

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617028

研究課題名(和文) 栄養と食による肥満細胞活性化制御の解析：「抗炎症食」をめざして

研究課題名(英文) A potential modulation of mast cell function by nutritional factors

研究代表者

増子 佳世 (MASUKO, Kayo)

相模女子大学・栄養科学部・教授

研究者番号：80288208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：[目的]創傷治癒における肥満細胞の役割が示されており、一方、アルギニン(Arg)などのアミノ酸を用いた免疫栄養が有効とされる。今回、アミノ酸の肥満細胞への作用を検討した。[方法] P815細胞をGln・Arg濃度を変更した培地で培養し、IL-6で刺激後、上清中のヒスタミン・IL-13濃度をELISAで測定した。[結果] Gln高濃度培地ではIL-6によるP815のヒスタミン分泌が増加した。一方、ArgはIL-6への反応を変化させなかった。IL-13分泌はArg濃度やIL-6刺激で変化しなかった。[考察・まとめ]アミノ酸は肥満細胞からのヒスタミンおよびIL-13分泌に影響を与えることが判明した。

研究成果の概要(英文)：[Background] Mast cell activation has been implicated in wound healing via releasing a variety of mediators. Glutamine (Gln) and arginine (Arg) are used as "immunonutrients" in malnourished patients, but their potential effect on mast cells is unclear. We evaluated the effect of Gln and/or Arg on mast cell function. [Methods] P815 cells were cultured in a medium under different Gln and/or Arg concentrations. Histamine and IL-13 release was measured using enzyme-linked immunoassays. [Results and Discussion] Cells cultured in higher Gln concentrations produced a greater histamine response upon IL-6 stimulation. IL-13 production was not significantly altered by IL-6 stimulation or by Arg concentration. [Conclusions] Gln and/or Arg concentrations in situ may regulate histamine and IL-13 release from mast cells. The appropriate use of functional amino acids as immunonutrients may suppress inflammation and aid in wound healing.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：肥満細胞 栄養 ヒスタミン グルタミン アルギニン

## 1. 研究開始当初の背景

肥満細胞は多能性幹細胞に由来する造血系細胞であり、IgE 依存性または非 IgE 依存性刺激によるヒスタミンなどのケミカルメディエータの分泌誘導や各種サイトカイン産生を通して、自然免疫や炎症、アレルギー反応において重要な役割を果たす。最近、褥瘡を含む創傷治癒過程においても肥満細胞が関与することが示唆されている。例えば、肥満細胞を欠損するマウスでは創傷治癒が遅延することなどが報告されている(Weller K et al, FASEB J. 20(13):2366, 2006)。しかし、創傷治癒などの炎症病態における肥満細胞の作用と制御メカニズムには、いまだ不明な点が多く残されている。

一方、低栄養状態の患者においては創傷治癒がしばしば遅延することが経験されるが、近年臨床実地において、いわゆる免疫栄養“immunonutrition”として、アルギニン(Arg)やグルタミン(Gln)などのアミノ酸や n-3 多価不飽和脂肪酸、核酸などを含む各種経腸栄養剤が重症患者の周術期等に投与され、予後改善に有用であることが報告されている。特に Arg は免疫賦活化作用を有することが示され、Arg を強化した免疫増強剤 (immune-enhancing diet; IED) が開発された。しかし IED は重症感染症症例ではむしろ予後を悪化させる可能性があるとして示唆され、Arg を配合しない免疫調整栄養剤 (immune-modulating diet; IMD) との使い分けが行なわれている (総説; 川本ら、日本病態栄養学会誌、2013)。いずれにしてもこれらの機能アミノ酸は、初期の血液凝固期から炎症期、そして細胞増殖から肉芽形成・組織修復に至る創傷治癒の各過程において、リンパ球や線維芽細胞に作用することが示されている。従ってこの各段階で、創傷部位に局在する肥満細胞の活性化にも影響している可能性が想定される。しかし、アミノ酸が肥満細胞に与える影響についてはこれまで詳細が明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

免疫栄養に用いられるアミノ酸の培養条件における濃度の差異が肥満細胞の活性化に与える影響について検討する。

## 3. 研究の方法

マウス由来肥満細胞株 P815(理研 BRC)を、10%ウシ胎仔血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加 RPMI1640 培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>環境で培養した。また今回、L-Gln を含まない RPMI1640 を用い、Gln 濃度を任意の濃度 (0-1,000 mg/L) に調整するとともに Arg 濃度を 2 段階に設定した。一部の細胞を試験管内でリコンビナント IL-6(20 ng/mL)により刺激し、一定時間培養後、培養上清を

回収して上清中のヒスタミンおよび IL-13 濃度を市販のキット (Histamine Enzyme Immunoassay Kit<sup>TM</sup>, SPI Bio Inc., および Mouse IL-13 Quantikine<sup>TM</sup>, R&D) を用いた ELISA 法により測定し、結果を Microsoft Excel および「エクセル統計」<sup>TM</sup> を用いて解析した。解析は triplicate で行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

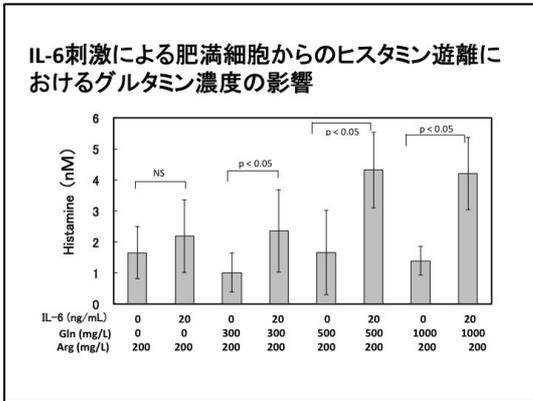
### 1) 培養条件におけるアミノ酸濃度と P815 肥満細胞からのヒスタミン分泌の検討

まず予備的検討として、RPMI1640 培地中の Gln・Arg 濃度の変化と P815 細胞生存率との関係についてトリプルブルーおよび MTS アッセイを用いて検討した。この結果、P815 細胞を、Gln を含有せず、Arg も添加しない培地で培養した場合には細胞生存率測定結果が有意に低下したが、それ以外の条件では実験系により数値のばらつきはあったものの明らかな生存率の差は認められなかった。

次に、Gln と Arg を通常条件と異なる濃度に調整して P815 細胞を培養し、一部に IL-6 刺激を加え (24 時間) 培養上清を回収して上清中のヒスタミン分泌を ELISA 法で測定した。通常 RPMI1640 培地 (Gln, Arg 含有) を用いた培養においても、P815 細胞からは基礎レベルのヒスタミン分泌が検出された。培地中の Gln 濃度のみを変化させた場合 (0-1,000 mg/L)、ヒスタミンの基礎分泌においては有意な変化はみられなかった。しかし IL-6 で細胞を刺激すると、培養条件中の Gln 濃度が高いほど、IL-6 刺激によるヒスタミン分泌増加率が增大することが判明した (具体的には、Arg 200mg/L 含有の培養条件において、Gln が 0, 300, 500 mg/L の場合それぞれヒスタミン量の基礎レベルに対する IL-6 刺激後の比率は 1.214, 2.317, 3.280 倍であった)。このことから、Gln の増加は肥満細胞の IL-6 刺激に対する反応を増強している可能性が示された。

次に培地中の Gln, Arg 濃度をともに変化させると、高濃度 Arg (400 mg/L) 含有培地で培養した P815 細胞では、Gln 濃度によらず IL-6 刺激に対し高いレベルのヒスタミン分泌が見られた。以上より、Gln と Arg が肥満細胞のヒスタミン分泌に与える影響は異なることが示された。

図 1: IL-6 刺激による肥満細胞からのヒスタミン遊離におけるグルタミン濃度の影響 (Kawamoto et al, 2013)



## 2) 培養条件におけるアミノ酸濃度と P815 肥満細胞からの IL-13 分泌の検討

次に、創傷治癒を始めさまざまな病態における線維化に関わる向線維化サイトカインの一つである IL-13 の肥満細胞からの分泌について、培養条件中のアミノ酸濃度との関連を検討した。

上記と同様に、RPMI1640 培地の Gln, Arg 濃度を変化させて培養上清中の IL-13 を ELISA により測定した。

この結果、P815 肥満細胞からの IL-13 分泌は、RPMI 培地の Gln 濃度のみを変化させた場合、Gln 高濃度(500~1,000 mg/L)条件で培養した細胞において増加がみられた。しかし、ヒスタミンと異なり、細胞への IL-6 刺激の有無による有意な変化は認められなかった。さらに、IL-13 産生は Gln 濃度によっては変化した、Arg 濃度には依存しないことが判明した。

## 3) 考察

以上より、P815 肥満細胞の炎症性刺激による活性化におけるヒスタミンおよび IL-13 分泌は、培養条件のアミノ酸濃度(Gln と Arg)によって異なる産生制御を受けることが示された。

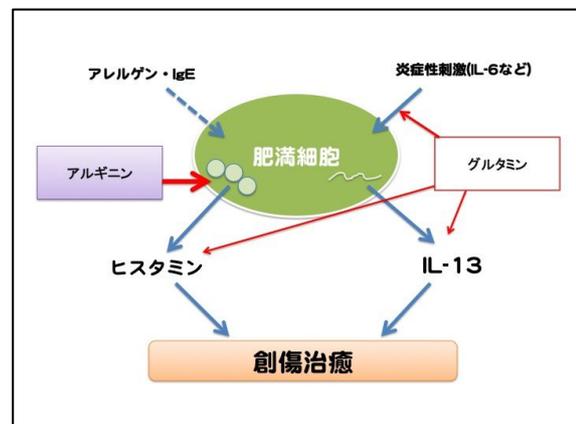
肥満細胞由来ヒスタミンは、線維芽細胞の遊走などを通して創傷治癒を促進し、また IL-13 は TGF- $\beta$  発現誘導を介してコラーゲン合成を促進し、創傷などにおける線維化や皮膚組織のリモデリングに作用する pro-fibrotic なサイトカインとして知られている。今回の実験系では、肥満細胞を、IgE 依存的経路ではなく非依存的刺激、すなわち IL-6 の添加によって活性化することで主としてアレルギー反応の単純な再現ではなく炎症性病変を想定した検討を行なった。この結果、P815 肥満細胞は IL-6 刺激に応じてヒスタミンを分泌したほか、IL-13 の産生も IL-6 によって刺激されることが判明し、さらにこれらの産生分泌が、肥満細胞の培養条件におけるアミノ酸濃度の差異によって変動することが示された。

今回、培養液中の Gln は、肥満細胞からの IL-6 誘導によるヒスタミン分泌を変化させたが、Arg はヒスタミンの基礎分泌レベルに影響を与えた。一方 IL-13 については、ヒスタミンの場合と異なり、IL-6 刺激や Arg 濃度による有意な影響は認められず、Gln により変化することが示された。このことから、Arg と Gln が肥満細胞に及ぼす影響は異なっていることが判明し、いわゆる免疫栄養において用いられる、Arg を強化した「免疫増強栄養剤」(EID)と、Arg 強化のない「免疫調整栄養剤」(IMD)が異なる治療成績をもたらすことの理由の一つに関わることも想定される。また、ヒスタミンは脱顆粒による分泌、サイトカインである IL-13 は転写活性化などヒスタミンとは異なる機構で産生刺激されていると考えられ、今後、アミノ酸が肥満細胞の異なる活性化経路に与える影響について、シグナル伝達経路等の詳細な検討が必要である。さらに、今回用いた Arg, Gln は「条件付き必須アミノ酸」であるが、他のアミノ酸も含め、いわゆるアミノ酸バランスが褥瘡や創傷治癒に与える影響に関する分子レベルでの解析も望まれる。

以上より、重症患者や外科手術周術期のいわゆる免疫栄養におけるアミノ酸は、少なくとも一部は肥満細胞の機能制御を通して、炎症やアレルギー、創傷治癒に影響を及ぼしていることが示唆された。今後、創傷治癒へのアミノ酸組成の異なる薬剤の適応検討など、臨床応用の可能性についても念頭におき検討していきたい。

図 2：肥満細胞のヒスタミンおよび IL-13 産生分泌におけるアルギニン・グルタミンの異なる作用(仮説)

アルギニンは、preformed のヒスタミン脱顆粒に影響を及ぼし、一方グルタミンは炎症性刺激(IL-6等)によって誘導される IL-13 産生に関わっていることが示唆された。これにより肥満細胞からのヒスタミン・IL-13 産生誘導がアミノ酸バランスにより制御されている可能性があると考えられる。



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 5 件)

1. Masuko K. Potential regulation of mast cell function via peroxisome proliferator-activated receptor pathway. Accepted for publication in the "Abstract Book" of *Annals of Rheumatic Diseases*, 2014, June.

2. Kawamoto M, Masuko K. Modulation of Mast Cell Function by Amino Acids In vitro: A Potential Mechanism of Immunonutrition for Wound Healing. 2013. *Journal of Nutritional Health and Food Science*, 査読有, 1(1):6

<http://symbiosisonlinepublishing.com/nutritionalhealth-foodscience/nutritionalhealth-foodscience04.php>

3. Masuko K. The multifaceted effects of vitamin D and its potential contribution to rheumatoid arthritis. *Brit J Med Med Res* 2013. 査読有, 4(8): 1680-90.

4. 川本真砂子、増子佳世: 免疫栄養と創傷治癒. *日本病態栄養学会誌*, 2013、査読有、16(1):67-76,2013

5. Masuko K., Tohma S, Matsui T. Potential food-drug interactions in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 2013. 査読有, 16(2):122-8. doi: 10.1111/1756-185X.12069.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 川本真砂子、増子佳世. アミノ酸による肥満細胞機能制御と創傷治癒への関与についての検討. 第 16 回日本褥瘡学会にて発表予定 (2014.8.29, 名古屋; 口演採用)

2. 川本真砂子、増子佳世. 炎症性刺激に対する肥満細胞の反応におけるアミノ酸の作用の解析. *日本病態栄養学会*, 2014.1.11~12、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

3. 川本真砂子、大友正孝、増子佳世. グルタミンによる肥満細胞機能制御の可能性. 第 15 回日本褥瘡学会、2013.7.19~20(神戸国際展示場・神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル)

4. Kawamoto,M, Masuko K. In Vitro glutamine- induced modulation of histamine release from mast cells. 8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition) 2013.6.9~12、(舞浜: 東京ベイ舞浜ホテル)

〔図書〕(計 2 件)

1. 星恵子(編集代表)、増子佳世、他(分担執筆). *薬事日報社. やさしい臨床医学テキスト*第3版. 2014年, pp369-373, 465-490,他。

2. 荒金英樹、若林秀隆(編著)、増子佳世、他(分担執筆). *医歯薬出版. 悪液質とサルコペニア-リハビリテーション栄養アプローチ* .2014年, pp153-161.

6. 研究組織

(1)研究代表者

増子 佳世 (MASUKO, Kayo)  
相模女子大学・栄養科学部・教授  
研究者番号: 8 0 2 8 8 2 0 8

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: