

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750039

研究課題名(和文) カロリー制限食の摂取に伴うマイクロRNAを介した免疫増強メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of microRNA that regulates immune function by caloric restriction

## 研究代表者

田中 沙智 (TANAKA, Sachi)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90633032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：適切なカロリー制限は、様々な疾病を予防するなどの健康効果をもたらすことが知られている。本研究では、カロリー制限によって著しく変化する血中miRNAに着目し、miRNAを介した免疫制御に関するメカニズムを明らかにすることを目的とし、実験を行った。マウスを用いて、カロリー制限を行ったところ、カロリー制限食の摂取によって脾臓中のナイーブT細胞が増加し、血清中で発現が増加するmiRNAを同定した。今後は、選抜したmiRNAのターゲット分子を同定し、miRNAによる免疫機能制御メカニズムの詳細を明らかにしたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Caloric restriction (CR) regulates to delay the aging of the immune system. However, detail mechanisms of immunomodulation by CR remain unclear. In this study, we established the mouse model of CR, and analyzed the changes of population and T cell function in caloric restricted mice. The proportions of CD4 and CD8 T cells in spleen cells from CR mice were significantly increased compared with control mice. Additionally, CR mice showed the higher proportion of naive CD4 T cells than that of control mice. Furthermore, we investigated the differential expression of circulating microRNAs (miRNAs) in the serum from CR mice by miRNA microarray analysis. The levels of some of circulating miRNAs from CR mice were increased compared with control mice. These results suggested that some miRNAs might be critical factor in the immune regulation such as proportional and phenotypic changes of T cells by caloric restricted feeding.

研究分野：免疫学

キーワード：カロリー制限 マイクロRNA T細胞 免疫機能

## 1. 研究開始当初の背景

今日の日本は「飽食の時代」と言われるほど食が豊かで栄養状態も良くなり、世界一の長寿国になった。その反面、飽食ゆえの栄養の摂り過ぎや食生活の乱れなどにより、生活習慣病が増加の一途を辿っている。そのため、適切に摂取カロリーをコントロールして、栄養バランスの取れた食事をすることが、健康な生活を営む上で重要である。

適切なカロリー制限は、様々な疾病を予防するなどの健康効果をもたらすことが知られている。マウスやラットに通常の 30-40% のカロリーを制限した飼料を摂取させた場合、生活習慣病の発症が低下し、癌の発症が予防され、老化を遅らせて寿命が延びることが報告されており (Das et al., Obesity Reviews 2004) アカゲザルの研究ではカロリー制限により、老化関連疾患 (糖尿病, 心血管疾患, 悪性腫瘍, 認知症) の発生頻度が減少し, 老化関連死の減少も確認された (Colman et al., Science 2009) 。また、カロリー制限によって脾臓のNK 活性やT 細胞応答が増強するなど、免疫機能が向上することも知られている (Hishinuma et al., Annals of Nutrition and Metabolism 1990) 。カロリー制限による種々の健康増進効果においては、Sirt1 が寿命を制御する分子として作用し、広範な生理機能を制御していると考えられている (Cohen et al., Science 2004) 。しかしながら、カロリー制限によって引き起こされる免疫機能の向上については、分子レベルでの解析に関する報告が少なく、詳細なメカニズムは不明である。

マイクロ RNA (miRNA) は 22 塩基以下の 1 本鎖 RNA 分子であり、標的 mRNA を不安定化すると共に翻訳阻害を行うことでタンパク質合成を抑制する。血中の miRNA はエクソソーム内に存在すると安定し、がん、感染症および生活習慣病などの様々な疾患の発症によって発現変動するため、バイオマ

ーカーとしての活用が期待されている。カロリー制限させた老齢のマウスの研究では、カロリー制限で変動する候補 miRNA が選抜されており、老化や代謝、アポトーシス関連遺伝子の制御に関わることが示されている (Dhahbi et al., Aging 2013) ため、免疫機能を制御する miRNA が存在することも強く示唆される。また、カロリー制限に伴う免疫増強に関与する miRNA を同定することができれば、新たな免疫増強バイオマーカーの発見と、それをを用いた治療への応用が可能となる。研究代表者はこれまでに、食品由来生理活性物質が免疫バランスを制御し、その免疫調節機能のメカニズムの解明を行ってきた (Tanaka et al., Cellular Immunology 2011) 。また、マウスに対してカロリー制限をさせる実験系をすでに確立しており、カロリー制限により免疫応答が惹起することは確認できているものの、免疫応答を制御する分子メカニズムの解明には至っていない。さらに、研究代表者は次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った経験があり (Tanaka et al., Infection and Immunity 2013) 、マイクロアレイで得られた膨大なデータから、特徴のある変動を示した遺伝子群の選抜やそのクラスター解析、選抜した遺伝子群の機能解析などが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では、カロリー制限によって著しく変化する血中 miRNA に着目し、miRNA を介した免疫制御に関するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

本実験に用いた C57BL/6 マウス (雄) は CLEA Japan (Tokyo, Japan) より購入した。マウスは、室温  $23 \pm 2$  、明期 12 時間、

暗期 12 時間の環境で飼育を行った。飼育は、信州大学動物実験委員会の定める指針に従った。全てのマウスは 8 週齢までの間、CLEA Japan より購入した CLEA Rodent Diet CE-2 を自由摂取させた。8 週齢から 30 日間、コントロール飼料摂取群には AIN-93M を毎日約 4 g ( 13.2 kcal ) /mouse 摂取させ、カロリー制限食摂取群には AIN-93M の 40% カロリーカットした飼料を毎日約 4 g ( 7.92 kcal ) /mouse 摂取させた。水は自由飲水とした。

#### ( 2 ) サンプルングおよび脾臓細胞の調製と培養

マウスから血液を採取した後、頸椎脱臼により屠殺し、腹腔内脂肪、大腸、小腸、胃、肝臓、腎臓、心臓、胸腺、脾臓を摘出し、重量を測定した。血液は 1 時間室温で静置し、5,000 rpm、4 で 10 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し、-80 で凍結保存した。脾臓は重量測定後にほぐし、脾臓細胞を単離した。その懸濁液を 40  $\mu$ m ナイロン製セルストレーナー ( BD Falcon, Franklin Lakes, NJ ) に通した。次に、赤血球を除去するために、0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む 0.17 M Tris-HCl 緩衝液 ( pH 7.65 ) で細胞を処理した。遠心分離後、細胞は 10% FBS とペニシリン G ( 10,000 U/mL )、ストレプトマイシン ( 10 mg/mL ) ( Sigma, St. Louis, MO ) を含む RPMI-1640 培地 ( Sigma ) を加えて、 $1 \times 10^7$  cells/mL の濃度に再懸濁した。その後、脾臓細胞を 96 穴平底プレートに  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、無刺激条件、抗 CD3 抗体 ( 5, 20 ng/mL ) ( BioLegends, San Diego, USA )、LPS ( 0.1, 1  $\mu$ g/mL ) ( Sigma ) 刺激条件で 37、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて 48 時間の培養を行った。

#### ( 3 ) フローサイトメトリー

免疫担当細胞の割合を解析するために、脾臓細胞を 7-AAD および、蛍光ラベルされた

抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 TCR $\beta$  抗体、抗 NK1.1 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD45RB 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD62L 抗体で染色した。ヘルパー T 細胞の表現型についてはナイーブ (  $\text{CD4}^+\text{CD45RB}^+\text{CD62L}^+$  )、エフェクター (  $\text{CD4}^+\text{CD45RB}^-\text{CD62L}^-$  )、エフェクターメモリー (  $\text{CD4}^+\text{CD45RB}^+\text{CD62L}^-$  )、セントラルメモリー (  $\text{CD4}^+\text{CD45RB}^-\text{CD62L}^+$  ) の割合および細胞数を解析した。キラー T 細胞の表現型についてはナイーブ (  $\text{CD8}^+\text{CD44}^-\text{CD62L}^+$  )、エフェクター (  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+\text{CD62L}^-$  )、エフェクターメモリー (  $\text{CD8}^+\text{CD44}^-\text{CD62L}^-$  )、セントラルメモリー (  $\text{CD8}^+\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$  ) の割合および細胞数を解析した。これらの抗体および試薬は BioLegends より購入した。上記抗体で染色した脾臓細胞をフローサイトメーター ( FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA ) で取り込み、細胞割合を解析した。

#### ( 4 ) マイクロアレイ解析

各群マウス 12 匹から血清をそれぞれ 50  $\mu$ L ずつ採取して混合し、プールの血清 600  $\mu$ L から miRNA を含む total RNA を抽出した。その後、3D-Gene Mouse microRNA ver.19.0 chips にハイブリダイズし、東レマイクロアレイ解析システム ( Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan ) を用いて血清中の miRNA 発現を解析した。

#### ( 5 ) total RNA 抽出

miRNA を含む total RNA は miRNeasy<sup>®</sup> Serum/Plasma Kit ( QIAGEN, Valencia, CA, USA ) を用いて抽出した。血清 200  $\mu$ L に 1 mL の QIAzol 溶解試薬を加え、ボルテックスにより混合した。5 分間室温で静置後、200  $\mu$ L のクロロホルムを加え、15 秒間手で激しく混合した。3 分間、室温で静置し、4、12,000  $\times$ g で 15 分間遠心した。遠心後の水

層を別のチューブに回収し、900  $\mu\text{L}$  のエタノールを加えた。それを RNeasy MinElute spin column に添加し、室温、8,000  $\times g$  で 15 秒間遠心した。その後、遠心洗浄を行い、14  $\mu\text{L}$  の RNase-free water で miRNA を抽出した。抽出はすべてキットが推奨するプロトコールに従って行った。また、クロロホルム添加前に Spike-in Control として *C. elegans* miR-39 である miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control ( QIAGEN ) を血清に 3.5  $\mu\text{L}$  添加した。

#### ( 6 ) 逆転写 ( RT ) および定量 PCR ( qPCR ) 反応

RT 反応では、total RNA 5 ng、100 mM dNTPs (with dTTP) 0.15  $\mu\text{L}$ 、MultiScribe™ Reverse Transcriptase ( 50 U/ $\mu\text{L}$  ) 1  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ Reverse Transcription Buffer 1.5  $\mu\text{L}$ 、RNase Inhibitor ( 20U/ $\mu\text{L}$  ) 0.19  $\mu\text{L}$ 、RT primer 3  $\mu\text{L}$  を混合した。RT primer は、各種 miRNA 特異的なプライマーを使用した。そこに RNase-free water を加え 15  $\mu\text{L}$  とし、16 で 30 分、42 で 30 分、85 で 5 分の条件で反応させ、cDNA を合成した。qPCR 反応では、cDNA サンプル 1.33  $\mu\text{L}$ 、qPCR の primer および probe を含む TaqMan® MicroRNA Assay ( 20 $\times$  ) 1  $\mu\text{L}$ 、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix 10  $\mu\text{L}$ 、50 $\times$ ROX reference dye 0.4  $\mu\text{L}$  に RNase-free water 7.67  $\mu\text{L}$  を加え 20  $\mu\text{L}$  とし、95 で 60 秒反応させた後、95 で 15 秒、60 で 60 秒を 40 cycles 行った。遺伝子発現量の定量化のため、*C. elegans* miR-39 を外因性標準遺伝子とし、比較 Ct ( Ct ) 法を用いて相対的定量で解析した。TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit、RT primer および TaqMan® MicroRNA Assay ( 20 $\times$  ) は Applied Biosystems ( Foster City, CA ) より購入し、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix は Toyobo ( Osaka, Japan ) より

購入した。

#### ( 7 ) miRNA mimic のトランスフェクション

miRNA による T 細胞の表現型への影響を調べるために、単離したマウス脾臓細胞へ miRNA の mimic をトランスフェクトした。トランスフェクションはすべて製造業者が推奨するプロトコールに従って行った。マウス脾臓細胞を単離し、24 穴平底プレートに  $5.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、37、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて 12 時間の培養を行った。1well あたり、0.15  $\mu\text{L}$  の miRNA mimic ( QIAGEN )、あるいは 0.3  $\mu\text{L}$  の AllStars Negative Control siRNA ( QIAGEN ) を 100  $\mu\text{L}$  の血清が含まれていない RPMI-1640 培地で希釈し、さらに 3  $\mu\text{L}$  の HiPerFect Transfection Reagent をそれぞれ添加して、ボルテックスにより混合した。室温 ( 15 ~ 25 ) で 8 分間静置した後、調製した試薬を 103  $\mu\text{L}$ /well ずつ細胞に添加し、37、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて 6 時間の培養を行った。その後、血清が含まれている RPMI-1640 培地を 400  $\mu\text{L}$ /well 添加し、37、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて 24 時間の培養を行った。

#### ( 8 ) 統計解析

実験は 3 回以上独立して行い、それぞれの実験結果より平均値と標準偏差を算出した。有意差検定は、Student の *t* 検定を行った。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) カロリー制限食摂取による体重変化

カロリー制限食摂取による免疫機能への影響を調べるために、C57BL/6 マウス ( ) 8 週齢にコントロール飼料あるいは 40% カロリー制限飼料を 30 日間摂取させた。実験期間中、体重を毎日測定した結果、CON マウスに比べ CR マウスで有意に体重増加が抑制

された。最終日の CR マウスの体重の平均値は、CON マウスに比べ有意に低値を示した。また、一日の摂取カロリーをグラフに示したところ、CON マウスに比べ CR マウスでは 40%のカロリー制限が維持されていた。

#### (2) カロリー制限食摂取による臓器重量及び脾臓細胞数の変化

CON マウスおよび CR マウスの臓器重量を測定した結果、CR マウスにおいて腹腔内脂肪、肝臓、腎臓、心臓、胸腺の重量が CON マウスに比べ有意に低値を示し、大腸、小腸の重量が CON マウスに比べ有意に高値を示した。また、CON マウスおよび CR マウスの脾臓重量及び細胞数を測定した結果、CR マウスにおいて脾臓の重量は CON マウスに比べ有意に低値を示したが、細胞数は有意な差はなかった。

#### (3) カロリー制限食摂取による脾臓細胞中の免疫担当細胞群の割合及び細胞数の変化

CON マウスおよび CR マウスの脾臓細胞を FACS 抗体で染色し、FACS を用いて免疫担当細胞群の割合および細胞数を測定した結果、CR マウスの T 細胞 ( $CD4^+TCR\beta^+$ 、 $CD8^+TCR\beta^+$ ) の割合が CON マウスに比べ有意に増加し、マクロファージ ( $CD11b^+$ ) と樹状細胞 ( $CD11c^+$ ) の割合が有意に減少した。また、CR マウスの NK 細胞 ( $NK1.1^+TCR\beta^-$ )、B 細胞 ( $CD19^+$ )、マクロファージ ( $CD11b^+$ )、樹状細胞 ( $CD11c^+$ ) の数が CON マウスに比べ有意に減少した。

#### (4) カロリー制限食摂取による T 細胞表現型の割合及び細胞数の変化

CON マウスおよび CR マウスの脾臓細胞を FACS 抗体で染色し、FACS を用いてヘルパー T 細胞表現型の割合および細胞数を測定した結果、CR マウスのナイーブ T 細胞の割合が CON マウスに比べ有意に増加し、エフ

ェクターメモリー T 細胞の割合が有意に減少した。また、CR マウスのエフェクター T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞の細胞数が CON マウスに比べ有意に減少した。以上の結果より、カロリー制限食摂取によってナイーブヘルパー T 細胞の割合が増加し、免疫老化の遅延が起こっていると考えられる。よって、カロリー制限食摂取によって免疫老化の遅延を引き起こすモデルマウスを作成できた。キラー T 細胞についても、表現型の割合及び細胞数を測定したところ、CR マウスにおいてキラー T 細胞表現型の割合および細胞数に有意な変化は見られなかった。

#### (5) カロリー制限食を摂取させたマウスの血清 miRNA 発現の網羅的解析

カロリー制限食摂取が血清中の miRNA 発現に及ぼす影響を調べるために、CON マウスおよび CR マウス間で miRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、CR マウスにおいて 15 種類の miRNA で 2 倍以上の発現増加が見られ、15 種類の miRNA で 0.5 倍以下の発現減少が見られた。

#### (6) カロリー制限食を摂取させたマウスの血清 miRNA 発現の定量的解析

マイクロアレイ解析の結果より、カロリー制限食を摂取させたマウス血清において発現量が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下に変化した 30 種類の miRNA のうち、CR マウスで特に発現量の高い miRNA リアルタイム PCR 法により検証したところ、CR マウスは CON マウスに比べて、発現量が有意に高い miRNA が存在することが示された。

(7) miRNA をトランスフェクトしたマウス脾臓細胞のヘルパー T 細胞表現型解析  
上記実験で同定できた miRNA によるヘルパー T 細胞表現型への影響を調べるために、マウス脾臓細胞に miRNA mimic あるいは

AllStars Negative Control siRNA ( Control mimic ) をトランスフェクトした。トランスフェクションした細胞を回収し、フローサイトメーターにてヘルパーT 細胞表現型の割合を測定した結果、Control mimic をトランスフェクトした細胞と同定できた miRNA を mimic をトランスフェクトした細胞のヘルパーT 細胞表現型の割合に有意な違いはなかった。

今後は、選抜した miRNA のターゲット分子を同定し、miRNA による免疫機能制御メカニズムの詳細を明らかにしたいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

1. **田中沙智** Mechanisms of immunomodulation by caloric restriction 第44回日本免疫学会学術集会 札幌コンベンションセンター 平成27年11月19日
2. 山田和輝、古屋花暖、山本佳奈、**田中沙智** カロリー制限食及び高脂肪食摂取による免疫機能への影響 第9回健康長寿長野研究会 松本大学 平成27年6月27日

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 沙智 (TANAKA, Sachi)  
信州大学・学術研究院農学系・助教  
研究者番号：90633032