

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750044

研究課題名(和文) 日常食成分としてのグリセロリン脂質による免疫調節ネットワークの解明

研究課題名(英文) Effects of dietary glycerophospholipids on immune systems

研究代表者

稲福 征志 (INAFUKU, Masashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力研究員

研究者番号：90457458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫刺激物質を投与した際に上昇するマウスの血中炎症性サイトカインレベルは、食餌性グリセロリン脂質の影響を大きく受けていた。ホスファチジルコリンまたはホスファチジルイノシトールの摂取は炎症を抑制する方向に働くが、ホスファチジルセリンの摂取は炎症を亢進させており、インターフェロン(IFN γ)レベルの変動が顕著であった。ホスファチジルイノシトール摂取によって脾臓のT細胞数が変動しており、更にはConA刺激によるT細胞活性に変動が生じていた。それらのT細胞においては、細胞外刺激に対する活性化能は鈍化していたが、細胞内刺激に対する活性化能は変化していなかった。

研究成果の概要(英文)：Dietary glycerophospholipids affected on the increase in serum inflammatory cytokine levels of mice treated with immunostimulants. Dietary phosphatidylcholine or phosphatidylinositol inhibited these increases, whereas phosphatidylserine enhanced. Among the inflammatory cytokines, interferon-gamma levels were significantly affected by dietary phospholipids. Dietary phosphatidylinositol significantly increased the number of splenic T lymphocytes, but decreased that interferon-gamma producing T-cells. In splenic T lymphocytes of mice fed phosphatidylinositol, significant alleviation of interferon-gamma producing ability were shown when extracellular but not intracellular activation.

研究分野：脂質応用学、食品機能学

キーワード：グリセロリン脂質 食事 免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫と栄養

身体にとって非自己なる異物を排除するために「免疫」と呼ばれる防御機構が発達してきた。一般的に免疫は相反関係にある「細胞性免疫」と「液性免疫」のバランスによって調整されており、それらのバランス調整にはヘルパーT細胞が産出するサイトカインが重要な役割を果たしていることが知られている。サイトカインの産出パターンから、ヘルパーT (Th) 細胞は大きく1型 Th (Th1) 細胞と2型 Th (Th2) 細胞に分けられ、Th1細胞は細胞性免疫を、Th2細胞は液性免疫を促進する。これらのTh1/Th2バランス(図1参照)は栄養状態によって大きく影響を受けること、すなわち免疫と栄養が密接な関係にあることが明らかとなっている。三大栄養素を中心とした各種栄養素の十分な摂取が生体の正常活動と構造維持に必須であるが、これら栄養素の摂取が不十分であると免疫能は低下する。一方、ある種の栄養素は、生理的な必要量以上を摂取すると従来認識されている働きを超えた機能として、免疫調節能を示すことが知られている。しかしながら、それらの機能は一様ではなく、アミノ酸(グルタミンやアルギニン)や脂肪酸(n-3系とn-6系)などのように、各栄養素の免疫調節能を理解することは、栄養学の発展においても非常に重要である。現在の医療現場では術後患者の臨床的転帰を改善する目的で免疫能を賦活化または調整する栄養素を強化した栄養剤を利用した新規栄養療法『Immunonutrition』[Immune(免疫)とNutrition(栄養)を掛け合せた造語]が導入されており、このことから「免疫」における「栄養」の重要性が高いことは容易に予想でき、我々の日常生活における「食」が「免疫」に及ぼす影響について理解を深める重要度は増す一方である。

(2) リン脂質の栄養生理作用

生体膜の構成成分であるリン脂質は、その特性を生かして乳化や分散の目的などで食品添加剤としても幅広く使用されている。我々ヒトが摂取する食事性脂質の主たるものは中性脂質(TG)であるが、3~8%はリン脂質であるとされており、主要な食事リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)の1日あたりの摂取量は2~8gであると算出されている。そのためリン脂質の栄養生理機能を理解するために多くの研究がなされており、その作用はTGとは異なり、かつTGよりも有益な栄養生理作用を示すことが明らかにされている。それらの報告の殆どはレシチンまたはPCを用いたものである。

(3) リン脂質と免疫

1980年代より *in vitro* でのグリセロリン脂質処理は免疫細胞の機能を変動させ、その機

能変動の様相はリセロリン脂質種によって異なることが明らかにされている。それらの研究結果を受けて、必然的に食成分が直接接触する腸管の免疫に対する食事性リセロリン脂質の影響に注目は集まり、PC摂取が腸管の炎症進展を抑制することが報告されている。更に近年では、リセロリン脂質摂取が腸管以外の免疫動態にも影響を及ぼすことが報告されており、PC摂取はマクロファージ活性化の抑制、リウマチの抑制、胸膜炎の抑制、および喘息の悪化を示すことが確認されている。これらの結果はPC摂取によって全身の免疫動態がTh2優位(=Th1が抑制された)状態に変動したことを示唆するものであり、日常食成分としてのリン脂質の免疫調節能を理解する重要性を更に示したものである。

2. 研究の目的

PCが免疫動態を変動させる栄養生理機能を有していることは疑う余地がない。しかしながら、その分子機構に関する研究は皆無であり、PC以外のリン脂質が免疫動態に与える影響についての情報は非常に少ない。主要な食事リン脂質はPCやホスファチジルエタノールアミン(PE)であるが、ホスファチジリノシトール(PI)やホスファチジルセリン(PS)の比較的マイナーなグリセロリン脂質の機能性を理解することも重要であり、事実、大豆由来のPIまたはPI・PS混合物は、大豆由来のTGとは異なる栄養生理作用(抗肥満活性作用)を示すことが報告されている。従って、摂取するリセロリン脂質の基本構造によって齎される免疫調節能についての理解を深めるべく、大豆由来のリセロリン脂質による免疫調節ネットワークの基盤で機能する免疫細胞種の同定とそのメカニズムの明確化を試みる。

3. 研究の方法

当該申請研究においては、大豆由来のPC(日油株式会社製)PI(旭化成ファーマ製)PS(カーギル製)を用いた。上記Gly-PLsを1%混合したAIN-93G食餌にて飼育したC57BL/6マウスを用いて研究を遂行した。なお、対照群には大豆油(TG)を与えた。

各実験群のマウスに免疫刺激物質を投与して、血中サイトカインレベルの変動を比較する。また、各マウスの脾臓、肝臓、腹腔内より免疫担当細胞を回収して、細胞表面発現マーカー【Th細胞(CD3+CD4+)、細胞傷害性T細胞(CD3+CD8+)、B細胞(CD45R+)、ナチュラルキラー(NK)細胞(NK1.1+CD3-)、NKT細胞(NK1.1+CD3+)、M(CD11b+F4/80+)、樹状細胞(DC、CD11c+およびCD123+)】にて、各細胞群をセルソーターにて回収する。その後、様々な免疫刺激物質で処理した後のサイトカインタンパク

質の発現変動を比較した。

4. 研究成果

各リン脂質を摂取したマウスにリポポリサッカライド (LPS) を投与して 6 時間後の血中サイトカインレベルを測定した。LPS 投与によって血中のインターロイキン(IL)-6、-10、-12、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 レベルは全て上昇する (図 1)。PC を摂取したマウスの IL-12 と IFN- γ レベルの上昇は、TG 摂取群と比較しても有意に抑制されており、同様の結果が PI を摂取したマウスでも認められた。一方で、PS 摂取したマウスの IL-12 レベル上昇は抑制されていたが、IL-10 レベルの上昇は亢進していた。

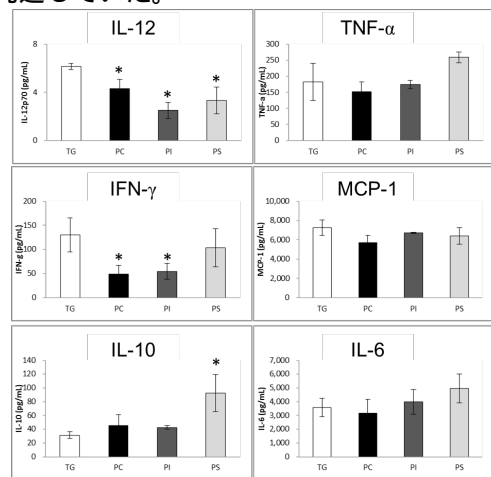


図1 リポポリサッカライド投与による血中サイトカインレベルの上昇

各リン脂質を摂取したマウスにコンカナバリン A (ConA) を投与して 8 時間後の血中サイトカインレベルを測定した。ConA 投与によって血中の IL-6、-10、-12、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 レベルは全て上昇する (図 2)。PC 摂取によって IFN- γ 、MCP-1、IL-6 の上昇は有意に抑制されていた。PI 摂取によっては IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、MCP-1、IL-6 の上昇が有意に抑制されていた。一方、PS 摂取マウスにおいては、LPS 投与時と同様に、IL-10 レベルの上昇が亢進していた。

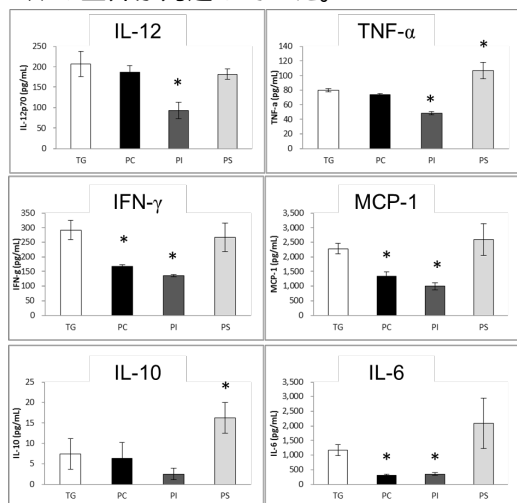


図2 コンカナバリンA投与による血中サイトカインレベルの上昇

リン脂質摂取によって、免疫刺激物質投与による血中サイトカインレベルの上昇に差が生じることが確認できた。それらの結果は、グリセロリン脂質摂取によって免疫担当細胞の機能変動が生じる可能性を示しており、更には、それらの影響はリン脂質種によって異なる可能性が示された。

次に、リン脂質摂取による免疫細胞機能変動を証明するために、リン脂質摂取させたマウスの脾臓より単離した免疫担当細胞を免疫刺激物質で処理して、そのサイトカイン産生能を調べた。その結果として、in vivo 試験時と同様に、グリセロリン脂質摂取によって脾臓由来免疫細胞のサイトカイン産生能が変動しており、更には脂質種によってその影響が異なることが明らかとなった (図 3)。

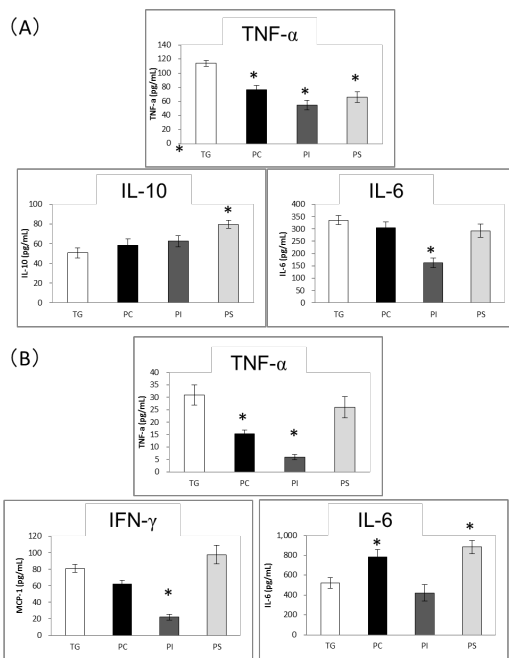


図3 リポポリサッカライド暴露(A)とコンカナバリンA暴露(B)による脾臓免疫細胞のサイトカイン放出

上記の研究において、PI 摂取群のサイトカインプロファイルが同様の変動を示した。その中でも IFN- γ レベルについては、免疫刺激物質による上昇が PI 摂取によって抑制されていた。IFN- γ は主として T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞より産出されるサイトカインである。PI 摂取したマウスの脾臓免疫細胞群における上記細胞について解析すると、T 細胞数 (CD4+および CD8+ とともに) が減少していることが確認されたことから (図 4) T 細胞のみを活性化させる ConA を用いて、T 細胞の IFN- γ 産生能について解析を行なった。

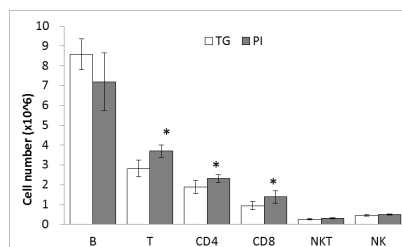


図4 PI摂取による脾臓免疫細胞数の変動

脾臓由来 T 細胞における IFN- γ 産生細胞の割合および IFN- γ 産生能について Intracellular flow cytometry で解析したところ、PI 摂取群の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両方において、IFN- γ 産生細胞率は対照群よりも有意に低い値を示したが、それら一細胞あたりの IFN- γ 産生能は同等であった(図 5)。

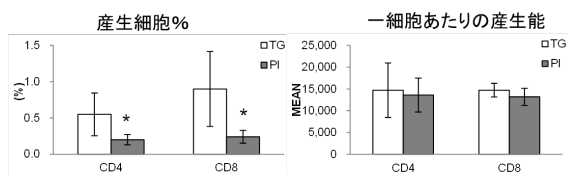


図5 コンカナバリンA刺激による脾臓T細胞のIFN- γ 産生

それらの T 細胞に対して、追加にて抗原提示細胞からの直接的な T 細胞活性化を模倣する CD3/CD28 共刺激を行った。その結果として、PI 摂取群の T 細胞 IFN- γ 産生細胞率は有意に低いままであり、一細胞あたりの IFN- γ 産生能の有意に低下していた(図 6)。次に、抗原提示細胞からの刺激による T 細胞活性化に参与する細胞内シグナルを活性化したところ(PMA によるプロテインキナーゼ活性化と Ionomycin による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇)PI 摂取による T 細胞の IFN- γ 産生機能は対照群と同等であった(図 6)。

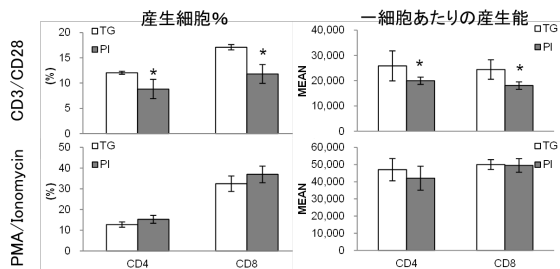


図6 コンカナバリンA刺激T細胞への追加刺激による機能変動

以上の結果は、PI 摂取したマウスの脾臓 T 細胞の炎症性サイトカイン IFN- γ の産生能は、細胞外刺激に対しては鈍化するが、細胞内刺激に対しては変化しないことを示している。従って、食餌性リン脂質は T 細胞の外部から直接的に受ける刺激に対する反応に対して影響を与えていると考えられた。具体的には、細胞膜の性質や細胞膜上の受容体などの構成に変化が生じていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Inafuku, M., Taira, N., Nugara, R.N., and Oku, H. Comparative study of the effect of dietary soybean phospholipids on concanavalin A-induced liver injury in mice. 12th Asian Congress of Nutrition (Kanagawa, Japan), 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲福 征志 (INAFUKU, Masashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力

研究員

研究者番号：90457458