

## 卵白由来リゾチームの免疫促進効果に関する研究

愛媛大学農学部・教授 菅原 卓也

### ■ 緒 言

リゾチームは卵白に豊富に含まれ、食品はもとより医薬品としても利用されている。これまでの我々の研究で、卵白リゾチームはリンパ球を活性化し、抗体産生を促進することが明らかになっている<sup>1)</sup>。また、リゾチームの免疫促進活性は加熱処理により上昇する<sup>2)</sup>。従って、加工工程における加熱処理は活性を高めると考えられ、機能的食品への応用が期待できる。そこで、リゾチームの利用のさらなる展開を勘案し、卵白由来リゾチームの保健機能、特に免疫系への効果に関してさらに詳細に検討することを目的とした。リゾチームの免疫系への効果として、我々が明らかにしたリンパ球の活性化以外には、炎症性腸疾患モデルブタへの胃内カテーテル投与により腸内の炎症性タンパク質産生を抑制する<sup>3)</sup>という報告があるものの、リゾチームの抗炎症作用の詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで、リゾチームの免疫系への新たな効果を解明するため、炎症反応に關与するマクロファージに対する卵白リゾチームの作用について検討した。

### ■ 方 法

#### (1) 主な試薬

卵白リゾチームは、MP Biomedicals から入手した。また、*Escherichia coli* 由来リポ多糖(LPS)は、Sigma から入手した。

#### (2) 細胞培養法

マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を 10% ウシ胎児血清(Sigma)、100U/mL ペニシリン G カリウム塩(Sigma)、100 $\mu$ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩(Sigma)、3.7mg/mL 炭酸水素ナトリウム(和光純薬)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培地(Sigma)で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の環境下において継代培養した。

#### (3) マクロファージ細胞株の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

LPS による刺激で活性化した RAW264.7 細胞に対する卵白リゾチームの作用を解析した。RAW264.7 細胞を 24 穴培養プレート(BD バイオサイエンス)に 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells で播種し、12 時間前培養後、10ng/mL の LPS で 1 時間刺激し、炎症応答を誘導した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄したのち、LPS 非存在下において卵白リゾチームを作用させた。培養後、培養上清中に産生された炎症性サイトカインである IL-6、および TNF- $\alpha$  量を酵素抗体法により測定した。

#### (4) マクロファージ細胞株の炎症性サイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響

24 穴培養プレートに 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells で播種し、12 時間前培養した。10 ng/mL の LPS で 1 時間刺激後、PBS で洗浄したのち、LPS 非存在下においてリゾチーム(500 $\mu$ g/mL)を 6 時間、12 時間、24 時間作用させた。その後、細胞から Sepasol RNA I Super G(ナカライテスク)を用いて RNA を抽出し、cDNA を作製した。その後、Fast SYBR Green(Applied Biosystems)を用いて Step One Plus Real-Time PCR System(Applied Biosystems)によりリアルタイム PCR 反応を行い、炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼすリゾチームの影響を検討した。

#### (5) 一酸化窒素(NO)産生に及ぼす影響

24 穴培養プレートに 5.0 $\times$ 10<sup>5</sup>cells で播種し、12 時間前培養した。10ng/mL の LPS で 1 時間刺激後、PBS で洗浄したのち、LPS 非存在下においてリゾチーム(500 $\mu$ g/mL)を 24 時間作用させ、NO 産生に与える影響を、Griess Reagent System(Promega)を用いて検討した。

#### (6) 貪食活性に及ぼす影響

24 穴培養プレートに 5.0 $\times$ 10<sup>5</sup>cells で播種し、12 時間前培養した。10ng/mL の LPS で 1 時間刺激後、

PBS で洗浄したのち、LPS 非存在下においてリゾチーム (500 $\mu$ g/mL) を 6 時間、12 時間、24 時間作用させた。その後、テキサスレッドで蛍光標識した酵母由来ザイモサン (Life Technology) を添加して 1 時間培養後、ザイモサンに対する貪食活性をフローサイトメーター FACS Caliber (BD バイオサイエンス) で測定した。

#### (7) 細胞質内 NF- $\kappa$ B 量に及ぼす影響

60mm シャーレ (BD バイオサイエンス) に  $1.4 \times 10^6$  cells で播種し、12 時間前培養した。10ng/mL の LPS で 1 時間刺激後、PBS で洗浄したのち、LPS 非存在下においてリゾチーム (500 $\mu$ g/mL) を 1 時間作用させた。その後、CeLytic NuCLEAR Extraction Kit (Sigma) を用いてタンパク質抽出物を調製した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、ウエスタンブロッティングにより、シグナル分子を検出した。タンパク質の検出には、Cell Signaling Technology から入手した抗体を用いた。

## ■ 結果

### (1) LPS 刺激で惹起された炎症性サイトカイン産生に及ぼす卵白リゾチームの効果

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を LPS 刺激により炎症応答を惹起した後、リゾチームを 12 時間作用させ、炎症性サイトカイン産生に及ぼす効果を検討した。その結果、図 1 に示したように、RAW264.7 細胞の IL-6 産生、および TNF- $\alpha$  産生がリゾチーム濃度依存的に抑制された。このことから、リゾチームには抗炎症作用があることが明らかになった。

### (2) 卵白リゾチームの炎症性サイトカイン産生抑制効果の経時変化

リゾチームがマクロファージに対して培養 12 時間において強力な抗炎症作用を示したことから、その経時変化について検討した。1 時間の LPS 刺激後、最も効果が顕著であった 500 $\mu$ g/mL においてリゾチームを 3 時間、6 時間、12 時間、24 時間作用させた後、IL-6、および TNF- $\alpha$  産生量を測定した。その結果、図 2 に示したように、培養 6 時間目には有意な抗炎症作用を示すことが明らかになった。

### (3) 卵白リゾチームの作用メカニズムの解明

リゾチームが炎症性サイトカイン産生を抑制したことから、その作用メカニズムを明らかにするため、IL-6、および TNF- $\alpha$  の遺伝子発現に及ぼすリゾチームの影響を検討した。1 時間の LPS 刺激後、リゾチーム (500 $\mu$ g/mL) を 3 時間、6 時間、12 時間作用させた後、細胞を回収し、IL-6、および TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を解析した。その結果、図 3 に示したように、IL-6、および TNF- $\alpha$  のいずれも遺伝子発現が顕著に抑制されることが明らかになった。

リゾチームが炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制したことから、炎症反応により惹起される、転写因子 NF- $\kappa$ B の細胞質から核への移行が抑制されている可能性が推察されたため、LPS、およびリゾチームを作用させた後細胞を回収し、細胞質内の NF- $\kappa$ B を検出した。その結果、図 4 に示したように、細胞質内の NF- $\kappa$ B 含量、および NF- $\kappa$ B に結合し NF- $\kappa$ B の核移行を抑制する I- $\kappa$ B の含量がリゾチームを作用によって大きく変化しないことが明らかになった。従って、リゾチームによる炎症性サイトカイン産生の抑制は、NF- $\kappa$ B の核移行阻害による転写活性の抑制ではなく、別のメカニズムによる作用であることが推察された。

### (4) LPS 刺激で惹起された一酸化窒素産生に及ぼす卵白リゾチームの効果

炎症性サイトカイン産生が抑制されたことから、その他の炎症性因子の産生に及ぼすリゾチームの影響を検討した。マクロファージが抗菌のために産生する一酸化窒素 (NO) の産生に及ぼす影響を検討した。NO は病原体殺傷には必要ではあるが、過剰な産生は血管拡張や低血圧の原因となる。1 時間の LPS 刺激によって RAW264.7 細胞の炎症応答を惹起した後、リゾチームを 24 時間作用させ、培地中に産生された NO を定量した。その結果、リゾチームの作用により、NO 産生が顕著に抑制されることが明らかになった (図 5)。

### (5) 貪食活性に及ぼす卵白リゾチームの影響

LPS 刺激により惹起された貪食活性に及ぼすリゾチームの影響を経時的に測定した。1 時間の LPS 刺激の後、6 時間、12 時間、24 時間後にテキサスレッドで蛍光標識したザイモサンに対する RAW264.7 細胞の貪食活性を測定した。その結果、図 6 に示したように、リゾチームは貪食活性には

影響を与えないことが明らかになった。

## ■ 考 察

卵白リゾチームは LPS で炎症応答を惹起したマクロファージ細胞に対して、転写活性を抑制することにより、炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。また、一酸化窒素産生も抑制することが明らかになった。これらの作用は、NF- $\kappa$ B の核移行の抑制ではなく、別のメカニズムであることが推察され、JNK や p38 などの MAP キナーゼの活性化抑制の可能性を検討する必要がある。また、卵白リゾチームは炎症性サイトカイン産生を強力に抑制するにもかかわらず、貪食活性には全く影響しなかったことから、異物等の除去機能は低下させずに抗炎症作用を示すことが明らかとなった。また、本研究では、LPS 非存在下においてリゾチームを作用させていることから、これまでに報告されている、リゾチームの LPS への結合による炎症惹起の阻害作用とは異なるメカニズムで作用している。

今後、腹腔から回収した初代マクロファージに対する効果や、SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) モデルマウスに対する卵白リゾチームの経口投与の効果を検証しつつ、リゾチームの持つ免疫促進作用との関連性についても解析する。

## ■ 要 約

本研究により卵白由来リゾチームは、LPS で活性化したマクロファージの炎症性サイトカイン産生、および一酸化窒素産生を抑制し、抗炎症作用を示すことが明らかになった。一方、貪食活性には影響しないことから、異物等の除去機能は低下させずに抗炎症作用を示すことが示唆された。

## ■ 文 献

1. T. Sugahara, F. Murakami, Y. Yamada and T. Sasaki (2000) The mode of actions of lysozyme as an immunoglobulin production stimulating factor., *Biochim. Biophys. Acta*, 1475, 27-34.
2. T. Sugahara, Y. Yamada, S. Yano and T. Sasaki (2002) Heat denaturation enhanced immunoglobulin production stimulating activity of lysozyme from hen egg white., *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 19-24.
3. M. Lee, J. Kovacs-Nolan, C. Yang, T. Archbold, M. Z. Fan and Y. Mine (2009) Hen egg lysozyme attenuate inflammation and modulate local gene expression in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis., *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2233-2240.

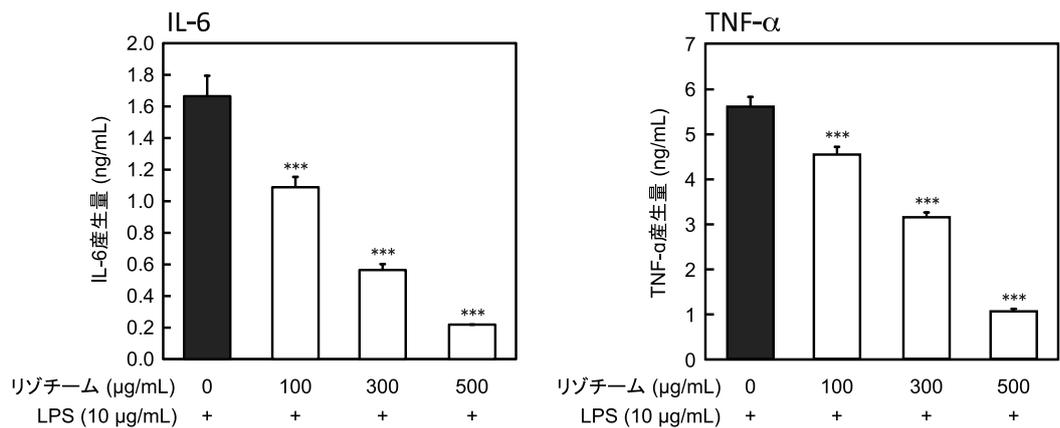


図1 マクロファージの炎症性サイトカイン産生に及ぼす卵白リゾチームの影響 <sup>\*\*\*p<0.001</sup>

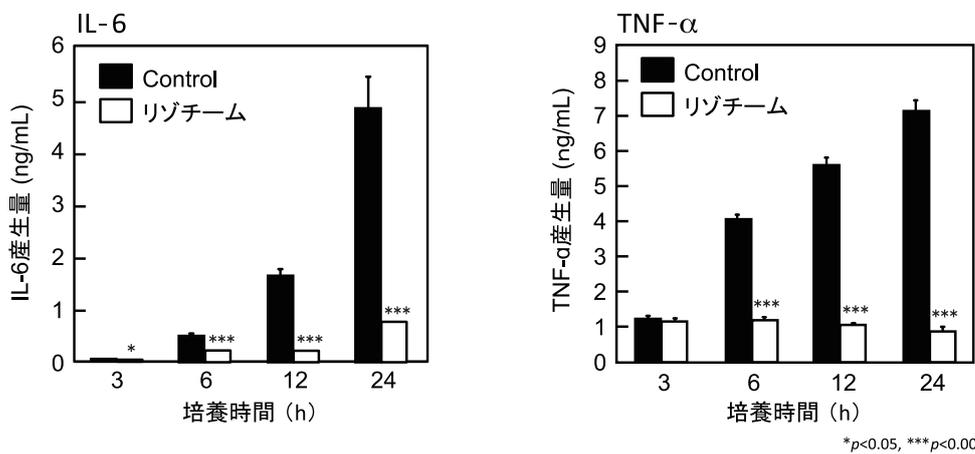


図2 マクロファージの炎症性サイトカイン産生に及ぼす卵白リゾチームの経時的影響 <sup>\*p<0.05, \*\*\*p<0.001</sup>

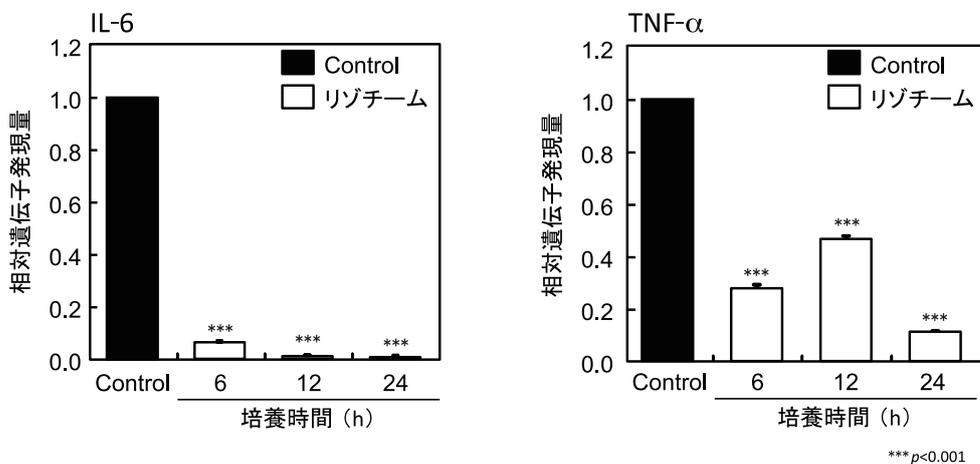


図3 炎症性サイトカイン遺伝子発現に及ぼす卵白リゾチームの影響 <sup>\*\*\*p<0.001</sup>

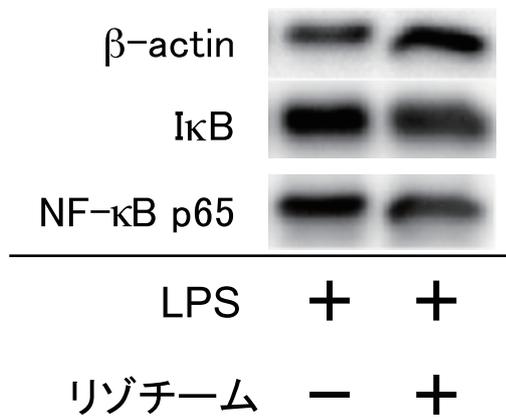


図4 細胞質 NF- $\kappa$ B 量に及ぼす卵白リゾチームの影響

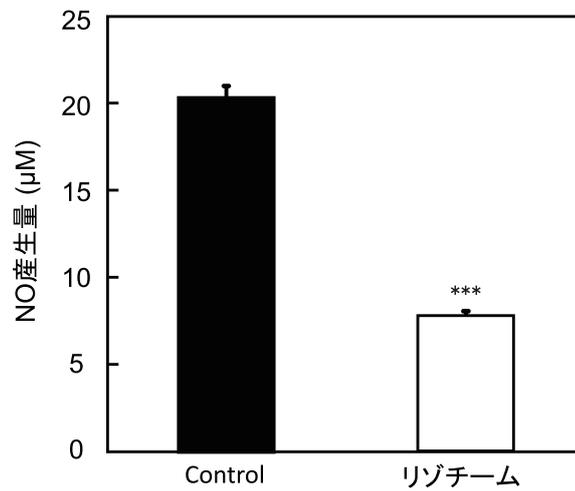


図5 マクロファージの NO 産生に及ぼす卵白リゾチームの影響

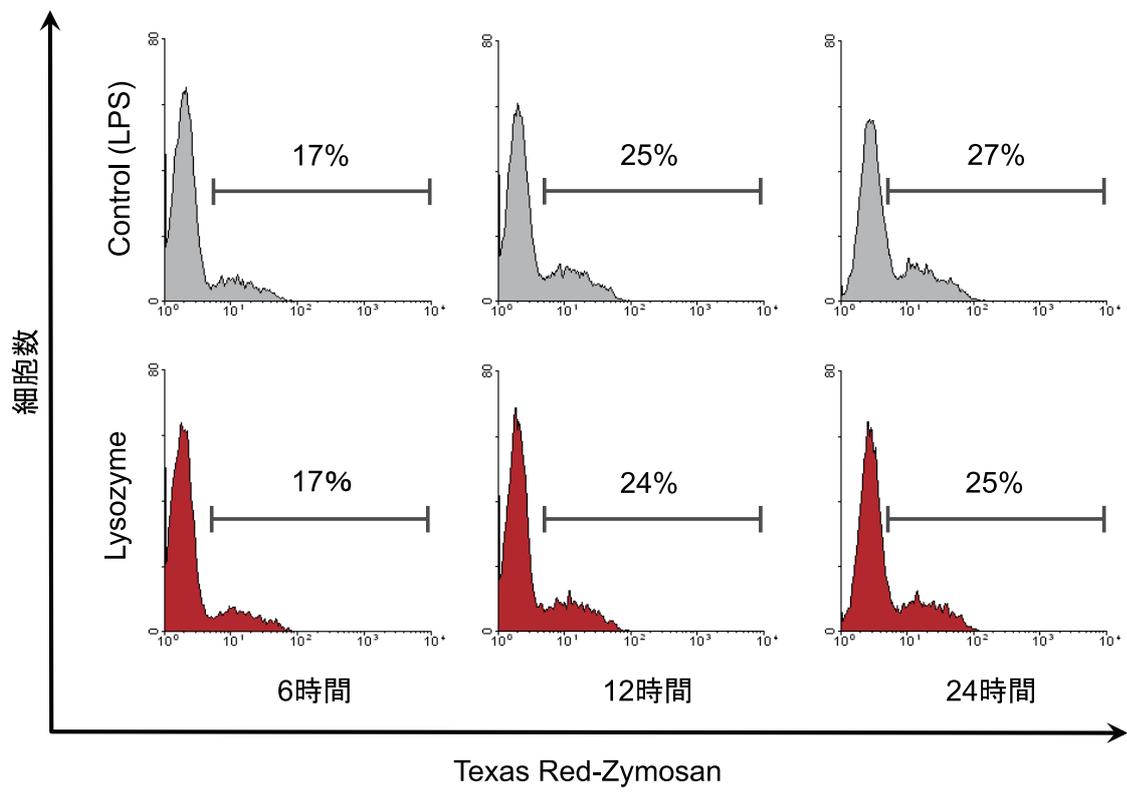


図6 マクロファージの貪食活性に及ぼす卵白リゾチームの影響