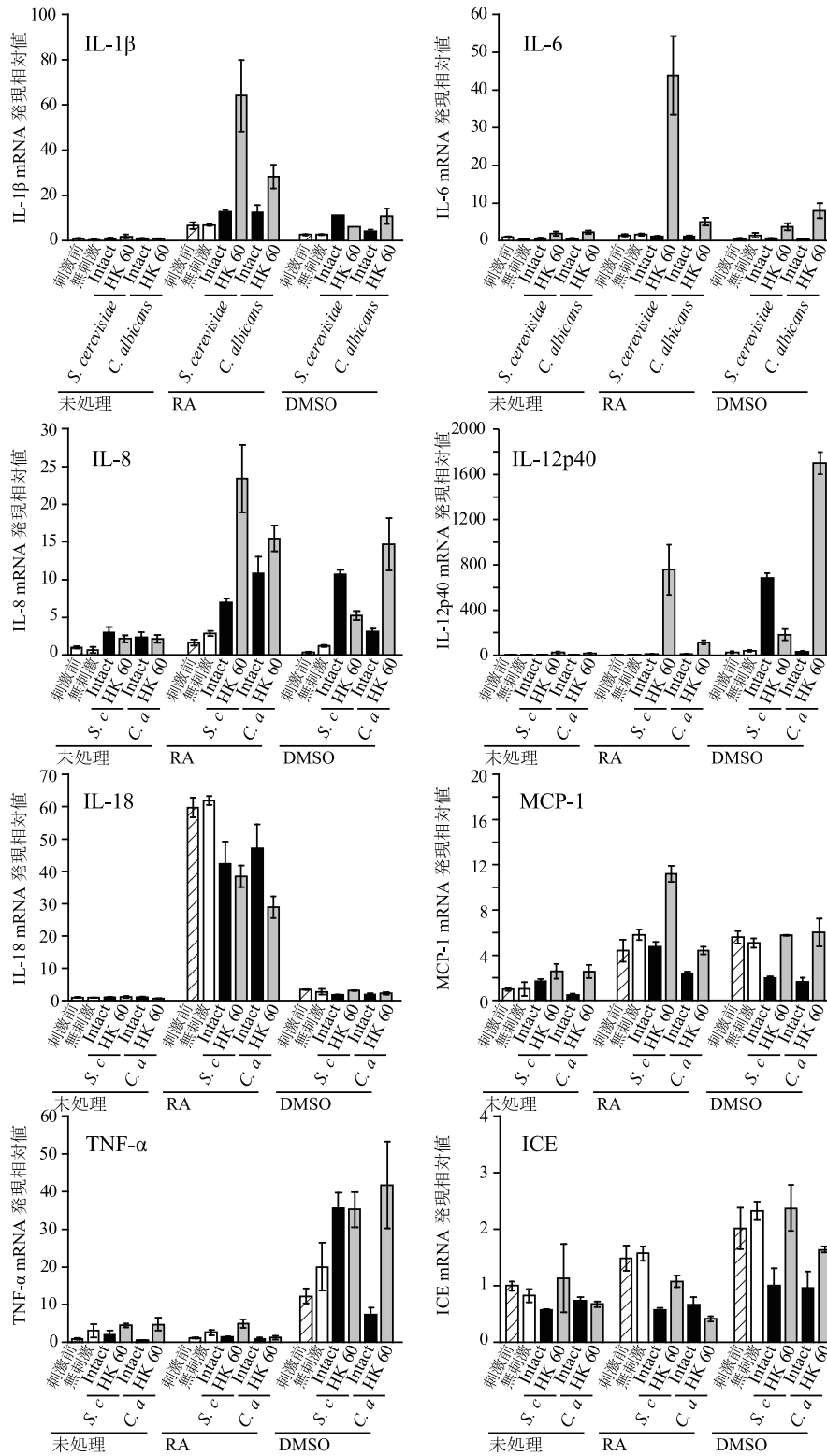


図 4-3 レチノイン酸または DMSO 添加培地で培養した HL-60 細胞を *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生菌体または加熱死菌体と共培養した際のサイトカイン mRNA 発現量の変化  
 HL-60 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  個) を、 $1 \mu\text{M}$  レチノイン酸 (RA) または 1.25% DMSO 添加 RPMI1640 培地 1 mL で 6 日間培養した後、*S. cerevisiae* または *C. albicans* 生菌体 (intact) ( $1.0 \times 10^7$  CFU), およびそれぞれを  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱した加熱死菌体 (HK 60) と 7 時間共培養を行った。値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)。

クスに利用されたりしている。これまでに、*S. cerevisiae* や、*S. cerevisiae* と同一種と考えられている *S. boulardii* の摂取が生体に有用な作用をもたらすと報告されている。例えば、*S. cerevisiae* 経口投与が、牛の乳量改善や子豚の発育促進に作用したり (Galvão et al., 2005; van Heugten et al., 2003)、*S. boulardii* がヒトの下痢症の治療に用いられたりしている (Surawicz et al., 1989; Zanello et al., 2009)。また、*S. cerevisiae* の細胞壁成分である  $\beta$ -グルカンの経口投与が、家畜の発育や免疫機能の改善に有効であるという報告が存在する (Eicher et al., 2006; Li et al., 2006; Tsukada et al., 2003)。しかしながら、まれに、*S. cerevisiae* 感染症が免疫不全患者などで発生することもあり (Muñoz et al., 2005)、*S. cerevisiae* 生菌体やその成分を機能性食品として大量に摂取する場合には、注意が必要である。

本章において、酵母刺激により HL-60 細胞が分泌したサイトカインは、生体内で適切にその分泌が制御されない場合には炎症性疾患などを引き起こすもの (Brown and Mayer, 2007)、一方でこれらの物質の産生は、感染から宿主を守るのに重要な役割を担う必須な応答である。また、*S. cerevisiae* の経口摂取は、炎症性疾患を起こすことなく、生体に有用な作用を及ぼすことも知られている (Galvão et al., 2005; Surawicz et al., 1989; van Heugten et al., 2003; Zanello et al., 2009)。これらのことから、健全な宿主にとって適量の *S. cerevisiae* 菌体や菌体成分の摂取は、免疫機能を刺激するものの、通常は、速やかに排除され炎症性疾患や免疫不全を起こすほどの過度のサイトカイン産生を促さないと考えられる。*S. cerevisiae* やその菌体成分・分泌物を機能性食品として有効に活用するために、適切な用量の検討と摂取が重要となる。

本章において、*S. cerevisiae* による好中球様 HL-60 細胞からのサイトカイン産生促進活性は、生菌体と加熱死菌体 (60°C または 100°C で 30 分間処理) それぞれで様式と強度が異なっており、HL-60 細胞からの IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 および TNF- $\alpha$  産生を、生菌体よりも死菌体のほうがより強く誘導した。この原因として、酵母が加熱により死滅した際に、菌体表面物質の構成や構造とその露出程度の変化や、酵母細胞からの分泌物の消失が起こり、HL-60 細胞による酵母細胞の認識・貪食とそれに続くサイトカイン産生経路に与える作用に変化が生じたことが考えられる。あるいは、死菌体のほうが貪食と分解が容易に進行することなどが考えられる。

酵母の細胞壁を構成し、免疫賦活性物質として知られている  $\beta$ -グルカンは、酵母生菌体の表層では出芽痕のみに存在が認められるが、90°C、20 分間の加熱により、細胞表層全面に現れるとされている (Gantner et al., 2005)。本章でも、加熱処理条件が若干異なるものの、同様に酵

母細胞表層の構成成分に変化が生じていたと予想され、このことが生菌体と死菌体によるサイトカイン産生活性の差を生じさせた一因と考えられる。さらに、酵母加熱死菌体では、酵母からのプロテアーゼなどの液性因子の分泌が消失し、HL-60 細胞の構成成分やサイトカインなどの分泌物に対する分解も減少したり、HL-60 細胞上のプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptors : PARs) を介した応答が変化したりする可能性もあり、これらも生菌体と死菌体によるサイトカイン産生活性の差を生じさせた一因となっているのかもしれない。

好中球様 HL-60 細胞に関する解析を行った第4章では、第2章や第3章の腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いた解析とは異なり、*S. cerevisiae* 生菌体のほうが、*C. albicans* 生菌体より、サイトカイン産生応答誘導活性が高かった。この現象は、体内に侵入した場合に *S. cerevisiae* 生菌体のほうが、速やかに貪食され、分解・排除されることを示唆している可能性がある。*S. cerevisiae* は、今回研究で使用した菌株を含め、一般に菌糸形になることはなく、酵母形で増殖するために、宿主細胞に貪食されやすく、免疫応答も *C. albicans* に比べ速やかに行われると考えられる。

この HL-60 細胞で観察された現象は、*C. albicans* の形態的变化や産生する病原性因子などに由来する HL-60 細胞に対する細胞傷害性に起因しているとも考えられる。今回の 37°C で 10% FBS を含む培地 (pH 7.4) 中での培養は、*C. albicans* の偽菌糸および菌糸形成に適した条件である。*C. albicans* の菌糸形成は、病原性の発現において重要な役割を担っており、Cph1, Efg1, Rim101, Flo8 などさまざまな転写因子によって制御されている

(Biswas et al., 2007; Cao et al., 2006; El Barkani et al., 2000; Nantel et al., 2002)。これらの転写因子は、血清成分やその他の栄養成分、pH、温度などにより制御されている。*C. albicans* は発芽管を形成して菌糸形になることにより、宿主の貪食作用から逃れたり、宿主細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告されている (Gantner et al., 2005; Lavigne et al., 2006; Mullick et al., 2004; Rotstein et al., 2000)。また、菌糸形の *C. albicans* は酵母形に比べて、抗炎症サイトカイン IL-10 の産生活性は強く、炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  の産生活性は弱いことで、宿主の免疫応答から逃れる戦略をとっているとされる (van der Graaf et al., 2005)。さらに、*C. albicans* の菌糸形では、 $\beta$ -グルカンの露出量が減り、マクロファージの Dectin-1 を刺激しないことで、マクロファージによる免疫応答や貪食作用を引き起こさないとされている (Gantner et al., 2005)。実際の腸管においても、同様に *C. albicans* の形態変化が起こり、生体の免疫応答を回避することで、宿主に重篤な感染症状を示すのであろう。また、酵母形 *C. albicans* に対して

は Th17/Th2 応答が起こり、菌糸形に対しては Th1/Treg 応答が起こると報告がある (Bonifazi et al., 2009)。 *C. albicans* が分泌するプロテアーゼも生育ステージにより異なり (Chen et al., 2002)、宿主細胞のプロテアーゼ活性化受容体 (PARs) を介して異なる免疫応答を誘導すると考えられる (Moretti et al., 2008)。

以上のような現象を含め、好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン産生に対する酵母の処理方法や菌体濃度の影響を検討した本章の結果は、有用酵母をプロバイオティクスとして利用するときの有効性と安全性を確保するために重要であり、また真菌症の治療法開発においても、貴重な情報となるであろう。

本章で用いたレチノイン酸と DMSO は、両物質とも HL-60 細胞を好中球様に分化させることが知られているが (Breitman et al., 1980; Collins et al., 1978)、1  $\mu$ M レチノイン酸含有培地と、1.25% DMSO 含有培地での前培養とで、その後の HL-60 細胞のサイトカイン産生に異なる影響を及ぼした。レチノイン酸含有培地で培養した HL-60 細胞では、酵母による刺激が無い状態でも、非含有培地で培養した HL-60 細胞に比べて、IL-1 $\beta$  と MCP-1 産生量が増加したが、DMSO ではその増加はみられなかった (図 4-1)。各物質の mRNA の発現量は、レチノイン酸含有培地で培養した HL-60 細胞では、IL-1 $\beta$  と MCP-1、IL-18 mRNA 発現量が増加し、DMSO 添加培地の場合には MCP-1 と TNF- $\alpha$  mRNA 発現量の増加がみられた (図 4-3)。さらに、酵母刺激による HL-60 細胞からのサイトカイン産生量にも、レチノイン酸・DMSO 間で差がみられ、レチノイン酸添加培地で培養した HL-60 細胞のほうが、DMSO 添加培地で培養した HL-60 細胞よりも、酵母に対するサイトカイン産生量は強い傾向がみられた (図 4-1)。HL-60 細胞のヒト好中球様細胞への分化を促すとされているレチノイン酸と DMSO であるが、細胞のサイトカイン産生能への影響が異なることがわかった。HL-60 細胞を用いた好中球に関する実験には、通常レチノイン酸または DMSO のどちらかを使うことが多く、両者を比較した報告はほとんどない。本章で明らかとなったレチノイン酸と DMSO の差は、今後の HL-60 細胞を用いた研究に有用な情報となるであろう。

#### 4.5 小括

第 4 章では、第 2 章および第 3 章の解析結果を受け、IL-8 で動員される好中球の酵母に対する応答を新たに明らかにする目的で、*S. cerevisiae* および *C. albicans* に対するヒト好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン応答を検討した。

その結果、*S. cerevisiae* 生菌体および加熱死菌体は、1  $\mu$ M レチノイン酸で前培養した HL-60 細胞からの IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、MCP-1、TNF- $\alpha$  分泌を促進した。一方、*C. albicans* 加熱死菌体は IL-6、IL-8、IL-12、MCP-1 および TNF- $\alpha$  の分泌を促進したが、その生菌体は IL-1 $\beta$ 、IL-8 および IL-18 の分泌をわずかに促進したのみであった。また、これらの 1  $\mu$ M レチノイン酸で分化誘導した HL-60 細胞のサイトカイン応答は、1.25% DMSO 処理の HL-60 細胞の応答より強い傾向を示した。

*S. cerevisiae* に応答して好中球様 HL-60 細胞から分泌された様々なサイトカインの種類を考慮すると、生体内では酵母細胞成分による刺激に対し、好中球自身のほか、マクロファージ、NK 細胞、T 細胞の走化性の活性化、サイトカイン産生調節、細胞分化等に影響が及ぶと予想される。

### 第 5 章 ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞または好中球様 HL-60 細胞と酵母を共培養した際の酵母菌体成分認識受容体の遺伝子発現変化

#### 5.1 序

微生物に対する宿主細胞の自然免疫応答の惹起には、宿主細胞に発現している Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) などのパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor : PRR) が関与すると考えられている (図 1-4)。TLR は、哺乳類や魚類、鳥類などでその発現が認められ、ヒトでは TLR1 から TLR10 までが同定されており、それぞれ特異的に微生物分子パターン (microbe-associated molecular pattern : MAMP) を認識する。酵母の認識に関与している受容体としては、TLR2 が TLR1 または TLR6 と重合体を形成して、酵母菌体や酵母の細胞壁成分ザイモサンを (Ozinsky et al., 2000; Underhill et al., 1999)、また、TLR4 が酵母のマンナンを (Tada et al., 2002)、TLR9 が *C. albicans* を認識すると報告されている。(Miyazato et al., 2009)。さらに、TLR 以外の受容体も酵母の認識に関与しているとされ、Dectin-1、補体受容体 3 (CR3)、スカベンジャー受容体等が酵母細胞壁成分  $\beta$ -グルカンを認識し、サイトカイン産生応答が誘導されることが知られている (Brown and Gordon, 2001; Brown et al., 2003; Gantner et al., 2003; Rice et al., 2002; Ross et al., 1987)。

パターン認識受容体の発現は、生体内の組織や細胞ごとに異なることが知られている。免疫応答解析に用いられる種々のモデル細胞においても、いくつかの TLR の発現が報告されており、第 2 章および第 3 章で用いた腸管

表 5-1 PCR プライマー配列と反応条件

標的遺伝子	プライマー (5'-3')	アニーリング 温度 (°C)	伸長反応 時間 (秒)	増幅 サイズ (bp)	
GAPDH	sense	tgaacgggaagctcactgg	63	30	307
	antisense	tccaccaccctgttgctgta			
TLR1	sense	ccaaggaaaagagcaaacgtg	60	15	130
	antisense	gcagcaatatcaacaggaggaa			
TLR2	sense	tgcggaagataatgaacacc	60	15	140
	antisense	gatcccaactagacaagactg			
TLR4	sense	aattggcaggaagcaacatc	60	25	256
	antisense	ctgagttggtgaaatgcc			
TLR6	sense	aagcaaacgtgggtcttt	56	20	156
	antisense	cgactgtactattcacatcatcc			
Dectin-1	sense	tcaatgtaagaggaagggtg	52	15	127
	antisense	gcccaagctctctaaacattt			

PCR 反応は、95°Cで15分間加熱した後、94°Cで15秒間の変性反応、表中の温度で20秒間のアニーリング反応、72°Cで表中の時間の伸長反応を40サイクル繰り返した。

上皮様 Caco-2 細胞では、TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 の mRNA の発現が確認されているが (Akhtar et al., 2003; Furrie et al., 2005; Melmed et al., 2003; Sierro et al., 2001), タンパク質レベルでの発現の詳細は明らかになっておらず、酵母による刺激を受けた際の mRNA の発現の変動も明らかになっていない。一方、第4章で用いた好中球様 HL-60 細胞においては、TLR2 および TLR4 の mRNA およびタンパク質レベル発現が確認されている (Mita et al., 2001; Shuto et al., 2007)。

そこで本章では、Caco-2 細胞および HL-60 細胞における酵母細胞の認識に関与する可能性がある受容体の発現に関して、種々の培養条件や、酵母菌体による刺激が及ぼす影響を mRNA レベルで解析した。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 酵母試料

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM, 和光) より購入した *S. cerevisiae* JCM 7255<sup>T</sup> および *C. albicans* JCM 1542<sup>T</sup> を、YM broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) にて、30°C, 3日間培養した後、1000×g, 4°C で10分間遠心分離し、沈渣をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で2回洗浄し、必要な濃度に PBS で懸濁した。酵母菌数はポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学, 東京) を用いて、平板混釈法にて測定した。

### 5.2.2 Caco-2 細胞と酵母の共培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターリソース基盤開発部細胞材料開発室 (つくば) より購入した Caco-2 細胞 (RCB0988) (Fogh et al., 1977; Kanda et al., 1998) を、1 mM L-グルタミン (和光純薬, 大阪), 10 mM HEPES (同仁, 熊本), 15% 非働化ウシ胎児血清 (FBS; PAA Laboratories, Linz, Austria) を加えた DMEM 中に懸濁し、6 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン, NJ, USA) で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。Caco-2 細胞 (6.0 × 10<sup>5</sup> 個) を懸濁した 2.5 mL DMEM を、2.5 mL の DMEM を注加した 6 ウェルマイクロプレート内の 45-mm ミリセル HA フィルター (ミリポア, MA, USA) 上に播種し、6-7 日間培養した。その後、酪酸 (0 または 10 mM, 和光純薬, 大阪) を添加した DMEM で、4 日間培養した。培地は、フィルター上に細胞を播種後、一日おきに同一組成の新しいものと交換した。続いて、2.5 mL DMEM 中に懸濁した *S. cerevisiae* または *C. albicans* の生菌体を Caco-2 細胞の頂端面側に入れ、フィルター下部の Caco-2 細胞側底面側には、新しく同じ培地を加え、7 時間共培養を行った。

### 5.2.3 HL-60 細胞と酵母の共培養

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターリソース基盤開発部細胞材料開発室 (つくば) より購入した前骨髄球性白血病細胞 HL-60 (RCB0041) を 1 mM L-グルタミン (和光純薬, 大阪), 10 mM HEPES (同仁,



熊本), 10% FBS を加えた RPMI1640 培地 (日水製薬, 東京) で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。ヒト好中球様への分化を促すため, 24 ウェルマイクロプレート (ベクトン・ディキンソン, NJ, USA) に 1.0×10<sup>6</sup> 個ずつ播種し, 1 μM レチノイン酸または 1.25% DMSO 添加 RPMI1640 培地で 6 日間培養した。培地は一日おきに新しいものと交換した。続いて, *S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体または加熱死菌体を含む同一の培地 (1 mL) と交換し, 7 時間共培養を行った。

#### 5.2.4 TLRs および Dectin-1 mRNA 発現量の測定

酵母との共培養前および共培養後の Caco-2 細胞または HL-60 細胞から, RNeasy mini kit (キアゲン, Hilden, Germany) および DNase (キアゲン) を用いて, 全 RNA を抽出した。抽出した RNA から, Omniscript reverse transcriptase (キアゲン), oligo d(T)<sub>12-18</sub> プライマー (GEヘルスケアバイオサイエンス, NJ, USA) および RNaseOUT recombinant RNase inhibitor (インビトロジェン) を用いて, 逆転写により cDNA を合成した。cDNA から mRNA 発現量を測定するため, QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン) と, TLR および Dectin-1 特異的プライマー (日本遺伝子研究所, 仙台, 表 5-1) を用いて, ライトサイクラー330 システム (ロシュ, Mannheim, Germany) により, PCR を行った。各プライマー配列および PCR 条件を表 5-1 に示す。各サンプルの GAPDH を内部標準とした。PCR 増幅産物は, 2% アガロースゲル (Agarose L03, タカラバイオ, 大津) で電気泳動し, そのサイズと単一バンドであることを確かめた。マーカーには 100 bp DNA ladder (タカラバイオ) を用いた。

### 5.3 結果

#### 5.3.1 酪酸により分化誘導した Caco-2 細胞を酵母生菌体と共培養した際の TLRs および Dectin-1 の mRNA 発現量の変化

Caco-2 細胞における酵母菌体成分認識受容体 TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現に対し, Caco-2 細胞の分化誘導に用いた 10mM 酪酸と, *S. cerevisiae* または *C. albicans* 生菌体との共培養が及ぼす影響について検討した。その結果, 酪酸を添加せずに培養した Caco-2 細胞でも, これら受容体 mRNA の発現が認められ (図 5-1), 10 mM 酪酸添加培地で 4 日間の培養により, Caco-2 細胞の TLR2 mRNA 発現量は変化しなかったが, TLR1, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量は増加した (表 5-2)。一方, 酵母菌体との共培養が受容体に与える影響に関しては, 繰り返し 4 回行なった実験において,

10 mM 酪酸の添加の有無に関わらず, 酵母の共存による明瞭な変化の傾向は認められなかった (表 5-2)。

#### 5.3.2 レチノイン酸または DMSO により分化誘導した HL-60 細胞を酵母と共培養した際の TLRs および Dectin-1 の mRNA 発現量の変化

HL-60 細胞における酵母菌体成分認識受容体 TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現に対し, HL-60 細胞の分化誘導に用いたレチノイン酸または DMSO が及ぼす影響と, *S. cerevisiae* および *C. albicans* の生菌体または加熱処理菌体との共培養が及ぼす影響について検討した。

その結果, レチノイン酸 (1 μM) 含有培地で 6 日間前培養することにより, HL-60 細胞の TLR1, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加した (図 5-2)。一方, DMSO (1.25%) 含有培地で培養した場合には, TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量増加がみられた (図 5-2)。

酵母との 7 時間の共培養による変化に関しては, レチノイン酸または DMSO 含有培地で好中球様に分化させた HL-60 細胞を *S. cerevisiae* 加熱死菌体 (60°C) で刺激した際に, TLR2 mRNA の発現量増加がみられた (図 5-2)。また, *S. cerevisiae* および *C. albicans* 生菌体で刺激した際に, TLR1 mRNA の発現量が減少した (図 5-2)。

### 5.4 考察

Caco-2 細胞および HL-60 細胞における酵母菌体成分認識受容体の遺伝子発現について, 分化誘導剤および酵母菌体との共培養が与える影響について検討した。

Caco-2 細胞においては, 酪酸を加えずに培養した状態, これまで報告のあった TLR1, TLR2, TLR6 mRNA の発現に加え (Melmed et al., 2003), Dectin-1 mRNA の発現が新たに確認された (図 5-1 および表 5-2)。分化誘導剤である 10 mM 酪酸を添加した培地での培養時には, 酪酸無添加のときに比べ, Caco-2 細胞の TLR1, TLR6, Dectin-1 mRNA の発現量が高まるのが初めて明らかとなった。第 2 章および第 3 章で明らかにしたように, 酪酸による分化誘導に伴いサイトカイン分泌応答の亢進が観察されることから, これらの受容体の遺伝子発現の増加により受容体のタンパク質レベルでの発現も増強されて酵母菌体の認識能が高まり, それを基にさらにサイトカイン産生応答等の程度も亢進したのではないかと考えられる。

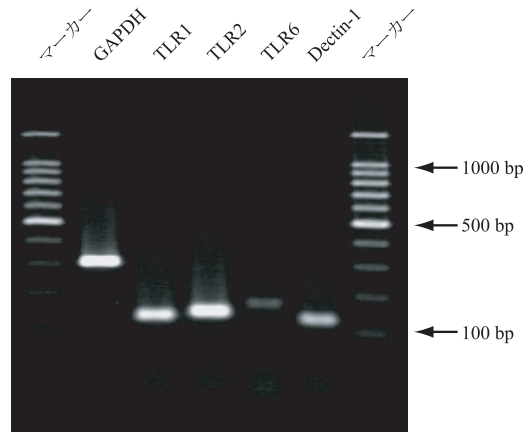


図 5-1 酪酸無添加培地で培養した Caco-2 細胞の TLR1, TLR2, TLR6, Dectin-1 および GAPDH mRNA の発現

表 5-2 酪酸および *S.cerevisiae* または *C.albicans* 生菌体との共培養による Caco-2 細胞の TLRs および Dectin-1 mRNA 発現量の変化

酪酸	酵母 (CFU)	TLR1		TLR2		TLR6		Dectin-1	
		0時間	7時間	0時間	7時間	0時間	7時間	0時間	7時間
0 mM	無刺激	1.0	1.2	1.0	1.1	1.0	2.4	1.0	0.2
0 mM	<i>S. cerevisiae</i> ( $6.0 \times 10^6$ )	-	1.4	-	0.8	-	2.8	-	0.4
0 mM	<i>C. albicans</i> ( $6.0 \times 10^6$ )	-	1.8	-	1.8	-	2.0	-	2.1
10 mM	無刺激	24	38	0.4	0.6	49	66	7.3	4.7
10 mM	<i>S. cerevisiae</i> ( $6.0 \times 10^6$ )	-	26	-	0.7	-	32	-	11
10 mM	<i>C. albicans</i> ( $6.0 \times 10^6$ )	-	14	-	0.3	-	22	-	15

Caco-2 細胞 ( $6.0 \times 10^5$  個) をミリセル-HA フィルター上に播種し、酪酸無添加培地で 6-7 日間培養した後、10 mM 酪酸添加・無添加培地 (フィルター上下に各 2.5 mL) 中で 4 日間培養し、その後、酵母生菌体と 7 時間共培養した。

表中の値は、それぞれの実験区における Caco-2 細胞の GAPDH を内部標準として各受容体の発現量を算出し、さらに酪酸を添加しなかった培地中で培養した Caco-2 細胞の酵母刺激前 (0 時間) での値を基準 (1.0) とした際の相対値を示す (繰り返し 4 回の実験の代表的結果を記載)。

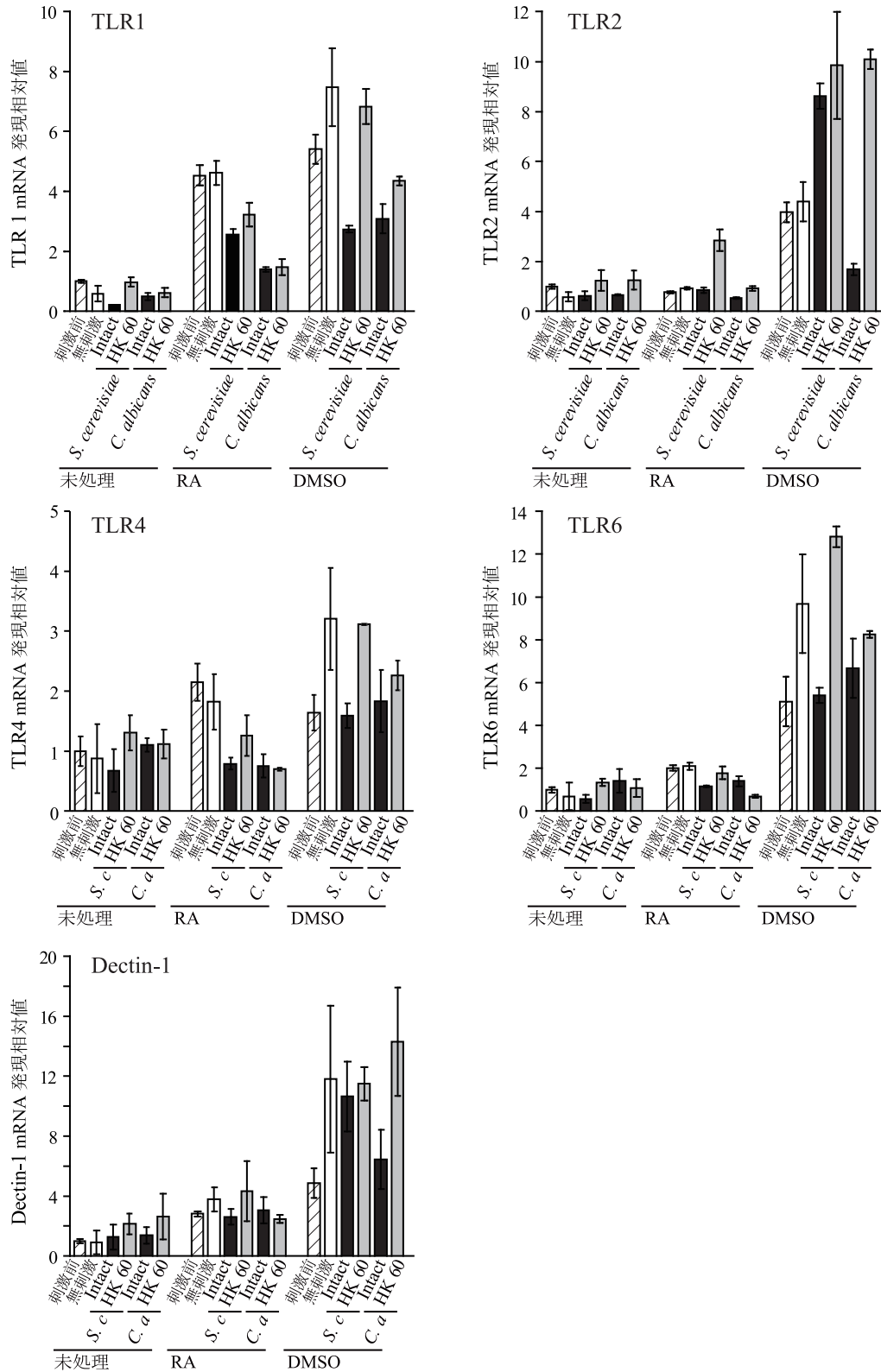


図 5-2 レチノイン酸または DMSO 添加培地で培養した HL-60 細胞を *S.cerevisiae* および *C.albicans* の生菌体または加熱死菌体と共培養した際の TLRs および Dectin-1 mRNA 発現量の変化

HL-60 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  個) を、 $1 \mu\text{M}$  レチノイン酸 (RA) または 1.25% DMSO 添加 RPMI1640 培地 1 mL で 6 日間培養した後、*S. cerevisiae* または *C. albicans* 生菌体 (intact) ( $1.0 \times 10^7$  CFU)、およびそれぞれを  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱した加熱死菌体 (HK 60) と 7 時間共培養を行った。値は、それぞれの実験区における HL-60 細胞の GAPDH を内部標準として各受容体の発現量を算出し、さらにレチノイン酸 (RA) と DMSO をともに添加しなかった培地中で培養した HL-60 細胞 (未処理) の酵母刺激前での値を基準 (1.0) とした際の相対値を示す。値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)。

HL-60 細胞においては、分化誘導剤であるレチノイン酸またはDMSOの添加の有無に関わらず、TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, Dectin-1 の mRNA 発現が認められた。レチノイン酸添加時には、分化誘導剤無添加時と比較して、TLR1, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加すること、また、DMSO 添加時には TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加することが明らかとなった (図 5-2)。これまで好中球様分化を同様に促すといわれていたレチノイン酸と DMSO であったが、本研究により、それぞれの物質が HL-60 細胞の受容体 mRNA 発現量の変化に異なる影響を及ぼすことが明らかになった。レチノイン酸添加培地で培養した HL-60 細胞では、酵母菌体の認識に重要といわれている TLR2 mRNA の発現量の増加はみられなかったものの、TLR2 と重合体を形成する TLR1 や TLR6, また TLR2 と協働的に作用する Dectin-1 の mRNA 発現量の増加がみられており、これに伴い実際の受容体の発現も増加することが考えられ、これにより酵母に対する感受性・応答性が上昇して、第4章で明らかにしたようにタンパク質レベルでのサイトカイン分泌が促進された可能性がある。

一方、酵母菌体による刺激が受容体の発現量に与える影響に関しては、10 mM 酪酸添加培地で培養した腸管上皮様 Caco-2 細胞においては、*S. cerevisiae* 生菌体刺激による顕著な受容体 mRNA 発現量の変化は認められなかった (表 5-2)。

レチノイン酸または DMSO で前培養した好中球様 HL-60 細胞においては、*S. cerevisiae* 加熱死菌体による刺激により、それぞれの物質で前培養した酵母刺激の無い HL-60 細胞と比べて TLR2 mRNA の発現量が増加し、*S. cerevisiae* および *C. albicans* 生菌体刺激により、TLR1 mRNA 発現量は減少した (図 5-2)。

他の報告では、マウスを用いた実験において、*Saccharomyces boulardii* 経口投与が正常結腸の TLR2 mRNA 発現量を増加させる一方で、同経口投与が他の刺激により増強された TLR2 mRNA 発現量を反対に減少させるとも報告されている (Jawhara and Poulain, 2007)。また、別の報告では、*C. albicans* が肝臓内リンパ球の TLR2 発現量を増加させたが (Renna et al., 2006)、ケラチノサイトの TLR2 発現量には変化を起さなかった (Pivarcsi et al., 2003)。TLR の mRNA 発現量は、細菌成分であるリポポリサッカライド (LPS) や、生体側の細胞が産生するサイトカイン等の刺激によっても変化し、細胞の種類によっても異なる調節を受けるとされている (An et al., 2002; Faure et al., 2001; Kurt-Jones et al., 2002; Muzio et al., 2000; Zarembek and Godowski, 2002)。本章において、好中球様 HL-60 細胞において酵母菌体刺激により誘導された

受容体遺伝子発現の変化は、生菌体と死菌体および *S. cerevisiae* と *C. albicans* とで異なった。これらの変化の差異は、それぞれの菌体の構成成分や分泌物の種類や量による刺激の差異が関連しているのであろう。またその差異に基づく HL-60 細胞からの異なるサイトカイン分泌等により、制御を受けた可能性も考えられる。

## 5.5 小括

本章では、腸管上皮様 Caco-2 細胞および好中球様 HL-60 細胞における酵母認識受容体の遺伝子発現に対して、それぞれの細胞の分化誘導剤および酵母菌体との共培養が与える影響について検討した。

Caco-2 細胞では、10 mM 酪酸添加培地で4日間の培養により、TLR1, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量が増加することが明らかになった。一方、酵母菌体との共培養は、培地への酪酸の添加の有無に関わらず、明瞭な変化を誘導しなかった。

HL-60 細胞では、分化誘導剤による差が認められ、1  $\mu$ M レチノイン酸含有培地で6日間前培養することにより、TLR1, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加し、1.25% DMSO 含有培地で前培養した場合には、TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量増加がみられた。また、レチノイン酸と DMSO 間には、受容体 TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量の程度に差がみられた。酵母による影響については、レチノイン酸処理または DMSO 処理を行った HL-60 細胞両方において、*S. cerevisiae* 加熱死菌体との共培養により TLR2 mRNA 発現量が増加した。

これらの受容体遺伝子発現の変化に伴い、Caco-2 細胞および HL-60 細胞の酵母認識の程度と、それに続くサイトカイン産生や貪食・分解等の応答が変化した可能性がある。

## 第6章 総合考察

本研究では、古くから発酵醸造食品の製造に用いられ、現在では機能性食品や家畜の飼料としても利用されている酵母が、腸管においてどのような初期自然免疫応答を誘導するかを解明する目的で、*Saccharomyces cerevisiae* を中心に、腸管上皮細胞と好中球細胞に対する免疫応答誘導作用をそれぞれのモデル細胞を用いて *in vitro* で解析した。また、健康人の腸管内に常在する酵母についても、*Candida albicans* を中心に同様に検討を行った。

第2章から第5章に示す結果より、腸管に存在する酵母は、腸管上皮細胞からの IL-8 産生分泌を誘導すること、

さらに IL-8 によって動員される好中球に対しては、*S. cerevisiae* と *C. albicans* が様々なサイトカインの分泌を異なる様式で誘導する可能性が示唆された (図 6-1)。

第 2 章、第 3 章においては、腸管上皮様 Caco-2 細胞の応答を解析した。種々の酵母が Caco-2 細胞からの IL-8 産生を促進したことから、各酵母の菌体成分・代謝産物は、腸管上皮細胞からの IL-8 産生誘導活性を基礎的に有していること、本活性には全菌株に共通の成分が関与していることが考えられる。しかし実際の生体内では、菌種間で、腸管における増殖能力や生存率、接着性、侵入・移行性等に差があり、それらのさまざまな特徴が複合的に作用して、免疫応答の誘導活性に差が生じる可能性がある。

酵母の刺激を受けた Caco-2 細胞より分泌が促進された IL-8 は、好中球や単球、NK 細胞、T 細胞の走化を誘導する。これらの細胞には、IL-8 をリガンドとする受容体 CXCR1 および CXCR2 が発現している (Bruhl et al., 2001; Lee et al., 1992; Robertson, 2002)。IL-8 は、CXC ケモカインの一種として知られており、刺激を受けたそれらの細胞で、さらに他のサイトカイン産生を調節する機能を有している (Burke et al., 2008; Campbell et al., 2001; Gerszten et al., 1999; Gesser et al., 1996; Godaly et al., 1997)。

生体内局所での IL-8 の産生および誘導される好中球の集積は、炎症の指標ともなっているが、IL-8 の分泌は、生体の異物排除に向けた初期免疫応答において、なくてはならない重要な役割を担っている。また、病原性細菌のみならず、腸管常在細菌やプロバイオティクスとして使用される細菌株が IL-8 産生を促進することも報告されており、IL-8 産生が必ずしも炎症性疾患につながるとは考えにくい。*S. cerevisiae* の場合にも、健常人が経口摂取した際に炎症疾患を起こすという報告はないことから、適度な *S. cerevisiae* の摂取は疾患を起こさないレベル以下で IL-8 産生を誘導すると考えられる。したがって、通常、疾病が発生していない生体内では、このような IL-8 の産生応答は調節・制御され可逆的にバランスがとれる状態になっており、強い炎症を永続的に生じさせることはないと思われ。

上皮細胞の分化を促すとされる酪酸は、ヒトの腸管内にも存在する微生物の代謝産物であり、Caco-2 細胞に対しては、細胞周期やアルカリフォスファターゼ活性、細胞移行、サイトカイン産生、経上皮電気抵抗値等に影響を与えることが報告されている (Fusunyan et al., 1999; Fusunyan et al., 1998; Harrison et al., 1999; Huang et al., 1997; Mariadason et al., 2001; Wu et al., 1999)。第 5 章では、腸管上皮細胞のモデル細胞である Caco-2 細胞を用いて、培地への酪酸添加が、TLR1, TLR6, Dectin-1 の mRNA

発現を増強することを明らかにした。このことが、第 2 章および第 3 章において示した、酪酸添加培地で培養した Caco-2 細胞でのみ、酵母刺激による IL-8 産生の増加がみられる現象の一因であると考えられる。また、腸管酪酸濃度が低い患者において、*Saccharomyces boulardii* の摂取が酪酸濃度を上げるという報告もある (Schneider et al., 2005)。これらのことから、摂取した酵母が腸管において酪酸濃度を調節する働きを示す一方で、反対にその酪酸によって酵母に対する腸管上皮細胞の免疫応答も調節されているという、生体における酵母と酪酸の密接な相互作用の存在も示唆された。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章の Caco-2 細胞から IL-8 が分泌されるという解析結果を受け、IL-8 で動員される好中球の酵母に対する応答を検討した。その結果、*S. cerevisiae* 生菌体および加熱死菌体は、1  $\mu$ M レチノイン酸で前培養した好中球様 HL-60 細胞からの IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1, TNF- $\alpha$  分泌を促進することが明らかとなった。一方、*C. albicans* 加熱死菌体は IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 および TNF- $\alpha$  の分泌を促進したが、*C. albicans* 生菌体は IL-1 $\beta$ , IL-8 および IL-18 の分泌をわずかに促進したのみであった。好中球様 HL-60 細胞から、*S. cerevisiae* に応答して分泌された様々なサイトカインの種類を考慮すると、好中球自身のほか、マクロファージ、NK 細胞、T 細胞の走化性の活性化、サイトカイン産生調節、細胞分化等に影響を及ぼすと予想される (図 6-1)。

*S. cerevisiae* の加熱死菌体は、生菌体と比較して、好中球様 HL-60 細胞からのサイトカイン (IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, TNF- $\alpha$ ) 産生誘導能が高く、また同時に、HL-60 細胞の酵母菌体の認識に重要な役割を担う受容体 TLR2 の mRNA 発現量を増加させた。この *S. cerevisiae* の加熱死菌体による TLR2 mRNA の増加は、生菌体よりも加熱死菌体のほうが高いサイトカイン産生誘導能を示す一因になっていると考えられる。また、細胞外に存在するサイトカインには TLR の発現を制御する働きがあり、例えば TNF- $\alpha$  には、毛細血管内皮細胞の TLR2 mRNA 発現を促進する作用があるという報告がある (Faure et al., 2001)。このことから、*S. cerevisiae* の加熱死菌体によって誘導された HL-60 細胞からの TNF- $\alpha$  産生を含むサイトカイン分泌の変化が TLR2 mRNA 発現量の増加をもたらしたとも考えられる。

第 4 章の好中球様 HL-60 細胞の酵母に対する応答は、第 2 章、第 3 章にて解析した腸管上皮様 Caco-2 細胞の場合と異なっていた。HL-60 細胞は、*C. albicans* 生菌体よりも *S. cerevisiae* 生菌体に対してより強いサイトカイン応答を示すとともに、より多くの種類のサイトカインを

産生した。この現象は、*S. cerevisiae* よりも強いと考えられている *C. albicans* の病原性と負の相関があるようにもみえ、*C. albicans* が有する免疫抑制・回避作用や、高い細胞傷害性に関連していると考えられる。生体内において、*C. albicans* 生菌体は腸管上皮細胞からの IL-8 産生を活性化するものの、それによって動員される好中球に対しては、サイトカイン産生をあまり誘導しないことで、他のさまざまな免疫担当細胞の応答誘起を減少させて自らの生残性を高める。そして、貪食・分解・除去から免れて常在菌となると同時に、ときとして全身へ広がり、強い病原性を示すのではないだろうか。一方、*S. cerevisiae* 生菌体の場合、腸管上皮細胞による IL-8 産生応答は *C. albicans* の場合より弱い、体内に侵入した際には動員された好中球による貪食・分解とサイトカイン応答が速やかに行われ、過剰な菌の増殖とそれによる過剰なサイトカイン応答が起こらないうちに、反応が収束するのであろう。

最近の報告で、*S. cerevisiae* と同一種と分類されている

*S. boulardii* の菌体成分は、*C. albicans* によって IL-8 産生が亢進されている Caco-2 細胞に対しては、逆に IL-8 の産生を抑制することが明らかになった (Murzyn et al., 2010)。また、酵母をマウスに摂取させた実験でも、健康なマウスに *S. boulardii* を摂取させると、大腸組織における TNF- $\alpha$  や TLR2 の mRNA 発現の増加がみられるが、反対にデキストラン硫酸 (DSS) による大腸炎モデルで TNF- $\alpha$  や TLR2 の mRNA 発現が亢進している場合には、これらの発現を抑制する作用があると報告されている (Jawhara and Poulain, 2007)。本研究において、*S. cerevisiae* は腸管上皮様 Caco-2 細胞からの IL-8 産生と、好中球様 HL-60 細胞からの IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1, TNF- $\alpha$  の産生を促したが、この応答は、健常細胞における基盤的な応答を解析したものであるといえる。したがって、*S. cerevisiae* の摂取は、生体内においてこれらのサイトカインの産生を促進すると考えられるが、過剰な産生を促進・継続させることはなく、調節機能を有している可能性が高い。

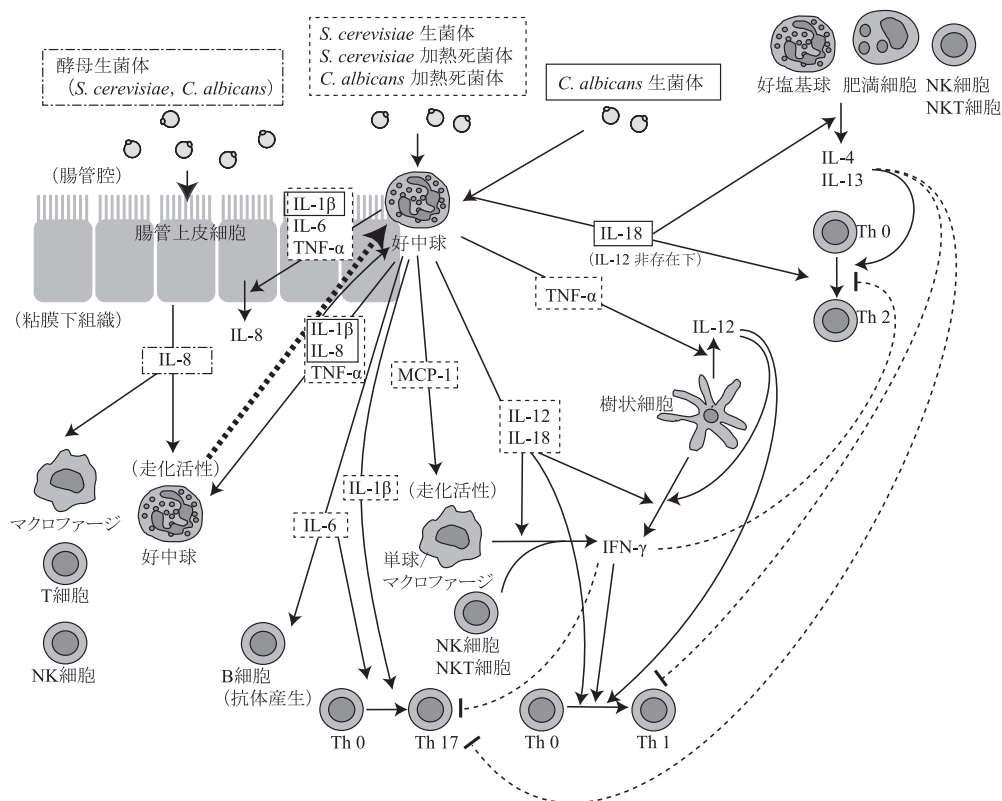


図 6-1 酵母による腸管上皮細胞および好中球からのサイトカイン産生誘導

このような応答に関連して、近年、自然炎症 *homeostatic inflammation* という概念が登場しており、微生物に対する受容体が、自己の内因性リガンドも認識し、炎症反応が誘導され、健常時には、生体の恒常性維持に働いていると考えられている (Fukui et al., 2009; Maru, 2010)。酵母によって誘導されるであろう腸管上皮細胞や好中球からのサイトカイン産生も、健常時の腸管における恒常性維持において重要な役割を担っているとも考えられる。

本研究では、研究例の多い乳酸菌等の細菌ではなく、酵母を研究対象に取り上げた。ある種の酵母は、プロバイオティクスとして扱われているものの、その認知度は乳酸菌に比べるとまだ低く、その効果についても研究例は少ない。腸内環境や腸内菌叢は、アレルギーやアトピー、食中毒や感染症など免疫に関連する疾病以外にも、神経性疾患 (Murphy and Bloom, 2006; O'Mahony et al., 2009; Rhee et al., 2009)、肥満 (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006)、老化 (Woodmansey, 2007)、発ガン (光岡, 1995) などとの関連が示唆されている。これらの疾患に対し、本研究で取り上げた食品製造に用いられる酵母をはじめとする微生物のプロバイオティクスおよびプレバイオティクスの投与による予防・改善効果は大いに期待できるのではなかろうか。

酵母は酸素存在下でも非存在下でも生育が可能であり、酸素存在下では増殖に伴い発生する活性酸素種の影響で死滅することも多い乳酸桿菌や、一般に偏性嫌気性のビフィズス菌とは性質が異なる。このことから、酵母には、現在プロバイオティクスとして多用されている乳酸桿菌やビフィズス菌などの酸素存在下では死滅しやすいという性質を補う、異なる利点もあると考えられる。実際に、発酵乳製品であるケフィア (ケフィール) では、数種類の酵母と乳酸菌が共存しており (Lopitz-Otsoa et al., 2006)、日本の漬物においても、酵母と乳酸菌が共存することで、良好な発酵が進むことが知られている (岩井ら, 1994)。これは、乳酸菌が産生し、乳酸菌自身の増殖を阻害する乳酸や活性酸素種を酵母が利用・除去することや、酵母からの滲出物が乳酸菌の栄養素となることで乳酸菌の増殖を促進すること (Cheirsilp et al., 2003a; Cheirsilp et al., 2003b; Liu and Tsao, 2009)、また、乳酸菌の増殖が死菌体を含む酵母表層のマナンなどとの接触により促進されること (Cheirsilp et al., 2003b) などが要因として考えられている。

*S. cerevisiae* 等の酵母を利用した食品に関して、免疫調節作用を謳った製品はないものの、日本ではビール酵母由来の食物繊維を利用した食品で、特定保健用食品として認められているものが存在する。また、ミネラル分やビタミン類を多く含むことから、サプリメントとして乾

燥ビール酵母が市販されている。さらに、酵母が家畜や養殖魚の飼料にも利用されるようになってきており、その効果についても研究が進行しており、家畜に *S. cerevisiae* 菌体を与えることで、成長促進や乳量の増加がみられたことが報告されている (Piva et al., 1993; van Heugten et al., 2003)。また、*S. cerevisiae* と遺伝的に近縁で、同一種ともいわれる *S. boudarlilii* がヨーロッパを中心に細菌性下痢の予防および治療に使用されたり、炎症性腸疾患 (IBD) や過敏性腸症候群 (IBS) の改善に有効であると報告されているものの (Surawicz et al., 1989; Zanello et al., 2009)、その詳細な作用機序については未解明な部分が多い。さらに、免疫との関連では、現在、日本で死因第1位となっている悪性新生物、いわゆるガンについても、*S. cerevisiae* 死菌体や $\beta$ -グルカンによる免疫賦活化を介したガン細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導などが報告されているが、臨床的に実用化できるほどのデータはそろっていない (Chan et al., 2009; Ghoneum and Gollapudi, 2004)。

本研究では、酵母とヒトの腸管免疫機能との関係を、腸管上皮細胞と好中球のモデル細胞を用いて解析することで、生体内におけるそれぞれの細胞に対する酵母の影響について、その機序を詳細に解明することに成功した。これまでの食経験に基づく酵母摂取の生体への効果と、本研究での成果を複合的に考えることで、酵母の生菌体や加熱死菌体、菌体成分等を利用した安全で効果的な機能性食品や動物用飼料の開発がますます進むことを期待する。

## 要旨

酵母は、主に単細胞の形態で増殖する真核生物で、地球上の広範な場所に生存している。酵母のいくつかの菌種は、発酵食品の製造、サプリメントや機能性食品、飼料等に用いられており、代表的な *Saccharomyces cerevisiae* は、日本酒やワインの醸造、パンの発酵などに用いられる。また、生物の皮膚や呼吸器官、消化器官に常在する酵母も存在し、腸管常在性の *Candida albicans* は、宿主の免疫機能が低下・破綻したときに病原性を示す。

腸管には、酵母や細菌を含む数多くのさまざまな微生物が常在し、さらに、食物等と共に外部から摂り込んだ微生物も、通常は一時的ではあるものの腸管内に存在することとなる。宿主は、腸管内の微生物に対し、腸管上皮細胞や、近傍に存在する好中球やマクロファージ、樹状細胞、T細胞やB細胞などから構成される複雑な免疫系を制御して、サイトカイン産生等の免疫応答を示し、微生物の排除を行うとともに宿主の恒常性を維持してい

る。その応答誘導には、宿主細胞に発現されているパターン認識受容体などを介した微生物の認識が関与しており、酵母を認識する受容体としては、Toll様受容体 (Toll-like receptor : TLR) 1, TLR2, TLR6, および Dectin-1 などが挙げられる。

近年、腸内環境を整え、生体に有益な作用を及ぼす生きた微生物やそれらを含む食品であるプロバイオティクスが脚光を浴びている。特に、発酵乳製品に用いられる *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属などの細菌に関する研究が進んでおり、腸内細菌叢の改善、免疫機能への作用を介したアレルギーやアトピー、感染症の予防・改善などの効果が報告されている。しかしながら、酵母に関する報告は少ない。

そこで、本研究では、酵母を機能性食品やサプリメントの素材、プロバイオティクスとして利用することを考慮し、その摂取の安全性や機能を明らかにする目的で、酵母細胞が腸管においてどのような初期自然免疫応答を誘導するかを解明を試みた。方法として、*S. cerevisiae* と *C. albicans* 等に対し、腸管の最表層で腸管内の物質と数多く接触する腸管上皮細胞と、応答の初期段階に菌体排除で重要な役割を担う好中球が示す応答を解析することとし、各細胞のモデルであるヒト由来 Caco-2 細胞と HL-60 細胞を用いて行った。

#### Saccharomyces cerevisiae および Candida albicans に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の各種サイトカイン産生応答

*S. cerevisiae* および *C. albicans* に対して、Caco-2 細胞がどのようなサイトカイン応答を示すかを検討する目的で、酪酸およびウシ胎児血清 (FBS) 添加または無添加培地を用いて培養した Caco-2 細胞と各酵母との共培養時の IL-6, IL-8, IL-18, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF), 単球走化性因子 (MCP) -1, 幹細胞因子 (SCF), 腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$ , トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, および TGF- $\beta$ 3 mRNA の発現量と細胞外への分泌, およびアラキドン酸カスケード関連酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) -1, COX-2 の mRNA 発現量と分泌量の変化を解析した。酪酸は腸内細菌の代謝産物であり、Caco-2 細胞や腸管上皮細胞の分化を促す。

解析の結果、15% FBS 含有 DMEM 培地で培養した Caco-2 細胞は、10 mM 酪酸を加えた4日間の前培養により、酪酸無添加時と比較して、IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, SCF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$ , COX-1, 及び COX-2 の mRNA 発現量が増加したが、GM-CSF と TGF- $\beta$ 2 mRNA 発現量には変化がみられなかった。タンパク質レベルで

は、IL-8 分泌促進が ELISA により確認された。また、10 mM 酪酸添加培地で前培養した Caco-2 細胞をさらに *S. cerevisiae* 及び *C. albicans* 生菌体と共培養したところ、IL-6, IL-8, MCP-1, SCF, TNF- $\alpha$  のうち、IL-8 の mRNA 発現と分泌のみがさらに促進された。FBS 非含有培地で培養した Caco-2 細胞では、酪酸による上記の mRNA 発現量の増加はみられたものの、酵母刺激による Caco-2 細胞からのさらなる応答変化はみられなかった。

#### 種々の酵母および菌体成分に対するヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞の応答

*S. cerevisiae* と *C. albicans*, および *S. cerevisiae* 由来細胞壁粗画分のザイモサン, 細胞壁構成成分のグルカンおよびマンナンに対して、Caco-2 細胞 (10 mM 酪酸および15%含有 DMEM 培地にて培養) がどのような応答を示すかを検討した。

Caco-2 細胞からの IL-8 分泌量は、菌体濃度依存的に、*S. cerevisiae* あるいは *C. albicans* 生菌体との共培養により増加した。*S. cerevisiae* による IL-8 産生の増強の程度は、*C. albicans* によるものより小さく、同時に測定した Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗 (TER) 値の減少も、*S. cerevisiae* のほうが緩慢であった。また、マンナンを除くザイモサンとグルカンが同様に IL-8 の分泌を濃度依存的に促進した。種々の酵母、*Candida kefyr*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* は、いずれも Caco-2 細胞からの IL-8 分泌を促進した。

以上の結果から、実際の腸管において、管腔内の酵母は腸管上皮細胞を刺激して IL-8 産生を増強し、さらに広範な腸管免疫機能への作用を及ぼす可能性があると考えられる。

#### Saccharomyces cerevisiae および Candida albicans に対するヒト好中球様 HL-60 細胞のサイトカイン産生応答

腸管において、上皮細胞から産生される IL-8 は好中球を動員する。好中球は、酵母を含む微生物の貪食・分解・除去に重要な役割を果たす細胞である。好中球の酵母に対するサイトカイン応答を検討する目的で、1  $\mu$ M レチノイン酸または1.25% DMSOで分化誘導したヒト好中球様 HL-60 細胞と、*S. cerevisiae* または *C. albicans* を共培養し、HL-60 細胞のサイトカイン応答を検討した。その結果、*S. cerevisiae* 生菌体および加熱死菌体による刺激は、レチノイン酸で処理した好中球様 HL-60 細胞からの IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1, TNF- $\alpha$  の分泌および遺伝子発現を促進した。一方、*C. albicans* 生菌体は IL-1 $\beta$ ,



IL-8, IL-18 の分泌のみを促進したが, その活性は *S. cerevisiae* よりも弱かった。*C. albicans* 加熱死菌体は, IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, TNF- $\alpha$  の分泌を促進した。

これらの結果から, *S. cerevisiae* は, 好中球のサイトカイン産生応答を *C. albicans* とは異なる様式で誘導して, 生体の免疫系に作用することが示唆された。

#### ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞または好中球様 HL-60 細胞と酵母を共培養した際の酵母菌体成分認識受容体の遺伝子発現変化

腸管上皮様 Caco-2 細胞および好中球様 HL-60 細胞における酵母認識受容体の遺伝子発現に対して, それぞれの細胞の種々の培養条件および酵母菌体による刺激が与える影響について mRNA レベルで検討した。

酵母菌体による刺激を行わない状態には, Caco-2 細胞では, 10 mM 酪酸添加培地での 4 日間の培養により, TLR1, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量が増加した。また, HL-60 細胞においては, 1  $\mu$ M レチノイン酸含有培地で 6 日間前培養することにより, TLR1, TLR4, TLR6 および Dectin-1 の mRNA 発現量が増加し, 1.25% DMSO 含有培地で培養した場合には, TLR1, TLR2, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量が増加した。さらにレチノイン酸と DMSO 間では, 受容体 TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 および Dectin-1 mRNA の発現量に差がみられた。

酵母細胞と各ヒト細胞の共培養時には, Caco-2 細胞については, 酵母細胞共存による明瞭な変化は認められなかった。HL-60 細胞については, レチノイン酸または DMSO で処理した HL-60 細胞で, *S. cerevisiae* 加熱死菌体との共培養により TLR2 mRNA の発現量が増加した。

これらの受容体の遺伝子発現の変化により, Caco-2 細胞および HL-60 細胞の酵母認識機構と, それに続くサイトカイン産生等の応答が変化した可能性がある。

本研究では, 酵母とヒトの腸管免疫機能との関わり合いを, 代表的な菌種 *S. cerevisiae* および *C. albicans* と, 腸管上皮細胞および好中球のヒト由来モデル細胞を用いて解析することで, その機序を科学的に解明することに成功した。これまでの食経験に基づく酵母摂取の生体への効果と, 本研究での成果を複合的に考えることで, 酵母やその成分を利用した安全で効果的な機能性食品や動物用試料の開発がますます進むものと考えている。

#### 謝辞

本研究の進行にあたって, 懇切なるご指導ご鞭撻を賜り, 学生の頃より永年にわたってご指導賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻比較病態生理学研究室 局博一教授に, 深く感謝申し上げます。また, 同研究室 桑原正貴准教授には, 丁寧なご指導にあずかりましたことを心より感謝申し上げます。

実験の遂行や論文作成にあたりまして, 多大なるご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食糧化学研究室 戸塚護准教授ならびに, 日本大学生物資源科学部食品生命学科食品生命機能学研究室 上野川修一教授に厚く感謝いたします。

本研究の共同研究者であります東京都立食品技術センター 細井知弘博士に深謝いたします。

本研究を進めるにあたって多大なるご指導を賜りました東京都立食品技術センター歴代所長の, 斎尾恭子博士, 真鍋勝博士, 沼田邦雄氏, 杉田英夫氏, 坂田雅史氏をはじめ, 本研究の進行を支えてくださいました東京都立食品技術センター職員および前職員の皆様に, 厚く感謝申し上げます。

最後に, 本研究を支えてくれた家族に感謝いたします。

#### 引用文献

- Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007) Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8: 942-949.
- Agirbasli, H., S.A. Özcan and G. Gedikoğlu (2005) Fecal fungal flora of pediatric healthy volunteers and immunosuppressed patients. *Mycopathologia* 159: 515-520.
- Akhtar, M., J.L. Watson, A. Nazli and D.M. McKay (2003) Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF- $\kappa$ B-independent pathway. *FASEB J.* 17: 1319-1321.
- Akiyama, K., T. Shida, H. Yasueda, H. Mita, Y. Yanagihara, M. Hasegawa, Y. Maeda, T. Yamamoto, K. Takesako and H. Yamaguchi (1996) Allergenicity of acid protease secreted by *Candida albicans*. *Allergy* 51: 887-892.
- Al-Sadi, R.M. and T.Y. Ma (2007) IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 178: 4641-4649.

- An, H., Y. Yu, M. Zhang, H. Xu, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, J. Guo, Z. Qin and X. Cao (2002) Involvement of ERK, p38 and NF- $\kappa$ B signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106: 38-45.
- 荒谷康昭 (2006) 真菌感染と好中球ミエロペルオキシダーゼ. *医真菌誌* 47: 195-199.
- Augeron, C. and C.L. Laboisse (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 44: 3961-3969.
- Barcenilla, A., S.E. Pryde, J.C. Martin, S.H. Duncan, C.S. Stewart, C. Henderson and H.J. Flint (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1654-1661.
- Barlow, A.J., T. Aldersley and F.W. Chattaway (1974) Factors present in serum and seminal plasma which promote germ-tube formation and mycelial growth of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 82 Pt. 2: 261-272.
- Beier, R. and A. Gebert (1998) Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am. J. Physiol.* 275: G130-137.
- Besong, S., J.A. Jackson, C.L. Hicks and R.W. Hemken (1996) Effects of a supplemental liquid yeast product on feed intake, ruminal profiles, and yield, composition, and organoleptic characteristics of milk from lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 79: 1654-1658.
- Biswas, S., P. Van Dijck and A. Datta (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 348-376.
- Bonifazi, P., T. Zelante, C. D'Angelo, A. De Luca, S. Moretti, S. Bozza, K. Perruccio, R.G. Iannitti, G. Giovannini, C. Volpi, F. Fallarino, P. Puccetti and L. Romani (2009) Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. *Mucosal Immunol.* 2: 362-374.
- Brandsch, M., Y. Miyamoto, V. Ganapathy and F.H. Leibach (1994) Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H<sup>+</sup> co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* 299 (Pt 1): 253-260.
- Breitman, T.R., S.E. Selonick and S.J. Collins (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2936-2940.
- Brown, G.D. and S. Gordon (2001) Immune recognition: a new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature* 413: 36-37.
- Brown, G.D., J. Herre, D.L. Williams, J.A. Willment, A.S. Marshall and S. Gordon (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119-1124.
- Brown, S.J. and L. Mayer (2007) The immune response in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 2058-2069.
- Bruewer, M., A. Luegering, T. Kucharzik, C.A. Parkos, J.L. Madara, A.M. Hopkins and A. Nusrat (2003) Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* 171: 6164-6172.
- Bruhl, H., K. Wagner, H. Kellner, M. Schattenkirchner, D. Schlondorff and M. Mack (2001) Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 126: 551-559.
- Buffo, J., M.A. Herman and D.R. Soll (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85: 21-30.
- Burke, S.M., T.B. Issekutz, K. Mohan, P.W. Lee, M. Shmulevitz and J.S. Marshall (2008) Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* 111: 5467-5476.
- Campbell, J.J., S. Qin, D. Unutmaz, D. Soler, K.E. Murphy, M.R. Hodge, L. Wu and E.C. Butcher (2001) Unique subpopulations of CD56<sup>+</sup> NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 166: 6477-6482.
- Cao, F., S. Lane, P.P. Raniga, Y. Lu, Z. Zhou, K. Ramon, J. Chen and H. Liu (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 17: 295-307.
- Casanova, M., A.M. Cervera, D. Gozalbo and J.P. Martinez (1997) Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 65: 4360-4364.
- Chaffin, W.L., J.L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo and J.P. Martínez (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180.
- Chambers, F.G., S.S. Koshy, R.F. Saidi, D.P. Clark, R.D. Moore and C.L. Sears (1997) *Bacteroides fragilis* toxin

- exhibits polar activity on monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) in vitro. *Infect. Immun.* 65: 3561-3570.
- Chan, G.C., W.K. Chan and D.M. Sze (2009) The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2: 25.
- Cheirsilp, B., H. Shimizu and S. Shioya (2003a) Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 100: 43-53.
- Cheirsilp, B., H. Shoji, H. Shimizu and S. Shioya (2003b) Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 279-284.
- Chen, Y.C., C.C. Wu, W.L. Chung and F.J. Lee (2002) Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology* 148: 3743-3754.
- Collins, S.J., F.W. Ruscetti, R.E. Gallagher and R.C. Gallo (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2458-2462.
- Conradi, R.A., K.F. Wilkinson, B.D. Rush, A.R. Hilgers, M.J. Ruwart and P.S. Burton (1993) *In vitro/in vivo* models for peptide oral absorption: comparison of Caco-2 cell permeability with rat intestinal absorption of renin inhibitory peptides. *Pharm. Res.* 10: 1790-1792.
- Cummings, J.H. (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22: 763-779.
- Cummings, J.H., E.W. Pomare, W.J. Branch, C.P. Naylor and G.T. Macfarlane (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221-1227.
- Dann, H.M., J.K. Drackley, G.C. McCoy, M.F. Hutjens and J.E. Garrett (2000) Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83: 123-127.
- DiCario, F.J. and J.V. Fiore (1958) On the composition of zymosan. *Science* 127: 756-757.
- Dongari-Bagtzoglou, A. and H. Kashleva (2003) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses of oral epithelial cells to *Candida albicans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 18: 165-170.
- Eckmann, L., M.F. Kagnoff and J. Fierer (1993) Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 61: 4569-4574.
- Eicher, S.D., C.A. McKee, J.A. Carroll and E.A. Pajor (2006) Supplemental vitamin C and yeast cell wall  $\beta$ -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *J. Anim. Sci.* 84: 2352-2360.
- El Barkani, A., O. Kurzai, W.A. Fonzi, A. Ramon, A. Porta, M. Frosch and F.A. Muhlschlegel (2000) Dominant active alleles of *RIM101 (PRR2)* bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4635-4647.
- Escotte, S., D. Al Alam, R. Le Naour, E. Puchelle, M. Guenounou and S.C. Gangloff (2006) T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34: 348-354.
- Faergemann, J. (2002) Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 545-563.
- Faure, E., L. Thomas, H. Xu, A. Medvedev, O. Equils and M. Arditi (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- $\kappa$ B activation. *J. Immunol.* 166: 2018-2024.
- Flo, T.H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan and T. Espevik (2001) Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J. Leukoc. Biol.* 69: 474-481.
- Fogh, J., W.C. Wright and J.D. Loveless (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 209-214.
- Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F.C. Odds and B. Hube (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 56: 397-415.
- Fukao, T., S. Matsuda and S. Koyasu (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN- $\gamma$  production by dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 64-71.
- Fukui, R., S. Saitoh, F. Matsumoto, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, K. Tabeta, B. Beutler and K. Miyake (2009) Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.* 206: 1339-1350.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.

- Furrie, E., S. Macfarlane, G. Thomson and G.T. Macfarlane (2005) Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115: 565-574.
- Fusunyan, R.D., J.J. Quinn, M. Fujimoto, R.P. MacDermott and I.R. Sanderson (1999) Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Mol. Med.* 5: 631-640.
- Fusunyan, R.D., J.J. Quinn, Y. Ohno, R.P. MacDermott and I.R. Sanderson (1998) Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1 $\beta$  and lipopolysaccharide. *Pediatr. Res.* 43: 84-90.
- Galvão, K.N., J.E. Santos, A. Coscioni, M. Villaseñor, W.M. Sicho and A.C. Berge (2005) Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 427-440.
- Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira and D.M. Underhill (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197: 1107-1117.
- Gantner, B.N., R.M. Simmons and D.M. Underhill (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 24: 1277-1286.
- Gerszten, R.E., E.A. Garcia-Zepeda, Y.C. Lim, M. Yoshida, H.A. Ding, M.A. Gimbrone, Jr., A.D. Luster, F.W. Luscinskas and A. Rosenzweig (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723.
- Gesser, B., M. Lund, N. Lohse, C. Vestergaard, K. Matsushima, S. Sindet-Pedersen, S.L. Jensen, K. Thestrup-Pedersen and C.G. Larsen (1996) IL-8 induces T cell chemotaxis, suppresses IL-4, and up-regulates IL-8 production by CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Leukoc. Biol.* 59: 407-411.
- Ghoneum, M. and S. Gollapudi (2004) Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, *in vitro*. *Anticancer Res.* 24: 1455-1463.
- Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gill, S.R., M. Pop, R.T. Deboy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett and K.E. Nelson (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.
- Godaly, G., A.E. Proudfoot, R.E. Offord, C. Svanborg and W.W. Agace (1997) Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect. Immun.* 65: 3451-3456.
- Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin and S.G. Oliver (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 563-567.
- Hachicha, M., P. Rathanaswami, P.H. Naccache and S.R. McColl (1998) Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J. Immunol.* 160: 449-454.
- Haller, D., C. Bode, W.P. Hammes, A.M. Pfeifer, E.J. Schiffrin and S. Blum (2000) Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47: 79-87.
- 原 歩・日比紀文・吉岡政洋・戸田京子・渡辺憲明・森田 稔・鈴木達夫・芦澤 宏・斉藤英胤・岩男 泰・渡辺 哲・土屋雅春 (1992) 大腸癌細胞株 Caco-2 の分化機序の検討. *日消誌* 89: 588-595.
- Harris, D.S., J.W. Slot, H.J. Geuze and D.E. James (1992) Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7556-7560.
- Harrison, L.E., Q.M. Wang and G.P. Studzinski (1999) Butyrate-induced G<sub>2</sub>/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34<sup>cdc2</sup> activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 150-156.
- Hashimoto, K., N. Matsunaga and M. Shimizu (1994) Effect of vegetable extracts on the transepithelial permeability of the human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1345-1346.
- Hashimoto, K., K. Takeda, T. Nakayama and M. Shimizu (1995) Stabilization of the tight junction of the intestinal Caco-2 cell monolayer by milk whey proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1951-1952.
- Heerd, B.G., M.A. Houston and L.H. Augenlicht (1994) Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 54: 3288-3293.
- Hespell, R.B., R. Wolf and R.J. Bothast (1987) Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2849-2853.
- Hidalgo, I.J. and R.T. Borchardt (1990) Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal

- epithelial cell line: Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1028: 25-30.
- Hidalgo, I.J., T.J. Raub and R.T. Borchardt (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu and et al. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76.
- Hornef, M.W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark and A. Richter-Dahlfors (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 195: 559-570.
- Hosoi, T., R. Hirose, S. Saegusa, A. Ametani, K. Kiuchi and S. Kaminogawa (2003) Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium *Bacillus subtilis* (natto). *Int. J. Food Microbiol.* 82: 255-264.
- Huang, N., J.P. Katz, D.R. Martin and G.D. Wu (1997) Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* 9: 27-36.
- Ishikawa, F. and S. Miyazaki (2005) New biodefense strategies by neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 226-233.
- 岩井正憲・今原広次・中浜敏雄 (1994) 醗酵食品の製造に係る乳酸菌(第4報): すぐき漬中の乳酸菌と酵母の栄養要求. 京都府立大学学術報告 23: 163-167.
- Jang, M.H., M.N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P.D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki and H. Kiyono (2004) Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6110-6115.
- Jawahara, S. and D. Poulain (2007) *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med. Mycol.* 45: 691-700.
- Jouault, T., C. Delaunoy, B. Sendid, F. Ajana and D. Poulain (1997) Differential humoral response against  $\alpha$ - and  $\beta$ -linked mannose residues associated with tissue invasion by *Candida albicans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 328-333.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira and D. Poulain (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* 188: 165-172.
- Jung, H.C., L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska and M.F. Kagnoff (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95: 55-65.
- Kanda, T., L. Foucand, Y. Nakamura, I. Niot, P. Besnard, M. Fujita, Y. Sakai, K. Hatakeyama, T. Ono and H. Fujii (1998) Regulation of expression of human intestinal bile acid-binding protein in Caco-2 cells. *Biochem. J.* 330 (Pt 1): 261-265.
- 加納 壘. (2004) サイトカイン産生からみた皮膚真菌症の病態. *医真菌誌* 45: 131-136.
- Kim, H.Y. and Y. Rikihisa (2000) Expression of interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in human peripheral blood leukocytes exposed to human granulocytic ehrlichiosis agent or recombinant major surface protein P44. *Infect. Immun.* 68: 3394-3402.
- Kim, H.Y. and Y. Rikihisa (2002) Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF- $\kappa$ B, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes, and neutrophils in response to *Anaplasma phagocytophila*. *Infect. Immun.* 70: 4132-4141.
- Klein, M.B., S. Hu, C.C. Chao and J.L. Goodman (2000) The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J. Infect. Dis.* 182: 200-205.
- Konishi, Y., K. Hagiwara and M. Shimizu (2002) Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2449-2457.
- Koyama, Y., T. Suzuki, A. Kajiya and M. Isemura (2005) Stimulation of IL-8 production by *Aralia cordate* lectin in human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 202-205.
- Krisanaprakornkit, S., J.R. Kimball, A. Weinberg, R.P. Darveau, B.W. Bainbridge and B.A. Dale (2000) Inducible expression of human  $\beta$ -defensin 2 by

- Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* 68: 2907-2915.
- Kurokawa, K., T. Itoh, T. Kuwahara, K. Oshima, H. Toh, A. Toyoda, H. Takami, H. Morita, V.K. Sharma, T.P. Srivastava, T.D. Taylor, H. Noguchi, H. Mori, Y. Ogura, D.S. Ehrlich, K. Itoh, T. Takagi, Y. Sakaki, T. Hayashi and M. Hattori (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14: 169-181.
- Kurt-Jones, E.A., L. Mandell, C. Whitney, A. Padgett, K. Gosselin, P.E. Newburger and R.W. Finberg (2002) Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100: 1860-1868.
- Lammers, K.M., U. Helwig, E. Swennen, F. Rizzello, A. Venturi, E. Caramelli, M.A. Kamm, P. Brigidi, P. Gionchetti and M. Campieri (2002) Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.* 97: 1182-1186.
- Laurent, F., M.F. Kagnoff, T.C. Savidge, M. Naciri and L. Eckmann (1998) Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> production. *Infect. Immun.* 66: 1787-1790.
- Lavigne, L.M., J.E. Albina and J.S. Reichner (2006) β-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions. *J. Immunol.* 177: 8667-8675.
- Lee, J., R. Horuk, G.C. Rice, G.L. Bennett, T. Camerato and W.I. Wood (1992) Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.* 267: 16283-16287.
- Ley, R.E., P.J. Turnbaugh, S. Klein and J.I. Gordon (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
- Li, J., D.F. Li, J.J. Xing, Z.B. Cheng and C.H. Lai (2006) Effects of β-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 84: 2374-2381.
- Liu, S.Q. and M. Tsao (2009) Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 34-38.
- Lopitz-Otsoa, F., A. Rementeria, N. Elguezal and J. Garaizar (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 67-74.
- Madara, J.L. and J. Stafford (1989) Interferon-γ directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 83: 724-727.
- Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux, E. Pelletier, L. Frangeul, R. Nalin, C. Jarrin, P. Chardon, P. Marteau, J. Roca and J. Dore (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55: 205-211.
- Mariadason, J.M., A. Velcich, A.J. Wilson, L.H. Augenlicht and P.R. Gibson (2001) Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* 120: 889-899.
- Martins, F.S., A.C. Rodrigues, F.C. Tiago, F.J. Penna, C.A. Rosa, R.M. Arantes, R.M. Nardi, M.J. Neves and J.R. Nicoli (2007) *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* 56: 352-359.
- Maru, Y. (2010) Premetastatic milieu explained by TLR4 agonist-mediated homeostatic inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* 7: 94-99.
- Melmed, G., L.S. Thomas, N. Lee, S.Y. Tesfay, K. Lukasek, K.S. Michelsen, Y. Zhou, B. Hu, M. Arditi and M.T. Abreu (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J. Immunol.* 170: 1406-1415.
- Mita, Y., K. Dobashi, T. Nakazawa and M. Mori (2001) Induction of Toll-like receptor 4 in granulocytic and monocytic cells differentiated from HL-60 cells. *Br. J. Haematol.* 112: 1041-1047.
- 光岡知足 (1990) 腸内細菌学. 朝倉書店, 東京.
- 光岡知足 (1995) 腸内フローラと発癌. 学会出版センター, 東京.
- 光岡知足 (1998) 腸内フローラとプロバイオティクス. 学会出版センター, 東京.
- Miyazato, A., K. Nakamura, N. Yamamoto, H.M. Mora-Montes, M. Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, K. Inden, X.

- Gang, K. Ishii, K. Takeda, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, Y. Adachi, N. Ohno, K. Mitsutake, N.A. Gow, M. Kaku and K. Kawakami (2009) Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 77: 3056-3064.
- 宮園浩平 (1995) サイトカイン・増殖因子用語ライブラリー (菅村和夫ほか編). 羊土社, 東京. pp. 253-254.
- Moretti, S., S. Bellocchio, P. Bonifazi, S. Bozza, T. Zelante, F. Bistoni and L. Romani (2008) The contribution of PARs to inflammation and immunity to fungi. *Mucosal Immunol.* 1: 156-168.
- 森下芳行 (1990) 腸内フローラの構造と機能. 朝倉書店, 東京.
- Mostefaoui, Y., C. Bart, M. Frenette and M. Rouabhia (2004) *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cell. Microbiol.* 6: 1085-1096.
- Mullick, A., M. Elias, P. Harakidas, A. Marcil, M. Whiteway, B. Ge, T.J. Hudson, A.W. Caron, L. Bourget, S. Picard, O. Jovceviski, B. Massie and D.Y. Thomas (2004) Gene expression in HL60 granulocytoids and human polymorphonuclear leukocytes exposed to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 72: 414-429.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann and M. Modolell (1998) Murine macrophages secrete interferon  $\gamma$  upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187: 2103-2108.
- Muñoz, P., E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J.M. Eiros, M.J. Pérez, M. Sánchez-Somolinos, C. Rincón, J. Hortal and T. Peláez (2005) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1625-1634.
- Murakami, H. and H. Masui (1980) Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3464-3468.
- Murphy, K.G. and S.R. Bloom (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444: 854-859.
- Murzyn, A., A. Krasowska, D. Augustyniak, G. Majkowska-Skrobek, M. Lukaszewicz and D. Dziadkowiec (2010) The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. *FEMS Microbiol. Lett.* 310: 17-23.
- Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L.P. Ruco, P. Allavena and A. Mantovani (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 5998-6004.
- 中野裕康 (1995) サイトカイン・増殖因子用語ライブラリー (菅村和夫ほか編). 羊土社, 東京. pp. 117-119.
- 中尾篤人 (2010) TGF- $\beta$  シグナルと免疫系の恒常性. *実験医学増刊* 28: 115-119.
- Nantel, A., D. Dignard, C. Bachewich, D. Harcus, A. Marcil, A.P. Bouin, C.W. Sensen, H. Hogues, M. van het Hoog, P. Gordon, T. Rigby, F. Benoit, D.C. Tessier, D.Y. Thomas and M. Whiteway (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell* 13: 3452-3465.
- Netea, M.G., L.J. van Tits, J.H. Curfs, F. Amiot, J.F. Meis, J.W. van der Meer and B.J. Kullberg (1999) Increased susceptibility of TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J. Immunol.* 163: 1498-1505.
- O'Mahony, S.M., J.R. Marchesi, P. Scully, C. Codling, A.M. Ceolho, E.M. Quigley, J.F. Cryan and T.G. Dinan (2009) Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol. Psychiatry* 65: 263-267.
- Obert, G., I. Peiffer and A.L. Servin (2000) Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Virol.* 74: 4645-4651.
- Olson, E.J., J.E. Standing, N. Griego-Harper, O.A. Hoffman and A.H. Limper (1996) Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infect. Immun.* 64: 3548-3554.
- 大隅良典・下田 親 (2007) 酵母のすべて. シュプリンガー・ジャパン, 東京.
- Ozinsky, A., D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. Smith, C.B. Wilson, L. Schroeder and A. Adrem (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13766-13771.
- Pecquet, S., D. Guillaumin, C. Tancrede and A. Andremont

- (1991) Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3049-3051.
- Pillemer, L. and E.E. Ecker (1940) Anticomplementary factor in fresh yeast. *J. Biol. Chem.* 137: 139-142.
- Piva, G., S. Belladonna, G. Fusconi and F. Sicbaldi (1993) Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *J. Dairy Sci.* 76: 2717-2722.
- Pivarsci, A., L. Bodai, B. Réthi, A. Kenderessy-Szabó, A. Koreck, M. Széll, Z. Beer, Z. Bata-Csörgő, M. Magócsi, E. Rajnavölgyi, A. Dobozy and L. Kemény (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.* 15: 721-730.
- Ramanan, N. and Y. Wang (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288: 1062-1064.
- Renna, M.S., S.G. Correa, C. Porporatto, C.M. Figueredo, M.P. Aoki, M.G. Paraje and C.E. Sotomayor (2006) Hepatocellular apoptosis during *Candida albicans* colonization: involvement of TNF- $\alpha$  and infiltrating Fas-L positive lymphocytes. *Int. Immunol.* 18: 1719-1728.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2: 361-367.
- Rhee, S.H., C. Pothoulakis and E.A. Mayer (2009) Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6: 306-314.
- Rice, P.J., J.L. Kelley, G. Kogan, H.E. Ensley, J.H. Kalbfleisch, I.W. Browder and D.L. Williams (2002) Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. *J. Leukoc. Biol.* 72: 140-146.
- Robertson, M.J. (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 71: 173-183.
- Rodrigues, A.C., D.C. Cara, S.H. Fretez, F.Q. Cunha, E.C. Vieira, J.R. Nicoli and L.Q. Vieira (2000) *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 89: 404-414.
- Rodriguez-Juan, C., M. Perez-Blas, E. Suarez-Garcia, J.C. Lopez-Suarez, M. Muzquiz, C. Cuadrado and J.M. Martin-Villa (2000) *Lens culinaris*, *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba* lectins specifically trigger IL-8 production by the human colon carcinoma cell line CACO-2. *Cytokine* 12: 1284-1287.
- Roeder, A., C.J. Kirschnig, R.A. Rupec, M. Schaller and H.C. Korting (2004) Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol.* 12: 44-49.
- Romani, L. (2004) Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 1-23.
- Ross, G.D., J.A. Cain, B.L. Myones, S.L. Newman and P.J. Lachmann (1987) Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for  $\beta$ -glucans. *Complement* 4: 61-74.
- Rotstein, D., J. Parodo, R. Taneja and J.C. Marshall (2000) Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock* 14: 278-283.
- Rubin-Bejerano, I., I. Fraser, P. Grisafi and G.R. Fink (2003) Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11007-11012.
- Scanlan, P.D. and J.R. Marchesi (2008) Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J.* 2: 1183-1193.
- Scevola, D., L. Perversi, C. Cavanna, C. Candiani, F. Uberti, B. Castiglioni and P. Marone (2003) Acid tolerance and fecal recovery following oral administration of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chemother.* 15: 143-147.
- Schaller, M., R. Mailhammer, G. Grassl, C.A. Sander, B. Hube and H.C. Korting (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J. Invest. Dermatol.* 118: 652-657.
- Schneider, S.M., F. Girard-Pipau, J. Filippi, X. Hébuterne, D. Moysé, G.C. Hinojosa, A. Pompei and P. Rampal (2005) Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J. Gastroenterol.* 11: 6165-6169.
- Sharp, R. and G.T. Macfarlane (2000) Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4212-4221.
- Shuto, T., T. Furuta, J. Cheung, D.C. Gruenert, Y. Ohira, S.



- Shimasaki, M.A. Suico, K. Sato and H. Kai (2007) Increased responsiveness to TLR2 and TLR4 ligands during dimethylsulfoxide-induced neutrophil-like differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 31: 1721-1728.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J.P. Kraehenbuhl and J.C. Sirard (2001) Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13722-13727.
- Simonovic, I., J. Rosenberg, A. Koutsouris and G. Hecht (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell. Microbiol.* 2: 305-315.
- Steele, C. and P.L. Fidel, Jr. (2002) Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 70: 577-583.
- Sugimoto, T., Y. Ishikawa, T. Yoshimoto, N. Hayashi, J. Fujimoto and K. Nakanishi (2004) Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. *J. Exp. Med.* 199: 535-545.
- Surawicz, C.M., G.W. Elmer, P. Speelman, L.V. McFarland, J. Chinn and G. van Belle (1989) Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 96: 981-988.
- Suzuki, T., A. Tsuzuki, N. Ohno, Y. Ohshima and T. Yadomae (2000) Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28: 157-162.
- Tada, H., E. Nemoto, H. Shimauchi, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, N. Ohno, H. Tamura, K. Shibata, S. Akashi, K. Miyake, S. Sugawara and H. Takada (2002) *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol. Immunol.* 46: 503-512.
- Terada, M., H. Tsutsui, Y. Imai, K. Yasuda, H. Mizutani, K. Yamanishi, M. Kubo, K. Matsui, H. Sano and K. Nakanishi (2006) Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8816-8821.
- Traber, M.G., H.J. Kayden and M.J. Rindler (1987) Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *J. Lipid Res.* 28: 1350-1363.
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 133-146.
- Tsukada, C., H. Yokoyama, C. Miyaji, Y. Ishimoto, H. Kawamura and T. Abo (2003) Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of  $\beta$ -glucan. *Cell. Immunol.* 221: 1-5.
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis and J.I. Gordon (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti and A. Aderem (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.
- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann and A. Zychlinsky (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8: 668-676.
- van der Graaf, C.A., M.G. Netea, I. Verschueren, J.W. van der Meer and B.J. Kullberg (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.* 73: 7458-7464.
- van Heugten, E., D.W. Funderburke and K.L. Dorton (2003) Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.* 81: 1004-1012.
- Vizoso Pinto, M.G., T. Schuster, K. Briviba, B. Watzl, W.H. Holzappel and C.M. Franz (2007) Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *J. Food Prot.* 70: 125-134.
- Weide, M.R. and J.F. Ernst (1999) Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses* 42 Suppl 2: 61-67.
- Weinstein, D.L., B.L. O'Neill and E.S. Metcalf (1997) *Salmonella typhi* stimulation of human intestinal epithelial cells induces secretion of epithelial cell-derived interleukin-6. *Infect. Immun.* 65: 395-404.
- Whittaker, R.H. (1969) New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two

- kingdoms. *Science* 163: 150-160.
- Willment, J.A. and G.D. Brown (2008) C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* 16: 27-32.
- Woese, C.R. (1994) There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* 58: 1-9.
- Woese, C.R. and G.E. Fox (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090.
- Woese, C.R., O. Kandler and M.L. Wheelis (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
- Wohlt, J.E., T.T. Corcione and P.K. Zajac (1998) Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *J. Dairy Sci.* 81: 1345-1352.
- Woodmansey, E.J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1178-1186.
- Wu, G.D., N. Huang, X. Wen, S.A. Keilbaugh and H. Yang (1999) High-level expression of I $\kappa$ B- $\beta$  in the surface epithelium of the colon: in vitro evidence for an immunomodulatory role. *J. Leukoc. Biol.* 66: 1049-1056.
- 山口英世 (1999) 病原真菌と真菌症. 南山堂, 東京. pp. 92-99.
- Yoshida, Y., W. Yokoi, K. Ohishi, M. Ito, E. Naito and H. Sawada (2005) Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 714-723.
- Yoshida, Y., W. Yokoi, Y. Wada, K. Ohishi, M. Ito and H. Sawada (2004) Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1185-1192.
- Yoshimoto, T., H. Okamura, Y.I. Tagawa, Y. Iwakura and K. Nakanishi (1997) Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3948-3953.
- Zanello, G., F. Meurens, M. Berri and H. Salmon (2009) *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 47-58.
- Zarembek, K.A. and P.J. Godowski (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168: 554-561.

#### 関連文献

- Saegusa, S., M. Totsuka, S. Kaminogawa and T. Hosoi (2004) *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41: 227-235.
- Saegusa, S., M. Totsuka, S. Kaminogawa and T. Hosoi (2007) Cytokine responses of intestinal epithelial-like Caco-2 cells to non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts in the presence of butyric acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2428-2434.
- Saegusa, S., M. Totsuka, S. Kaminogawa and T. Hosoi (2009) *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* stimulate cytokine secretion from human neutrophil-like HL-60 cells differentiated with retinoic acid or dimethylsulfoxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2600-2608.

# *In vitro* study of immune responses of human intestinal epithelial- and neutrophil-like cells to nonpathogenic and opportunistic pathogenic yeasts\*

Shizue Saegusa\*\*

Food Technology Research Center, Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center  
(Tokyo Metropolitan Food Technology Research Center)

## Abstract

Specific yeast species are utilized for the production of fermented foods, probiotics and animal feeds. For example, *Saccharomyces cerevisiae*, a non-pathogenic yeast, is used for brewing Japanese sake, wine and beer, and making bread. These yeast cells exist transiently in the intestine following oral ingestion, in contrast to other yeast species that survive in mammalian intestines or respiratory tract and on the skin surface. The intestinal commensal yeast, *Candida albicans*, causes opportunistic invasive infectious diseases, particularly in immunosuppressed patients. Some of the yeast cells present in the intestine are considered to contact with host cells. However, little is known about the effects of yeast cells on the intestinal immune system. In the current study, we examined the cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells and neutrophil-like HL-60 cells to various yeast cells and yeast cell wall components.

Intact *S. cerevisiae* and *C. albicans* enhanced interleukin-8 (IL-8/CXCL-8) mRNA expression and protein secretion from Caco-2 cells in the presence of 10 mM butyric acid and 15% FBS. Prior to co-culture experiments, Caco-2 cells were precultured with 10 mM butyric acid for enhancing differentiation. The yeast stimuli did not enhance mRNA expression of IL-6, IL-18, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, stem cell factor (SCF), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Caco-2 cells. Transepithelial electrical resistance (TER) of Caco-2 cell monolayers was decreased following co-cultivation with *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Notably, a more rapid decrease in TER was induced by intact *C. albicans* than intact *S. cerevisiae*.

Other non-pathogenic yeast cells originating from foods, including *Candida kefir*, *C. utilis*, *C. versatilis*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Zygosaccharomyces rouxii*, *S. cerevisiae* cell wall components, zymosan and glucan, as well as opportunistic pathogens isolated from human tissues, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, enhanced IL-8 secretion from Caco-2 cells.

Next, we focused the responses of neutrophils attracted by IL-8 secreted from intestinal epithelial cells. Human neutrophil-like HL-60 cells pre-cultured with either 1  $\mu$ M retinoic acid or 1.25% DMSO for 6 days for differentiation were subsequently co-cultured with *S. cerevisiae* and *C. albicans* in identical media. Intact and heat-killed *S. cerevisiae* enhanced IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MCP-1 and TNF- $\alpha$  secretion and mRNA expression from HL-60 cells cultured in the presence of retinoic acid. In contrast, intact *C. albicans* slightly enhanced secretion of IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-18, while heat-killed *C. albicans* promoted the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-8,

IL-12, IL-18, MCP-1 and TNF- $\alpha$ .

Since cytokine responses to yeast cells and cellular components are assumed to be induced by interactions with pattern recognition receptors (PRRs) that recognize yeast cell components expressed on Caco-2 and HL-60 cells, we examined the gene expression patterns of PRRs. Message expression of Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR6 and dectin-1 was detected in Caco-2 and HL-60 cells. Alterations in PRR mRNA expression were induced by yeast cells, butyric acid, retinoic acid and DMSO.

Here, we have shown that non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts induce secretion of cytokines from human intestinal epithelial-like Caco-2 and neutrophil-like HL-60 cells, depending on the method of killing of yeast cells, yeast species and concentrations, as well as differentiation methods. Although an imbalance in cytokine secretion is likely to be involved in inflammatory diseases, secretion of cytokines is essential in the immune system to protect the host against foreign substances. In addition, oral ingestion of adequate amounts of specific yeast cells and cellular components by humans and animals is reported to induce beneficial effects in several gastrointestinal diseases, immune modulation and growth performance without triggering inflammatory diseases. Further investigation and careful use of yeast cells and cellular components as a functional food ingredient are therefore necessary. Our in vitro analyses should aid in clarifying the intestinal innate immune responses to yeast cells that exist commensally or transiently after oral ingestion.

Keywords: yeast, intestinal epithelial cells, neutrophils, cytokine, Toll-like receptor

\*Doctorial dissertation, The University of Tokyo.

\*\*Corresponding author: shizue-saegusa@food-tokyo.jp