

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560052

研究課題名(和文)食品由来の核酸による新規口腔内免疫システム活性化に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Activation of innate immune response by DNA from food

研究代表者

早川 清雄 (HAYAKAWA, Sumio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00368292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、毎日、多くの食事を摂取している。食事には、ビタミン・ミネラル・タンパク質をはじめとした必須な栄養素が豊富に含まれており、それらが身体や健康の維持に重要であることが明らかにされている。しかしながら、食品に含まれる核酸による機能性は、ほとんど明らかにされていない。そこで、食品に含まれる核酸に注目し自然免疫応答に対する効果について検討を行った。免疫応答をつかさどるマクロファージ細胞に対して数種類の食品から抽出した核酸と口腔内に存在するペプチドを混合し処理を行うと、細胞質のセンサー分子を介して自然免疫応答が活性化されることがわかってきた。食品由来の核酸は、健康の一端を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Food is recognized as one of the important factors which regulate human health such as immune response. It is known that vitamins, minerals and proteins are essential nutrients to build a healthy body. However, the role of food DNA on health is not clearly understood. So, we focused on the effect of food DNA on activation of innate immune signaling pathway mediated by PRRs. Here we show that a complex with the food DNA and short peptide, the only cathelicidin-derived antimicrobial peptide, activated innate immune response and functioned as a ligand of RIG-I in macrophage. We suggest that DNA from food could provide an application in therapy aimed at maintaining good health.

研究分野：生化学

キーワード：食品 核酸 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

我々は、毎日、多くの食事を摂取している。食事には、ビタミン・ミネラル・タンパク質をはじめとした必須な栄養素が豊富に含まれており、それらが身体の維持・健康の維持に重要であることが多くの研究者によって明らかにされている。

申請者は、これまでに自然免疫応答を中心に研究を行ってきた。この自然免疫応答は、人のみならず、植物から保存されている古典的、かつ非常に重要な生体防御システムであり、近年、世界中の研究者たちに注目され急速にそのメカニズムが明らかにされつつある領域である。自然免疫系の活性化は、病原体を構成する構造 (PAMPs; Pathogen-associated molecular pattern) がパターン認識受容体 (PRRs; Pattern-recognition receptors) によって認識されることから始まることが知られている。京都大学の藤田先生らが、インフルエンザウイルスなど RNA ウイルスが感染した細胞においては、細胞質に局在するセンサー分子である RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) がウイルス由来の核酸 RNA を認識し、インターフェロン (IFNs) やサイトカインを強く誘導することを見出した (*Nature Immunology*, **5**, 730-737, 2004)。また、申請者は、この RIG-I 経路に関与する新しい調節因子を見出し、その分子を ZAPS (Zinc finger Antiviral Protein 1, Short isoform) として報告した (*Nature Immunology*, **12**, 37-44, 2011)。

そこで、申請者は、「核酸による免疫応答の活性化」に着目し、日常的に摂取している食品由来の核酸が細胞内でセンサー分子により認識され、免疫応答の活性化に寄与するのではないかと考え、免疫細胞の一つであるマクロファージを用いて、インターフェロンやサイトカインの誘導を指標に核酸の認識と活性化シグナルのメカニズムについて検討を進めた。

2. 研究の目的

食品由来の核酸の認識が、細胞内のどのような分子パターン認識特性によって細胞の活性化に関与するのか、また活性化されたとしたら、どのようなセンサー分子によって核酸が認識され、下流のシグナル伝達経路を活性化するのかを明らかにすることである。さらに、植物由来の核酸の質的な違いにより応答性におよぼす影響が異なる可能性についても検討することを考えている。最終的には個体レベルで、核酸が及ぼす自然免疫応答への影響について評価することを計画している。

3. 研究の方法

細胞には、ウイルスや細菌感染に伴い、それら構成物質を迅速に認識し、異物を排除する機構が備えられている。中でも細胞質に存在する DNA 認識に関するセンサーとして AIM2 (absent in melanoma 2) や poly (dA-dT) ・

(dT-dA) などの AT-rich な二本鎖 DNA の場合、RNA polymerase III を介して 5' 末端三リン酸をもった二本鎖 RNA が転写されることで、RIG-I 依存性経路が活性化されること (Chiu, Y.H. et al., *Cell*, **138**, 576-91, 2009; Ablasser, A. et al., *Nat. Immunol.* **10**, 1065-72, 2009) など、核酸認識機構に関連する新しい報告がなされている。

一方で、AT-rich な二本鎖 DNA 以外の DNA については、ヒトの末梢血単核球などの特定の種類の細胞においてのみ I 型 IFN 産生誘導などの応答を示すことが報告されており、この場合、どのようなセンサーによって認識されるかは明らかにされていない。

本課題では、まず、免疫応答を担うマウス由来のマクロファージ細胞 (Raw 264.7 細胞、Bone Marrow-Derived Macrophage (BMDM)) を用いた実験系において解析を進めることを計画した。これまでに細胞株を用いて、核酸に対する応答性を、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) ・ ELISA 等で解析可能な系を確立している。実際、12well plate の 1well に対して、細胞を 2×10^5 cells となるように調整した後、植物から抽出した核酸 (DNA) を用いて細胞を処理し、至適時間培養した後、細胞から total RNA を抽出し qRT-PCR を用いた解析、または培地の上清を用いて ELISA 法にてタンパク質の定量解析を行った。さらに、様々な野菜から DNA を抽出し細胞に対する応答性の違いについて比較検討を行った。次に、実際に植物由来の核酸による、ウイルス感染防御に対する効果について、in vitro の実験系においてインフルエンザウイルスを用いてウイルス複製に関する検討を qRT-PCR 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 最初に、Raw 264.7 細胞または BMDM に対して、植物から抽出した DNA を用いて処理を行った。本研究課題においては細胞内における核酸 (DNA) の認識を検討するため、Lipofectamine と混合した DNA を細胞に対して処理を行い、インターフェロン (IFN) およびサイトカインの mRNA 発現について qRT-PCR を用いて解析を行った。その結果、数種類の植物由来 DNA を用いて活性を比較すると、もやし > アスパラガス > ブロッコリーの順番に核酸処理を行った細胞において強くインターフェロンおよびサイトカインが誘導されることがわかった。

(2) 核酸処理により、実際にタンパク質レベルでインターフェロンが誘導されているのかどうかについて ELISA 法を用いて検討した。ブロッコリー由来の核酸 (DNA) を Raw264.7 細胞に導入し、24 時間後に培地に含まれる IFN 量を ELISA 法を用いて測定した結果、qRT-PCR の結果と同様に IFN が強く誘導されることがわかった。

(3) 実際に、IFN の誘導が植物由来の核酸 (DNA) によって誘導されているのかどうか検討するため、抽出した核酸を DNaseI で処理し検討を行った。核酸を DNaseI で処理した後、アガロースゲル電気泳動で分解されていることを確認した後、Raw264.7 細胞に導入し qRT-PCR 法を用いて IFN mRNA の発現誘導について検討した。その結果、DNaseI で処理した DNA を細胞内へと導入した場合、DNA を導入していない細胞と同様に IFN の誘導がみられなかったことから、植物由来の DNA が細胞内へと導入されることにより、IFN 誘導活性を示していたことがわかった。

(4) 植物由来 DNA で処理した細胞を用いて、抗ウイルス効果について検討を行った。Raw264.7 細胞を DNA で処理した後、インフルエンザウイルスを感染させ、そのウイルス量を qRT-PCR 法を用いて解析を行った。その結果、処理した植物由来 DNA の濃度に依存して、ウイルス由来 RNA 量が減少することがわかった。また、インフルエンザウイルス量をプラークアッセイにより検討すると、有意に減少することがわかった。以上のことから、植物由来の DNA による IFN の誘導が、インフルエンザウイルスの抑制に有効であることを示すことができた。

(5) 細胞内へ導入した植物由来 DNA により、どのようなシグナル経路が活性化されるのかを合成 siRNA を用いたノックダウンの実験系により検討した。Raw264.7 細胞に対して合成 siRNA (RIG-I/STING/Myd88) を transfection し、48 時間後に植物由来 DNA を細胞内へと導入した後、qRT-PCR 法を用いて IFN の mRNA 発現について解析を行った。その結果、RIG-I および STING をノックダウンした細胞においては、IFN のシグナルが抑制された。一方、Myd88 をノックダウンした細胞においては、IFN の抑制効果が見られなかった。この結果から、細胞内に導入された植物由来の DNA は、a) RNA polymerase III を介して RIG-I によって認識され活性化される経路、b) RIG-I によって直接 DNA が認識される経路が考えられた。そこで、DNA または RNA のどちらが IFN の誘導に関与するのかを検討した。まず、Raw264.7 細胞に植物由来 DNA を導入した後、24 時間後に細胞から total RNA を回収した。次に、その total RNA を DNaseI で処理し、再び細胞へと導入することで RNA の関与を検討した。その結果、コントロール細胞由来の RNA を Raw 細胞へ導入した実験においては、IFN mRNA の発現が誘導されなかった。一方、植物由来の DNA を導入した細胞から抽出した RNA を Raw 細胞へ導入した結果、IFN の mRNA 発現が誘導されることがわかった。このことは、細胞内に導入された植物由来の DNA が細胞内で RNA に変換された後、RIG-I を介して IFN の誘導に寄与していることが考えられる。

(6) 唾液中に含まれる LL37 ペプチドと植物由来の DNA を混合し、ペプチド-DNA 複合体による自然免疫応答の活性化について検討を行った。In vitro の実験において、LL37 合成ペプチドと植物由来 DNA を混合しマクロファージに対して処理を行った。その結果、IFNB の発現誘導を qRT-PCR および ELISA により確認することができた。

本研究課題では、植物由来の DNA による自然免疫応答の活性化に関する検討を行った。植物由来の核酸 (DNA) が細胞内に導入されると強く IFN が誘導されることがわかった。また、口腔内に存在するペプチドと複合体を作ることにより、自然免疫応答の活性化が誘導されることがわかってきた。

我々は、日常的に食品の一つとして植物 (野菜) を摂取している。この植物の摂取は、これまで栄養素の摂取のためと考えられていたが、栄養素のみならず、それ自身が免疫応答の活性化に関与していることが考えられる。すなわち、植物の摂取を介して、免疫応答の活性化を誘導し、我々の生体防御機構の一端を担っていることが考えられる。今後は、植物のみならず、食品に含まれる核酸をターゲットとし、自然免疫システムにあたる影響を検討していく。

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 2 件)

① 早川清雄, 大石由美子
炎症シグナルが調節する脂質代謝調節機構
第 6 回 Molecular Cardiovascular
Conference II, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県, 福岡市) 2015

② 戸田遥香, 早川清雄, 亀山武志, 高岡晃教
植物由来の DNA による自然免疫応答の活性化の解析
第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 学術集会, 北海道大学 (北海道, 札幌市) 2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫応答を制御する核酸および核酸の加工法

発明者: 早川清雄・大石由美子

権利者: 東京医科歯科大学

種類：特許
番号：特願 第 2017-049827 号
出願年月日：2017/03/15
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：
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

早川 清雄 (HAYAKAWA, Sumio)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：00368292

(2) 研究分担者

亀山 武志 (KAMEYAMA, Takeshi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：40569505

(3) 研究分担者

高岡 晃教 (TAKAOKA, Akinori)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：30323611

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()