

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21263

研究課題名(和文) 抗炎症作用を持つ食品成分が形成する自然免疫記憶についての解析

研究課題名(英文) Analysis for induction of anti-inflammatory innate memory by dietary molecules

研究代表者

戸田 雅子(Toda, Masako)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10828429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は食品成分による免疫調整の増強を目指すものあり、特に「抗炎症作用を増強する自然免疫記憶」を樹状細胞に形成し、その形成機序を明らかにすることを目的とした。マウス骨髄由来樹状細胞を用い、トル様受容体4リガンド(米ぬか成分やマンノピオース)やC型レクチン受容体リガンド(酵母由来多糖類)で細胞を複数回刺激することで、抗炎症性サイトカインIL-10の産生増強を伴う記憶誘導が可能であることを見いだした。また樹状細胞における記憶形成には、リガンド刺激による(1)TLR4とDC-SIGN発現の増強、(2)解糖系代謝の促進、(3)ヒストン脱アセチル酵素3や6の活性化、が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進国では炎症性疾患の発症率が増加しており、「抗炎症性機能を持つ食品成分の活用」が求められている。樹状細胞は抗炎症免疫の誘導において中心的役割を果たす。本研究は、樹状細胞に抗炎症性の免疫記憶(複数回刺激による免疫応答の増強)を誘導する食品成分を見だし、その記憶形成メカニズムを明らかにした。これまでの自然免疫記憶に関する研究の多くは炎症性免疫の増強メカニズムを解析し、ワクチン応用を目指したものである。一方で本研究は、「抗炎症性の自然免疫記憶の形成とその作用メカニズム」を明らかにしており、その点が意義深い。また、抗炎症性機能を持つ食品の開発にも貢献すると期待され、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish anti-inflammatory innate memory in dendritic cells (DCs) using dietary molecules and elucidate mechanisms for the memory induction. We found that stimulation with TLR4 ligands (e.g., rice bran-derived molecules and -1,4-Mannobiose) and C type lectin ligands (e.g., yeast-derived polysaccharides) induces anti-inflammatory memory in DCs, which is accompanied by enhanced production of IL-10, the anti-inflammatory cytokine. Furthermore, we revealed that (1) enhanced expression of TLR4 and DC-SIGN, (2) promotion of glycolysis, and (3) activation of histone deacetylase 3 and 6, are involved in the induction of the memory induction in DCs. This study would advance our knowledge of mechanism for innate memory and application of dietary molecules for induction of anti-inflammatory immunity for better health.

研究分野：食品免疫学

キーワード：自然免疫 免疫記憶 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の先進国では少子化社会と高齢社会を迎えており、「食の機能性」の一層の活用によって国民が健康な生活と長寿を享受できる社会の実現が急務となっている。特に大きな社会問題になっている加齢性疾患やアレルギーは炎症性免疫により発症や病態が促進されるため、免疫調節機能、特に抗炎症・抗アレルギー作用を持つ食品の開発が望まれている。興味深いことに近年、免疫学において、新たなメカニズム「自然免疫記憶 (innate immune memory)」が発見された。従来、獲得免疫系だけが記憶を形成できると考えられていたが、自然免疫系も記憶形成が可能であることが明らかになったのである。自然免疫記憶は、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や単球を、病原体などの異物 (非自己) で刺激し応答を起こすように "トレーニング" すると、二度目以降に同じ非自己に対して強い免疫応答を示す機構であり、trained immunity とも呼ばれる。これまでの自然免疫記憶に関する研究の多くは、感染防御に働くマクロファージや単球における炎症性免疫の増強を解析しており、ワクチンへの応用を目指したものである。一方で、炎症性疾患の予防や寛解を目指した「抗炎症性の自然免疫記憶」や、「樹状細胞における自然免疫記憶の形成」、そして「自然免疫記憶の形成メカニズム」に関する知見は、研究開始当初において限られていた。

2. 研究の目的

樹状細胞はマクロファージとともに、自然免疫系において中心的役割を担う抗原提示細胞である。抗原提示細胞は外来性分子を認識する「パターン認識受容体」を発現しており、この受容体を介して「病原体構成分子パターン」や「食品分子の分子パターン」を認識し、炎症性あるいは抗炎症性のどちらの免疫系へ向かうかを決定する。本研究は、パターン認識受容体に結合する食品成分を用いることで、「抗炎症性の自然免疫記憶」の形成を樹状細胞に誘導できるかを解析し、さらにそのような「自然免疫記憶の形成メカニズム」の解明を目的とした。

自然免疫記憶の形成メカニズムとして、記憶誘導分子と結合するパターン認識受容体の発現レベル変化や細胞応答の関連遺伝子発現におけるエピジェネティクス制御、そして代謝リプログラミング (代謝様式の改変) の関与が考えられた。そこで「パターン認識受容体の発現レベルの変化」やエピジェネティクスの誘導分子「ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase: HDAC)」そして「代謝リプログラミングに伴う代謝物レベル変化」が、樹状細胞における「抗炎症性の自然免疫記憶形成」に関与するかを解析した。

3. 研究の方法

マウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived murine dendritic cells: BMDC) は樹状細胞モデルとして繁用されている。そこで本研究では、BMDC において抗炎症性の自然免疫記憶を形成できるかを解析した。記憶形成因子となる食品由来分子として、トル様受容体 (Toll like receptor: TLR) 4 リガンドである米ぬか成分やコーヒー豆残渣に含まれる (1-4) マンノビオース、C 型レクチン受容体 (C type lectin receptor: CLR) リガンドである酵母由来成分マンナンなどを含む多糖類を用いた。BMDC の培養系において、上記の食品由来分子で細胞を複数回、刺激し、最終刺激後の細胞におけるサイトカイン産生レベルを ELISA により解析した。さらに、細胞表面上における共刺激分子 (CD40、CD80、CD86) や TLR、CLR の発現レベルを FACS により解析した。樹状細胞の機能の一つである T 細胞刺激能は、BMDC とオボアルブミン (ovalbumin: OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウス (OT-II マウス) 由来 CD4 陽性 T 細胞の共培養系を用いて測定した。BMDC の記憶形成における HDAC やシグナル伝達経路の関与については、クラス I およびクラス II HDAC に対する阻害剤 (trichostatin A) や HDAC3 阻害剤 (RGFP966)、HDAC6 阻害剤 (FT895)、STAT3 阻害剤 (Stattic) で細胞を処理した際の細胞応答を解析した。また記憶形成における代謝リプログラミングの関与を調べるために、細胞の代謝物レベル変化を GC-MS/MS により解析した。

4. 研究成果

(1) 食品由来分子による受容細胞における記憶形成の誘導

最初に TLR4 リガンド (米ぬか成分や (1-4) マンノビオース) による樹状細胞の記憶形成を解析した。BMDC の培養系において、細胞を TLR4 リガンドで複数回刺激したところ、炎症性サイトカイン (IL-6 と TNF- α) と抗炎症性サイトカイン (IL-10) の産生、そして細胞表面上における共刺激分子の発現が増強された。BMDC を代表的な TLR4 リガンドであるリポ多糖で複数回刺激した際にも、同様の結果が観察された。さらに、BMDC の培養系において、TLR4 リガンドと共に CLR リガンド (酵母由来多糖類) で細胞を複数回刺激したところ、特に IL-10 産生が顕著に増強された (図 1A 参照)。OVA 特異的 T 細胞との共培養系において、TLR4 リガンドで記憶を形成した BMDC は T 細胞の炎症性応答を増強したが、TLR4 リガンドと CLR リガンドで刺激した BMDC は

T細胞の炎症性応答を抑制した。IL-10は、抗炎症・抗アレルギーの誘導において、要となる分子である。以上より、TLR4リガンドとCLRリガンドでBMDCを複数回刺激することで、抗炎症性の自然免疫記憶を誘導できることが明らかになった。

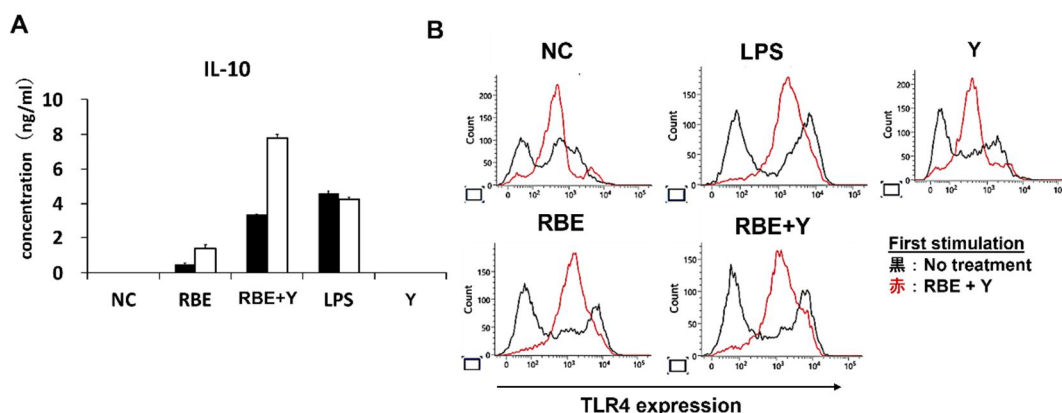


Fig. 1 The effect of repeated stimulation on production of IL-10 and expression of TLR4 in BMDCs. Twice stimulation with rice bran extract and yeast-derived polysaccharides enhanced production of anti-inflammatory cytokine IL-10 and expression of TLR4 in BMDCs. (A) Black bar: data of the cells received only one stimulation, white bar: data of the cells received twice stimulation. (B) Second stimulation: No treatment (NC), Lipopolysaccharide (LPS, positive Control), rice bran extract (RBE), yeast-derived polysaccharides (Y).

(2) 樹状細胞の記憶形成におけるパターン認識受容体と代謝リプログラムの関与

樹状細胞の記憶形成に「パターン認識受容体の発現増強」が関与しているかを調べるために、TLR4リガンドやCLRリガンドで複数回刺激したBMDCのTLRやCLR発現レベルをFACSで解析した。その結果、TLR4リガンドで刺激したBMDCにおいてはTLR4の発現が、さらにCLRリガンドで刺激したBMDCではCD209 (DC-SIGN: CLRファミリーに属する受容体)の発現が増強されることが明らかになった(図1B)。また、リガンドで複数回刺激したBMDCのメタボローム変化を解析したところ、乳酸産生レベルが促進されていた。我々はBMDCを用いた先行研究において、解糖系の亢進がIL-6やIL-10産生誘導に関与する知見を得ている。以上の結果より、樹状細胞の記憶形成には、リガンドと結合するパターン認識受容体の発現増強が関与していること、また代謝リプログラム(解糖系の促進)が関与することが明らかになった(図2参照)。

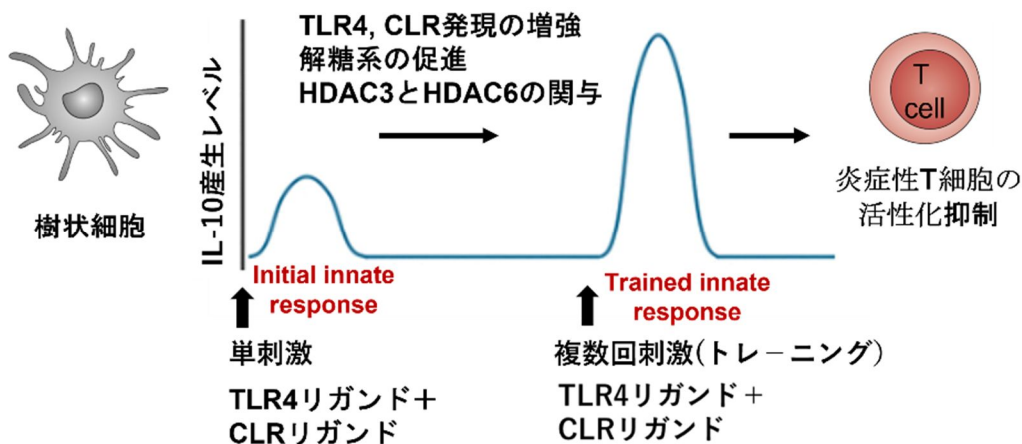


Fig. 2 Induction of innate memory in BMDCs. Repeated stimulation with a TLR ligand and a CLR ligand induces innate memory, which is accompanied by enhanced production of IL-10 in BMDCs. In action mechanisms for memory induction, enhanced expression of TLR and CLR, promotion of glycolysis and activation of HDAC are involved.

(3) 樹状細胞の記憶形成における HDAC の関与の解析

樹状細胞の記憶形成における HDAC の関与を解析するために、TLR4 リガンドや CLR リガンドで刺激した BMDC を HDAC 処理したところ、クラス I およびクラス II HDAC 阻害剤と HDAC6 阻害剤は IL-6 産生を増強する一方、IL-10 産生を阻害した。また、HDAC3 阻害剤は IL-6 と IL-10 産生をともに阻害することが明らかになった。近年、HDAC はヒストンを標的とするだけでなく、細胞シグナル伝達関連分子のアセチル化により、シグナル伝達系の活性化に関与することが明らかになってきている。HDAC6 は主に細胞質に存在し、転写因子 STAT3 の活性化に関与することが示唆されていることから、STAT3 阻害剤処理による BMDC のサイトカイン産生応答を解析した。その結果、Stat3 阻害剤は BMDC による IL-6 産生を阻害せず、IL-10 産生は部分的に阻害した。HDAC3 に関しては、ヒストンの脱アセチル化に働くとともに、アセチル基の除去により転写因子 NF- κ B p65 サブユニットの活性化に関与することが報告されている。以上より、HDAC3 はヒストン脱アセチル化あるいはまた NF- κ B の脱アセチル化により IL-6 と IL-10 の遺伝子発現に関与すること、HDAC6 は STAT3 活性化を介して IL-10 遺伝子発現に関与することが示唆された(図3参照)。

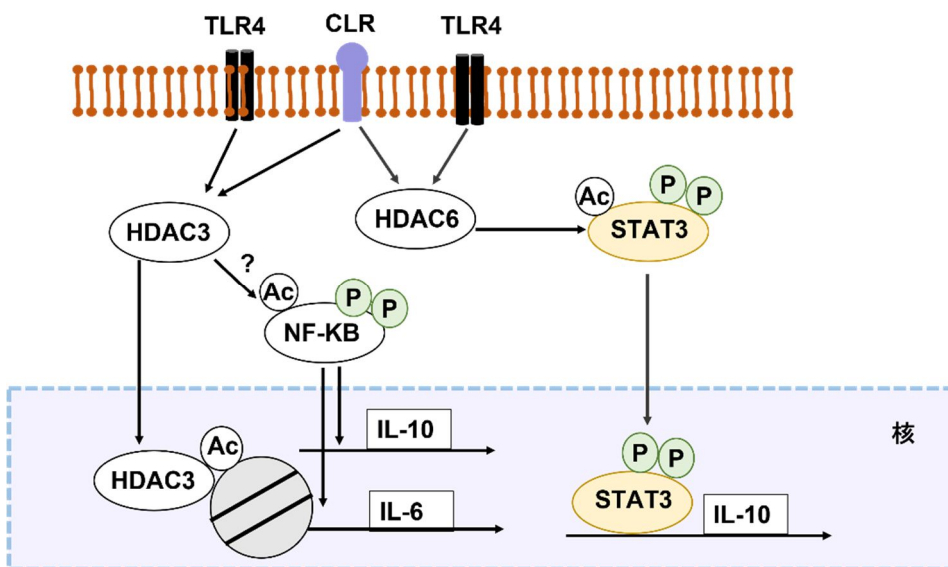


Fig. 3 Involvement of histone deacetylases in induction of IL-6 and IL-10 gene expression in BMDCs. Stimulation with a TLR ligand and/or a CLR ligand enhanced IL-6 and IL-10 production in BMDCs. Use of HDAC inhibitors suggested that HDAC3 is involved in expression of both IL-6 and IL-10, whereas HDAC6 is involved in expression of IL-10 only.

総括

本研究は、食品成分により「抗炎症免疫を増強する自然免疫記憶」を樹状細胞に形成できること、またそのような樹状細胞は IL-10 産生を増強し、炎症性 T 細胞の活性化を抑制できることを明らかにした。さらに樹状細胞における抗炎症性の自然免疫記憶の誘導には、食品成分の複数回刺激による TLR4 と DC-SIGN 発現の増強、解糖系代謝の促進、HDAC3 や HDAC6 の活性化、が関与することを見いだした。この知見は、細胞代謝やエピジェネティックな遺伝子発現を介した樹状細胞応答のさらなる新規メカニズムの解明、そして免疫制御のストラテジー確立の基盤となる。また、本研究は科学的エビデンスに基づく免疫機能性食品の開発にも貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野沢里緒、樋口央紀、戸田雅子
2. 発表標題 自然免疫賦活化能をもつ米ぬか成分の解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 第75回大会（オンライン大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野沢里緒、樋口央紀、戸田雅子
2. 発表標題 水溶性米ぬか抽出物の免疫賦活化能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masako Toda
2. 発表標題 Immunological function of dietary fiber
3. 学会等名 International symposium on lipids and food ingredients for health promotion（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳沢 真那、鄭 廷宇、原田 昌彦、戸田 雅子
2. 発表標題 酵母由来 β -Mannanによる 樹状細胞のIL-10産生増強メカニズムの解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 2022年度東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳沢 真那、鄭 廷宇、原田 昌彦、戸田 雅子
2. 発表標題 酵母由来 -mannanによる自然免疫記憶の形成機序に関する解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度年次大会
4. 発表年 2023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
研究協力者	原田 昌彦 (HARATA MASAHIKO) (70218642)		

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
---------	---------