

財団法人日中医学協会
2006 年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006 年 03 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名： 瀋 継偉

指導責任者名： 安保 徹 職名： 教授

所属機関名： 新潟大学大学院医歯学総合研究科

所在地： 〒951-8520 新潟市旭町通 1-757

電話： (025)227-2137 内線： 2137

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ：

絶食マウスにおけるリンパ球の性状及び機能の経時的解析

3. 成果の概要 (100 字程度)

この研究結果はだんだんに出てきて、これからの研究の発展が大きく期待されているところです。教授先生の高い評価を受けました。一部のデータは第 36 回日本免疫学会総会・学術集会上に発表しました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

1) 瀋 継偉、富山 智香子、任 宏偉、飯合 恒夫、神田 泰洋、川村 弘樹、川村 俊彦、安保 徹。
Analysis of lymphocytes of fasting mice. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会. 2006 年 12 月 11 日~13 日. 日本・大阪.

2) 瀋 継偉、富山 智香子、任 宏偉、飯合 恒夫、川村 俊彦、安保 徹. β -グルカン投与マウスにおける腸管上皮間リンパ球 (IEL) の経時的解析. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 2005 年 12 月 13 日~15 日. 日本・横浜

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

1) Jiwei Shen, Hongwei Ren, Chikako Tomiyama-Miyaji, Yasuyo Suga, Tetsuya Suga, and Toru Abo. Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts. Biomedical Research.4(2007). (印刷中)。

2) Hongwei Ren, Jiwei Shen, Chikako Tomiyama-Miyaji, Mayumi Watanabe, Eisuke Kainuma, Masashi Inoue Yuh Kuwano, Toru Abo. Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation. Cellular Immunology(2007).(印刷中)

3) X.Bai, S.Wang, C.Tomiyama-Miyaji, J.Shen, T.Taniguchi, N.Izumi, C.Li, H.Y.Balir, T.Nagura, S.Takahashi, T.Kawamura, T.Iiai, H.Okamoto, K.Hatakeyama, T.Abo. Transient Appearance of Hepatic Natural Killer Cells with High Cytotoxicity and Unique Phenotype in Very Young Mice. Scandinavian Journal of Immunology(2006) 63, 275-281.

絶食マウスにおけるリンパ球の性状及び機能の経時的解析

研究者氏名	潘 継偉
中国所属機関	黒竜江省医院消化器外科
日本研究機関	新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫・医動物教室
指導責任者	教授 安保 徹
共同研究者名	任 宏偉, 富山 智香子, 神田 泰洋, 飯合 恒夫

要 旨

低栄養状態は従来より、免疫機構に不利になると考えられてきた。しかし、我々は低蛋白食を与えたマウスは移植された腫瘍を拒絶すること、およびマラリア感染に抵抗性を持つことを報告している。そこで、短期絶食における免疫機構への影響を調べた。材料と方法：成体 C57BL/6 マウスに飼料のみを与えず、飲水については自由とし、絶食モデルを作成した。絶食後 1, 2, 3 日後に、肝、脾、胸腺、小腸から常法にて単核球を分離し、各臓器より分離した単核球をフローサイトメトリーにて細胞表面抗原の解析を行った。細胞傷害活性を測定するために、4 時間 ^{51}Cr 遊離試験を行った。標的細胞は Yac-1 及び B6 胸腺細胞を用いた。また、絶食マウスにおける細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った。結果と考察：全単核球数について、絶食期間が長くなる毎に明らかな減少を認めた。フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析では、肝臓の $\text{CD3}^{\text{int}}\text{IL-2R}\beta^{\text{int}}$ 細胞が増加し、その中でも $\alpha\beta\text{TCR}^{\text{int}}\text{NKT}$ 細胞の割合が顕著であった。小腸では $\text{CD8}\alpha^{\text{int}}\text{B220}^{\text{int}}\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}$ 細胞の割合の増加が認められた。細胞内サイトカインの解析については肝及び脾臓 NK、NKT 細胞は絶食 1 日目で $\text{IFN-}\gamma$ 及び IL-4 が増加したものの、2、3 日目では低下した。さらに、細胞傷害活性試験においては、肝のみ絶食 1 日目で活性が最大となり、2、3 日目では減少した。以上の結果より、一時的な低栄養状態では免疫能の低下ではなく、逆に増強していることが示唆された。

Key Words 絶食, 肝臓, 細胞表面抗原, 細胞傷害活性, 自然免疫

結 言

栄養状態は生体防御機構である免疫機能に大きく影響を及ぼしていることが知られているが、摂取する食物の量や質、あるいは栄養状態によって免疫機能が強く影響を受けることが明らかになってきた。従来より、低栄養状態（栄養失調状態）になると、免疫力が低下し、基礎疾患などがさらに症状を悪化させるという悪循環に陥る可能性が出てくると考えられてきた。

しかし、筆者らの研究室はマウスに低蛋白食含有の餌を与え、腫瘍への抵抗性及びマラリア感染防御に対する影響ということを報告している^{1) -5)}。低蛋白ダイエットにより、胸腺萎縮が誘導されてメインストリームの T 細胞が抑制され、逆に肝臓における自然免疫を活性化することが明らかとなった。その結果、低蛋白ダイエットにより、移植された腫瘍を拒絶した。そして、非致死性のみならず致死性のマラリア感染に抵抗性を獲得した。NK、NKT 細胞の機能が増強し、自然免疫を増強した^{5) -9)}。

そこで、本研究では、短期絶食におけるマウスリンパ球の phenotype と機能の点を中心に解析して、免疫機構への影響を調べた。

材料と方法

1、マウス

8~12 週齢の C57BL/6 (B6) を用いた。上記マウスは新潟大学動物実験施設にて SPF 環境で飼育されたものである。

2、絶食モデルの作成

マウスに飼料のみを与えず、飲水については自由とし、絶食モデルを作成した。

3、単核球の調製

絶食後 1, 2, 3 日後に、定法にて肝臓、脾臓、胸腺、および小腸上皮より単核球の分離を行った^{10),11)}。

マウス胸腺、肝臓と脾臓を細切後、200 ゲージのステンレスメッシュを通し、Eagle's MEM(Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)で洗浄後、胸腺の単核球を分離した。脾臓は 0.2% NaCl で溶血させ、単核球を分離した。肝臓は 35%percoll で比重遠心した後、0.83%NH⁴CL-Tris buffer(ph7.6)で溶血させ、単核球を分離した。

小腸は PBS で腸管内容物を洗い出し、パイエル板を切除した。その後、腸管を長軸方向に切開し、約 1.5 センチの長さに裁断しながら、20 ml の skating-water(Ca²⁺- and Mg²⁺- free Dulbecco's PBS containing 5 mM EDTA)の中に移し、分間培養した。液体が白濁しているのを確認した後、腸管を除けながら、上清を取り出した。25 分間 40%80%percoll で勾配遠心した後、interface を採取した。MEM で洗浄後、単核球を分離した。

4、フローサイトメトリーによる解析

マウスより分離した単核球を抗マウスモノクローナル抗体で二重及び三重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った¹²⁾。

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoery-thrin(PE)及び biotin 標識された以下の抗マウスモノクローナル抗体を使用した。FITC-conjugated anti-CD3 (145-2C11), anti-CD8 α (53-6.7), PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136), anti-IL-2R β (TM- β 1), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-CD4 (PM4-5), anti-CD8 β (53-5.8), biotin-conjugated anti-TCR $\alpha\beta$ (H57-597), anti-TCR $\gamma\delta$ (GL3) mAbs (BD PharMingen Co., San Diego, CA) を使用した。

5、細胞内サイトカインの解析

絶食マウスにおける細胞内サイトカイン IFN- γ 及び IL-4 の染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った。実験前 2 時間、ConA (Sigma,USA) を刺激物として、i.v.で 200 μ g/mouse 投与した。

6、⁵¹Cr 遊離法による細胞傷害活性解析

常法にて 4 時間 ⁵¹Cr 遊離試験を行った¹³⁾。標的細胞は YAC-1 及び B6 胸腺細胞を用いた。Effector 細胞には肝臓、脾臓から得た単核球細胞を用いた。

結果

1、絶食後各臓器の単核球数の変化

絶食後 1, 2, 3 日目、全単核球数について、対照群と比べ、絶食期間が長くなる毎に有意に減少を認めた(図 1)。肝臓、脾臓、小腸は絶食後 3 日目で全単核球数が約対照群の四分の一に減少したが、胸腺は約八分の一に減少した。(n=4, p<0.05)

2、細胞表面抗原の解析

絶食後マウスの NKT 細胞の変化を比べるために、対象群と絶食群マウス肝及び脾単核球を、抗 CD3 及び IL-2R β , CD3 及び NK1.1 の二重染色で解析を行った(図

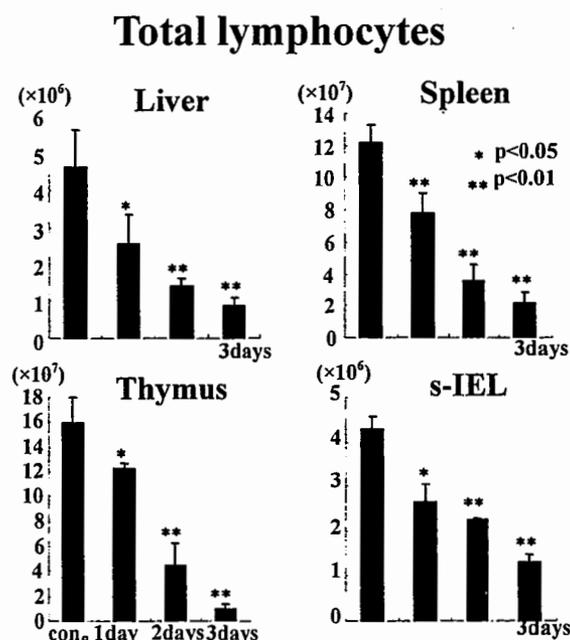


図1. 各臓器の単核球数を示す。

2)。肝の胸腺外分化 T 細胞は IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞として同定できる。IL-2Rβ⁺CD3⁻は NK 細胞であり、IL-2Rβ⁻CD3^{high} 細胞が胸腺由来 T 細胞である¹⁴⁾。

NK 細胞及び胸腺外分化 T 細胞は肝に豊富に存在するが、脾に少ない。対照群と比べ、絶食群マウスの肝臓の IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞及び NKT 細胞の比率は絶食期間が長くなる毎に増加した。脾臓の IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞は顕著な変化が認めなかったが、増加傾向を示している。

続いて、CD3⁺αβTCR 細胞を確認するために、抗 CD3 及び B220、αβTCR 及び γδTCR の二重染色で解析を行った(図 3)。その結果、絶食群マウスは対照群と比べ、肝、脾共に経時的に CD3⁺αβTCR 細胞の比率が明らかに増加した。

小腸のリンパ球の phenotype も、絶食の前で検索した(図 4)。この検討の結果では、B 細胞 (B220⁺CD3^{int}) (48.3%→50.7%→57.5%→62.8%)、γδTCR⁺αβTCR⁻細胞 (42.4%→51.9%→53.7%→55.6%)、CD8⁺CD4⁻細胞 (78.4%→83.9%→86.7%→90.1%)、CD8αα細胞 (56.8%→62.1%→68.1%→77.4%) の比率が絶食期間が長くなる毎に増加した。

各臓器の各分画細胞は絶食に対抗能力を比べるために、各臓器の各分画の絶対数を計算した。総単核球は著明な減少を認めたが、肝内 CD3^{int} 及び NKT 細胞絶対数の減少は緩やかであった (data not shown)。

3、細胞内サイトカインの解析

細胞内サイトカインの解析については肝臓 NK、NKT 細胞は絶食 1 日目で IFN-γ 及び IL-4 が増加したものの、2、3 日目では減少を認めた(図 5)。脾臓は肝臓と同様な変化であった (data not shown)。

4、絶食マウス肝臓及び脾臓リンパ球の NK 細胞傷害活性の変化

絶食マウス NK 細胞傷害活性の変化について、YAC-1 及び B6 マウス胸腺細胞を標的細胞として、絶食後 1、2、3 日目で、肝臓及び脾臓リンパ球の NK 細胞傷害活性を測定して、NK 細胞比率あたりの細胞傷害活性を解析した(図 6)。肝臓では絶食 1 日目で YAC-1 (図 6A) 及び B6 胸腺細胞 (図 6B) にて、細胞傷害活性が最大となり、2、3 日目では徐々に低下した。一方、脾臓では、YAC-1 及び B6 マウス胸腺細胞に対する細胞傷害活性が絶食の前後で著明な差を認めなかった。

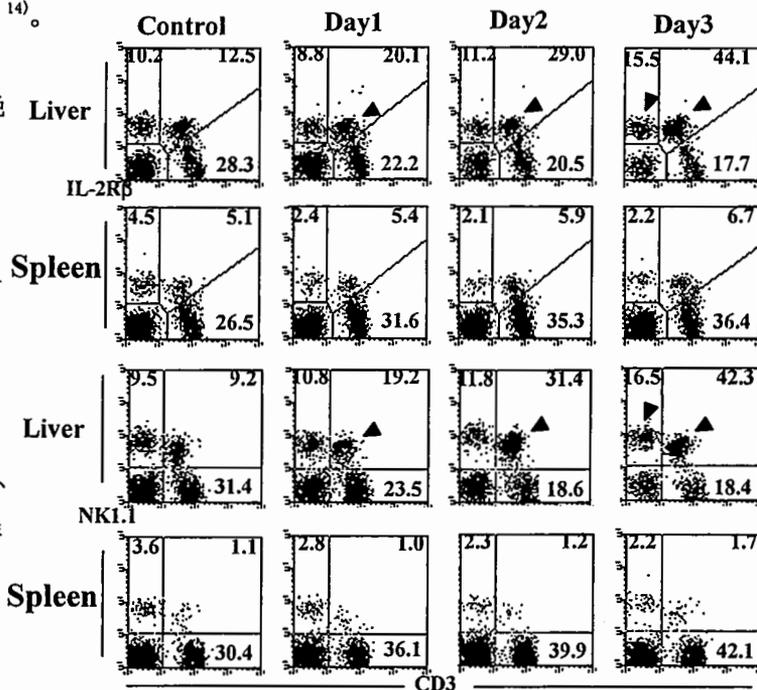


図2. 肝臓、脾臓の単核球をCD3、IL-2Rβ及びNK1.1により二重染色で解析を行った。図中の数値は各サブセットの比率を示す。

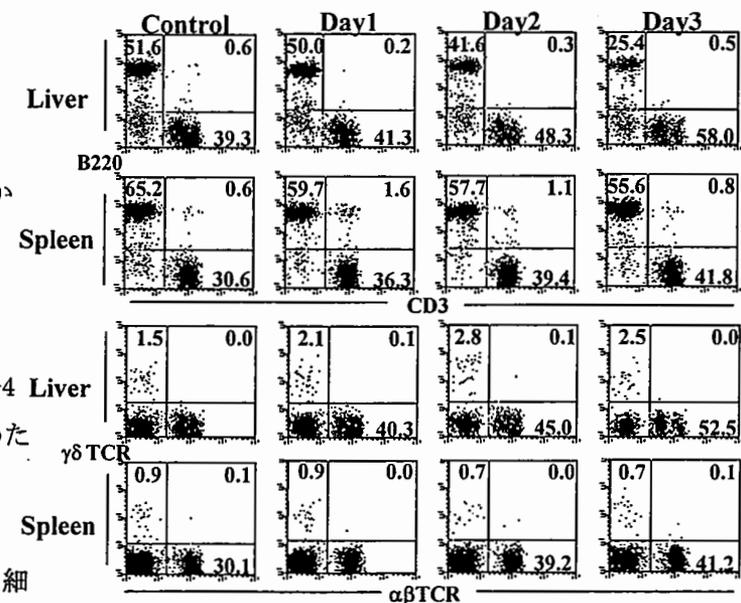


図3. 肝臓、脾臓の単核球をCD3、B220、αβTCR及びγδTCRにより二重染色を解析した。図中の数値は各サブセットの比率を示す。

考察

今回の研究は、絶食マウスのリンパ球による性質と機能の変化について解析した。対照組より、短期絶食マウス肝内NK細胞は、強い細胞傷害活性を有することが明らかになった。絶食により、胸腺の萎縮と、胸腺外分化T細胞であるIL-2Rβ⁺CD3^{int}細胞¹⁵⁾の増加がみられたことから、自然免疫系が活性化されたことによると考えられる。

われわれは、以前の研究において、ストレスが自然免疫系を活性化させ、逆に獲得免疫系の働きを弱めることを報告してきた^{16), 17)}。本研究により、絶食マウスも、このストレス反応に似た反応を示すことがわかった。ストレスは胸腺の萎縮を誘導し、通常のT細胞の分化を抑制し、獲得免疫系を不活性化し、逆に自然免疫系を活性化する¹⁸⁾。ただし、24時間の短期絶食は自然免疫を担うNK、NKT細胞の機能増強を誘導し、自然免疫系を活性化させるとはいえ、それ以上になると細胞数、機能とも低下することが明らかとなった。

従来、絶食は免疫応答低下を引き起こすといわれてきたが、本研究により、絶食時間によっては免疫応答の中でも自然免疫を増強しうることが示唆された。今後、自然免疫を増強する因子及び粘膜免疫を担う小腸のCD8αα⁺B220⁺γδTCR⁺細胞についても検討する予定である。

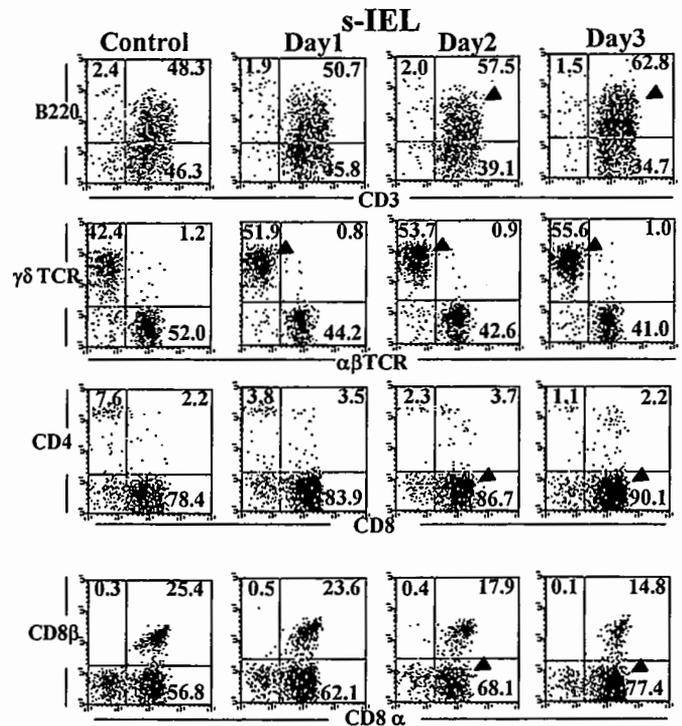


図4. s-IELの単核球の二重染色を示す。

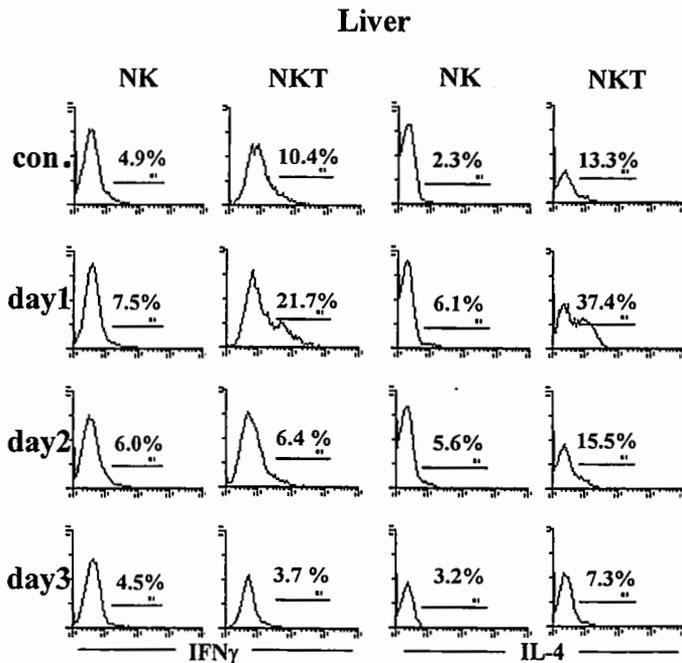


図5. 肝臓細胞内サイトカインの解析を行った。図内の数値は各分画細胞のサイトカインの比率を示す。

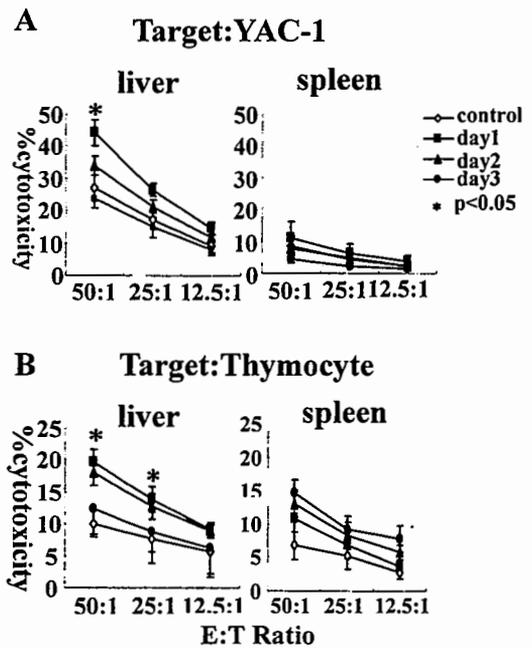


図6. 肝臓及び脾臓内単核球をエフェクターとした。標的細胞は (A) YAC-1 (B) B6胸腺細胞を用いた。

参考文献：

1. Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor MK, Morshed SRM, Halder RC, Kawamura T, Kosaka T, Miyaji C, Kawamura H, Seki S and Abo T. Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1⁺ subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* 207:28-35, 2001.
2. Abo T, Kawamura T and Watanabe H. Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174:135-149, 2000.
3. Mannor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ subsets of intermediate TCR cells which are constituents of the innate immunity. *Cell Immunol* 211:96-104, 2001.
4. Mannor MK, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T. Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169:301-306, 2002.
5. Changchun Li, Xuefeng Bai, Sen Wang, Chikako Tomiyama-Miyaji, Toru Nagura, Toshihiko Kawamura and Toru Abo. Immunopotential of NKT cells by low-protein diet and the suppressive effect on tumor metastasis. *Cellular Immunology* 231: 96-102, 2004.
6. Kawamura H, Kameyama H, Kosaka T, Kuwahara O, Bannai M, Kawamura T, et al. Association of CD8⁺ natural killer T cells in the liver with neonatal tolerance phenomenon. *Transplantation* 73:978-94, 2002.
7. Ishimoto Y, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Yokoyama H, Ebe K, Tsubata S, et al. Age-dependent variation in the proportion and number of intestinal lymphocyte subsets, especially natural killer T cells, double-positive CD4⁺ CD8⁺ cells and B220⁺ T cells, in mice. *Immunology* 113:371-7, 2004.
8. Takahashi S, Kawamura T, Kanda Y, Taniguchi T, Nishizawa T, Iiai T, et al. Activation of CD1d-independent NK1.1⁺ T cells in the large intestine by *Latobacilli*. *Immunol Lett* 102:74-8, 2006.
9. Bakir HY, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Nagura T, Kawamura T, Sekikawa H, et al. Reasons why DBA/2 mice are resistant to malarial infection: expansion of CD3^{int}B220⁺γδT cells with double-negative CD4⁺8⁻ phenotype in the liver. *Immunology* 17:127-35, 2006.
10. Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, et al. The primary site of CD4⁺8⁻B220⁺ T cells in *lpr* mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* 160:2665-74, 1998.
11. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β-glucan. *Cell Immunol* 221:1-5, 2003.
12. Miyaji C, Watanabe H, Miyakawa R, Yokoyama H, Tsukada C, Ishimoto Y, et al. Identification of effector cells for TNFα-mediated cytotoxicity against WEHI164S cells. *Cell Immunol* 216:43-9, 2002.
13. Emoto M, Neuhaus O, Emoto Y, Kaufmann SHE. Influence of β₂-microglobulin expression on gamma interferon secretion and target cell lysis by intraepithelial lymphocytes during intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 64:569-75, 1996.
14. Watanabe T, Kawamura T, Kawamura H, Haga M, Shirai K, Watanabe H, Eguchi S and Abo T. Intermediate TCR cells in mouse lung. Their effector function to induce pneumonitis in mice with autoimmune-like graft-versus-host disease. *J Immunol* 158: 5805-5814, 1997.
15. Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MDK, Morshed SRM and Abo T. Intensive generation of NK1.1- extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic MHC antigens. *Immunology* 102:450-459, 2001.
16. Murayama S, Tsukahara A, Suzuki S, Tada T, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T. Quick recovery in the generation of self-reactive CD4^{low}NKT cells by an alternative intrathymic pathway when restored from acute thymic atrophy. *Clin Exp Immunol* 117:587-595, 1999.
17. Oya H, Kawamura T, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T. The differential effect of stress on NKT and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 121:384-390, 2000.
18. Tagoh H, Nishijo H, Uwano T, Kishi H, Ono T and Muraguchi A. Reciprocal IL-1 beta gene expression in medial and lateral hypothalamic areas in SART-stressed mice. *Neurosci Letters* 184:17-20, 1995.