

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05893

研究課題名（和文）IL-12を介したNK細胞を活性化する食品成分の探索・解析

研究課題名（英文）Search and analysis of food substances which could activate NK cells via IL-12

研究代表者

薩 秀夫（Sa, Hideo）

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：80323484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：感染症などに対する生体防御に重要なNK細胞を活性化するインターロイキン12（IL-12）に注目し、マクロファージモデル細胞を用いてIL-12の発現を亢進する乳酸菌株の探索をおこなった。その結果、2種類の乳酸菌株が顕著にIL-12の発現・分泌を亢進することを見出した。さらに菌株の一つは、主として菌体RNAがTLRなど細胞内シグナル分子を介してIL-12発現を亢進することを見出した。また、この菌株をマウスに経口投与した結果、一部の臓器でIL-12の発現亢進が確認された。さらに本菌株を粉末化した菌体においてもIL-12発現亢進能が確認され、様々な食品への添加が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年の世界的な感染症含め感染症などに対する生体防御能を高めることが期待される食品成分を、特に乳酸菌の中から探索・解析した。その結果、生体防御に大きく関わるナチュラルキラー細胞を活性化するインターロイキン12（IL-12）の発現・分泌を顕著に亢進する乳酸菌株を新たに見出すことができた。さらに1株については、菌株によるIL-12発現亢進について、新たな細胞内シグナル伝達経路を介していることを見出すに至った。さらに今回見出された乳酸菌株は、大量調製に向けて粉末化した状態でもIL-12誘導活性を確認することができ、実際の食品への添加など新たな食品開発への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on interleukin-12 (IL-12), which activates NK cells, important immune cells for defense against infectious diseases, and searched for and analyze lactic acid bacteria strains that enhance the expression and secretion of IL-12 using macrophage-like cells. As a result, we found that two types of lactic acid bacteria (LAB) strains markedly enhanced IL-12 mRNA expression and secretion. In addition, one strain was found to enhance IL-12 expression mainly through intracellular signaling molecules, such as TLR, in the RNA of this strain. Further, oral administration of this LAB strain to mice up-regulated IL-12 mRNA expression in some organs. The powdered form of the strain was also found to enhance IL-12 expression, suggesting that this LAB strain can be added to and applied in various food products.

研究分野：食品機能学

キーワード：乳酸菌 インターロイキン12 マクロファージ ナチュラルキラー細胞

1. 研究開始当初の背景

少子高齢化が進んだ現代の日本においては、乳幼児・小児など子供の健全な成長と、高齢者の健康維持・健康寿命の延伸が望まれている。しかしながら日常生活の中で、我々の周りには病原性微生物を含む様々な微生物が無数に存在しており、常に感染症の脅威と隣り合わせであり、実際に近年世界的な感染症に曝された(曝されている)ことも事実である。感染症に対する防御には免疫能・生体防御能が極めて重要であるが、幼児・小児はまだ免疫能が十分に備わっておらず、かたや高齢者においては加齢とともに免疫能が低下することが知られている。

一方、病原菌などの侵入に対する生体防御に関与する自然免疫系の細胞群の一つとして、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)が注目されている。NK細胞は体内で生じたがん細胞やウイルス感染細胞を攻撃して除去する機能を有し、これはNK活性とも呼ばれる。NK活性は小児期から徐々に増加して20代をピークとし、それ以降は加齢とともにその活性が低下することが報告されており、一般に高齢者が感染症に罹患しやすくまた重症化しやすい一因とされる。このNK細胞の活性化に重要な因子として、サイトカインの一種であるインターロイキン12(IL-12)が知られている。IL-12はマクロファージや樹状細胞から分泌されるサイトカインであり、免疫賦活作用が報告されている。すなわち分泌されたIL-12はナイーブCD4T細胞をCD4⁺T細胞へと分化させ、さらにインターフェロン γ (IFN γ)の産生を亢進する。IFN γ はNK細胞を活性化することでウイルス感染細胞やがん細胞などに対する攻撃を増強し、生体防御能を高めることが知られている。従って、IL-12の発現・産生を亢進させることでNK細胞の活性化、ひいては感染防御能の亢進が期待される。

このような背景から本研究では、日常的に摂取する食品によって免疫能、すなわち生体防御能を高め、感染症を予防することを目的として進めることとした。日常的に摂取する食品によって免疫能を高めることができれば、小児や高齢者も手軽に取り入れることででき、免疫能・生体防御能の強化が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では食品成分による生体防御能の増強を大きな目標として、IL-12発現亢進を介してNK細胞を活性化する食品成分、中でも乳酸菌を探索すべく、以下の具体的な目的を持って進めることとする。

- (1) 動物培養細胞を用いて、IL-12発現・分泌を亢進する乳酸菌株を網羅的に探索・解析する。
- (2) (1)で見出された乳酸菌株によるIL-12発現亢進の作用メカニズムを分子・細胞レベルで明らかにする。
- (3) 上記で見出された乳酸菌株について実際に実験動物に投与し、in vivoにおけるIL-12発現への影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マクロファージモデル細胞として、マウス腹水由来J774.1細胞およびRAW264.7細胞を用いた。RPMI培地に10%の牛胎児血清と抗生物質を加えた培地を用いて、100mmディッシュで培養した。細胞が60~80%のコンフレントの状態まで継代をおこなった。

(2) real-time PCR 解析

IL-12のmRNA発現量の解析には、real-time PCR法を用いた。J774.1細胞を24-well plateに 2.5×10^5 cells/wellで播種し、翌日に乳酸菌を含む培地に置き換えた。菌体は、24時間嫌気条件で培養しPBSで洗浄後にオートクレーブ処理した死菌体を用いた。菌体を含む培地でJ774.1細胞を一定時間インキュベートした後、RNAiso Plusを用いてRNAを抽出し、PrimeScript RT Master Mixを用いてcDNAを合成した。IL-12などのprimerとTB Green Premix Ex Taqを用いてQuantStudio 3により解析をおこなった。

(3) ELISA 解析

J774.1細胞からのIL-12分泌量は、sandwich-ELISA法を用いて解析した。96-well plateにJ774.1細胞を 1.0×10^5 cells/wellで播種し、翌日に菌体を含む培地に置き換えインキュベートした。24時間後に培養上清を回収し、ELISAキットを用いてIL-12量を測定してIL-12分泌量とした。

(4) RNA 干渉法

J774.1細胞を 0.3×10^5 cells/wellで播種し、一晚培養した。標的分子のsiRNAとトランスフェクション試薬を混合したものを添加し、37℃で24時間インキュベートした。対照群

には Firefly luciferase(FLUC)の siRNA を用いた。その後、菌体を含む培地と置き換えて、3 時間インキュベート後に RNA を回収して cDNA を合成し、real-time PCR により解析した。

4 . 研究成果

(1) IL-12 の mRNA 発現を亢進する乳酸菌株の探索・解析

野菜の葉などから単離され死菌体処理した乳酸菌株を、J774.1 細胞に数十種類添加して IL-12 mRNA 発現量を亢進する乳酸菌株を探索した。その結果、2 種類の乳酸菌株が IL-12 の mRNA 発現量を顕著に増加させ、これら 2 種の菌株は IL-12 の分泌量も有意に増加させることが確認された。またこれらの菌株を J774.1 細胞と同じマクロファージモデル細胞である RAW264.7 細胞に添加したところ、RAW264.7 細胞においても同様に IL-12 の mRNA 発現亢進がみられた。さらに、見出された乳酸菌株について死菌と生菌で活性を比較したところ、いずれも死菌体の方がより高い IL-12 誘導活性を示した。

(2) 乳酸菌株による IL-12 発現亢進の作用機序解析

そこで 1 種の乳酸菌株に焦点を当て、菌体のどのような成分が IL-12 発現亢進に関与しているのか、各種酵素処理をおこなった結果、RNase 処理によって菌体による IL-12 発現亢進は有意に抑制された。実際に菌体より RNA を抽出し J774.1 細胞に導入したところ IL-12 の mRNA 発現は亢進し、IL-12 発現亢進には菌体 RNA の関与が示唆された。

さらに乳酸菌体による IL-12 発現亢進の細胞内シグナル経路について RNA 干渉法を用いて解析した結果、RNA を認識することが知られる TLR3 および TLR7 をノックダウンしても菌体による IL-12 発現亢進は変化しなかったのに対し、TLR8 をノックダウンした場合には IL-12 発現亢進が有意に抑制され、乳酸菌による IL-12 発現亢進には TLR8 が関与していることが示唆された。また、TLR8 の下流に位置する MyD88 について RNA 干渉法を用いて解析した結果、MyD88 ノックダウン条件下では菌体による IL-12 発現亢進は有意に抑制された。さらに IL-12 の転写制御が報告されている転写因子 IRF5 の関与を同様に検討した結果、IRF5 ノックダウン条件下で IL-12 発現亢進は抑制され、また実際に乳酸菌添加によって IRF5 が核内へ移行することが示された。これらの結果より、主として乳酸菌死菌体中に含まれる RNA がマクロファージモデル細胞内の TLR8 に作用し、MyD88 を介して IRF5 を活性化し IL-12 転写活性を亢進することで、IL-12 発現・分泌を亢進することが示唆された。

(3) IL-12 発現を亢進する乳酸菌株がマウスにおける IL-12 mRNA 発現に及ぼす影響

また本乳酸菌株が *in vivo* においても IL-12 発現を亢進するか、マウスを用いて検討した。6 週齢の Balb/c マウスに本菌株を 3 週間ゾンデで経口投与した後、各種臓器より RNA を抽出し IL-12 の mRNA 発現量を解析した。その結果、菌株の添加によってマウス小腸では IL-12 の mRNA 発現量が増加する傾向がみられ、また肺では有意な増加がみられた。これより本菌株は、*in vivo* においても一部臓器で IL-12 発現を亢進する可能性が示唆された。

(4) 粉末化乳酸菌株が IL-12 mRNA 発現に及ぼす影響の解析

本乳酸菌株を様々な食品に添加・応用しやすくすることを考慮し、粉末化した本乳酸菌株を調製・検討した。粉末化乳酸菌について IL-12 の mRNA 発現に及ぼす影響を検討したところ、IL-12 の mRNA 発現を菌数依存的に亢進した。また粉末化乳酸菌は、同じ菌数のこれまで用いてきた死菌体処理した乳酸菌（懸濁状態）と同程度に IL-12 の mRNA 発現を亢進した。これらの結果より、本乳酸菌株は粉末化しても IL-12 発現亢進能は保持されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satsu H. Kimura S. Hori Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Physiological effects of food ingredients on intestinal epithelial cell function.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 100499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2023.100499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 薩 秀夫、梅谷華奈、日浦月穂、柴田奈那、鈴木政彦、辻川勇治、坂根 巖	4. 巻 25
2. 論文標題 IL-12発現を亢進するプロバイオティクスの探索・解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 前橋工科大学研究紀要	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Satsu H. Gondo Y. Shimanaka H. Imae M. Murakami S. Watari K. Wakabayashi S. Park S.J. Nakai K. Shimizu M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Signaling Pathway of Taurine-Induced Upregulation of TXNIP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12070636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 薩 秀夫、権藤 祐輔、嶋中 花、井前 正人、村上 茂、和多利 研二、堀 友稀、清水 誠	4. 巻 9
2. 論文標題 タウリンによるTXNIP発現制御の細胞内シグナル解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 タウリンリサーチ	6. 最初と最後の頁 35-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 薩 秀夫、権藤 祐輔、嶋中 花、井前 正人、村上 茂、和多利 研二、若林 俊一、 朴 聖俊、中井謙太、清水 誠	4. 巻 8
2. 論文標題 タウリンによるTXNIP転写活性亢進機構の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 タウリンリサーチ	6. 最初と最後の頁 11-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 藤原唯信、柴田奈那、村田美樹、浅見進也、薩秀夫
2. 発表標題 漬物由来乳酸菌SSL-1株によるIL-10発現亢進の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木政彦、辻川勇治、山本純也、坂根巖、北澤春樹、薩秀夫
2. 発表標題 緑茶葉由来乳酸菌の IL-12発現誘導効果とメカニズム解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原唯信、柴田奈那、村田美樹、浅見進也、薩秀夫
2. 発表標題 粉末化漬物由来乳酸菌によるサイトカイン発現制御の解析
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 政彦、辻川 勇治、坂根 巖、北澤春樹、薩 秀夫
2. 発表標題 緑茶葉より単離した乳案菌のIL-12発現誘導の作用機序の解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideo Satsu
2. 発表標題 Regulation of gene expression and cell function by taurine
3. 学会等名 22th IUNS- ICN (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田奈那、日浦月穂、村田美樹、浅見進也、薩 秀夫
2. 発表標題 漬物由来乳酸菌によるIL-12発現制御の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 政彦、辻川 勇治、坂根 巖、Julio Villena、北澤春樹、薩 秀夫
2. 発表標題 お茶由来乳酸菌の単離および免疫調節作用の検証
3. 学会等名 日本食品免疫学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田奈那、薩秀夫
2. 発表標題 発酵漬物由来Lactiplantibacillus plantarum株によるIL-12発現亢進の作用機序解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki, M., Hiura, T., Satsu, H., Tsujikawa, Y., Sakane, I., Villena, J., Kitazawa, H.
2. 発表標題 Immunomodulatory effects of lactobacilli from green tea leaf in murine macrophages and intestinal epithelial cells: the role of bacterial RNA
3. 学会等名 The 11th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田奈那、日浦月穂、村田美樹、浅見進也、薩 秀夫
2. 発表標題 IL-12発現亢進を介した免疫賦活能を有する漬物由来乳酸菌の探索・解析
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsukiho Hiura, Masahiko Suzuki, Kana Umetani, Mizuki Honda, Yuji Tsujikawa, Iwao Sakane, Hideo Satsu
2. 発表標題 Enhancement of IL-12 Expression by Probiotics in Macrophage-like Cells
3. 学会等名 International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田奈那、村田美樹、浅見進也、薩 秀夫
2. 発表標題 漬物由来乳酸菌によるIL-12発現制御の解析
3. 学会等名 第25回日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部2020年度合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日浦月穂、鈴木政彦、本田瑞希、辻川勇治、坂根 巖、薩 秀夫
2. 発表標題 IL-12発現を亢進する乳酸菌の探索および作用機序の解析
3. 学会等名 第25回日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部2020年度合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田奈那、日浦月穂、村田美樹、浅見進也、薩 秀夫
2. 発表標題 漬物由来乳酸菌によるIL-12発現制御の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日浦月穂、鈴木政彦、本田瑞希、辻川勇治、坂根 巖、薩 秀夫
2. 発表標題 Lactobacillus plantarum LOC1によるIL-12発現誘導の作用機序の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Satsu H. Fukumura M. Watari K.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 -
3. 書名 Regulation of CXCR4 expression by taurine in macrophage-like cells (in Taurine 12)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------