

平成 22 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20680035

研究課題名 (和文) 緑茶成分、特にカテキン類による感染防御に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic studies of protective immunity and immune response on catechins.

研究代表者

早川 清雄 (HAYAKAWA SUMIO)

北海道大学 遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00368292

研究成果の概要 (和文) : 近年、茶を用いた研究がさかんに行われ、胃癌の発症率を抑制したり、血中コレステロールを低下させたりする疫学的研究やそれらの結果を裏付ける分子メカニズムが詳細に検討され、科学的に茶の有効性が明らかとなりつつある。本研究においては、生体防御に関わる免疫応答、特に自然免疫系に対する影響について検討した。今回、IFN 産生を増強する新たな分子を見いだした。この分子は、細胞内で核酸認識に重要な役割を担う分子であることが示唆される結果が得られた。今後、この分子メカニズムを明らかにし、カテキン摂取との関連性を検討し、疾患を予防またはコントロールする新たな標的分子としての可能性を検討していきたいと考える。

研究成果の概要 (英文) : Green tea, one of the most popular beverage consumed in japan, contains a series of polyphenols known as catechins. The catechins have been reported to posses various biological and pharmacological effects, such as anticancer and antibacterial activities, and lowering of plasma lipids and glucose level. The present study was designed to examine the effect of catechins on the innate immune response. Virus infection elicits potent cellular responses that contain virus spread before the adaptive immune system can intervene, and production of type I interferons (IFN  $\alpha/\beta$ ) is central to this process. The sensor involved in coupling recognition of virus infection with the induction of IFN  $\alpha/\beta$  have recently been discovered. These sensors include RIG-I and MDA5, RNA-binding DExD/H box helicases. Recent study indicated that cytosolic DNA-dependent RNA polymerase III converts pathogen dsDNA into dsRNA that has a 5' triphosphate (3pRNA). This RNA species is then sensed by the RNA sensor RIG-I, leading to INF- $\beta$  production and activation of innate immunity. In this experiments, we found that new function molecule "SCI-2" enhanced the innate immune responses by 3pRNA. These results suggest that SCI-2 is important in recognition of nucleic acids derived from virus. Furthermore, to reveal the underlying mechanisms of action at a molecular level correlation between catechins and SCI-2, we will examine the effect of tea catechin on the virus infection in transgenic mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
年度			
総計	8,200,000	2,460,000	10,660,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

茶成分に含まれるカテキン類は、抗酸化作用 (*Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1369, 1999)、コレステロール上昇抑制作用 (*J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 1986)、抗腫瘍作用など (*栄食誌*, **42**, 39, 1989)、抗アレルギー作用 (*Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5079, 1985)、様々な生理作用を有していることが報告されている。近年、茶に含まれるカテキンを飲料等に加えて特定保健食品として市販されている商品が少なくない。日本人にとってなじみのある「緑茶」がもつ健康によせる期待度は大きいと考える。

一般的に、茶に含まれているポリフェノールを茶カテキンと総称しているが、茶カテキンの中には様々なカテキンが含まれている。その中でも主な緑茶カテキンとして、エピガロカテキンガレート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピカテキン (EC) の4種類がある。現在、緑茶カテキンに関する研究が様々な観点から行われているが、カテキン類の中で主に生理作用を示す物質として研究されているのは、この4種類である。

私はこれまでに、緑茶に含まれる成分による癌細胞のアポトーシス誘導について研究を行い EGCG が、ヒト白血病細胞 U-937 細胞に発現するアポトーシスを誘導する特異的受容体 Fas へと結合し、下流のカスパーゼを活性化することでアポトーシスを誘導するという事を見いだした (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3285**, 1102-6, 2001)。最近、九州大学の Tachibana らも同様に抗腫瘍活性に関わる EGCG のレセプター

を見いだしたことを報告している (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380-1, 2004)。このことから、EGCG は、細胞のレセプターあるいは細胞表面の分子と結合することで、シグナルを細胞内へ伝達する物質となりうる事が示されている。さらに私は、細菌やウイルスなど微生物の感染防御と抗腫瘍効果においてインターフェロン (IFN) による p53 の遺伝子発現、タンパク質発現増加が重要であることを示した (*Nature*, **424**, 516-23, 2003)。感染防御における IFN の発現誘導は非常に重要で、非感染時には発現は非常に弱く、感染後に顕著に発現誘導される。誘導された IFN は、抗ウイルス活性を示すだけでなく、アポトーシス誘導においても重要な役割をはたすことを明らかにした。

本研究においては、自然免疫応答に重要な I 型インターフェロン発現誘導とカテキンの関係について明らかにしたいと考える。

自然免疫は、微生物感染時に迅速に機能する免疫応答機構である。適応免疫の活性化は自然免疫の活性化に続く免疫応答であり、近年、微生物の構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR) や本研究室の高岡らが見いだした DNA センサー、DAI などが注目されている (*Nature*, **448**, 501-505, 2007)。

これまでに、茶カテキンが微生物に対して、抗菌活性を持つことは多くの研究者によって報告されているが、微生物感染時の生体防御メカニズムに対するカテキンの機能については、ほとんど明らかにされていない。したがって、1) 茶カテキンが与える自然免疫系への効果について明らかにし、2) モデル動物を使ってカテキンの効果を検討する。本

研究は、日常生活における感染の予防や新たな治療法を開発するための基礎的な研究となることが考えられる。

## 2. 研究の目的

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 刺激による免疫応答に対する影響を検討する。

*In vitro* の実験系を用い、PAMPs 刺激またはカテキン類を加え、インターフェロン産生やサイトカイン産生を Real-time RT-PCR や ELISA 法、ウェスタンブロッティング法を用いてカテキン類の効果を検討する。さらに、カテキン類が結合すると考えられる分子の同定を行う。そのために、カテキンに結合するタンパク質を回収し、MS を用いて相互作用のあるタンパク質を見いだす。

*In vitro* のデータをもとに、*in vivo* での感染防御における EGCG の効果を検討する。マウスに緑茶を引水または摂食させた後、ウイルス感染に対して生体防御効果が増強するかどうかを検討する。さらに、DNA チップや二次元電気泳動を用いて、発現が異なる遺伝子やタンパク質を網羅的に解析する。

## 3. 研究の方法

本研究においては、緑茶カテキン類が生体防御機構、特に自然免疫系への関与を検討する。抗腫瘍作用や抗アレルギー作用などに関しては、これまでに様々な知見が報告されている。一方、自然免疫系に関与する報告はほとんどない。

そこで、今回、マウスの線維芽細胞を用いて、グラム陰性細菌の外膜の構成成分であるリポ多糖(LPS)や二重鎖 RNA アナログの poly rI:rC など、PAMPs 刺激による遺伝子発現変化に、カテキン類がどのように影響するのかを Real-time RT-PCR で調べる。またこのとき、DNA chip または ABI 社の gene panel を用いて免疫に関連した遺伝子発現解析も視野に入れている。PAMPs 刺激を加えた実験結果をもとに、実際にウイルス刺激 (NDV, HSV-1) を加えて PAMPs 刺激による効果が反映されるかどうかを検討する。

さらに、カテキン類が PAMPs 刺激に対して関与を示すようであれば、どのような分子がカテキンと相互作用をしているのかを検討する。cell lysate とカテキン類を固定化したカラムを用いてカテキンに結合する分子を得るとともに、二次元電気泳動法と MS を組み合わせて網羅的な解析を行う。

最終的には、生体防御における免疫応答にカテキン類と相互作用する分子を同定する

とともに、マウスを用いた動物実験で、感染防御機構におけるカテキン類の関与を検討する。

## 4. 研究成果

日本国内における茶系飲料の生産量は増加している。このことから、多くの日本人が日常的に茶を飲用していることが示唆される。近年、茶を用いた研究がさかんに行われ、胃癌の発症率を低下させたり、血中コレステロールを低下させたりする疫学的研究やそれらの結果を裏付ける分子メカニズムが詳細に検討され、科学的に茶の有効性が明らかとなりつつある。本研究においては、生体防御に関わる免疫応答、特に自然免疫系に対する影響について調べている。ウイルス感染防御に関与する自然免疫系、特に I 型インターフェロン (IFN) の産生の観点から、ウイルス核酸の認識に関わる分子メカニズムの検討をおこなった。IFN 産生の trigger として、細胞表面には Toll-like 受容体 (TLR) を介してウイルスを含む病原微生物認識する経路や細胞内でウイルス由来の DNA や RNA などの核酸認識受容体を介する経路が知られている。特に細胞内でウイルス由来の核酸を認識する経路においては、近年新しい知見が報告されつつあり、DNA ウイルス由来の核酸の mimic として用いられている B-DNA (合成 DNA) を細胞内へ投与すると、それを鋳型として 5' triphosphate RNA (3pRNA) が合成され、核酸受容体である RIG-I を介して IFN 産生が誘導されることが報告された。

本研究においては、B-DNA による IFN 産生を増強する新しい分子を見いだしたことから、B-DNA のみならず、他のウイルス核酸の mimic として用いられている核酸 (poly rI:rC, 3pRNA) による刺激で IFN が増強されるのかどうかを検討した。我々が見いだした分子 (SCI-2) を HEK293T 細胞に過剰発現させ、様々な核酸で刺激すると mRNA 発現レベル・タンパク質レベルで IFN の増強を確認することができた。さらに、見いだした分子は、TLR を介した signal を増強することはなかった。この分子は、細胞内で核酸認識に重要な役割を担う分子であることが示唆された。

そこで、この SCI-2 分子を過剰発現させた細胞にインフルエンザウイルスを感染させたところ、SCI-2 を発現させていない細胞と比べて強く IFN 産生を誘導した。

このことは、自然免疫機構を介した生体防御において SCI-2 分子が重要な働きを担っていることを示している。

現在、トランスジェニックマウスを作製して生体における機能解析をおこなっている。

今後、このマウスを用いて、ウイルス感染と茶カテキンの効果を調べていく中で、新し

い分子メカニズムを明らかにし、疾患を予防またはコントロールする新たな標的分子としての可能性を検討していきたいと考える。

#### 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2件)

1. Isogai, N., *et al.*, Cytokine-rich autologous serum system for cartilaginous tissue engineering., *Ann. Plast. Surg.*, 査読有, 60 巻, 2008, 703-709
2. Sato, M., *et al.*, Subcellular localization of human heparanase and its alternative splice variant in COS-7 cells., *Cell. Biochem. Funct.*, 査読有, 26 巻, 2008, 676-683

[学会発表] (計4件)

1. 高岡晃教, 早川清雄 自然免疫におけるIFN応答の新たな制御メカニズム, 第32回日本分子生物学会, 2009, 12, 10, パシフィコ横浜
2. 早川清雄, 高岡晃教 核酸を介する自然免疫活性化機構の解析, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12, 3, 大阪国際会議場
3. 高岡晃教, 早川清雄 SCI2を介する自然免疫シグナル制御, 第82回日本生化学会大会, 2009, 10, 29, 神戸ポートアイランド
4. 早川清雄, 高岡晃教 Novel function of DNA triggered innate immune responses, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.9, 淡路夢舞台国際会議場

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

早川 清雄 (HAYAKAWA SUMIO)  
北海道大学 遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号: 00368292