

平成 21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580139

研究課題名 (和文) 食品成分β-カロテンによる抗原提示細胞活性調節における作用メカニズムの究明

研究課題名 (英文) Studies on the mechanism underlying a dietary factor
-β-carotene-induced modulation of the activity of antigen presenting cells.

研究代表者

山西 倫太郎 (YAMANISHI RINTARO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30253206

研究成果の概要：

我々は、これまでにマウスに高ビタミンEとともにβ-カロテンを摂取させた場合には、抗原投与により誘導されるIgE抗体の産生が低下し、そして1型ヘルパーT細胞活性が亢進していることを報告している。本研究では、β-カロテンが免疫系に対してこのような影響を及ぼすメカニズムを解析することを目的とした。そこで、まずβ-カロテンを摂取したマウスの脾細胞およびそこに含まれる抗原提示細胞を実験材料に種々の検討を行った。また、マウスマクロファージ培養細胞 RAW264 を用いて、培地にβ-カロテンを添加することにより、β-カロテンの作用のより詳細な分析を行った。β-カロテンを摂取したマウスでは、β-カロテン投与量に応じて脾細胞のβ-カロテン蓄積量が増加し、それに呼応してグルタチオン量が亢進していることを見出した。その際、グルタチオン合成酵素 mRNA 量が増加していることも突き止めた。さらに、脾臓細胞のプラスチック付着画分 (抗原提示細胞リッチ画分) において、抗原提示に関与するシステイン-カテプシンの活性が亢進していることが判明した。培養細胞実験系では、細胞へのβ-カロテンの蓄積後、細胞膜の脂質過酸化が起こり、その後グルタチオン量の増加が生じるという時間的關係性が明らかとなった。以上より、β-カロテンはその redox activity により細胞内のグルタチオン合成を亢進させ、それに由来する還元性に基いて抗原提示を活性化させるというメカニズムが強く示唆された。今回の研究によって、β-カロテンの免疫調節における作用機序が明らかとなったわけであるが、それにより、どのような場合に、β-カロテンの摂取による効果的な免疫賦活が見込めるのかを判断することができるようになる。この成果は、健康増進の観点からβ-カロテンやそれを含む緑黄色野菜・果物の効果的な摂取を企図する場合に、役に立つ知見であると見込まれる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：食品機能学、食品免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的な背景: 主要なβ-カロテン供給源と目されている野菜や果物の摂取が、健康維持に寄与していることが明らかな一方、β-カロテンそのものの摂取については、大規模介入試験において、無効または有害との結果も出ており (G.S. Omenn, *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1550-9, 1996; D. Albanes, *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1560-70, 1996)、科学的に納得しづらい状況である。このような状況下では、β-カロテンの生体への作用について、科学的により詳細に検討し、生理的な作用点ならびに作用メカニズムを解明することが必要であり、それこそが、この物質の功罪を論ずる手掛かりになる。

(2) 研究代表者らの準備状況: 研究代表者らは、これまでに、α-トコフェロールと共にβ-カロテンを強化した食餌を摂取したマウス群において、通常食マウス群よりもアレルギーの要因となるIgE抗体の産生が低下していることを見出し、(N. Bando, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 2176-82, 2003)、この根拠となるデータとして、特定のタンパク質抗原に応答するトランスジェニックマウスを用いた最近の研究で、同様の食餌がマウスの抗原呈示刺激に応答するサイトカイン分泌を1型ヘルパーT細胞(Th1)優位に調節することも見出し、(T. Koizumi, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 3042-5, 2006)。さらに、マクロファージ様培養細胞を用いた研究から、脂溶性の抗酸化性食品成分として知られるβ-カロテンとα-トコフェロールの抗酸化作用を比較したところ、β-カロテンはフリーラジカルによる細胞膜脂質の酸化を抑制できないが細胞内の還元型グルタチオン量を亢進すること、α-トコフェロールはフリーラジカル作用を消去するが細胞内グルタチオン量には影響を与えないことを見出し、(T. Imamura, *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2112-20, 2006)。

(3) 関係する国内外の研究との関係性: 抗原呈示機能を持つマクロファージの細胞内Redox statusは、ヘルパーT細胞の免疫応答に影響する(Th2への分化を抑え、Th1を導く)ことが、近年明らかにされつつある(Y. Murata, *et al.*, *Int Immunol*, **14**, 201-12, 2002)。これらより、研究代表者は、『β-カロテンは抗原呈示細胞の細胞質の酸化還元状態を還元側に導いた結果、同細胞によるインターロイキン12(IL-12)の産生亢進を介して、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』との仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

現代社会では、アレルギー疾患(Th2優位によって生じる)が社会問題となっている。生体内の免疫系において、Th1を賦活し、Th2とのバランスを良好に維持し続けるためには、試薬による一時的な還元ではなく、食品成分により抗原呈示細胞の酸化還元状態を恒常的に還元状態に導くことが求められる。β-カロテンは、この作用をもつ有望な候補物質として考えられる。

β-カロテンの作用について、有力な証拠をより多く集めて仮説を立証し、β-カロテンの健康維持効果の一例として、『アレルギー予防へのβ-カロテンの積極的活用』に道を開くことが、本研究の究極の目標である。この目標に到達するために、これまでの研究成果を受けて、「β-カロテンが、如何にして抗原呈示細胞活性に影響を及ぼすのか。そのメカニズムの詳細を明らかにする。」のが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス摂食実験

β-カロテンの摂取がマウス脾細胞内グルタチオン量、ならびに抗原呈示に重要なカテプシン活性に対して及ぼす影響について解析するため、β-カロテンの添加量を変化させた食餌を与えたマウス群を用意して、脾細胞に蓄積するβ-カロテン量ならびにレチノール量とともに、それらの項目を測定した。

① 飼料の調製

α-トコフェロールを強化したコントロール飼料100gに対して、β-カロテンを0、10、20、50mgの割合で添加した食餌を作製した。

② 脾細胞のβ-カロテン蓄積量測定

細胞中のβ-カロテンを抽出し、HPLCを用いた吸光測定(450nm)により定量した。

③ 脾細胞のレチノール蓄積量測定

細胞中のレチノールを抽出し、HPLCを用いた吸光測定(330nm)により定量した。

④ 脾細胞のグルタチオン蓄積量測定

抽出したグルタチオンを1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンで誘導体化し、HPLCを用いた吸光測定(365nm)により定量した。

⑤ 脾細胞のグルタチオン産生律速酵素(γ-グルタミルシステインリガーゼ)mRNA量測定

抽出した全mRNAを、軽鎖サブユニットのプライマーを用いてリアルタイムRT-PCR

により定量した。比較基準としては、 β -アクチン mRNA 量を用いた。

⑥ 脾細胞プラスチック付着画分 (抗原呈示細胞リッチ画分) のカテプシン活性測定

システインカテプシン、アスパラギン酸カテプシンそれぞれに対する市販特異的基質の分解による蛍光の発生または消失により、酵素活性を測定した。システインカテプシン活性測定には Z-Phe-Arg-MCA 励起 380nm・蛍光 440nm、アスパラギン酸カテプシン活性測定には MOCAc-Gly-Lys-Pro-Ile-Ley-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH₂ 励起 328nm・蛍光 393nm を用いた。

(2) 培養細胞実験

培地への β -カロテンの添加が RAW264 マウスマクロファージ培養細胞にもたらす影響について細胞内グルタチオン量を中心に詳細に検討した。

① β -カロテン含有培地の調製

β -カロテンをテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、10mMのストック溶液を作製し、これを MEM 培地で希釈し、0・2.5・5・10 μ M β -カロテン培地を作製した。すべての培地で、THF は 0.2% となるように調節した。

② 細胞の β -カロテン蓄積量の測定

細胞中の β -カロテンを抽出し、HPLC を用いた吸光測定 (450nm) により定量した。

③ 細胞膜脂質過酸化の測定

脂質過酸化のマーカーとしてチオバルビツール酸との反応物 (TBARS) の蛍光を励起 515nm・蛍光 553nm で測定した。

④ 細胞内グルタチオン量の測定

抽出したグルタチオンを 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンで誘導体化し、HPLC を用いた吸光測定 (365nm) により定量した。

⑤ 細胞の γ -グルタミルシステインリガーゼ mRNA 量測定

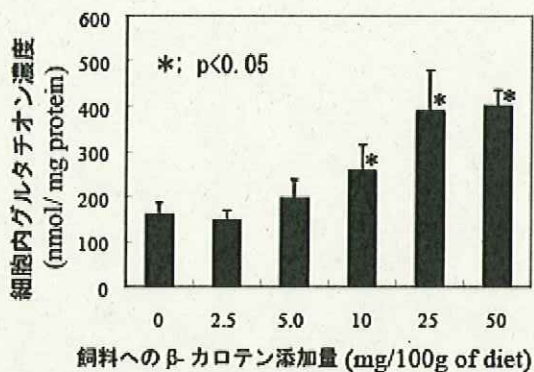
抽出した全 mRNA を、軽鎖サブユニットのプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR により定量した。比較基準としては、 β -アクチン mRNA 量を用いた。

4. 研究成果

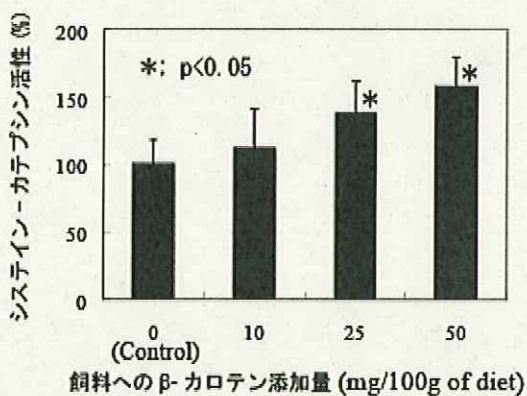
(1) マウス摂食実験の結果

β -カロテンを摂取したマウスでは、 β -カロテン投与量に相関して脾細胞の β -カロテン蓄積量が増加していた。一方で、レチノール蓄積量も増加したものの、20mg の添加で既にプラトーに達していた。

β -カロテンを摂取したマウスでは、 β -カロテン投与量に相関して脾細胞のグルタチオン蓄積量が増加していた (右上図)。このとき γ -グルタミルシステインリガーゼの mRNA 量も増加しており、グルタチオン産生系の亢進が示唆された。



また、 β -カロテンを摂取したマウスでは、 β -カロテン投与量に相関して脾細胞プラスチック付着画分のシステインカテプシンの活性が亢進していることが判明した (下図)。アスパラギン酸カテプシンの活性には変化が見られなかった。



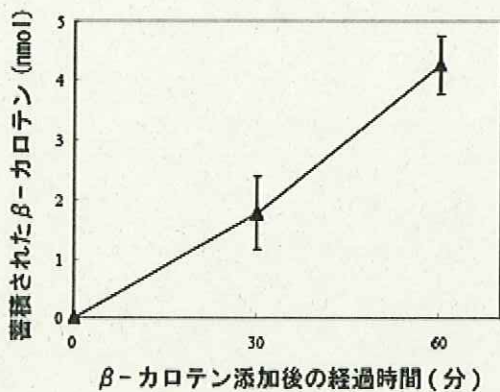
以上の結果から、 β -カロテンを摂取したマウスでは、脾細胞に β -カロテンが蓄積することにより、細胞内のグルタチオン合成系が亢進し細胞内グルタチオン量が増加するものと考えられた。これは結果的に、細胞内のシステインカテプシンの活性の向上への寄与を介して抗原呈示を活性化するものと考えられる。抗原提示の活性化は、1型ヘルパーT細胞誘導に作用することが知られており、これらの実験結果は、これまで、我々が得てきた β -カロテンの作用を裏付けるものと位置づけることができる。

この研究成果は、日本農芸化学会の英文誌 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry の 72 巻 1595-1600 2008 年、において公表した。

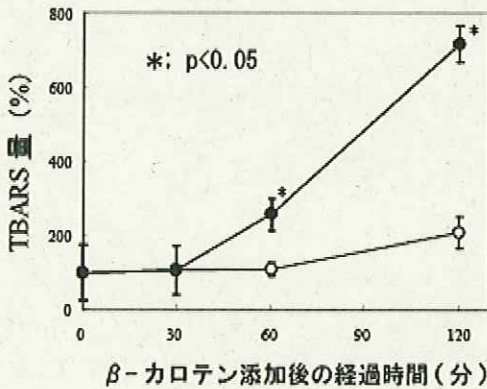
(2) 培養細胞実験

β -カロテンを培地に添加して 24 時間インキュベートした細胞では、 β -カロテン濃度に相関して、細胞に蓄積された β -カロテン量が増加していた。 β -カロテンの蓄積は添加後

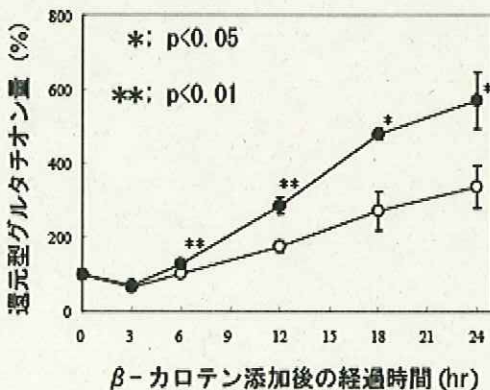
30分で既に検出され始め(次ページに図)、6時間後にプラトーに達した。



β-カロテンを培地に添加して24時間インキュベートした細胞では、β-カロテン濃度に相関して、TBARSの値が増大していた。β-カロテン添加60分後にはTBARSの有意な増加が検出された(下図)。



β-カロテンを培地に添加して24時間インキュベートした細胞では、β-カロテン濃度に相関して、細胞内グルタチオン量が増加していた。この時、γ-グルタミルシステインリガーゼのmRNA量も同様であった。β-カロテン添加3時間後には、グルタチオン産生律速酵素 mRNA 量の有意な増加が検出された。添加6時間後にはグルタチオン量の有意な増加が検出された(下図)。



今回の実験で、それぞれの測定項目において、培地中のβ-カロテンへの濃度依存性が観察されており、β-カロテンは確実にRAW264細胞に作用していることが明らかである。また、β-カロテンに対する一連の細胞応答の時間的経過が明らかとなった。それにより、細胞の培地に含まれるβ-カロテンは、①細胞膜へと移行して、②細胞膜脂質の過酸化を誘導し、③それに対抗するために細胞内のグルタチオン合成系が刺激亢進され、④結果として細胞内の還元性因子であるグルタチオン量が増大するという関係性が明らかとなった。前年度のマウス実験においてのβ-カロテン摂取によるグルタチオン増大現象が、細胞レベルで解明されたことになる。

この実験結果は、Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA ("Wiley-Blackwell")社の Molecular Nutrition & Food Research 誌にて公表予定である(本報告書に用いた図は、論文に掲載されるものを、日本語表記にし、さらに有意水準を図中に示すという変更を加えたものである)。

一方、前段落の③に相当するグルタチオン合成への影響を詳細に解き明かすべく実験を計画し、平成19年度にはγ-グルタミルシステインリガーゼ遺伝子の上流DNA配列のクローニングを行った。そして、長さを変えた数種類の上流配列を発現プラスミドに組み込むことに成功した(研究分担者 木本眞順美教授との共同研究)。平成20年度には、この発現プラスミドを用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行ったが、いずれのプラスミドもβ-カロテンに対する応答性を示さず、転写調節に関するDNA上のシスエレメントを特定するには至らなかった。用いた上流配列の長さの不足のために、β-カロテンに対して応答しなかった可能性もあるが、一方でmRNA量の増加にはその分解抑制の寄与という可能性も否定できない。この点については、今後の更なる検討を必要としている。

(3) 成果のまとめと今後の展望

β-カロテンは、細胞に蓄積しそのRedox activityにより、結果として細胞内のグルタチオン合成すなわち抗酸化性を導いた。これは抗原呈示細胞画分において、抗原呈示に関するプロテアーゼの活性を亢進したことから、抗原呈示の活性化を導くものと予想される。一方で、炎症性サイトカインのmRNA発現を抑制したことから、抗炎症作用も期待できる。以上のように、今回の研究は、β-カロテンに対してどのような効果が期待できるのかを明らかにするものである。同時に、どのような場合に効果が期待できるのかについても、指針をもたらすものである。例え

ば、既にグルタチオン合成が高まっていてこれ以上の亢進が望めない場合には、効果が期待できないと考えられる。つまり今回の研究成果から、食品成分であるβ-カロテンを健康維持の目的で摂取する場合の具体的な目安が提供されたことになる。今後、さらに詳しく研究することにより、その確度を高め、個々人のケースで利用の適否を判断できるようにする日が来るものと期待できる。

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 3 件)

- ① Saki Takeda, Noriko Bando, Rintaro Yamanishi, Ingested β-carotene enhances glutathione level and up-regulates the activity of presumed cysteine cathepsin in murine splenocytes. , Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 72 巻、1595-1600、2008 年、査読有
- ② 山西倫太郎、善玉か、それとも悪玉か? ~ β-カロテンの免疫系への作用に関する研究、フードリサーチ、通巻 637 号、30-35、2008 年、査読無
- ③ 山西倫太郎、カロテノイドとヒトの発がんリスクについての最近の研究、オレオサイエンス、7 巻、423-436、2007 年、査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① Noriko Bando, Hironobu Katagawa, Rintaro Yamanishi, Shinichi Sugiyama, Satoshi Sasaki, Masayuki Okuda, and Junji Terao, Serum Carotenoid and Tocopherol Levels and The Risk of Atopic Dermatitis and Asthma in Children., The 15TH International Symposium on Carotenoids (Okinawa)、平成 20 年 6 月 22 日~27 日
- ② 山西倫太郎、RAW264 細胞の redox status と免疫機能に及ぼすカロテノイドの影響の解析、日本食品免疫学会第 4 回学術集会 (2008 年度大会; 東京)、平成 20 年 5 月 13 日~14 日
- ③ 板東紀子、片側光宣、山西倫太郎、杉山真一、佐々木敏、奥田昌之、寺尾純二、小中学生におけるアレルギー疾患と血清トコフェロール・カロテノイド濃度の関連について、第 62 回日本栄養食糧学会 (坂戸、埼玉)、平成 20 年 5 月 4 日
- ④ Rintaro Yamanishi、Saki Takeda、Noriko Bando, Feeding β-Carotene Results in the Enhancement of Cathepsin B+L Activity Accompanied by the Cytoplasmic Reductive Alteration in Murine Splenocytes., International Conference on

Food Factors for Health Promotion (Kyoto)、平成 19 (2008) 年 11 月 28 日~12 月 1 日

⑤ 山西倫太郎、β-カロテン摂取による IgE 抗体産生抑制とそのメカニズムについての考察、平成 19 年度日本栄養・食糧学会中国・四国、近畿支部合同大会 (東広島) シンポジウム、平成 19 (2007) 年 11 月 17 日~18 日

⑥ 勝浦桜子、山西倫太郎、マウス培養マクロファージ RAW264 の細胞生理に及ぼすカロテノイドの影響、第 61 回 日本栄養・食糧学会大会 (京都)、平成 19 (2007) 年 5 月 17 日~20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 倫太郎 (YAMANISHI RINTARO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：30253206

(2) 研究分担者

板東 紀子 (BANDO NORIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教務員
研究者番号：40116851
木本 眞順美 (KIMOTO MASUMI)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：40108866

(3) 連携研究者

なし