

|                |   |
|----------------|---|
| 氏名（本籍）         | 保坂 善仁（秋田県）  |
| 専攻分野の名称        | 博士（理学）  |
| 学位記番号          | 理博甲 第 9 号   |
| 学位授与の日付        | 令和 3 年 9 月 24 日   |
| 学位授与の要件        | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |
| 研究科・専攻         | 理工学研究科 総合理工学専攻  |
| 学位論文題目<br>（英文） | 特異抗体を用いた新規免疫賦活活性測定法の構築と高免疫賦活活性微生物製剤の開発（Development of a new method for measuring immunostimulatory activity using specific antibodies and development of highly immunostimulatory microbial preparations） |
| 論文審査委員         | （主査）教授 涌井 秀樹<br>（副査）教授 疋田 正喜<br>（副査）教授 尾高 雅文<br>（副査）教授 藤原 憲秀  |

## 論文内容の要旨

日本人の平均寿命は、男女ともに世界のトップクラスである反面、日常生活に支障をきたさない健康寿命は、男性で8歳程、女性で12歳程の乖離がある。最近の人口動態統計によると、肺炎（誤嚥性肺炎を含む）は死因の約10%を占める。60歳代から肺炎が増加する傾向にあり、加齢による免疫力の低下が一因と考えられている。免疫力の強化対策は、超高齢化社会における重要な課題である。

免疫には、自然免疫（病原体が侵入するたびに、非特異的に速やかに排除する）と、獲得免疫（病原体との初回接触時に免疫学的記憶が成立し、再接触時に特異的に速やかに排除する）がある。常に病原体微生物の侵入に曝される消化管には、自然免疫機構が特に発達している。ヒトの腸管粘膜には、体全体の約70%の免疫細胞が集中しており、腸管免疫と呼ばれるシステムが備わっている。

本論文では、新規の免疫賦活活性測定法を構築し、免疫賦活能を有する発酵食品と微生物の探索を行った。以下の5章で構成されている。

第1章では、健康寿命、免疫機構、腸管免疫について概説し、本研究の目的を述べている。

第2章では、免疫賦活活性測定法の構築について述べている。本研究では、機能性食品素

材の開発指標として、二種のサイトカインに着目し、interleukin-12 (IL-12) と interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の測定系を構築した。ヒトIL-12は、サブユニットのp35とp40から構成され、自然免疫細胞でのIL-12の活性測定には、p35に対する特異抗体が必要であった (p40は、自然免疫細胞に発現するIL-23にも共通に存在するサブユニットであるため)。抗ヒトIL-12 p35抗体は市販されていないことから、新規にIL-12測定系を構築した。ヒト全長IL-12 p35の発現・精製法の詳細について記載し、得られたIL-12測定系での良好な検量線の結果を示している。工夫を加えた点は、(1) 構造安定性の高いGST融合蛋白質として発現させたこと、(2) 低温での酵素処理でGSTの切断が可能な酵素認識アミノ酸配列を挿入したこと、(3) 毒性の高い蛋白質発現が可能な大腸菌株を用いたことである。発現・精製したIL-12 p35は不溶性であったが、ウサギに免疫して特異的な抗体を得た。この抗体を使用することで、ヒトIL-12の測定系を構築することができた。同様の方法で、ヒトIFN- $\gamma$ を発現・精製し、特異的な抗体を得て、ヒトIFN- $\gamma$ の測定系も構築することができた。

第3章では、これまでに報告されている乳酸菌に匹敵する免疫賦活能を有する発酵食品・微生物について探索している。最初に、一般的な機能性食品について概説し、本研究で特に着目した *Tempeh*, *R. oligosporus*, *A. oryzae* などの供試サンプルの調整方法を述べている。次に、本研究の主体を成す「Caco2 細胞 (腸管上皮様細胞に分化する) を用いた *in vitro* 腸管免疫モデル」の実験方法について解説し、本研究での有用性について述べている。乳酸菌との比較試験を行い、*Tempeh* と *R. oligosporus* が、Caco2 細胞における IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生誘導を高める結果を示した。

第4章では、「THP-1細胞 (自然免疫の主役であるマクロファージ様細胞に分化する) を用いた「食食試験」へと研究を展開している。免疫賦活能を有する発酵食品・微生物として期待できる *Tempeh* と *R. oligosporus* が、マクロファージ様細胞での大腸菌食食能を増強させる結果を示した。

第5章では、全体の研究成果の意義をまとめ、今後の機能性食品の開発に向け、*Tempeh* と *R. oligosporus* の有用性を述べている。

全体で85編の参考文献が引用されており、関連分野の重要文献の内容が解説されている。

## 論文審査結果の要旨

本論文では以上のように、ヒト IL-12 と IFN- $\gamma$  の測定系を独自に開発し、「腸管免疫モデル」と「食食試験」での測定系に応用した。*Tempeh* と *R. oligosporus* に有望な高免疫賦活活性を見出しており、新たな機能性食品の開発に繋がる研究として高く評価できる。博士 (理学) の学位論文として、十分に価値があるものと認められる。

### 【 主論文公開誌 】

Hosaka Y, Matsutani S, Kawate S, et al. Expression of difficult-to-express proteins, human IL-12 and IFN- $\gamma$ . *Am J Mol Biol* 11: 29-37, 2021