

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870246

研究課題名(和文)小腸の粘膜免疫および全身免疫に対する米タンパク質摂取の有効性

研究課題名(英文)Effects of rice endosperm protein on systemic and intestinal immunity

研究代表者

久保田 真敏 (Kubota, Masatoshi)

新潟大学・研究推進機構 超域大学院・助教

研究者番号：00595879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：予備的な検討から、米胚乳タンパク質(REP)は小腸の免疫関連遺伝子の発現に影響を与える可能性が示された。そこで本研究では、REPが免疫系に与える影響について明らかにすることを目的にした。細胞性免疫が強いLewisラット、液性免疫が強いBrown NorwayラットにREPを3-4週間摂取させ、小腸の免疫関連遺伝子発現および血漿中I型ヘルパーT (Th1)細胞/II型ヘルパーT (Th2)細胞バランスに与える影響を検討した。その結果、卵白タンパク質群と比較して、REP群では細胞性免疫に係る遺伝子群の発現が上昇し、血漿中Th1/Th2バランスをTh1細胞側に偏向させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：There are limited reports about physiological functions of rice endosperm protein (REP) in spite of an importance as a protein source. Thus, we attempted to clarify effects of REP on immune system to search novel physiological functions of REP. Male Lewis rats with higher activities of cellular immunity and Brown Norway (BN) rats with higher activities of humoral immunity at 3 weeks of age were employed. These rats were fed on egg white protein (OVA) as a control and REP diets for 3-4 weeks. From microarray analysis, the expressions of genes related to cellular immunity in the jejunum were increased in the REP group, compared with those in the OVA group. In addition, plasma IgG2a/IgG1 (Th1/Th2) ratio in both model rats was significantly increased and the proportion of Th1 cells in Lewis rats was significantly increased in the REP group, compared with the OVA group. Therefore, REP enhances cellular immunity and deflects the Th1/Th2 balance to Th1 side.

研究分野：栄養学 食品化学

キーワード：米胚乳タンパク質 細胞性免疫 Th1/Th2バランス

1. 研究開始当初の背景

米は日本人の主食であり、エネルギー供給源として重要な食品であるが、精白米中のタンパク質含量が約6%と低く、タンパク質供給源としての価値は軽視されがちである。しかし、日本人の一日当たりの食品群別タンパク質摂取量でみると、米は肉類や魚介類に次ぐ3番目の位置を占めており、その摂取量はさまざまな機能性が報告されている大豆を含む豆類の約2倍となっており、摂取量の面からでもその重要性は際立っている(図1)。し

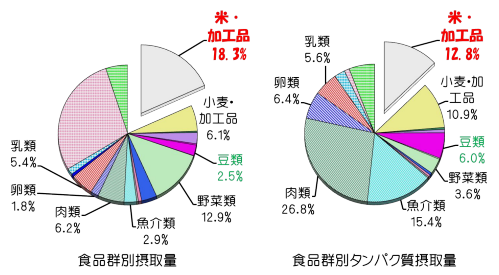


図1 日本人の食品群別摂取量およびタンパク質摂取量(20~29歳)
(平成24年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省)

かし、機能性食品としての認識が高い大豆タンパク質と比較して、米のタンパク質の機能性についての報告は、原料供給の問題などから非常に限られてきた。近年になりこの原料供給の問題が解決され、機能性研究を行うことが可能となり、申請者らのグループは、米胚乳タンパク質(REP)の脂質代謝改善作用(Yang *et al.*, 2007)や糖尿病性腎症の進行遅延効果(Kubota *et al.*, 2013)などを報告してきた。さらなる新規機能性を探索する過程で、申請者らのグループがDNAマイクロアレイ解析を用いて小腸の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、免疫系に関する遺伝子が数多く発現変動していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、REP 摂取が小腸の遺伝子発現および免疫系に与える影響について明らかにすることを目的とした。予備的な検討から、細胞性免疫に関係する遺伝子の活性化の可能性が示されたことから、特に免疫系では細胞性免疫と液性免疫のバランスに与える影響に注目して検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) Lewis ラットを用いた検討

供試動物として、細胞性免疫が強い Lewis 系雄ラット(日本エスエルシー(株))を用いた。週齢は小腸の発達が十分ではない離乳直後の3週齢とし、対照群として免疫系に対する有益な効果が報告されていない卵白タンパク質(OVA)群、試験群として REP 群を設定し、それぞれのタンパク質を用いて調製した飼料(粗タンパク質(CP)含量 20%)を3または4週間摂取させた。なお OVA(CP 80.0%)は日本クレア社製のものを使用し、REP(CP > 85%)は亀田製菓株式会社より提供されたものを使用した。

小腸遺伝子発現に与える影響

試験終了時(3週間)に、生体における最も重要な免疫器官の1つである小腸を部位(十二指腸、空腸、回腸)ごとに回収し、DNA マイクロアレイに供し、小腸の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。なお DNA マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の RatGenome 230 2.0 array を用いて行い、REP 群の遺伝子発現は OVA 群のすべての遺伝子発現を 1.0 とした時の相対値で示し、1.5 倍以上の発現変動がみられた遺伝子群について、Ingenuity pathway analysis (IPA) や Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)などのデータベースを用いてより詳細な解析を行った。

血漿中 Th1/Th2 バランスに与える影響

試験終了直前(3週目)にラットの尾静脈より血液を採取し、血漿中の I 型ヘルパー T(Th1)細胞/II 型ヘルパー T(Th2)細胞比に与える影響を、血漿中免疫グロブリン(Ig) G2a (Th1 細胞側)および IgG1 (Th2 細胞側)濃度を ELISA 法により測定することで評価した。IgG2a および IgG1 の濃度は、Rat IgG1 ELISA quantitation set および Rat IgG2a ELISA quantitation set (Betyl Laboratories, Inc.)を使用して、450 nm における吸光度を測定して算出した。

脾臓中 Th1、Th2 細胞存在割合に与える影響

試験終了時(4週目)に小腸と並んで重要な免疫器官である脾臓を回収し、脾臓中の Th1 細胞および Th2 細胞の存在割合を、フローサイトメトリーを用いて検出した。試験終了後に回収した脾臓から脾臓細胞を調製し、T 細胞を活性化するために抗 CD3 抗体 (BD Pharmingen) および抗 CD28 抗体 (BioLegend) で 36 時間処理(5% CO₂, 37 °C)した。その後、脾臓細胞を Alexa Flour®647 anti-rat CD3 抗体 (BioLegend)、PE/Cy7 anti-rat CD4 抗体 (BioLegend)、FITC anti-T-bet 抗体 (BioLegend)、PE mouse anti-GATA3 抗体 (BD Pharmingen) を用いて処理し、フローサイトメトリーに供した。なお本研究では、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体および抗 T-bet 抗体の3種類の抗体で検出された細胞を Th1 細胞、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体および抗 GATA3 抗体の3種類の抗体で検出された細胞を Th2 細胞とした。

(2) Brown Norway (BN) ラットを用いた検討

供試動物として液性免疫が強い雄性 BN ラット(日本エスエルシー(株))を用いた。その他の条件は(1)と同様に行い、試験期間は 3 週間とした。

小腸遺伝子発現に与える影響

(1)- の検討から、遺伝子発現変動は空腸で最も顕著であったため、(2)- では空腸のみを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。それ以外の条件はすべて(1)- と同様に行

った。

血中 Th1/Th2 バランスに与える影響
(1)- 同様に行った。

(3)統計解析

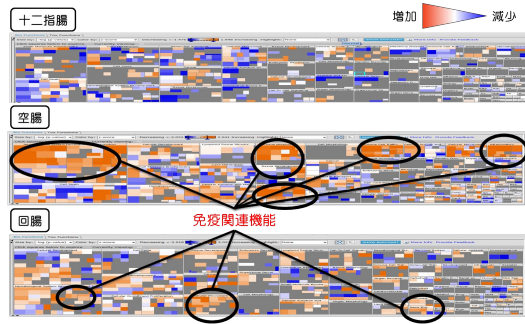
データは平均値±SEM で示し、2 群間の有意差の判定は *t* 検定を用いて行った。

4. 研究成果

(1) Lewis ラットを用いた検討

小腸遺伝子発現に与える影響

OVA 群の全ての遺伝子発現を 1.0 とした時に、REP 群で 1.5 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子は、十二指腸で 600 個、空腸で 1291 個、回腸で 531 個であった。同様に 1.5 倍以上の発現下降がみられた遺伝子はそれぞれ 1326 個、1108 個、1113 個であった。これら遺伝子群を IPA を用いて機能分類したところ、図 2 のような結果が得られた。特に空腸で発



OVA群の全遺伝子発現を1.0とした時に、REP群で1.5倍以上の発現増減がみられた遺伝子群をIPAを用いて機能分類した。○は発現変動がみられた免疫関連機能
図2 米胚乳タンパク質摂取により発現変動した小腸遺伝子群の機能分類

現増加した機能(オレンジ色)が極めて多く、REP 摂取の影響が大きく表れていることが推察された。また発現変動した機能の中で、黒丸で囲われた箇所は免疫に関係する機能を示しており、REP 摂取が小腸の免疫系に大きく影響を与えていることが推察された。変動が、みられた空腸の免疫系に関する機能を図 3 に示した。免疫担当細胞の量や活性化、遊

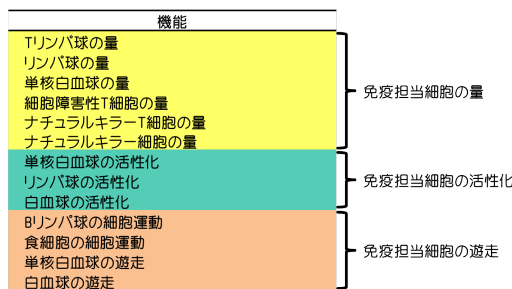


図3 米胚乳タンパク質摂取により遺伝子発現が上昇した免疫機能走などの機能に関する遺伝子群が上昇している可能性が示され、特に細胞障害性T細胞(CTL)、ナチュラルキラー(NK)細胞、NKT細胞など細胞性免疫に関わる細胞の量に関する遺伝子群の発現が増加している可能性が示された。

また個別に遺伝子の発現を解析していくと、CTL の細胞表面に存在している CD8a

molecule (*Cd8*)が REP 群の空腸で 2.0 倍以上に発現上昇しており、ナイーブT細胞からTh1細胞への分化を誘導するサイトカインであるインターロイキン(IL)-12 の遺伝子発現も倍率こそ大きくないものの、1.2 倍以上の発現上昇がみられた。さらに IL-12 のシグナリングに重要な signal transducer and activator of transcription 4 (*Stat4*)の遺伝子発現も 2.0 倍以上の発現上昇がみられ、Th1 細胞への分化が REP 群で誘導されている可能性が推察された。

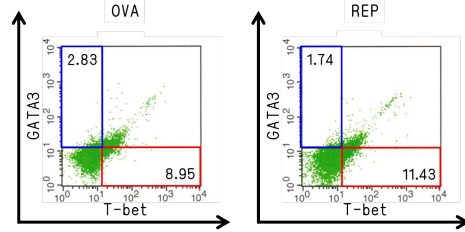
以上のマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果より、REP が細胞性免疫を活性化する機能を有していることが期待された。そこで次に REP 摂取が血漿中、脾臓中の Th1/Th2 バランスに与える影響を検討することとした。

血漿中 Th1/Th2 バランスに与える影響

血漿中の IgG2a および IgG1 濃度は 2 群間で有意な変動はみられなかったものの、OVA 群と比較して REP 群において、IgG2a (Th1 細胞側)は高くなる傾向がみられ、IgG1 (Th2 細胞側)は低くなる傾向がみられた。これら血漿中の濃度を元に Th1/Th2 比を算出すると、REP 群で OVA 群と比較して有意に高値($P < 0.05$)を示すことが明らかとなった。以上の結果より、REP 摂取は血漿中の Th1/Th2 バランスを有意に Th1 細胞側へ偏向させることが明らかとなった。さらに脾臓中の Th1、Th2 細胞の存在比に与える影響を、フローサイトメトリーを用いて検討することとした。

脾臓中 Th1、Th2 細胞存在割合に与える影響

フローサイトメトリーの結果より、脾臓中の Th1/Th2 バランスの有意な変動はみられなかったものの、REP 群で OVA 群と比較して Th1/Th2 比が高くなる傾向がみられた。また、GATA3 陽性細胞(Th2 細胞)は有意な変動はみられなかったものの、REP 群でその存在割合が減少する傾向がみられ、T-bet 陽性細胞(Th1 細胞)の存在割合は OVA 群と比較して、REP 群で有意に高値を示した($P < 0.05$)。図 4 にそれぞれの群の代表的な個体のフローサイトメトリーの結果を示した。以上の結果よ



□、CD3⁺CD4⁺T-bet⁺細胞(Th1細胞); □、CD3⁺CD4⁺GATA3⁺細胞(Th2細胞); OVA、オパールブミン群; REP、米胚乳タンパク質群。図中の数値は存在割合(%)。

図4 米胚乳タンパク質摂取が脾臓中Th1、Th2細胞存在比に与える影響

り、REP 摂取は脾臓中の Th1 細胞の存在割合を有意に上昇させることが明らかとなった。

これまで細胞性免疫が強い Lewis ラットを用いて、REP の Th1/Th2 バランスの Th1 細胞側への偏向作用を明らかにしてきた。次に液性免疫の強い BN ラットを用いて、異なる Th1/Th2 バランスを持つラットにおいても REP が Th1/Th2 バランスの Th1 細胞側への偏向作用を有しているかを検討することとした。

(2) Brown Norway (BN)ラットを用いた検討
小腸遺伝子発現に与える影響

(1)- の結果より、マイクロアレイ解析は最も変動が激しかった空腸でのみ行った。OVA 群の遺伝子発現 1.0 とした時に REP 群で 1.5 倍以上の発現増減がみられた遺伝子数は、それぞれ 1093 個、426 個であった。これら発現変動がみられた遺伝子群について KEGG を用いて機能分類すると、免疫機能に分類される遺伝子が最も多く、77 個(増加 59 個、減少 18 個)の遺伝子で発現変動がみられた。

個別の遺伝子の発現変動を解析した結果、NK 細胞のシグナル伝達および IgA 分泌に関連する複数の遺伝子で発現変動がみられた。図 5 に、NK 細胞のシグナル伝達に係る遺伝

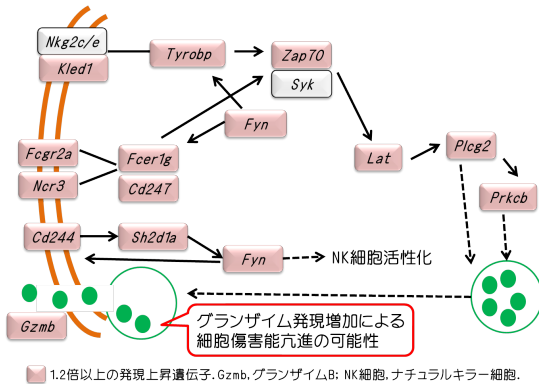


図5 米胚乳タンパク質摂取がNK細胞に与える影響

子群の変動を示した。NK 細胞活性化受容体として知られている natural cytotoxicity triggering receptor 3 (Ncr3) やそのシグナル伝達に係る Cd247, Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide (Fcer1g) などの遺伝子の発現が 1.2 倍以上に増加しており、NK 細胞が活性化している可能性が推察された。また、NK 細胞における細胞障害活性の主役の 1 つである グランザイム B (Gzmb) の遺伝子発現も 1.2 倍以上に増加しており、REP 摂取により NK 細胞の細胞障害活性が増強されている可能性が期待された。

図 6 に IgA 分泌に係る遺伝子群の発現変動を示した。腸管を含む粘膜面における免疫に重要な役割を果たしているのが IgA であり、この IgA は病原微生物などと結合することで粘膜面への付着および粘膜面からの侵入を防止する機能を有している。B 細胞の増加に重要である chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4) や、B 細胞表面の抗原である Cd79b、Cd45 などの遺伝子発現が 1.5 倍以上に増加していた。以上のマイクロアレイ

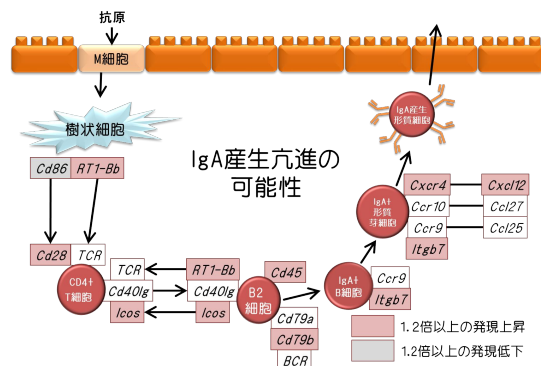


図6 米胚乳タンパク質摂取がIgA産生に与える影響

解析の結果より、REP は B 細胞の発達、シグナル伝達を活性化させ IgA 産生を誘導している可能性が推察された。

これら REP 摂取による NK 細胞の活性化や IgA 産生亢進作用は、遺伝子発現レベルでの結果であり、今後の課題として NK 細胞の細胞障害活性の測定や糞中 IgA 量の測定を行い、その機能を直接的に検証する必要がある。

血漿中 Th1/Th2 バランスに与える影響

BN ラット中の IgG1 濃度は Lewis ラットと比較して、約 2 倍以上という非常に高い値を示し、液性免疫が強いという系統の特徴を反映していることが確認された。また 2 群間の血漿中 IgG2a および IgG1 濃度は、OVA 群と比較して REP 群でそれぞれ有意に高値を示した ($P < 0.05$) が、IgG2a の変動がより顕著であった。また、血漿中の Th1/Th2 は IgG2a の変動幅が大きいこともあり、OVA 群と比較して REP 群で有意に高値を示した ($P < 0.05$)。以上の結果より、REP 摂取は液性免疫が強い BN ラットにおいても、血漿中 Th1/Th2 バランスを Th1 細胞側に偏向する機能を有していることが明らかとなった。

本研究により、REP が腸管の免疫関連遺伝子発現に影響を与える可能性が示され、血漿中の Th1/Th2 バランスを Th1 細胞側に偏向させる機能を有していることが明らかとなった。特に免疫機能を Th1 細胞側に偏向させる機能は、近年患者数の増加が問題となっている食品アレルギーに対する有益な機能として期待される。ヒトの胎児は Th1 細胞が抑制され Th2 細胞が優位な状態であり、出生後多くの菌に晒されることで、Th1 細胞優位にバランスが変動していく。しかし、近年の衛生状況の改善が Th2 細胞優位の免疫状態を作り出してしまい、これがアレルギー患者増加の原因の 1 つとなっていると考えられている(衛生仮説)。本研究は離乳直後のラットを用いており、離乳直後の食事として積極的に米タンパク質を摂取することで、Th1 細胞を活性化し Th1/Th2 バランスを改善することができ、アレルギー体質の改善に寄与することが期待される。しかし、本研究ではアレルギー感作モデルなどアレルギーに焦点を当てた検討は行っておらず、今後の課題としてアレルギーに焦点を当てた直接的な検討が必要

になると考えられる。

また一方で、アレルギー発症に関して衛生環境とTh1/Th2バランスのみで説明することが困難な疫学調査結果も報告されるようになり、Th1、Th2細胞の過剰な活性化を抑える制御性T細胞などTh1、Th2細胞以外の作用メカニズムにも注目が集まるようになってきている。今後はこのような細胞に対するREP摂取の影響を検討し、さまざまな面からアレルギーに対する有効性を評価していく必要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2件)

Kubota M, Saito Y, Masumura T, 他3名(6名中1番目), In vivo digestibility of rice prolamin/protein body-I particle is decreased by cooking, *J Nutr Sci Vitaminol*, 60, 300-304, 2014, 査読有.

Kubota M, Watanabe R, Kabasawa H, 他5名(8名中1番目), Rice protein ameliorates progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high sucrose feeding, *Br J Nutr*, 110, 1211-1219, 2013, 査読有.

[学会発表](計3件)

Kamada T, Terao S, Kubota M, *et al.*, Effect of rice endosperm protein on systemic and intestinal immunity, 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May, 14-18, 2015.

寺尾怜史、久保田真敏、関口操、他、米胚乳タンパク質摂取がBrown Norwayラットの腸管および全身性免疫に与える影響、第68回日本栄養・食糧学会大会、酪農学園大学、2014年5月30日~6月1日。

寺尾怜史、久保田真敏、大谷元、他、米タンパク質摂取がLewisラットの腸管免疫に与える影響、第67回日本栄養・食糧学会大会、名古屋大学、2013年5月24日~26日。

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保田 真敏 (Kubota Masatoshi)

新潟大学 研究推進機構 超域学術院 助教

研究者番号：00595879