

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861971

研究課題名(和文) タモギタケ抽出成分による口腔上皮細胞の遺伝子発現変化のニュートリゲノミクスの解析

研究課題名(英文) Nutrigenomics analysis of gene expression changes in the oral epithelium cells by Tamogitake mushrooms extracts.

研究代表者

佐藤 惇 (SATO, JUN)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30624267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タモギタケから精製した成分の、口の粘膜細胞に対する影響および作用機序を、遺伝子解析により明らかにし、食物摂取時における機能食品としてのタモギタケの口腔への効果を解明することを目的として行った。

タモギタケ由来のエルゴチオニンがヒトの歯肉の細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について、歯肉由来細胞の培養液へ24時間の短期間および1ヶ月の長期間エルゴチオニンを添加することによってその遺伝子変化の解析を行い、データ解析を行ったところ、血液の凝固および傷の治癒に関連する遺伝子グループの発現を上昇させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study, components purified from *Pleurotus cornucopiae* (Tamogitake in Japanese), effects and mechanism of action against oral mucosal cells, revealed by gene analysis, it is an object to elucidate the effect of the oral cavity of Tamogitake as functional food.

Effects of Ergothioneine to the human gingival cells gene expression, conducted an analysis of the genetic changes by a short-term of 24 hours or long period of one month to add a ergothioneine to the culture of gingival-derived cells were subjected to data analysis.

As a result, it was found to increase the expression of a gene group which ergothioneine is associated with coagulation of the blood and wound healing.

研究分野：歯学

キーワード：ニュートリゲノミクス 歯肉上皮細胞 歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

ニュートリゲノミクスは、食品成分の nutrition(栄養)を摂取したときに起こる生体内の代謝活動を、遺伝子(mRNA)発現レベル等の genomics(遺伝情報)で解析する研究である。食品や食品素材が生体にどのように作用したかを、遺伝子発現やタンパク質、代謝産物などを網羅的に解析し、その機能を解明することを目的としている。これまでにケルセチンやカテキンをはじめとするポリフェノール類や、フコキサンチンなどのカロテノイド類、ゴマのリグナンなどのさまざまな食品由来の成分の研究が進められ、利用されてきている。口腔は食品の入り口であり、食品中の成分が直接的に組織に作用することからニュートリゲノミクス解析を行うべき部位であるが、ほとんど解析が行われていない。

研究代表者らは、近年、主に北海道および東北に自生する食用の茸であるタモギタケより抽出した成分が、抗カンジダ菌効果、および上皮が産生する抗菌ペプチドの一種であるヒト  $\alpha$ -ディフェンシン産生増強効果のあることを発見し、これを配合した口腔保湿ジェル・スプレーを開発した。口腔ケアに使用される口腔清掃剤・保湿剤は様々な有効成分が配合されたものが開発されているが、生体からの抗菌ペプチド産生増強作用を有するものはない。また有効成分が食品由来であれば使用者も口腔内に使用することに安心感もあり、毎日の口腔ケアへ応用することで口腔内の衛生状態を保つことができると考えられる。

タモギタケにはこれ以外にこれまで、抗腫瘍作用を持つエルゴステロールパーオキサイド、抗酸化作用を持つエルゴチオネイン、保湿効果や抗アトピー効果を持つグルコシルセラミド、また血圧調節物であるアンギオテンシン変換酵素阻害物質も含まれていることが報告されており (Takei et al.,2004; Chear et al.,2012;山岸ら.,2011; Hagiwara et al.,2005) その健康食品としての価値から  $\alpha$ -グルカンを高含有した清涼飲料水、皮膚の保湿機能改善を期待したセラミドサプリメントや保湿クリーム、毛根の発育効果を期待したエルゴチオネイン配合のシャンプーなどが商品化されている。これらのことから、口腔粘膜上皮への作用には  $\alpha$ -ディフェンシン産生増強以外にも様々な効果があるものと期待されるが、その詳細については明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

タモギタケに様々な成分が含まれているが、中でもエルゴチオネインはキノコ類の中でも特に多く含まれているものであることが知られている。そこで、申請者はまずタモギタケ由来のエルゴチオネインがヒト歯肉

上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。同時に、Ingenuity Pathway Analysis(IPA)解析を行ったところ、まず、大きなジャンルとして血液凝固および創傷治癒に関連する遺伝子グループの発現を上昇させていることを突き止めた。

しかしながら、エルゴチオネイン以外の成分や crude な状態での口腔上皮細胞に及ぼす影響については不明である。本研究では、エルゴチオネイン以外の物質でタモギタケに多く含まれているグルコシルセラミド、エルゴステロールパーオキサイド、グルカンおよび crude なものの口腔上皮細胞の遺伝子発現へ及ぼす影響について網羅的に解析することにより、各抽出物の口腔上皮に対する作用をニュートリゲノミクス的手法により明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔上皮細胞におけるタモギタケ精製成分の遺伝子発現変化作用の検討

今回の研究では、タモギタケ抽出液中に含まれる前述の成分を単品、もしくは混合して培養口腔上皮細胞培地に添加し、一定時間培養後に Total RNA を抽出し、遺伝子発現量を解析することにより評価する。タモギタケ精製成分は、既に株式会社スリーピー(北海道江別市)から提供を受けている。

口腔上皮細胞は、ヒト歯肉上皮前駆細胞 (CELLNTEC 社)を用いる。細胞培養液にエルゴステロールパーオキサイド、グルコシルセラミドおよびグルカンの各タモギタケ抽出成分単体または混合物を添加し、24 時間後に TotalRNA を抽出、whole human genome マイクロアレイ(Agilent 社)を用いた遺伝子発現マイクロアレイ法により、遺伝子発現変化を網羅的に解析する。また各抽出物の添加による遺伝子発現量の変化は、各試薬の溶媒のみを同様に添加した control サンプルと比較する。発現変化のみられた遺伝子について、TaqMan(R) probes (Applied Biosystem)を用いた定量的リアルタイム RT-PCR により、各遺伝子の発現変化について詳細に検討し、control サンプルとの発現量を比較、検討する。有効成分の特定が進んだ後、濃度や作用時間の最適化を行い、混合物の有効性が認められた場合は混合割合の最適化についても検討する。

### (2) 発現変化の見られた遺伝子群の pathway 解析

タモギタケ抽出物の添加により発現上昇が見られた遺伝子群について、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェア (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>)を用いて、パスウェイ解析を行いネットワーク構築し、遺伝子群の機能解析および遺伝子発現シグナルの細胞内伝達経路の予測を行う。

Ingenuity Pathway Analysis は、遺伝子データベースを用いたバイオインフォマティ

クスにより、既知の遺伝子パスウェイとの関連性をスコア化し、発現変化のみられた遺伝子群ネットワークの機能を予測するシステムである。この Pathway 解析により、タモギタケから抽出された成分が口腔上皮に及ぼす作用を予測することができる。

予測された遺伝子発現シグナルの伝達経路について、伝達経路の阻害薬を添加した細胞培養実験により確認を行う。

上記の計画で当初実験を進めたが、エルゴチオネイン以外の成分を単離して検討したところ、crude な状態での口腔上皮細胞に及ぼす影響と同様な実験結果は見られなかった。

そこでキノコ類の中でもタモギタケに特に多く含まれる重要な成分であるエルゴチオネインの作用をさらに追及することに焦点を絞り、前述の実験方法の試薬をエルゴチオネインに統一化し、短期的影響および、エピジェネティックな修飾による発現変化も検討するための一ヶ月間の長期培養による長期的影響についても検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 口腔上皮細胞におけるタモギタケ精製成分の遺伝子発現変化作用の検討

エルゴチオネインの添加(1mM)による歯肉上皮前駆細胞における遺伝子発現変化において、添加 24 時間後の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて検討したところ control 細胞と比較し 2 倍～50 倍の発現上昇が認められた遺伝子は 248 種であった(図 1)。

Fold change (EGT+HGEP/Control HEGP)	遺伝子数
10倍～50倍	15
5倍～10倍未満	55
2倍～5倍未満	178

図 1 遺伝子発現マイクロアレイ法による検討

(2) 発現変化の見られた遺伝子群の pathway 解析

発現が 2 倍～50 倍上昇した遺伝子群について、IPA による pathway 解析を行ったところ、血液凝固機構および創傷治癒に関する因子が多くみられた(図 2, 3)。

これらのマイクロアレイで発現上昇が確認された遺伝子群のうち、創傷治癒やフィブリンの安定性にかかわる血液凝固第 6 因子、6 型コラーゲン、およびフィブリノゲン遺伝子の全てのサブタイプについて定量的 RT-PCR にて検討したところ、マイクロアレイと同様に、F13B、COL6A3 および FGA、FGG のサブタイプの発現上昇が認められた(図 4, 5, 6, 7)。

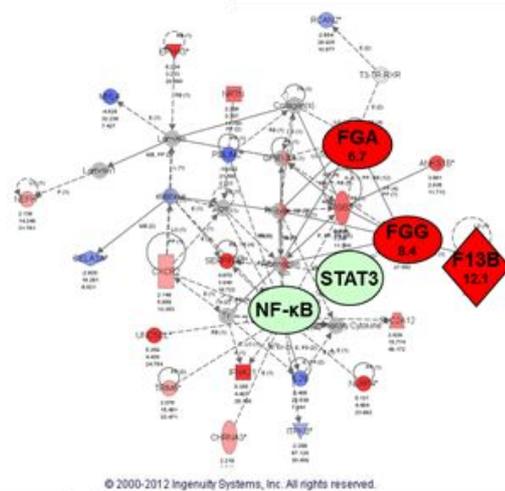


図 2

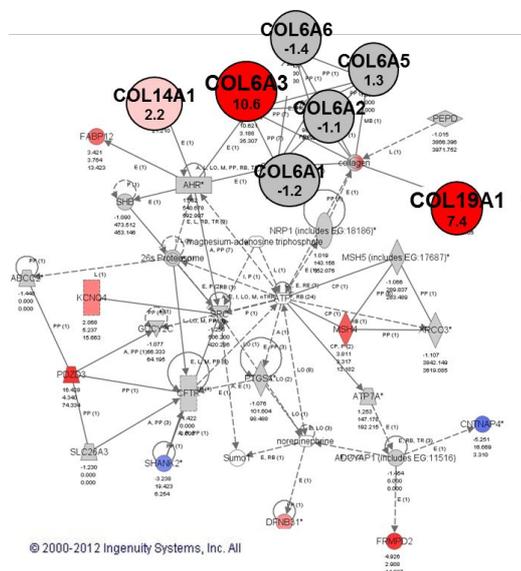


図 3

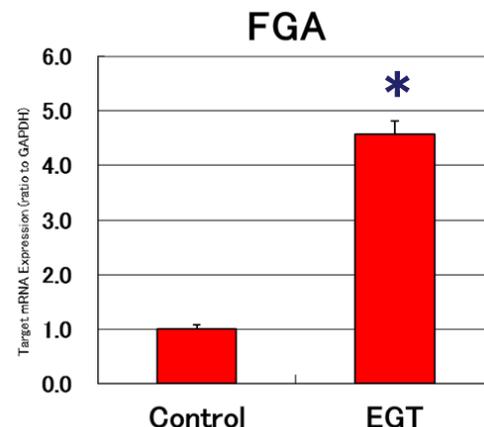


図 4 Fibrinogen alpha chain (FGA)

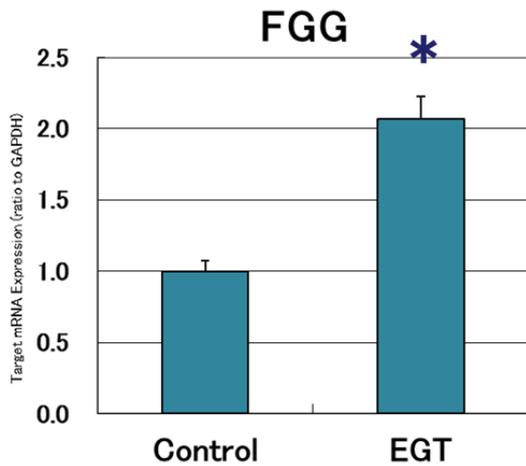


図5 Fibrinogen gamma chain (FGG)

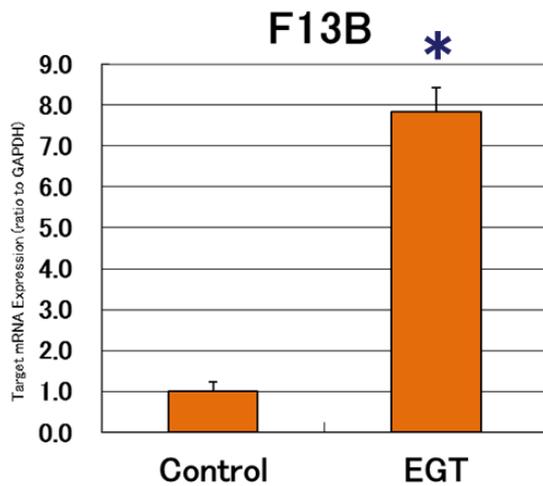


図6 Coagulation factor 13 B chain (F13B)

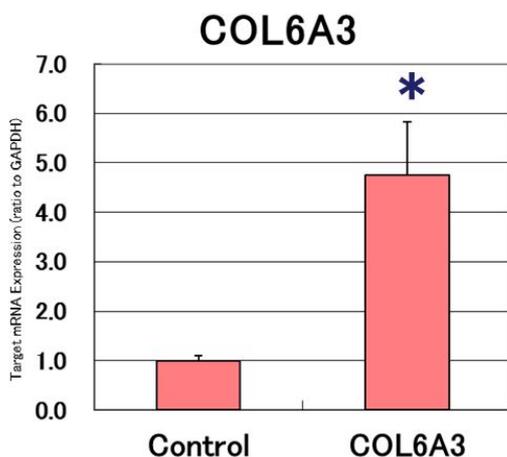


図7 Collagen type 6 alpha 3 (COL6A3)

\* $P < 0.05$  Mann-Whitney U Test in SPSS

(3) 歯肉上皮培養細胞へのエルゴチオネインの長期作用における遺伝子発現変化の検討

エルゴチオネインの歯肉上皮細胞への作用の、エピジェネティックな修飾による発現変化の可能性も検討するため、一ヶ月間の長期培養による長期的影響についても、24時間作用の実験と同様に検討を行った。

エルゴチオネインを添加(1mM)した培養液で一ヶ月間培養後の歯肉上皮前駆細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイ法にて検討したところ、control細胞と比較し発現が2倍以上5倍未満の遺伝子が1580種、5倍以上10倍未満が114種、10倍以上約15倍までの遺伝子が4種類、同定された。(図8)。

発現が2倍~15倍上昇した遺伝子群について、IPAによるpathway解析を行ったところ、IL-17Aを介した各種抗菌ペプチドおよび免疫反応に参与する因子の高い関連性が認められた。(図9)。

Fold change (EGT-HGEP/Control HEGP)	遺伝子数
10倍~15倍	4
5倍~10倍未満	114
2倍~5倍未満	1580

図8

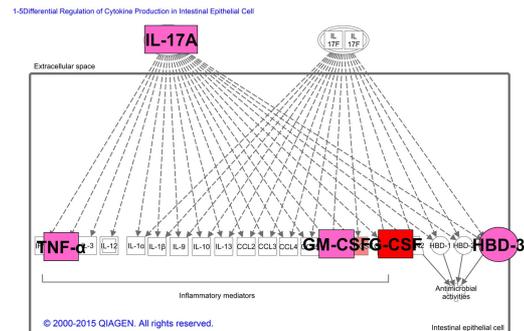


図9

本研究の結果、タモギタケ由来のエルゴチオネインは、口腔粘膜上皮細胞に対して創傷治癒や感染防御の遺伝子発現を上昇させ、歯周炎等の口腔内感染疾患に対して防御的に働く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0件)

〔学会発表〕(計5件)

佐藤 惇、森川 哲郎、原田 文也、Bhoj Raj Adhikari、伊藤 小原純、中條 貴俊、宇津 宮

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

雅史、高井理衣、植原治、吉田光希、西村学  
子、富山隆広、安彦善裕. タモギタケ由来エ  
ルゴチオネインの長期作用による歯肉上皮  
細胞における遺伝子発現変化のバイオイン  
フォマティクス解析. 第 16 回 抗加齢医学  
会総会, パシフィコ横浜, (神奈川県横浜市),  
2016 年 06 月 10 日 ~ 06 月 12 日

佐藤惇、中條貴俊、高井理衣、吉田光希、  
西村学子、富山隆広、安彦善裕. タモギタケ  
由来エルゴチオネインによる歯肉上皮細胞  
における創傷治癒関連因子の遺伝子発現変  
化. 第 14 回 日本抗加齢医学会総会, 大阪国  
際会議場, (大阪府大阪市), 2014 年 06 月 06  
日 ~ 06 月 08 日

佐藤惇、中條貴俊、高井理衣、佐藤英樹、  
吉田光希、西村学子、安彦善裕. タモギタケ  
由来エルゴチオネインによる歯肉上皮細胞  
における血液凝固関連因子の遺伝子発現変  
化. 第 6 回日本口腔検査学会総会, 鶴見大学  
歯学部, (神奈川県横浜市), 2013 年 09 月 15  
日 ~ 09 月 16 日

佐藤惇、高井理衣、佐藤英樹、吉田光希、  
山崎真美、西村学子、富山隆広、パワール・  
ウジャー、安孫子宜光、安彦善裕. 歯肉上  
皮細胞におけるタモギタケ由来エルゴチオ  
ネインによる遺伝子発現変化のバイオイン  
フォマティクス解析. 第 13 回日本抗加齢医  
学会総会, パシフィコ横浜, (神奈川県横浜  
市), 2013 年 06 月 28 日 ~ 06 月 30 日

佐藤惇、山崎真美、西村学子、富山隆広、  
パワール・ウジャー、安孫子宜光、安彦  
善裕. エルゴチオネインの歯肉粘膜上皮細  
胞に対する遺伝子発現の網羅的解析. 第 102  
回日本病理学会総会, ロイトン札幌, (北海  
道札幌市), 2013 年 06 月 06 日 ~ 06 月 08 日

〔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 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
佐藤 惇 ( SATO, Jun )  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 32624267

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :