

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504006

研究課題名(和文)免疫機能に影響するマクロファージの酸化還元状態に対する β -カロテン介入機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the intervening mechanism of beta-carotene in the redox status of macrophages which regulate the immunological functions.

研究代表者

山西 倫太郎 (Yamanishi, Rintaro)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：30253206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞内のグルタチオン(GSH)量は、個体の免疫力に影響する。本研究では、マウスマクロファージ(M ϕ)培養細胞RAW264を用い、 β -カロテン(BC)がM ϕ 内GSH合成を引き起こすまでのメカニズムを検討した。その結果、RAW264細胞に対するBC誘導性GSH産生に、c-Jun N-terminal Kinaseによる情報伝達の関与が判明した。さらに、細胞内GSH量に対する影響において、レチノールも β -カロテンと同様の活性を示したが、一方でそれらの共通の代謝物であるレチノイン酸によって刺激されるレチノイン酸受容体やレチノイドX受容体が関与する情報伝達は、その作用には関係しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The amount of intracellular glutathione (GSH) in immune cells regulates the individual immune competence. In this study how beta-carotene elicits intracellular GSH-synthesis was investigated with a murine macrophage cultured cell line RAW264. As a result, the involvement of the signal transduction pathway mediated by c-Jun N-terminal Kinase in beta-carotene-induced GSH-synthesis in RAW264 cells was elucidated. Furthermore, retinol showed the similar activity with beta-carotene in affecting the intracellular GSH level. Despite such common activity between beta-carotene and retinol, the absence of signaling pathway consisting of retinoic acid receptor (RAR) and/or retinoid-X receptor (RXR), which would be stimulated by retinoic acid, a common metabolite between beta-carotene and retinol, from the activity was suggested.

研究分野：統合栄養科学

 キーワード：食品成分の機能性 食品免疫学 マクロファージ グルタチオン β -カロテン c-Jun N-terminal Kinase レチノイド

1. 研究開始当初の背景

(1) 科学的な背景

β-カロテン他のカロテノイドが免疫機能に影響を及ぼしたとする研究報告が、これまでに数多く存在する。しかし、ビタミンA前駆物質としての作用以外には、定まった見解はない。そして、免疫細胞に対するβ-カロテンの作用メカニズムも明らかではなかった。

(2) 研究代表者らの準備状況

研究代表者は、「β-カロテン添加食を摂取したマウスでは、アレルギーを起こすIgE抗体の産生が低下する (*Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 2176-2182, 2003)」・「抗原刺激に応答する脾細胞IL-12分泌はβ-カロテン摂取により増強され、1型ヘルパーT細胞(Th1)優位になる (*Biosci Biotechnol Biochem* 70, 3042-3045, 2006)」という結果を得てきた。

また、ヒトでも「血清β-カロテン濃度とアトピー性皮膚炎罹患率が逆相関する」ことを学会報告した(平成20年日本栄養・食糧学会大会、埼玉)。これらは、β-カロテンの摂取が生体の適応免疫系に影響を及ぼしていることを示している。

さらに、より詳細な分析のため、IL-12を分泌する抗原提示細胞の一種であるマクロファージに着目し、そのマウス培養細胞RAW264の培地へのβ-カロテン添加の影響について検討したところ、「β-カロテンは細胞膜脂質の過酸化を誘導するが、一方で細胞質内の抗酸化性を向上させる (*Biosci Biotechnol Biochem* 70, 2112-2120, 2006)。」という結果を得た。

そして近年では、「マウスにおけるβ-カロテンの摂取・蓄積は、脾臓細胞内の還元型グルタチオン(GSH)濃度増大をもたらす、Cys-カテプシンの活性亢進をもたらす (*Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1595-1660, 2008)。」こと、「RAW264細胞実験系において、β-クリプトキサンチンはβ-カロテンと同様の効果を持つものの、細胞膜への蓄積性の違いのため、ルテインには効果がない (*Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1396-1405, 2009)。」こと、さらに、これらのカロテノイドの作用が、GSH産生律速酵素グルタミン酸システインリガーゼ調節サブユニット(GCLm)のmRNA発現増加に起因する(科研費基盤研究(C)22500761)ことも見出した。

(3) 関連する国内外の研究との関連性

本研究で測定する成分であるGSHについては、それが生体の機能維持・調節に重要であることがこれまでの多くの研究において示されてきた。

特に、抗原提示細胞内のGSHの量ならびに酸化還元状態が、生体内の免疫状態の指標であるTh1/Th2バランスに影響することが明らかとなってきた(Y. Murata et al., *Int. Immunol.* 14, 201-212, 2002)。

本研究により、β-カロテンが抗原提示細胞

に対してGSH産生を誘導する物質であることがメカニズムの解明により裏付けられれば、科学的根拠を持ってβ-カロテンの利用について考えることができる。

2. 研究の目的

これまでの研究成果より、研究代表者は、免疫系に対するβ-カロテンの作用について、『β-カロテンは細胞膜に蓄積し、細胞質内のGSH量を増大させる。マクロファージ等の抗原提示細胞においても細胞質の酸化還元状態を還元側に導くため、活性酸素種(ROS)の攻撃に弱いCys-カテプシンの活性を保護する効果を持つ。Cys-カテプシン活性は、適応免疫の要である抗原提示と相関するので、β-カロテンの影響下では同細胞によるIL-12の産生量が増大し、このサイトカインによって誘導されるTh1優位な免疫応答をもたらすため、Th2により導かれるIgE抗体産生は抑制される。』という仮説を立てるに至った。

本研究は、上記の仮説の最重要ポイントである「β-カロテンによるマクロファージ等抗原提示細胞内のGSH量増加メカニズムの解明」を目的としており、マウスマクロファージ培養細胞RAW264をモデルとして用い、種々の実験を行った。まず、酸化・抗酸化に関係する細胞内情報伝達系の関与について検討した。さらに、栄養素としてのβ-カロテンの位置づけであるプロビタミンAの観点から、ビタミンAであるレチノールや代謝物レチノイン酸の生理作用との関係の有無について明確にするため、レチノイン酸受容体(RAR)やレチノイドX受容体(RXR)に対する刺激または阻害による影響について、特に詳細に検討した。

3. 研究の方法

細胞内情報伝達系に対する各種刺激剤を用いて、β-カロテンの作用を再現できるかについて測定したり、逆に各種阻害剤を用いて、β-カロテンによるRAW264細胞内GSH合成(系)に対する影響を測定することにより、β-カロテンの作用に関与している情報伝達系について検討する実験を行った。

(1) β-カロテンによるGSH産生誘導・GCLmタンパク質発現誘導に対するmitogen-activated protein kinase (MAPK)情報伝達系の関与

β-カロテンによるGSH産生誘導に対して、種々のMAPK阻害剤の作用を比較した。測定に用いた阻害剤は、c-jun N-terminal Kinase (JNK)阻害剤SP600125、p38 MAPK阻害剤SB203580、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2阻害剤FR180204の3種である。

β-カロテンによるGCLmタンパク質発現誘導に対して、β-カロテンで関与が示唆された特定のMAPKに対する阻害剤の作用について、細胞

抽出画分を用い、抗 GCLm 特異的抗体によるウエスタンブロッティング法で測定した。

β-カロテンにより、で関与が示唆された特定の MAPK が、リン酸化されるかどうかについて、細胞抽出画分を用い、そのタンパク質に対する特異的抗体とリン酸化された当該タンパク質に対する特異的抗体によるウエスタンブロッティング法で比較検討した。

(2) β-カロテンによる GSH 産生誘導に対するレチノイド情報伝達系の関与

β-カロテン代謝産物であるレチノールが、β-カロテン同様に RAW264 細胞内 GSH 量を亢進させるかどうかを検討した。

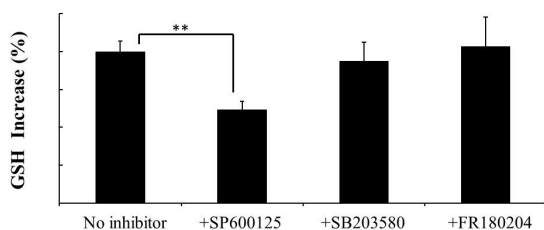
種々のレチノイド系受容体アゴニストが、β-カロテン同様の GSH 量増加作用を示すかどうかを検討した。用いたアンタゴニストは、レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor: RAR) 汎アゴニストの all-trans レチノイン酸、RAR 選択的アゴニスト AM80、RAR 選択的アゴニスト CD2314、RAR 選択的アゴニスト CD437 またはレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor: RXR) アゴニスト SR11237 である。

β-カロテンによる GSH 産生誘導に対して、種々のレチノイド系受容体アンタゴニストの作用を比較した。用いたアンタゴニストは、レチノイン酸受容体 RAR 選択的アンタゴニスト ER50891、RAR 選択的アンタゴニスト CD2665、または RXR アンタゴニスト HX 531 である。

4. 研究成果

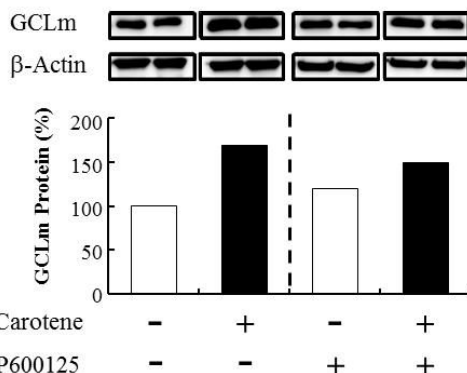
(1) β-カロテンによる GSH 産生誘導・GCLm タンパク質発現誘導に対する MAPK 情報伝達系の関与

β-カロテンによる GSH 産生誘導に対する種々の MAPK 阻害剤の影響



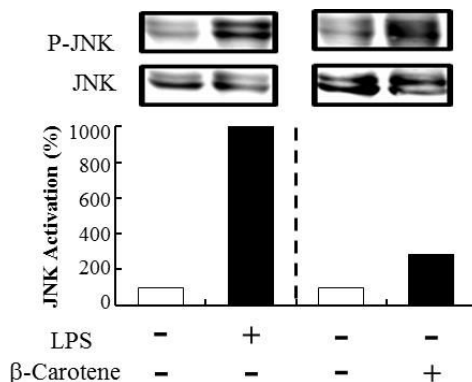
JNK 阻害剤 SP600125 は、β-カロテンによる GSH 産生誘導を阻害したが、p38 MAPK 阻害剤 SB203580、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 阻害剤 FR180204 は阻害しなかった。

β-カロテンによる GCL タンパク質発現誘導に対する JNK 阻害剤 SP600125 の影響



β-カロテンによる GCLm タンパク質発現誘導は、JNK 阻害剤 SP600125 により阻害された。

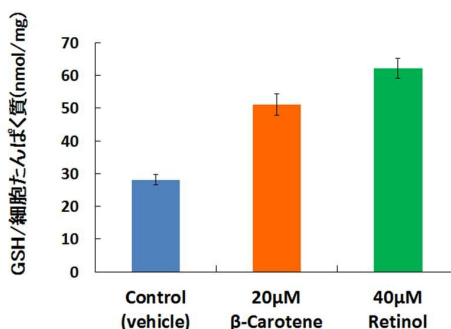
JNK リン酸化に対する β-カロテンの影響



RAW264 細胞に β-カロテンを添加するとポジティブコントロールであるリポ多糖 (LPS) 添加時と同様、JNK のリン酸化が誘導されていることが明らかとなった。

(2) β-カロテンによる GSH 産生誘導に対するレチノイド情報伝達系の関与

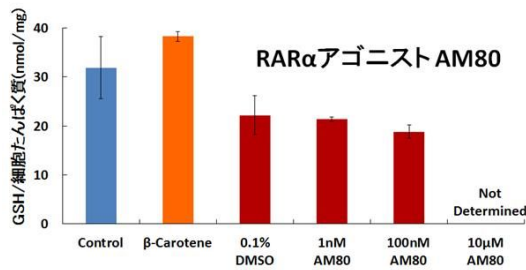
細胞内 GSH 量に対するレチノールの影響



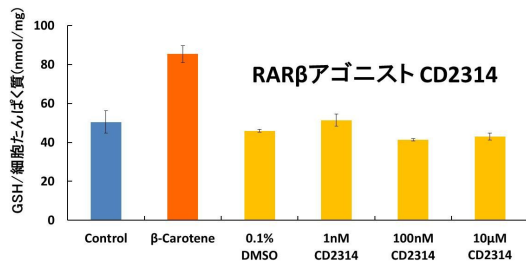
上図の通り、レチノールが、β-カロテン同様に RAW264 細胞内の GSH 量を増加させたことから、β-カロテンがレチノイドとして作用する可能性について検討する必要が生じた。

細胞内 GSH 量に対する RAR アゴニストや RXR アゴニストの影響

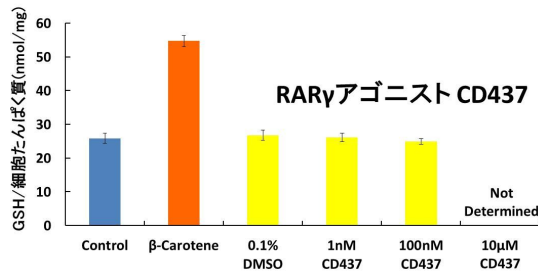
A) RAR アゴニストによる影響



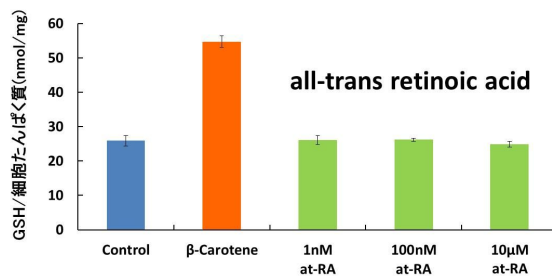
B) RAR アゴニストによる影響



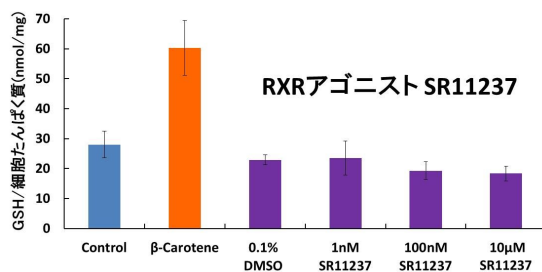
C) RAR アゴニストによる影響



D) RAR 汎アゴニストによる影響



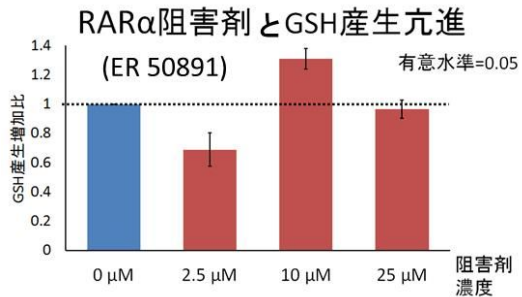
E) RXR アゴニストによる影響



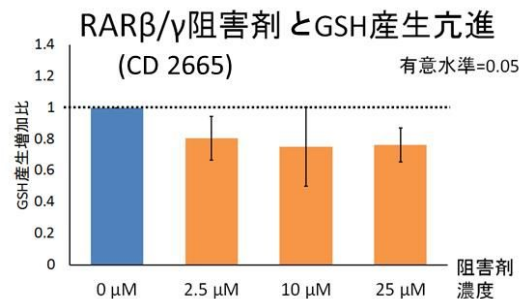
A) RAR アゴニスト、B) RAR アゴニスト、C) RAR アゴニスト、D) RAR 汎アゴニスト、E) RXR アゴニストいずれを添加した場合も、 β -カロテンを添加した場合のような GSH 増加作用は検出されなかった。

β -カロテンによる細胞内 GSH 産生誘導に対する RAR アンタゴニストや RXR アンタゴニストの影響

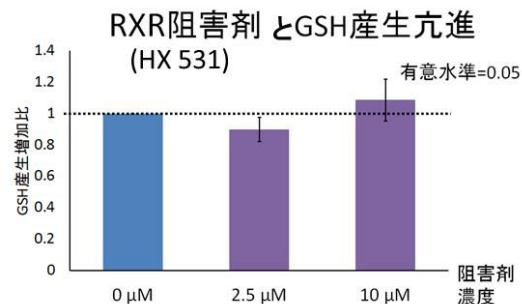
A) RAR アンタゴニストによる影響



B) RAR / アンタゴニストによる影響



C) RXR アンタゴニストによる影響



A) RAR アンタゴニスト、B) RAR / アンタゴニスト、C) RXR アンタゴニストいずれを用いた場合でも、 β -カロテンによる GSH 産生誘導に対する抑制作用は検出されなかった。

考察

RAW264 細胞における β -カロテンによる GSH 産生誘導には、酸化還元との関係の深い JNK 経路による情報伝達が関与しているも

のと推察された。一方、 β -カロテンと同様にレチノールに RAW264 細胞における GSH 産生誘導能が見出されたことから、 β -カロテンによる GSH 産生誘導にレチノイド系の情報伝達即ち、RAR や RXR の関与があるか否かについて検討したが、結果としてレチノイド情報伝達系の関与はないものと判断された。

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 1 件)

(1) T. Akaboshi & R. Yamanishi
Certain Carotenoids Enhance the Intracellular Glutathione Level in a Murine Cultured Macrophage Cell Line by Inducing Glutamate-cysteine-ligase., *Mol. Nutr. Food Res.*, (査読有り) **58** 巻 6 号, 2014, pp.1291-1300.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) R. Yamanishi, The intracellular mechanism for up-regulating the glutathione level in RAW264 murine macrophages exposed to β -carotene., 12th ACN (Yokohama) 2015 年 5 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

(2) 山西倫太郎、食品成分等に対する生体応答に関する研究、平成 26 年度神奈川県立保健福祉大学研究発表会、2014 年 9 月 25 日、神奈川県立保健福祉大学 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 倫太郎 (YAMANISHI RINTARO)
神奈川県立保健福祉大学保健福祉学部栄養学科・教授
研究者番号：30253206