

## 制御性B細胞を誘導する食品因子による炎症抑制効果

戸塚 護

東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

### 緒 言

アレルギー疾患や自己免疫疾患など、免疫機能の異常を原因とする疾患の増加は我が国においても大きな問題となっている。一方、軽度の炎症が持続的に進行する反応である慢性炎症が、生活習慣病、がん、神経変性疾患などの発症基盤となっていることが近年明らかにされつつある。炎症・免疫応答の制御には、免疫系の司令塔とも呼ばれるT細胞とその活性化を制御する樹状細胞が重要な役割を果たしている。我々は、食品による炎症・免疫反応の制御を目的として、免疫応答を抑制する機能をもつ制御性T細胞 (Treg) の分化誘導を促進する活性をもつ植物由来食品成分を *in vitro* CD4<sup>+</sup>T細胞分化誘導系を用いて検索した結果、柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンゲニンにその活性があることを明らかにした<sup>1)</sup>。

T細胞とならぶ、もう一つのリンパ球であるB細胞は、侵入した病原体に対する最終的な攻撃の武器となる抗体を生産することがその主要な働きである。ところが、近年の研究によりB細胞の一部は主に抑制性サイトカインであるインターロイキン10 (IL-10) を産生することにより、過剰な免疫応答を負に制御する機能をもつ制御性B細胞 (Breg) として働くことが明らかにされてきた<sup>2)</sup>。Bregは直接Th1、Th2などのエフェクターT細胞の活性化を抑制する、あるいはTregの分化誘導に

かかわるものと考えられており、*in vitro*で誘導されたBregは動物実験モデルにおいてアレルギーや自己免疫疾患の発症予防効果を示すことも報告されている<sup>3,4)</sup>。また、脂肪組織中にはIL-10を産生するBregが多数存在しており、これが脂肪組織における炎症反応を抑制することでメタボリックシンドローム発症の抑制に寄与していることが報告されている<sup>5)</sup>。やせたマウスと比較して肥満したマウスでは脂肪組織におけるBregの数が減少しており、この現象はヒトにおいても確認されている。

我々は、これまでにBreg誘導活性を有する食品因子の検索を行い、フラボノイドであるKaempferolおよびTamarixetinがBreg誘導活性をもつことを明らかにしている。本研究では、KaempferolおよびTamarixetinに類似した構造をもつフラボノイドのBreg誘導活性を比較検討することで、それらの構造とBreg誘導効果の関連性を検討した。また、Kaempferolを実際に経口投与した際のBreg誘導効果および抗炎症作用を検討した。

### 結 果

#### 1. Breg分化誘導・活性化に影響を与える食品成分の検索

Kaempferol、Tamarixetinおよびそれに類似した構造をもつフラボノイドのBreg誘導効果を検討した。すな

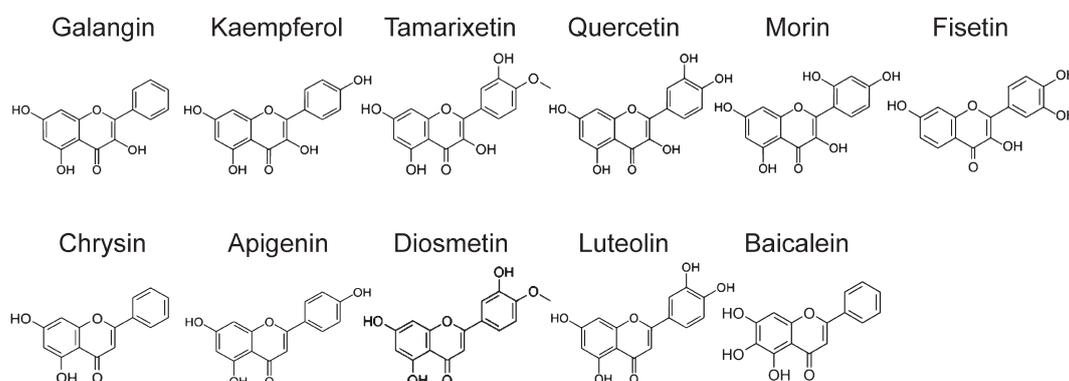


図1 本研究で用いたフラボノイドの構造

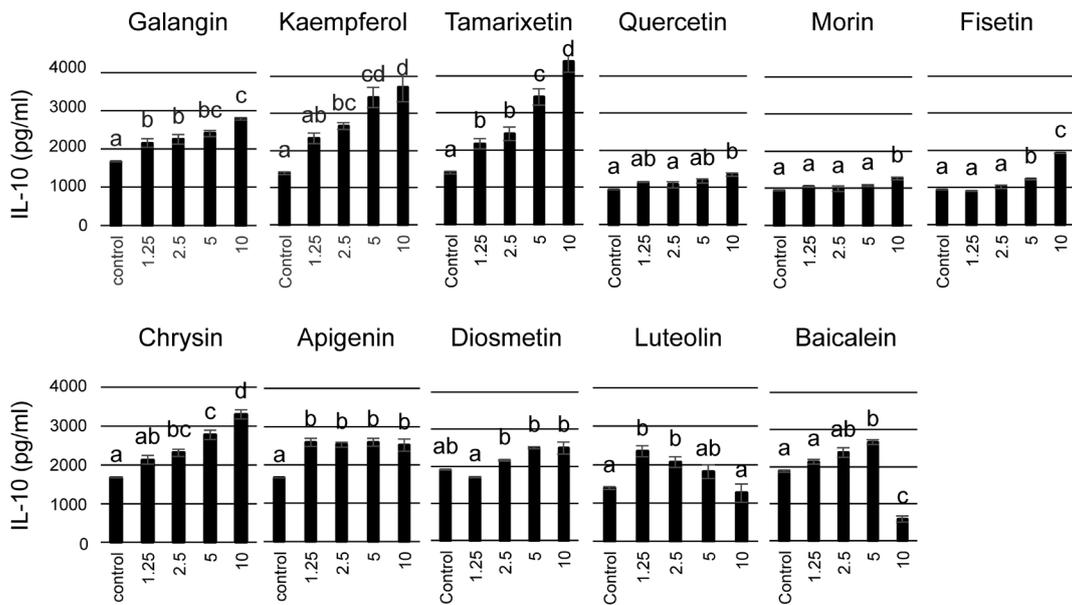


図2 フラボノイドの制御性B細胞誘導活性

C57BL/6マウス脾臓から調製したB細胞を、LPS (10 μg/ml) の存在下、各フラボノイド (1.25~10 μM) を添加して48時間培養し、培養上清中のIL-10量をELISA法で測定した。それぞれデータは平均値±標準誤差 (n=3) で示した。異符号間で有意差 (p<0.05, Tukey法) があることを示す。

わちC57BL/6マウス脾臓から磁気ビーズ法 (MACS法) を用いてB細胞 (B220<sup>+</sup>細胞) を調製し、リポ多糖 (LPS, 10 μg/ml) の存在下、6種類のフラボノール類および5種類のフラボン類 (図1) のうち、いずれかを1.25~10 μMの濃度で添加し、48時間培養した。その培養上清に含まれるIL-10量を酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した。また、フローサイトメトリーにより細胞の生存率、生細胞中のIL-10産生細胞の割合を解析した。

その結果、フラボノール類のKaempferol、Tamarixetin、Galanginおよびフラボン類のChrysinでは、1.25~2.5 μM以上で有意なIL-10産生の増加が認められ、濃度依存的な増加が観察された (図2)。フラボン類のApigeninは、1.25 μMで有意な増加が認められたが、濃度の増加には反応しなかった。これら5つのフラボノイドは10 μMの添加でも細胞生存率に影響は与えなかった (図3)。

QuercetinとMorinはIL-10産生にも、細胞生存率にもほとんど影響を与えなかった。また、Fisetin、Diosmetinは微弱ながらIL-10産生の増加が観察され、10 μM添加時に細胞生存率の低下が認められた。

Baicaleinは5 μMでIL-10産生増加が認められたが、10 μMでは著しく低下した。Luteolinは1.25 μMで増加が認められたが、それ以上の濃度では濃度依存的に産生

生細胞の割合 (%)

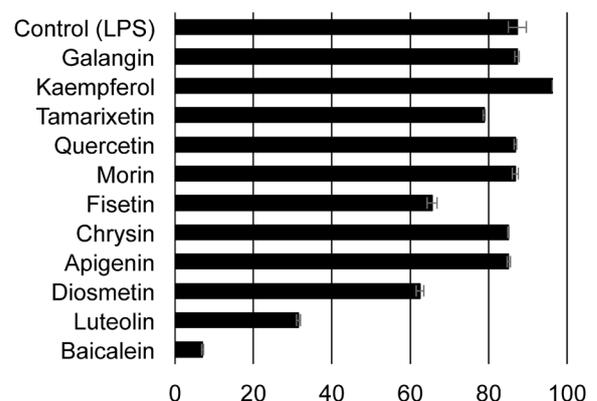


図3 フラボノイドのB細胞に対する細胞毒性

C57BL/6マウス脾臓から調製したB細胞を、LPS (10 μg/ml) の存在下、各フラボノイド (10 μM) を添加して48時間培養した後、フローサイトメトリーにより生細胞と死細胞の比率を解析した。データは細胞生存率 (%) で示した。

量が低下した。この両者は10 μM添加時に細胞生存率の著しい低下が観察され、強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。さらに、2.5~5 μM添加時には、生細胞中のIL-10産生細胞の割合が増加していることも示された (図4)。したがって、これらはBreg誘導効果とB細胞に対する細胞毒性とを併せ持つことが示された。

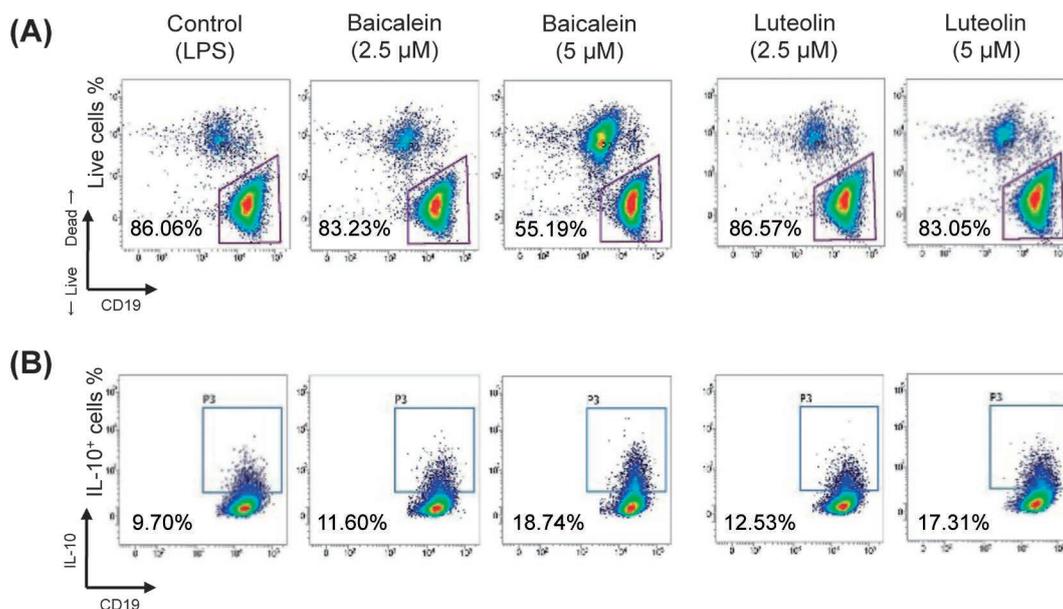


図4 細胞毒性のあるフラボノイドの制御性B細胞誘導活性

C57BL/6マウス脾臓から調製したB細胞を、LPS (10 μg/ml) の存在下、各フラボノイド (2.5および5 μM) を添加して48時間培養し、フローサイトメトリーにより (A) 生細胞と死細胞を分けた後、(B) 生細胞中のIL-10産生細胞の割合を調べた。

## 2. Kaempferolのマウス生体内におけるBreg誘導効果および抗炎症効果

Kaempferolを経口投与したマウス生体内でのBreg誘導活性を検討した。すなわち、KaempferolをC57BL/6マウスに経口ゾンデを用いて1日当たり10 mg/Kg体重で14日間経口投与した後、脾臓細胞および腸間膜リンパ節細胞を調製し、IL-10の細胞内サイトカイン染色によりB細胞中のIL-10産生細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Kaempferolを経口投与したマウスでは、脾臓および腸間膜リンパ節の両方において、IL-10産生Bregの存在比率が上昇していることが明らかとなり (図5)、経口投与したKaempferolが生体内においてもBreg誘導活性を示すことが明らかとなった。

炎症性腸疾患のモデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルを用い、Kaempferolを経口投与した際の抗炎症効果を検討した。すなわち、Kaempferolを上記と同様の方法で22日間C57BL/6マウスに強制経口投与し、最後の8日間に3% DSSを含む飲料水を自由摂取させることにより腸炎を誘発した。体重変化、糞便の状態を観察し、その症状を病態スコア (DAI score) として表した。DSS投与開始の2日後から症状が認められたが、Kaempferol投与群ではPBS投与群と比較して病態スコアが有意に低い値を示し

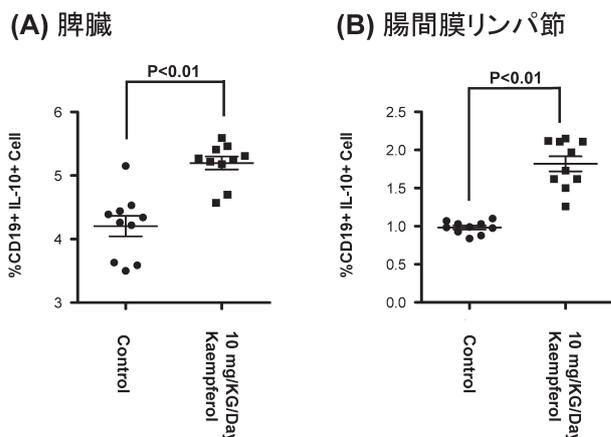


図5 Kaempferolの経口投与による生体内での制御性B細胞の誘導

C57BL/6マウスに経口ゾンデを用いて、Kaempferolを10 mg/kg体重/日、14日間経口投与した後、(A) 脾臓細胞および (B) 腸間膜リンパ節細胞を調製した (n=10)。IL-10の細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーによりB細胞中のIL-10産生細胞の割合を解析した。

た (図6)。さらに、DSS投与終了時に解剖し、大腸の長さ、大腸組織中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性およびIL-6量を測定したところ、Kaempferol投与群では、大腸炎症状の指標となる大腸長の短縮が有意に抑制され、大腸組織中の炎症状態を示すMPO活性およびIL-6量も有意に低値を示した。これらの結果から、Kaempferolの経口投与はDSS誘導性大腸炎の症状を緩

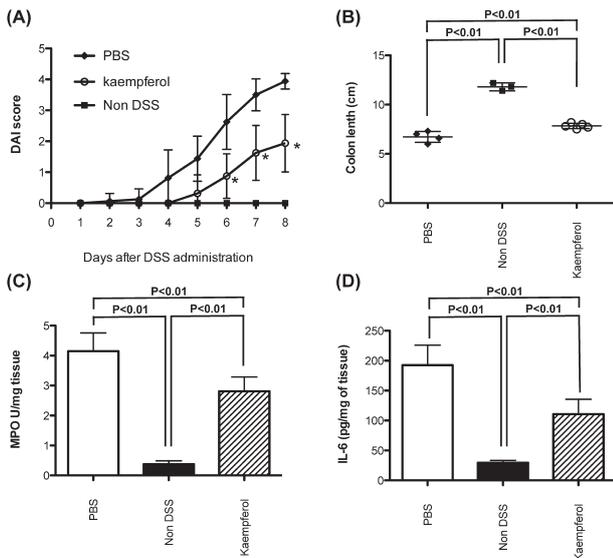


図6 Kaempferolの経口投与によるDSS誘導大腸炎の症状緩和効果

C57BL/6マウスに経口ゾンデを用いて、Kaempferolを10 mg/kg体重/日、14日間経口投与した後、3%DSSを含む飲料水を8日間自由摂取させた ( $n=5$ )。14日間PBSを投与した後DSSを投与した群、DSSを投与しない群を対照群として設けた。最後の8日間に体重を測定し、糞便の状態(固さ、血便)を観察し、その結果を病態スコアとして示した(A)。最終日にマウスを解剖し、(B)大腸長を測定するとともに、大腸組織中の(C)ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性および(D)IL-6量を測定した。データは平均値±標準偏差で示した。

和させることが示された。

## 考 察

本研究で検討した11種類のフラボノイドの中でもKaempferol、Tamarixetinは高いIL-10産生を示し、Breg誘導活性が高いことが示された。11種類のフラボノイドは、(1)IL-10産生を誘導し細胞毒性をもたないもの(Kaempferol、Tamarixetin、Galangin、Chrysin、Apigenin)、(2)IL-10産生誘導活性と細胞毒性をもつもの(Fisetin、Diosmetin、Baicalein、Luteolin)、(3)IL-10産生・細胞生存率に影響を与えないもの(Morin、Quercetin)、に分類することができた。細胞毒性の強いものはフラボン類に多かったが、フラボノール類とフラボン類で明確にBreg誘導活性の有無が分かるわけではなく、官能基の位置でも明確な構造活性相関は認められなかった。

植物化学物質によるリンパ球の機能分化には、芳香族炭化水素受容体(AhR)が関与する例が知られている<sup>1,6)</sup>。Breg誘導においてもAhRアンタゴニスト活性の関与を示す結果が得られている。本研究で用いたフラ

ボノイドについて、AhRアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討することにより、Breg誘導におけるAhRの役割についてより深い理解が得られるものと考えられる。

Kaempferolの経口投与によりDSS誘導性大腸炎の症状悪化が抑制されることが示された。Kaempferolの経口投与がBregを増加させたことを考えると、少なくともここで示された抗炎症効果の一部はBreg誘導を介したものであろうと考えられる。Breg誘導活性をもつ食品因子による炎症・免疫反応の抑制を介した疾病予防効果については、今後さらなる検討が必要である。

アレルギーや炎症反応は非常に多くの免疫細胞の働きで制御されており、食品成分による制御の標的となる反応は数多くある。医薬品においても、リウマチなどの免疫・炎症性疾患の治療には、標的の異なる薬剤を同時に処方する多剤併用療法の有効性が明らかにされてきている。一般に機能性食品成分は医薬品と比較すると、効果の点で活性が弱いものが多いことは否めない。しかしながら、本研究で明らかにしたBreg誘導活性をもつものや、T細胞やマスト細胞に作用する成分など、異なる標的細胞、標的反応に効果を示す複数の機能性食品成分が同時に働くことで、それぞれの効果は小さくても、総合的にみると高い効果が得られるという可能性が期待される。これはまさに、食による疾病予防における現代の「食べ合わせ」の効果を示すものであろう。本研究は、新たな標的細胞に対して作用し炎症抑制効果をもつものを見出そうとする研究であり、有効な「食べ合わせ」を実現する可能性を広げるものであると考えている。

## 要 約

アレルギーなどの免疫機能の異常や、生活習慣病などの発症基盤となる慢性炎症を抑制する機能をもつ食品成分を探索することを目的として、炎症・免疫反応に抑制的に作用する制御性B細胞(Breg)に着目した。本研究ではフラボノイドのBreg誘導活性および生体内での抗炎症効果について検討した。

これまでにBreg誘導活性を見出しているKaempferol、Tamarixetinとこれらに類似した構造をもつ4種類のフラボノール類および5種類のフラボン類のBreg誘導活性を、マウス脾臓B細胞の*in vitro*培養系でのIL-10産生を指標として検討したところ、新たにGalangin、Chrysin、Apigeninが活性を有することが明らかとなった。Baicalein、LuteolinにもBreg誘導活性

が認められたが、同時に強い細胞毒性を示すことも明らかとなった。これらの分子の構造とBreg誘導活性には明確な構造活性相関は認められなかった。Kaempferolをマウスに経口投与したところ、脾臓および腸間膜リンパ節においてIL-10産生Bregの存在比率が上昇し、生体内でのBreg誘導活性が示された。また、Kaempferolの経口投与はマウスDSS誘導性大腸炎モデルにおいて炎症抑制効果を示した。Kaempferolは、生体内でBregを誘導することを介して抗炎症作用を示すことが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) H. K. Wang, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 2171–2178, 2012.
- 2) F. E. Lund, T. D. Randall: *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 236–247, 2010.
- 3) S. Amu, et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, 1114–1124, 2010.
- 4) C. Mauri, et al.: *Nat. Rev. Rheumatol.*, **6**, 636–643, 2010.
- 5) S. Nishimura, et al.: *Cell Metab.*, **18**, 759–766, 2013.
- 6) Y. Li, et al.: *Cell*, **147**, 629–640, 2011.