

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07432

研究課題名(和文) 卵白リゾチームの抗炎症作用の解明

研究課題名(英文) Anti-inflammatory effect of hen egg white lysozyme

研究代表者

菅原 卓也 (Sugahara, Takuya)

愛媛大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00263963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リゾチームは、炎症状態のマクロファージに対して、MAPキナーゼ経路のうちJNKの活性化抑制により、炎症性サイトカイン(IL-6およびTNF- α)やNO産生を遺伝子発現レベルで抑制することで、抗炎症効果を示すことが明らかになった。一方、MAPキナーゼのうち、ERKおよびP38のリン酸化レベル、さらにNF- κ Bの核内移行には影響しなかった。また、マクロファージの貪食活性にも影響しないことが明らかになった。生体内における抗炎症効果については、LPS誘導性の全身性炎症症候群モデルマウスに対して、血中の炎症性サイトカインレベルの抑制、脾臓における各炎症性サイトカイン遺伝子発現レベルの抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Lysozyme is widely distributed in various biological fluids and tissues. The effect of lysozyme on macrophages involved in inflammatory responses was examined. Lysozyme significantly suppressed the production of TNF- α and IL-6 by LPS-treated mouse macrophage cell line RAW264.7 cells and mouse peritoneal macrophages in a dose-dependent manner due to suppression of the gene expression levels of these cytokines. Zymosan A-mediated phagocytosis activity was not affected by lysozyme, suggesting that lysozyme shows the anti-inflammatory effect without inhibiting the phagocytotic response of macrophages. In addition, lysozyme inhibited phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK). It is suggested that lysozyme intracellularly suppresses LPS-induced inflammatory response by inhibiting JNK phosphorylation in macrophages. Oral administration of lysozyme significantly suppressed the serum IL-6 and TNF- α levels in LPS-induced inflammation model mice.

研究分野：食品機能学

キーワード：リゾチーム 抗炎症 TNF- α インターロイキン6 マクロファージ 炎症性サイトカイン 貪食活性
全身性炎症モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

リゾチームは分子量約 14,000 の塩基性タンパク質であり、細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解することで抗菌性を示し、免疫系において侵入微生物に対する第一のバリアとして、生体防御に大きく関わっている。申請者は、卵白に豊富に含まれるリゾチームの免疫促進効果に着目し、培養細胞やヒト末梢血リンパ球の抗体産生やサイトカイン産生を促進する効果があることを発見した (Murakami et al., *Cytotechnology*, 24, 177-182, 1997.)。また、リゾチームの酵素活性は免疫促進効果に関与しないこと、リゾチームは細胞内に取り込まれ、タンパク質の翻訳過程を促進することを明らかにした (Sugahara et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1475, 27-34, 2000.)。さらに、加熱処理による疎水性の上昇によって免疫促進活性が賦活化されることを発見した (Sugahara et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 19-24, 2002.)。これらの結果から、リゾチームは単なる溶菌酵素として、水際での微生物の侵入を防いでいるだけでなく、獲得免疫系に大きく寄与していることが明らかになった。本研究により、免疫系全体に及ぼすリゾチームの総括的な免疫活性を解明できるとともに、得られた学術エビデンスをもとに、リゾチームを用いた機能性食品開発にも繋がると期待できる。

2. 研究の目的

炎症応答は重要な免疫応答の一つであり、傷口などで炎症が起こることによって患部への免疫細胞の集積を誘導し、傷口からバクテリアが侵入するのを阻止している。一方、組織における慢性的な炎症が、メタボリックシンドローム、ガン、神経変性疾患など様々な疾患の誘発原因になっていることが近年明らかになってきている。脂肪組織へのマクロファージの浸潤および慢性的な炎症の誘発が、2 型糖尿病を、また脳内における慢性炎症は、認知症を誘発していることが明らかになっている。

過剰な免疫応答による炎症を抑制する作用を持つ機能性物質の検索を行い、その結果、リゾチームに抗炎症効果があることを確認した。そこで本研究では、リゾチームの抗炎症効果とその作用メカニズムを詳細に解明することを目的として研究に着手した。これまでの予備的な検討によって、リゾチームはリポポリサッカライド (LPS) で過剰炎症を誘発したマクロファージ細胞に対して、インターロイキン (IL)-6 や腫瘍壊死因子 (TNF)- α といった炎症性サイトカインの産生を細胞毒性を示すことなく強力に抑制する効果があることが明らかになった。そこで、免疫系に及ぼすリゾチームの影響の解明を最終目標として捕らえ、本研究課題では炎症状態にあるマクロファージに対する抗炎症効果とその作用メカニズムの解明、および炎症モ

デルマウスに対するリゾチームの経口投与の効果을明らかにすることを目的とし、得られた学術エビデンスをもとにした機能性食品開発への展開を図る。さらに、ヒト介入試験の実施に向けたリゾチームの機能性に関する基礎的データの蓄積も大きな目的の一つである。

3. 研究の方法

(1) 過剰炎症状態のマクロファージに対するリゾチームの抗炎症効果の解明

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に加え、より生体に近いマクロファージとして、メス BALB/c マウスの腹腔から腹腔マクロファージ (P-Mac) を回収して実験に用いた。

上記マクロファージを、LPS で刺激することで炎症状態とした後、卵白リゾチームを使用させ、培養液中に分泌された IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン量を酵素抗体法で定量することで抗炎症効果を評価した。また、貪食活性に及ぼす効果については、テキサスレッドで蛍光標識したザイモサン A の取り込みをフローサイトメーターにより統計的に解析した。さらに、活性酸素種である NO の産生に及ぼす影響については、グリース試薬による NO 定量法を用いて測定した。

LPS は、マクロファージ表面上に存在する トール様受容体 (TLR) 4 に結合し、細胞内シグナル伝達を惹起する。最終的には、NF- κ B の細胞質から核内への移行や MAP キナーゼを活性化することによって炎症性サイトカイン遺伝子発現を活性化し、産生を促進することが知られている。そこで、LPS によって活性化された TLR4 シグナル経路のどの部分に対してリゾチームが抑制的に作用しているかを明らかにするため、TLR4 シグナル経路の分子の活性化レベル、特に MAP キナーゼ経路と NF- κ B 経路に着目して、ウエスタンブロットティング法により解析した。

(2) 生体内におけるリゾチームの抗炎症効果の解明

培養細胞で認められているリゾチームの抗炎症効果が、生体内においても認められるかどうかを明らかにするため、LPS を腹腔に投与することで誘導される全身性炎症反応症候群 (SIRS) モデルマウスやデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルマウスに対して卵白リゾチームを経口投与し、腹腔マクロファージの活性化レベルや血中炎症性サイトカインレベルに及ぼす効果を検討した。

SIRS モデルマウスに対するリゾチームの抗炎症効果については、メス BALB/c マウスに卵白リゾチームを 6 日間単回経口投与し、最後の経口投与の 2 時間後に 5 mg/kg 体重で LPS を腹腔内投与することにより SIRS を誘導した。LPS 投与の 2 時間後に血清を回収し、血液中や肝臓や脾臓などにおける炎症性サ

イトカイン濃度(酵素抗体法)や遺伝子発現量(リアルタイム RT-PCR 法)を測定した。

4. 研究成果

(1) 過剰炎症状態のマクロファージに対するリゾチームの抗炎症効果の解明

炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

LPS により過剰炎症状態を誘発したマクロファージに対する抗炎症効果を検討した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を LPS で 1 時間刺激し、炎症性応答を誘導した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄したのち、LPS 非存在下においてリゾチームを作用させた。培養後、培養上清中に産生された IL-6 および TNF- α 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、リゾチームの作用により、炎症性サイトカイン産生が濃度依存的に抑制されることが明らかになった(図 1 上段)。また、BALC/c マウスの腹腔から回収した P-Mac に対しても同様に、濃度依存的に炎症性サイトカイン産生を抑制した(図 1 下段)。

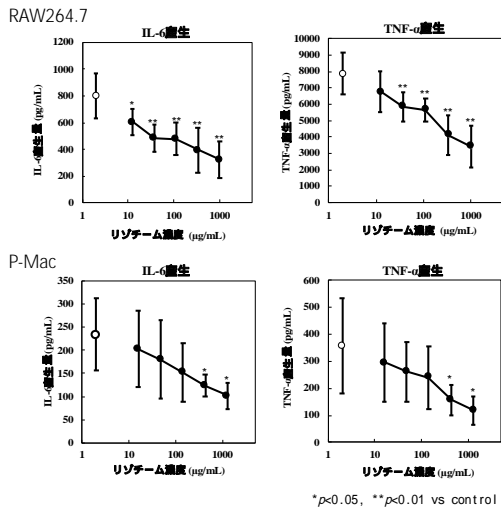


図 1 過剰炎症状態マクロファージの炎症性サイトカイン産生に及ぼすリゾチームの効果

一方、LPS 刺激しない状態の RAW264.7 細胞に対しては、炎症性サイトカイン産生の促進効果は認められず、過剰炎症状態にあるマクロファージに対して抑制的に作用することが明らかになった。また、RAW264.7 細胞に対するリゾチームの抗炎症効果の経時変化を検討したところ、作用 5 時間で効果を示し、少なくとも 23 時間は効果を維持することが明らかになった(図 2)。

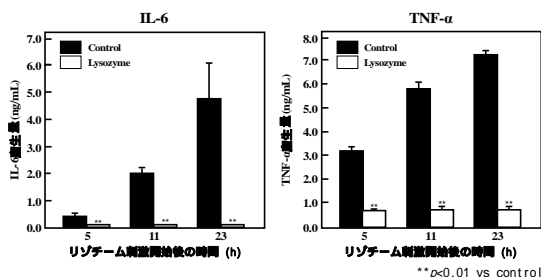


図 2 炎症性サイトカイン産生抑制効果の経時変化

NO 産生に及ぼすリゾチームの影響

一酸化窒素 (NO) は、活性酸素種であり、体内に侵入したバクテリアを殺傷するためにマクロファージによって産生される。LPS 刺激したマクロファージの NO 産生に及ぼすリゾチームの影響を検討した。その結果、RAW264.7 細胞および P-Mac いずれに対してもリゾチームは産生抑制効果を示すことが明らかになった。

貪食活性に及ぼすリゾチームの影響

マクロファージは体内に侵入した微生物を貪食・分解するとともに、分解断片を抗原提示することで、獲得免疫系を活性化する重要な役割を担っている。過剰炎症状態を沈静化する必要はあるものの、貪食活性まで抑制することは、生体防御の観点から、好ましくない。そこで、マクロファージの貪食活性に及ぼすリゾチームの影響を検討した。リゾチーム刺激 5 時間および 11 時間で、Texas-Red で標識した Zymosan A の貪食を指標として、P-Mac の貪食活性に及ぼすリゾチームの影響を検討した。その結果、P-Mac の貪食活性は Control と同等レベルであり(図 3)、リゾチームはマクロファージの貪食活性を抑制することなく、抗炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、リゾチームはマクロファージによる自然免疫応答を抑制することなく、抗炎症効果を示すことが示唆された。

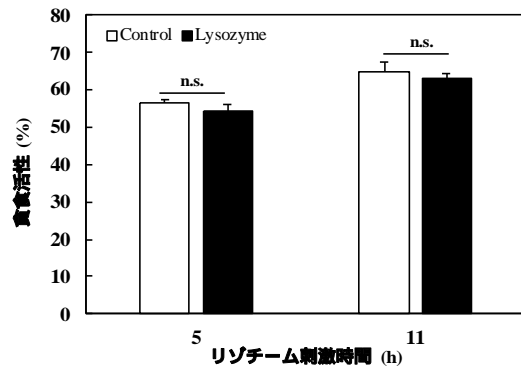


図 3 P-Mac の貪食活性に及ぼすリゾチームの影響

リゾチームの作用メカニズムの解明

炎症性サイトカインや NO 産生が抑制されたことから、その作用メカニズムの解明を行った。まず、P-Mac の炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼすリゾチームの影響について、リアルタイム RT-PCR を用いて経時変化を検討した。リゾチーム処理 5、11、23 時

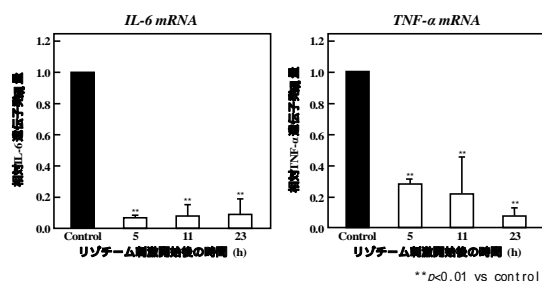


図 4 P-Mac の遺伝子発現に及ぼすリゾチームの影響

間の IL-6 および TNF- α の遺伝子発現量を検討した結果、リゾチーム処理 5 時間において、明らかに遺伝子が抑制され、それが維持されることが明らかになった (図 4)。

遺伝子発現が抑制されたことから、マクロファージの遺伝子発現の抑制メカニズムを検討した。リゾチームは、マクロファージ細胞表面上の LPS 受容体である TLR4 を起点とするマクロファージ活性化シグナル伝達に影響を及ぼし、転写活性を抑制しているのではないかと推察された。そこで、TLR4 シグナル伝達の下流にあり、転写活性を調節している MAP キナーゼ経路と NF- κ B 経路に及ぼす影響を検討した。ERK、JNK および p38 の MAP キナーゼのリン酸化による活性化レベルに及ぼす影響を検討した結果、リゾチーム処理により JNK のリン酸化レベルが有意に抑制された。一方、ERK および p38 のリン酸化レベルには変化は認められなかった (図 5)。これらの結果より、リゾチームは JNK のリン酸化抑制を通して炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

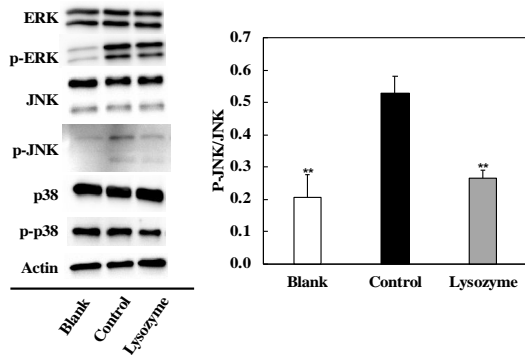


図 5 MAP キナーゼ経路に及ぼすリゾチームの影響

また、NF- κ B 経路に及ぼす影響を検討した結果、リゾチームは、NF- κ B の核内移行には影響しないことが明らかになった。以上のことから、リゾチームは、JNK の活性化レベルを抑制することで炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルを下方制御し、その結果、炎症性サイトカインの産生量を抑制することで、抗炎症効果を発揮することが推察された。

(2) 生体内におけるリゾチームの抗炎症効果の解明

リゾチームの生体内における抗炎症効果を明らかにするため、まず、LPS 誘導性の全身性炎症反応症候群 (SIRS) モデルマウスに対する経口投与の効果を検討した。メス 5 週齢の BALB/c マウスに 6 日間リゾチームを単回経口投与した後に、LPS (5.0 mg/kg 体重) を腹腔内投与することによって全身性炎症反応を誘導した。Intact 群 (炎症非誘導群)、Control 群 (炎症誘導群)、リゾチーム低用量投与群 (炎症誘導およびリゾチーム 4.5 mg/kg

体重/day 投与)、リゾチーム中用量投与群 (炎症誘導および 450 mg/kg 体重/day 投与)、リゾチーム高用量投与群 (炎症誘導およびリゾチーム 2250 mg/kg 体重/day 投与) の 5 群で検討した。まず、LPS 投与の 2 時間後に血清を回収し、血清中の IL-6 および TNF- α 量を測定したところ、Control 群と比べて高用量群において IL-6 および TNF- α 量が有意に抑

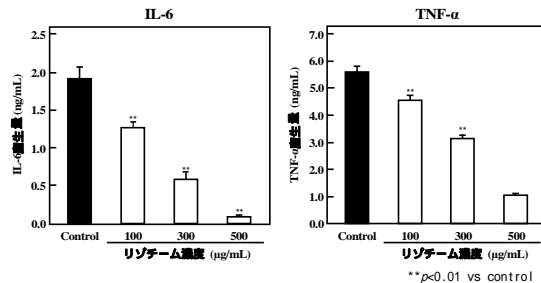


図 6 SIRS モデルマウスに及ぼすリゾチームの経口投与の影響

制された (図 6)。また、有意な差はなかったものの、中用量群においても抑制傾向がみられた。

脾臓組織中の IL-6 および TNF- α 量を検討したところ、Control 群と比べて中用量群および高用量群において有意な抑制が認められた。そこで、脾臓組織中における各サイトカインの遺伝子発現レベルを検討したところ、高用量群において IL-6 の遺伝子発現の有意な抑制が認められた。また、有意差は認められなかったものの、中用量群においても抑制的な傾向が認められた。さらに、脾臓中の他の炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討した結果、IL-1 および IL-12 の遺伝子発現も高用量群で有意に抑制された。IL-1 は単球、マクロファージをはじめとして樹状細胞や好中球など様々な細胞から産生される。一方、IL-12 はマクロファージや好中球、

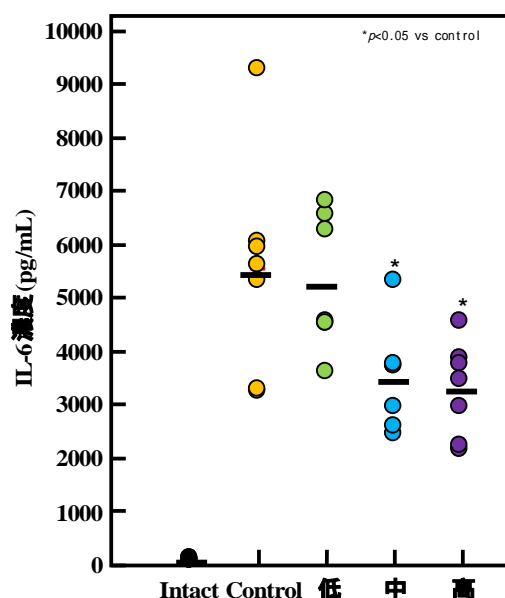


図 7 脾臓 IL-6 濃度に及ぼすリゾチームの経口投与の影響

樹状細胞から主に産生されることから、リゾチームは生体内においてマクロファージ以外の細胞にも抗炎症作用を示す可能性が示唆された。さらに、脾臓における IL-6 量についても、高用量投与および中用量投与によって、顕著に抑制された(図7)。

また、DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに対するリゾチームの経口投与(高用量:150 mg/kg体重/day、低用量:15 mg/kg体重/day)の影響を検討したところ、大腸の長さの改善など、大腸炎症状に対する顕著な緩和効果は認められなかったものの、血便症状に対しては、有意な改善効果が認められた。

本研究において、リゾチームはマクロファージに取り込まれた後に、JNK のリン酸化を下方制御することで、LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。また、SIRS モデルマウスの血清中サイトカイン量が有意に抑制されたことから、リゾチームは生体における炎症症状を緩和することが示唆された。リゾチームは、リンパ球系細胞の抗体産生を促進する効果がある一方、炎症状態のマクロファージや炎症モデルマウスに対して、抑制的に作用することが明らかになった。リゾチームの免疫系に及ぼす効果に関する研究は、他には例がない。全身性炎症モデルに対するリゾチームの投与効果については、当初予想していた効果と比較して、血中の炎症性サイトカインレベルの低下だけでなく、脾臓や肝臓など広範囲の器官に対しても抗炎症効果を示したことは、予想外の発見であった。以上のことから、本研究により、リゾチームは、単に溶菌による細菌の侵入を抑制する化学的バリアとしてだけでなく、自然免疫系、および獲得免疫系において、免疫細胞の活性を調節し、少なからず免疫系の調節に関わっていることを始めて明らかにすることができた。この研究成果をさらに発展させることで、リゾチームの免疫調節機能の全容を明らかにし、さらにはリゾチームを機能性食品素材として利用できるのではないかと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) A. Tagashira, K. Nishi, S. Matsumoto, M. Ishida and T. Sugahara: Anti-inflammatory effect of lysozyme from hen egg white on mouse peritoneal macrophages. *Cytotechnology*, In press, 2018. **査読有**
DOI:10.1007/s10616-017-0184-2
- (2) M. Ishida, K. Nishi, N. Kunihiro, H. Onda, S. Nishimoto and T. Sugahara: Immunostimulatory effect of aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. seed on

macrophages., *J. Sci. Food Agr.*, **97**, 4727-4736, 2017. **査読有**
DOI:10.1002/jsfa.8341

- (3) S. Wijanarti, A.B.N. Putra, K. Nishi, E. Harmayani and T. Sugahara: Immunostimulatory activity of snake fruit peel extract on murine macrophage-like J774.1 cells., *Cytotechnology*, **68**, 1737-1745, 2016. **査読有**
DOI:10.1007/s10616-015-9925-2
- (4) S. Yasunaga, M. Domen, K. Nishi, A. Kadota and T. Sugahara: Nobiletin suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by regulating MAPK signaling in 3T3-L1 cells., *J. Funct. Foods*, **27**, 406-415, 2016. **査読有**
DOI:10.1016/j.jff.2016.09.025

〔学会発表〕(計5件)

- (1) A. Tagashira, K. Nishi, S. Matsumoto and T. Sugahara: Anti-inflammatory effect of lysozyme., The 11th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF2018), October 14-17, 2018, Vancouver, Canada.
- (2) A. Tagashira, K. Nishi, S. Matsumoto and T. Sugahara: Anti-inflammatory effect of lysozyme from hen egg white on macrophages., The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF2017), October 22-25, 2017, Gunsan, Korea.
- (3) 田頭歩佳、西 甲介、松本真弥、菅原卓也: 卵白由来リゾチームのマクロファージに対する抗炎症効果, 日本動物細胞工学会 2017 年度大会 (JAACT2017), 2017 年 7 月 20-21 日 松山市.
- (4) A. Tagashira, T. Okamoto, A. Yamauchi, K. Nakano, K. Nishi and T. Sugahara: Effects of 3-phenylamino-L-alanine (PAA) and 4-aminophenol (4-AP) on chemotaxis and expression of chemokine receptors in human eosinophils., The 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), October 24-27, Melbourne, Australia.
- (5) T. Sugahara, S. Matsumoto and K. Nishi: Effect of lysozyme on RAW264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide., The 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), October 24-27, Melbourne, Australia.

〔その他〕

ホームページ等

愛媛大学農学部応用生命化学専門教育コ

ー ス動物細胞工学教育分野
<http://web-amb.agr.ehime-u.ac.jp>
愛媛大学農学部附属食品健康科学研究センター
<http://fhsrc.agr.ehime-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 卓也 (SUGAHARA, Takuya)
愛媛大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00263963