

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617001

研究課題名(和文) 核酸による新しい口腔内免疫賦活化の原理の確立とその応用を目指す基盤研究

研究課題名(英文) The study of activation of innate immune response by dietary nucleic acids via oral mucosa

研究代表者

亀山 武志 (Kameyama, Takeshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・研究員

研究者番号：40569505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：食品には様々な栄養が含まれているが、食品由来の核酸の栄養学的な役割については十分に明らかにされていない。一方で口腔内における自然免疫システムは、生体防御という観点から重要な機能を担っている事が示唆されているが、その詳細については未だ不明である。本研究では、野菜由来のDNAが自然免疫システムを活性化することを、細胞レベルやマウスの個体レベルで明らかにした。今後、食事によって摂取される食餌性核酸の栄養免疫学的な役割について追求していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Diet contains various kinds of nutrient,, which keep us healthy. However the nutritional role of nucleic acids derived from diets is not clearly understood. The innate immunity system is an essential step as the front line of host defense. Although oral mucosa acts as powerful barriers, the importance of oral mucosa in innate immunity remains unclear. In this study, we demonstrate that DNA derived from vegetable activated innate immune response both in vitro and in vivo, which may provide the nutritional immunological role of dietary nucleic acids.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：総合栄養科学

キーワード：自然免疫 食餌性核酸 インターフェロン 口腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは外来異物,特に病原微生物から生体を守りその恒常性を維持する上で必須のシステムであり,大きく自然免疫系と獲得免疫系とに分けられる.自然免疫システムは,病原微生物感染を認識しその異物を駆除するだけでなく,後に続く獲得免疫系を活性化させる生体防御システムである.この自然免疫システムのなかでも病原微生物を『認識』するというプロセスが,免疫システムの活性化をスタートさせるという点で非常に重要である.我々は特にウイルス感染に着目し「核酸を認識するセンサー分子」に焦点を当てて研究を行ってきた.これまでに細胞質DNAセンサーとしてDAI(DNA-dependent activator of IRFs)を同定し,インターフェロン活性化機構に関する研究を報告した(Takaoka *et al. Nature*: 2007, **448(7152)**, 501-505).また細胞質RNAセンサーRIG-Iを強力に活性化させる新たな調節因子ZAPS(Zinc finger antiviral protein, short form)を見出し,I型IFNおよび炎症性サイトカインの産生を通じて,抗ウイルス作用を強力に増強することを報告した(Hayakawa *et al. Nat. Immunol.*: 2011, **12(1)**, 37-44).こうした研究を行う中で,食品中にも多量の核酸が含まれているため,こういった食餌性核酸が,特に口腔粘膜において,自然免疫系を活性化しうるのはかについて疑問をもった.

これまで,粉ミルクなどに核酸を混ぜることで,アレルギーを減らすことが出来ると言われているが,栄養学的な見地からの核酸の役割について殆ど明らかにされていない.一方で口腔は消化管の最初の門戸として生体防御の最前線の場所として認知されているものの,腸管粘膜と比較して口腔粘膜における粘膜免疫の重要性についての研究は,まだ発展途上であるため,本研究では口腔粘膜における自然免疫系について着目したいと考えた.

2. 研究の目的

本研究では,口腔内で食餌性核酸に着目し,(1)食餌性核酸による自然免疫応答の賦活化メカニズムについて,(2)口腔粘膜を介した自然免疫賦活化メカニズムの解明を目的とし,これらを通じて自然免疫賦活化の原理を臨床応用出来るような基礎研究を展開する事を目標とした.今回本研究で口腔粘膜を標的とするメリットとして,消化酵素の影響を受けにくい事,胃や腸管と異なり肝

臓の初回通過効果を回避できる吸収部位である事, バイオアベイラビリティが高い事, 低侵襲である事, 免疫系を担うリンパ組織が豊富である事が挙げられる.このことは様々な分野で応用出来る可能性が高いと考えた.

3. 研究の方法

(1) 食餌性核酸が自然免疫応答を活性化させるかについて下記の材料と方法を使用した.食餌性核酸は,食用として使用される野菜からCTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)法にてDNAを抽出した.用いた食材は,*Brassica oleracea*(ブロッコリー),*Zea mays*(トウモロコシ),*Brassica rapa*(チンゲンサイ),*Daucus carota L*(ニンジン),*Capsicum annum L*(ピーマン),*Hypsizygus marmoreus*(ブナシメジ)を使用した.これらの食餌性核酸をマウスマクロファージ由来のRaw264.7細胞や*Tlr9*欠損マウス由来の脾臓細胞の培養上清中に添加することで,細胞を刺激した.核酸刺激後に,細胞からRNAを抽出して,*Ifna1*,*Ifnb1*,*Il6*,*TNF* mRNAを定量的RT-PCR法で,IFN- γ の蛋白量をELISAで測定した.またインフルエンザウイルス感染には,A/Puerto Rico/8/1934 H1N1を使用した.

(2) 口腔粘膜を介した自然免疫賦活化メカニズムを明らかにするために,Siegfried Weiss博士との共同研究で del tabeta-Lucマウス(Lienenklaus *et al. J Immunol*: 2009, **183(5)**, 3229-3236)を使用した.このマウスはIFN- γ 遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子に置換されているため,IFN- γ の発現を*in vivo*イメージングにより個体レベルで解析できる.マウス口底部にイソフルによる全身麻酔下で食餌性核酸を染みこませた脱脂綿を置くことで刺激した.その後,マウスの腹腔内にルシフェリンを注射し,IVIS Imaging systemを用いて経時的にルシフェラーゼの発光強度を計測することで,IFN- γ の誘導をモニターした.

4. 研究成果

(1)はじめに,6種類の野菜やキノコから,CTAB法を用いてそれぞれの食餌性核酸を抽出し,Raw264.7細胞に刺激した.その結果,食餌性核酸,特にブロッコリーとチンゲンサイ由来の核酸において,刺激後3-6時間に*Ifnb1*およ

び*I16*, *TNF*の遺伝子が発現誘導された。また刺激後24hの培養上清を用いてIFN- γ が蛋白レベルで誘導されていることが見出された。

次に食餌性核酸をDNase I処理することで、DNAが応答性に関与するかについて検討した。ブロココリー由来の食餌性核酸をDNase I処理したものをRaw264.7細胞に刺激すると、*Ifnb1* mRNAの誘導が認められなかったことから、植物DNAが自然免疫応答を活性化していることを明らかにした。さらに、植物DNAが、どのような核酸センサーを介して自然免疫系の活性化が起きるのかについて検討した。Tlr9欠損マウス由来の脾臓細胞に、植物DNAを刺激すると、*Ifnb1*, *I16* mRNAの誘導が認められなかったことから、植物DNAによる自然免疫の活性化はTlr9を介することを明らかにした。

さらに、我々は食餌性核酸によってIFN- γ が誘導されることが、実際に抗ウイルス活性の増強に寄与しているのかを調べた。そこで、食餌性核酸でRaw264.7細胞を前処理してインフルエンザウイルス感染を行ったところ、未処理群と比較して、ウイルス量が有意に減少したことから、植物DNAによって細胞の抗ウイルス活性が増強することが明らかになった。

(2) *Ifnb1*をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウスを用いて、個体レベルで口腔組織において食餌性核酸が自然免疫を誘導するかについて調べた。その結果、刺激後8時間でルシフェラーゼの発光がコントロールと比較して有意に増強したことから、食餌性核酸の刺激によって、マウス口腔内においてもIFN- γ が誘導されることが示された。

これらの結果は、日常生活の食事で植物由来の「核酸」を摂取することで、自然免疫系が活性化しうることを示唆している。つまり、これまで栄養学的な核酸の役割については明らかにされていなかったが、これらの結果は、食餌性核酸には自然免疫系の活性化という役割があることが示唆される。この成果について現在論文投稿準備中ではあるが、このようなことを明らかにすることは、食事は、自然免疫を賦活させるという新しい側面を見出すことにつながる。つまり「よく噛んで食べる」ということは単に栄養の吸収効率を上げるという事だけでなく、よく噛むことは口腔粘膜を介した効果的な自然免疫系を活

性化するという意味づけをする事になる。こうした知見は食育について貢献する事が出来、食事と免疫活性化という大きな概念を加える事になることが考えられる。一方で、これらの知見は必ずしもヒト疾患に限ったものではなく、家畜などへの応用することが可能である。世界的にも問題となっているトリインフルエンザや、宮崎県において大流行した口蹄疫ウイルスなどの感染症は、酪農畜産分野に経済的にも社会的にも大きな被害損失をもたらすものであるため、簡便で効果的な感染防御対策を確立する事は、急務の課題である。そこで本研究で見出された知見を土台として、家畜の飼料に有効性のあることが示された核酸を混入することで、家畜においても自然免疫系を活性化させることが出来れば、より簡便でより効果的な感染防御対策となる可能性があると考えられる。

今後、本研究をさらに発展させる事で、口腔内免疫賦活化を介する新たな予防法を確立し、植物由来の天然型のDNAをリガンドとして用いた、安全な免疫賦活剤の開発を目指していきたい。

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0件)
(現在投稿準備中)

[学会発表](計2件)

戸田 遙香, 早川 清雄, 亀山 武志, 高岡 晃教. 植物由来の DNA による自然免疫応答活性化の解析. 日本インターフェロン・サイトカイン学会 2014年6月19日 札幌(フラテホール)

早川 清雄. 野菜由来の DNA による自然免疫応答の活性化. 北海道大学 IGM 研究交流会 2012年9月17日 札幌(北海道大学内)

[図書](計1件)

KAMEYAMA, Takeshi, TAKAOKA, Akinori. Humana Press, Method in Mol. Biology. Characterization of innate immune signalings stimulated by nucleic acid sensors. 2014, 14

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀山 武志 (KAMEYAMA, Takeshi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究員
研究者番号：40569505

(2)研究分担者

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

足立 義博クリストファー (ADACHI,
Yoshihiro Christopher)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究員
研究者番号：10616204

(3)連携研究者

高岡 晃教 (TAKAOKA, Akinori)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：30323611

(4)研究協力者

岡田 佳奈子 (OKADA, Kanako)
北海道大学医学研究科・修士

戸田 遙香 (TODA, Haruka)
北海道大学・理学部・学生