

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500974

研究課題名(和文) 食物繊維による小腸上皮細胞上グルカン受容体シグナルを介した抗炎症機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of anti-inflammatory property of dietary fiber through glucan receptor on small intestinal epithelial cells

研究代表者

水野 雅史 (Mizuno, Masashi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00212233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レンチナンによる抗炎症機構を明らかにすることを目的として研究を行った。レンチナン経口投与したDSS腸炎モデルにおいて、Dectin-1KOマウスでは抗炎症効果は認められなかった。さらに野生型マウス腸上皮細胞のTNFR1発現量は減少したのに対して、Dectin-1KOマウスでは減少は認められなかった。以上の結果から、レンチナンの炎症抑制効果は、Dectin-1を介して認識され、最終的にTNFR1 mRNA発現量を制御することによって抗炎症効果を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of anti-inflammation by lentinan was investigated. Lentinan was orally administered to Dectin-1 knockout (Dectin-1 KO) mice which were treated by DSS to induce colitis. Oral administration of lentinan (100 µg/mouse/day) did not show any significant improvement in DSS-induced Dectin-1 KO mice. Moreover, TNFR1 mRNA expression in intestinal epithelial cells was decreased by lentinan administration to wild type mice, but not Dectin-1 KO mice. These results revealed that lentinan may exert its anti-inflammatory activities through the beta-glucan receptor Dectin-1 with the decrease of TNFR1 in intestinal epithelial cells.

研究分野：食品化学

キーワード：Lentinan Dectin-1

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国においてIBDの患者数が若年層を中心に増加の一途をたどっている。IBDは、クローン病 (Crohn's disease; CD) と潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) に大別され、いずれも腹痛・下痢・血便などを伴うQOLの悪い消化管の慢性炎症疾患であり、難病に指定されている。その原因として、食事性抗原や腸内細菌に対する宿主免疫システムの異常な活性化が挙げられている。実際IBD患者の腸管粘膜においては、TNF- $\alpha$  やIL-6などの炎症性サイトカインを過剰に産生する抗原提示細胞およびT細胞の存在が報告されている。抗原提示細胞は、抗原提示およびサイトカインの産生によって未分化のT細胞に対する分化誘導能を有する唯一の抗原提示細胞であることからすれば、腸管粘膜固有層に存在する抗原提示細胞を制御できればIBDの改善に寄与できると考えられた。

2. 研究の目的

抗原提示細胞は、宿主免疫システムにおいて、T細胞分化の方向性を担う重要な免疫担当細胞である。近年、腸管粘膜に存在する抗原提示細胞は、腸管上皮細胞と協働して免疫抑制性のT細胞を分化誘導することが明らかにされた。一方、食品因子による生体の恒常性維持や免疫生体防御を有益な方向へと統制する方法やこれに基づく応用技術を開発できれば、免疫応答の異常が引き金となっている炎症性腸疾患 (IBD) を治療あるいは予防することが出来る。本研究では、まず *in vitro* 培養系を構築し、食物繊維が腸管上皮細胞上のいかなる受容体を介して樹状細胞活性化に端を発する免疫システムの恒常性維持につながるかを明らかにし、最終的にはその受容体ノックアウトマウスを用いて *in vivo* でも証明することで、食物繊維による抗炎症機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IBDを反映した共培養系モデルの構築

これまでに構築してきた腸管炎症モデルを改良して、トランスウェルを用いて腸管腔側に小腸様上皮培養細胞であるCaco-2細胞を、基底膜側に抗原提示細胞を配置した共培養系を構築する。その上で樹状細胞を活性化する因子としてリポポリサッカライド (LPS) を基底膜側から加え、炎症性サイトカインを分泌させる。このようにして内膜側に炎症を起こさせた状態で、IBD患者に見られるTNF- $\alpha$  産生、腸管上皮単層膜の崩壊、白血球遊走因子のケモカインであるIL-8産生を調べた。この際、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  およびIL-8産生量の測定は、ELISA法を用いる。これらのサイトカインを測定し、IBDを反映した共培養系モデルが構築されているかを確認した。

(2) 小腸上皮細胞上のレンチナン受容体の特定

小腸上皮細胞上には受容体Toll-like

receptor (TLR)1~10が存在しており、それぞれ特有のリガンドを認識し、自然免疫を司っている。これらの受容体のうちの受容体を介してレンチナンを認識するのかを特定するため、それぞれの受容体の抗体を中和抗体としてCaco-2細胞に処理した後レンチナンを添加し、LPS刺激下でのIL-8産生における抑制効果の打破が起こるかどうかを検討した。また、最近になって - グルカンレセプターとして見つけられたDectin-1あるいは2についても同様に検討を行い、レンチナンを認識する小腸上皮細胞上受容体を特定した。

4. 研究成果

(1) 共培養による腸管モデルをもとに、マクロファージを配置した基底膜側 (腸粘膜側) からLPSを加えることでTNF- $\alpha$  の産生を促進し、炎症状態を模倣させた。具体的には、トランスウェルメンブレン上に腸管上皮培養細胞であるCaco-2細胞を、基底膜側にマクロファージの培養細胞であるRAW264.7細胞を配置して腸管粘膜系の細胞環境を簡便に模し、基底膜側へのLPS処理によってマクロファージを活性化させた。次にこの系が、炎症状態の腸管粘膜を擬似できているかどうかを確かめるために、LPS刺激後のIL-8およびTNF- $\alpha$  産生、腸管上皮単層膜の損傷、抗TNF- $\alpha$  抗体およびブデソニド処理によるIL-8 mRNA発現におよぼす効果について検討した結果、今回の炎症性腸管モデルが生体における腸管炎症状態を模倣し得ていることが確認でき、疑似炎症腸管モデルとして有効であることが確認できた。

(2) Dectin-1中和抗体処理により、レンチナンによるCaco-2中IL-8 mRNA発現抑制は失われたが、TLR2中和抗体による影響はみられなかった。また、いずれの中和抗体処置においてもRAW264.7からのTNF- $\alpha$  産生量に対する影響はなかった (図1)。

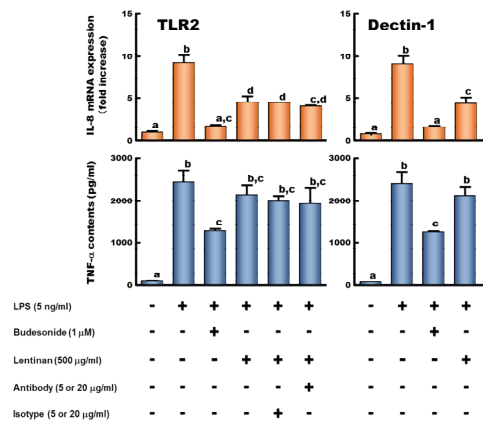


図1 インビトロ腸炎モデル系を用いてTLR2、およびDectin-1中和抗体によるIL-8 mRNA発現、およびTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響

(3) Dectin-1 shRNA導入Caco-2とRAW264.7の共培養系において、レンチナンによるIL-8

mRNA 抑制効果は失われた ( 図 2 )

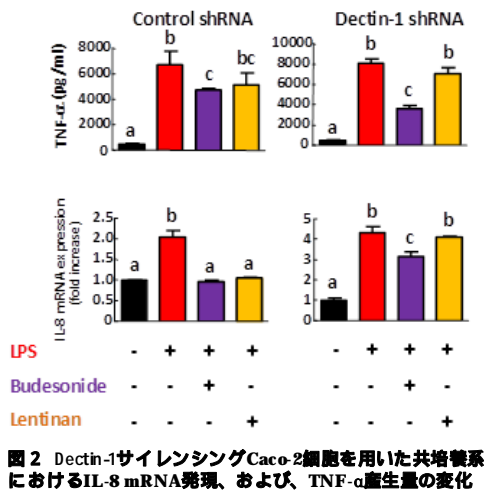


図 2 Dectin-1サイレンシングCaco-2細胞を用いた共培養系におけるIL-8 mRNA発現、および、TNF-α産生量の変化

( 4 ) 野生型マウスと Dectin-1KO マウスを用いて DSS 腸炎モデルにおける体重減少、および、結腸の長さに対するレンチナン効果を見たところ、Dectin-1KO マウスにおいてのみ抗炎症効果は認められなかった ( 図 3、4 )。図 1 から 4 の結果から、腸管上皮細胞上の Dectin-1 を介してレンチナンが腸炎抑制効果を発揮していることが明らかとなった。

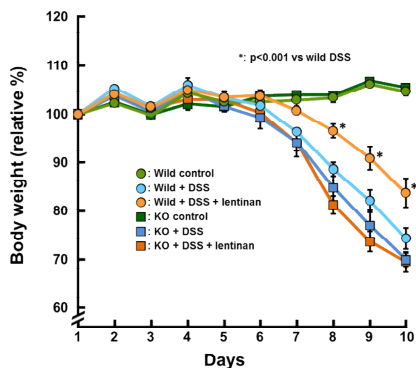


図 3 野生型マウス、および、Dectin-1KOマウスを用いてDSS誘導腸炎モデルにおける体重変化に対するレンチナンの効果

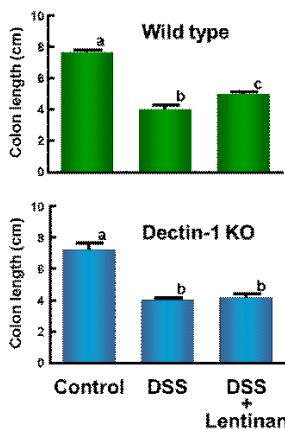


図 4 野生型マウス、および、Dectin-1KOマウスを用いてDSS誘導腸炎モデルにおける結腸の長さに対するレンチナンの効果

( 5 ) レンチナン処理により野生型マウス腸上皮細胞の TNFR1 発現量は減少したのに対して、Dectin-1KO マウスではレンチナンによる減少は認められなかった ( 図 5 )

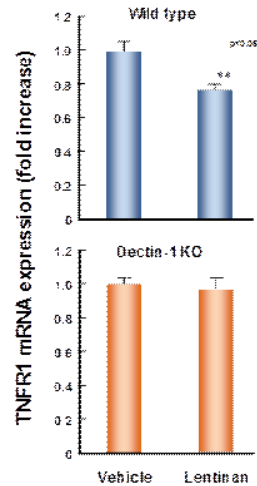


図 5 TNFR1発現におけるレンチナンの効果

以上の結果から、レンチナンが示した炎症状態下における Caco-2 中での IL-8 mRNA 発現増加や DSS 誘導腸炎モデルマウスにおける炎症抑制効果は、レンチナンが腸管上皮細胞上に発現している Dectin-1 を介して認識され、最終的に TNFR1 mRNA 発現量を制御することによって抗炎症効果を誘導している可能性が示唆された。

### 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 7 件 )

1. Mizuno, M., and Nishitani, Y., Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **52(3)**, 202-207, 2013. 査読有り
2. Mizuno, M., and Nishitani, Y., Macrophage activation-mediated hydrogen peroxide generation by the royal sun medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, **15(4)**, 365-371, 2013. 査読有り
3. Nishitani, Y., Zhang, L., Yoshida, M., Azuma, T., Kanazawa, K., Hashimoto, T., and Mizuno, M., Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e62441. doi: 10.1371. 査読有り
4. Nishitani, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., Azuma, T., Kanazawa, K.,

- Hashimoto, T., and Mizuno, M., Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: Role of the aglycone in NF- $\kappa$ B inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors*, **39(5)**, 522-533, 2013. 査読有り
5. 水野雅史, 坊池 剛、西谷洋輔、キノコ由来多糖の免疫賦活作用、食品加工技術、**32(3)**, 45-50, 2012. 査読有り
6. Xu, X. J., Yasuda, M., Mizuno, M., and Ashida, H.  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1656-1663, 2012. 査読有り
7. Xu, X. J., Yasuda, M., Tsuruta, S., Mizuno, M., and Ashida, H.  $\beta$ -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7. *J. Biol. Chem.*, **287(2)**, 871-878, 2012. 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Masashi Mizuno and Takashi Hashimoto, Synergistic anti-inflammatory activity of luteolin and some polyphenols in *in vitro* co-culture system composed of Caco-2 and RAW264.7 cells, Society of Free Radical Biology and Medicine 21st Annual Meeting, 2014. 11. 20. Seattle (USA)
2. 大浦圭吾、橋本堂史、水野雅史、食品由来多糖によるナイーブT細胞分化の制御、日本応用糖質科学会平成 26 年度大会、平成 26 年 9 月 24 日、朱鷺メッセ(新潟)
3. 水野雅史、食品に含まれる機能成分による腸管免疫制御機構、日本化粧品技術者会第 200 回講演会、平成 26 年 9 月 3 日、大阪薬業年金会館(大阪)
4. 水野雅史、シイタケは腸を健全に保ちます、吉備国際大学「健康増進」市民シンポジウム、平成 26 年 8 月 6 日、吉備国際大学南あわじ志知キャンパス(兵庫)
5. Yurie Kijitani and Masashi Mizuno, Dectin-1 is responsible for intestinal anti-inflammatory activity of Lentinula edodes extract lentinan, Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. 12. 13, Chiba (Japan)
6. Masashi Mizuno, Yurie Kijitani. and Takashi Hashimoto, Lentinan,  $\beta$ -1,3;1,6-glucan, exerts intestinal anti-inflammatory activity through Dectin-1, European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) 2013. 10. 22. Nice (France)
7. 雉子谷百合江、西谷洋輔、橋本堂史、水野雅史、レンチナンによる腸炎抑制を引き起こす小腸上皮細胞上受容体について、日本応用糖質科学会平成 25 年度大会(第 62 回)、平成 25 年 9 月 25 日、鹿児島大学農学部(鹿児島)
8. 水野雅史、非吸収性食物成分による小腸上皮細胞上受容体シグナルを介した抗炎症機能の解析、神戸大学バイオプロダクション次世代農工連携拠点主催フォーラム「医薬品および食品の機能性・安全性評価の新展開」、平成 25 年 7 月 26 日、TRI(神戸)
9. Nishitani Yosuke and Mizuno Masashi, Endocytosis of TNFR 1 is initiated through a specific receptor on intestinal epithelial cells which can recognize lentinan, shiitake mushroom-derived  $\beta$ -1,3;1,6-glucan, Immuno 2013, 10th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, 2013. 3. 11. Barcelona (Spain)
10. Nishitani Yosuke and Mizuno Masashi, Anti-inflammatory activity of Shiitake mushroom-derived  $\beta$ -1,3;1,6-glucan, lentinan, through modulation of TNF receptor 1 (TNFR1) distribution in intestinal epithelial cells, 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2012. 8.20. Philadelphia (USA)
11. Mizuno Masashi, Zhang Ling and Nishitani Yosuke, Endocytosis of tumor necrosis factor receptor 1 plays a key role in anti-inflammatory by lentinan in intestinal epithelial cells, The 3rd Conference for the African Society for Edible and Medicinal Mushrooms, 2012. 6.26. Windhoek (Namibia)
12. 西谷洋輔、水野雅史、レンチナンは腸管上皮細胞の TNFR1 の発現制御によって腸管炎症を抑制する、第 16 回腸内細菌学会、平成 24 年 6 月 14 日、神戸市産業振興センター(神戸)

〔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：  
出願年月日：  
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 (MIZUNO Masashi)  
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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：