

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580188

研究課題名(和文) コラーゲンによる自然免疫活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of collagen on the innate immune system.

研究代表者

菅原 卓也 (Sugahara, Takuya)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：00263963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：可食性のクラゲ由来コラーゲンが、自然免疫系に関与するマクロファージ、および樹状細胞を活性化し、サイトカイン産生や貪食活性などを促進することが明らかになった。その作用機構を検討した結果、コラーゲンはNF- κ Bの細胞質から核内への移行を促進するとともに、MAPキナーゼの一種であるJNKを活性化することが明らかになった。さらに、クルマエビ、ヒラメ、ブリに対する病原菌による攻撃試験において、コラーゲンを餌と一緒に投与すると、病原菌に対する抵抗性が高まった。この結果から、コラーゲンの免疫促進効果が、実際の感染症に対する防御能を高めることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The effects of collagen from jellyfish on the innate immune response, especially on the activity of macrophages were evaluated. The phagocytosis of macrophage was enhanced by collagen. Jellyfish collagen also stimulated tumour necrosis factor- α and interleukin-6 production of macrophages as the result of elevated gene expression levels of these cytokines. Oral administration of collagens elevated cytokine production by peritoneal macrophages in mice. On the contrary, collagen suppressed gene expression of PPAR γ 1 in macrophages. It is supposed from this result that collagen may stimulate the cytokine production by suppressing the PPAR γ 1 expression. The activity of jellyfish collagen was cancelled by TLR4 inhibitor. Moreover, jellyfish collagen stimulated phosphorylation of I κ B β , promoted translocation of NF- κ B, and activated JNK. Jellyfish collagen also activated and induced maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells.

研究分野：食品機能学

キーワード：コラーゲン 自然免疫 マクロファージ 樹状細胞 サイトカイン産生 TLR4

1. 研究開始当初の背景

申請者は、可食性のクラゲ由来のコラーゲンがヒト型ハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体産生やヒト末梢血リンパ球のIgM産生を促進するとともに、インターフェロン(IFN)- γ や、腫瘍壊死因子(TNF)- α 産生も促進するなど、獲得免疫系に関与するBリンパ球、およびTリンパ球を活性化する効果があることを明らかにしてきた。また、免疫促進効果はクラゲ由来のコラーゲンばかりでなく、ウシアキレス腱由来のコラーゲンにも認められたものの、その比活性はクラゲコラーゲンの6分の1以下であった(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2131-2137, 2006)。この結果はコラーゲンの由来によりその生理効果に大きな差があることを意味しており、免疫促進効果に関してはクラゲ由来コラーゲンに優位性があることが示唆された。

また、作用メカニズムの解析の結果から、抗体産生促進効果については、抗体遺伝子の転写活性を上昇させるだけでなく、翻訳段階にも促進的に作用することで、強力な産生促進効果に繋がっているものと推察された。また、マウスへの経口投与によって、生体内における抗原特異的免疫活性が上昇することも明らかになった(*Cytotechnology*, 63, 481-492, 2011)。

生体内においてコラーゲンが抗原特異的な獲得免疫系を促進することが判明したことから、本研究では、獲得免疫よりも前の段階、すなわち抗原非特異的な、侵入微生物の捕食等による自然免疫系に及ぼす効果を検討することにより、生体防御全体に及ぼすコラーゲンの効果についての詳細を学術的に解明するとともに、得られた学術エビデンスをベースとして、機能性食品や家畜や養殖魚等の機能性飼料などに展開することが可能になると期待できることから、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

これまでのコラーゲンの免疫促進効果に関する研究において、抗原特異的な獲得免疫に対する促進効果があることを明らかにしてきた。これに関連して、抗原非特異的な自然免疫系へのコラーゲンの効果に着目し、病原菌などを貪食して無毒化するとともに、その病原菌に対する獲得免疫の確立を誘導するマクロファージや樹状細胞に対するコラーゲンの効果を検討することを目的とした。

予備的な検討の結果、コラーゲンはマクロファージの貪食活性を上昇させるとともに、インターロイキン(IL)-6産生を強く促進することが推察された。そこで、これまでに得られた研究成果をさらに発展させ、自然免疫系に及ぼす効果を解明することによって、免疫系全体に及ぼすコラーゲンの影響を明らかにすることを目的として、本研究課題では以下の4項目について検討することにした。

(1) マクロファージの貪食活性に及ぼすコラーゲンの影響

マクロファージの貪食活性に及ぼすコラーゲンの影響を評価する。コラーゲンソースとしてクラゲから抽出したコラーゲンと市販のウシアキレス腱由来コラーゲン精製標品を用い、マウスマクロファージ細胞株J774.1細胞やマウス腹腔由来初代マクロファージ細胞(P-Mac)の貪食活性に対するコラーゲンの効果を明らかにする。

(2) マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすコラーゲンの効果と作用メカニズムの解明

J774.1細胞、およびP-Macをターゲットとし、サイトカイン(免疫タンパク質)産生に及ぼすコラーゲンの影響を検討する。現在までの予備的な試験において、マクロファージのIL-6産生を促進することが推察されており、IL-6以外のサイトカイン産生に及ぼす効果を検証するとともに、遺伝子の発現レベルに及ぼす影響を検討する。また、マクロファージの活性化において、コラーゲンがどのように作用することで貪食活性やサイトカインの産生を促進しているのかを明らかにする。

(3) 生体内におけるマクロファージの活性に及ぼすコラーゲン摂取の影響

マウスにコラーゲンを経口投与した後にP-Macを回収し、貪食活性やサイトカイン産生活性を検討することで、生体内におけるコラーゲンの免疫促進効果を明らかにする。

(4) コラーゲン投与が耐病性に及ぼす影響

自然免疫しか持たないクルマエビや、自然免疫と単純な獲得免疫系を持つ魚類を対象として、病原微生物による攻撃試験を実施し、コラーゲンの経口摂取が病原微生物に対する抵抗性にどう影響するかを明らかにする。この検討により、コラーゲンの経口摂取による免疫促進効果が、宿主の病原微生物に対する抵抗性の向上につながるかどうかを明らかにすることができるとともに、実用化への貴重な知見を得ることができる。

これまでにコラーゲンが獲得免疫系の活性化に寄与することが確認されているものの、自然免疫に及ぼす影響についての報告はなく、本研究により自然免疫に対する促進効果の詳細、およびその作用機序が解明されれば、コラーゲンの免疫系全般にわたる促進効果、および免疫ネットワークの活性化メカニズムの解明などの学術的な成果が得られるばかりでなく、機能性食品素材としてのコラーゲンの有効性を実証することができる。また、病原微生物への抵抗性付与効果が実証されれば、コラーゲンの免疫促進効果が、実際の感染症に対する抵抗性の向上につながることを証明できる。この研究成果の実用化として、機能性食品としてだけでなく、魚類や家畜などに対する免疫賦活能を有する機能性飼料添加剤への応用にもつながると期待

できる。また、食品の機能性解明、および機能性食品開発においては、ヒトが食品として摂取することによりどのような生体調節作用が期待できるかを実証するヒト介入試験の必要性はますます高まってきており、ヒト介入試験への展開に先立って、あらかじめ基礎的なデータ収集を行うことも本研究の重要な目的である。

3. 研究の方法

コラーゲンソースとしては、これまでに獲得免疫系に対する強い促進効果が認められている可食性クラゲから調製したコラーゲン、および精製標品であるウシアキレス腫 (BAT) コラーゲンを用い、下記の項目について検討した。

(1) マクロファージの食食活性に及ぼすコラーゲンの影響

クラゲ、および BAT コラーゲンを用い、ザイモサンアッセイによりマウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞、およびマウス腹腔から調製した初代 P-Mac の食食活性に及ぼす効果を検討した。

(2) マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすコラーゲンの効果と作用メカニズムの解明

マクロファージは TNF- α や IL-6 などのサイトカインを産生し、獲得免疫系を刺激する。そこで、J774.1 細胞、および P-Mac に対するサイトカイン産生促進効果を明らかにする。そこで、コラーゲンを含む培地でマクロファージを培養した後、培養上清中に産生された IL-6、TNF- α などのサイトカイン量を酵素抗体法で定量するとともに、抗菌物質である一酸化窒素 (NO) の産生をグリエス試薬による定量によって評価することで、マクロファージに対するコラーゲンの促進効果を評価した。作用メカニズムの解析として、サイトカインや誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の遺伝子発現レベルへの効果を、定量的逆転写 PCR 法を用いて解析した。

マクロファージは様々なサイトカインや刺激因子の作用を受けて活性化される。マクロファージは核内受容体スーパーファミリーのメンバーの一つである PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)- γ 1、および γ 3 を発現しており、マクロファージの活性を抑制的に制御していることが知られている。そこで、PPAR γ に着目し、コラーゲン刺激により、RRAR γ の遺伝子発現、およびレセプター活性がどのように変化するか、あるいは PPAR γ の活性に関与する MAP キナーゼシグナル系がどのような影響を受けるかを定量的逆転写 PCR 法、あるいはウエスタンブロット法により分子レベルで解析した。

また、マクロファージと同様に食食活性と抗原提示機能を持つ樹状細胞に対するコラーゲン効果を明らかにするため、マウス大腿骨から回収した骨髓細胞を顆粒球単球コロ

ニー刺激因子 (GM-CSF) で骨髓樹状細胞に分化誘導したのち、樹状細胞に対するコラーゲンの作用を解析した。

(3) 生体内におけるマクロファージの活性に及ぼすコラーゲン摂取の影響

コラーゲンをメス 6 週齢 BALB/c マウスに 1 週間経口投与した後に腹腔から P-Mac を回収し、そのサイトカイン産生活性を解析することで、コラーゲンの経口投与によるマクロファージに対する活性化効果を検討した。

(4) コラーゲン投与が耐病性に及ぼす影響

これまでにコラーゲンの経口投与により生体内において、特に獲得免疫系が活性化されることを確認しているが、コラーゲンを免疫促進効果のある機能性食品素材として開発するためには、コラーゲンの摂取が実際の感染症予防に対してどの程度効果を発揮するかを明らかにする必要がある。まず、自然免疫しか存在しないクルマエビを対象として、コラーゲンの混餌投与下において、致死性の病原菌による攻撃試験を行い、コラーゲンの経口投与が耐病性にどのような効果を示すかを検討した。また、コラーゲンの免疫促進作用が、実際の感染症に対する抵抗性の向上効果として現れるかどうかを評価するため、養殖魚生産者である愛媛県認定漁業士組合の松本嘉晃理事長の協力を受け、自然免疫系に加え獲得免疫系を有する魚類(ヒラメ、ハマチ)を対象として、病原微生物による攻撃に対するコラーゲン摂取の防御効果を検証した。

4. 研究成果

(1) マクロファージの食食活性に及ぼすコラーゲンの影響

コラーゲンの免疫促進効果に関して、自然免疫系に関与するマクロファージに対する作用を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、マウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞の食食活性におよぼすコラーゲンの効果を、テキサスレッドで蛍光標識したザイモサンに対する食食活性を指標として検討した。その結果、クラゲコラーゲン、

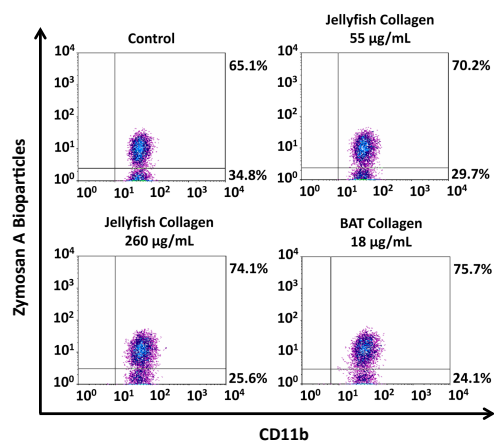


図1 J774.1細胞の食食活性に及ぼすコラーゲンの効果

およびウシアキレス腱 (BAT) コラーゲンは、いずれも J774.1 細胞の貪食活性を促進した (図 1)。

また、メス BALB/c マウスの腹腔から調製した P-Mac の貪食活性に及ぼす効果を同様に検討したところ、コラーゲンは P-Mac の貪食活性も促進した。

(2) マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすコラーゲンの効果と作用メカニズムの解明

J774.1 細胞、および P-Mac のサイトカイン産生に及ぼすクラゲ、および BAT コラーゲンの効果を検討した。その結果、TNF- α 、および IL-6 の産生を有意に促進することが明らかになった。

サイトカイン産生促進効果について、その作用メカニズムを明らかにするため、TNF- α 、IL-6、および IL-12 の遺伝子発現を定量的逆転写 PCR 法で解析した。その結果、J774.1 細胞、および P-Mac の両細胞において、いずれのサイトカインの mRNA 発現が有意に促進されており、遺伝子発現レベルの促進により、サイトカイン産生が上昇したことが明らかになった (図 2)。

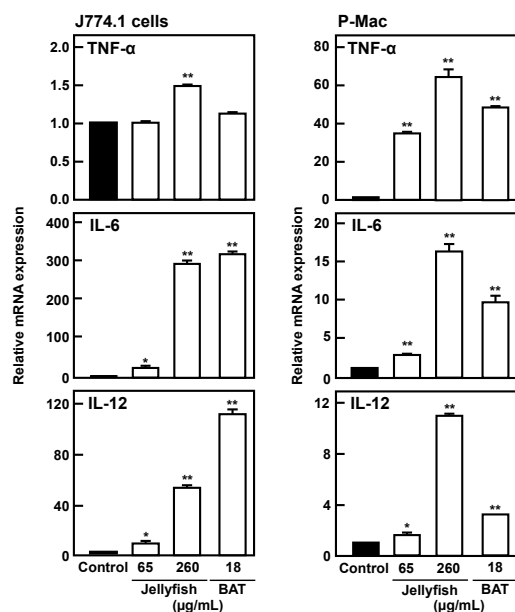


図 2 サイトカイン遺伝子発現に及ぼすコラーゲンの効果

また、炎症応答により発現が上昇する誘導性 NO 合成酵素 (iNOS)、およびシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 の遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、コラーゲンは両遺伝子の発現を促進した。さらに、J774.1 細胞の NO 産生に及ぼすコラーゲンの効果を評価したところ、コラーゲンによって NO 産生が促進されることが明らかになった。これらのことから、コラーゲンはマクロファージの種々の活性を全体的に賦活化することが明らかになった。

コラーゲンによって遺伝子発現レベルが促進されることが明らかになったことから、

作用メカニズムについて、さらに詳細に検討した。マクロファージは、細胞表面に発現しているトール様受容体 (TLR) 4 を介して活性化される。そこで、TLR4 の特異的阻害剤である VIPER 作用下において J774.1 細胞に対するクラゲコラーゲンの効果を検討した。その結果、阻害剤共存において、J774.1 細胞の TNF- α 産生に及ぼすコラーゲンの促進効果は大きく抑制された (図 3)。このことから、コラーゲンは TLR4 経路でマクロファージを活性化することが明らかになった。

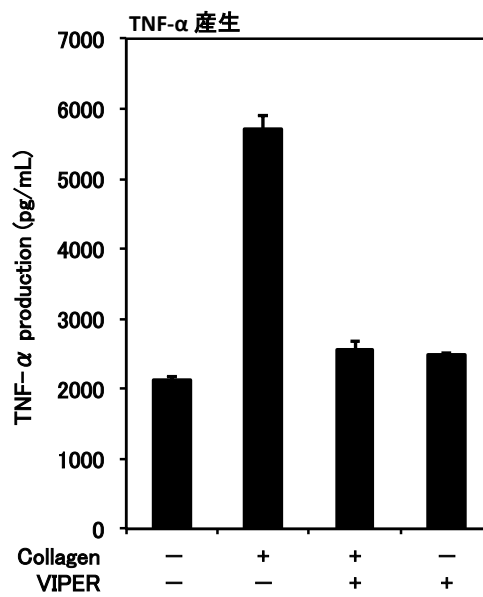


図 3 TLR4 阻害条件下におけるコラーゲンの促進効果

TLR4 はエンドトキシンとして知られるリポ多糖 (LPS) の受容体であり、TLR4 経路ではエンドトキシンによって活性化される。コラーゲンのマクロファージ促進効果が、クラゲコラーゲン抽出物に夾雑しているエンドトキシンによる影響の可能性が考えられたため、クラゲコラーゲン抽出物中のエンドトキシン濃度を測定したところ、抽出物にはエンドトキシンは混入していなかった。また、抽出物をコラゲナーゼ処理することで促進活性が有意に抑制されたことから、クラゲコラーゲン抽出物のマクロファージ活性化作用はエンドトキシンによるものではなく、コラーゲンによる効果であることが明らかになった。

さらに詳細な作用メカニズムを解析した結果、コラーゲン処理により、TLR4 経路の下流における NF- κ B の核内移行の促進に加え、MAP キナーゼの一種である JNK の活性化が認められた。この結果から、コラーゲンは、TLR4 を刺激し、転写因子である NF- κ B の核内移行と JNK を活性化することでマクロファージを賦活化することが明らかになった。さらに、マクロファージの活性化に抑制的に作用する PPAR γ 1 の発現を抑制することが明らかになった。

次に、骨髄由来樹状細胞に対する効果について検討した。マウス大腿骨から骨髄細胞を回収し、GM-CSFを添加した培地で培養することにより、樹状細胞へと誘導した。樹状細胞へ分化したことは、形態的な変化に加え、MHC-IIとCD11cの発現により確認した。得られた骨髄樹状細胞に対してクラゲコラーゲンを作用させたところ、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、およびIL-12産生が顕著に促進された(図4)。また、この産生促進効果は、遺伝子発現の活性化によるものであることが明らかになった。さらに、コラーゲン処理により、樹状細胞への分化誘導、および成熟が促進されることが明らかになった。これらの結果から、コラーゲンは自然免疫応答において、マクロファージだけでなく、樹状細胞に対しても活性化、およびサイトカイン産生促進効果を示すことが明らかになった。

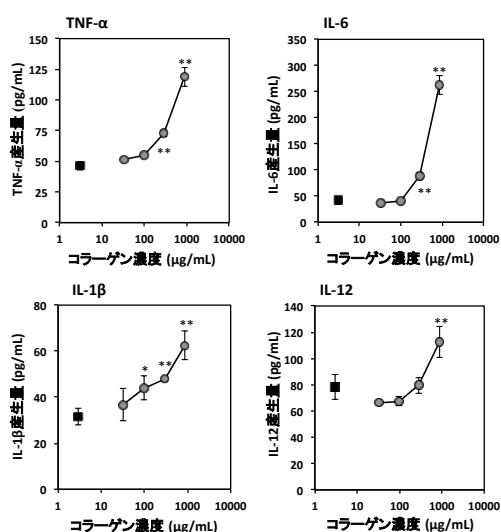


図4 骨髄樹状細胞のサイトカイン産生に及ぼすコラーゲンの効果

(3) 生体内におけるマクロファージの活性化に及ぼすコラーゲン摂取の影響

コラーゲンの経口投与によるマクロファージへの効果を検討するため、メス6週齢BALB/cマウスに、クラゲコラーゲンを1.5、および6.0 mg/kg体重/dayで投与した。また、精製標品であるBATコラーゲンを0.5 mg/kg体重/dayで7日間単回投与した後、腹腔から回収したP-Macを培養し、TNF- α 、およびIL-6産生活性を*ex vivo*において評価した。その結果、クラゲコラーゲン、およびBATコラーゲンともに、経口投与によってP-MacのTNF- α 、およびIL-6産生を有意に促進することが明らかになった。このことから、コラーゲンの摂取によって、生体内においてもマクロファージを活性化する効果があることが明らかになった。

(4) コラーゲン投与が耐病性に及ぼす影響

コラーゲンの摂取による免疫活性の促進が、耐病性の付与につながるかどうかを確認した。まず、無脊椎動物であり、自然免疫系だけを持つクルマエビを用い、ホワイトスポ

ットウイルスに対する耐病性を指標として、クラゲコラーゲンの混餌投与の効果を検討した。その結果、クラゲコラーゲンの投与によって有意な生存率の改善が認められ、コラーゲンが無脊椎動物の耐病性付与に効果があることが確認された。これは、コラーゲンの摂取が食細胞などの自然免疫系を担う免疫担当細胞を活性化したことによる効果であると推察された。

さらに、魚類に対する耐病性付与効果を検討した。ヒラメの滑走細菌症、およびブリ類の結節症に対する耐病性に及ぼすコラーゲンの混餌投与の効果を検討した。その結果、ヒラメ、ブリの両試験において、顕著な生存率の向上が認められ、コラーゲンの摂取が実際の感染症に対する抵抗性の付与につながることを明らかになった。

これまでに得られていたコラーゲンの獲得免疫系に及ぼす促進効果と、3年間の本課題研究で得られた自然免疫系に及ぼす促進効果成果をまとめると、**コラーゲンは、獲得免疫系だけでなく、自然免疫系も活性化し、免疫系全体を活性化する効果を持つ**ことが明らかになった。

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) Putra A. B. N., Nishi K., Shiraishi R., Doi M. and Sugahara T.: Jellyfish collagen stimulates maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells., *J. Funct. Foods*, **査読有**, 14, 308-317, 2015.
DOI:10.1016/j.jff.2015.02.008
- (2) Daifuku M., Nishi K., Okamoto T. and Sugahara T.: Activation of J774.1 murine macrophages by lactate dehydrogenase., *Cytotechnology*, **査読有**, 66, 937-943, 2014.
DOI:10.1007/s10616-013-9646-3
- (3) Kumalasari I. D., Nishi K., Putra A. B. N. and Sugahara T.: Activation of macrophages stimulated by bengkoang fiber extract through Toll-like receptor 4., *Food Funct.*, **査読有**, 5, 1403-1408, 2014.
DOI:10.1039/c3fo60360a.
- (4) Putra A. B. N., Nishi K., Shiraishi R., Moi M. and Sugahara T.: Jellyfish collagen stimulates production of TNF- α and IL-6 by J774.1 cells through activation of NF- κ B and JNK via TLR4 signaling pathway., *Mol. Immunol.*, **査読有**, 58, 32-37, 2014.
DOI:10.1016/j.molimm.2013.11.003
- (5) Kumalasari I. D., Nishi K., Harmayani

- E., Raharjo S. and Sugahara T.: Effect of bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract on murine macrophage-like J774.1 cells and mouse peritoneal macrophages., J. Funct. Foods, 査読有, 5, 582-589, 2013.
DOI:10.1016/j.jff.2012.12.005
- (6) Daifuku M., Nishi K., Okamoto T., Nishimoto S. and Sugahara T.: Immunomodulatory effects of lactate dehydrogenase *in vitro* and *in vivo*., J. Funct. Foods, 査読有, 4, 972-978, 2012.
DOI:10.1016/j.jff.2012.07.005
- (7) Putra A.B.N., Morishige H., Nishimoto S., Nishi K., Shiraishi R., Doi M. and Sugahara T.: Effect of collagens from jellyfish and bovine Achilles tendon on the activity of J774.1 and mouse peritoneal macrophage Cells., J. Funct. Foods, 査読有, 4, 504-512, 2012.
DOI:10.1016/j.jff.2012.02.011

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Putra A.B.N., Nishi K., Shiraishi R., Doi M. and Sugahara T.: Immunostimulatory effects of jellyfish collagen on mouse bone marrow-derived dendritic cells., 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF 2014), October 14-17, Istanbul, Turkey.
- (2) Sugahara T., Kumalasari I.D., Nishi K. and Putra A.B.N.: Effect of bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract on murine macrophage-like J774.1 cells and mouse peritoneal macrophages., 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF 2014), October 14-17, Istanbul, Turkey.
- (3) Putra A.B.N., Morishige H., Nishimoto S., Nishi K., Shiraishi R., Doi M. and Sugahara T.: Studies on the immunostimulatory effects of jellyfish collagen on macrophage., The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), November 27-30, Nagoya Congress Center (名古屋国際会議場), Nagoya.
- (4) Kumalasari I.D., Nishi K., Harmayani E., Raharjo S. and Sugahara T.: Immunostimulatory activity of bengkoang (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) fiber extracts on lymphocytes and macrophages., The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology

(JAACT2012), November 27-30, Nagoya Congress Center (名古屋国際会議場), Nagoya.

[その他]

ホームページ等

○愛媛大学農学部応用生命化学専門教育コース動物細胞工学教育分野

<http://web-amb.agr.ehime-u.ac.jp>

○愛媛大学農学部附属食品健康科学研究センター

<http://fhsrsrc.agr.ehime-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 卓也 (SUGAHARA Takuya)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：00263963

(2) 研究協力者

松本 嘉晃 (MATSUMOTO Yoshiteru)

愛媛県認定漁業士協同組合理事長