

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658041

研究課題名（和文） 腸管樹状細胞を介した食品免疫調節機能の次世代評価系の開発

研究課題名（英文） Establishment of the next-generation evaluation system for immunomodulating functions of food using intestinal dendritic cells

研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA SATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40238019

研究成果の概要（和文）：腸管樹状細胞は、腸管免疫系の応答調節に重要な役割を果たし、食品による免疫調節の標的となっている。これまで腸管樹状細胞をマウス等から分離する困難さから、食品の腸管樹状細胞を介した免疫調節機能を評価することは容易ではなかった。そこで本研究においては、食品の腸管樹状細胞を介した免疫機能の新規評価系の構築に向けて、マウス骨髄細胞からの腸管型樹状細胞の誘導および誘導された樹状細胞の TLR を介した応答性について検討した。

研究成果の概要（英文）：It has been difficult to evaluate the immunomodulating functions of foods using intestinal dendritic cells because of difficulties in isolating such cells. In this study, we investigated the induction of intestinal-type dendritic cells from mouse bone-marrow cells, aiming to establish a novel evaluation system for immunomodulating functions of foods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：樹状細胞、腸管、機能性食品

1. 研究開始当初の背景

腸管樹状細胞(DC)は、腸管免疫系の応答調節に重要な役割を果たし、食品による免疫調節の標的となっている。しかしながら、現時点では、腸管 DC はマウス等の実験動物から

直接分離して実験する以外方法がなく、腸管から細胞を分離する困難さから、食品の腸管 DC を介した免疫調節機能を評価することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究においては、食品の腸管 DC を介した免疫機能を評価する新規評価系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 (BM) 細胞からの腸管型 DC の誘導

BALB/cA マウスより大腿骨および脛骨より BM 細胞を得た。この BM 細胞を異なる濃度の マウス granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), マウス IL-4, レチノイン酸 (all-trans-retinoic acid; RA) を含む 10% FCS-RPMI 培地中で培養 7 日間培養し BM DC を誘導した。

細胞の表面分子 (CD11c, CD11b, CD103) の発現をフローサイトメトリーにより解析し、LPS 添加、非添加で培養した後の遺伝子発現を定量 PCR により測定した。遺伝子発現については、*Aldh1a2*, *Il6* をはじめ、腸管 DC で発現する遺伝子について検討した。

(2) BM 細胞由来 DC における TLR2 リガンド刺激による TLR9 応答の抑制

BALB/cA マウスあるいは、TLR2 欠損マウスから得た BM 細胞から GM-CSF+IL-4 により DC を誘導した。CpG オリゴ DNA (TLR9 リガンド)、リポペプチド Pam₃CSK₄ (TLR2 リガンド)、およびその両方存在下で培養し、*Il12b* 等の遺伝子発現を定量 PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) BM 細胞からの腸管型 DC の誘導

本研究開始前後に、GM-CSF, RA, IL-4 により BM 細胞から誘導された DC において、腸管 DC に高発現する RA 生成酵素 *Aldh1a2* の発現が誘導されることなどが報告された。そこで本研究では、これら既報を参考にし、BM

細胞からの腸管型 DC の誘導とその解析を目的として、BM DC を GM-CSF, IL-4 および RA 存在下で誘導し、CD11c⁺ 細胞中の CD11b および CD103 の発現を解析した。BM DC の誘導条件として条件 1 : 20 ng/mL GM-CSF+1 μM RA、条件 2 : 10 ng/mL GM-CSF+1 μM RA、条件 3 : 10 ng/mL GM-CSF+10 ng/mL IL-4、条件 4 : 10 ng/mL GM-CSF+1 μM RA+10 ng/mL IL-4 の 4 条件を比較した。その結果、条件 2 (GM-CSF+RA) では CD11b^{hi} CD103⁺ DC が多く誘導されたのに対して、条件 4 (GM-CSF+RA+IL-4) では CD11b^{lo} CD103⁺ DC が誘導された。

次に上述の 4 条件で誘導された BM DC を LPS 存在下および非存在下で培養し、遺伝子発現応答を解析した。その結果、腸管 DC に高発現する遺伝子の一つ IL-6 に関しては、どの BM DC も、刺激によって同程度に高い IL-6 遺伝子発現を示したが、同じく腸管 DC に高発現が認められるレチノイン酸変換酵素である *Aldh1a2* の遺伝子発現に違いが見られた。すなわち、条件 4 (GM-CSF+RA+IL-4 存在下) で誘導された BM DC において、他の条件で誘導されたものと比べて、LPS 刺激後の *Aldh1a2* 遺伝子発現が高かった。また、条件 3、4 で誘導された BM DC では腸管パイエル DC において高発現する別の遺伝子が強く発現した。

RA や IL-4 による腸管 DC の特徴を示す BM DC の誘導が報告されたが、本研究により、添加条件により、CD11b や CD103 で規定される DC のサブセットやいくつかの腸管 DC に特徴的な遺伝子の発現パターンが異なることが確認された。このようにして誘導された腸管型 DC を用いて、食品因子に対する応答を評価することが可能と考えられた。また今後、腸管型 DC それぞれのサブセットを誘導できる条件をより詳しく検討すれば、より

ち密な解析が可能となると期待される。

(2) BM 細胞由来 DC における TLR2 リガンド刺激による TLR9 応答の抑制

これまで我々は、マウス腸管 DC において、TLR2 リガンド刺激により、TLR9 による応答が抑制されることを見出していた。そこで、BM 細胞より誘導された DC において、同様な抑制応答が認められるかどうか検討した。その結果、BM 細胞より誘導された DC においても、TLR2 リガンドであるリポペプチド Pam₃CSK₄ により、TLR9 リガンドである CpG オリゴ DNA に対する *Il12b* 発現応答の抑制が観察された。またこの抑制効果は、TLR2 欠損マウスの BM より誘導された DC では認められず、確かに TLR2 を介していることが確認された。

DC のこのような TLR2 を介した抑制応答は、腸管における過剰な免疫応答や炎症を抑制する機構であると考えられ、食品による DC を介した免疫調節において、このような応答を利用できると期待される。以上より、BM 細胞から誘導された DC は、食品因子のこのような免疫調節機能を探索、評価することに有効と考えられた。

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 八村敏志. 腸管自然免疫系と腸内細菌. 臨床栄養. 査読無, 120: 685-688, 2012.

② Y. Hiramatsu, A. Hosono, T. Konno, Y. Nakanishi, M. Muto, A. Suyama, S. Hachimura, R. Sato, K. Takahashi, S. Kaminogawa. Orally administered

Bifidobacterium triggers immune responses following capture by CD11c⁺ cells in Peyer's patches and cecal patches. *Cytotechnology*, 査読有, 63: 307-317, 2011. DOI: 10.1007/s10616-011-9349-6.

[学会発表] (計 9 件)

① 上滝隆太郎, 八村敏志ら. 複数の TLR 刺激を受けたパイエル板樹状細胞における応答抑制の解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会. 2013 年 3 月 25 日, 東北大学 (宮城県).

② KOTAKI Ryutaro HACHIMURA Satoshi et al. TLR2 ligand stimulation inhibits CpG-induced responses in Peyer's patch dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸国際展示場他 (兵庫県).

③ 上滝隆太郎, 八村敏志ら. パイエル板樹状細胞における TLR2 刺激の TLR9 応答に対する抑制作用. 日本食品免疫学会 2012 年度大会, 2012 年 10 月 16 日, ヤクルトホール (東京都).

④ 上滝隆太郎, 八村敏志ら. TLR リガンド刺激に対する腸管樹状細胞の免疫応答性解析. 日本食品免疫学会 2011 年度大会, 2011 年 10 月 18 日, 東京大学 (東京都).

⑤ 輪島隼一, 八村敏志ら. TLR リガンド刺激に対する腸管樹状細胞の免疫応答性解析. 第 15 回腸内細菌学会, 2011 年 6 月 16 日, 東京医科歯科大学 (東京都).

⑥ A. Shiokawa, S. Hachimura et al. IL-10 and IL-27-producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. 14th

International Congress of Immunology,
2010年8月26日, 神戸国際展示場(兵庫県).

⑦S. Wajima, S. Hachimura et al. Immune
functions of Peyer's patch dendritic
cells stimulated by TLR ligands. 14th
International Congress of Immunology,
2010年8月26日, 神戸国際展示場(兵庫県).

⑧八村敏志. ビフィズス菌、乳酸菌と腸管免
疫系. 第14回 腸内細菌学会, 2010年6月
13日, 京都大学(京都府).

⑨輪島隼一, 八村敏志ら. 生物成分刺激した
パイエル板樹状細胞の免疫応答性解析. 日本
食品免疫学会 2010年度大会. 2010年6月1
日 東京大学(東京都).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA SATOSHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号: 40238019