

## 論文要旨

論文題目 南米原産ヒユ科一年草 *Amaranthus hypochondriacus* L.  
(アマランス) の穀粒が免疫系に与える効果とその応答特性

日比壮信

本研究では新しい機能を持つ食品の開発を目指し、これまで栄養学的側面でしか評価されてこなかった南米原産の一年草 *Amaranthus hypochondriacus* L. (アマランス) の穀粒に着目し、その全身および腸管の免疫系に与える作用について、*in vivo* および *in vitro* の両面からの研究を行った。さらに、そこで得られた独特の免疫応答特性に寄与していると考えられる、樹状細胞という免疫刺激能の非常に高い細胞を切り口の一つとして解析し、腸管膜リンパ節樹状細胞の特異なサイトカイン誘導特性と、脾臓樹状細胞の寛容誘導特性についての新たな知見を得ることができた。

第 1 章では、アマランスの免疫系に与える影響を *in vitro* にて解析した。アマランスは未利用資源としても、またその豊富な栄養資源としても、これからのあたらしい食機能開発の有望な候補の一つである。そのアマランスの免疫系に与える影響についての基礎的なデータの収集は、安全性や加工特性などと並んで需要の高い研究テーマであると考えられた。そこで本研究では、オバルブミン (OVA) に対する特異的な T 細胞レセプター (TCR) を高発現するトランスジェニック (Tg) マウス (OVA 23-3) マウスの T 細胞を使い、T 細胞の分化およびイムノグロブリン (Ig) E 産生に与える影響を観察した。実験に使用した OVA 23-3 マウスは抗原特異的 T 細胞を高頻度で発現して

いる。そのため、通常のマウス体内においてあらかじめ抗原による刺激のない状態では、一種類の抗原に反応できる T 細胞の割合が非常に低いため、抗原未感作 T 細胞の応答を観察することが困難であるのに対して、今回使用した OVA 23-3 マウスは T 細胞の大部分が抗原特異的 TCR を発現しているため、抗原未感作 T 細胞の応答や分化の解析が可能である。OVA 23-3 マウスを使うことで、*in vitro* での抗原未感作 T 細胞の分化および、抗原特異的な IgE 産生に対するアマランス抽出物の効果を評価することが可能となった。アマランス穀粒を熱水にて抽出した、アマランス抽出物を培養系に加えることで、インターフェロン (IFN)  $\gamma$  の産生亢進およびヘルパー T (Th) 1 分化誘導が確認された。また、その効果を通じて、IgE 抗体の産生低下も確認された。アマランス穀粒に存在する熱に対して安定な、水溶性の IFN- $\gamma$  増強および IgE 抗体産生抑制効果をもつ成分の存在が示唆された。また、その効果は、CD4<sup>+</sup> T 細胞に直接働くわけではなく、抗原提示細胞を介して働きかけていることが示唆された。そのため、抗原提示細胞の中で最も強力な細胞として知られている、樹状細胞への効果を調べた。その結果、高濃度抗原存在下で樹状細胞からのインターロイキン (IL) -12 産生が高くなるという結果が得られた。この樹状細胞からの IL-12 高産生は T 細胞の IFN- $\gamma$  産生誘導の理由の一つであると考えられた。

第 2 章においては、*in vitro* において示されたアマランス穀粒抽出物の効果が、穀粒そのものを投与することでも起こり得るのかという疑問について検討を加えた。第 1 章で使用した OVA 23-3 マウスは *in vitro* での Th1/Th2 分化を観察することができるとともに、*in vivo* において経口的に OVA を摂取させることで、小腸微絨毛における形態変化、炎症細胞の浸潤、下痢そして血中 IgE 抗体価の上昇などがおこる食物アレルギーモデルマウスとしても期待されている。このマウスを使用して、OVA を経口投与して食物アレルギー症状を誘起し、その際にアマランス穀粒を経口投与することで、アマランスの食物アレルギーに与える効果について評価した。アマランス経口投与により、血中の抗原特異的 IgE 抗体は有意に抑制され、脾臓の IFN- $\gamma$  産生は亢進していることがわかった。アマランスを経口投与した時に活性化 T 細胞やメモリー T 細胞の数に変化はなく、また CD4<sup>+</sup> T 細胞において Th1 特異的な転写因子 T-bet (T-box expressed in T cells) が上昇していることから、アマランス経口投与により、生体内で Th1 細胞が誘導され、IFN- $\gamma$  高産生が誘導されることが示唆された。その効果が IFN- $\gamma$  誘導性の抗原特異的 IgE 抗体の減少という結果につながると考えられた。また、この結果は *in vitro* の結果を良く反映していた。

また、OVA 23-3 マウスへのアマランス経口投与実験で腸管免疫系における特徴的な免疫応答の誘導があることが明らかになった。アマランスを経口投与した時、パイエ

ル板細胞においてはほとんど特異的な免疫応答を惹起しないにも関わらず、腸管膜リンパ節では強い Th1 増強および Th2 抑制というパターンを示した。このことは、アマランスがパイエル板を介さずに、腸管膜リンパ節における強い免疫応答を引き起こしているという、特徴的な機構の存在を示唆した。腸管膜リンパ節は、経口的な抗原の投与による、全身性の寛容すなわち、経口免疫寛容の成立に対して重要な場であると言われていたが、本研究はアマランス穀粒など、免疫応答を修飾する食品成分に対しての、応答の場としても重要であることが示された。

第 3 章では、第 2 章で示された、アマランスが腸管膜リンパ節で強く免疫応答を引き起こしていること、また、第 1 章で示された、アマランス抽出物が樹状細胞に働いて IL-12 産生を誘導しているという結果を受けて、樹状細胞という強い免疫刺激能をもつ細胞を一つの指標として、腸管および脾臓の樹状細胞の T 細胞応答に与える影響について検討した。第 1 節では、アマランス経口投与により Th1 細胞応答が強く誘導された腸管膜リンパ節での Th1/Th2 細胞応答の誘導特性を理解することを目的とした。腸管膜リンパ節と脾臓およびパイエル板からそれぞれ樹状細胞を分離し、それらを抗原提示細胞として、様々な濃度の抗原存在下で培養したときの抗原未感作 T 細胞の 1 次応答について、代表的 Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  および Th2 サイトカイン IL-4 を中心に解析した。従来の研究では GALT に存在する樹状細胞は Th2 応答を誘導し、脾臓は Th1 優位な免疫応答を誘導するとされてきた。しかし、我々の研究により、腸管の樹状細胞も、脾臓の樹状細胞も抗原濃度によって IFN- $\gamma$  および IL-4 どちらのサイトカインの産生を誘導できることが示された。しかし、高度に精製した CD11c<sup>high</sup>/B220<sup>-</sup> の樹状細胞を用いた同様の実験では、腸管膜リンパ節の樹状細胞の IFN- $\gamma$  誘導能が高いことが示唆された。さらに、この IFN- $\gamma$  は腸管膜リンパ節樹状細胞の IL-12 高産生によるものではないかと考えられた。また、腸管膜リンパ節樹状細胞は細胞表面の共刺激分子にも特徴をもつことが明らかとなった。例えば B7-DC という、T 細胞の IFN- $\gamma$  産生および樹状細胞の IL-12 産生を誘導する共刺激分子によるこれらの現象の説明も、可能であると考えられた。

最後に第 2 節では、樹状細胞を利用して、経口投与した抗原が、腸管膜リンパ節だけではなく、脾臓でも抗原特異的な T 細胞寛容を誘導することができるという機構についての研究を行った。経口免疫寛容という現象の発見は 1 世紀程度遡るが、いまだにその成立および維持機序の全ては解明されていない。我々は、経口抗原が脾臓でも抗原提示されていることに注目し、脾臓樹状細胞と抗原特異的 T 細胞をマウスに移入することで、経口抗原を投与されたマウス脾臓樹状細胞の T 細胞寛容に対する役割を調べた。経口抗原を投与したマウス脾臓から分離した樹状細胞は *in vivo* で T 細胞の分

裂を誘導しないにも関わらず、移入 7 日後に脾臓細胞を取り出してきて、T 細胞の抗原特異的増殖応答および IL-2 産生能を測定したところ、それらの応答が抗原特異的に低下していることがわかった。この結果は脾臓樹状細胞が、T 細胞の寛容を誘導できることを示したはじめてのデータである。これにより、経口抗原が腸管膜リンパ節や、パイエル板など腸管だけでなく全身の免疫系を代表している、脾臓においても誘導されている可能性があることを示した。これらの結果は、経口的に摂取した免疫修飾物質や抗原が腸管や脾臓で免疫系の細胞である、樹状細胞や T 細胞に影響を与えていることを強く示唆したといえる。

本研究により、アマランスにおける IFN- $\gamma$ 産生誘導を通じた IgE抑制機構についての輪郭が見え始めた。腸管免疫系の樹状細胞の応答特性や、経口抗原に対する脾臓樹状細胞の寛容誘導能などが明らかになりつつある。これらのモデルを利用することにより、経口的に摂取できる食物由来の成分が、腸管免疫系および全身免疫系を活性化させ、バランスの崩れた生体の恒常性の回復および維持が可能になるかもしれない。食品成分による免疫系の賦活には一つの利点が考えられる。それは、増殖する病原性微生物とは異なり、摂取量をコントロールすることができる点である。また、様々な種類の食品成分を一度にとれることから、その相乗効果などについても期待される。しかし、食品成分の免疫系に与える影響についての研究は始まったばかりであり、今後も更に研究を進めることで、正しい効果のおよび正しい安全性の評価が行われるべきである。それらの研究が進んで初めて、人々の健康に寄与できる食品の開発が可能となると考えられる。