

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22300261

研究課題名(和文) インバリアントNK T細胞新規ナチュラルリガンドの同定と機能性食品の開発

研究課題名(英文) Identification of natural ligand for invariant NKT cells

研究代表者

江本 正志 (Emoto, Masashi)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：70232981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：米糠中のスフィンゴ糖脂質中に強い腫瘍転移抑制活性のあること、並びにinvariant (i) NK T細胞の新規ナチュラルリガンドが複数存在することを見出した。これまで米糠中には1種類しかスフィンゴ糖脂質が存在していないと考えられていたが、本研究により10種類以上のスフィンゴ糖脂質が存在すること、その中でもこれまでに知られていたスフィンゴ糖脂質中にはiNKT細胞のナチュラルリガンドが存在しないこと、他の複数のスフィンゴ糖脂質中にはiNKT細胞のナチュラルリガンドが存在すること、その中には新規の分子の存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I found that sphingoglycolipids purified from rice bran contain molecules which strongly inhibit tumor metastasis and that several natural ligands for invariant NKT cells exist therein. Interestingly, I found that natural ligand for invariant NKT cells does not exist in a major sphingoglycolipid in rice bran. Moreover, I found that more than 10 sphingoglycolipids exist in rice bran and that the natural ligands for invariant NKT cells exist in these sphingoglycolipids. In addition, I found that one of these ligands is a new molecule.

研究分野：Immunology

キーワード：Invariant NKT cell Natural ligand Sphingoglycolipid Rice bran

1. 研究開始当初の背景

(1) 米は古くから日本人の主食として、我が国において最も広く栽培されてきた穀物資源である。米は玄米のまま食用とされることは少なく、精米後白米として食用に供される。これまで、精米過程で生じる大量の米糠は、かつてはその多くは農業廃棄物として処理されてきたが、近年では飼料・肥料として利用されている。さらに最近では米原油(米糠由来)から米油を精製する過程で生じるガム質からレシチン、セラミド等、ワックスから高級脂肪酸等、ダーク油から γ -オリザノール、フェルラ酸等、スカム (scum: 浮き滓) からトコトリエノール、ビタミン E 等、多くの有用な生理活性物質が単離・精製されてきており、医薬品、医薬部外品、化粧品、食品添加物、食品等として広く用いられるようになった。また、米油を絞った後に生じる脱脂糠には、GABA、フィチン酸、イノシトール等の生理活性物質が含まれており、有用な天然生理活性物質として利用されている。特に、米セラミド(米スフィンゴ糖脂質)は、動物性セラミドと同様に保湿効果並びに血中脂質低下作用等を有することから、化粧品や健康食品等として用いられており、最近では、脂質代謝に関与する可能性のあることが示唆されている(1)。また、米スフィンゴ糖脂質に限らず、植物、細菌、海綿などから分離されたスフィンゴ糖脂質を含有するNKT細胞活性化用組成物、インターロイキン(IL)-4産生促進用組成物、インターフェロン γ 産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、IL-12産生促進用組成物、IL-10産生促進用組成物、NK細胞活性化用組成物、抗腫瘍作用組成物、抗アレルギー作用組成物、感染抵抗性増強用組成物、抗ウイルス作用組成物、IL-6産生促進用組成物、NO産出促進用組成物等に関する提案もなされている(2, 3)。更に、広く植物素材を原料としたスフィンゴ糖脂質を高濃度に含有するスフィンゴ糖脂質含有物の製造方法(4)、更にはスフィンゴ糖脂質を配合した大腸癌予防剤なども提案されている(5)。しかしながら、米セラミド(米スフィンゴ糖脂質)に免疫学的活性並びにiNKT細胞のリガンドが存在するか否かについては明らかにされておらず、また、iNKT細胞のリガンドが上述した種々の生理活性を示すのかについては不明である。

(2) 近年、海綿中に発見された α -galactosylceramide (α -GalCer)及び化学的に合成されたその誘導体がiNKT細胞のリガンドであり、iNKT細胞依存性に強い抗腫瘍効果、感染制御作用、並びに抗アレルギー作用を示すことが明らかになったことから(6, 7)、抗癌剤・抗感染症薬・抗アレルギー薬としての期待が高まっている。しかし、ヒトを含めた哺乳類が海綿と遭遇する可能性は極めて低いことから、その後多くの研究者によってナチュラルリガンドの探索が始

まった。その結果、*Sphingomonas Ehrlichia*の細胞壁に存在する α -glucuronosylceramide (8-11)、*Borrelia*に存在する α -galactosyldiacylglycerol (12)等が本細胞のナチュラルリガンドであることが明らかとなった(リソソームに存在するisoglobotrihexosylceramideも本細胞のナチュラルリガンドであると報告されたが(13, 14)、現在は否定的である(15))。現在、化学的に合成したスフィンゴ糖脂質を用いてiNKT細胞のリガンドを探索している研究者は多いが、何れも α -GalCerのような強い活性は認められておらず、本当の意味でのナチュラルリガンドが存在しているか否かについては今日まで不明である。

(3) 現在のところ、癌(腫瘍)に対する予防策は殆どなく、治療にのみ委ねられている。治療方法は、各種抗癌(腫瘍)剤、放射線、外科的摘出、若しくは何れかを組み合わせることにより行われているが、抗癌剤の場合には強い副作用があること、放射線の場合には多額の費用がかかること、外科的に摘出した場合には患者にかなりの負担がかかること、及びこれらの治療を施したとしても再発の可能性が否めないことから、有効な治療方法がないというのが現状である。このように、癌(腫瘍)に対する既存の予防法・治療法の限界に加えて、食生活や日常生活におけるストレスが急増している昨今、罹患数が世界的に増加していることから、癌(腫瘍)に対する安全、確実かつ簡便に提供できる新規予防薬・治療薬の開発が急務である。

(4) これまで、種々の感染症に対する予防策としてワクチンが広く用いられてきた。ワクチンは、目的とする病原微生物に対する特異的免疫応答が長期間持続することを利用して、対象となる病原微生物によって効果の持続期間が大きく異なること、病原体によっては変異を起こすこと、並びに個体差を生じる場合があることから、必ずしも有効な予防策とはいえない。また、生ワクチンでは使用する弱毒株の変異する可能性があり、安全面において問題がある。一般に、感染症に罹患した場合の治療薬として、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤などの抗生物質が使用されている。抗生物質はヒトの細胞を破壊することなく体内の微生物を減少(あるいは死滅)させると共に、生体の免疫応答によって残存する病原微生物を殺傷・排除させるために投与される。しかし、近年、抗生物質の多用によって多剤耐性菌が出現し、院内感染・日和見感染など、社会的問題となっていることから、緊急な対策が必要とされる。このように、感染症に対する既存の予防法・治療法の限界に加えて、再興感染症並びに新興感染症への罹患数が世界的に増加していることから、安全、確実かつ簡便に提供できる新規予防薬・治療薬の開発が急務である。

(5) 現在、国民の多くが健康志向にあり、それに伴って健康食品ブームが過熱化していること、アンチエイジングに対する国民の関心がこれまで以上に高まっていること、並びに最近の研究により、免疫系の異常が加齢と深くかかわっていることが明らかになっていることから、安全性の高い健康食品・健康飲料・化粧品、その中でも特に免疫能を高めるような食品・飲料・化粧品の開発が社会的に強く要求されている。また、これまでの疾病に加えて新たな疾病が出現すると共に、癌や新興感染症・再興感染症が増加し、これら疾病に対する早急な対策が社会的に必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、米糠の有機溶媒抽出画分を分離・精製し、iNKT細胞の新規リガンドを同定すると共に、その作用機序を明らかにすることにより、機能性食品・機能性健康飲料・食品添加物・化粧品・医薬部外品としての有用性を明確にすると共に、各種病態（感染症・腫瘍等）への有効性を検討し、医薬品及び診断薬への応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 米糠スフィンゴ糖脂質の単離: 米原油に水を加えて得られる水和ガムを、脱脂、中和後、不溶物を除去し、スフィンゴ糖脂質1%程度を含む原料を得た。原料500gを適量のヘキサンに加熱溶解し、脂溶性の不純物を除去した。溶媒を留去した残留物にエタノール750mLを加えて攪拌しセラミド画分を抽出後、溶媒を除去した。残留物にアセトンを適量加えて加熱溶解し再結晶した。得られた粗結晶をエタノールに再溶解して不溶の配糖体を除去した後、エタノール可溶画分を陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂で処理した。樹脂処理溶出物の溶媒を除去し、残留物を適量のアセトンで再結晶して、米糠スフィンゴ糖脂質1.0g(収率0.5%)を単離した。このようにして得られた米糠スフィンゴ糖脂質の純度は、HPLC-ELSD(光散乱検出器付き液体クロマトグラフィー)で定量した結果、ロットにより異なるが約60~80%程度であった。

(2) 米糠スフィンゴ糖脂質の分画: 上述した如く得られた米糠スフィンゴ糖脂質8gをクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(フラッシュクロマトグラフィー用シリカゲル40gをクロロホルムに懸濁:球状、関東化学)で分画した。分画はクロロホルム:アセトン=10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6各600mL及びメタノール600mLで溶出し、溶媒を除去した(Fr.1~Fr.8)。各分画のガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー(TLC:シリカゲル、クロロホルム:メタノール=10:1、濃硫酸で呈色)の結果より、フラクション

(Fr.) 5・6は配糖体、Fr. 7・8はスフィンゴ糖脂質、その中でも特にFr. 8はスフィンゴ糖脂質を高純度に含有する分画であることが明らかとなった。

(3) 使用マウス: C57BL/6マウス並びに各種iNKT細胞欠損マウス(何れも雌マウス8~12週齢)を実験に供した。

(4) 使用腫瘍株:メラノーマ細胞株(B16)を実験に供した。

(5) 投与: マウスの腹腔内に各画分を150µg投与した。尚、以下の実験では、各群間での体重差が1g未満のものを用いた。

(6) 抗体: Fcγ receptor (R) (2.4G2) に対するモノクローナル抗体 (mAb) は、ハイブリドーマ培養上清より精製したものを、また fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD3ε mAb (145-2C11) 並びにビオチン標識抗 NK1.1 mAb (PK136) は、BD PharMingen より購入したものを実験に供した。

(7) 試薬: 牛胎児血清は Trace Biosciences、パーコール(比重:1.124g/mL)は Biochrom、RPMI 1640は日水製薬株式会社、HEPESは同仁化学研究所、L-グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンは Invitrogen、2-メルカプトエタノール、炭酸水素ナトリウム、塩化アンモニウム、TRIS (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1β-プロパンジオール)及びアジ化ナトリウムは和光純薬工業株式会社、ウシ血清アルブミンは Thermo、ストレプトアビジン(SA)標識 Cy5は BD PharMingen、パラホルムアルデヒドは Merck より購入したものを実験に供した。

(8) α-GalCer/CD1d tetramer の作製: マウス CD1d/β2-ミクログロブリンテトラマーは BirA biotinylation site と CD1d を用いたバキュロウイルス発現系を用いて調製した(16, 17)。

(9) 肝内白血球の調製: 肝内白血球は江本等の方法により調製した(18)。

(10) フローサイトメトリー: 抗体の非特異的結合を防ぐため、細胞を抗 FcγR mAb と 4 度、15 分間反応させた後、FITC 或いはビオチン標識 mAb と 4 度、15 分間反応させた。ビオチン標識抗体は SA-標識 Cy5 (BD PharMingen) にて視覚化した。染色後、細胞を 1% パラホルムアルデヒド含有 PBS(-) で固定後、フローサイトメーター (FACSCalibur (BD PharMingen)) により取り込み、CellQuest software (BD PharMingen) により解析した。α-CalCer/CD1d テトラマーによる染色は、

ブロッキング後、Pycerythrine 標識 α -GalCer/CD1d テトラマーと室温で 15 分間反応させた。

(11) iNKT 細胞の動態解析: 予め米糠由来スフィンゴ糖脂質精製画分の Fr.1 ~ Fr. 8 或いは Vehicle を腹腔内投与したマウスの肝臓より上述したごとく白血球を調製した後、iNKT 細胞の動態をフローサイトメトリー (mAb \cdot α -GalCer/CD1d テトラマーの両者) により解析した (16)。

(12) 腫瘍転移抑制実験: 予め Fr. 8 或いは Vehicle を腹腔内投与したマウスに、メラノーマ細胞 (B16) を移植し、移植後の生存率並びに移植後 40 日目の肺における転移の程度を肉眼的に観察した。

4. 研究成果

(1) 米糠スフィンゴ糖脂質精製画分投与による肝内 iNKT 細胞の消失: C57BL/6 マウスに Fr.1 ~ Fr. 8 或いは Vehicle を投与し、24 時間後に肝臓内に存在する白血球をフローサイトメトリーにより観察した。Fr.1 ~ Fr.7 及び Vehicle 投与群では Fr. 8 を投与しても各細胞集団に殆ど変化は認められなかった。他方、Fr. 8 投与群では、T 細胞、NK 細胞並びに B 細胞は殆ど影響を受けなかったが、NKT 細胞が選択的に著減した。iNKT 細胞にリガンド (α -GalCer) が結合すると蛍光標識した抗体では検出されなくなることから (19-27)、本結果は Fr. 8 中に iNKT 細胞のリガンドが存在することを示唆している。若干ではあるが、Fr. 8 投与群の肝臓に NK1.1⁺TCR β ⁺ 細胞が検出された。NK1.1⁺TCR β ⁺ 細胞には iNKT 細胞だけでなく、他の NKT 細胞 (Unconventional NKT 細胞) も存在することから (28)、Fr. 8 を投与した際に肝臓に残存する NK1.1⁺TCR β ⁺ 細胞はこういった細胞であると考えられる。実際、テトラマーを用いて解析したところ、Vehicle 処理群の肝臓に高頻度に認められたテトラマー反応性細胞は、Fr. 8 投与群では全く認められなかった。

(2) 米糠スフィンゴ糖脂質精製画分の腫瘍転移抑制効果: 予め Fr. 8 或いは Vehicle を投与した C57BL/6 マウスにメラノーマ細胞を静脈接種し、経日的に肺の状態並びに生存率を観察した。未処理群並びに Vehicle 処理群では肺への転移が観察され、早期に死亡したが、Fr. 8 投与群では、肺への転移が全く認められず、マウスは半年経過した時点でも全例生存していた。iNKT 細胞欠損マウスでは、Fr. 8 を投与しても C57BL/6 マウスに Fr. 8 を投与した時のような効果は認められなかった。iNKT 細胞がリガンドにより活性化されるとメラノーマ細胞の転移が抑制されることから (6)、本結果は iNKT 細胞依存性に Fr. 8 に腫瘍の転移を抑制する活性が存在することを示唆している。

引用文献

- 国際公開特許 WO2005 / 068041 号
特開 2005 - 263797 号公報
特開 2007 - 70311 号広報
特開 2005 - 120321 号公報
特開 2006 - 290856 号公報
Science 278: 1626, 1997
Annu. Rev. Immunol. 23: 877, 2005
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 1351, 2005
Nature 434: 520, 2005
Nature 434: 525, 2005
Eur. J. Immunol. 35: 1692, 2005
Nat. Immunol. 7: 978, 2006
Science 306: 1786, 2004
Nature 434: 525, 2005
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 5977, 2007
Infect. Immun. 74: 5903, 2006
J. Exp. Med. 192: 741, 2000
Int. Immunol. 7: 1729, 1995
J. Immunol. 171: 4020, 2003
Eur. J. Immunol. 30: 985, 2000
① Microb. Infect. 9: 1511, 2007
② Nat. Immunol. 3: 867, 2002
③ Int. Immunol. 16: 241, 2004
④ J. Exp. Med. 192: 741, 2000
⑤ J. Exp. Med. 195: 869, 2002
⑥ Eur. J. Immunol. 30: 1919, 2000
⑦ Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 10913, 2003
⑧ Eur. J. Immunol. 30: 2300

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: iNKT 細胞活性化剤
発明者: 江本正志・江本善子・丹生淳郷
権利者: 株式会社岡安商店・江本正志
種類: 特許
番号: 特願 2010-69467
出願年月日: 2010 年 3 月 25 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江本正志 (EMOTO, Masashi)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70232981

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

内記 良一 (NAIKI, Yoshikazu)
愛知医科大学・医学部・助教
研究者番号：10434622

藤村 響男 (FUJIMURA, Takao)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：50209087

喜多 英二 (KITA, Eiji)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90133199

福田 利夫 (FUKUDA, Toshio)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：00173352

(4) 研究協力者

江本 善子 (EMOTO, Yoshiko)

渡辺 和喜 (WATANABE, Kazuki)

小山 雄一 (KOYAMA, Yu-ichi)

丹生 淳郷 (NYU Kiyosato)

帰山 隆樹 (KIYAMA, Takajyu)

西尾 和正 (NISHIO, Kazumasa)

Robert Hurwitz

Stefan H.E. Kaufmann

Hans Mollenkopf