

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658116

研究課題名(和文) 制御性B細胞の分化誘導・活性化を促進する食品成分の探索

研究課題名(英文) Screening of food factors inducing regulatory B cells

研究代表者

戸塚 護 (Totsuka, Mamoru)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70227601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：過剰な免疫応答を負に制御する制御性B細胞の分化誘導・活性化を促進するフラボノイドを検索する実験系を構築し、ケンフェロールおよびタマリキセチンがリポ多糖存在下でマウスB細胞のインターロイキン10産生制御性B細胞を増加させることを見出した。ケンフェロールをマウスに経口投与することで、脾臓および腸間膜リンパ節において制御性B細胞を増加させた。両フラボノイドは芳香族炭化水素受容体のアンタゴニストとしての機能があり、この活性が制御性B細胞の誘導・活性化に寄与している可能性が示唆された。本研究は制御性B細胞の誘導・活性化を標的とした新たな抗アレルギー、抗炎症食品の開発原理を示した。

研究成果の概要(英文)：An experimental system screening flavonoids that enhance the differentiation of mouse B cells to regulatory B cells or those activating regulatory B cells was established. Using this system, we found that kaempferol and tamarixetin upregulated interleukin-10-producing regulatory B cells in the presence of lipopolysaccharides. Oral administration of kaempferol was found to increase the ratio of regulatory B cells in spleens and mesenteric lymph nodes of mice. Kaempferol and tamarixetin showed an antagonistic activity to aryl-hydrocarbon receptor, and the activity was suggested to contribute to the up-regulation of regulatory B cells. This study demonstrates a novel approach to develop anti-allergic and anti-inflammatory functional foods targeting regulatory B cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：制御性B細胞 インターロイキン10 フラボノイド ケンフェロール タマリキセチン 芳香族炭化水素受容体(AhR) 抗アレルギー 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症をはじめとして、アレルギーに悩む人は増加の一途をたどっている。これは単に日常生活における Quality of Life の低下のみならず、経済活動における生産性の低下をもたらす点で社会的にも大きな問題となっている。アレルギー症状の緩和に対して、日常的に医薬品を使うことに抵抗をもつ人も多く、医療費の増大をもたらすことから、日々の食品の摂取によりその症状緩和や発症予防が可能となれば恩恵は大きいものと考えられる。

従来、免疫応答の制御は、免疫系の司令塔とも呼ばれる T 細胞とその活性化を制御する樹状細胞が担うものと考えられてきた。一方、抗体産生を担うリンパ球である B 細胞の一部は、主に抑制性サイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) を産生することにより、過剰な免疫応答を負に制御する機能をもつ制御性 B 細胞 (regulatory B cell; Breg) として働くことが明らかにされてきた。Breg は直接 Th1, Th2 などのエフェクター T 細胞の活性化を抑制する、あるいは制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導にかかわるものと考えられており、*in vitro* で誘導された Breg は動物実験モデルにおいてアレルギーや自己免疫疾患の発症予防効果を示すことも報告されている。

しかしながら、基礎免疫学的にも Breg の分化誘導や活性化のメカニズムには不明な点が多く残されており、Breg の分化誘導・活性化にかかわるサイトカイン、Breg に特異的な転写因子などは未解明なままである。また、微生物由来成分が Toll 様受容体 (TLR) を介した刺激で Breg の誘導にかかわることは報告されているが、食品由来の因子を含め Breg の分化・活性化に影響を及ぼすような低分子化合物については、これまでに報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、Breg の分化誘導および活性化を促進するような食品成分を見だし、抗アレルギー・抗炎症食品の新しい開発原理を明らかにすることを目的とした。このような食品成分は、T 細胞やマスト細胞をターゲットとする成分と協調的あるいは相乗的に効果を示すことが期待され、両者の組み合わせにより効果的な抗アレルギー、抗炎症作用が期待される。一方、Breg の分化誘導・活性化を促進する物質が見つければ、生体内での生理的な Breg の分化・活性化において重要なシグナル経路を明らかにすることにつながるなど、基礎免疫学的観点での貢献も期待できる。

まず Breg を誘導するような低分子化合物はあるのかどうかを明らかにするため、(1) マウス脾臓由来 B 細胞から Breg の分化誘導あるいは活性化を促進する低分子化合物を検索する *in vitro* 実験系を構築した。さらに、(2) 上記実験系で各種食品由来化合物を

対象として活性成分の検索を行い、活性をもつ化合物の *in vivo* での活性、作用機作について検討した。

3. 研究の方法

(1) Breg 分化誘導・活性化に影響を与える食品成分の *in vitro* 検索系の構築

BALB/c マウスから脾臓細胞を調製し、磁気ビーズ法 (MACS 法) を用いて B220⁺ 細胞を精製し、B 細胞として用いた。Breg を誘導することが明らかにされているリポ多糖 (LPS; TLR4 リガンド) を、様々な濃度で B 細胞に添加し、培養上清中の IL-10 産生量の変化を酵素免疫測定法 (ELISA 法) にて解析した。このとき IL-6 産生量も ELISA 法で測定した。CpG オリゴ DNA (TLR9 リガンド) がサイトカイン産生に与える効果についても検討した。

(2) Breg 誘導活性を有する食品成分の検索

上記で構築した実験系を用いて、13 種のフラボノイドの Breg 誘導活性を検討した。10 µg/ml の LPS 存在下、それぞれのフラボノイドを添加して 48 時間培養し、培養上清中の IL-10 量を ELISA 法で測定した。また、細胞内 IL-10 の抗体染色により、IL-10 産生 Breg をフローサイトメトリーで解析した。

(3) 食品成分で分化誘導・活性化された Breg の特性の解析

フラボノイドの存在下で分化誘導・活性化された Breg の T 細胞応答抑制活性を調べるため、D011.10 マウス由来 CD4⁺T 細胞を抗原提示細胞と抗原ペプチドで刺激する実験系において、Breg の添加による T 細胞応答の変化 (サイトカイン産生、細胞表面分子の発現) を解析した。

(4) 芳香族炭化水素受容体の関与の検討

芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon Receptor: AhR) の関与を検討するため、B 細胞においてリガンド依存的に AhR が発現誘導する遺伝子 (CYP1a1, AhRR) の mRNA 発現に対して、フラボノイド添加が与える影響をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(5) *In vivo* における Breg 誘導効果の検討

In vitro での Breg 誘導活性が示されたフラボノイドについて、*in vivo* での誘導活性を検討するため、フラボノイドを 2 週間強制経口投与した後に、脾臓および腸間膜リンパ節 B 細胞中の IL-10 産生 Breg の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

Breg 分化誘導・活性化に影響を与える分子の *in vitro* 検索系の構築

食品成分が Breg の分化誘導・活性化に与える影響を検討するための実験条件を検討した。BALB/c マウス脾臓由来 B 細胞を LPS あ

るいは CpG オリゴ DNA で刺激することで、IL-10 の産生が誘導された。CpG オリゴ DNA は IL-6 産生を強く誘導する活性も認められたため、Breg 誘導活性を示す食品成分の検索には、10 µg/mL の LPS による Breg 誘導系を用いることとした。

Breg 誘導活性を有する食品成分の検索

LPS 存在下、13 種類のフラボノイドを添加して脾臓由来 B 細胞を培養したところ、ケンフェロールおよびタマリキセチンの添加により濃度依存的に IL-10 産生が増加することが明らかとなった。腹腔、腸間膜リンパ節およびパイエル板由来の B 細胞に対しても、同様の IL-10 産生増強が認められた。一方、ルテオリンおよびバイカレインを添加した場合には IL-10 産生の抑制が観察された。また、フローサイトメトリーにより細胞内 IL-10 発現を解析した場合にも、ケンフェロールおよびタマリキセチンの添加により IL-10 産生 Breg の割合の増加が観察された。

フラボノイドで分化誘導・活性化された Breg の特性の解析

D011.10 マウス由来 CD4⁺T 細胞を抗原刺激する際に、ケンフェロールおよびタマリキセチン存在下で誘導された Breg を添加した場合には、LPS のみで誘導した Breg を添加した場合と比較して、インターフェロン γ および IL-4 産生をより強く抑制することが示された。

Breg 誘導活性における芳香族炭化水素受容体の関与の検討

免疫細胞の活性化や分化誘導において、受容体型転写因子である AhR が関与する例が多く知られている。ケンフェロールおよびタマリキセチンによる Breg 誘導における AhR の関与を検討するため、AhR リガンドで誘導される遺伝子 (CYP1a1, AhRR) の B 細胞における mRNA 発現を検討した。ケンフェロールおよびタマリキセチンの添加により AhRR の mRNA 発現が顕著に抑制されたことから、両フラボノイドはマウス B 細胞において AhR アンタゴニストとして作用することが示唆された。

一方、バイカレインおよびルテオリンも AhR アンタゴニスト活性を有することが報告されている。ルテオリンおよびバイカレインは高濃度では B 細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかとなったため、この作用により LPS で誘導される Breg の IL-10 産生を抑制したものと考えられた。しかしこの時、B 細胞の生細胞中の IL-10 産生 Breg の割合は、ルテオリンおよびバイカレインの添加で増加していた。

AhR 遺伝子欠損マウスでは IL-10 産生 Breg の存在比が高まっていたという実験結果も得られており、上記の結果を合わせて考えると、AhR アンタゴニスト活性を有するフラボ

ノイドは Breg 誘導活性をもつことが示唆された。

ケンフェロールの経口投与による Breg 誘導

ケンフェロールの *in vivo* での Breg 誘導活性を検討するため、C57BL/6 マウスに 2 週間、ケンフェロールを強制経口投与した。脾臓および腸間膜リンパ節における IL-10 産生 Breg の存在をフローサイトメトリーで解析したところ、ケンフェロール投与群では対照群と比較して、両組織で IL-10 産生 Breg が増加していることが明らかとなった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでに Breg を誘導する活性をもつ低分子化合物については、知る限り国内外で報告がなく、本研究で得られた成果は新奇な発見であると言える。芳香族炭化水素受容体 (AhR) アンタゴニスト活性が Breg 誘導に関与することが示唆されたこともインパクトの大きい重要な知見と言える。また、様々な野菜・果物類に含まれるケンフェロールについては、動物実験のレベルではあるが、経口投与により *in vivo* においても Breg を誘導する活性が認められており、これを摂取することにより Breg 誘導を介した免疫調節、炎症抑制が期待できる点でも意義ある成果と考えられる。

2013 年には脂肪組織において IL-10 産生 B 細胞が多く存在し、脂肪組織における炎症抑制に働き、生活習慣病の予防に寄与しているという研究結果が報告された。そのような B 細胞はやせたマウスの脂肪組織で多く存在し、太ったマウスの脂肪組織ではそれが減少することも見いだされた。生活習慣病をはじめとして様々な疾患において、慢性的な炎症がその原因となることが明らかにされてきている。Breg や制御性 T 細胞のような免疫抑制作用をもつ免疫細胞を分化誘導・活性化する食品成分を明らかにし、これらを組み合わせることで利用することにより効果的に慢性炎症を抑制することが可能となることが期待される。このような設計原理に基づいた生活習慣病を予防する食品の開発は、食による国民の健康維持に資するものと考えられる。

(3) 今後の展望

本研究では 2 つのフラボノイドに Breg 誘導活性があることが見いだされた。今後はフラボノイドの構造的な観点からケンフェロール、タマリキセチンに類似の構造をもつフラボノイドの Breg 誘導活性を解析することにより、構造活性相関の研究を進めたい。一方、AhR の関与が示唆されたため、その点についてもさらに実験結果を積み重ね、明らかにする必要がある。

Breg 誘導活性を有する食品成分を実際に経口投与した場合の、免疫調節作用について

明らかにする必要がある。経口免疫寛容の誘導強化によるアレルギー応答の制御、自己免疫疾患の制御、腸炎症の制御効果、上記で述べたような脂肪組織における炎症抑制効果などについて検討していきたい。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

葉 鎮豪、堀内 準矢、薩 秀夫、清水 誠、
戸塚 護

ケンフェロール経口投与による制御性 B 細胞の分化誘導とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎の抑制効果(口頭発表)
日本農芸化学会 2014 年度大会 (JSBBA 2014) 2014 年 3 月 29 日、明治大学(東京)

戸塚 護

食品成分による T 細胞・B 細胞機能分化の制御 (依頼講演)

日本農芸化学会関東支部 2013 年度第 2 回支部例会シンポジウム「食品機能研究の最前線」

2014 年 2 月 1 日、東京農工大学 農学部講堂 (東京都府中市)

Chen-Hao Yeh、Marc Veldhoen、Mamoru Totsuka

Aryl hydrocarbon receptor deficiency induces regulatory B cell population with IL-10 and IL-27 production (口頭 + ポスター発表)

第 42 回日本免疫学会学術集会 (JSI 2013)、2013 年 12 月 12 日、幕張メッセ(千葉)

Mamoru Totsuka

Modulation of T-cell and B-cell functions by dietary polyphenols (招待講演)

2013 Annual Conference of the Korean Society of Nutrition "Inflammation and Nutrition", Session 5 'Immunity and Inflammation', 2013 年 11 月 8 日、Millennium Seoul Hilton Hotel, Seoul, Korea

葉 鎮豪、清水 誠、戸塚 護

タマリキセチンによる制御性 B 細胞の分化誘導とその免疫抑制効果 (口頭発表)

日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 26 日、東北大学(宮城県)

葉 鎮豪、薩 秀夫、清水 誠、戸塚 護

ケンフェロールによる制御性 B 細胞の分化誘導とその実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する抑制効果 (ポスター発表)

日本食品免疫学会 第 8 回学術大会、2012 年 10 月 16 日、ヤクルトホール(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 護 (TOTSUKA, Mamoru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授

研究者番号：70227601