

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 3 月 29 日現在

機関番号：12301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2011～2013  
課題番号：23658108  
研究課題名(和文) ミルクに免疫制御システムは存在するか？

研究課題名(英文) Immune regulation systems in milk

## 研究代表者

榎本 淳 (ENOMOTO, Atsushi)

群馬大学・理工学研究院・准教授

研究者番号：70183217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミルクには未知の免疫抑制因子が存在するのではないかという筆者独自の考えに基づき検討したところ、牛乳より新たに分離したミルクペプチド画分がアレルギーや自己抗原に特異的なマウスT細胞応答を抗原特異性やMHC拘束性に依存することなく、完全に抑制できることを見出した。これらの知見はミルクペプチド画分がアレルギーや自己免疫疾患の予防や治療に応用できる可能性を示唆するものであるといえる。

研究成果の概要(英文)：A milk peptide fraction newly purified from cow's milk was found to highly suppress both allergen- and autoantigen-specific murine T cell responses, independent of their antigen specificity and MHC restriction. Our findings may be useful for preventing the allergies and autoimmune diseases.

研究分野：農学

キーワード：ミルク ペプチド T細胞 1型糖尿病 自己免疫疾患 鶏卵アレルギー アレルギー疾患 免疫抑制剤

## 1. 研究開始当初の背景

この世の中に人類に食べられるために存在するものは一つもない。しかし、ミルクは唯一の例外であり、母が子に与えるために分泌し、子の健やかな成長を保証する種々の巧妙な仕組みが施された完全食品である。筆者は、哺乳類が誕生後、初めて口にする食品がミルクであることに着目し、免疫系の発達が不完全な乳児の免疫系をむやみに刺激することなく、暴走させないために、ミルクには未知の免疫抑制因子が存在しているのではないかという考えに至った。このような考えを挑戦的萌芽研究(研究課題:1型糖尿病および関節リウマチの発症に及ぼす牛乳蛋白質の抑制効果、課題番号:20658032、研究代表者:榎本淳、研究期間:平成20~21年度)として検討したところ、予想通り、牛乳蛋白質の一種であるラクトパーオキシダーゼ(LPO)が1型糖尿病の発症原因となる自己免疫応答や鶏卵アレルギーに特異的なT細胞応答およびIgE抗体応答を完全に抑制することができ、自己免疫疾患やアレルギー疾患の予防・治療に有効であることを実験動物レベルで見出した(農芸化学会2010年度大会(要旨集45頁、2AJp19~2AJp22の4題)、食品免疫学会2010年度大会(要旨集33~34頁、P09~P10の2題)、14th International Congress of Immunology(2010年、PP-104-29)で発表しており、特に食品免疫学会のポスター発表の一つは口頭発表10題の一つに選抜された)。

## 2. 研究の目的

最近、上述した考えを若干修正すべきであると考え直すようになった。「平時」には子供の免疫系は抑制されている方がよいものの、感染症が流行しているような「有事」には、ミルクを介して乳児の免疫系を積極的に活性化させる必要があることはいままでもない。この考えに基づき、予備実験を試みたところ、ある牛乳蛋白質画分にLPOとは全く正反対の活性を有する未知の免疫賦活物質が存在することに気づき、本研究の目的を下記のように設定した。

(1)牛乳由来新規免疫賦活物質の同定

(2)上記物質の免疫系、特にサイトカイン応答、T細胞応答、抗体応答に及ぼす影響の検討

(3)上記物質の鶏卵アレルギー、1型糖尿病、慢性関節リウマチの発症に及ぼす影響の検討

(4)上記物質の免疫賦活効果とLPOの免疫抑制効果の比較、さらに上記物質とLPOに何らかの関連があれば、両者を統一的に制御するしくみの解明

これまでの研究と比較した本研究の特色は、下記の点にある。

(1)食品を介して、アレルギーの予防・治療を目指した研究は数多いものの、自己免疫疾患を対象とした研究はほとんど試みられ

ていない。

(2)アレルギーを対象とした研究の多くがプロバイオティクス(乳酸菌)を用いているが、そのアレルギー抑制効果は菌株依存적であり、実験の再現性を取りにくいこともあり、有効物質の同定が困難なため、応用を考えた場合、本研究で対象とした牛乳蛋白質の方が優れている。

(3)牛乳成分の免疫賦活活性・抑制活性に関する個々の研究はあるものの、両者を統一的に検討した例はない。

## 3. 研究の方法

(1)牛乳ラクトパーオキシダーゼ(LPO)のIL-10応答誘導効果を抑制するミルクペプチド画分(MKF)

1型糖尿病の動物モデルであるNODマウス(10~12週齢、糖尿病未発症)のnaiveな脾臓細胞をConA、抗CD3抗体、LPO(50~100 $\mu$ g/ml)、ミルクペプチド画分(MKF、1~1,000 $\mu$ g/ml)を添加して3日間培養した。1~3日目の培養上清をそれぞれ回収し、それらに含まれるIL-4、6、10、12産生量をELISAにより測定・比較した。

(2)ミルクペプチド画分(MKF)のT細胞応答抑制効果

BALB/c、C3H/HeN、C57BL/6Nマウス(8~10週齢、)をあらかじめ鶏卵白アルブミン(OVA)あるいはスカシ貝ヘモシアニン(KLH)にて免疫した後、それらのリンパ節細胞を取り出し、その抗原特異的なあるいは抗CD3抗体刺激によるT細胞増殖応答を $^3$ H標識チミジンの細胞内取込み量を指標として測定した。そこにMKFを0.1~100 $\mu$ g/ml添加し培養することにより、これらのT細胞増殖応答に及ぼすMKFの抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1)牛乳ラクトパーオキシダーゼ(LPO)のIL-10応答誘導効果を抑制するミルクペプチド画分(MKF)

私どもは「1.研究開始当初の背景」に記載したように、ミルクには未知の免疫抑制因子が存在するのではないかという独自の考えに基づき、各種実験動物を用いて検討したところ、本研究開始以前に、牛乳由来ラクトパーオキシダーゼ(LPO)が1型糖尿病の動物モデルであるNODマウスの発症の引き金となる自己免疫応答や主要な鶏卵アレルギーである卵白アルブミン(OVA)に特異的なBALB/cマウスのT細胞増殖応答を抑制できること、さらにはこれらのマウスの脾臓細胞を、LPOとConAや抗CD3抗体、IL-2などのT細胞を活性化させる試薬と共に培養することにより、強力なIL-10応答が選択的に誘導されることなどを見出してきた。すなわち、LPOは免疫抑制活性を有するIL-10産生細胞を優先的に誘導することにより、上述し

たような免疫抑制効果を発揮するものと考えられた。

本研究では最初に、同じく牛乳より分離したミルクペプチド画分 (MKF) がこの LPO の IL-10 応答誘導効果にどのような影響を与えるのか検討した。naïve な NOD マウスの脾臓細胞に ConA や抗 CD3 抗体刺激を与えて培養したところ、全ての培養期間において IL-4 や IL-12 の産生は認められなかったものの、培養 2 日目以降に IL-10 応答が、培養 1 日目から IL-6 応答が観察された。ここに MKF をさらに加えて培養した場合、IL-10 応答は完全に阻害され、逆に IL-6 応答は増大することが明らかとなった。次に NOD マウスの脾臓細胞を、ConA や抗 CD3 抗体に加えて LPO を添加して培養したところ、これまでの報告と同様、ConA や抗 CD3 抗体単独添加群と比較して IL-6 応答には変化が認められなかったものの、IL-10 応答は大幅に増大した。この培養系に MKF を加えたところ、やはり IL-10 応答は大きく低下し、逆に IL-6 応答は増加することが明らかとなった。

このような MKF のマウス脾臓細胞に対する IL-10 応答抑制・IL-6 応答促進効果は 50 µg/ml 以上の濃度で認められ、さらに、10 週齢、糖尿病未発症、35 週齢、糖尿病発症の NOD マウスを用いた場合も同様な結果が得られたため、NOD マウスの週齢、性別、糖尿病の発症の有無に関わらず発揮されるものと考えられた。これらの結果より、MKF が LPO の IL-10 応答誘導効果を強力に抑制できることが明らかとなった。

## (2) ミルクペプチド画分 (MKF) の T 細胞応答抑制効果

次になぜ MKF が LPO の IL-10 応答誘導効果を抑制できるのか解明するために、抗原および抗 CD3 抗体刺激によるマウス T 細胞増殖応答に及ぼす MKF の抑制効果について検討した。あらかじめ OVA で免疫した BALB/c マウスのリンパ節細胞の抗原および抗 CD3 抗体刺激による増殖応答は、MKF の添加濃度の増大に伴い減少し、MKF 10 µg/ml 以上の添加により有意に抑制された。この MKF の T 細胞応答抑制効果は培養開始時に抗原と共に MKF を添加した場合のみならず、培養 3 日目に MKF を <sup>3</sup>H 標識チミジンと同時に添加した場合でも認められた。また、免疫処理を施していない naïve な BALB/c マウスの脾臓細胞の抗 CD3 抗体刺激による増殖応答も、やはり MKF 10 µg/ml 以上の添加により有意に抑制された。

さらに MKF のこのような抑制効果は BALB/c マウスのみならず、C3H/HeN や C57BL/6N マウスのリンパ節細胞を用いた場合でも、また抗原を OVA から KLH に変更した場合においても観察された。すなわち、MKF の T 細胞応答抑制効果は MHC 拘束性や抗原特異性に関わらず、発揮されるものと考えられた。これらの結果より、MKF はマ

ウス T 細胞の活性化を汎用的に抑制することができるため、LPO の IL-10 応答誘導効果を抑制できるものと結論づけられた。本研究開始時には、私どもが新たに見出した MKF は LPO とは全く正反対の活性を有する免疫賦活物質であると捉えていたが、本研究の結果、予想に反して、MKF は LPO より強力な T 細胞応答抑制活性をもつ免疫抑制剤であることが明らかとなった。

## (3) その他

BALB/c マウスの脾臓細胞に抗 CD3 抗体刺激を与えると、IL-4、6、10、IFN- $\gamma$  などのサイトカイン応答が誘導されるが、MKF はこの中で IL-6 応答には全く影響しないものの、Th1 系のサイトカインである IFN- $\gamma$  応答や Th2 系のサイトカインである IL-4 および 10 応答を有意に抑制できることが新たに明らかとなった。さらに鶏卵アレルギーモデルである DO11.10 マウスの脾臓細胞を用いた場合においても、鶏卵アレルギーの発症原因となる Th2 系のサイトカインである IL-4 および 10 応答を抑制できることが見出されたため、MKF はアレルギー疾患の予防・治療法として応用できる可能性が示唆された。

NOD マウスは最も代表的な自己免疫疾患の一つである 1 型糖尿病のモデルマウスであるが、MKF はこのマウスの 1 型糖尿病の発症原因となる自己免疫応答を *in vitro* で抑制できることが本研究の結果、明らかとなった。これは MKF が自己免疫疾患の予防・治療法として期待できることを示唆する知見である。今後はこのような MKF が有するアレルギーや自己免疫疾患の発症を抑制する効果について、さらに検討していきたい。

## 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 6 件)

真下和樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、T 細胞応答に及ぼすミルクペプチド画分の作用( )、日本食品免疫学会第 9 回学術大会、2013 年 10 月 17 日~2013 年 10 月 18 日、東京大学(東京都)

佐藤真名美、八村敏志、榎本 淳、川上浩、T 細胞応答に及ぼすミルクペプチド画分の作用( )、日本食品免疫学会第 9 回学術大会、2013 年 10 月 17 日~2013 年 10 月 18 日、東京大学(東京都)

中村圭介、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、ラクトパーオキシダーゼの IL-10 応答誘導効果を抑制するミルクペプチド画分、日本食品免疫学会第 8 回学術大会、2012 年 10 月 16 日~2012 年 10 月 17 日、ヤクルトホール(東京都)

A. Enomoto, T. Takeuchi, K. Takahashi, M. Chibana, S. Hachimura and H. Kawakami, Interleukin-10-producing Regulatory Cells Induced by Cow's Milk Lactoperoxidase, The 25th Animal and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Nov. 27-30, 2012, Nagoya Congress Center, Nagoya

真下和樹、柏木春香、野澤清史、星野早苗、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、自己抗原および牛乳ラクトパーオキシダーゼにより誘導される IL-10 産生細胞、日本動物細胞工学会第 24 回大会、2011 年 7 月 22 日～2011 年 7 月 23 日、東京大学(東京都)

生方孝明、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、鶏卵アレルギーに特異的な免疫応答に及ぼすラクトパーオキシダーゼの抑制効果、日本食品免疫学会第 7 回学術大会、2011 年 10 月 18 日～2011 年 10 月 19 日、東京大学(東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎本 淳 (ENOMOTO ATSUSHI)

群馬大学・理工学研究院・准教授

研究者番号：70183217

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし