

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580144

研究課題名（和文） 葉酸過剰摂取が制御性 T 細胞の機能、分化に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文） Effect of excessive folic acid intake on the function and the differentiation of regulatory T cell

研究代表者

岡本 能弘 (OKAMOTO YOSHIHIRO)

千葉科学大学 薬学部 准教授

研究者番号：40261036

研究成果の概要（和文）：葉酸過剰摂取、あるいは欠乏が免疫システムに及ぼす影響は不明である。制御性 T 細胞（Treg）に 4 型葉酸受容体（FR4）が高発現することが報告されている。葉酸摂取異常によって Treg 表面の FR4 を介して Treg 細胞機能に何らかの機能変化を及ぼすことが想定される。葉酸過剰摂取では卵白アルブミン（OVA）に対する経口免疫寛容の抑制、葉酸欠乏では経口免疫寛容の亢進傾向を見出した。この葉酸欠乏／過剰摂取による免疫寛容変動の機序として、Treg 細胞の量・機能変動が考えた。葉酸の摂取状況が Treg 細胞分化に及ぼす影響を調べた。葉酸欠乏飼料で 1 ヶ月飼育したマウスの脾細胞中の内在性 Treg（nTreg）頻度（CD4+CD25+Foxp3+）は対照群と有意な差はなかった。また、過剰葉酸含有飼料（50mg/g diet; 通常飼料の葉酸含量の 2000 倍）で飼育した場合も有意な差はなかった。この時の CD4+細胞の FR4 発現にも有意な差がなかった。nTreg 分化に葉酸摂取状況は関係しないようである。一方、これらマウス脾細胞から *in vitro* で Treg を誘導した（iTreg）場合、iTreg 頻度は葉酸の摂取量に依存して低下する傾向が見られた。近年、Treg と IL-17 産生細胞として重要な Th17 との分化の可塑性が注目されている。これらマウス脾細胞から *in vitro* で Th17 を誘導したところ、葉酸の摂取量に応じて Th17 頻度が増加した。以上のことから、葉酸は Treg/Th17 の可塑性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。葉酸欠乏状態での免疫寛容亢進には Th17 分化低下により iTreg/Th17 バランスの Treg 分化優位な状況になっている可能性がある。一方、葉酸過剰状態での免疫寛容抑制のしくみには iTreg よりも Th17 分化が優位になっている状況が免疫寛容抑制に関与している可能性がある。今後この現象の分子メカニズムの解明が必要である。

研究成果の概要（英文）：Effect of excessive intake or deficiency of folic acid has not been clarified. It has been reported that the type 4 folic acid receptor (FR4) expresses on the cell surface of regulatory T cell (Treg). An unusual intake of folic acid may affect the function or differentiation of Treg cell. The excessive intake of folic acid decreased the oral tolerance for anti-ovalbumin (OVA) antibody production, and the deficiency of folic acid enhances oral tolerance for antibody production. An excessive intake or deficiency of folic acid did not affect on naturally occurring Treg (nTreg) population and function. However, the decreased number of induced Treg (iTreg) in mice with excessive folic acid intake was observed compared with normal mice. On the other hand, the increased number of iTreg was observed in mice with folic acid deficient diet. The plasticity between iTreg and Th17 has been reported. To investigate the effects of folic acid intake on Th17 differentiation, splenocytes were stimulated under Th17-polarizing conditions (immobilized anti-CD3 and anti-CD28 with IL-6 plus TGF- β for 4 days). The Th17 differentiation enhances with increasing folic acid contents in the diet. The enhanced immune tolerance in mice with folic acid deficient diet might come from the suppressed Th17 differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2200000	660000	2860000
2011年度	900000	270000	1240000
2012年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能、免疫寛容、葉酸、制御性T細胞、Th17

1. 研究開始当初の背景

食品成分は、抗原として腸管のリンパ球により認識される。この時、腸管免疫系の大きな特徴は、抗原特異的免疫抑制機構がはたらくことである。この現象は経口免疫寛容とよばれ、食物アレルギーなどの過剰な免疫反応の抑制機構の一つと考えられている。経口免疫寛容における免疫抑制反応はT細胞依存性であることが知られており、その重要な因子の一つとして、近年、制御性T細胞(Regulatory T cell, Treg)の役割が大きく注目されている。

Treg細胞は、自己の組織を攻撃する「自己反応性T細胞」の働きを抑制する役割をも担っている。Treg細胞は正常個体リンパ球中の約10%を占めるとされ、正常な免疫機能の維持にとっては必要不可欠な細胞であり、自己免疫疾患などの場合では、Treg細胞の機能が不十分であったり、Treg細胞が不足することによって、過剰な免疫反応が起きることが証明されている。最近、Treg細胞がビタミンである葉酸の受容体(4型葉酸受容体: folate receptor 4, FR4)を恒常的に高発現させていることが見い出された。これまで免疫応答を抑制するTreg細胞とそれ以外のT細胞を区別するための実用的な細胞表面マーカーがなかったため、Treg細胞特異的細胞表面マーカーとして注目されている。しかしながら、FR4は、Treg細胞特異的マーカーとしては注目されているが、FR4がTreg細胞にのみ特異的に存在する生物学的意義は不明である。

葉酸(プテロイルグルタミン酸)は、水溶性のビタミンB群の一種で生体内ではDNAやアミノ酸の合成や造血に関連している。健常者では通常の食生活では葉酸が不足したり、過剰摂取となることはないと考えられているが、不適切な食生活習慣による摂取不足や特定の薬剤摂取、血液透析などの際には欠乏症が起こりうる。一方、葉酸は栄養機能食品とし

て表示許可され、サプリメントや食品に添加されるなど広く一般に市販され、誰もが入手可能となっており、過剰摂取となる可能性も想定される。また近年では、妊娠初期時に葉酸が不足すると、胎児の神経管閉鎖障害の発生率が高くなるとの報告があり、厚生労働省は特に妊娠を希望している女性に対しては通常の食事以外の栄養補助食品からの葉酸摂取を推奨する通知を出した(平成12年12月 厚生労働省通知)。

現代の社会において、葉酸の過剰・欠乏状態は起こりうる健康上のリスクである。葉酸の摂取不足や過剰摂取によって経口免疫寛容の成立に重要なTreg細胞表面の4型葉酸受容体を介してTreg細胞に何らかの影響を及ぼすことが想定される。しかしながら、現在のところ、葉酸の欠乏、あるいは過剰摂取により免疫寛容システムがどのように変動するのかが明らかにされていない。

2. 研究の目的

葉酸の摂取状況が免疫機能、特に、経口免疫寛容の成立にどのような影響を及ぼすかを明らかにすること、さらに、葉酸摂取状況による免疫寛容機能の変動が葉酸受容体を有するTreg細胞の機能変動、分化能の変動に起因しているか否か検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 飼料の調製と投与

AIN-93G(日本農産工業株式会社)、葉酸欠乏AIN-93G(日本農産工業株式会社)、あるいはAIN-93Gに葉酸5mg/g dietを添加した飼料(葉酸過剰飼料)を調製した。BALB/cマウス(3週齢, male, 日本エスエルシー株式会社)を3群に分けそれぞれの飼料を実験期間を通して自由摂取させた。

(2) OVA 特異的経口免疫寛容の誘導

BALB/c CrSlc マウスに 5 mg/ml ovalbumin (OVA, Sigma Chemical) 0.2 ml を 7 日間経口投与した。この免疫寛容の誘導は、各種葉酸含量の被験飼料にて 30 日間飼育した後、行った (Fig. 1)。7 日間の連続経口投与終了の翌日、2.5 mg/ml OVA をフロイントの完全アジュバントとともに 0.1ml を足蹠皮内へ免疫し、さらに 2 週間後に同量の OVA をフロイントの不完全アジュバントとともに再度免疫した。

(3) OVA 特異的抗体価の測定

OVA に対する特異的抗体価 (Total immunoglobulin, IgG, IgG1 および IgG2a) は、ELISA 法により測定した。ELISA プレートに 100 μ l の OVA 溶液 (100 μ g/ml) を添加し、固相化した。マウスの血清を添加し、室温で 2 時間反応させた。続いて、Horseradish peroxidase (HRP) 標識 anti-mouse total immunoglobulin goat antibody (1 μ g/ml, Vector Laboratories)、Biotynilated anti-mouse IgG goat antibody (1 μ g/ml, Vector Laboratories)、HRP 標識 anti-mouse IgG1 rat monoclonal antibody (1 μ g/ml, Beckman Coulter)、もしくは HRP 標識 anti-mouse IgG2a monoclonal antibody (1 μ g/ml, Beckman Coulter) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。発色基質は tetramethylbenzidine を用いて発色させ吸光度を測定した。

(4) 細胞増殖能の評価 (WST-1 assay)

各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製し (5% FCS 含有 RPMI1640 培地)、96 well plate に 1×10^5 cell/well で播き、OVA (4 mg/ml) を添加後、(37°C, 5% CO₂) にて培養した。32 時間後に WST-1 試薬 (Dojin) を添加し、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し、生細胞数を求めた。

(5) サイトカイン産生の評価

各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製し、特異的抗原 (OVA) あるいは Concanavalin A (ConA, Sigma Chemical) 存在下 48 時間培養後、培養上清を回収した。培養上清中のインターフェロン- γ (IFN- γ)、インターロイキン-4 (IL-4) の産生量について、サンドイッチ ELISA 法 (R&D Systems) にて測定した。

(6) フローサイトメーターによる 4 型葉酸受容体 (FR4) 陽性制御性 T 細胞の分析
各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製後、洗浄し、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス FR4 抗体 (BioLegend) /phycoerythrin (PE) 標識抗マウス CD25 抗体 (Beckman Coulter) /PE-Cy5 標識抗マウス CD4

抗体 (Beckman Coulter)、あるいは、細胞内 の foxp3 分子を PE-anti-mouse Foxp3 抗体にて染色し、フローサイトメーター装置 Epics ALTRA (Beckman Coulter) を用いて陽性細胞比率を測定した。なお、これら使用した標識抗体の細胞への非特異的な結合に対するコントロール (isotype control) として、FITC 標識ラット IgG2a/PE 標識ラット IgG1/PE-Cy5 標識ラット IgG1 (Beckman Coulter) をそれぞれ反応させ同様に測定した。

(7) リアルタイム RT-PCR による Foxp3 mRNA 発現量の定量

細胞から全 RNA を抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace - α - (東洋紡ライフサイエンス社) を使用し、全 RNA (100ng) を鋳型として oligo dT primer (50 pmol/ μ l) にて 1st strand cDNA 合成を行った。つづいて Foxp3 の遺伝子発現量を Foxp3 特異的プライマー、SYBR Green Real time PCR Master Mix (東洋紡ライフサイエンス) を用いて定量した。リアルタイム PCR 装置には、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ) を用いた。各群の Foxp3 mRNA 量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量で補正した。

(8) Th17 分化誘導とその評価

各群のマウス脾細胞を anti-CD3 抗体を結合させたプレート中で IL-6 (20 ng/ml, PeproTech). とともに 4 日間培養した。細胞を回収し、再度 PMA/ionomycin で刺激した。細胞は CD4 および、細胞内 IL-17 を蛍光標識抗体 (BioLegend) にて染色し、フローサイトメーターにて測定した。

(9) 統計学的解析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意差は Kruskal-Wallis の多重比較検定法により行い、 $p < 0.05$ で差のある場合に Tukey あるいは Scheffé の多重比較法による有意差検定を行い、それぞれ危険率 5% で評価した。

4. 研究成果

(1) 葉酸摂取状況の抗体産生に及ぼす影響
今回、実験期間を通して、葉酸欠乏および葉酸過剰条件で飼育したマウスの体重変化、餌の摂取量について、標準飼料飼育マウスとの間に統計学的に有意な差は見られなかった。葉酸欠乏、あるいは過剰状態で飼育したマウスの OVA に対する経口免疫寛容成立状況について評価した。血中 OVA 特異的抗体価は、OVA の連続経口投与により低下した (Fig. 1)。この結果は、OVA の経口投与により、OVA に対する免疫寛容が誘導されたことを示す。葉酸の摂取状況を変えた群の血中の OVA 特異的

抗体価は、対照群で見られた抗体価低下と比較し、統計学的に有意な変動を引き起こさなかったものの過剰摂取群では抗体価低下が解除され、抗体価上昇傾向がみられた (Fig. 1)。一方、葉酸欠乏群では血中抗体価のさらなる低下傾向がみられた。各群のマウスから調製した脾細胞培養上清中に分泌された抗体量を測定した。葉酸過剰摂取群では OVA 特異的抗体産生の亢進がみられた。一方、葉酸欠乏食摂取群では対照群と差は見られなかった。

以上、葉酸過剰摂取群では、対照群で見られた抗体価低下と比較し、抗体価が高くなることから、免疫寛容機能が抑制されていることが推察される。一方、葉酸欠乏群では対照群で見られた抗体価低下と比較し、抗体価が低くなったことから、免疫寛容機能が強く働いたことが推察される。また、IgG サブクラスについて葉酸摂取の影響を検討した結果、IgG1、IgG2a 抗体価の変化は IgG と同様の変動パターンであり、サブクラス特異的な変動はみられなかった。

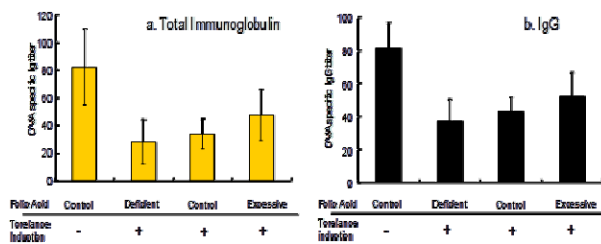


Fig. 1 葉酸欠乏/葉酸過剰摂取が OVA 特異的経口免疫寛容に及ぼす影響 (抗体価)

葉酸欠乏/葉酸過剰状態で飼育したマウスに OVA を 7 日間連続経口投与したのち、OVA を皮内投与し、OVA に対する免疫応答を誘起した。各群のマウスから血清を採取し、Total immunoglobulin(a)、および IgG 抗体(b) 量を ELISA 法にて測定した。(n=10)

(2) 葉酸摂取状況の抗原特異的細胞増殖に及ぼす影響

脾細胞の抗原特異的増殖反応について検討した。OVA 刺激に伴う細胞増殖は、対照群では OVA 経口投与により有意に低下した。これは抗原特異的免疫寛容が誘導され、免疫応答が抑制されたことを示す。葉酸過剰群では、対照群と比較し、有意に細胞増殖が増加した。つまり、免疫寛容が完全に機能しなかったことを示す。一方、葉酸欠乏群は対照群と比較し、増殖が低下した。この葉酸摂取の作用が感作抗原 (OVA) 特異的な作用かを調べるため ConA 刺激による増殖を評価した。OVA 経口投与により免疫寛容を誘導した対照群において、ポリクローナルな刺激 (ConA 刺激) に伴う細胞増殖が有意に抑制された。そして、葉酸過剰摂取は、OVA 刺激による増殖反応の結果と同様の変動パターンであった。したがって、今回の実験条件では葉酸過剰摂取がポ

リクローナルな影響を及ぼすことが判明した。

(3) 葉酸摂取状況のサイトカイン産生に及ぼす影響

免疫寛容のメカニズムとして抗原特異的なヘルパー T 細胞の不应答が考えられる。ヘルパー T 細胞の不应答が誘導されているか否かを調べた。抗原特異的なヘルパー T 細胞の機能を調べるため、OVA 刺激に伴う Th1 型サイトカイン (IFN- γ)、および、Th2 型サイトカイン (IL-4) 産生量を評価した。対照群では OVA の経口投与により、OVA 刺激特異的 IFN- γ 産生量が低下した。葉酸過剰摂取は、この IFN- γ 産生低下を解除し、IFN- γ 産生を上昇させた。従って、葉酸過剰摂取により OVA 経口投与により誘導された Th1 細胞の不应答が解除されていると考えられた。一方、葉酸欠乏群では IFN- γ 産生量が対照群よりさらに低下した。IL-4 産生は、免疫寛容を誘導しなかった群を含む全ての群で検出限界以下となった。今回の実験条件では、OVA 特異的ヘルパー T 細胞は Th1 型が優位に活性化されているようである。さらに、この葉酸過剰摂取による不应答解除が抗原特異的なものを調べるため ConA 刺激によるサイトカイン産生を評価した。その結果、葉酸過剰摂取群は、ConA 刺激に伴う IFN- γ 産生が増加した。一方、葉酸欠乏食群は対照群と比較し、変動はみられなかった。従って、葉酸過剰摂取群で見られた Th1 細胞の不应答解除は、ポリクローナルに生じているようである。対照飼料摂取マウスに経口免疫寛容を誘導することにより ConA 刺激に伴う IL-4 産生量は低下傾向を示した。葉酸過剰摂取によっても IL-4 産生増加は起こらなかった。一方、葉酸欠乏食群では IL-4 産生低下傾向が見られた。IL-4 産生は葉酸摂取状況により大きな影響を受けないようである。以上の結果は葉酸の過剰摂取によりヘルパー T 細胞、特に Th1 細胞の不应答が解除されることが考えられた。

(4) 葉酸摂取状況の制御性 T 細胞に及ぼす影響

経口免疫寛容の誘導メカニズムには抗原特異的なヘルパー T 細胞の不应答による機構以外に免疫反応を誘起するヘルパー T 細胞や B 細胞などの機能を抑制する T 細胞、いわゆる制御性 T 細胞 (Treg) により細胞自体を破壊することなく免疫応答を阻害する機構が考えられている。免疫反応を誘起するヘルパー T 細胞や B 細胞などの機能を抑制する Treg 細胞は CD4+CD25+細胞として特定され、その免疫抑制機能発現にはフォークヘッドファミリー転写因子の Foxp3 が重要である。

近年、Treg 細胞の特異的細胞表面抗原とし

て 4 型葉酸受容体 (FR4) が報告されている。しかしながら、その FR4 が Treg 細胞に局在する生理的意義は不明である。我々はこの葉酸摂取状況により FR4 を介して、Treg 機能が修飾される可能性を検討した。葉酸摂取状況による Treg 細胞 (CD4+CD25+FR4+細胞) の頻度をフローサイトメーターにより解析した。葉酸過剰摂取では対照群との差はみられなかった。一方、葉酸欠乏食で飼育したマウスは、CD4+CD25+細胞、CD4+CD25+FR4+細胞頻度の低下がみられた。

免疫抑制機能発現に直接関連する Foxp3 遺伝子発現量の変動を調べた。対照群では経口免疫寛容の誘導により Foxp3 遺伝子発現量の上昇が観察された。葉酸過剰食摂取マウス、葉酸欠乏食摂取マウスともに対照群に比較し、有意差が無かった。この結果は、葉酸過剰食群、葉酸欠乏群ともに免疫寛容の変動は、nTreg によらないと考えられる。

(5) 葉酸摂取の誘導型 Treg、Th17 分化誘導に及ぼす影響

近年、Treg と IL-17 産生細胞として重要な Th17 との分化の可塑性が注目されている。これらマウスリンパ球から *in vitro* で iTreg、Th17 を誘導したところ、iTreg 頻度は葉酸の摂取量に依存して低下する傾向が見られ、Th17 頻度は、葉酸の摂取量に応じて増加した。以上のことから葉酸は Treg/Th17 の可塑性に影響し、誘導型 Treg 分化に影響している可能性が考えられる。葉酸欠乏状態での免疫寛容亢進には Th17 分化低下により iTreg/Th17 バランスの Treg 優位な状況への偏向が関わっている可能性がある。葉酸過剰状態での免疫寛容抑制のしくみには iTreg よりも Th17 分化が優位になっている状況が免疫寛容抑制に関与している可能性がある。今後この現象の分子メカニズムの解明が必要である。

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 Yoshihiro Okamoto, Takazumi Hara, Tatsuya Ebato, Takashi Fukui, Toshiyuki Masuzawa: Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation, *Int Immunopharm*, 16, 178-183, 2013. (査読有)

② Mayuri Tanaka, Yoshihiro Okamoto, Takashi Fukui, Toshiyuki Masuzawa: Suppression of interleukin 17 production by Brazilian propolis in mice with

collagen-induced arthritis, *Inflammopharm*, 20(1), 19-26, 2012. (査読有)

③ Yoshihiro Okamoto, Mayuri Tanaka, Takashi Fukui, Toshiyuki Masuzawa: Brazilian propolis inhibits the differentiation of Th17 cells by inhibition of interleukin-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3, *Immunopharm Immunotox*, 34(5), 803-809, 2012. (査読有)

④ Yoshihiro Okamoto, Mayuri Tanaka, Takashi Fukui, Toshiyuki Masuzawa: Inhibition of interleukin 17 production by curcumin in mice with collagen-induced arthritis. *Biomed Res*, 22(3), 299-304, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

岡本 能弘, 田中 麻優里、葉酸過剰摂取の経口免疫寛容誘導に及ぼす影響、日本食品免疫学会 2010 年度大会

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 能弘 (OKAMOTO YOSHIHIRO)

千葉科学大学 薬学部 准教授

研究者番号：40261036

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：