

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07819

研究課題名(和文) DOSY-NMR法による硫酸化多糖分析と腸管免疫制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on analysis of sulfated polysaccharides with a DOSY-NMR spectroscopy and regulatory mechanisms in intestinal immunity.

研究代表者

宮崎 義之 (Miyazaki, Yoshiyuki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40380779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フコイダンをはじめとする硫酸化多糖の分析法の開発と生理機能の解明に取り組んだ。硫酸基と相互作用して核磁気共鳴(NMR)シグナルを変化させる一連の化合物を見だし、硫酸含量を迅速に測定する新たな定量法を構築した。また、フコイダンが細胞膜上で作用して免疫細胞の活性化を導く機構を解明し、腸管免疫細胞の活性化や腸内環境の改善を介した抗腫瘍免疫の増強およびがん性血管新生の抑制効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻に含まれるフコイダンをはじめとする硫酸化多糖類は、免疫バランスの調整など健康維持に寄与する種々の生理機能を持った食品成分である。本研究で構築したNMR分析法は、硫酸化多糖の機能品質を保証するための簡便かつ迅速な定量分析への応用が可能と考えられる。これに加えて、フコイダンによる腸管免疫増強の作用機序が明らかとなったことで、健康維持において真に効果的な食品開発の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed development of analytical method and elucidation of physiological functions of sulfated polysaccharides such as fucoidan. As the results, a series of compounds that interact with sulfate groups to change the nuclear magnetic resonance (NMR) signal were found, and constructed a new quantitative method for rapid determination of sulfate content. In addition, a mechanism by which fucoidan acts on the cell membrane to activate immune cells was clarified. Furthermore, it was revealed that fucoidan enhanced antitumor immunity and suppressed cancerous angiogenesis through activation of intestinal immune cells and improvement of intestinal environment.

研究分野：食品科学

キーワード：硫酸化多糖類 1H-DOSY-NMR 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる難消化性多糖類は、食物繊維として整腸作用や生活習慣病を予防する効果が期待されている。加えて、分子中に硫酸基を持つ特殊な多糖類(硫酸化多糖)は、抗がん作用や免疫調節作用などでより強い生理機能を示すことが報告されている。

先行研究では、食品機能性の観点から、海藻由来の硫酸化多糖類であるフコイダンの生理機能を検証し、オキナワモズクフコイダンがヒト乳がん細胞株のアポトーシス死を誘導すること⁽¹⁾、メカブフコイダンがマウス脾臓細胞の抗体産生を向上させること⁽²⁾などを報告してきた。また、マウスを用いた動物試験の結果から、フコイダンを摂取することでNK細胞の活性化など抗腫瘍免疫の増強に効果を有することを明らかにし、学会などで報告している。さらに、健常ボランティアを対象とするフコイダン摂取試験を実施し、唾液分泌型IgA抗体の産生量を増加させるなど、ヒトの免疫力向上に寄与する可能性を見いだしてきた⁽³⁾。

一方、多糖類は、分子の大きさや構成成分が一定しておらず、構造も複雑なため、公的な定量分析法が未だ定められていない。また、免疫細胞の活性化やがん細胞のアポトーシス死誘導において、細胞表面受容体を介した作用機序が一部示されているものの^(4,5)、決定的な立証には至っていない。

そうした状況を踏まえて、フコイダンの機能的品質を適切に評価するためには、硫酸化多糖の新規分析法の開発とより詳細な作用機構の解明が必要とされる。

<引用文献>

- ① Yamasaki-miyamoto *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **57**:8677-8682, 2009
- ② Takai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**:1743-1747, 2014
- ③ 宮崎ら, *FoodStyle21* **18**:21-25, 2014
- ④ Teruya *et al.*, *Glycoconj. J.* **26**:1019-1028, 2009
- ⑤ Yamasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**:1163-1168, 2012

2. 研究の目的

本研究では、硫酸化多糖フコイダンによる免疫調節機構を明らかにし、健康維持に寄与するフコイダンの効果的な食品利用法の考案に資する学術情報を得るため、(1) 機能性発現に必要な硫酸基をターゲットとした硫酸化糖の新規分析法の構築と(2) フコイダンの生理機能の発現機構の解明を目的として、以下の研究に取り組んだ。

(1) ¹H-DOSY-NMR法による硫酸化糖分析：硫酸化多糖が生理機能を発揮するためには、一定の糖鎖長と硫酸基が必要と考えられている。本研究では、それらの構造的特徴(糖鎖長や硫酸基数)をとらえる核磁気共鳴(NMR)装置を用いた硫酸化糖識別分析法の構築を試みた。

(2) フコイダンの生理機能発現機構：フコイダンは免疫増強効果を有することが多数報告されている一方で、難吸収性の食品成分であることから、腸管に存在する免疫細胞、特にマクロファージなどの活性化に働くと考えられている。本研究では、マクロファージにおけるフコイダンの作用機序を解析するとともに、フコイダン投与試験により腸管におけるフコイダンの作用標的ならびに生理的效果を検討した。

3. 研究の方法

(1) ¹H-DOSY-NMR法による硫酸化糖分析：① 市販の硫酸化単糖を用い、硫酸基の識別に適した化合物(リガンド)を探索した。その際、硫酸基が負電荷を有することから、正電荷を有する化合物を候補リガンドとして選抜し、¹H-NMR測定における化学シフト値の変化を指標として硫酸基との相互作用を評価した。② 磁場に勾配をかけることで分子量に応じた化学シフト値の変化を検出するdiffusion-ordered spectroscopy (DOSY)-NMR測定によって、リガンドと硫酸化糖が結合することで生じる分子量の変化を利用した分別分析を試みた。③ リガンドと硫酸化糖の混合比を変えることで生じる化学シフト値の変化を指標とした定量解析法を検証した。

(2) フコイダンの生理機能発現機構：① 培養試験において、蛍光標識フコイダンを用いてマクロファージ様細胞株への結合分布を評価すると共に、細胞の活性化におけるフコイダンとβ-グルカンの細胞膜受容体を介した協調的な作用機序を検証した。動物試験においては、② 蛍光標識フコイダンを用いて、フコイダンの作用標的となる腸管免疫細胞の同定を試みるとともに、フ

コイダン摂食試験によって、③ 腸管免疫細胞の活性制御と全身免疫への波及効果ならびに腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ^1H -DOSY-NMR 法による硫酸化糖分析

① リガンド化合物の探索：硫酸基が負電荷を示すことから、対となる正電荷を有する 30 種の含窒素化合物を候補として ^1H -NMR 測定を行った。スペクトル解析の結果、硫酸化糖および第 4 級アンモニウム化合物においては、明瞭な化学シフト値の変化を観察できなかった。一方、以下の 6 種：イミダゾール、ニコチンアミド、ピリジン、アルギニン、グリシンをはじめとする候補化合物で、硫酸化糖と共存した時のみ化学シフト値の変化が認められ、それらをリガンドとして硫酸基を検出可能であることが示された。本研究では、化学シフト値の変化量が大きく、単一ピークとして検出され、糖類のスペクトルと重複しないといった条件を満たすニコチンアミドおよびイミダゾールを有力リガンドとして、更なる解析を行った。

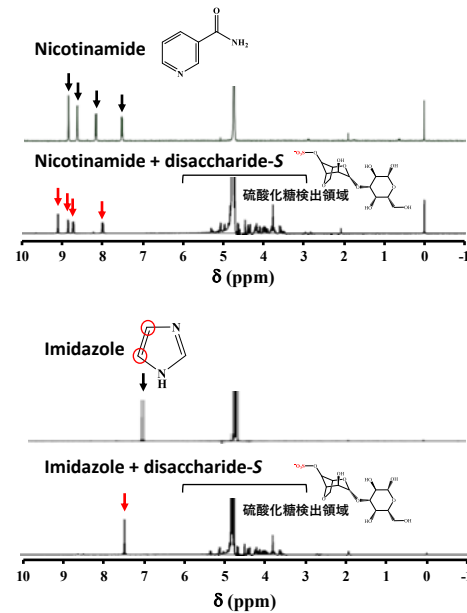


図1 硫酸化糖との相互作用に伴うリガンド化合物の化学シフト値の変化

② DOSY-NMR 解析：ニコチンアミドをリガンドとして用い、硫酸化糖と結合することで生じる分子量の変化に基づく分画分析を試みた。その結果、単糖およびオリゴ糖については、分子量に応じたスペクトルの分離が確認できた。しかし、リガンドと硫酸化糖を共存させた際には、それぞれ単独時とは異なる拡散を示したものの、両者が同一線上に並ぶことは無かった。この結果は、硫酸化糖とリガンドとの相互作用においては、結合と遊離がくり返される平衡状態にあり、両者の平均的な位置に共鳴スペクトルが観察されるものと推察された。以上により、本法によって、多成分混合系においてリガンドが結合する成分（硫酸化糖）と相互作用の無い他の成分とを識別することができず、硫酸化糖の識別定量分析に適用することは困難であると考えられた。

③ 硫酸化糖の定量分析：リガンドと硫酸化糖の混合モル比に対して、 ^1H -NMR 測定から得られたケミカルシフト値をプロットした結果、イミダゾールと硫酸化ネオカラビオースの混合モル比 1.0 において変曲点を示すことが明らかとなった。更に、この傾向は、単糖から 6 糖までの硫酸化糖で一定して認められ、中性糖では化学シフト値の変化は生じなかった。従って、イミダゾールと硫酸基は 1 : 1 の割合で相互作用しており、既知モル濃度のイミダゾールをリガンドとして用いることで、硫酸基含量を推定できることが示された。また、正電荷のイミダゾールは、負電荷を有するカルボキシル基（海藻多糖類の構成成分であるウロン酸の官能基）とも相互作用することから、硫酸化糖と同様の化学シフトの変化（定量における正の誤差）が生じたが、エステル化による前処理を行うことで、リガンドとカルボキシル基との相互作用をブロックできることを示した。加えて、本法の市販の硫酸化多糖類や天然海藻抽出物に含まれるフコイダンにおける硫酸基定量への応用に向けて前処理工程および至適分析条件を検討している。

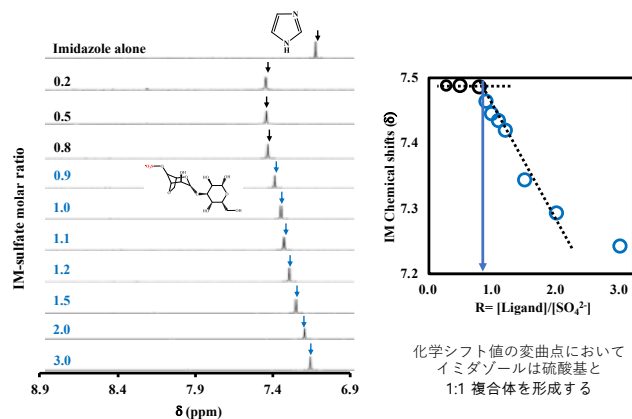


図2 Ligand-aided ^1H -NMRを用いた硫酸含量の推定

(2) フコイダンの生理機能発現機構

① 培養試験によるフコイダンの生理機能発現機構の解析：先の研究からフコイダンがマクロファージに作用することで免疫機能の亢進に働くことが示されている。本研究では、フコイダンが細胞膜上の受容体と相互作用することでマクロファージを活性化させると考え、同じく細胞膜上で作用することが知られている酵母由来多糖類β-グルカン（ザイモザン）との機能的相互作用を、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 を用いて検討した。その結果、オキナワモズク由来フコイダンはRAW264細胞の免疫機能（サイトカインおよび一酸化窒素産生）において、ザイモザンとの協調的増強効果を示すことを明らかにした。また、蛍光標識フコイダンを用いて RAW264 細胞における結合局在性を検討し、オキナワモズクフコイダンが RAW264 細胞の細胞膜表面上で作用することが明らかとなり、フコイダン受容体の存在が示唆された。加えて、本強調効果には、フコイダン受容体とβ-グルカン受容体（デクチン-1）との相互作用が重要であることを明らかにした。しかし、フコイダン受容体の同定には至らなかった。

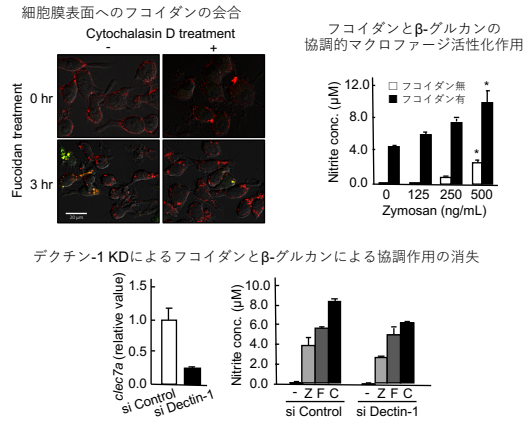


図3 細胞膜受容体を介したフコイダンのマクロファージ活性化作用

② 腸管免疫細胞におけるフコイダンの作用標的：ビオチン標識フコイダンを用いて、腸管におけるフコイダンの作用標的細胞の同定を試みた。その結果、フコイダンは、マウス腸管における腸間膜リンパ節、パイエル板、粘膜固有層ならびに粘膜構成上皮間に存在するマクロファージや樹状細胞のほか、リンパ球などにも結合することを示した（未発表）。各細胞集団間および集団内においてフコイダン結合性が異なるため、より詳細な標的細胞集団の解析ならびに結合後の細胞の分化および活性化に対する効果とその作用機序を引き続き検討している。

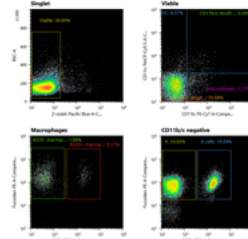


図4 フコイダンが相互作用するマウス腸間膜リンパ節細胞のポピュレーション解析

③ フコイダンによる腸内環境の制御：フコイダンによる腸管免疫の活性化と全身への波及効果を検証するため、がん性血管新生のフコイダン含有食品による抑制効果を検討した。マウスメラノーマ細胞株 B16 を封入した基底膜マトリクスゲルを皮下注射したマウスに2種フコイダンおよびアガリクス菌糸体エキス末からなる食品素材（CUA-フコイダン）を2%含有する食餌を与えたところ、ゲル内のヘモグロビン量および CD31 発現細胞数が対照群と比べて低値を示し、CUA-フコイダン摂取によって血管新生が抑制されることが示された。一方、VEGF によって誘導される血管新生は CUA-フコイダン摂取による顕著な影響を認めず、ゲル内の VEGF 発現量が CUA-フコイダン摂取マウスで低下していたことから、CUA-フコイダンは VEGF 発現の抑制を介してがん性血管新生を抑えることが明らかとなった。また、ゲル内への免疫細胞の浸潤状態を観察したところ、CUA-フコイダン摂取により CD206 陽性抑制型マクロファージおよび制御性 T 細胞の割合が低下していた。CD206 陽性抑制型マクロー

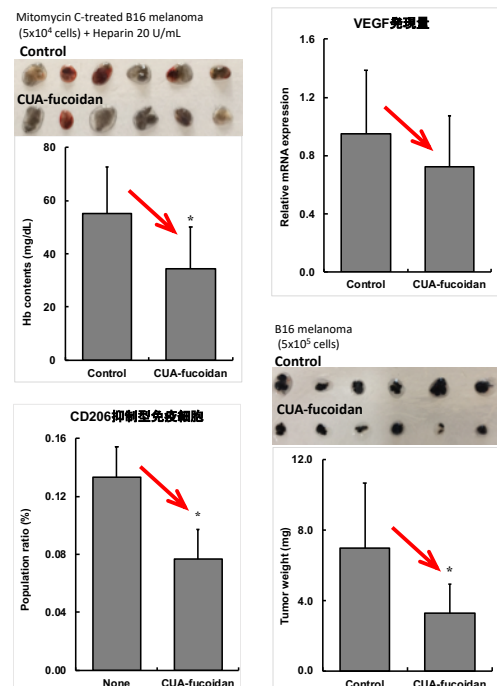


図5 がん性血管新生と腫瘍成長に対する CUA-フコイダン摂取による抑制効果とその作用メカニズム

ージは VEGF を産生することが知られており、CUA-フコイダン摂取マウスにおける VEGF 発現の低下への関与が示唆された。加えて、CUA-フコイダン摂取マウスでは、B16 皮下移植腫瘍の形成が有意に抑制された。以上の結果から、腸管免疫への作用が示唆されている CUA-フコイダンは、腫瘍微小環境への抑制型免疫細胞の浸潤を抑制し、VEGF 発現の低下に伴う血管新生の抑制を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性が示された。また、当研究では、オキナワモズクフコイダン摂取に伴い、腸内細菌叢の改変が生じることを明らかにしており、腸内環境の変化が全身免疫系の制御に何らかの影響を与えているものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazaki Yoshiyuki, Iwaihara Yuri, Bak Juneha, Nakano Hayato, Takeuchi Shugo, Takeuchi Hideaki, Matsui Toshiro, Tachikawa Daisuke	4. 巻 516
2. 論文標題 The cooperative induction of macrophage activation by fucoidan derived from Cladosiphon okamuranus and α -glucan derived from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 245 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Juneha Bak, Yoshiyuki Miyazaki, Toshiro Matsui
2. 発表標題 An establishment of NMR-based analytical assay for sulfated saccharides in solution.
3. 学会等名 ICoFF 2019 The 7th international conference on Food Factors, Kobe（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Juneha Bak, Yoshiyuki Miyazaki, Toshiro Matsui
2. 発表標題 Ligand-aided quantitative and selective NMR assay for sulfated saccharides in solution.
3. 学会等名 International symposium between National Taiwan University and Kyushu University, Kyushu University（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Juneha Bak, Hayato Nakano, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Suppressive effects of fucoidan-agaricus mix (CUA-fucoidan) on angiogenesis and tumor growth in B16 melanoma-bearing mice
3. 学会等名 104th Annual Meeting of The American Association of Immunologists（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Yuri Iwaihara, Masaji Nakamizo, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 Potentiating effects of high-molecular weight fucoidan-agaricus mix (CUA) feeding on tumor vaccination
3. 学会等名 102nd Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 祝原由莉, 中溝公次, 竹内秀吾, 竹内秀晃, 立川大介, 宮崎義之
2. 発表標題 硫酸化多糖フコイダンによるマクロファージ活性化機構の解明
3. 学会等名 第65回日本食品科学工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiyuki Miyazaki, Yuri Iwaihara, Masaji Nakamizo, Shugo Takeuchi, Hideaki Takeuchi, Daisuke Tachikawa
2. 発表標題 The induction of macrophage activation by a sulfated polysaccharide fucoidan
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門機能性多糖分析学寄附講座
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/bapsa/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	祝原 由莉 (Iwaihara Yuri)		