

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23780129
研究課題名（和文） 酵素合成法を用いた Treg 分化誘導能を有するポリフェノール配糖体の創製
研究課題名（英文） Enzymatic synthesis of polyphenol-glycosides with stimulatory activity on Treg differentiation
研究代表者 片山 茂 (KATAYAMA SHIGERU) 信州大学・農学部・助教 研究者番号：30443922

研究成果の概要（和文）：アレルギー疾患は、国民の約 3 割が罹患する国民病であり、現在も増加の一途を辿っている。本研究では、アレルギー疾患の根治的治療につながる免疫寛容誘導剤の開発を目的とし、Treg 分化誘導能を有するポリフェノール配糖体の創製を酵素合成法により試みた。その結果、新規に合成したポリフェノール配糖体は樹状細胞の抗原提示能を抑制する働きが認められた。Treg 分化誘導能については顕著な効果が得られなかったが、ポリフェノール配糖体の抗アレルギー作用に関する重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We synthesized newly polyphenol glycosides via a rutinase-catalyzed transglycosylation reaction. We then prepared a newly in vitro assay system using DCs differentiated from human monocytic THP-1 for the screening of anti-allergic compounds. Significant decrease in HLA-DR expression was observed in the apple procyanidins and caffeic acid-rutinosides-treated cells in the stimulation of OVA. These suggest that the newly developed polyphenols glycosides should be contribute to anti-allergic agents with suppressive effect on antigen presentation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー疾患の根本的な治療をめざして、「食べて治す」という免疫寛容を利用した経口減感作療法の研究が行われている。減感作療法とは、アレルギー原因物質（アレルゲン）で弱く刺激し抗体産生を抑えて免疫寛容を誘導する試みで実用化が期待されている。近年、申請者らは、ソバ主要アレルゲン Fag e1 のエピトープ部位に多糖（マンノース型糖鎖）修飾すると、IgE 抗体結合能および抗原提示能が低下することを見出した。さらにこの多糖修飾 Fag e1 をソバアレルギーモデルマウスに継続摂取させると、アレルギー反応は抑制し経口免疫寛容を誘導できる

ことを明らかにした。このように多糖修飾は低アレルゲン性の経口免疫寛容誘導剤を開発するうえで有用な手法であることが示された。

(2) Treg の分化誘導は樹状細胞から提示される情報によって制御される。それゆえ、樹状細胞に働きかけて“ナイーブ T 細胞の Treg への分化誘導”を促進できれば、Treg が増加し Th2 細胞によるアレルギー反応を抑制できる。この Treg 分化誘導剤の候補としてポリフェノールの配糖体に着目し、配糖体の一種であるキラヤサポニンの抗アレルギー作用を動物実験により明らかにした。しかし、このような天然化合物のスクリーニングは、“単離

精製に膨大な時間・労力を費やす、微量成分のため見逃す可能性が高い、わずかな構造の違いで機能が大きく異なるため網羅的に探索するうえで効率が悪い”など、種々の問題がある。そこで申請者らは、“酵素合成法”を用いて「Treg 分化誘導能を有するポリフェノール配糖体」を創製する着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) アレルギー疾患の根治的治療につながる免疫寛容誘導剤の開発を目的とし、「Treg 分化誘導能を有するポリフェノール配糖体」を酵素合成法により創製する。

(2) 樹状細胞を用いた培養アッセイ系で制御性 T 細胞 (Treg) 分化誘導能を指標としてスクリーニングを行い、免疫寛容誘導剤としての効果を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ポリフェノール配糖体の作成には、ルチナーゼの糖転移反応を利用した。ルチナーゼはダツタンソバ (*Fagopyrum tataricum*) 種子から3種類のカラムクロマトグラフィー

(DEAE-Sephacryl S-100→HiTrap SP)を用いて精製した。20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に所定濃度のフェノール化合物、ルチン及びルチナーゼを加え、40°C で 24 時間インキュベーションすることで合成を行った。

HPLC (Inertsil NH<sub>2</sub> カラム) にて新規合成されたルチノシドの精製を行った。得られたルチノシドは FAB-MS および NMR 解析によって分子量および構造式を明らかにした。

(2) ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/ml) および interleukin-4 (IL-4, 20 ng/ml) を添加し 4 日間培養することによって、THP-1 由来樹状細胞 (TDDC) への分化誘導を行った。形態変化およびフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析 (樹状細胞の特異マーカー: CD11c, DC-SIGN) によって樹状細胞への分化を確認した。得られた TDDC に対して、各種タンパク質抗原 (鶏卵主要アレルゲン Ovalbumin (OVA)、Ovomucoid (OM)、牛乳主要アレルゲン  $\beta$ -lactoglobulin, 小麦主要アレルゲン gliadin、ソバ主要アレルゲン Fag e1、Fag e2、スギ花粉主要アレルゲン Cry j1、ダニ主要アレルゲン Der f1)、OVA 酵素消化物、およびウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 3 日間抗原刺激を行った。OVA 酵素消化物は、pH 2.0 調整下、50°C 24 時間のペプシン消化により調製し、消化の進行度は SDS-PAGE によって確認した。抗原提示能の指標として、抗原提示分子 MHC クラス II の構成分子である HLA-DR および補助刺激分子である CD86 および CD80 分子の発現量の変化をフローサ

イトメトリー FACSCalibur (Becton Dickinson 社) により測定した。このとき、Fc レセプターのブロッキングとして、FcR blocking reagent (MACS 社) を使用するとともに、使用抗体と同一の Isotype control 抗体をコントロールとして各種マーカーの発現量を平均蛍光強度 (Delta mean fluorescence intensity, MFI) として算出した。抗原取り込み能は、FITC 標識 OVA を添加して 30 分間培養した後、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。

(3) MARCH1, 2, 8 等の遺伝子の発現解析は、リアルタイム PCR 法により mRNA レベルを定量した。内在性コントロール遺伝子として  $\beta$ -actin を使用した。TDDC のサイトカイン産生量は、培養上清を用いてバイオラッド社製 ELISA キットにより測定した。

## 4. 研究成果

(1) ルチナーゼの加水分解反応の逆反応を利用して、フェノール性化合物に糖鎖を付加させた。新規ポリフェノール配糖体を HPLC により分離精製した。その結果、酵素合成法により 5 種類のポリフェノール配糖体 (カテキン、バニリン酸、シナピン酸、フェルラ酸、カフェ酸) を得ることができた。上記ポリフェノール配糖体の分子量は FAB-MS により決定し、さらに NMR 解析により構造解析を行った (図 1)。フェノール性化合物に関しては、芳香環 4 位の水酸基にルチノースが導入されることが NMR 解析の結果より明らかになった。しかし、カフェ酸のようなオルト位に二つの水酸基がある場合は、芳香環 3 位の水酸基にルチノースが結合した。なお、ポリフェノール配糖体合成における糖転移反応の至適条件は、50°C、pH 5.0、250  $\mu$ kat であり、加水分解反応の至適条件とは異なることが明らかになった。

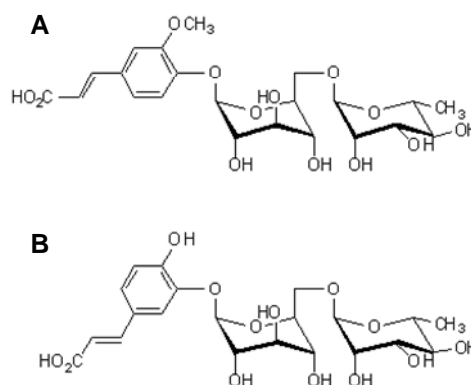


図1. フェルラ酸ルチノシド(A)およびカフェ酸ルチノシド(B)の構造式

(2) 新規ポリフェノール配糖体について、脾臓細胞を用いてサイトカイン産生能を検討した。その結果、脾臓細胞培養系において、インターフェロン $\gamma$ 産生量が糖鎖導入により上昇することが示された。一方、IL-4産生量は糖鎖導入により減少した。ポリフェノール配糖体のなかでは、カテキン配糖体で最も顕著な効果が認められた。腸管パイエル板細胞を用いた実験においても、同様の効果が認められた。

(3) 樹状細胞様 THP-1 (TDDC) を用いた *in vitro* アッセイ系を用いて、免疫寛容誘導能を有する免疫制御因子のスクリーニングを行った。TDDC 上の HLA-DR (MHC クラス II 抗原) 発現量は各種抗原の刺激に対して著しく上昇するのに対して、抗原性が乏しいとされる OVA 酵素消化物や BSA には顕著な変化を示さなかった。そこで OVA 刺激時の抗原提示能を指標として、抗原提示抑制作用を有する免疫制御因子のスクリーニングを行なった。その結果、カテキン、カテキン重合体 (プロシアニジン、以下 AP と略す)、さらにはグルコマンナンやカラギーナンなど数種の糖類において、OVA に対する顕著な抗原提示抑制作用が示された。さらに、AP をプロシアニジンの重合度ごとに分画し、1~9 画分を用いて抗原提示抑制能を評価したところ、いずれの画分においても HLA-DR の発現抑制が認められた。このとき、1、3、5、6、8、9 量体において有意な抑制効果が示された。AP の抗原提示抑制能の作用機序として、抗原である OVA の取り込み自体が抑制される可能性について検討した。FITC 標識した OVA を用いて取り込み能を測定したところ、AP 添加に関わらず細胞内の蛍光強度に変化はなかった。このことから、AP は OVA の取り込み能に影響を及ぼさず、AP 添加時も OVA は TDDCs によって取り込まれていることが明らかとなった。そこで次に、HLA-DR がユビキチン化により分解を受けている可能性について検討した。その結果、ユビキチンリガーゼ MARCH1 の発現上昇が AP 添加によって誘導されることが示された。このとき、MARCH2、MARCH8 の発現には影響を及ぼさなかった。以上より、抗原提示抑制作用にはユビキチン化酵素の活性化が関与することが示された。

(4) 樹状細胞は、抗原提示細胞としてヘルパー T 細胞の免疫応答において起点となる重要な働きを有している。これまで、数多くの抗アレルギー物質に関する評価系が報告されているが、樹状細胞の機能を指標とした評価系はほとんどないのが現状である。これまで樹状細胞の調製には、末梢血単核球が用いられてきたが、その都度ヒトの血液を必要であ

り、調製にも煩雑な操作が必要となる。一方、単球細胞である THP-1 や KG-1 など細胞株を用いて樹状細胞の代わりに使用する報告もあるが、これらは抗原提示能を有しておらず正確な樹状細胞の機能を評価できなかった。本研究では、市販の株化細胞である THP-1 細胞に分化誘導剤として PMA と IL-4 を添加することで抗原提示能を有する樹状細胞様の THP-1 を得ることに成功した。本法は、PBMC と比較して、調製方法が容易に大量生産することができる。免疫調整剤のスクリーニング評価系への利用のみならず、抗アレルギー物質の樹状細胞に関する作用機序の解明など、幅広く利用できるのが特徴である。

(5) TDDC を用いた *in vitro* アッセイ系により、ポリフェノール配糖体 (カフェ酸ルチノシド) の免疫寛容誘導作用について検討した。Treg 分化誘導に関する IL-10 産生量とレチノイン酸合成酵素 RALDH2 の mRNA レベルを測定したが、顕著な変化は認められなかった。一方、卵白主要アレルゲン OVA 刺激下において、樹状細胞様 THP-1 の MHC クラス II 分子の HLA-DR と補助刺激分子 CD86 の発現量は、ポリフェノール配糖体の添加により有意に低下した (図 2)。以上の結果は、酵素合成法により合成したポリフェノール配糖体が樹状細胞における免疫調節機能を有し、アレルギー疾患予防への利用が期待できる新たな化合物であることを示唆するものである。

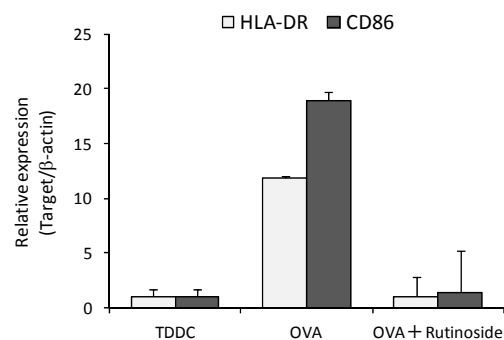


図2. ポリフェノール配糖体の抗原提示抑制作用

## 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 1 件)

(1) Katayama S, Kukita T, Ishikawa E, Nakashima S, Masuda S, Kanda T, Akiyama H, Teshima R, Nakamura S, Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells, Food Chem.138, 2013, 757-761 査読有

DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.076

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Katayama S.、Development of human dendritic cell-based in vitro assays for assessment of the potential allergenicity of foods and its anti-allergic compounds, ISNFF2012、2012.12.5、USA
- ② 山内雄貴、片山茂、加藤幸、真壁秀文、中村宗一郎、ルチン分解酵素ルチナーゼを用いた新規フェノール化合物配糖体ルチノシド合成の最適化、日本農芸化学会中部支部第 165 回例会、2012.10.27、愛知
- ③ 片山茂、久木田卓弥、穂山浩、中村宗一郎、THP-1 由来樹状細胞の確立とアレルギー性評価への応用、日本食品化学会 2012 年度大会、2012.6.22、北海道
- ④ 久木田卓弥、片山茂、中島翔平、舛田晋、神田智正、穂山浩、中村宗一郎、リンゴ由来プロシアニジンの抗原提示抑制効果、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.23、京都
- ⑤ 久木田卓弥、片山茂、石川えり、中島翔平、舛田晋、神田智正、穂山浩、中村宗一郎、樹状細胞様 THP-1 細胞を用いた抗原提示能抑制物質の探索、第 4 回食品薬学シンポジウム、2011.10.29、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山 茂 (KATAYAMA SHIGERU)  
信州大学・農学部・助教  
研究者番号：30443922

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：