

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4月20日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590260

研究課題名（和文） 新規乳汁由来腸管免疫調節因子の同定とその作用発現機構の解明

研究課題名（英文） Identification of novel immune regulatory factors in the gut immune system and elucidation of molecular mechanisms for their function.

研究代表者

岸本 成史 (KISHIMOTO SEISHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：60234217

研究成果の概要（和文）：

牛乳カゼインおよびそのトリプシン消化物が、マクロファージ様に分化させた細胞のGiタンパク質を介した細胞内カルシウム応答を引き起こすことを見出し、これが α s1カゼイン由来の新規の血球系細胞活性化ペプチドによるものであることを明らかにした。本ペプチドに対するマクロファージ様細胞の細胞内カルシウム応答は、既知の生理活性ペプチド受容体を介さずに起こることが示唆された。さらに、本ペプチドは、免疫担当細胞を選択的に活性化するものである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that bovine milk casein and its digest with trypsin evoked intracellular calcium mobilization in the macrophage-like cell line through the Gi protein. A novel peptide sequence activating blood cells was identified from α s1-casein. It was indicated that the unknown receptor coupled with Gi protein was involved in the intracellular calcium response to the peptide. Moreover, the peptide could activate the immune cells selectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：栄養生理学

1. 研究開始当初の背景

腸管は、生体内にありながらその表面積

が非常に広く且つ外界と接しているために食物や飲料、環境由来の抗原や病原体の曝

露を常に受けており、これらから生体を防御する第一線を担う最大の免疫器官として機能している。また、外来異物だけでなく常在している腸内細菌にも曝露されているために、腸管は他の組織とは異なる独特の免疫システムを構築している。この腸管免疫系は、腸管に流入してくる食物由来の種々の物質によって様々な影響を受けるものと考えられ、実際に炎症・アレルギーの誘因物質としての食物由来因子に関する報告が多くなされている。母乳は、一般的にこのようなアレルギーを起こすことが無く乳児の免疫系を賦活化することが知られている食物であり、その本態の一部は分泌型IgA やリゾチームといった抗菌性物質やサイトカインであるものの、それ以外にも免疫賦活化に関与する成分が存在していても不思議は無い。母乳を摂取すると、腸管に到達するまでもしくは腸管においてタンパク質や脂肪などの成分が消化酵素や腸内細菌の作用を受けて分解、代謝され、その殆どが腸管上皮を介して吸収されるが、その一部はカゼインホスホペプチドのように生理活性を有し、腸管内もしくは腸管上皮でその機能を発揮するものが存在することがわかってきている。近年、このような生理活性をもつ成分の報告が蓄積しているにもかかわらず、腸管免疫担当細胞への作用を介して腸管免疫系へ影響を及ぼす因子については報告が殆どなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々人間は、出生直後から乳幼児期には唯一の栄養源として母乳や育児用粉乳を飲み、離乳後は食物として牛乳やその加工品である乳製品を日常的に食する。このように、乳汁や乳製品はヒトの健康を維持する上で欠かすことのできない栄養学上重要な食物である。本研究は、乳汁中に存在する腸管免疫の調節因子としての機能を発揮する生理活性物質を新規に同定し、その作用発現機構を解明することにより、乳およびその製品の新たな栄養学的意義を提示することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ様に分化させたヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞の牛乳カゼインに対する遊走および活性化

本研究では、マクロファージ様細胞のモデル細胞として、100 nM の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$ 存在下で5日間培養したヒト前骨髄球性白血病細胞株の HL-60 細胞を用いた。この細胞の牛乳カゼインに対する遊走は、Transwell

を用いて測定した。また、牛乳カゼインに対する細胞の活性化は、カルシウムの蛍光指示薬である Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度の変化として測定した。

(2) マクロファージ様に分化させた HL-60 細胞の遊走・活性化に関与するカゼインペプチドの単離・同定

牛乳カゼインは、トリプシン存在下で 37°C、12 時間インキュベーションすることにより消化した。このトリプシン消化カゼイン分解物の中から、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$ 処理によりマクロファージ様に分化させた HL-60 細胞の細胞内カルシウム応答を指標として、限外ろ過、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより活性のあるペプチドを分離・精製した。さらに、このペプチドの配列を LC-TOF-MS により同定した。

(3) カゼインペプチドのマクロファージ様に分化させた HL-60 細胞に対する作用とその作用機序

同定された配列および類似の配列を持つ各種合成ペプチドを作製した。マクロファージ様に分化させた HL-60 細胞をこれらで刺激した際の細胞内カルシウム応答を測定した。各種阻害剤による阻害効果および各種リガンドによる脱感作の影響を調べる際には、ペプチドで刺激する前にこれらの試薬を予め細胞に添加した。

4. 研究成果

(1) 牛乳カゼインおよびそのトリプシン分解物がどのような機構を介して血球系細胞を遊走・活性化させるのかを知るために、ヒト前骨髄球性白血病細胞株の HL-60 細胞を用いて検討した。HL-60 細胞を牛乳カゼインで刺激すると、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。カゼインをトリプシンで完全に消化した場合でも、その作用に影響は無かった。HL-60 細胞を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$ または all-trans retinoic acid でそれぞれマクロファージ様または好中球様に分化させることにより、この細胞内カルシウム応答が増強した。また、この応答は、百日咳毒素やホスホリパーゼ C 阻害剤で阻害されることから、Gi タンパク質を介することが示された。一方、この応答は、オピオイド受容体や C3a 受容体アンタゴニストでは阻害されないこと、カゼイン由来の免疫調節ペプチドとして報告されているペプチドでは脱感作されないことから、既知のカゼイン由来生理活性ペプチドを介して引き起こされるものではないことが示唆された。

(2) マクロファージ様に分化させた HL-60 細胞の細胞内カルシウム応答を指標として、カゼインのトリプシン消化物の中から血球細胞活性化ペプチドを単離、同定することを試みた。カゼインのトリプシン消化物を限外ろ過により分画したところ、HL-60 細胞の細胞内カルシウム応答を引き起こす活性は 10 kDa 以下の画分に存在した。次に、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより分離したところ、活性はヒドロキシアパタイト非吸着画分に残った。さらに、逆相 HPLC により分離した際に最も活性の高い分画を回収し、そこに含まれるペプチドを精製した。LC-TOF-MS によりその分画に含まれるペプチドの配列を決定したところ、 α s1 カゼイン由来の 10 個のアミノ酸からなるペプチドが同定された。

(3) 今回同定された配列を持つペプチドを合成した。この合成ペプチドは、分化させた HL-60 細胞の細胞内カルシウム応答を濃度依存的に引き起こすことが確認された。また、この応答は、百日咳毒素の前処理により阻害されたことから、Gi タンパク質を介して惹起することも確認された。本配列を持つペプチドは、これまでに血球系細胞などの細胞を活性化させることが報告されていないことから、今回同定されたペプチドは新規のカゼイン由来の血球系細胞活性化ペプチドと考えられた。

(4) 本血球系細胞活性化ペプチドの配列の中に、オピオイド様活性またはベンゾジアゼピン様活性を示す可能性が報告されている配列が含まれているが、分化させた HL-60 細胞の本血球系細胞活性化ペプチドに対する細胞内カルシウム応答は、オピオイド受容体アンタゴニストやベンゾジアゼピン受容体アンタゴニストによって阻害されなかった。また、Gi タンパク質共役型受容体を介して血球系細胞の細胞内カルシウム応答を引き起こすことが知られている補体 C3a や細菌由来の走化性ペプチド fMLP によって本血球系細胞活性化ペプチドの作用が脱感作されないことも確認された。これらのことから、本血球系細胞活性化ペプチドによる血球系細胞の活性化は、既知のカゼイン由来生理活性ペプチドや既知の作用機序を介して引き起こされるものではないことが示唆された。

(5) 本血球系細胞活性化ペプチド配列の一部を改変したものや、N 末端や C 末端へ別のペプチドを連結したもの、N 末端や C 末端を削ったものを合成し、生理活性を比較したところ、元のペプチド配列を持つものが最も活性が高く、そのうちの一部の配列が活性発現に必須であることがわかった。

(6) ヒト大腸癌細胞株 CACO-2 細胞を本新規血球細胞活性化ペプチドで刺激したところ、細胞内カルシウム応答を惹起せず、本ペプチドが腸管上皮細胞には作用しないことが示唆された。このことから、ヒトに摂取された牛乳カゼインが消化されることにより消化管内で生じた本血球細胞活性化ペプチドが、腸管に存在する免疫担当細胞に選択的に作用している可能性が考えられた。

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 Urakami, C., Kurosaka, D., Tamada, K., Kishimoto, S., Tezuka, Y. and Nishigori, H. Lovastatin alters TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in porcine lens epithelial cells. *Curr. Eye Res.*, 査読有, 2012, in press.

② Ishikawa, Y., Hashizume, K., Kishimoto, S., Tezuka, Y., Nishigori, H., Yamamoto, N., Kondo, Y., Maruyama, N., Ishigami, A. and Kurosaka, D. Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *Exp. Eye Res.*, 査読有, Vol. 94, 2012, 85-89.

③ Hori, M., Kishimoto, S., Tezuka, Y., Nishigori, H., Nomoto, K., Hamada, U. and Yonei, Y. Double-Blind Study on Effects of Glucosyl Ceramide in Beet Extract on Skin Elasticity and Fibronectin Production in Human Dermal Fibroblasts. *Anti-Aging Med.*, 査読有, Vol. 7, 2010, 129-142.

④ Yamate, S., Nishigori, H., Kishimoto, S., Tezuka, Y., Fukushima, A. and Nishigori, H. Effects of Betamethasone and Mifepristone (RU486) on Brain Acetylcholinesterase of Developing Chick Embryos. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 査読有, Vol. 36, 2010, 11-18.

〔学会発表〕(計 3 件)

① 浦上千佳子, 岸本成史, 黒坂大二郎, 水晶体上皮細胞の上皮間葉系移行におけるロバスタチンの影響、第 114 回日本眼科学会総会、2010 年 4 月 17 日、名古屋国際会議場

② 岸本成史, 手塚優, 西郡秀夫、マクロファージ様に文化させた HL-60 細胞の活性化を引き起こす牛乳カゼイン由来の生理活性ペプチド、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山県桃太郎アリーナ

③ 手塚優, 西郡秀夫, 岸本成史、血球系細胞の活性化を引き起こす牛乳カゼイン由来生理活性ペプチドの同定、第 82 回日本生化学

学会大会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド

〔図書〕（計1件）

① 岸本成史、丸善、食品安全ハンドブック、2010、pp. 205-207

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 成史 (KISHIMOTOI SEISHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：60234217