

氏名（本籍）	さとう わたる 佐藤 亘（静岡県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 270 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	自然免疫活性化物質による T 細胞ならびに NK 細胞機能の調節作用に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 大野 尚仁 教授 新槇 幸彦 教授 平野 俊彦

論文内容の要旨

緒論

人々は不老長寿を目指し、医療技術や生活様式など様々なものを発展させてきた。一方、高齢になるにつれて免疫力は低下し、様々な疾患を起こす頻度が上昇することから、免疫機能の低下を改善することで、疾患のリスクを軽減できる可能性がある。厚生労働省は、これからの高齢社会を健康で活力あるものにするため、生活習慣病などを予防し、壮年期死亡の減少、健康寿命の延伸等を目標とする 21 世紀における国民健康づくり運動「健康日本 21」を提唱している。

老化により機能が低下する代表的な免疫細胞として、T 細胞と NK 細胞が知られている。胸腺は T 細胞を成熟させるが、老化と共に著しく萎縮するため、T 細胞機能、特に制御機能は徐々に劣化する。また、老化により T 細胞の Programmed cell death 1 (PD-1) の発現が上昇し、これが癌が増加する一因ではないかと考えられている。一方、NK 細胞は、独自に自他を判断する様々な機構を有しており、自己のマーカーである MHC クラス I 分子の発現が消失、または低下したものを非自己として認識し排除する。また、NK 細胞は、活性、抑制に関わる受容体のバランスによりアポトーシスが誘導され機能が制御されている。

老化に伴う免疫機能の低下に対しては、様々な対応策が考えられるが、本研究では食品、特に機能性食品の可能性を探ることとした。近年になり、食品成分は様々な自然免疫活性化物質（病原体関連分子パターン、Pathogen Associated Molecular Patterns: PAMPs）を含有していることが報告されており、これらを介して免疫機能が強化されている可能性がある。本研究では PAMPs として、菌類、酵母、藻類、植物由来の B グルカン、 α マンナン、多糖類などを用い、第一章では T 細胞、第二章では NK 細胞への影響を検討した。

第一章 自然免疫活性化物質による T 細胞機能の修飾に関する検討

自然免疫は、感染の初期段階において重要な防御機構である。自然免疫を担当する細胞は、パターン認識受容体(Pattern Recognition Receptors: PRRs)を介して、PAMPs の特異的な構造を検知する。機能性食品は、菌類、酵母、藻類、植物を含む様々な素材を原料として作り出されている。岩倉ら(Tang C., et al., Cell host microbe, 18, 2015) は、食物として摂取した β グルカンが自然免疫受容体の活性化を介して腸内細菌叢に質的な変化を与え、腸管の免疫応答性を調節している事を明らかにした。食品の機能性、特に免疫系の調節作用について、さらに詳細に解明するために、PAMPs の T 細胞への影響について、脾臓細胞における IFN- γ 産生作用ならびに T 細胞のサブセットへの影響について解析した。PAMPs としては、 β グルカン(菌類、酵母、藻類)、 α マンナン(酵母)、ならびに植物多糖(BWMP)を用いた。

第一節では、オスの DBA/2、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を様々な PAMPs で *in vitro* 刺激しサイトカイン産生パターンを比較検討した。いずれも PAMPs もサイトカイン産生を上昇させたが、BWMP のみが IFN- γ 産生を抑制した。また、この作用は PAMPs 刺激条件下のみならず、未刺激時に産生される IFN- γ 産生のいずれも抑制することを明らかにした。一方、骨髄由来の樹状細胞(BMDC)を様々な PAMPs で刺激したところ、BWMP も TNF- α ならびに IL-6 産生を増強し、免疫促進的に作用した。

第二節では、BWMP による IFN- γ 産生抑制機構について、IFN- γ を主に産生する T 細胞に注目し検討した。BWMP は、オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来の T 細胞を CD3 ϵ 抗体で刺激した際に IFN- γ 産生のみならず、IL-4 産生も抑制した。さらに、BWMP は、T 細胞の増殖を抑制するだけでなく、IL-2 産生も抑制した(Figure 1)。これらのことから、BWMP は T 細胞増殖を抑制するとともに、サイトカイン産生を減少したものと考えられる。以上のことから、食品中に含有されている様々な PAMPs は、T 細胞の増殖ならびにサイトカイン産生に対し、プラスとマイナスの両面から機能を制御している可能性のあることが示唆された。これらのことから食品中の PAMPs は、免疫系の機能維持と増強において有用性を発揮することが期待できる。

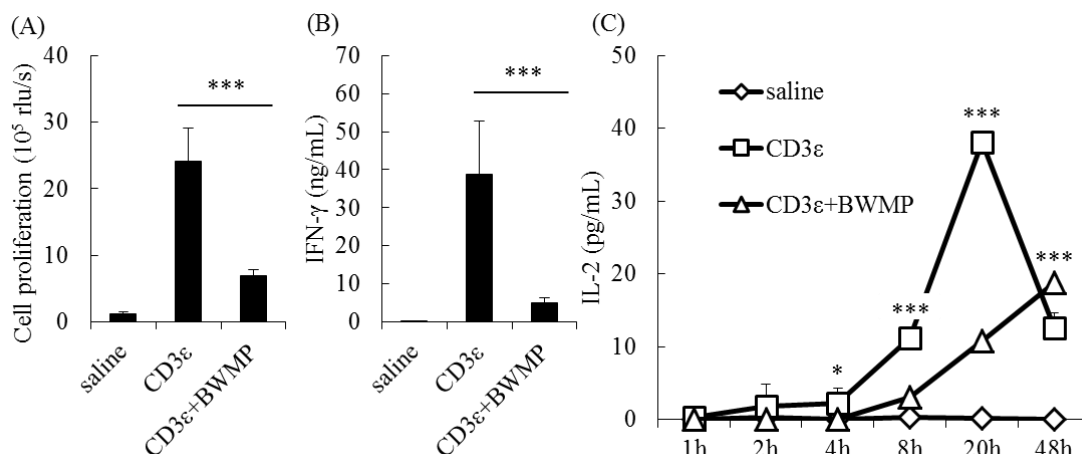


Figure 1. Effect of BWMP on the cell proliferation (A), the IFN- γ production (B), and the IL-2 production (C) on splenic CD3⁺ T-cells.

Effects of BWMP on the cell proliferation (A) and the IFN- γ production (B) by splenic CD3⁺ T-cells from DBA/2 mice. T-cells were stimulated for 48 h with mouse CD3 ϵ antibody in the presence or absence of BWMP. Effects of BWMP on the time course of IL-2 production (C) by splenic CD3⁺ T-cells from DBA/2 mice. T-cells were stimulated for 1, 2, 4, 8, 20, or 48 h with mouse CD3 ϵ antibody in the presence or absence of BWMP. Significant differences, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

第二章 食品由来の自然免疫活性化物質による血管炎の修飾とNK細胞の関連性に関する検討

生体防御機構は、様々な生物に存在する。 β グルカン認識する dectin-1、 α マンナンを認識する dectin-2 の機能は、真菌感染に対する生体防御機構として重要である。 β グルカン、 α マンナンは、自然界に広く存在しており、動物実験で使用している標準的な飼料にも、植物ならびに酵母由来の β グルカンが豊富に含まれている。腸管粘膜には β グルカン認識受容体が発現しており、飼料中の β グルカンが刺激となり、全身の免疫機構に影響を与えることが報告されている。近年、石橋ら(Ishibashi K., et al., 日本医真菌学会誌, **51**, 2010)は様々な動物の血清中に、抗 β グルカン抗体が存在することを見出した。一方、川崎病は幼少時に発症する難治性疾患であり疾患の発症と病状に免疫系の制御機能が関連しているものと考えられている。川崎病の病因究明と治療法の開発のために様々な動物モデルが開発されてきた。CAWSは病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清中に放出される α マンナンであり、マウスに川崎病に類似した血管炎を惹起する。CAWS 血管炎の重症度は系統により異なり、DBA/2 では重篤な致死性の血管炎を惹起する。

NK 細胞は様々な経路により細胞傷害性を発揮する。抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) は Fc 受容体を介した体液性免疫と細胞性免疫が相乗的に働く傷害作用であり、NK 細胞の特徴的な傷害機構である。また、NK 細胞は、抗原提示細胞との細胞間相互作用に基づくサイトカインネットワークにより傷害活性が上昇する。

第一節で種々の材料から得られた PAMPs による NK 細胞の ADCC 機能に与える影響について検討するために、健常人の β グルカンならびに α マンナンに対する特異抗体の力価と交差反応を検討した。その結果、IgG、IgM のいずれのクラスからも β グルカン、 α マンナンに対する特異抗体が見出された。さらに、材料により力価は異なっており、微細構造も認識していることが明らかとなった。これらのことから、 β グルカン、 α マンナンは特異抗体と結合し、Fc 受容体を介して NK 細胞の ADCC 活性を増強する可能性のあることが示唆された。

第二節では、飼料ならびに含有される PAMPs の影響について検討するために、 β グルカン

含量の異なる2種の飼料を用いて、CAWS 血管炎ならびにNK細胞機能への影響について検討した。天然飼料として CE-2 を、β グルカンをほとんど含まない合成飼料として AIN93G を用いた。両飼料で飼育したマウスに CAWS を投与し、血管炎を惹起したところ、AIN93G では CAWS 投与による血管炎が増悪化し、生存日数も短縮した(Figure 2)。また、NK細胞の傷害活性は、CAWS 投与により低下し、さらに AIN93G 摂取群では低下傾向が顕著であった。

以上のことから、β グルカン、α マンナンは特異抗体を介して NK 活性を増強することが示唆された。また、β グルカン含量の少ない飼料により血管炎が増悪化したことから、飼料中の PAMPs は消化管機能の調整において重要な役割を演じている可能性のあることが強く示唆された。

総括

人々は不老長寿を目指し、医療技術や生活様式など様々なものを発展させてきた。高齢になるにつれ、免疫力が低下し疾患が増加するが、本研究では、機能性食品の成分を用いることで、免疫機能を調節し、高齢化による疾患のリスクを減少することができるのか検討した。本研究結果から、β グルカン、α マンナンが免疫力を上昇させるだけでなく、植物多糖の BWMP のように、T 細胞にも働き IFN-γ 産生を抑制するなど、免疫機構を様々な角度から調整する PAMPs が存在することが明らかとなった。さらに、飼料中の β グルカンが、心疾患モデルにおいて免疫力を調整し、疾患の進行を抑制している可能性のあることが示唆された。また、β グルカン、α マンナンは、抗体を介した ADCC ならびに自然免疫系の活性化を介して NK 細胞機能を高進している可能性のあることが示唆された。これらのことから、食品中には様々な PAMPs が含まれ、日々の食事の質が免疫機能に影響を強く与えている可能性のあることが示唆された。

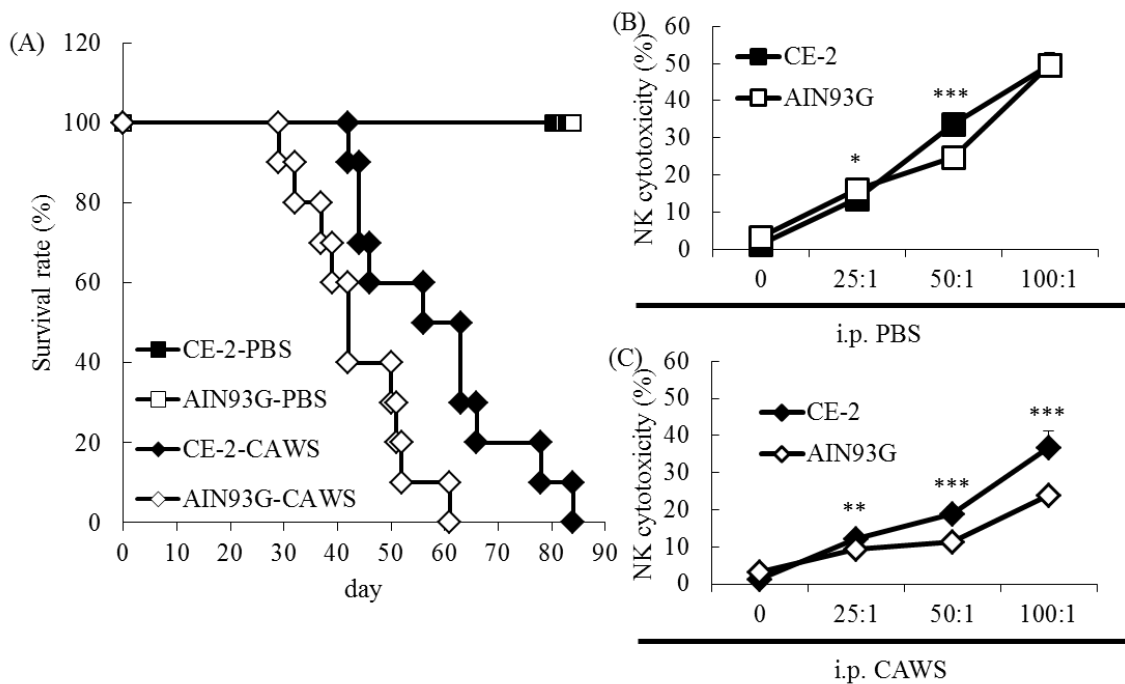


Figure 2. Effect of the feeding on the survival and the NK cell activity on CAWS vasculitis.

(A) Survival rate following i.p. PBS or CAWS-induced vasculitis from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G. NK cytotoxicity in splenocytes from DBA/2 mice on 28day splenocytes by feeding of CE-2 or AIN93G. NK cell activity was measured by incubating 24 h with target cells. (B) i.p. PBS or (C) i.p. CAWS. Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

論文審査の結果の要旨

免疫機能は年齢と共に低下し、感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍など様々な疾病を引き起こすことから、超高齢社会においては、免疫機能の維持・増強を目指した物質の開発が求められている。老化により機能低下する代表的な免疫細胞として、T細胞とNK細胞が知られている。食品には様々な自然免疫活性化物質(Pathogen Associated Molecular Patterns : PAMPs)が含まれることから、本研究ではPAMPsによるT細胞(第一章)ならびにNK細胞(第二章)の調節作用について検討した。

第一章「自然免疫活性化物質によるT細胞機能の修飾に関する検討」では、菌類、酵母、藻類、植物などの食品素材から分画・分離した様々なPAMPsを用い、DBA/2ならびにC57BL/6系統のマウスの脾臓細胞を*in vitro*刺激しサイトカイン産生パターンを比較検討した。PAMPsとしては、高分子多糖である、 β グルカン、 α マンナン、並びに笹由来の複合植物多糖(BWMP)などを用いた。その結果、いずれのPAMPsもサイトカイン産生を上昇させたが、BWMPのみがIFN- γ 産生を抑制した。一方、骨髄由来の樹状細胞(BMDC)を様々なPAMPsで刺激したところ、用いたすべてのPAMPsがTNF- α ならびにIL-6産生を増強し、免疫促進的に作用した。そこで、次に、特徴的な活性パターンを示したBWMPによるIFN- γ 産生抑制機構について、T細胞に注目し検討した。その結果、BWMPはDBA/2マウス脾臓T細胞のCD3 ϵ 抗体刺激によるIFN- γ 産生ならびにIL-4産生を抑制した。さらに、BWMPは、T細胞増殖を抑制するとともにIL-2産生を抑制した。以上、本章では、食品中に含有されている様々なPAMPsがT細胞の増殖ならびにサイトカイン産生に対し、プラスとマイナスの両面から機能を制御していることを見出した。これらのことから食品中のPAMPsは、老化に伴う免疫系の機能維持と増強に寄与することが期待される。

第二章「食品由来の自然免疫活性化物質による血管炎の修飾とNK細胞の関連性に関する検討」では、CAWS血管炎モデル動物を用いて飼料と血管炎感受性の関連性を検討するとともに、NK細胞の抗体依存性細胞傷害(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC)作用について検討するために、健常人のPAMPs特異抗体について比較検討した。まず、健常人血清を用い食品由来のPAMPsとして β グルカン、 α マンナン、ならびにBWMPを用いて特異抗体の力価と交差反応を検討したところ、IgG、IgMのいずれのクラスからも特異抗体が検出され、相互の交差性は低く、特異性が高かった。これらのことから、PAMPsは特異抗体、Fc受容体を介してNK細胞のADCC活性を増強する可能性のあることが示唆された。次に、*in vivo*動物モデルを用いてNK細胞機能を評価するため、天然(CE-2)ならびに合成(AIN93G)飼料を用いてマウスを飼育し、CAWS血管炎ならびにNK細胞機能への影響について検討した。AIN93Gは β グルカン制限食として汎用されているものである。その結果、AIN93G群ではCAWS血管炎が増悪化し、生存日数も短縮した。また、NK細胞の傷害活性は、CAWS投与により両飼料群ともに低下し、AIN93G摂取群では低下傾向が顕著であった。こ

これらのことから、飼料中の PAMPs は消化管機能の調整において重要な役割を演じている可能性のあることが強く示唆された。

本研究結果から、食品中に含有される様々な構造の PAMPs は、免疫機構を様々な角度から調整することが明らかとなった。さらに、心疾患動物モデルにおいて飼料中の β グルカンが免疫能を調整し、疾患の進行を抑制している可能性のあることが示唆された。また、PAMPs に対する特異抗体は、ADCC 経路の活性化を介して NK 細胞機能を高進している可能性のあることが示唆された。これらのことから、食品中には様々な PAMPs が含まれ、日々の食事の質が免疫機能の維持と向上に強く影響を与えている可能性のあることが示唆された。

本研究内容は、食品中に含有される自然免疫活性化物質が T 細胞ならびに NK 細胞の活性化を介して免疫系を制御できる可能性を強く示唆しており、博士(薬学)の学位論文として相応しい価値あるものと判断する。