

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590004

研究課題名（和文） 消化管免疫応答を制御する冬虫夏草属菌由来の高分子アジュバントに関する研究

研究課題名（英文） Identification of active ingredients of culture fluid from entomogenous fungi that modulate ileal immune responses in murine Peyer' s patch cells.

研究代表者

高野 文英 (TAKANO FUMIHIDE)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20236251

研究成果の概要（和文）：研究代表者は研究機期間内に、冬虫夏草属菌が産生する消化管免疫調節物質の構成成分を明らかにする研究を行った。その結果、ハナサナギタケ培養物に強い免疫調節活性があり、精製の結果、糖タンパクであることが判明し、詳細な解析の結果、ペプチドは8種類のアミノ酸、糖は $\beta$ （1→3）グルカンから構成されることが分かった。さらに詳細な構造解析の結果、免疫賦活化高分子は多糖とペプチドの混合物であった。また、冬虫夏草属菌を用いた機能性食品等に配合されるプロアントシアニジンやニンニクについても経口免疫アジュバント活性を調べたところ、強い活性を示すことを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The culture fluid of entomogenous fungi including genus *Paecilomyces* and *Cordyceps* promotes ileal immune responses in murine Peyer' s patch cells ex vivo, and their constituents were identified as glycoprotein, molecular mass was up to 17 kD, containing 8 amino acids and  $\beta$ （1→3）glucan. The detail analyses of chemical structures of glycoprotein revealed that the glycoprotein was mixture of peptides (approximately 70% glucans and 25% peptides including amino acids monomer). Proanthocyanidins, stilbenoids or garlic extract, which are frequently used as health foods of entomogenous fungi, also showed a potentiating activity on ileal immune responses. These data suggested that some entomogenous fungi and the mixture of glucan and peptides have an adjuvant activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：冬虫夏草；糖タンパク；構造；免疫アジュバント；経口免疫；；アミノ酸；多糖

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 消化管免疫について

消化管粘膜において免疫応答にあずかるリンパ組織はパイエル板、小腸上皮組織固有リンパ球およびクリプトパッチであり、ここに存在する T リンパ球が中心となって免疫応答を司る。T 細胞による免疫反応の優位性は抗原刺激を受けたヘルパー T 細胞 (Th0) が分化し、T ヘルパーサブタイプ (Th1 と Th2) のどちらかに傾くことかにより決定され、Th1 優位に免疫応答が活性化されると単球系細胞や T 細胞の活性化による感染予防、腸内健全化、およびアレルギー抑制が、Th2 優位に免疫応答が活性化するとウイルスや寄生虫に対する抗体産生がそれぞれ誘導される。

### (2) 消化管免疫と創薬

このような消化管免疫システムは、病原菌ばかりでなく、食物由来の成分や薬物によっても誘導される。したがって、消化管免疫応答に影響を及ぼす薬物や食品を調べることにより、腸内環境を保全する効果やアレルギーを抑制する食品や薬物などを見出すことが可能であり、さらには、消化管免疫におけるある特定の免疫応答 (Th1) を選択的に刺激する物質を探索することにより、新奇な作用機序をもつアレルギー治療薬や感染予防薬を見出すことが可能である。

### (3) 冬虫夏草属菌

生きた昆虫に寄生する子囊菌 (バツカク菌科) は、世界で 300 種以上が知られ、中国固有種のガ (*Hepialus armoricanus*) の幼虫に寄生し、キノコ状の子実体 (子実体) を形成する「冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc」は、「不老・滋養強壮」の生薬や薬膳食材として用いられる。一方、昆虫寄生菌のうち、無性孢子の子実体を形成する *Paecilomyces* 属も民間薬として利用され、ガの蛹に寄生するハナサナギタケ (*Paecilomyces tenuipes*) は「冬虫夏草」と類似した薬効がある。昆虫寄生菌は、自然界において希少かつ絶対数が少ないうえ、数センチの大きさでしかないことから、薬用・創薬資源としての量的確保が困難であり、最近まで研究が進展しなかった。研究代表者はこれまでに、昆虫成分を含まない液体培地で昆虫寄生菌を大量培養することに成功し、菌の量的確保の問題を解決するとともに、その培養代謝液には T 細胞免疫応答の賦活化や抗酸化活性、消化管 Th1 免疫応答の選択的活性化、および培養代謝液中の糖タンパクには抗ガン剤で骨髄機能を障害させたマウスに経口投与することにより、白血球と赤血球が回復する骨髄機能改善効果があることを見

出している。

## 2. 研究の目的

当該研究では、消化管免疫応答を制御可能な免疫アジュバントを冬虫夏草属菌の培養液から見出し、この機能性を解析することで新規な消化管機能改善や食物アレルギーを改善可能な創薬シーズあるいはリード化合物とすることを目標にした研究である。冬虫夏草属菌の中でも、消化管免疫を調節する活性が高い *P. tenuipes* 菌を野外採取して培養し、得られる代謝産物を精製して詳細な構造解析を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ハナサナギタケ及び類縁菌の野外採取と消化管免疫応答に対する活性評価

5~8 月にかけて、東北から北陸の広葉樹林帯に発生する新鮮なハナサナギタケ *P. tenuipes* を採取後、分生子柄束から無菌的に分生孢子を採取し、2 ヶ月間静置培養する。培養基表面には白色の菌糸体と野外と同じ形態をもつ分生子柄束が多数発生する。培養終了後に菌糸体と代謝液を濾別して培養代謝液を凍結乾燥し、以下の評価系で活性を調べた。

### (2) 消化管免疫応答活性評価

C57BL/6N マウスからパイエル板を摘出し、リンパ球系細胞を分離後にシャーレに播く。この培養細胞系に上記の培養代謝液エキスあるいは、その分画物を添加して 24~72 時間培養する。培養終了後に、培養液上清を回収するとともに、細胞から常法に従って total RNA を抽出する。培養液上清については IL-2 と IFN- $\gamma$  (Th1)、IL-4 (Th2)、IgA あるいは IgG1 のそれぞれのサイトカインや免疫グロブリンを ELISA 法で測定した。

### (3) アジュバント PGF の精製と分析

野外で採取した冬虫夏草菌を無菌的に 6 ヶ月間にわたって静置培養し、菌糸体と子実体が十分に形成した段階で得られるが培養液について、消化管免疫応答に及ぼす影響を調べ活性を評価する。次いで、得られたろ液の凍結乾燥物を限外濾過膜による透析の後に内液をゲル濾過し、SDS-PAGE により分画物の精製度合いをチェックしたのち、 $\beta$ -グルカン測定キット、NMR および Bradford 法により、多糖およびタンパク含量を測定した。次いで、これらを酸およびアルカリ処理してからエタノールを加えてタンパク変性と沈殿を行い、その上澄みについて糖鎖解析を実施した。これとは別に、多糖体をゲル濾過により除去し、これを酸加水分化したのち、アミノ酸分

析装置にかけ、構成アミノ酸の含量を測定した。

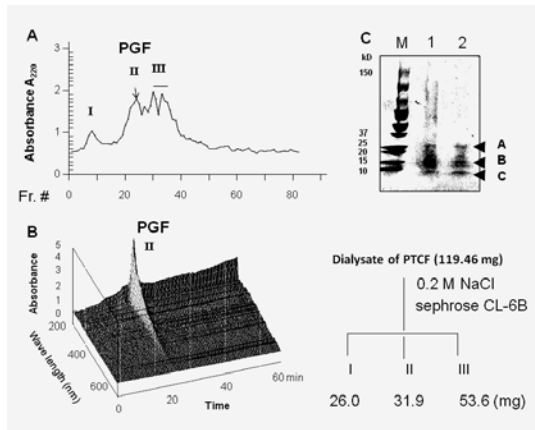


図1 冬虫夏草培養液中のアジュバント活性物質 PGF

(4) 冬虫夏草属菌と併用される天然物の生理活性評価

冬虫夏草属菌は薬膳として利用されることも多く、メリンジョ、ニンニク、トウガラシ、ブドウポリフェノールといった天然素材とともに利用されることが多い。そこで、これらの天然物についてエキスを作成し、それらの消化管免疫応答や各種の免疫関連作用についても調べた。

4. 研究成果

主な研究成果

(1) 培養と精製

平成 22 年度は、採取地域（東北・北陸エリア）の梅雨明けが早く高温乾燥な夏が続いたため、菌育成環境の悪化や昆虫発生数の減少が影響したが、採取回数を多くすることにより、採取目標のハナサナギタケを含む 5 種 20 検体の菌体を採取するのに成功した。採取した菌種のうち、ハナサナギタケ、クモタケ、ムラサキクビオレタケ、カメムシタケについては、菌糸体の発生が良好であったので、昆虫成分を含まない酵母寒天培地で大量培養を行った。次いで、培養代謝液のエキス調整後に、分子ふるいゲル濾過カラムに通導して糖蛋白の精製を行いマウスで消化管免疫賦活化試験を行った結果、ハナサナギタケ、クモタケの培養代謝液において、3 種類の免疫調節が含まれていることが判明し、2 種の菌に含まれる糖蛋白の分子量は近似していることが電気泳動により判明した。

(2) アジュバント糖タンパクのアミノ酸分析と冬虫夏草属菌と併用される天然物の活性

①アジュバントの構成物

平成 23 年度では、発生した東日本大震災の影響で、発生時期における冬虫夏草属菌採取

が実行できなかった。そこで、前年に大量培養に成功した培養液からアジュバント成分を単離精製し、糖たんぱくの量を算出したところ、0.3w/w%と極めて少ないことが判明したが、得られた 100 mg について、ペプチド分析を実施した。培養物から分画・精製した免疫活性化アジュバント物質は、多糖含有量が約 70%，蛋白が約 10%を含有する。蛋白について、アミノ酸分析を実施した結果、グルタミン酸含有率が最も高く（10%以上）、ついでプロリン（4%）、ロイシン（3%）、セリン（2%）、アラニン（2%）、アスパラギン酸（2%）、フェニルアラニン（2%）であった。さらに、多糖について糖鎖解析を実施した結果、 $\beta$ （1 $\rightarrow$ 3）が主たる構成多糖で、他に $\beta$ （1 $\rightarrow$ 4）および $\beta$ （1 $\rightarrow$ 6）グルカンがわずかに存在することが明らかとなった。さらに、糖の組成については、マンノース、アロース、ガラクトース、グルコースであり、グルコースのお存在比率が最も高く、次いでマンノースであることが NMR により判明した。

当該年度の研究では、自然災害に遭ったため、目的とする冬虫夏草属菌の採取が出来ず、培養およびアジュバント画分の精製ができなかったため、冬虫夏草属菌と併用されることが多い天然物について消化管免疫アジュバント活性やその他の生物活性についても評価した。

②カプサイシンとカロテノイド類の消化管免疫賦活活性

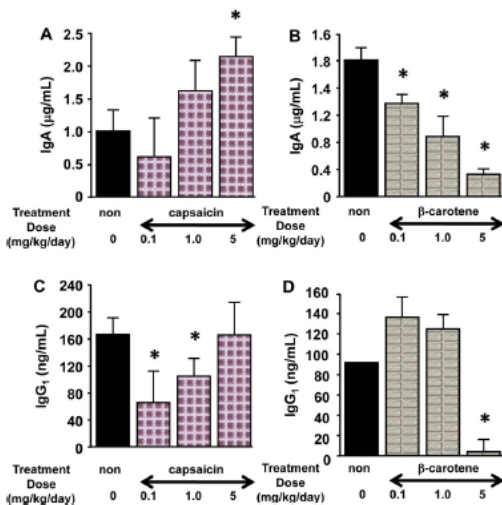


図2 カプサイシンとカロテノイドの免疫グロブリン産生に及ぼす影響

冬虫夏草料理に使用されるトウガラシ類から得られるカプサイシン、あるいはカロテノイドをマウスに経口投与して得られるパイエル板構成細胞について LPS 刺激化による免疫グロブリン産生を調べた結果、カプサイシンは IgA と IgG1 の産生を誘導するのに対して、 $\beta$ カロテンはこれらの産生を抑制する作用を示した（図2）。得られたこれらの成果は、論文にまとめ学会や海外学術誌に報告することができた。

③ メリンジヨによる消化管免疫賦活活性とその活性成分

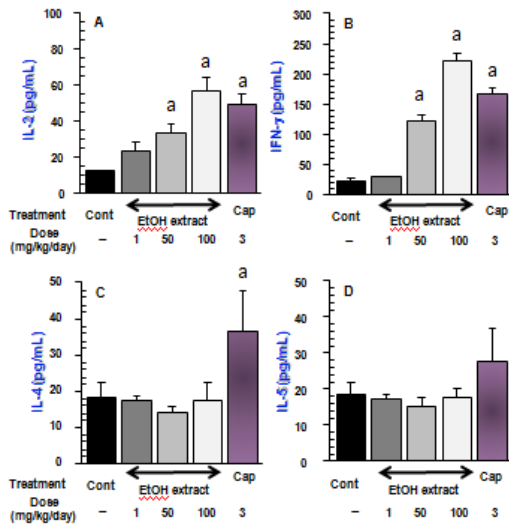


図3 メリンジヨエキスのパイエル板サイトカイン産生増強活性

メリンジヨはグネツム科の果実であり、インドネシアで食材として利用されるが、冬虫夏草属菌との併用で、免疫機能が上昇することを見出している。そこで、メリンジヨ果実のエキスについてマウスパイエル板を用いたアジュバント活性を評価した結果、強い IL-2 および IFN- $\gamma$  産生誘導作用があることが分かった (図3)。そこで、本エキスについて、活性を追いながら生理活性成分の探索を実施した結果、新規化合物を含むスチルペノイド類を見出すことに成功した (図4)。この本研究成果については論文にまとめ海外学術誌に報告することが出来た。

単離したスチルペノ誘導体の構造

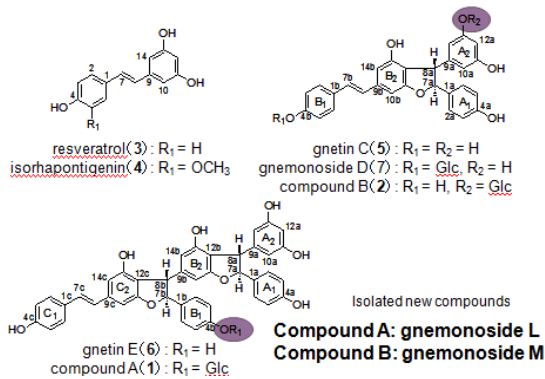


図4 メリンジヨより単離された新規スチルペノイド

④ ニンクエキスの消化管免疫賦活活性とその活性成分

ニンクは冬虫夏草の薬膳料理にも頻繁に用いられているものであるが、消化管免疫に及ぼす影響は知られていないので、活性を

評価した。

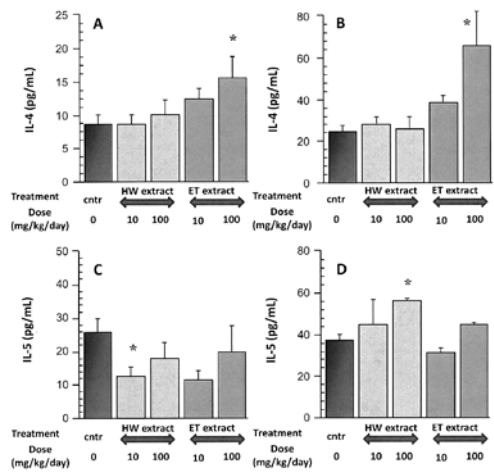


図5 ニンクエキスのパイエル板サイトカイン産生制御活性

その結果、ニンクエキスは、エタノール抽出したものに、パイエル板による強い IFN- $\gamma$  の産生誘導活性があることが分かった。さらに、この作用を担う成分について探索した結果、ニンク特有の成分である硫黄有機化合物の DADS とにおい前駆物質のアリインが担っていることも明らかにすることができた。さらに、これらのおい物質やニンクエキスを経口投与したマウスからパイエル板構成細胞を採取して、これらの細胞

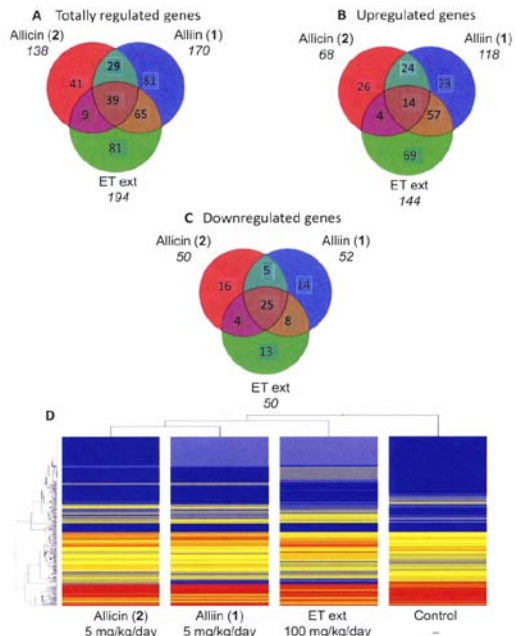


図6 ニンク、アリイン、アリシン投与後のパイエル板遺伝子発現に及ぼす影響とその網羅的解析結果

内に発現する遺伝子について DNA マイクロア

レイ法を用いて網羅的に解析を行った。その結果、インターフェロン誘導に関する制御因子の活性化が認められ、さらにコレステロール代謝や造血に与るいくつかの生体内因子に対しパイエル板で制御していることも新たに明らかにすることができた (図 6)。これらの研究成果を学会発表するとともに、海外の学術雑誌に報告した。

#### ⑤その他の天然物の活性

上記以外についても、冬虫夏草属菌を主とした機能性食品に添加されるポリフェノールのプロアントシアニジンにも抗炎症あるいはメラニン生成阻害といった活性があることを見出すことができ、これらの研究成果を学会および海外学術誌に報告することが出来た。

#### (3) 冬虫夏草属由来アジュバントの詳細分析

冬虫夏草採取と大量培養が可能となった最終年度 (H24 年度) において、再度ハナサナギタケ *P. tenuipes* 由来アジュバント PGF のスケールアップを行い、タンパク・ペプチド画分について詳細な分析を行った。その結果、これらは先のグルタミンやプロリンなどの遊離アミノ酸を主とするペプチドの断片からなることが、ゲル濾過、電気泳動およびアミノ酸分析法から明らかになり、消化管免疫賦活はこれらのペプチドが存在しないと誘導されないことが、判明した。

すなわち、冬虫夏草由来アジュバントの PGF は、 $\beta$  グルカン、ペプチドおよび遊離アミノ酸の混合物であることが判明した。

#### (4) 総括

本研究成果から、冬虫夏草属菌には消化管免疫応答の制御活性があり、その活性を示す PGF は多糖体とアミノ酸、ペプチドの混合物であることを明らかにすることが出来た。さらに、冬虫夏草属菌と併用される天然物にも経口免疫を不活化する作用があることを明らかにすることができ、それらについてはいくつかの生理活性成分を突き止めることもできた。

冬虫夏草由来のアジュバント物質 PGF (多糖・ペプチド混合物) について、活性がペプチドか、多糖体の単独によるものか、あるいはこれらの混合が重要であるかを突き止めることにより、新奇な経口免疫アジュバントのリード化合物になりうる。

当該研究の最終年度において、冬虫夏草属菌の中でもセミ由来 (ツクツクボウシタケ *P. cicadae*) の培養代謝物には、パイエル板 Th17 からのサイトカイン産生を抑制する新たな結果が得られた。Th17 が産生する IL-17 はアレルギー応答と密接な関係があり、制御活

性や生理活性成分について、さらに研究を進めることで、食物アレルギーの緩和に役立つ新たな機能性をもった天然物薬物を見出すことも可能となる。

今後も食物アレルギーを標的とした新規生理活性の探索や PGF の活性本体について研究を継続する予定である。

#### 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 4 件)

1. T. Tatsuno, M. Jinno, Y. Arima, T. Kawabata, T. Hasegawa, N. Yahagi, F. Takano, T. Ohta. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 35(6): 909-916, (2012).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.35.909>
2. N. Ota, F. Takano, S. Muroga, T. Kawabata, Y. Ishigaki, N. Yahagi, T. Ohta. Garlic extract and its selected organosulphur constituents promote ileal immune responses ex vivo. *Journal of Functional Foods*, 査読有, 4(1): 243-252, (2012).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.11.003>
3. H. Kato, M. Samizo, R. Kawabata, F. Takano, T. Ohta. Stilbenoids from the melinjo (*Gnetum gnemon* L.) fruit modulate cytokine production in murine Peyer's patch cells ex vivo. *Planta Medica*, 査読有, 77(10): 1027-1034, (2011).  
DOI: 10.1055/s-0030-1250742
4. M. Yamaguchi, N. Yahagi, H. Kato, F. Takano and T. Ohta. Capsicum extract and its constituents modulated the production of immunoglobulins in Peyer's patch cells ex vivo. *Journal of Functional Foods*, 査読有, 2(4): 255-262, (2010).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.09.002>

[学会発表] (計 6 件)

1. 高野文英 (代表). 天然薬物資源の薬理的評価と活性成分に関する研究; 腸管免疫系および骨髄系に対する作用を中

- 心として、日薬研究会、日本薬科大学、2012年5月28日(月)
2. 高野文英 (代表). Fermentation Food Symposium Kanazawa 2012 ("City Area Project 2009"), Kanazawa University-Ishikawa Prefectural University-Industrial Research Institute of Ishikawa, 「発酵と薬効」、Kanazawa (Kanazawa University), 2, March 2012.
  3. 高野文英. Fermentation Food Symposium Kanazawa 2011 ("City Area Project 2009"), Kanazawa University-Ishikawa Prefectural University-Industrial Research Institute of Ishikawa), Fumihide Takano, "Ileal Immune Response with Fermentation Food", Kanazawa (Kanazawa University), 21, January 2011.
  4. 高野文英 (代表). 白鶴霊芝エキスのマウス小腸パイエル板サイトカイン産生・抗体産生に及ぼす影響, および発現遺伝子の網羅的解析; 第4回食品薬学シンポジウム、東京、2011. 10. 28~29.
  5. 川畑陵介 (代表). メリンジョ果実部に含まれる化合物の生物活性評価; 第4回食品薬学シンポジウム、東京、2011. 10. 28~29.
  6. 室賀翔太 (代表). ニンニクとその含硫化合物のマウス小腸パイエル板細胞におけるサイトカイン産生に及ぼす影響, および発現遺伝子の網羅的解析; 第4回食品薬学シンポジウム、東京、2011. 10. 28~29.

〔図書〕(計0件)  
なし

〔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.nihonyakka.jp/teacher/kanpou\\_takano.html](http://www.nihonyakka.jp/teacher/kanpou_takano.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
高野 文英 (Takano Fumihide)

研究者番号: 20236251

日本薬科大学・薬学部・准教授

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
太田 富久 (Ohta Tomihisa)

研究者番号: 50108560

金沢大学・薬学系・教授

石垣 靖人 (Ishigaki Yasuhito)

金沢医科大学・総合医科学研究所・准教授

研究者番号: 20232275

(4) 研究協力者

矢萩 信夫 (Yahagi Nobuo)

薬食微生物学研究所・民間・所長

研究者番号: なし