

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04498

研究課題名(和文)食品因子による制御性T細胞及びB細胞誘導の分子基盤と免疫・炎症反応制御効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of inhibitory effect of food-derived substances inducing regulatory T cells and B cells on immune and inflammatory response and its molecular basis

研究代表者

戸塚 護 (Totsuka, Mamoru)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：70227601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答を調節する食品因子に着目して、免疫応答抑制機能をもつ制御性T細胞および制御性B細胞の分化・活性化を誘導する食品因子を検索し、その作用機構や経口投与した際の抗炎症効果を解析した。植物に含まれる化学成分であるフラボノイドの一部にそのような活性化があることを見出し、これらが炎症性腸炎動物モデルにおいて抗炎症効果を示すことを明らかにした。このような免疫抑制機能を有する食品因子は、アレルギーなどの免疫疾患の予防や症状を軽減したり、慢性炎症を発症基盤とする生活習慣病の予防などに効果を示すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the immune-modulating functions of food factors, we searched for those inducing or activating regulatory T cells (Tregs) or regulatory B cells (Bregs), which have immune-suppressive functions. The mechanisms of action of the food factors and anti-inflammatory activity in vivo were investigated. We found several flavonoids having such an immune-modulating functions, and observed the suppressive effects of these factors on an animal model of inflammatory bowel diseases. Food factors with immune-suppressive functions are expected to prevent or ameliorate allergies and also lifestyle diseases developing on the basis of chronic inflammation.

研究分野：食品機能学、食品免疫学

キーワード：制御性T細胞 制御性B細胞 フィトケミカル フラボノイド 免疫抑制作用 インターロイキン10 抗炎症効果

## 1. 研究開始当初の背景

喘息・花粉症などのアレルギー疾患や、リウマチ・I型糖尿病などの自己免疫疾患のように、免疫機能の異常が直接的な原因となる疾患の罹患率は、特に先進諸国においてこの20~30年で大きく増加しており、大きな問題となっている。一方近年の研究から、様々な慢性疾患、特に肥満に伴うメタボリックシンドローム、糖尿病、動脈硬化性疾患、がんなどの生活習慣病や、アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症や重症化に、軽度の炎症が持続的に進行する反応である慢性炎症が深く関与していることが明らかにされつつあった。炎症反応は、外来異物や自己の死細胞を排除し、生体恒常性を維持するために生じる反応であり、これらの反応は主に免疫系の細胞や分子が担っている。

免疫・炎症応答の抑制を担うリンパ球として、制御性T細胞(Treg)と制御性B細胞(Breg)の存在が知られている。これらは、他のリンパ球や樹状細胞の機能を抑制し、異物排除の目的を達した免疫応答を収束させたり、自己成分や無害な外来抗原に対する免疫寛容を維持する働きを担っており、アレルギー制御において重要な働きをしていることが明らかにされている。医学分野ではTreg誘導により動脈硬化症の発症を抑制する試みも行われている(Sasaki N *et al*, *J Atheroscler Thromb*, 2012)。

著者らはTregの分化誘導を促進する食品成分を検索したところ、柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンゲニンにその促進活性があることを見いだした(Wang HK *et al*, *J Agric Food Chem*, 2012)。Treg誘導に芳香族炭化水素受容体(AhR)が関与することが報告されており(Quintana FJ *et al*, *Nature*, 2008)、ナリンゲニンのTreg誘導活性はAhR阻害剤の存在下で解除されることから、AhRに依存した反応であると考えている。しかしながら、AhRアゴニスト活性をもつ化合物全てがTreg誘導活性をもつ訳ではないこと、逆にAhRアゴニスト活性をもたないフラボノイドにもTreg誘導活性があるものを見出しており(2014年日本農芸化学会にて発表)、フラボノイドによるTreg誘導活性の分子機構については不明な点が多く残されている。また、著者らはナリンゲニンを乳酸菌(*Lactococcus lactis* C59株)とともにマウスに投与することにより、乳酸菌単独投与の場合と比べて、より顕著にTreg誘導を強化し、経口免疫寛容の誘導を強化することを見出した(2014年日本農芸化学会にて発表)。

免疫応答を抑制するサイトカインであるインターロイキン10(IL-10)を産生し、過剰な免疫応答を負に制御する機能をもつBreg(Lund, FE and Randall, TD, *Nat Rev Immunol*, 2010)もアレルギーや自己免疫疾患の抑制に重要な働きをしている。また脂肪組織中にIL-10を産生するBregが多数存在しており、これが脂肪組織における炎症

反応を抑制することでメタボリックシンドローム発症の抑制に寄与していることが報告されていた(Nishimura, S *et al*, *Cell Metab*, 2013)。

著者らはリポ多糖(LPS)刺激によりマウスBregを誘導する実験系において、IL-10産生を増強する働きを有する食品因子を探索したところ、様々な野菜・果物に多く含まれるフラボノイドであるケンフェロール、イチョウなどに含まれるタマリキセチンにその活性があることを見出した(2012年、2013年日本農芸化学会にて発表)。また、AhRを介したシグナルを阻害することでBreg誘導が増強されることを、AhR遺伝子欠損マウスおよびAhRアンタゴニストを用いた研究から明らかにした(2013年日本免疫学会学術集会以て発表)。最近、抗体を産生する形質細胞がIL-10などの抑制性サイトカインを産生することが報告され(Shen P *et al*, *Nature*, 2014)、ケンフェロールのIL-10増強活性と形質細胞誘導との関係を明らかにすることで、活性発現の分子機構解明につながる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、免疫調節機能を有する食品因子は、アレルギーの制御のみならず、炎症反応を制御することにより生活習慣病などの疾患の予防にも寄与する可能性があり、従来考えられていたよりも広範な疾患の発症予防に役立つことが期待された。そこで本研究では、免疫・炎症応答の抑制を担うリンパ球であるTreg及びBregに着目し、その分化誘導・活性化に働く食品因子を研究対象とした。これまでの研究で見出した、TregやBregを誘導する食品因子(乳酸菌体、フィトケミカル等)について、これらの成分の機能発現の分子基盤を明らかにすることにより、その設計原理の構築を目指すとともに、より高い活性をもつ食品因子の探索も行い、生体内での免疫・炎症反応に対する抑制効果、疾患発症予防効果について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Treg誘導活性の解析

Tregの誘導にAhRの活性化が関与することが報告されているが、これまでの研究でフィトケミカルのTreg誘導活性とAhRアゴニスト活性は必ずしも相関しないことが示されている。各種植物由来食品因子について、Treg誘導活性を次の方法で検討した。すなわち、BALB/cマウス脾臓由来ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をIL-2とsuboptimalな濃度のTGF-βの存在下、抗CD3抗体、抗CD28抗体で刺激した。この系に被検食品因子を添加し、Treg誘導活性を解析した。Foxp3の発現をフローサイトリーおよび定量的RT-PCR法で解析し、他のCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖に対する抑制能を検

討した。中和抗体を用いて Treg 誘導活性が TGF- $\beta$  に依存するか否かについても検討した。

Treg 誘導活性が認められた因子については、当該食品因子存在下で特異的に誘導されるタンパク質を同定することを目的として、二次元電気泳動を用いた網羅的タンパク質発現解析を行った。ゲルから抽出したタンパク質を酵素分解断片の質量分析により推定した。

#### (2) Breg 誘導活性の解析

Breg 分化誘導・活性化に影響を与える食品因子を次の方法で検索した。すなわち、C57BL/6 マウス脾臓由来 B 細胞 (B220<sup>+</sup>細胞) を suboptimal な量の LPS 存在下で培養し、食品因子を添加した場合の培養上清中の IL-10 産生量を酵素免疫測定法 (ELISA) にて測定し、IL-10 産生細胞の割合の変化をフローサイトメトリーで解析した。

Breg の免疫抑制活性を評価するため、C57BL/6 マウス脾臓由来 T 細胞を抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を用いて刺激する実験系に同型マウス由来の Breg を加えた場合の T 細胞応答の変化を解析した。すなわち、T 細胞のインターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$  等のサイトカイン産生量の変化を ELISA 法により解析した。

Breg 誘導活性が見出された食品因子について、他の免疫関連細胞の IL-10 産生に与える影響について検討した。すなわち、脾臓から調製した樹状細胞、マウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞を Toll 用受容体 (TLR) リガンドで刺激した際に誘導される IL-10 産生に対して、培養系に添加した当該食品因子の効果を検討した。また、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激して機能分化を誘導する実験系においてこれらの因子を添加した際の効果を検討した。

#### (3) 生体内での Treg および Breg 誘導活性、抗炎症効果の解析

Treg 誘導活性や Breg 誘導活性が見出された食品因子や、それらを組合せて用いた場合の抗炎症効果を次のように解析した。

まず、*in vitro* でより生体に近い応答の観察が可能な実験系として、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞等の様々な免疫細胞が混在しているマウス脾臓細胞を LPS 刺激によって活性化する系を用い、Treg および Breg の誘導、IL-10 産生、IL-6 等の炎症性サイトカイン産生を解析した。

マウスに経口投与した際の *in vivo* での Treg/Breg 誘導能を検討した。すなわち、当該食品因子をマウスに胃ゾンデを用いて投与した後、脾臓、腸管関連リンパ組織などの Treg および Breg の存在状態を検討した。

また、炎症性腸疾患のモデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎動物モデルを用い、当該食品因子の抗炎症効果を検討した。すなわち、当該食品因子を

C57BL/6 マウスに 3 週間強制経口投与し、最後の 7 日間に 3% DSS を含む飲料水を自由摂取させることにより腸炎を誘発し、その間の体重変化、糞便の状態を観察した。DSS 投与終了時に解剖し、腸管の状態、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板の Treg あるいは Breg の存在も解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Treg 誘導活性を有する食品因子

27 種類の植物由来食品因子について、Treg 分化を誘導・促進する活性を検討した。その結果、いずれもフラボノイドであるエリオジクチオール、ケンフェロールを含む 4 種の食品因子の存在下で培養した T 細胞において、Treg 特異的転写因子である Foxp3 を発現する細胞の割合の上昇、Foxp3 mRNA 発現量の増加、他の CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する抑制活性が認められたことから、これらの食品因子に Treg 誘導活性があることが示された。

エリオジクチオールは TGF- $\beta$  非存在下でも同様の Treg 誘導活性を示し、TGF- $\beta$  の産生量および mRNA 発現量を増加させた。また、抗 TGF- $\beta$  中和抗体の存在下で Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の割合が低下したことから、エリオジクチオールの Treg 分化誘導効果には TGF- $\beta$  の産生誘導が関与していることが示唆された。一方で、抗 TGF- $\beta$  中和抗体添加時にエリオジクチオールの Foxp3 発現誘導能が完全には抑制されなかったことから、TGF- $\beta$  の関与しないエリオジクチオール特異的な Treg 分化誘導機構が存在することも示唆された。

エリオジクチオールの存在下で活性化刺激を加えて培養したマウス CD4<sup>+</sup>T 細胞のタンパク質発現の網羅的解析を行った。2 次元電気泳動像において、対照群と発現量の異なるスポットから抽出したタンパク質の酵素分解断片の質量分析を行い、同定を試みたところ、4 つのスポットについて候補タンパク質が得られた。

##### (2) Breg 誘導活性を有する食品因子

15 種類のフラボノイドについて Breg 誘導活性を検討したところ、これまでに見出したケンフェロールおよびタマリキセチンに加え、イソラムネチンおよびミリセチンが B 細胞の IL-10 産生を増強する活性をもつことが示された。これらがマウス脾臓由来樹状細胞、あるいはマウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞の IL-10 産生に与える影響を検討したところ、タマリキセチンは樹状細胞およびマクロファージの IL-10 産生に対しても増強効果を示すことが明らかとなり、B 細胞、樹状細胞、マクロファージに共通する機構を介して IL-10 産生を増強することが示唆された。

##### (3) 生体内での Treg および Breg 誘導活性、抗炎症効果

マウス脾臓細胞を LPS 刺激した際の IL-10 産生に対するケンフェロール、タマリキセチ

ン添加の効果を検討したところ、IL-10 産生増強効果、IL-10 産生細胞の割合の増加、IL-10 mRNA 発現量の増加が認められた。また、2 週間 C57BL/6 マウスにケンフェロールを胃内強制投与したのち、脾臓および腸間膜リンパ節から細胞を調製し、IL-10 産生細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、ケンフェロールの経口投与は腸間膜リンパ節の B 細胞および T 細胞における IL-10 高産生細胞の割合を増加させることが明らかとなった。

DSS 誘導性大腸炎モデルを用い、上記の食品因子を単独あるいは組み合わせて投与した際の効果を検討した。ケンフェロール、タマリキセチン、あるいはその両者を同時に 2 週間 C57BL/6 マウスに胃内強制投与し、投与期間の最後の 8 日間に DSS を含む飲料水を自由摂取させ、その間の体重変化、糞便の状態を観察したところ、両者を同時に投与した場合に顕著な症状抑制効果が観察された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

HeeSun Shin, Hideo Satsu, Min Jung Bae, Zhaohui Zhao, Haru Ogiwara, Mamoru Totsuka, and Makoto Shimizu. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, 168, 167-175 (2015)

Phuong Le Vu, Ryo Taktori, Taku Iwamoto, Yutaka Akagi, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka, Kazuhiro Chida, Kenji Sato, Makoto Shimizu. Effects of Food-Derived Collagen Peptides on the Expression of Keratin and Keratin-Associated Protein Genes in the Mouse Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(5), 227-235 (2015)

Tatsuhiko Hisatsune, Jun Kaneko, Hiroki Kurashige, Yuan Cao, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka, Yoshinori Katakura, Etsuko Imabayashi, and Hiroshi Matsuda. Effect of anserine/carnosine supplementation on verbal episodic memory in elderly people. *Journal of Alzheimer's Disease*, 50, 149-159 (2016)

Ayako Aoki-Yoshida, Kiyoshi Yamada, Satoshi Hachimura, Toshihiro Sashihara, Shuji Ikegami, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka. Enhancement of oral tolerance induction in DO11.10 mice by *Lactobacillus gasseri* OLL2809 via increase of effector regulatory T cells. *PLoS ONE*, 11(7): e0158643 (2016)

Hee Soon Shin, Hideo Satsu, Min-Jung Bae, Mamoru Totsuka, Makoto Shimizu. Catechol Groups Enable Reactive Oxygen Species Scavenging-Mediated Suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Nutrients*, 9(2), 165 (2017)

Junpei Nakase, Yuuichi Ukawa, Syoji Takemoto, Takayoshi Kubo, Yuko M. Sagesaka, Ayako Aoki-Yoshida, Mamoru Totsuka. RNA and a Cell Wall Component of *Enterococcus faecalis* IC-1 are Required for Phagocytosis and Interleukin 12 Production by the Mouse Macrophage Cell Line J774.1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(6), 1099-1105 (2017)

Yoshinori Katakura, Mamoru Totsuka, Etsuko Imabayashi, Hiroshi Matsuda, Tatsuhiko Hisatsune. Anserine/Carnosine Supplementation Suppresses the Expression of the Inflammatory Chemokine CCL24 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elderly People. *Nutrients*, 9(11): E1199 (2017)

戸塚 護, 腸の構造と働き. *日本栄養士会雑誌* 60(12), 654-656 (2017)

Qiong Ding, Kitora Tanigawa, Jun Kaneko, Mamoru Totsuka, Yoshinori Katakura, Etsuko Imabayashi, Hiroshi Matsuda, Tatsuhiko Hisatsune. Anserine/Carnosine

Supplementation Preserves Blood Flow in the Prefrontal Brain of Elderly People Carrying APOE e4. *Aging and Disease*, 9(3), 334-345 (2018)

Satoshi Hachimura, Mamoru Totsuka, Akira Hosono. Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(4), 584-599 (2018)

Taku Iwamoto, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Yamada, Tetsuro Emoto, Ryo Hatano, Makoto Shimizu. Establishment of intestinal epithelial cell line derived from fetal mouse colon and its immune-related characteristics - Comparison with mouse small intestinal epithelial cell line. *Cytotechnology*, in press.

Peng Li, Mamoru Totsuka, Yasuharu Ishihara, Ayako Aoki-Yoshida, Makoto Shimizu. Inhibitory effect of apple condensed tannins on expression of interleukin 6 by murine intestinal epithelial cell line MoS13 cells. *Cytotechnology*, in press.

〔学会発表〕(計 19 件)

Yuan Cao, Junya Uchida, Yuichi Tsuda, Hideo Satsu, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka. Carnosine enhances intestinal IgA antibody production in mice. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), May 14-18, 2015, Yokohama, Japan.

戸塚 護, 「プロバイオティクスによる経口免疫寛容誘導の強化」, 第 19 回腸内細菌学会, 2015 年 6 月 18 日, 北里大学薬学部コンベンションホール, 東京.

李 鵬, 青木 綾子, 戸塚 護, 「マウス腸管上皮細胞のケモカイン産生に対するリンゴ由来プロシアニジンの亢進作用」, 日本

動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015), 2015 年 7 月 9-10 日, 東北大学, 仙台.

戸塚 護, 青木綾子, 「乳酸菌による腸管免疫応答の制御」, 2015 年度生理学研究所研究会「生物学的階層構造をまたぐセルセンサー情報伝達に関する戦略的研究開発」, 2015 年 9 月 14-15 日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター, 岡崎.

戸塚 護, 「食品因子による T 細胞機能分化および 腸管上皮細胞機能の制御」, 日本食品免疫学会 2015 年度大会 日本食品免疫学会賞受賞講演, 2015 年 10 月 15-16 日, 東京大学 伊藤謝恩ホール, 東京.

青木(吉田) 綾子, 青木 玲二, 園山 慶, 戸塚 護, 「経口免疫寛容誘導における膜小胞「エキソソーム」の役割」, 第 11 回日本食品免疫学会 2015 年 10 月 15-16 日, 東大・伊藤謝恩ホール, 東京.

Mamoru Totsuka, 「Enhancement of oral tolerance induction by probiotics: different immunosuppressive mechanisms by different probiotic strains」, The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF 2015) Symposium 「Probiotics & Prebiotics」, 2015 年 11 月 22-25 日, COEX, Seoul, Republic of Korea.

戸塚 護, 「フィトケミカルによる免疫調節」, 岩手大学動物医学食品安全教育研究センター/東京大学食の安全研究センター/大阪府立大学食品安全科学研究センター/神戸大学食の安全・安心科学センター第 5 回共同開催フォーラム「食科学の近未来 - 守りと攻めの備えは万全か - 」2015 年 12 月 3-4 日, 東京大学 弥生講堂, 東京.

山田 剛史, 青木 綾子, 青木 玲二, 野村 将, 鈴木 チセ, 戸塚 護, 「*Lactococcus lactis* C59 株由来莢膜多糖の 免疫調節機能」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

伊藤 誠晃, 青木 綾子, 山岸 直子, 青木 玲二, 鈴木 チセ, 高山 善晴, 戸塚 護, 「コール酸の経口投与が C57BL/6J マウスの社会性行動に与える影響」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

松田 幸, 青木 綾子, 戸塚 護, 「抗原刺激下におけるエリオジクチオール制御性 T 細胞分化およびサイトカイン応答への影響」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

宇都 侑莉子, 青木 綾子, 青木 玲二, 園山 慶, 戸塚 護, 「腸内細菌叢の有無による

マウス由来血清エキソソーム構成の違い」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

羽多野 安曇, 青木 綾子, 戸塚 護, 「L-トリプトファンおよび L-プロリンがマウス腸管上皮細胞のサイトカイン産生応答に与える効果」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

堀内 準矢, 葉 鎮豪, 清水 誠, 戸塚 護, 「制御性 B 細胞の IL-10 産生増強効果を示すフラボノイドの作用機構の解析」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

長尾 淳史, 青木 綾子, 清水 誠, 岩槻 健, 戸塚 護, 「マウス腸管上皮細胞株から腸管オルガノイド誘導の試み」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

李 鵬, 青木 綾子, 伊東 秀之, 戸塚 護, 「Effect of extracts from different parts of pomegranate on chemokine production by intestinal epithelial cells」, 2016 年 3 月 27-30 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

戸塚 護, 「腸管における炎症反応と免疫応答制御」, 第 98 回日本栄養・食糧学会関東支部大会シンポジウム「ロコモとメタボを標的とした腸管研究の最前線」, 2016 年 10 月 22 日, 東京農業大学, 東京.

Cao Yuan, Junya Uchida, Yuichi Tsuda, Hideo Satsu, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka, 「Carnosine enhances intestinal IgA antibody production in mice」, The 2016 World Life Science Conference (WLSC2016), Nov. 1-3, 2016, China National Convention Center, Beijing, China.

Mamoru Totsuka, 「Modulatory effect of dietary phytochemicals on immune cells with immune-suppressive functions」, World Federation of Chinese Medicine Societies - the Conference of the Establishment of the Expert Committee of Mongolian Medicine, Jul. 14-16, 2017, Tongliao, China.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸塚 護 (TOTSUKA, Mamoru)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号: 70227601