

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700822

研究課題名(和文) 初期免疫応答におけるビタミンCの賦活化促進効果と炎症抑制効果の機構解明

研究課題名(英文) Modulatory Effect of Vitamin C in Early Immune Response

研究代表者

曽根 保子 (SONE, YASUKO)

高崎健康福祉大学・公私立大学の部局等・講師

研究者番号：80452027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養液のビタミンC濃度を、血液中よりもはるかに高い濃度(5 mM)になるように設定し、細胞内外のビタミンCの濃度を高めることで、細胞内の炎症抑制因子の生成が促進される可能性が示唆された。しかし、ビタミンCの炎症抑制因子に対する直接的な作用経路や免疫応答の体系的な作用機序については不明な点を多く残していることから、今後は、免疫応答へのビタミンCによる直接的な影響と、生体内の種々の環境因子との相互作用からもたらされる間接的な影響とを分け、両面からの検討を進めることが重要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is suggested the possibility that the supplementations of highly-concentrated vitamin C promote the generation of the anti-inflammatory autacoid. The highly-concentrated vitamin C level in this study could be carried out by intravenous injection, not by a general meal.

研究分野：分子栄養学

キーワード：免疫応答 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

1970年代に、一般的な食事から摂取する量をはるかに上回る多量のビタミンC(L-アスコルビン酸)を摂取すると、風邪やがんに対する予防効果が期待できると報告され、それ以降、ビタミンCと免疫に関するさまざまな研究が行われてきた。

例えば、疫学研究では、ビタミンCが免疫作用を増強する可能性や炎症に対する抑制効果をもつ可能性などが示されている。

他方、実験科学的な研究では、ビタミンCがインターフェロンの産生を刺激して、免疫応答の活性を高めることやリンパ球の増殖、リンパ球の遊走性、ナチュラルキラー細胞の活性を高める可能性があることが報告されている。

しかし、このような研究報告のなかには、相反する研究結果が存在するものも多く、免疫応答におけるビタミンCの主要な作用は、免疫系の賦活化(促進)にあるのか、アレルギー性炎や炎症の抑制、または促進にあるのか、もし、ビタミンCに何らかの作用があるとすれば、どのような機構で制御されているのかなど、不明な点が多く、免疫応答におけるビタミンCの作用機序についての全容は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、免疫応答におけるビタミンCの機能的役割を明らかにし、ビタミンCの免疫賦活化作用、炎症の抑制効果などについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ODSラットの初代肝細胞での評価

ビタミンCの合成能をもたないOsteogenic Disorder Shionogi / Shi Jcl- od/od (ODS)ラットの初代肝細胞を用い、免疫応答におけるビタミンCの影響を解析した。

ここで用いたODSラットは、ヒトと同じようにビタミンCの合成能をもたないため、その初代肝細胞は、ビタミンCを選択的に取り込む輸送単体であるナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターを発現しており、このトランスポーターを介して、ナトリウムイオンとともにビタミンCを細胞外から細胞内へ輸送する。このとき、細胞を育成する培養液中に、ビタミンCを添加しておく、ODSラットの初代肝細胞は、効率的にビタミンCを細胞内へ取り込む。

そこで、ODSラットの初代肝細胞の培養液のビタミンC濃度を、血液中と同じ程度の濃度(0.05 mM)、血液中よりもはるかに高い濃度(5 mM)、血液中よりも低い濃度(0 mM)になるように設定して培養をしたのち、免疫応答にかかわる遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。

(2) 単球様細胞での評価

ヒト由来の単球様細胞であるTHP-1細胞を用い、免疫応答におけるビタミンCの影響を遺伝子レベルで評価した。

単球様細胞であるTHP-1細胞は、培養液中に添加されたphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)により刺激を受けると、浮遊細胞から接着細胞へ分化し、マクロファージ様の特徴を示すことが知られている。

そこで、THP-1細胞の培養液中へPMAを添加し、THP-1細胞をマクロファージ様に分化させたのち、培養液のビタミンC濃度、及びビタミンCの安定型誘導体である2-O-β-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸をそれぞれ0.05 mM、5 mM、0 mMとなるように設定し、免疫応答にかかわる遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。

(3) 酸化促進剤、及び還元剤での評価

水溶液中に溶解したビタミンCは、金属イオンの存在下で、これらと容易に反応し、過酸化水素などの活性酸素種を生成するプロオキシダント(過酸化物質)としてはたらくことが報告されている。このように、ビタミンCは、条件によって、酸化を促進する一面をもつことから、(1)、及び(2)での検討において、培養液中にビタミンCを添加することで、培養液、及び細胞の活性酸素種のレベルを高め、その活性酸素種が細胞の免疫反応に影響を及ぼす可能性がある。

他方で、ビタミンCは生体内で発生する活性酸素を捕捉する能力をもっており、体内では有効な抗酸化物質として機能している。体外でも水溶液相などにおいて、ビタミンCが電子の供与体としてはたらく、アンチオキシダント(抗酸化物質)としての機能を発揮する。

以上のようなビタミンCの化学的性質によってもたらされる酸化と還元のパランスの変化が、細胞の免疫応答へ大きな影響をもたらしている可能性が考えられる。

そこで、ビタミンCとは異なる酸化促進剤・還元剤として、過酸化水素・N-アセチルシステインなどを培養液中に添加して培養し、その後、免疫応答に関する遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。

4. 研究成果

(1) ODSラットの初代肝細胞での評価

培養液のビタミンC濃度を、血液中と同じ程度の濃度(0.05 mM)、血液中よりもはるかに高い濃度(5 mM)、血液中よりも低い濃度(0 mM)になるように設定して培養をすることによって、いくつかの免疫応答にかかわる遺伝子の発現に変化が認められた。培養液中のビタミンCの濃度により、炎症反応を促進する遺伝子や炎症反応を抑制する遺伝子の発現がそれぞれ変動したため、ビタミンCが何らかのかたちで、免疫応答の形成にかかわっている可能性が示された。

しかし、必ずしも細胞へ負荷したビタミンCの濃度に依存したかたちで、その変化が認められておらず、これらの発現は多様に変動していた。この要因の一つには、これらの遺伝子の発現が細胞内におけるさまざまな環境因子の影響を複合的に受けていることが考えられる。

培養液中のビタミンCの濃度によって変動した遺伝子の例として、細菌感染や局所的な傷害などの異常部位に作用する生理活性物質（オータコイド）を生成する遺伝子が挙げられる。培養液中のビタミンCの濃度を5mMに高めることによって、この遺伝子の発現レベルは上昇し、逆に、培養液中のビタミンCの濃度を下げ、0mMに設定することにより減少した（図1）。

オータコイドは、炎症反応やアレルギー反応において、重要な因子として知られており、特定のオータコイドは、外的刺激による活性化で生じるマスト（肥満）の脱顆粒を抑制することで、炎症や疼痛の反応を軽減させる方向に傾けることが知られている。したがって、細胞内のビタミンCの濃度を血液中の濃度よりもはるかに高めることにより、特定のオータコイドを介して、炎症や疼痛の反応を抑制する可能性があることが示唆された。

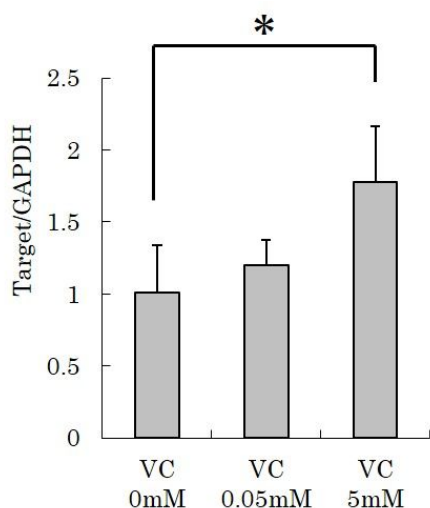


図1 オータコイド生成因子の遺伝子発現

(2) 単球細胞での評価

培養液のビタミンC、及びビタミンCの安定型誘導体である2-O-β-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の濃度を、血液中と同じ程度の濃度（0.05mM）、血液中よりもはるかに高い濃度（5mM）、血液中よりも低い濃度（0mM）になるように設定して培養をすることによって、いくつかの免疫応答にかかわる遺伝子の発現に変化が認められた。

培養液中に含まれるビタミンCや、その誘導体の濃度により、炎症反応を促進する遺伝子や炎症反応を抑制する遺伝子の発現がそれぞれ変動したため、ビタミンCや誘導体が何らかのかたちで、免疫応答の形成にかか

わっている可能性が示された。

しかし、得られた結果の再現性が低く、同様の実験を行うたびに、遺伝子の発現レベルは多様に変動した。この要因の一つに、免疫応答では、細胞内外の生理活性因子の濃度、pH、反応の時間などのさまざまな環境因子の影響を複合的に受けやすいことが考えられる。

(3) 酸化促進剤、及び還元剤での評価

ビタミンCは、生体内の酸化、あるいは還元深く関係する因子であることから、培養液中にビタミンCを添加したことにより、培養液中、もしくは細胞内のレドックス環境（酸化、還元の状態）が変化し、それに伴って、免疫応答にかかわる遺伝子の発現が変動した可能性も高い。このため、ビタミンCとは異なる酸化促進剤、及び還元剤によって、培養液中のレドックス環境を変化させ、上述と同様な変化をもたらされるかを検討した。

その結果、これらの遺伝子発現のなかで、細胞内外のレドックス環境に強く影響を受けていると推測されると、受けていないと推測される遺伝子が認められたが、それらの変化の程度やパターンは、多様であり、培養液中に添加した酸化促進剤、及び還元剤の濃度依存的な変化を示さなかった。この原因として、添加した酸化促進剤、及び還元剤によって、さまざまな生体応答が引き起こされ、それらの影響を複合的に受けている可能性が考えられる。また、酸化促進剤、及び還元剤の種類によって、体内の環境が微妙に変化するため、一概に結果を評価することが難しかった。

(4) 総括

本研究では、培養液のビタミンC濃度を、血液中よりもはるかに高い濃度（5mM）になるように設定し、細胞内外のビタミンCの濃度を高めることで、細胞内の炎症抑制因子の生成が促進される可能性が示唆された。

しかし、ビタミンCの炎症抑制因子に対する直接的な作用経路や免疫応答の体系的な作用機序については不明な点を多く残していることから、今後は、免疫応答へのビタミンCによる直接的な影響と、生体内の種々の環境因子との相互作用からもたらされる間接的な影響とを分け、両面からの検討を進めることが重要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

Sone Y, Hirasawa R, Ichi I, Ishikawa T, Kodama S, Sone H, Egawa S, Kawahara K, Otsuka Y, Fujiwara Y, Efficacy of habitual exercise for improving lipid profiles depends on the PPARα genotype in Japanese males, J Nutr Sci Vitaminol, 査読有, 60巻, 2014, 66-70.

Akiyama Sannomaru Y, Sanceda N, Sone Y, Kurata T, Suzuki E, Changes in Fatty Acid Composition of Maiwashi (Sardine) Added with Linoleic Acid during Fermentation Process in Fish Sauce Making, Journal of Cookery Science of Japan, 査読有, 47 巻, 2014, 165-170

曽根 保子, 園田 麻里子, 赤尾 茉衣, 石川 朋子, 市 育代, 藤原 葉子, 高脂肪摂取マウスの骨に及ぼす - トコフェロールの影響、ビタミン E 研究の進歩、査読有、16 巻、2014、28-34

Sone Y, Kido T, Ainuki T, Sonoda M, Ichi I, Kodama S, Sone H, Kondo K, Morita Y, Egawa S, Kawahara K, Otsuka Y, Fujiwara Y, Genetic Variants of the Fatty Acid Desaturase Gene Cluster Are Associated with Plasma LDL Cholesterol Levels in Japanese Males, J Nutr Sci Vitaminol, 査読有, 59 巻, 2013, 325-335

Kodama S, Horikawa C, Fujihara K, Hirasawa R, Yachi Y, Yoshizawa S, Tanaka S, Sone Y, Shimano H, Iida KT, Saito K, Sone H, Use of high-normal levels of hemoglobin A1C and fasting plasma glucose for diabetes screening and prediction - A meta-analysis, Diabetes Metab Res Rev, 査読有, 29 巻, 2013, 680-692

Hirasawa R, Yachi Y, Yoshizawa S, Horikawa C, Heianza Y, Sugawara A, Sone Y, Kondo K, Shimano H, Saito K, Kodama S, Sone H, Quality and accuracy of Internet information concerning a healthy diet, Int J Food Sci Nutr, 査読有, 64 巻, 2013, 1007-1013

Arisawa K, Ichi I, Yasukawa Y, Sone Y, Fujiwara Y, Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes, J Biochem, 査読有, 154 巻, 2013, 281-289

秋山 (山王丸) 靖子, 品川 浩一, 深谷 睦, 日比野 康英, 沼尻 幸彦, 曽根 保子, 鈴木 恵美子, 加園 恵三, 医薬品服用者におけるウコン含有健康食品の摂取に関する実態調査、日本食生活学会誌、査読有、23 巻、2013、225-23

曽根 保子, 江川 重信, 河原 和夫, 近藤 和雄, 大塚 譲, 藤原 葉子, 脂肪酸組成比による SCD1 活性と動脈硬化性疾患誘導性脂質プロファイルとの関連、日本臨床栄養学会雑誌、査読有、35 巻、2013、

114-129

近松 出穂, 吉原 千寿, 山下 香織, 赤尾 茉衣, 園田 麻里子, 石川 朋子, 池本 真二, 西川 可穂子, 曽根 保子, 市 育代, 藤原 葉子, ビタミン E 同族体が高脂肪食誘導性肥満マウスの耐糖能に及ぼす影響、ビタミン、査読有、86 巻、2012、671-677

Nomi Y, Shimizu S, Sone Y, Tuyet MT, Gia TP, Kamiyama M, Shibamoto T, Shindo K, Otsuka Y, Isolation and antioxidant activity of zeylanin A, a new macrocyclic ellagitannin from Syzygium zeylanicum leaves, J Agric Food Chem, 査読有, 60 巻, 2012, 10263-10269

Kodama S, Saito K, Tanaka S, Horikawa C, Fujiwara K, Hirasawa R, Yachi Y, Sone Y, Tada Iida K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H, Fasting and post-challenge glucose as quantitative cardiovascular risk factors: a meta-analysis, J AthEroscler Thromb, 査読有, 19 巻, 2012, 385-396

〔学会発表〕(計 13 件)

国内学会

曽根 保子 他、脂肪酸組成比による SCD1 活性と動脈硬化性疾患誘導性脂質プロファイルとの関連、第 37 回日本臨床栄養学会総会、2015 年 10 月 3 日、都市センターホテル (東京・千代田区)

曽根 保子 他、赤血球膜リン脂質の SCD1 活性比と脂質代謝異常との関連、第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014 年 7 月 11 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

曽根 保子 他、微侵襲システムを用いた新規試験食の検討、第 36 回日本臨床栄養学会総会・第 35 回日本臨床栄養協会総会、2014 年 10 月 5 日、JP タワーホール & カンファレンス (東京都・千代田区)

曽根 保子 他、高脂肪摂食マウスの骨に及ぼす - トコフェロールの影響、第 24 回ビタミン E 研究会、2013 年 1 月 12 日、慶應義塾大学 芝共立キャンパス (東京・港区)

曽根 保子 他、オリーブ葉ポリフェノール Oleuropein が糖質代謝に及ぼす影響、第 67 回日本栄養・食糧学会、2013 年 5 月 25 日名古屋大学東山キャンパス (愛知県・名古屋市)

国際学会

Sato H, Kawamura Y, Tomino S, Sonoda M, Ichi I, Sone Y, Ishikawa T, Fujiwara Y, Tocotorienol improves the glucose tolerance in obese mice induced by high fat feeding, 12th Asian Congress of Nutrition, 14-18 May 2015, Yokohama (JAPAN)

Sato Y, Suzuki E, Murai M, Sone Y, Miyake N, Effect of short-term fasting on biomarkers and status of Vitamin C in Mice, 12th Asian Congress of Nutrition, 14-18 May 2015, Yokohama (JAPAN)

Murai M, Sato Y, Sone Y, Isaka A, Nishimura C, Kogure M, Miyake N, Suzuki E, Effect of High-Fat Diet on Behavior of Ascorbic Acid in C57BL6/J Mice, 12th Asian Congress of Nutrition, 14-18 May 2015, Yokohama (JAPAN)

Sone Y, Morito K, Narita T, Egawa S, Kawahara K, Otsuka Y, Fujiwara Y, Efficacy of Habitual Exercise for Improving Lipid Profiles Depends on the PPAR-gamma Genotype in Japanese Males, 12th Asian Congress of Nutrition, 14-18 May 2015, Yokohama (JAPAN)

Ishikawa T, Sone Y, Sonoda M, Yamashita K, Fujiwara Y, Three-dimensional analysis of the onset of regional heterogeneity of hepatocytes and microvascular architecture in shrew hepatic lobules, 20th International Congress of Nutrition, 15-20 September 2013, Granada (SPAIN)

Fujiwara Y, Ikeda N, Sonoda M, Ichi I, Sone Y, Ishikawa T, Oleuropein improves glucose tolerance of high-fat induced obese mice, 20th International Congress of Nutrition, 15-20 September 2013, Granada (SPAIN)

Sone Y, Ichi I, Kawahara K, Kondo K, Otsuka Y, Fujiwara Y, The association of serum lipid profile with SCD1 desaturase indices in red blood cells membranes, 20th International Congress of Nutrition, 15-20 September 2013, Granada (SPAIN)

Sone Y, Ichi I, Kawahara K, Kondo K, Otsuka Y, Fujiwara Y, Association of non HDL-C Levels and the LDL-C/HDL-C Ratio, with Fatty Acid Levels and SCD1 Desaturase Indices in Red Blood Cell

Membranes, 8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, 9 - 12 June 2013, Tokyo (JAPAN)

〔図書〕(計4件)

曽根 保子 他、東京化学同人、基礎栄養学、2015、55-87

曽根 保子、藤原 葉子、日本ビタミン学会、免疫応答におけるビタミン C の生理学的役割、2014、527-529

曽根 保子 他、羊土社、分子栄養学 遺伝子の基礎からわかる、2014、167-184

曽根 保子 他、学文社、食べ物と健康、2012、9-14

〔その他〕

ホームページ等

http://www.takasaki-u.ac.jp/p_eiyo/7994/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曽根 保子 (SONE, Yasuko)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：80452027

(2) 研究分担者 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし