

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05507

研究課題名(和文) 葉酸摂取量の調節による免疫機能制御方法の開発

研究課題名(英文) Manipulation of immune function by dietary folic acid

研究代表者

岡本 能弘 (Okamoto, Yoshihiro)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40261036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(regulatory T cell, Treg細胞)はFoxp3陽性T細胞であり、免疫応答の調節機能を担う。その細胞表面には4型葉酸受容体(FR4)が高発現しており、食餌中の葉酸がTreg細胞に影響を及ぼすことが想定される。葉酸過剰摂取群マウスはTreg細胞数の増加傾向が見られた。このメカニズムの解明のため遺伝子発現の変動をマイクロアレイにて解析した結果、葉酸過剰摂取により2倍以上発現亢進のみられた6個の遺伝子、2倍以上の発現低下のみられた2個の遺伝子を明らかとした。これらには免疫機能に関連する遺伝子も含まれていた。葉酸摂取量は免疫系の制御に影響を及ぼす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞(Treg細胞)は生体内において過剰な免疫応答を制御する機能を担う免疫担当細胞の一つである。Treg細胞膜上には4型葉酸受容体(FR4)が高発現していることが報告されているが、その生理的意義は不明である。葉酸は生体内の様々な酵素の補酵素であり、主に核酸合成に関連するビタミンであるとともに生体が摂取した葉酸はTreg細胞上のFR4を介してTreg細胞機能に何らかの機能変化を及ぼすことが想定される。葉酸摂取量が免疫システムの制御に影響を及ぼすならば、葉酸摂取量の調整などにより、免疫疾患の予防、感染症の予防に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Effect of excessive intake or deficiency of folic acid has not been clarified. It has been reported that the type 4 folic acid receptor (FR4) expresses on the cell surface of regulatory T cell (Treg). An excessive intake of FA (0.5 mg folic acid/g diet and 1.5mg folic acid/g diet) increased naturally occurring Treg (nTreg) population compared with healthy mice. Comprehensive gene expression changes with excessive intake or deficiency of dietary FA were examined by microarray analysis. The excessive intake of FA induced 6 genes showed more than twice increase of the expression and 2 genes showed more than twice decrease compared with normal diet. The Those genes include genes related immune system, such as immunoglobulin joining chain immunoglobulin joining chain In summary, our study demonstrated the previously unappreciated role of dietary FA as a critical nutrient that maintains Tregs. Our observation might have been important in manipulation of immune function.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 葉酸

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞 (Treg 細胞) は生体内において過剰な免疫応答を制御する機能を担う免疫担当細胞の一つである。Treg 細胞膜上には4型葉酸受容体 (FR4) が高発現していることが報告されている (Yamaguchi ら, Immunity, 2007) が、その生理的意義は不明である。生体が摂取した葉酸はTreg 細胞上のFR4 を介してTreg 細胞機能に何らかの機能変化を及ぼすことが想定される。本研究は葉酸摂取量が Treg 細胞の機能や分化に及ぼす影響とその分子レベルでの機序を解明することを目的としている。葉酸は肉類や緑黄色野菜に多く含まれており、葉酸欠乏および過剰摂取は、現代社会において健康上のリスクと考えられている。葉酸は生体内の様々な酵素の補酵素であり、主に核酸合成に関連するビタミンである。実際に葉酸欠乏および過剰摂取が Treg 細胞の分化にどのような影響を及ぼすか検討した。

2. 研究の目的

葉酸の摂取状況が免疫機能、特に、経口免疫寛容の成立にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすること、さらに、葉酸摂取状況による免疫寛容機能の変動が葉酸受容体を有する Treg 細胞の機能変動、分化能の変動に起因しているか否か検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 飼料の調製と投与

AIN-93G 粉末飼料 (control diet, 葉酸含量 2 µg/g diet, オリエンタル酵母株式会社) を対照飼料、葉酸欠乏 AIN-93G (オリエンタル酵母株式会社)、葉酸過剰摂取群について葉酸過剰飼料 FA 群(低用量葉酸)は、葉酸欠乏標準飼料 AIN93G に葉酸を 0.5 mg/g 配合した。葉酸過剰飼料 FA 群(高用量葉酸)は 1.5 mg/g となるよう配合した。C57BL/6J マウス(日本エスエルシー株式会社)を4群に分けそれぞれの飼料を4週間通して自由摂取させた。各群のマウス(n=4)から脾細胞、あるいは腸間膜リンパ節細胞懸濁液を調製し、total RNA を抽出した。

(2) Foxp3+細胞のフローサイトメトリー分析

PE-Cy5 標識抗マウス CD4 抗体 (バイオレジェンド株式会社) P にて細胞表面抗原を標識後、FoxP3 fixation concentrate (R&D Systems, Inc.) で細胞を懸濁し、30分静置する。脱イオン水で10倍希釈した FoxP3 permeabilization and wash buffer (R&D Systems, Inc.) で細胞を2回洗浄後 PE 標識抗 FoxP3 抗体 (R&D Systems, Inc.) を添加し、30分間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメトリー (Guava® Muse™ セルアナライザー、Merck Millipore 社) で解析した。

(2) マイクロアレイ分析

葉酸欠乏食、葉酸過剰食による遺伝子発現の変動についてマイクロアレイ分析を実施した。健常マウスを葉酸過剰飼料あるいは葉酸欠乏飼料で4週間飼育した後に脾細胞懸濁液を調製し、その遺伝子発現の変動をマイクロアレイ Clariom™ S Assay, mouse (Thermo Fisher Scientific, Inc., cat.# 902930)を用いて解析した。各群のマウス脾臓細胞から Total RNA 250 ng

を分取した。 GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit を用いて、Fragmented and Labeled cDNA サンプルを作製した後、 GeneChip™ Hybridization Oven 645 を用いて、アレイを、45°C、16 時間 (60 rpm) インキュベートした。 GeneChip™ Scanner 3000 7G を用いて、アレイのスキャンニングを行った。

4 . 研究成果

(1) 葉酸摂取状況が内在性 Treg((naturally occurring regulatory T cell : nTreg) 数に及ぼす影響

今回、実験期間を通して、葉酸欠乏および葉酸過剰条件で飼育した 4 群のマウスの体重変化、餌の摂取量に関して、標準飼料飼育マウスとの間に統計学的に有意な差は見られなかった。

飼育開始 4 週間後、脾臓と腸管膜リンパ節細胞懸濁液を調製しフローサイトメトリーにて Foxp3 発現細胞を測定した。脾臓と腸管膜リンパ節ともにフローサイトメトリーで解析した Treg 細胞数 (CD4+Foxp3+) は葉酸摂取量が多いほど増加する傾向が見られた (Fig. 1) 。これらの結果は、少なくとも葉酸摂取量により、末梢 nTreg 細胞が増加傾向となることを示す。

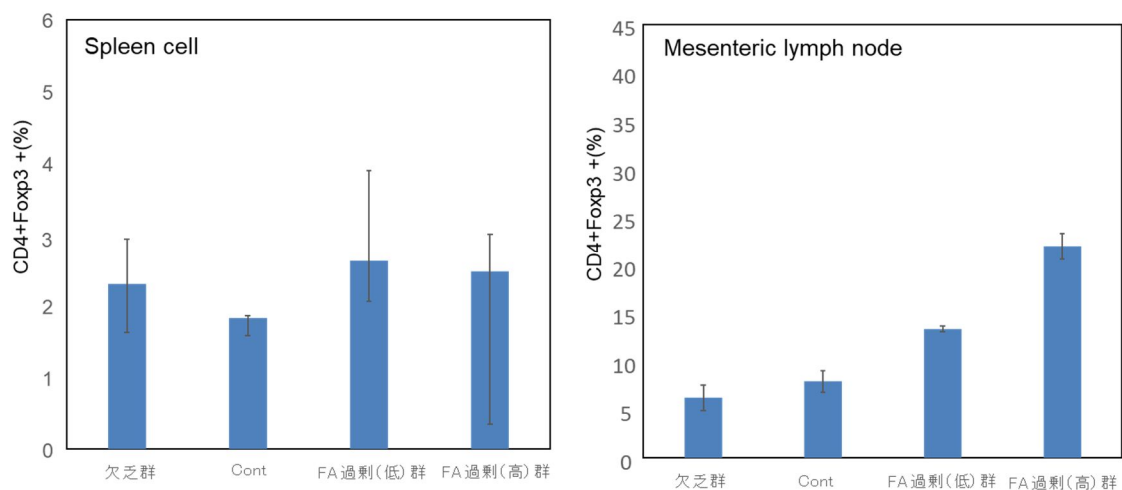


Fig.1 葉酸欠乏 / 葉酸過剰摂取が Treg に及ぼす影響

葉酸欠乏 / 葉酸過剰状態で飼育した各群のマウスから、脾臓細胞、腸管膜リンパ節細胞を調製し、フローサイトメーターで CD4+FoxP3+ 細胞を検出した。

欠乏群 : 葉酸欠乏 AIN-93G、Cont : AIN-93G 標準飼料(葉酸含量 2 μg/g diet)、Fa 過剰(低)群 : 葉酸欠乏標準飼料 AIN93G に葉酸を 0.5 mg/g diet 配合、Fa 過剰(高)群 : 葉酸欠乏標準飼料 AIN93G に葉酸を 1.5 mg/g diet 配合)

(2) 葉酸欠乏食、葉酸過剰食による遺伝子発現の変動

葉酸過剰摂取が nTreg の Foxp3 発現を亢進する分子メカニズムを明らかにするため葉酸欠乏食、葉酸過剰食による遺伝子発現の変動についてマイクロアレイ分析を実施した。健常マウスを葉酸過剰飼料あるいは葉酸欠乏飼料で 4 週間飼育した後に脾細胞リンパ球の遺伝子発現の変動状況を通常飼料(Control)で飼育したマウスとマイクロアレイで比較解析した。その結果、葉酸過剰飼料摂取群では 2 倍以上の発現亢進のみられた 6 個の遺伝子、2 倍以上の発現低下のみられた 2 個の遺伝子を明らかとした。一方、葉酸欠乏飼料摂取群では 2 倍以上の発現亢進のみられた 30 個の遺伝子、2 倍以上の発現低下のみられた 3 個の遺伝子を明らかとした。

これら葉酸摂取状況により発現変動する遺伝子の中には immunoglobulin joining chain 、heme oxygenase 1 (HO-1) 、 lysozyme 2 など免疫機能に深く関連すると考えられる遺伝子も含まれていた。以上の結果から、葉酸摂取量が免疫システムの制御に影響を及ぼす可能性が考えられた。これまでに、Byung-Min Choi らは Foxp3 は HO-1 の発現調節への関連が報告している (Byung-Min Choi ら, Biochem Biophys Res Commun, 2005)。

今後、これらの遺伝子発現変動と Treg 細胞の機能との関係について詳細に解析し、葉酸過剰摂取により誘導される Foxp3 発現を亢進させるしくみの解明につなげる予定である。

Table 1-1 葉酸過剰摂取により発現が2倍以上亢進する遺伝子		
Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description
NM_152839	Jchain	immunoglobulin joining chain
NM_008036	Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B
NM_010234	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
ENSMUST00000085949	Gm17428	predicted gene, 17428 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:4937062]
ENSMUST00000177817	Gm21738	predicted gene, 21738 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5433902]
NM_027222	Mzb1	marginal zone B and B1 cell-specific protein 1

Table 1-2 葉酸過剰摂取により発現が半分以下に低下する遺伝子		
Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description
NM_010442	Hmox1	heme oxygenase 1
NM_017372	Lyz2	lysozyme 2

Table 2-1 葉酸欠乏飼料により発現が2倍以上亢進する遺伝子		
Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description
NM_001159711	Ly96	lymphocyte antigen 96
NM_017480	Icos	inducible T cell co-stimulator
NM_001025246	Trp53i11	transformation related protein 53 inducible protein 11
NM_008491	Lcn2	lipocalin 2
NM_016740	S100a11	S100 calcium binding protein A11
NM_172865	Manea	mannosidase, endo-alpha
NM_001159908	Zfand2a	zinc finger, AN1-type domain 2A
NM_001039185	Ceacam1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
NM_009795	Capns1	calpain, small subunit 1
NM_025390	Pop4	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae)
NM_019566	Rhog	ras homolog gene family, member G
NM_010442	Hmox1	heme oxygenase 1
NM_001029876	Urb2	URB2 ribosome biogenesis 2 homolog (S. cerevisiae)
NM_007927	Emd	emerin
NM_010828	Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
NM_001083955	Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 2
NM_008218	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1
NM_001161419	Atp5g1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)
NM_134188	Acot2	acyl-CoA thioesterase 2
NM_178198	Hist1h2bj	histone cluster 1, H2bj
NM_001015889	Taf9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
NM_178195	Hist1h2bf	histone cluster 1, H2bf
NM_007479	Arf4	ADP-ribosylation factor 4
NM_001177751	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1
ENSMUST00000077127	Gm3839	predicted pseudogene 3839
ENSMUST00000172270	Gm5218	predicted gene 5218 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3646583]
NM_029787	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3
NM_001270537	Bin2	bridging integrator 2
NM_134150	Otub1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1
NM_010324	Got1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble

Table 2-2 葉酸欠乏飼料により発現が半分以下に低下する遺伝子		
Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description
NM_133962	Arhgef18	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18
NM_013815	Baz1a	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A
NM_026987	Dhx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本能弘
2. 発表標題 葉酸過剰摂取による制御性T細胞分化の修飾
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------