

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12339

研究課題名(和文) ガレクチン9分泌誘導を有した食品因子による新規アレルギー抑制

研究課題名(英文) F-fucoidan from *Saccharina japonica* is a novel inducer of galectin-9 and exhibits anti-allergic activity

研究代表者

水野 雅史 (Mizuno, Masashi)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：00212233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マコンブ由来F-フコイダンは、ガレクチン9発現量を増加させ、肥満細胞活性化によるアレルギー症状を抑制しました。またこのガレクチン9は、肥満細胞に結合したIgEを減少させ、脱顆粒を抑制しました。このことからF-フコイダンは抗原感作後でも、ガレクチン9を誘導することにより肥満細胞の活性化を抑制し、アレルギー症状を抑制できることが明らかになりました。この結果より、一度花粉症や食物アレルギーなど、型アレルギーを発症した人でも、F-フコイダンを摂取することで、アレルギー症状が抑えられる可能性があることが示されました。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that oral administration of F-fucoidan from *Saccharina japonica* possessed anti-allergic effects using the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction, but not by intraperitoneal administration. Oral administration of F-fucoidan at least for 7 days started after 2nd or 4th sensitization with OVA/Al(OH)<sub>3</sub> inhibited reduction of rectal temperature induced by activation of mast cells in OVA. F-fucoidan increased galectin-9 mRNA expression in colonic epithelial cells. These results suggested that F-fucoidan could suppress the allergic symptoms in sensitized mice by inducing galectin-9 production from colonic epithelial cells. In conclusion, it was suggested that F-fucoidan might become an effective therapeutic agent for patients already developed type I allergic diseases.

研究分野：食品化学

キーワード：型アレルギー フコイダン コンブ ガレクチン9

## 1. 研究開始当初の背景

ガレクチンは、 $\beta$ -ガラクトシド結合を有した糖鎖に親和性を示す動物レクチンである。その中でガレクチン9は、好酸球に対して走化因子として働くことが知られている(Wada et al., *J. Biol. Chem.*, 272(9), 6078-86, 1997)。最近、この物質はTim-3陽性細胞のアポトーシスを誘導することによって自己免疫反応を抑制することができる可能性が示された(Zhu et al., *Nat. Immunol.*, 6(12), 1245-52, 2005)。フコイダンは褐藻類由来の食物繊維として知られており、免疫応答を調節することが報告されている。我々は、これまでにマコンプに多く含まれるF-フコイダンを、血小板凝集抑制作用(Ren et al., *Br. J. Nutr.*, 110(5), 880-890, 2013)や抗炎症作用(Mizuno et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73(10), 2324-2325, 2009)を有することを明らかにしてきた。さらに型アレルギーモデルであるPCAにおいて、フコイダン経口摂取が耳介の浮腫を抑制することを認めている。アレルギー発症においてIgEは重要な働きをしているが、ガレクチン9はIgEとの親和性が高いため肥満細胞とIgEとの結合は阻害される可能性がある。このことは、これまでのアレルギーを抑制する食品因子の探索における着眼点は異なっていることである。すなわち、これまではアレルギーによってナイーブT細胞がTh2細胞へと分化し、B細胞からの抗体産生がIgMからIgEへとクラススイッチにより抗原特異的IgE産生が増加する系を抑制することであった。しかしながら、本研究では、ガレクチン9が肥満細胞に対する脱感作能を有することに注目している。

## 2. 研究の目的

ガレクチン9は、過剰免疫状態では免疫の抑制を免疫低下状態では免疫増強を発揮する作用を有しており、免疫反応における恒常性維持(ホメオスタシス)を司る物質として最近注目されている。一方、我々はこれまでに、褐藻類特に昆布に含まれている多糖体であるフコイダンを、血小板凝集抑制作用や抗炎症作用を有していることを明らかにしてきた。また、最近型アレルギーの受動皮膚アナフラキシー(PCA)反応試験においてフコイダンが耳介浮腫を抑制することを見出した。本研究では、フコイダンによる型アレルギー抑制効果が免疫反応を司るガレクチン9の分泌促進に起因しているのではないかと考え、ガレクチン9分泌を促す食品あるいは

食品因子を探索することにより、新規のアレルギー抑制方法を開発することを目的とした。

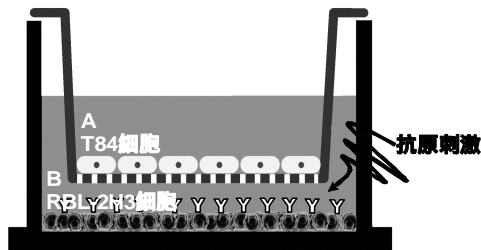
これまでのアレルギー抑制を有する食品や食品成分の探索には、細胞実験としてはヒスタミンなどのケミカルメディエーターを分泌することでアレルギー発症を引き起こす肥満細胞に直接処理する、いわゆる「ぶっかけ実験」が行われてきた。あるいは、アレルギーを実験動物に投与することによってアレルギーを誘発させる実験として、OVA感作によるアレルギー実験が良く行われている。また、最近ではNC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデル実験も良く用いられている。しかしながらこれらの実験には問題点が多く存在している。細胞へ直接処理する実験系では経口摂取するという過程が考慮されていないために、腸管からの消化吸収という過程が無視されている。また、食物繊維のように吸収されなくても腸管上皮細胞へ直接作用することで生理機能を発揮する場合もあることが報告されており(Nishitani et al., *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e62441.)。探索には向いていない点が多い。一方、実験動物を用いた系では、実験遂行する際に試料量が多量に必要なうえ、実験日数もかかるという欠点がある。それらを解決するために、両者の欠点を補うことができ、抗アレルギー効果を比較的簡便に評価できる系として、腸管細胞と肥満細胞からなる共培養系を本研究で構築することを目指した。その際一般に良く用いられている小腸様上皮細胞であるCaco-2細胞は、ガレクチン9を分泌することができないセルラインなので、抗アレルギー効果を検証するためには不適格と考え、ヒト結腸がん由来T84細胞と肥満細胞であるRBL-2H3による共培養系を考案した。この系により、腸における消化吸収の影響や測定試料の少量化も検討できるようにする。

## 3. 研究の方法

腸管細胞と肥満細胞からなるアレルギー発症疑似モデルシステムの構築

これまでに炎症性腸疾患を緩和できる食品を検索するためにCaco-2細胞とRAW264.7細胞をトランズウェル膜で仕切った疑似腸炎モデルを構築し(Tanoue et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374(3), 565-569, 2008.)、その有用性と抑制機構について検討してきた(Nishitani et al., *Biofactors*, 9(5), 522-533, 2013. Nishitani et al., *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e62441.)。今回はその技術

を応用して、トランスウェルを用いて、ガレクチン9を分泌するヒト結腸がん由来 T84 細胞を管腔側 (A)、基底膜側 (B) に肥満細胞 (RBL-2H3) を配置した共培養モデルを作成する (下図参照)。アレルギーが起こっている



アレルギー発症疑似モデル

るかどうかは、 $\beta$ -ヘキソミニダーゼ活性を測定することで判断する。RBL-2H3 細胞を抗 DNP-IgE 抗体で感作させ洗浄後、管腔側に種々の食品因子 (フコイダンを含む) を添加する。6 時間反応後、基底膜側に抗原として DNP-albumin を添加することで脱顆粒を誘引し、RBL-2H3 細胞から基底膜側の上清に放出された  $\beta$ -ヘキソミニダーゼ活性を測定し脱顆粒の指標とした。

インビボ系アレルギー実験における食品因子の効果

アレルギー発症疑似モデルで抗アレルギーおよびガレクチン9分泌が認められた食品因子を用いて、インビボでの効果を再確認する。まず PCA 反応実験を行う。PCA 反応試験は IgE と抗原により誘導される I 型アレルギーの下流の反応の動物モデルとして使用する。5 週齢、雌の BALB/c マウスにフコイダン等の食品因子を 4 日間、毎日胃内強制投与した後、抗原特異的 IgE を尾静脈より投与し、その 30 分後に最初の耳介厚を測定する。さらに、その直後抗原 (Ag) である DNP を耳介に塗布し、2 時間後に再び耳介厚を測定する。この刺激前と刺激後の耳介厚の差を IgE/Ag による浮腫とし、その差の減少程度で抗アレルギー効果を判断する。また、血中のガレクチン9分泌量については抗 IgE 抗体を用いて免疫沈降法で IgE 画分を調整し、その上で抗ガレクチン9抗体を用いたウェスタンブロット法で検出する。PCA 反応は、I 型アレルギー発症過程において後半の段階である感作された B 細胞から分泌される IgE と抗原の反応を見ている系であるが、その前の段階すなわち Th1/Th2 バランスへの影響を確認するため、OVA 誘導アレルギー実験を行う。5 週齢、雌の BALB/c マウスに抗原となる OVA/アジュバ

ンドを腹腔内に投与することで感作を行い、感作後 5 日毎に OVA 腹腔内投与による刺激を与えることでアレルギー反応を惹起する。フコイダンを含め食品因子は OVA 投与の 1 週間前から毎日胃内強制投与する。OVA 投与の 1 日前に尾静脈より採血を行い、血清中の総 IgE 量、OVA 特異的 IgG1 量を測定し、実験最終日には血清中の IgE、IgG1 量に加えて、脾細胞を調整し Th1 および Th2 型サイトカイン産生量も測定する。一方、ガレクチン9については、最終日に得た血清を用いて PCA 実験の場合と同様に測定する。

#### 4. 研究成果

(1) TA84 と RBL-2H3 による共培養系では、フコイダンによる抗アレルギー効果についてはっきりとした結果は得られなかった。しかしながら、RBL-2H3 を用いたインビトロ実験では、フコイダンは RBL-2H3 に結合した IgE を効果的に遊離させることが明らかとなった。

(2) OVA による感作 7 日前から F-フコイダンを投与し始め、OVA を 5 日毎に 4 回腹腔内投与した。OVA 投与の 1 日前に尾静脈から採血を行い、総 IgE 量を測定した。また、最終日には心採血により回収した血清で OVA 特異的 IgE、IgG1 量の測定を行った。その結果、OVA 感作後から総 IgE 量が増加し始めたが、F-フコイダン投与による影響はみられなかった。また、OVA 特異的 IgE、IgG1 量についても F-フコイダンの投与による変化はなかった。

(3) OVA による感作を 2 度行い、2 度目の感作の 9 日後に OVA を尾静脈から投与することでアレルギーを誘導した。I 型アレルギー時には肥満細胞の活性化による血管透過性の亢進に伴い、体温が低下することが知られており、直腸温度は全身性アレルギー症状の指標としてよく用いる。そこで、本実験でも肥満細胞の活性化によるアレルギー症状

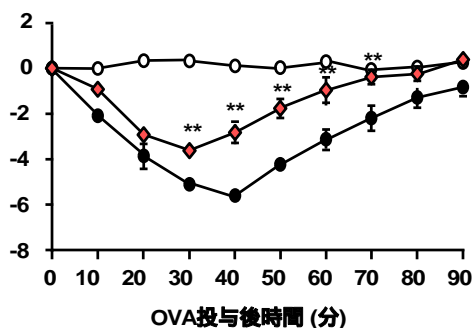


図1. OVA投与による直腸温度の変化

の指標として、直腸温度を OVA 投与の 10 分後から 90 分間測定した。その結果、図 1 に示すように、OVA コントロール群では OVA 投与後から直腸温度が低下し始め、最大 5.6 低下し、40 分をピークとして回復した。一方で F-フコイダン投与した場合、最大 3.7 低下し、30 分をピークとして回復しており、F-フコイダンによる体温低下の緩和が確認された。

(4) 腸上皮細胞での Galectin-9 発現に影響があるか調べるため、直腸温度測定後にマウスの腸上皮細胞を回収し、Gal-9 mRNA 発現量を測定した。図 2 に示すとおり、腸上皮細胞

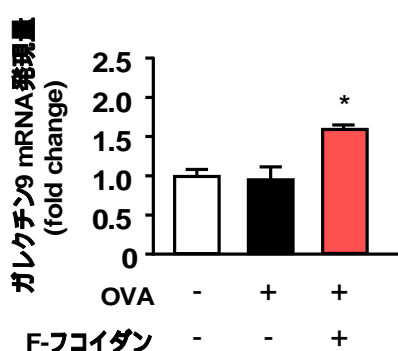


図2. フコイダン投与によるガレクチン9 mRNA発現量の変化

胞での Galectin-9 mRNA 発現量についても、F-フコイダンの投与によって増加していた。以上の結果から、マコンブ由来 F-フコイダンは、OVA 誘導性アレルギーモデルにおいて、血中総 IgE 量、および抗原特異的 IgE、IgG1 量に影響は示さなかった。また、脾細胞からのサイトカイン産生は変化せず、全身免疫系に関与しないことが明らかとなった。一方で、ガレクチン9発現量を増加させ、肥満細胞活性化によるアレルギー症状を抑制した。このことから F-フコイダンは抗原感作後でも、ガレクチン9を誘導することにより肥満細胞の活性化を抑制し、アレルギー症状を抑制できることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Tanino, Y., Hashimoto, T., Ojima, T. and Mizuno, M. F-fucoidan from *Saccharina japonica* is a novel inducer of galectin-9 and exhibits anti-allergic activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 59(1), 25-30, 2016.

2. Yamashita, S., Yokoyama, Y., Hashimoto, T. and Mizuno, M. A novel *in vitro* co-culture model comprised of Coco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine. *J. Immunol. Meth.*, 435, 1-6, 2016.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 谷野有佳、橋本堂史、藍原祥子、尾島孝男、水野雅史、マコンブ由来 F-フコイダンによる新規型アレルギー抑制機構、日本応用糖質科学会平成 27 年度大会、2015
2. Yuka Tanino, Takashi Hashimoto, Yoshiko Aihara, Takao Ojima, and Masashi Mizuno, Oral intake of F-fucoidan from *Laminaria Japonica* prevents type I allergy through secretion of galectin-9, Proceedings of the 19th international conference, 2015
3. 坂口香奈、谷野有佳、橋本堂史、水野雅史、OVA 誘導アレルギーモデルにおける F-フコイダンの抗アレルギー効果、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会、2016
4. 坂口香奈、橋本堂史、水野雅史、抗原感作状態での F-フコイダンのアレルギー抑制効果、日本農芸化学会関西支部第 498 回講演会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-shokuhin/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 雅史 (Masashi Mizuno)

神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：00212233

(2)研究分担者  
橋本 堂史 (Takashi Hashimoto)  
神戸大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：90362764

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )