

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658113

研究課題名（和文） 食品機能成分による脂質ラフトの機能制御を介した免疫調節

研究課題名（英文） Immunomodulation of functional food components via regulation of lipid rafts

研究代表者

菅原 達也（SUGAWARA TATSUYA）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70378818

研究成果の概要（和文）：20 種類のカロテノイドが免疫担当細胞に与える影響について、脂質ラフトに注目して評価した。その結果、肥満細胞の脱顆粒抑制反応については 6 種類、B 細胞受容体のキャッピング反応に対しては 12 種類、マクロファージの一酸化窒素産生については 15 種類のカロテノイドが抑制作用を示すことを見出した。それぞれの細胞について、リガンド刺激後の受容体および脂質ラフトの局在を可視化したところ、細胞の活性化を抑制した全てのカロテノイドは、受容体の脂質ラフトへの移行も抑制した。これらの結果より、カロテノイドは受容体および脂質ラフトの局在に影響を与え、免疫調節作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated that the effects of 20 carotenoids on the function of immunocompetent cells. It was found that 6, 12 and 15 carotenoids can suppress the reaction of mast cells, B cells and macrophage via their receptors, respectively. The translocation of the receptor to lipid rafts in each immunocompetent cell was inhibited by all carotenoids showing the suppression activity of the response by the ligand. These results suggested that the regulation of function in the immunocompetent cells by carotenoids was due to the alteration of the location of the receptors and lipid rafts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

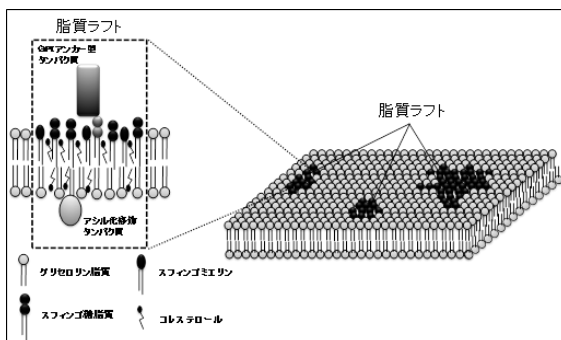
リウマチ、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、食物アレルギー等のアレルギー疾患を有する患者数は、日本国民の 30% 以上にもものぼるといわれており、今後も増加傾向にあると予想されている。そのため、アレルギーに対する効果的な対症療法や根治的な治療法の確立が求められており、アレルギー発症メカニズムの分子生物学的な解明もまた精力的に進められてきている。そのなかで、典型的な炎症メディエーターの発現変化を指

標とした細胞レベルの炎症評価系を用いた検討が数多く実施され、天然機能性成分の抗炎症作用もそのような評価系を使って行われている。

免疫担当細胞（マスト細胞、T 細胞、B 細胞など）に特有の受容体の多くは、細胞内にシグナルを伝達する際に脂質ラフトが深く関与することが示されてきている。脂質ラフトとは、直径数 nm・数十 nm のコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜マイクロドメインである。グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型（GPI アンカー型）

タンパク質やパルミチン酸のような飽和脂肪酸の修飾を受けたタンパク質が脂質ラフトに濃縮されており、様々な受容体やシグナルに関わるタンパク質が会合していることから、機能的なドメイン構造と考えられている。実際に脂質ラフトが細胞外シグナルを細胞内に効率よく伝えるシグナル伝達の間として機能することが明らかにされつつあり、生命科学の研究において最先端の分野として注目を集めている。なかでも免疫担当細胞に特異的な受容体のシグナル伝達に関して、脂質ラフトが深く関わることを示されてきている (Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 31, 2000)。しかし、その仕組みについては依然として未解明な部分が多く残されており、これらが解明されることは生命科学の飛躍的な発展にもつながることが期待される。さらに、脂質ラフトの機能を外因的な食品機能成分により制御しようとする研究はあまりなく、食品機能成分であるカロテノイドにより、脂質ラフトを介した免疫応答の制御を評価した例は、研究代表者のマスト細胞の脱顆粒反応に対するものしかない (J. Biol. Chem. 284, 28172, 2009)。

したがって、このような食品機能成分によって脂質ラフトの機能を制御することで、免疫機能を調節できる可能性が高いと考えられる。



2. 研究の目的

本研究は、マスト細胞を含めた様々な免疫担当細胞（マクロファージ、B細胞、T細胞など）について、脂質ラフトの機能変化に着目して、食品機能成分の影響を評価することで、全く新しい視点からの免疫機能制御（抗炎症作用や免疫賦活作用など）につなげようとするものであり、萌芽的な研究といえ、学術的な意義も極めて大きい。

本研究課題では、マスト細胞の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)、マクロファージなどの IgG 受容体 (FcγR) や Toll 様受容体 (TLR)、B 細胞の B 細胞受容体 (BCR)、T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) といった脂質ラフトへ移行することにより、細胞内にシグナルが伝達される受容体に着目し、研究期間内に以下の項

目を実施した。(1) 食品機能成分であるカロテノイドが、これらの受容体の脂質ラフトへの移行や免疫応答に与える影響を明らかにする。(2) 作用メカニズムについて、脂質ラフトの構成成分（タンパク質や脂質）組成や機能の変化に注目した解析を行うことで、カロテノイドによる脂質ラフト機能制御の詳細なメカニズムを探る。

3. 研究の方法

(1) 免疫調節作用の評価

食品機能成分であるカロテノイドは、抗腫瘍作用や抗酸化作用などの様々な生理機能を有することで知られている。しかしながら免疫担当細胞に対する影響については、動物実験や臨床試験の報告があるのみであり、その作用機序に注目した研究はほとんど行われていない。

そこで本研究ではカロテノイドが免疫システムに与える影響について、その作用機序を明らかにすることを目的とし、培養細胞レベルでの機能性の評価を行った。具体的には肥満細胞、B細胞、マクロファージに注目し、それぞれ高親和性 IgE 受容体、B細胞受容体、Toll 様受容体 4 を介した細胞の活性化に対するカロテノイドの影響を評価した。

(2) 受容体の脂質ラフトへの移行の評価

これまでの研究によって、アスタキサンチンなどのいくつかのカロテノイドは、高親和性 IgE 受容体の脂質ラフトへの移行を阻害し、肥満細胞の活性化を抑制することが見出されている (J. Biol. Chem. 284, 28172, 2009)。

そこで (1) で免疫調節作用が確認されたカロテノイドについて、それぞれの免疫受容体の脂質ラフトへの移行に与える影響を調べた。受容体および脂質ラフトの局在を蛍光免疫染色法によって可視化し、カロテノイドが受容体の移行に与える影響を直接的に細胞の状態イメージング化した。

4. 研究成果

(1) 肥満細胞の活性化に対する作用

肥満細胞のモデルとしてラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 を用いた。抗原および対応する IgE 抗体で細胞を刺激した際の脱顆粒反応を指標とし、それぞれのカロテノイドの肥満細胞活性化抑制作用を評価した。その結果、新たにロロキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、フコキサンチノール、リコペン、β-クリプトキサンチン、シフォナキサンチンの6種類のカロテノイドについて脱顆粒抑制作用が見出された。肥満細胞の脱顆粒反応は、食品アレルギーや花粉症などの I 型アレルギーにおける主要な炎症反応であるた

め、本研究で新たに脱顆粒抑制作用が見出されたカロテノイドには、I型アレルギーの症状を緩和する効果が期待された。

(2) B細胞の活性化に対する作用

B細胞のモデルとしてヒトバーキットリンパ腫細胞株 Ramos を用いた。抗 IgM 抗体を用いて B 細胞受容体を架橋し、その後の B 細胞受容体のキャッピング反応を指標にカロテノイドの抑制作用を評価した。20 種類のカロテノイドについて評価したところ、12 種類で抑制作用が確認できた。またその作用の強さは、リコペン、フコキサンチン、シフォナキサンチン、β-カロテン、ハロシンチアキサンチン、フコキサンチノール、シフォネイン、β-クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、ジアトキサンチン、ビオラキサンチン、ルテインの順であった。

(3) マクロファージの活性化に対する作用

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 をモデルとして用い、リポ多糖刺激に伴う一酸化窒素産生量を指標に抑制作用を評価した。15 種類のカロテノイドについて抑制作用が見出された。またフコキサンチノール、シフォネイン、ジアトキサンチン、リコペン、β-カロテン、ルテイン、フコキサンチン、ゼアキサンチン、ハロシンチアキサンチン、ビオラキサンチン、アロキサンチン、エキネノン、シフォナキサンチン、9'-cis-ネオキサンチン、ペクテノロンの順に強い抑制作用が認められた。

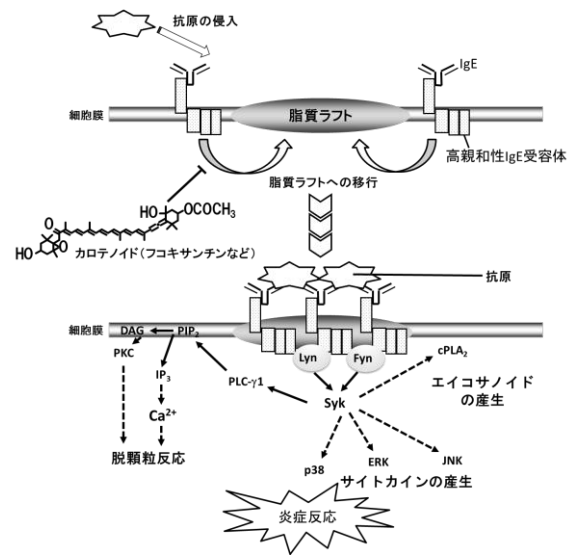
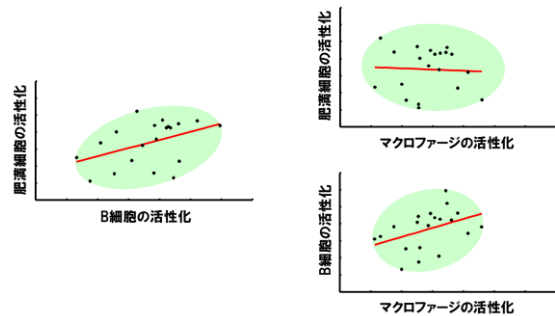
(4) 受容体の脂質ラフトへの移行の評価

RBL-2H3 細胞と RAW264 細胞については GM1 を、Ramos 細胞については CD65 を蛍光染色することによって、それぞれの細胞における脂質ラフトの局在を可視化した。カロテノイドで細胞を処理し、リガンド刺激後の受容体および脂質ラフトの局在を可視化したところ、細胞の活性化を抑制した全てのカロテノイドは、受容体の脂質ラフトへの移行も抑制した。一方、細胞の活性化に影響を与えなかったカロテノイドは、受容体および脂質ラフトの局在にも影響を与えなかった。これらの結果より、カロテノイドは受容体および脂質ラフトの局在に影響を与え、免疫調節作用を示すと考えられた。

(5) 総括

シフォナキサンチンやフコキサンチンなどの 5 種類のカロテノイドは肥満細胞、B 細胞、マクロファージの全ての細胞に対して抑制的に作用したが、いずれの細胞の活性化にも影響を与えないカロテノイドも確認された。各細胞の活性化に対する抑制率をプロットしたところ（下図）、肥満細胞の活性化に

対する抑制作用と B 細胞の活性化に対する抑制作用の間には有意ではないものの正の相関が認められた。一方、肥満細胞とマクロファージ、B 細胞とマクロファージの活性化に対する抑制作用の間に相関は認められず、マクロファージに対する抑制作用については作用機構が異なる可能性が考えられた。また、本研究で新たに免疫調節作用が見出されたカロテノイドは、受容体の脂質ラフトへの移行を抑制していた。以上の結果から受容体と脂質ラフトを介した免疫担当細胞活性化の抑制作用は、カロテノイドの化学構造によって異なることが示され、その詳細な作用機構は細胞の種類によって異なると考えられた。



肥満細胞での例

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)

[学会発表] (計 9 件)

1. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、高親和性 IgE 受容体の凝集阻害を介したカロテノイドの脱顆粒抑制作用、第 65 回日本栄養・食糧学会、2011 年 5 月 14 日、

東京

2. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、免疫担当細胞におけるカロテノイドの脂質ラフトを介した受容体応答の制御、日本食品科学工学会第 58 回大会、2011 年 9 月 10 日、仙台

3. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、免疫担当細胞における脂質ラフトを介した受容体応答に対するカロテノイドの抑制作用、第 25 回カロテノイド研究談話会、2011 年 9 月 13 日、筑波

4. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、免疫担当細胞における受容体応答に対するカロテノイドの影響、日本栄養・食糧学会第 50 回近畿支部大会、2011 年 10 月 15 日、奈良

5. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、脂質ラフトを介した免疫担当細胞の活性化に対するカロテノイドの影響、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都

6. 真鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝、脂質ラフトを介した免疫担当細胞の活性化に与える海洋カロテノイドの影響、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 20 日、仙台

7. 真鍋 祐樹、菅原 達也、平田 孝、マスト細胞の脱顆粒反応に対する海洋生物由来カロテノイドの抑制効果、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 25 日、東京

8. Yuki Manabe, Shota Sakai, Tatsuya Sugawara, Takashi Hirata, Inhibitory Effects of Carotenoids on Antigen-induced Activation of Immune Cells, 103rd AOCs Annual Meeting & Expo, 2nd May 2012, Long Beach, USA

9. Yuki Manabe, Shota Sakai, Tatsuya Sugawara, Takashi Hirata, Inhibitory Effects of Marine Carotenoids on the Lipid Raft-associated Activation of Immune Cells, International Symposium on Food Biotechnology and Sea cucumber Utilization, 23rd May 2012, Qindao, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原達也 (SUGAWARA TATSUYA)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70378818