

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380077

研究課題名（和文）食物質による腸上皮の免疫制御機能の修飾に関する分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Molecular Mechanisms for Modulation of Immune-Regulatory Function of Intestinal Epithelia by Food Factors

## 研究代表者

戸塚 護（TOTSUKA MAMORU）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70227601

研究成果の概要（和文）：腸管上皮細胞（IEC）の免疫制御機能を調節する食品因子を解析した。カルノシンは IEC の菌体成分刺激により誘導されるサイトカイン産生を増強した。その培養上清は粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生を増強し、経口投与によりマウス小腸粘膜の IgA 産生が亢進した。IEC の IgA 輸送に関わるタンパク質発現をビフィズス菌体が増強すること、乳酸菌の経口投与が制御性 T 細胞を誘導し経口免疫寛容を増強すること、ナリンゲニンが制御性 T 細胞を誘導することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Function of food factors that modulate immune-regulatory functions of intestinal epithelial cells (IEC) was analyzed. Carnosine enhanced the cytokine secretion from IEC stimulated with bacterial components. The supernatant of the IEC upregulated IgA production by B cells derived from mouse lamina propria. Oral administration of carnosine increased the amount of IgA in mucosa of the mouse small intestine. We also found that bifidobacteria upregulated the expression of a transcytotic carrier protein for IgA in IEC, that oral administration of lactobacilli induced regulatory T cells and enhanced oral tolerance induction, and that naringenin has the capacity to induce regulatory T cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管上皮細胞、Toll 様受容体、腸管免疫系、IgA、サイトカイン、プロバイオティクス、カルノシン

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 腸上皮の免疫制御機能

腸管上皮細胞（intestinal epithelial cell; IEC）は物理的バリアを形成するとともに、自然免疫系の作用により感染防御に働

く。IEC は Toll 様レセプター（TLR）や NOD1 などを介して病原体の成分を認識すると、炎症性サイトカイン・ケモカインを産生し、他の貪食細胞・リンパ球との協同により病原体の排除を行う。また、B 細胞の IgA クラス

イッチに重要な働きをする APRIL (*Immunity* 26: 812-26, 2007)、樹状細胞に作用し 2 型ヘルパー T 細胞分化を誘導する TSLP (*Nature Immunology* 6: 507-14, 2005) などのサイトカインを分泌することで、腸管免疫機能を制御する可能性が示されている。一方、IEC は多量体免疫グロブリンレセプター (pIgR) を介して上皮下の粘膜固有層で産生された IgA を管腔内に輸送する。

IEC の免疫制御機能は非常に多岐にわたるが、他にも様々なサイトカイン・細胞表面分子の発現が知られており、未知の免疫制御機能の存在も十分予想される。また、腸管上皮細胞間に存在する T 細胞 (IEL) の機能も未解明である。常に食物質に曝されていることを考えても、免疫調節機能を有する食物質の作用点として、腸上皮は重要な位置を占めていると考えられる。

## (2) 腸管上皮細胞株

IEC の免疫制御機能の研究には、主にヒト結腸ガン由来の IEC 培養株 (Caco-2, HT-29 など) が用いられてきた。これらは研究者の解釈により小腸 IEC、大腸 IEC あるいは大腸がん細胞のモデルとして使い分けられている。また、ヒト腸管免疫細胞の調製は困難であることから、ヒト IEC 株との相互作用の解析には培養株あるいは末梢血由来のリンパ球を用いることが多く、生体内での細胞間相互作用を反映していない可能性が危惧される。

著者らはマウス IEC を用いることにより、上記の問題点の解決を図った。これまでに胎仔マウス IEC の初代培養法を確立し、これにガン遺伝子 (SV40 Large T 抗原) を導入して不死化することにより、新規マウス小腸および大腸由来 IEC 株を樹立してきた。これらの IEC 株を用い、マウス腸管由来の各種免疫細胞との相互作用を解析することにより、IEC の免疫制御機能の解析が可能であると考えた。

## (3) 食物質による腸上皮の免疫制御機能の修飾

プロバイオティクス、植物化学物質、タウリン、ヒスチジンなどが IEC の炎症性サイトカイン産生を抑制する作用をもつことが報告されている。また、応募者らはヌクレオチドの経口摂取が IEC の IL-7 産生を増強し、 $\gamma\delta$  型 TCR 陽性 IEL を増加させること (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1459-65, 2000)、リンゴポリフェノールの経口摂取でも  $\gamma\delta$  型 TCR 陽性 IEL が増加すること (*FEBS Lett.* 579 (20): 4479-4484, 2005) を報告している。しかしながら、IEC の APRIL や TSLP などのサイトカインを介した腸管免疫応答制御、腸管 T 細胞に対する抗原提示などへの食物質の影響についての研究はほとんど例がなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、腸管上皮細胞の免疫制御機能を明らかにすること、また腸管上皮の機能を調節する働きをもつ食品成分を明らかにし、その作用機構を解明することを目的とした。まず、今後の腸管上皮細胞の免疫制御機能の研究推進に資するべく、成体マウスから新規に小腸および大腸上皮細胞株の樹立を行った。また、ヒト腸上皮細胞株 Caco-2 細胞及びマウス小腸 IEC 株を用いて、カルノシン ( $\beta$ Ala-His)、ビフィズス菌の腸管上皮細胞に対する作用およびその作用メカニズムについて解析を行った。また、乳酸菌の腸管免疫系に対する作用、特に経口免疫寛容誘導に対する乳酸菌の働きについて解析した。腸管において制御性 T 細胞を誘導しうる食品成分の探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規成体マウス由来腸管上皮細胞株の樹立

成体の BALB/c マウスの小腸および大腸由来 IEC の初代培養にガン遺伝子 (SV40 Large T 抗原) をレトロウイルスベクターを用いて導入することにより不死化し、さらにクローン化することによって IEC 株を樹立した。

### (2) 食品成分が IEC のサイトカイン産生に与える効果の解析

2 週間培養して分化させた Caco-2 細胞をカルノシンとともに 24 時間培養し、その後カルノシンと各種 TLR リガンドを加えて培養した。培養上清中のインターロイキン 8 (IL-8) 量を酵素免疫測定法 (ELISA) にて定量した。また、Caco-2 細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成を行った後、リアルタイム PCR を用いた定量 RT-PCR 法により IL-8 mRNA を定量した。ヒト IL-8 プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した遺伝子を Caco-2 細胞に導入し、レポーターアッセイを行うことにより、カルノシンの作用が転写段階で働いているのかどうかを検討した。また、各種阻害剤を用いて、関連する細胞内シグナル伝達経路を解析した。

また、マウス小腸上皮細胞株 (MoS13 細胞) を各種食品成分 (カルノシン、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 株、リンゴポリフェノール) とともに 24 時間培養し、その後それぞれの食品成分と各種 TLR リガンドの存在下、非存在下で培養した。培養上清中の IL-6 量を ELISA 法にて定量し、IL-6 mRNA 量を定量 PCR 法で定量した。IL-6 プロモーターレポーターアッセイ、各種阻害剤を用いた関連する細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

### (3) 小腸上皮細胞株の培養上清が粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生に与える影響の解析

各種食品成分、あるいは食品成分と TLR リ

ガンド刺激の存在下で培養した MoS13 細胞の培養上清を、BALB/c マウス小腸粘膜固有層から単離した B 細胞に添加し、その培養上清中の IgA 量を ELISA 法にて定量した。

(4) カルノシンの経口投与が腸管 IgA 産生に与える効果

0.5%カルノシンを含む飲水を BALB/c マウスに 2 週間自由摂取させた後、小腸粘膜中の IgA 量を ELISA 法にて測定した。

(5) ビフィズス菌が IEC の pIgR 発現に与える効果

BALB/c マウスおよび MyD88 遺伝子欠損マウス胎仔腸管の組織培養系にビフィズス菌の加熱死菌体を添加し、pIgR mRNA の発現、pIgR タンパク質量を定量した。

(6) 乳酸菌の経口投与が経口免疫寛容誘導に与える効果

卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスである D011.10 マウスに、OVA 含有水を自由摂取させることにより経口免疫寛容を誘導する実験系において、乳酸菌 (*Lactobacillus gasseri* OLL2809 株) の経口投与の効果を検討した。脾臓および腸管リンパ組織の T 細胞におけるサイトカイン産生、制御性 T 細胞機能、細胞表面分子発現を解析した。また、乳酸菌を BALB/c マウスに経口投与し、その腸管に存在する樹状細胞の機能、腸管粘膜におけるケモカインの発現を解析した。

(7) 制御性 T 細胞を誘導する食品成分の検索

BALB/c マウス脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞の *in vitro* 分化誘導系において、各種食品成分を添加して分化誘導した。その T 細胞が、他の T 細胞応答を抑制する機能をもつかどうかを解析した。また、その T 細胞のサイトカイン産生、制御性 T 細胞マーカーの発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 新規成体マウス由来腸管上皮細胞株の樹立

新規マウス小腸 IEC 株 (aMoS7) および大腸 IEC 株 (aMoC1) を樹立した。これまでに樹立したマウス胎仔小腸 IEC 株である MoS13 細胞、胎仔大腸 IEC 株である MoC5 細胞とともに、今後の IEC の研究に大きく貢献することが期待され、実際これらの細胞株を利用する多くの研究者との共同研究が進行中である。

(2) カルノシンによる IEC 機能の調節

カルノシンは TLR1/2、TLR2/6、TLR5 の各リガンド刺激で誘導された Caco-2 細胞の IL-8 産生を亢進し、IL-8 プロモーター活性も増強した。IL-8 産生亢進効果には p38 MAPK 経路が関与していることが示唆された。一方、カルノシンは TLR3、TLR7 リガンドで誘導される IL-8 産生を抑制した。カルノシンは MoS13 細胞においても、Pam3CSK4 (TLR1/2 リ

ガンド) 刺激で誘導される IL-6 分泌、IL-6 mRNA 発現、IL-6 遺伝子プロモーター活性を増強した。カルノシン単独処理でもわずかながら IL-6 産生の増強が認められた。TLR シグナル経路とは異なるシグナル経路を活性化することで、カルノシンと TLR リガンド刺激との相乗効果が生み出されていることが示唆された。

また、リンゴポリフェノールについてもカルノシンと同様の処理を行った場合に MoS13 細胞の IL-6 産生増強効果が観察された。本研究で用いた *in vitro* 実験系を評価系としてカルノシンと同様の活性を有する食品成分を検索することが可能となった点で意義が大きいと考えている。

(3) 食品成分の IEC への作用を介した IgA 産生増強効果

ビフィズス菌の加熱死菌体、あるいは Pam3CSK4 で刺激した MoS13 細胞の培養上清は、未刺激の培養上清と比べて、より強く BALB/c マウス腸管粘膜固有層に存在する IgA 抗体形質細胞の IgA 抗体産生を増強した。カルノシン処理とともに TLR リガンド刺激して得られた培養上清はさらに IgA 抗体産生を増強した。この IgA 抗体産生増強効果は IL-6 中和抗体の添加によって抑制された。

0.5%カルノシンを含む飲料水を 2 週間自由摂取させた BALB/c マウスの小腸内腔粘膜組織中の IgA 抗体量を調べた。その結果、空腸および回腸において、粘膜組織中 IgA 抗体量は対照群に比べてカルノシン投与群で有意に高い値を示した。このことから、カルノシンの経口投与はマウス腸管粘膜の IgA 産生を増強することが明らかとなった。今後、このカルノシン投与による IgA 産生誘導が、*in vitro* で観察したような IEC への作用により誘導されているのかを検討する必要がある。また、カルノシンのように IgA 産生を増強する作用を有する食品成分は、ウイルス等からの感染防御にも有効である可能性があり、今後その検討を行う予定である。

(4) ビフィズス菌による IEC の pIgR 発現誘導効果

ビフィズス菌の加熱死菌体を、マウス新生仔腸管 (空腸、回腸、大腸) の組織培養系に添加することにより pIgR の発現が有意に亢進した。この pIgR 発現亢進効果は、IL-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウス由来の腸管組織では認められなかったのに対し、MyD88 遺伝子欠損マウス由来の腸管組織では認められなかったことから、腸管上皮細胞が TLR を介してビフィズス菌体を認識し、pIgR 発現が誘導されることが示唆された。

(5) 乳酸菌の経口投与による経口免疫寛容誘導の増強

D011.10 マウスに、卵白アルブミン含有水を自由摂取させることにより経口免疫寛容

を誘導する実験系において、乳酸菌 (*L. gasseri* OLL2809 株) の生菌を強制経口投与した場合に、より早期に T 細胞応答の低下が誘導され、経口免疫寛容の誘導が増強された。この時、脾臓細胞の IL-10 産生および T 細胞応答抑制活性の上昇が観察され、これが制御性 T 細胞画分の増加と活性増強によるものであることが示唆された。また、BALB/c マウスに乳酸菌を経口投与した際に、腸管における形質細胞様樹状細胞数が増加すること、この樹状細胞が制御性 T 細胞をより強く誘導することが示された。この形質細胞様樹状細胞の増加に IEC からのケモカイン産生が関与している可能性を今後検討する予定である。

経口免疫寛容は食物アレルギー発症・寛解に深く関与していると考えられ、経口免疫寛容誘導を増強する食品成分は、食物アレルギーからの寛解を促進する働きが期待できる。(6) 制御性 T 細胞を誘導する食品成分の検索

芳香族炭化水素受容体 (AhR) のリガンドに制御性 T 細胞を誘導する活性が認められていることから、植物化学成分から AhR 活性化機能を有するものを検索し、それらについて BALB/c マウス脾臓 CD4+T 細胞の制御性 T 細胞への分化誘導活性を調べたところ、柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンゲニンにその活性が見いだされた。ナリンゲニンを経口摂取した場合に腸管上皮で起こる変化を今後解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Hsi-Kai Wang, Chen-Hao Yeh, Taku Iwamoto, Hideo Satsu, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka, Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有り, Vol.60 (2): 2172-2178, 2012, 10.1021/jf204625y.
- ② Yoshitaka Nakamura, Masaki Terahara, Kiyoshi Yamada Masatake Asano, Shigeru Kakuta, Yoichiro Iwakura, Mamoru Totsuka, Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression induced by heat-inactivated potential probiotics, *Bifidobacterium bifidum* OLB6378, in mouse intestinal explant model, *Scandinavian Journal of Immunology*, 査読有り, Vol.75 (2): 176-183, 2012, 10.1111/j.1365-3083.2011.02645.x
- ③ Ayako Yoshida, Kiyoshi Yamada, Yasumasa Yamazaki, Toshihiro Sashihara, Shuji Ikegami, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka,

*Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA directly suppress proliferation of CD4+ T cells through a MyD88-dependent signalling pathway, *Immunology*, 査読有り, Vol.133 (4): 442-451, 2011, 10.1111/j.1365-2567.2011.03455.x

- ④ Taku Iwamoto, Kiyoshi Yamada, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka, Analysis of immunological functions of small and large epithelial cell lines established from adult mouse intestinal crypt, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, Vol.75 (5): 925-929, 2011, 10.1271/bbb.100887.
- ⑤ HeeSun Shin, Zhaohui Zhao, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka, Makoto Shimizu, Synergistic effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and hydrogen peroxide on the induction of IL-8 production in human intestinal Caco-2 cells, *Inflammation*, 査読有り, Vol. 34(5): 440-447, 2011, 10.1007/s10753-010-9251-y.
- ⑥ Tetsunosuke Mochizuki, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka, and Makoto Shimizu, Transepithelial transport of macromolecular substances in IL-4 treated human intestinal T84 cell monolayers, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, Vol.73 (11): 2422-2426, 2009, 10.1271/bbb.90383.
- ⑦ Kiyoshi Yamada, Kanako Sato, Satoru Morishita, Shuichi Kaminogawa, and Mamoru Totsuka, Establishment of a primary culture method for mouse intestinal epithelial cells by organ culture of fetal small intestine, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, Vol.73 (8), 1849-1855, 2009, 10.1271/bbb.90246.

[学会発表] (計 28 件)

- ① 津田 悠一、腸管上皮細胞の Toll 様受容体刺激を介した免疫調節機能に対するカルノシンの亢進効果、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22-25 日、京都女子大学 (京都府)
- ② 王 璽凱、柑橘類由来ナリンゲニンにより誘導されるマウス制御性 T 細胞の機能解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22-25 日、京都女子大学 (京都府)
- ③ Wang, H-K, Screening and evaluation of dietary aryl hydrocarbon receptors (AhR) ligands inducing differentiation of regulatory T cells, 5th International Conference on Food Factors, 2011 年 11 月 20-23 日, Taipei

International Convention Center (台北、台湾)

- ④ 戸塚 護、腸管上皮細胞の IgA 輸送活性および IgA 産生誘導活性を増強する食品成分の評価、日本動物細胞工学会 2011 年度大会、2011 年 7 月 22 日、東京大学山上会館 (東京都)
- ⑤ 吉田綾子、*Lactobacillus gasseri* OLL2809 投与による粘膜固有層における経口免疫寛容誘導の促進、第 15 回腸内細菌学会、2011 年 6 月 16 日、東京医科歯科大学 M&D タワー大講堂 (東京都)
- ⑥ 戸塚 護、IgA 系粘膜免疫の食品因子による増強、第 11 回日本抗加齢医学会総会、2011 年 5 月 28 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑦ 吉田綾子、Analysis of regulatory CD4+ T cell subsets induced by oral administration of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 in orally tolerized D011.10 mice, 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑧ 岩本拓、Comparative analysis of the expression of Toll-like receptors and cytokines in epithelial cell lines and ex vivo cells from mouse small and large intestines, 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑨ 津田悠一、マウス腸管上皮細胞の Toll 様受容体リガンド刺激で誘導されるサイトカイン産生に対する食品因子の増強作用、第 6 回日本食品免疫学会学術大会、2010 年 5 月 1-2 日、東京大学 (東京都)
- ⑩ 岩本拓、成体マウス由来小腸および大腸上皮細胞株の樹立と免疫機能解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 25-28 日、京都女子大学 (京都府)
- ⑪ 吉田綾子、*Lactobacillus gasseri* OLL2809 の経口投与による D011.10 マウスの経口免疫寛容誘導の強化、日本免疫学会 2009 年度大会、平成 21 年 12 月 3 日、グランキューブ大阪 (大阪)
- ⑫ 戸塚 護、腸管上皮細胞による IgA 輸送および産生誘導の食品由来因子による増強、第 3 回日本食品免疫学会シンポジウム、平成 22 年 1 月 18 日、東京大学 (東京)
- ⑬ 岩本 拓、マウス小腸および大腸由来上皮細胞株の菌体成分に対する応答の比較解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、平成 22 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)
- ⑭ 岩本 拓、マウス小腸、大腸由来上皮細胞株における免疫関連分子の発現および微生物成分に対する応答の比較解析、第 5

回日本食品免疫学会学術大会、平成 21 年 5 月 26 日、東京大学 (東京)

- ⑮ 吉田綾子、*Lactobacillus gasseri* OLL2809 の経口投与による D011.10 マウスの経口免疫寛容誘導の強化、日本免疫学会 2009 年度大会、平成 21 年 12 月 3 日、グランキューブ大阪 (大阪)
- ⑯ 戸塚 護、腸管上皮細胞による IgA 輸送および産生誘導の食品由来因子による増強、第 3 回日本食品免疫学会シンポジウム、平成 22 年 1 月 18 日 東京大学 (東京)
- ⑰ 岩本 拓、マウス小腸および大腸由来上皮細胞株の菌体成分に対する応答の比較解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、平成 22 年 3 月 29 日、東京大学 (東京)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 戸塚護 (共著)、朝倉書店、食品と免疫・アレルギー事典、2011 年、488 ページ (pp. 33-38)
- ② 戸塚護 (共著)、朝倉書店、ミルクの事典、2009 年、557 ページ (pp. 39-40, 50-51, 248-253)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸塚 護 (TOTSUKA MAMORU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70227601