



信州大学農学部 田中 沙智

食品由来機能性成分による免疫調節作用メカニズムに関する研究

はじめに

免疫系が正常に作用するためには、正確かつ迅速な自己・非自己の異物認識、それに続く免疫細胞の活性化や過剰な免疫反応の抑制など、免疫系のバランスを維持することが重要である。我々を取り巻く生活環境には、大気汚染や食生活の乱れ、ストレスなどの体内環境を悪化させる様々な要因が存在し、それらが原因となって免疫バランスを適切に制御できない「免疫バランスの破綻」が起こると言われている。この免疫バランスの破綻の状態が持続・慢性化すると、がんやアレルギー、自己免疫疾患、感染症などの発症につながる事が示唆されている¹⁾。免疫バランスを維持するためには、免疫機能を調節する成分を含む食材を毎日の生活の中で摂取することが簡便、且つ効果的であると考え、私はこれまでに、黒豆の一種である「黒千石」²⁾、キク科の野菜「春菊」³⁾、および信州の伝統野菜の一種である「野沢菜」に免疫機能調節作用があることを明らかにしている。本講演では、野沢菜抽出物による免疫賦活作用とそのメカニズムについて詳細に報告する。

1. 野沢菜抽出物による IFN- γ 産生誘導メカニズム

免疫調節作用を有する農作物のスクリーニングでは、マウス脾臓細胞を用いて試験管培養法により評価し、抗がん、抗感染、抗アレルギー作用において重要なサイトカインである IFN- γ の産生誘導能を指標にした。各種野菜より熱水抽出物を調製し、マウス脾臓細胞に添加して48時間の培養を行った。その後、培養上清中に含まれる IFN- γ 産生レベルを ELISA で測定したところ、信州の伝統野菜の一種である「野沢菜」で IFN- γ 産生誘導能が高いことを見出した(図1A)。次に、野沢菜抽出物の樹状細胞に対する影響を調べるために、骨髓由来樹状細胞 (BMDC) に野沢菜抽出物を添加した時の細胞表面抗原 (MHC クラス I およびクラス II, CD86, CD40) の発現変化を調べた。その結果、野沢菜抽出物の刺激で BMDC は活性化し、細胞表面抗原の発現が増加した。また、このときの IL-12p70 産生レベルを ELISA で測定したところ、無刺激に比べて有意に増加した(図1B)。

加えて、野沢菜抽出物で刺激した脾臓細胞から誘導される IFN- γ 産生は抗 IL-12 抗体の処理により阻害された。さらに、

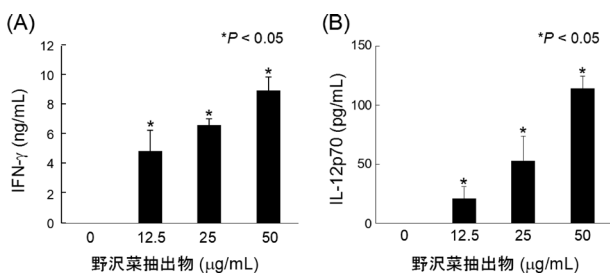


図1. 野沢菜抽出物によるサイトカイン誘導能

野沢菜抽出物の刺激で IFN- γ を産生する細胞を同定するために、抗 IFN- γ 抗体による細胞内染色を行い、IFN- γ 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにて解析した。その結果、IFN- γ 産生細胞は NK1.1 陽性細胞であることが確認された。以上のことから、野沢菜抽出物は樹状細胞からの IL-12 産生を促し、NK 細胞からの IFN- γ 産生を誘導することが示された(図2)。

2. 野沢菜の免疫賦活成分を認識するレセプターの解析

Toll-like receptor (TLR) は、樹状細胞やマクロファージに発現するレセプターで、外来抗原を認識し、その後の免疫応答シグナルを伝達する上で重要な役割を果たしている⁴⁾。野沢菜抽出物中の活性成分の認識における TLR の関与を明らかにするために、抗 TLR2 中和抗体および LPS の共通構造であるリピド A に結合し活性を阻害するポリミキシン B (PB) で処理した時の野沢菜抽出物による IFN- γ 産生を測定した。その結果、コントロールと比較して抗 TLR2 中和抗体および PB の処理で、野沢菜抽出物による IFN- γ 産生が減少した(図3)。

また、C型レクチンレセプター (CLR) は、樹状細胞やマクロファージに発現するレセプターで、カルシウム依存性に糖鎖構造を認識して、炎症性サイトカインの産生を誘導する⁵⁾。野沢菜抽出物に含まれる活性成分の認識における CLR の関与を調べるため、カルシウムのキレート剤である EDTA で脾臓細胞を処理したときの野沢菜抽出物の免疫賦活効果を検討した。

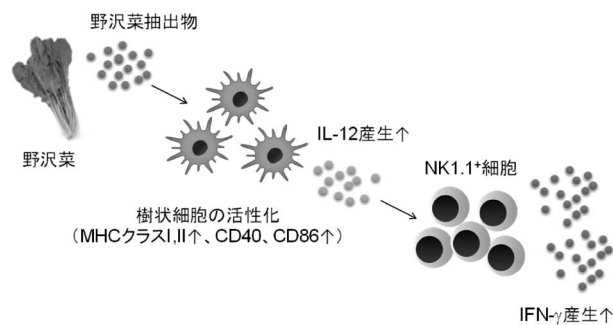


図2. 野沢菜抽出物による IFN- γ 産生誘導メカニズム

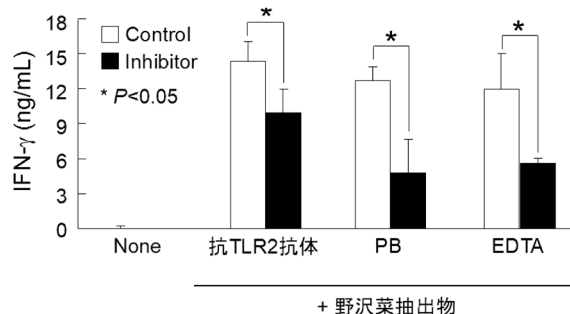


図3. 野沢菜抽出物による IFN- γ 産生に対するレセプター阻害剤添加実験

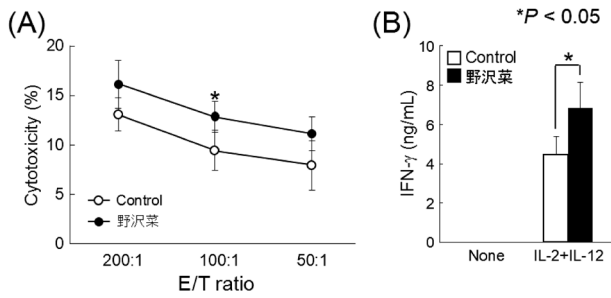


図4. 野沢菜抽出物を摂取させたマウスのNK活性とIFN- γ 産生の増強効果

その結果、コントロールに比べてEDTAで処理した場合、野沢菜抽出物によるIFN- γ 産生は有意に低下した(図3)。以上のことから、野沢菜抽出物に含まれる活性成分はTLR2やTLR4によって認識されること、カルシウム依存性にレセプターと結合することが示された。

さらに、シグナル伝達の阻害剤で処理したときの野沢菜抽出物によるIFN- γ 産生量を測定することで、受容体の下流に存在するシグナル伝達経路を検討したところ、野沢菜抽出物によるIFN- γ 産生誘導は、MAPK、NF- κ B、Sykを介したシグナル伝達経路が関与することが示唆された。

3. 野沢菜抽出物を摂取させたマウスの免疫機能の解析

野沢菜抽出物を摂取させたマウス生体内での免疫機能を評価するために、調製した野沢菜抽出物をC57BL/6マウスに7日間経口投与した。その後、脾臓細胞を単離し、YAC-1細胞をターゲット細胞としてNK活性を測定したところ、野沢菜抽出物を経口投与したマウスはコントロールのマウスに比べてNK活性が有意に増加した。また、マウスの脾臓細胞をIL-2+IL-12で刺激し、IFN- γ 産生量をELISAにて測定したところ、野沢菜抽出物を摂取させたマウスはコントロールマウスに比べて、IL-2+IL-12で刺激した脾臓細胞におけるIFN- γ 産生量が有意に増加した(図4A, B)。

腸内細菌叢に関する研究は、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム技術の開発などにより、ここ数年で飛躍的に発展しており、腸内細菌は整腸作用や免疫調節作用のみならず、がんやメタボリックシンドロームなどの疾病との関連性が報告されている。野沢菜抽出物の摂取による腸内細菌への影響を検証するために、マウスに野沢菜抽出物を経口摂取させ、結腸および盲腸の消化管内容物を採取し、配列特異的SSU rRNA切断法を用いて腸内細菌叢の構成比の変動を解析した。また、腸内細菌による嫌氣的発酵産物としての消化管内容物中短鎖脂肪酸濃度を測定した。その結果、野沢菜抽出物の摂取により、マウス結腸において、日和見菌の一種で酢酸を生成するバクテロイデス門が低下し、酪酸濃度が増加した。このときのマウス脾臓の免疫担当細胞について調べたところ、制御性T細胞の割合が増加する傾向にあった。さらに、脾臓細胞をLPSで刺激した時のIL-10産生は野沢菜抽出物の摂取により増加することが示された⁶⁾。以上のことから、野沢菜抽出物の摂取により、腸

内細菌叢が変動して酪酸濃度が増加し、免疫状態が変化することが示された。

おわりに

野沢菜の抽出物には、樹状細胞からのIL-12産生を介して、NK細胞からのIFN- γ 産生を誘導する免疫賦活効果があることが示された。今後は、免疫調節作用に関与する成分の単離・同定や、アレルギーや感染症などの疾患モデルマウスを用いて生体内での免疫機能制御について検証したいと考えている。さらに、動物実験だけでなくヒト介入試験を実施し、免疫関連疾患に対する予防・改善のメカニズムを詳細に解明することが今後の目標である。食事内容や栄養管理に気をつけることで病気を予防し、健康的な生活を送るための方策を科学的エビデンスに基づいて証明することが私の目指すところである。ヒトの健康に役立つ研究を遂行し、得られた研究成果を社会に還元できるようにしていきたいと考えている。

最後に、この受賞を励みとして、より一層研究に邁進するとともに、農芸化学分野の発展に寄与できる研究成果を上げられるように努力したい。

引用文献

- 1) Pae M, Meydani SN, Wu D. The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis.*, Vol. 3(1), p 91-129, (2012)
- 2) Tanaka S, Koizumi S, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. The extract of Japanese soybean, Kurosengoku activates the production of IL-12 and IFN- γ by DC or NK1.1 (+) cells in a TLR4- and TLR2-dependent manner. *Cell Immunol.*, Vol. 266(2), p 135-142, (2011)
- 3) Tanaka S, Koizumi S, Masuko K, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum coronarium* L. *Int Immunopharmacol.*, Vol. 11(2), p 226-232, (2011)
- 4) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*, Vol. 4(7), 499-511, (2004)
- 5) Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, Vol. 34(5), 651-664, (2011)
- 6) Tanaka S, Yamamoto K, Yamada K, Furuya K, Uyeno Y. Relationship of Enhanced Butyrate Production by Colonic Butyrate-Producing Bacteria to Immunomodulatory Effects in Normal Mice Fed an Insoluble Fraction of *Brassica rapa* L. *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 82(9), 2693-2699, (2016)

謝辞 本研究は、生研センター「革新的技術創造促進事業(異分野融合共同研究)」の支援を受けて行われました。本研究を遂行するにあたり、御助言と御指導を賜りました信州大学農学部の藤井博教授、米倉真一准教授、上野豊助教、北海道大学遺伝子病制御研究所の北村秀光准教授に深謝申し上げます。また、野沢菜を提供していただきました株式会社まるたかの杉山陽司氏に深謝申し上げます。最後に、本研究に関わる実験にご協力いただいた学生諸氏に深く感謝いたします。