

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780131

研究課題名(和文)腸管から吸収された  $\beta$ -グルカンの分解と腸管免疫系への作用

研究課題名(英文) Degradation of  $\beta$ -glucan absorbed from intestine and the effect of degraded  $\beta$ -glucan on the intestinal immune function

研究代表者

日野 真吾 (HINO, Shingo)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70547025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、 $\beta$ -グルカン受容体であるdectin-1を用いた定量系を構築し、この定量系を用いることで、体内および細胞内に取り込まれた  $\beta$ -グルカンがマクロファージにより貪食された後、活性酸素種によって非酵素的に分解されることを明らかにした。また、この分解された  $\beta$ -グルカンはマクロファージ活性化能を保持したまま再放出されることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using the extracellular domain of Dectin-1 as  $\beta$ -glucan-specific probes, we succeeded in detection of soluble and Dectin-1-reactive  $\beta$ -glucan discharged from macrophage cell lines as well as mouse peritoneal macrophages, which had phagocytized insoluble  $\beta$ -glucan particles. The RAW264.7 cell culture-supernatant containing the discharged  $\beta$ -glucan stimulated RAW264.7 cells, resulting in the induction of cytokine expression. Such discharge of Dectin-1-reactive  $\beta$ -glucan from macrophage cells was inhibited by either NADPH oxidase inhibitors or radical scavengers. These results suggest that degraded but Dectin-1-reactive  $\beta$ -glucan is discharged from macrophage cells phagocytizing insoluble  $\beta$ -glucan particles and stimulates the other phagocytes.

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： $\beta$ -グルカン マクロファージ 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

-グルカンは、病原微生物の細胞壁成分のひとつであることから、体内および細胞における -グルカンの認識機構や防御応答については、感染症研究の一環として研究が進んでいる。一方で、キノコ類や発酵食品中にも -グルカンが含まれることから、機能性食品成分として注目されており、経口投与された -グルカンが、IgA 分泌量の増加 (Clin Exp Immunol, 2005) や病原菌に対する抵抗性 (J Pharmacol Exp Ther, 2005) の付与などの効果を示すことが報告されている。グルカンが体内に取り込まれる場合には、免疫細胞が活性化することが考えられるが、 -グルカンの多くは不溶性であるため腸管吸収は起こらないと考えられてきた。一方で、ラットにおいて可溶性 -グルカンが、経口投与後末梢血に到達することが示唆されている (J Pharmacol Exp Ther, 2005)。しかし、哺乳動物に -(1,3)グルカンナーゼは見出されておらず、 -グルカンの代謝・分解機構は明らかになっていない

2. 研究の目的

体内および細胞内に取り込まれた -グルカンの代謝、特にマクロファージによる分解機構について活性酸素種の関与を明らかにすることを目的とする。また、 -グルカンのサイズと免疫活性化作用との関係を明らかにすることで -グルカン分解物の生物活性を評価する。

3. 研究の方法

- (1) マウス腹腔マクロファージ、マクロファージ細胞株 (RAW264.7) およびヒトマクロファージ細胞株 (THP-1) に -グルカンを添加し、その際に可溶化され再放出された -グルカンを定量的に解析した。また、同様の実験を活性酸素産生に関わる NADPH オキシダーゼやミエロペルオキシダーゼといった酵素阻害剤存在下またはラジカルスカベンジャー存在下で行うことで、活性酸素種の関与を解析した。また、分子メカニズムを解析するため RNA 干渉法により NADPH オキシダーゼ阻害時の -グルカン分解能についても検討した。また、これらの活性酸素産生阻害時のサイトカイン応答についても分析を行った。
- (2) 無細胞系での鉄-アスコルビン酸、銅 - アスコルビン酸、または、鉄 - 過酸化水素を用い、活性酸素による -グルカンの分解について評価した。また、活性酸素によって可溶化させた -グルカンのサイトカイン産生能について分析を行った。
- (3) 低分子化された -グルカンの生物活性を評価するため、塩酸によって酸加水分解した -グルカンを調製・分画し、これ

らの各画分と受容体との結合およびサイトカイン産生誘導能を解析した。

- (4) 腸上皮細胞株である Caco-2 を用いて -グルカンの透過性および透過した -グルカンのマクロファージによるサイトカイン産生誘導能を解析した。また、腸上皮細胞自身のバリア機能についても蛍光色素の透過性を指標に評価した。

4. 研究成果

- (1) マウスマクロファージ細胞株、マウス腹腔マクロファージ、ヒトマクロファージ細胞株はいずれも不溶性 -グルカンを貪食し、その後経時的に可溶化・再放出することが明らかとなった。また、この可溶化・再放出のプロセスは NADPH オキシダーゼ阻害剤やラジカルスカベンジャーの培地への添加により阻害されることが示された (図1)。加えて、NADPH オキシダーゼの発現を RNA 干渉法により阻害することで -グルカンの可溶化・再放出のプロセスが遅延した。一方で、阻害剤、ラジカルスカベンジャー、RNA 干渉法による活性酸素産生の阻害は可溶性 -グルカンの分解を遅延させ、培養上成虫に放出される -グルカンは増加することも明らかとなった。これらの結果からマクロファージによる -グルカンの可溶化・再放出のプロセスに活性酸素が関与することが明らかとなった。また、活性酸素の産生阻害は、マクロファージによるサイトカイン産生を増加させることも明らかとなった。これはサイトカイン産生誘導能を持つ -グルカンの分解が遅延することにより、マクロファージの応答が継続することによると考えられる。

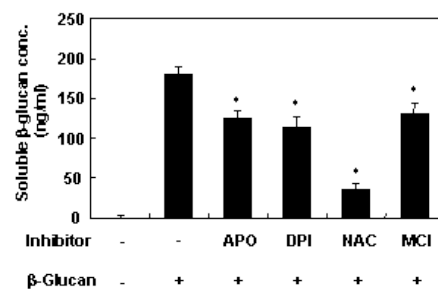


図1. NADPH オキシダーゼ阻害剤またはラジカルスカベンジャーによるマクロファージの -グルカン可溶化・再放出の阻害

- (2) 銅 - アスコルビン酸を用いた活性酸素発生系に -グルカンを添加することで -グルカンが可溶化されることが明らかとなった (図2)。一方で、可溶性 -グルカンを活性酸素処理した場合には受容体に結合能を持つ -グルカンは減少した。この結果は、 -グルカンの分解には活性酸素のみが必要であることを示している。

また、不溶性  $\beta$ -グルカンを活性酸素発生系に添加した際には可溶性  $\beta$ -グルカンが増加し、可溶性  $\beta$ -グルカンを活性酸素発生系に添加した際には可溶性  $\beta$ -グルカンが減少することから、活性酸素処理による  $\beta$ -グルカンの分解は2つのプロセスからなると考えられた。つまり、不溶性の粒子である  $\beta$ -グルカンが溶解性を持つ程度の分子量に切断され、これらの可溶性  $\beta$ -グルカンがさらに受容体結合能を持たない程度まで分解されると考えられた。どちらにしても、この無細胞系での実験から、マクロファージによる  $\beta$ -グルカンの代謝には活性酸素による非酵素的な分解がかかわることが示唆された。また、活性酸素処理によって可溶化された  $\beta$ -グルカンをマクロファージ細胞株に添加したところ、その  $\beta$ -グルカン量に応じてサイトカイン産生が誘導された。これはマクロファージによって可溶化された  $\beta$ -グルカンについても同様であり、活性酸素によって部分的に分解された  $\beta$ -グルカンは生物活性を保持していると考えられた。

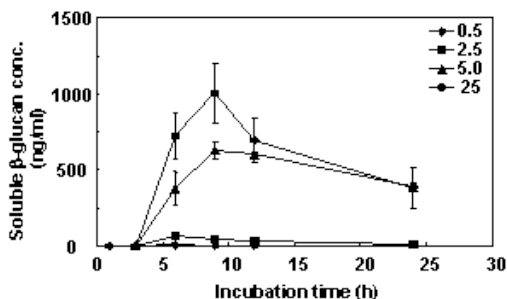


図2. 無細胞系での活性酸素処理による  $\beta$ -グルカン可溶化

- (3)  $\beta$ -グルカンを酸加水分解することで、低分子量(重合度)の  $\beta$ -グルカンを調製した。この可溶性  $\beta$ -グルカンとその受容体である dectin-1 との結合を ELISA 法によって解析したところ、 $\beta$ -グルカンの鎖長に依存して受容体と  $\beta$ -グルカンの結合は強くなった。マクロファージによるサイトカイン産生誘導能やサイトカイン産生の主要な調節因子である NF $\kappa$ B の活性化能についても同様であった。
- (4)  $\beta$ -グルカンの Caco-2 細胞における透過性は濃度依存的であり、また、粒子径に依存することが示された。また、上皮を通過した  $\beta$ -グルカンを含む基底膜側培養液に対するマクロファージのサイトカイン応答は  $\beta$ -グルカンのみをマクロファージに添加した場合とは異なり、免疫抑制的なサイトカインパターンを示した。

## 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 9件)

Hino, S., Sato, H., Matsuda, T., Morita, T., Measurement of barley  $\beta$ -glucan concentration in the plasma by sandwich ELISA using rat dectin-1, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有、77(2)、2013、413-415.  
DOI: 10.1271/bbb.120788

Hino, S., Kito, A., Yokoshima, R., Sugino, R., Oshima, K., Morita, T., Okajima, T., Nadano, D., Uchida, K., Matsuda, T., Discharge of solubilized and Dectin-1-reactive  $\beta$ -glucan from macrophage cells phagocytizing insoluble  $\beta$ -glucan particles: Involvement of reactive oxygen species (ROS)-driven degradation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有、421、2012、329-334  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.009

Hino, S., Takemura, N., Sonoyama, K., Morita, A., Kawagishi, H., Aoe, S., Morita, T., Small intestinal goblet cell proliferation induced by ingestion of soluble and insoluble dietary fiber is characterized by an increase in sialylated mucins in rats., J. Nutr. , 査読有、142、2012、1429-1436  
DOI: 10.3945/jn.112.159731

[学会発表](計 21件)

日野真吾、 $\beta$ -Glucan の免疫修飾作用と腸管吸収、シーズ&ニーズビジネスマッチング研究発表会 - 高齢化社会・健康・食品産業 -、ホテルアソシア静岡、2012年12月

日野真吾、消化管における  $\beta$ -glucan の上皮細胞およびマクロファージによる認識、第11回 Hindgut Club Japan サテライトミーティング(第66回日本栄養・食糧学会大会)、東北大学、2012年5月

日野真吾、消化管における  $\beta$ -glucan の上皮細胞およびマクロファージによる認識、第17回 Hindgut Club JAPAN シンポジウム、専修大学、2011年12月

日野真吾、 $\beta$ -グルカンの腸管からの吸収と分解機構、日本農芸化学会中部支部第163回例会、東海軒会館、2011年12月

Hino S.,  $\beta$ -Glucan and Its Implication for Health Benefits: where is it incorporated from?, 2nd Korea-Japan Joint Symposium and Graduate Students Forum., Kyungpook National University (Korea), 2011年9月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/morit\\_a\\_t/index.html](http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/morit_a_t/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日野 真吾 (HINO, Shingo)  
静岡大学・農学研究科・助教  
研究者番号：70547025

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：