

インフラマソーム制御を介した  
新しい眼の健康維持アプローチ：  
KW 乳酸菌の開発と事業化



- |                 |             |      |   |
|-----------------|-------------|------|---|
| ①               | ②           | ③    | ④ |
| キリンホールディングス株式会社 | キリン中央研究所    | 森田悠治 | ① |
| キリンホールディングス株式会社 | キリン中央研究所    | 鈴木弘章 | ② |
| キリンホールディングス株式会社 | キリン中央研究所    | 山崎雄大 | ③ |
| キリンホールディングス株式会社 | ヘルスサイエンス事業部 | 藤原大介 | ④ |

背景

今日、日本を含む多くの国で高齢化が顕在化し、生活習慣病や老年疾患罹患者の増加が社会課題の1つとなっている。加齢による恒常性と再生能力の低下はあらゆる組織で生じるが、特に眼は老化と密接な関連があると考えられ、加齢に伴う視機能低下や眼疾患増加が課題である。さらに、パソコンやスマートフォンなどの電子機器使用増加等の生活スタイル変化によって、加齢同様に目の疲れや不調の悩みを抱える現代人が若年層でも増加している。このような社会的背景からも、食生活を中心とした日常生活の中での眼の健康維持は非常に重要である。

一方、近年、加齢に伴う老化に共通する現象として炎症が注目されており、加齢と炎症の関連に着目した inflammaging という概念も提唱されている。炎症を抑制することにより老化や炎症性疾患の緩和が期待できるが、炎症抑制に着目した眼の健康維持に寄与するソリューションは限られていた。

1. 抗炎症効果を有する乳酸菌の発見

炎症は加齢による老廃物や光などの外部刺激に応答した樹状細胞などから産生される炎症性サイトカインによって惹起される。一方、炎症の抑制に寄与する抗炎症性サイトカインである IL-10 も M2型マクロファージ等の免疫細胞から産生されることが近年報告されている。我々は様々な菌株バンク等から収集した乳酸菌から、マクロファージ活性化を指標として、*Lactobacillus paracasei* KW3110株 (KW 乳酸菌) を発見し、IL-10産生誘導能について評価した。乳酸菌株によってマクロファージを刺激した際の IL-10産生量を評価した結果、対照乳酸菌株と比較して、KW 乳酸菌刺激によって有意に多い IL-10産生が認められたことから (図1)<sup>1)</sup>、眼における炎症抑制効果を中心にその後の解析を行った。

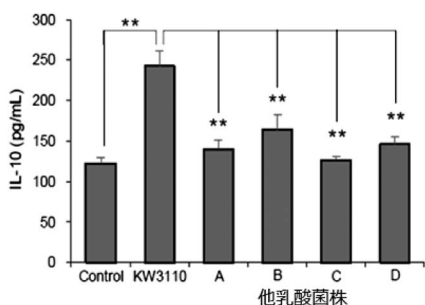


図1. 乳酸菌株のマクロファージへの添加による IL-10産生量比較

2. KW 乳酸菌の *in vivo* における網膜での炎症抑制効果

眼における炎症の引き金となる刺激として、光と加齢が考えられたため、我々は KW 乳酸菌死菌混餌投与によるブルーライト光暴露および加齢に対する網膜炎症抑制効果を *in vivo* で検証した。マウスを KW 乳酸菌摂取群・非摂取群の2群に分けて2週間混餌投与後、約470 nm の波長のブルーライト光を暴露した。その結果、非摂取群と比較して摂取群では網膜層の厚みの減少が有意に抑制されたとともに、網膜における炎症性サイトカインの発現が摂取群では有意に低かった。

次に、高齢マウス (16 か月齢) を KW 乳酸菌摂取群・非摂取群の2群に分けて6か月飼育した。その結果、高齢の摂取群では高齢の非摂取群と比較して、加齢で脱落が認められる網膜神経節細胞が有意に維持されており、若齢群と比較しても同程度であった (図2)<sup>2)</sup>。

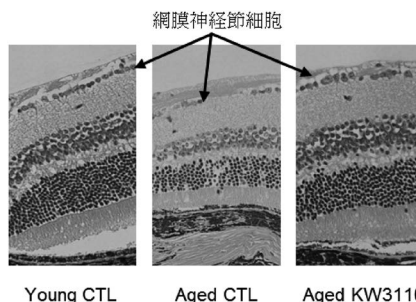


図2. 加齢における網膜神経節細胞死への効果

網膜神経節細胞は光情報を受容し、概日リズムの調節に寄与していることが報告されているが、高齢の非摂取群では活動リズムが乱れるのに対し、KW 乳酸菌摂取群では活動リズムの乱れが抑制されることも分かった<sup>3)</sup>。さらに、網膜中の免疫細胞における炎症性サイトカインの発現も高齢の摂取群では高齢の非摂取群と比較して有意に低かった。

KW 乳酸菌により上述のように網膜炎症が抑制されるメカニズムを詳細に解析するため、生体との最初の接点である腸管の免疫細胞および血中サイトカイン含量を解析した。その結果、小腸粘膜固有層において、加齢で増加する IFN- $\gamma$ 陽性 CD4陽性 T細胞の割合が、摂取群では非摂取群に比べて有意に低く、若齢群と同程度であった。さらに、高齢の摂取群では非摂取群と比較して IL-1 $\beta$ 等の血中炎症性サイトカイン含量も顕著に低く、若齢群と同程度であったことから、小腸粘膜固有層と同様に、加齢による血中の炎症状態も抑制されることが示唆され

た。これらの結果から、経口で生体内に取り入れられた KW 乳酸菌によって、腸・血液の炎症抑制を介して網膜の炎症を抑制している可能性が考えられた。

### 3. KW 乳酸菌のヒトにおける効果

*In vivo* で著効を認めたため、ヒトにおいて KW 乳酸菌摂取の効果を評価した。目の疲れを感じている 35 歳以上 50 歳未満の健康な日本人男女 88 名を KW 乳酸菌含有カプセル摂取群とプラセボ摂取群に無作為に割り付け、8 週間摂取させるランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を行った。摂取 0 週目、4 週目、8 週目にフリッカー検査により評価した結果、摂取 4 週目、8 週目のフリッカー値の 0 週目からの変化量について、KW 乳酸菌摂取群ではプラセボ摂取群と比較して有意に高値を示した (図 3)。大脳中枢の活動水準を反映するフリッカー値は目の疲れの指標とされることから、KW 乳酸菌摂取によって、目の疲れを感じている方の目の疲労感が軽減される事が示唆された。

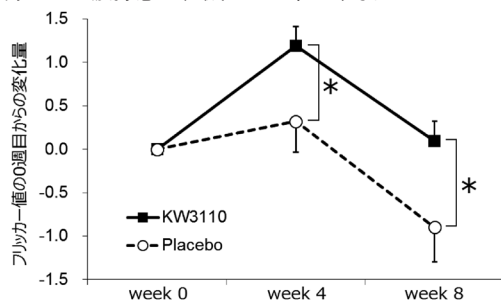


図 3. KW 乳酸菌含有食品摂取におけるフリッカー値変化量

### 4. インフラマソーム活性化抑制メカニズムの解析

上述の通り、KW 乳酸菌の炎症抑制効果を各種解析で見出したが、*in vivo* で KW 乳酸菌摂取により抑制された IL-1 $\beta$  は、炎症分子であるインフラマソームによって制御されることから、*in vitro* でインフラマソーム活性化への効果を評価した。その結果、LPS/ATP 刺激によってマクロファージから産生される IL-1 $\beta$  が、KW 乳酸菌によって顕著に抑制された一方、対照株の *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC53103) では IL-1 $\beta$  産生に変化がなかったことから、乳酸菌の中でも KW 乳酸菌に特徴的な効果であることが示唆された (図 4)<sup>4)</sup>。

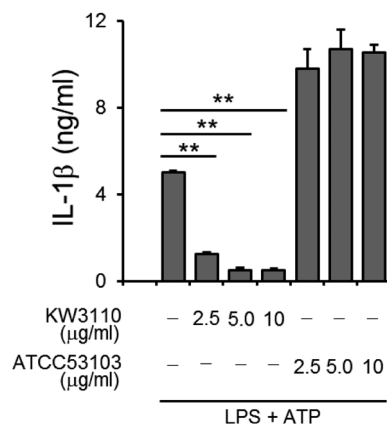


図 4. 乳酸菌株添加によるインフラマソーム活性化への効果

また、IL-10 受容体中和抗体によって KW 乳酸菌によるインフラマソーム抑制効果が一部キャンセルされ、KW 乳酸菌刺激により産生される IL-10 を介した作用機序を明らかにした。*In*

*vivo* でも、免疫老化および尿酸結晶投与による急性腹膜炎モデルや高脂肪食誘導性肥満モデルにおいて、KW 乳酸菌摂取によるインフラマソーム関連症状の抑制効果を確認した。

さらに、マクロファージに KW 乳酸菌が貪食されることで IL-10 産生が誘導されることを貪食阻害実験により明らかにした。続いて、レクチンアレイにより、KW 乳酸菌は対照株の ATCC53103 と比較して、 $\alpha$  マンノースを含む糖鎖を認識するレクチンへの結合性が強いことが示唆された。 $\alpha$  マンノースを含む糖鎖を認識するレクチンの Dectin-2 をマクロファージにおいてノックダウンした結果、KW 乳酸菌刺激による IL-10 産生が抑制されたことから、細菌表面の KW 乳酸菌に特徴的な糖鎖構造が IL-10 産生を介したインフラマソーム活性化抑制のメカニズムであることが示唆された。

### 5. おわりに

このように、我々は、炎症を抑制する KW 乳酸菌を発見したとともに、*in vitro*・*in vivo*・ヒト試験を通して、眼の炎症に対する効果を中心に評価した。また、KW 乳酸菌に特徴的な炎症抑制メカニズムとして、細菌として初めてインフラマソーム活性化の抑制効果を見出した。さらに、国内では機能性表示届出を行ったサプリメント商品を開発し、海外でも事業展開を開始している。今後も農芸化学領域の研究開発を推進することで、食による健康維持・増進を目指したい。

#### (引用文献)

- 1) Yamazaki T, Suzuki H, Yamada S, Ohshio K, Sugamata M, Yamada T, Morita Y. *Lactobacillus paracasei* KW3110 Suppresses Inflammatory Stress-Induced Premature Cellular Senescence of Human Retinal Pigment Epithelium Cells and Reduces Ocular Disorders in Healthy Humans. *Int J Mol Sci*, 21(14): 5091 (2020).
- 2) Morita Y, Jounai K, Sakamoto A, Tomita Y, Sugihara Y, Suzuki H, Ohshio K, Otake M, Fujiwara D, Kanauchi O, Maruyama M. Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related chronic inflammation and retinal cell loss in physiologically aged mice. *Aging*, 10(10): 2723-2740 (2018).
- 3) Morita Y, Jounai K, Tomita Y, Maruyama M. Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related circadian Locomotor activity and changes in gut metabolism in physiologically aged mice. *Exp Gerontol*, 153: 111477 (2021).
- 4) Suzuki H, Yamazaki T, Ohshio K, Sugamata M, Yoshikawa M, Kanauchi O, Morita Y. A Specific Strain of Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus paracasei*, Inhibits Inflammasome Activation In Vitro and Prevents Inflammation-Related Disorders. *J Immunol*, 205(3): 811-821 (2020).
- 5) Yoshikawa M, Yamada S, Sugamata M, Kanauchi O, Morita Y. Dectin-2 mediates phagocytosis of *Lactobacillus paracasei* KW3110 and IL-10 production by macrophages. *Sci Rep*, 11(1): 17737 (2021).

謝 辞 本研究に関しまして多くの貴重なご助言・ご指導を賜りました先生方に厚く御礼申し上げます。また、本研究成果はキリンググループにおける研究・商品開発・マーケティング・製造・販売などの多くの関係者の尽力によるものであり、関わっていただいた皆様に感謝申し上げます。