

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560070

研究課題名（和文）疲労診断バイオマーカーの探索による疲労予防食品開発への展開

研究課題名（英文）The study on the bio-marker for fatigue, and the development of the functional food

研究代表者

湊 健一郎（MINATO, Ken-ichiro）

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：10341728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本実験では、疲労の原因として免疫系細胞の炎症応答を示した。その診断マーカーとしてTNF、IL-6などの炎症促進性サイトサインが利用できることが示唆された。さらに、いくつかの食用キノコが免疫系細胞の炎症応答を抑制することを明らかにした。一方で機能性多糖であるタモギタケ中 グルカンは、成熟免疫系細胞に対しては炎症性応答の促進効果を示したが、未熟細胞からの分化過程においては逆に炎症抑制効果が期待できた。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that a fatigue could be caused by the inflammatory response of immune cells such as dendritic cells, macrophages and monocytes. In this study, the author has shown that both pro- and anti-inflammatory cytokines could become good bio-markers to diagnose fatigue. Moreover, some mushroom showed anti-inflammatory effect on the immune cells. And, the glucan from Pleurotus cornucopiae mushroom could suppress a differentiation of monocyte into inflamed macrophage despite the finding that the glucan induced to inflame matured dendritic cells, macrophages and monocytes. Therefore, this study has considered that some mushrooms can inhibit inflammation of immune cells, and prevent the fatigue.

研究分野：食品科学

キーワード：食用きのこ 炎症抑制作用 樹状細胞 マクロファージ 免疫調節作用 グルカン

1. 研究開始当初の背景

慢性的な生活習慣の変化による身体的・精神的「疲労」は、我が国の活力を減退させると危惧されており、その対策が急務とされていた。そこで申請者は生活因子のなかで食事における「疲労」予防効果が、「食育政策」が浸透している現在状況を鑑みて国民に対して非常に有効であると考えた。「疲労」は脳内神経細胞の炎症により、誘発されると考えられている。つまり炎症性サイトカインの発現パターンを詳細に観測すれば、「どの程度の疲労なのか」という疲労の客観的な判定が実現できると考えた。その抑制効果を指標にして食品による抗疲労効果をスクリーニングできることも考えられたため、申請者は神経系においても重要な免疫担当細胞であるマクロファージを使った炎症誘導実験により、これら炎症誘導物質の産生を指標にして、いくつかの食品因子の抑制効果を明らかにしていた(2012 および 2013 年フリーラジカルに関する国際学会で発表)。そこで本研究において実験開始当初は、抗疲労食品の開発を見据えて、疲労予知・診断に有効なバイオマーカーの探索を主たる目的とした。

2. 研究の目的

本研究は当初、「疲労」という主観的ともいえる疾患を、正確かつ簡便に診断する方法を確立させようという取組そのものが非常にチャレンジングな課題であった。疲労の診断には血液中の cortisol などのストレスホルモンの分泌量を測定することが考えられるが、疲労は実は神経系の免疫系恒常性の破綻に起因するとされる。そこで、本研究では、外部刺激による神経細胞の炎症反応と分泌サイトカイン生産量を調べて、主観的事象である「疲労」の簡易かつ客観的判定にチャレンジしていくことを計画した。つまり、外部からの疲労要因(微生物の侵入、過度な運動、孤独などの精神的負担)の刺激を受けた後、炎症性サイトカインを診断マーカーとして利用して疲労判定法の確立を目指した。さらにその方法を利用して「疲労予防食」を探索することが本研究の最終的な目標であった。そこで本実験では、次の基本的かつ重要な項目(1)、(2)を調査・解明することを目的とした。

- (1) 神経系マクロファージであるミクログリアの炎症時における、サイトカインおよびストレスホルモン(cortisol)産生の時間的変動および生産量の関連性解明による疲労バイオマーカーの探索

申請者のこれまでの成果を基にすると、脳内細胞の炎症発生機構としては、免疫

系と同様に TNF, IL-1 β , TGF- β などの炎症誘導物質(サイトカイン)の持続的産生による、神経系細胞の傷害であることが示唆されている。そこで本研究では、それらを疲労診断用バイオマーカーとして利用できるかどうか検討した。

- (2) 上記バイオマーカーを利用したスクリーニング手法を用いた各種そのまま食品の抗疲労効果の測定

さらに本実験では、確立された「疲労診断用バイオマーカー」を利用して、「抗疲労効果を持つ食品(そのまま食品)」を探索することも視野に入れていた。それ故、本研究で達成される成果は、疲労予防食品の開発に大いに活用でき、「健全な社会の構築」に果たす役割は非常に大きいと考えた。

3. 研究の方法

本研究では基礎的研究として次の二点を明らかにすることで、これまで主観的判定に委ねられていた「疲労」について、免疫系細胞の炎症抑制効果といった「客観的判定」による疲労判定法の確立を目指した。

- (1) 樹状細胞および単球、マクロファージの炎症時における、サイトカイン産生量および産生パターンの関連性解明による炎症バイオマーカーの探索

一般には疲労感の誘発にストレスホルモンが関与することが指摘されている。しかしながら、実際には脳内神経系マクロファージの炎症がストレスホルモン分泌という現象に大きく関わっていることが推察される。つまりミクログリアの炎症による老廃物の脳内への蓄積が、疲労誘発の引き金になるということが示唆されている。そこで、LPS刺激を受けた自然免疫担当細胞「樹状細胞」, 「マクロファージ」, 「単球」の炎症応答に対して分泌されるサイトカイン TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12やケモカイン類の産生パターンを、ELISAおよびqPCRによって検証した。疲労バイオマーカーの選抜をおこなう。一方免疫系細胞はその炎症状態をネガティブフィードバックにより抑制する目的で、IL-10などの、細胞再生を誘導するサイトカインを産生することも分かっている。そこで本サイトカインについても、炎症抑制効果を示すマーカーとなり得るかどうか、ELISAにより測定した。尚、各細胞群はヒト末梢血単核細胞(PBMCs)より分離・分化させたものを使用した。

- (2) In vivo実験系におけるマウス生体内マクロファージの炎症時における食品因子の抗炎症効果の検討(参考文献1)

疲労を抑制することが期待される機能性食品の開発を見据えて、実験動物を用いた炎症抑制効果を調査した。数年来より生体内における炎症反応が疲労発症メカニズムとして示唆されている。そこで、炎症抑制成分を含むタモギタケ熱水抽出物を一週間 BALB/c マウスに投与した。投与期間終了後直ちに、生体内よりマクロファージを採取して、(1) で明らかとなった炎症マーカーであるサイトカインのうち TNF, IL-1 β , IL-12 の産生を qPCR により分析した。また同時に、炎症抑制効果を示す IL-10 の産生量も測定した。

(3) 機能性多糖のマクロファージ分化における炎症抑制性応答についての検討

上記 (1) (2) については成熟細胞群の炎症応答における検証であったが、それら細胞の成熟前の分化過程における炎症応答について検討することも重要であることが示唆された。つまり、キノコ中の多糖画分は免疫系細胞の炎症応答を促進する作用を有していたが、マクロファージ分化に対しては炎症抑制型マクロファージへの分化を誘導することが示唆された。そのため培養細胞株である THP-1(単球)からマクロファージへの分化過程における、機能性多糖の影響を調査した。マクロファージには、炎症性サイトカイン IL-6, IL-12 や TNF を産生して、炎症の惹起、抗腫瘍作用に参与する 1 型マクロファージ (M1) と、IL-10 や TGF- β を産生して老廃物の除去や免疫抑制をおこなう 2 型マクロファージ (M2) などの、いくつかのサブタイプが存在する。それらのうち、M2 マクロファージは、炎症抑制性サイトカインを産生して免疫系恒常性維持において調整役となる。つまり M2 マクロファージの活性化は、M1 マクロファージを制御・抑制することが考えられる。そこでキノコ中多糖の M2 マクロファージ分化誘導作用について、成熟マクロファージから分泌されるサイトカイン類を ELISA により測定して検討した。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞および単球、マクロファージの炎症時における、サイトカイン産生量および産生パターンの関連性解明による炎症バイオマーカーの探索

ヒトPBMCsよりCD14⁺細胞を分離して、IL-4 およびGM-CSF刺激により分化誘導した成熟樹状細胞を実験に供した。LPS刺激した際に本細胞より放出されるサイトカイン類をELISAにより測定した。その結果を図1-3に示した。

図1の炎症促進性サイトカインTNF産生に対する影響で示したように、LPS刺激によるTNF産生抑制効果から、マイタケとナメコ抽出物にLPS刺激による樹状細胞の炎症応答を

抑制する効果が示唆された。さらに図2にマイタケ抽出物の炎症抑制効果を、同じく炎症促進性サイトカインIL-6産生抑制効果を示した。一方タモギタケ抽出物はTNFやIL-6の産生を促進する効果が示された。しかしながら興味深いことに、図3に示したように同時に炎症抑制性サイトカインであるIL-10の産生も促進していた。単球やマクロファージを用いた実験においても同様の結果を得た(未発表)なお、ケモカインの産生については、炎症誘導された成熟樹状細胞を用いたqPCR解析により、CCL2, CCL3, CCL8, CXCL9, CXCL10, LTAの産生が確認された。そのためそれらケモカインが炎症マーカーとして確認された。

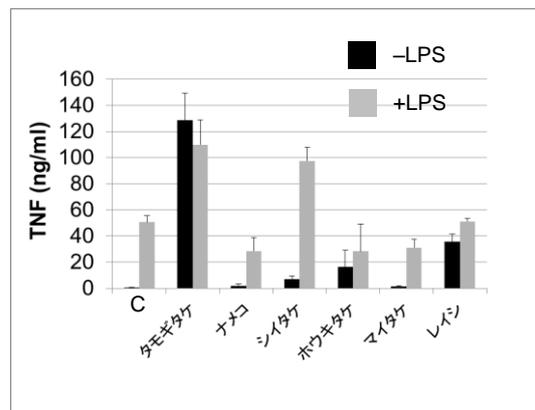


図1 いくつかの食用キノコ抽出物の、LPS刺激された樹状細胞に対する抗炎症作用

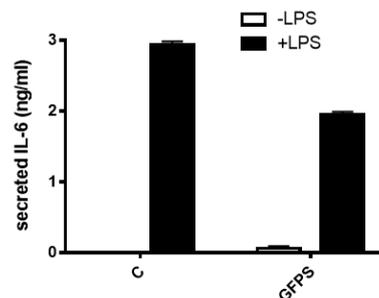


図2 マイタケ抽出物 (GFPS) の成熟樹状細胞に対する抗炎症作用

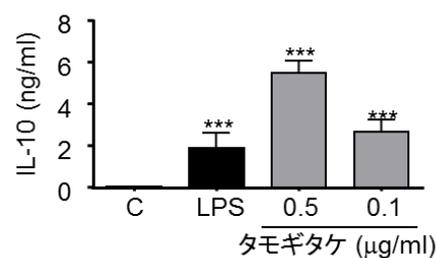


図3 成熟樹状細胞に対するタモギタケ抽出物の抗炎症性サイトカインIL-10産生誘導能 *** $p < 0.001$ (参考文献2)

(2) in vivo実験系におけるマウス生体内マクロファージの炎症時における食品因子の抗炎症効果の検討

ところで申請者は本実験においてタモギタケを機能性食品として展開することを目標にしていた。そのため、(1) のヒト PBMCs を用いた実験において、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を誘導した結果を根拠に、タモギタケ抽出物 (PCPS) の炎症抑制効果を実験動物を用いて検証することとした。

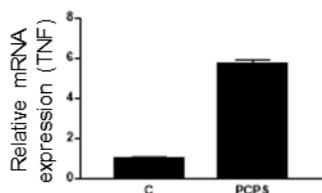


図 4 タモギタケ抽出物 (PCPS) のマウスマクロファージにおける炎症抑制効果の検証 (その 1)

その結果、図 4 に示したように、炎症促進性サイトカイン TNF の産生を誘導していたため、明確な炎症抑制効果は認められなかったが、図 5 に示したように、炎症抑制性 IL-10 の産生も同じく誘導したため、抗炎症作用の可能性は示されたと考える。これについては今後さらなる検討が必要である。

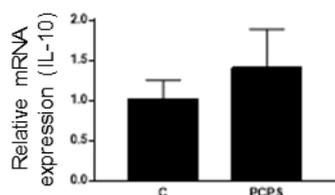


図 5 タモギタケ抽出物 (PCPS) のマウスマクロファージにおける炎症抑制効果の検証 (その 2) (参考文献 1)

(3) 機能性多糖のマクロファージ分化における炎症抑制性応答についての検討

本実験では、タモギタケの機能性食品としての展開を視野に入れていた。特にそれに含まれる機能性グルカンの作用に期待していた。しかしながら(1), (2)の結果からタモギタケには炎症促進作用の方が顕著に示されたため、異なるアプローチが必要であった。そこで申請者はマクロファージ分化に対する作用に着目した。そこで本実験では、タモギタケより機能性グルカンを分離・精製してその作用を調べることにした。GC/MS や NMR 解析の結果、本グルカンはβ-1,6-グルカンであることが示された。そこで単球細胞株

THP-1 を用いたマクロファージ分化実験により、この機能性多糖の分化に対する影響を調べた。その結果、このβグルカンは単球からマクロファージへ分化する際に、炎症性サイトカインである TNF や IL-6 の産生を顕著に抑制することが示された(図 6, 7)。また炎症性ケモカインである CXCL9 の発現も抑制した(未発表)。一方で本グルカンは、分化したマクロファージからの抗炎症性サイトカイン IL-10 産生・分泌を増加させた(図 8)。

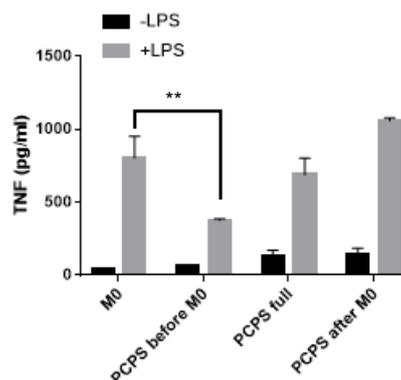


図 6 マクロファージ分化に対するタモギタケ中βグルカンの作用 (その 1) ** $p < 0.01$

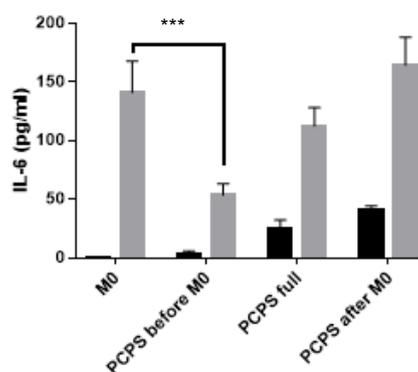


図 7 マクロファージ分化に対するタモギタケ中βグルカンの作用 (その 2) *** $p < 0.001$

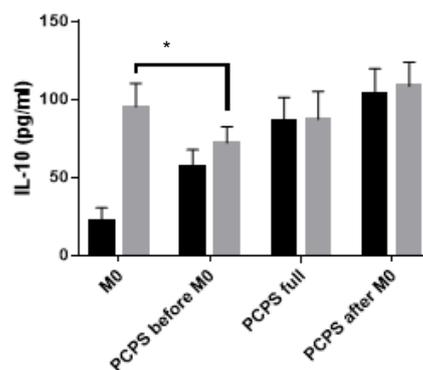


図 8 マクロファージ分化に対するタモギタケ中βグルカンの作用 (その 3) * $p < 0.05$

以上の結果より、いくつかのサイトカインおよびケモカイン類が炎症マーカーとしてELISAにより簡便に測定できることが示された。同時にタモギタケ中βグルカンによる炎症抑制効果の可能性が示され、マイタケやナメコなどが示した抗炎症性作用のように、マクロファージへの分化の過程において、炎症応答の増悪に対する予防・快復効果が期待できることが示唆された。これらの結果は、日頃から「きのこ」を食品として利用している我々にとっては非常に意義深いことである。

<参考文献>

- ① K. Minato, A. Ohara, M. Mizuno, Mediators of Inflammation, 2017, DOI: 10.1155/2017/8402405
- ② K. Minato, L. Laan, A. Ohara, I. van Die, Int. Immunopharmacol., 40, 2016, 156-163

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 2件)

- ① K. Minato, A. Ohara, M. Mizuno, A Proinflammatory effect of the b-glucan from Pleurotus cornucopiae mushroom on macrophage action, Mediators of Inflammation, 査読有, 2017, DOI: 10.1155/2017/8402405
- ② K. Minato, L. Laan, A. Ohara, I. van Die, Pleurotus citrinopileatus polysaccharide induces activation of human dendritic cells through multiple pathway, Int. Immunopharmacol., 査読有, 40, 2016, 156-163

[学会発表] (計 6件)

- ① K. MINATO, L. LAAN, I. van DIE, Immunomodulating and tumoricidal effects of b-1,3/1,6-glucan from Pleurotus citrinopileatus, Immuno-Oncology-Summit-Europe, 2017年3月, イギリス
- ② 湊健一郎, 小原章裕, タモギタケ中βグルカンのマクロファージ分化に対する影響 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月, 京都
- ③ K. MINATO, M. MIZUNO, L. LAAN, I. van DIE, Immunomodulating and tumoricidal effects of b-1,3/1,6-glucan from Pleurotus citrinopileatus, Novel Cancer Therapeutics Summit, 2016年11月, アメリカ
- ④ K. Minato, L. C. Laan, A. Ohara, I. van Die, Immunomodulating effects of edible mushrooms on innate

immunocompetent cells such as macrophage and dendritic cell, The Food Factor I, 2016年11月, スペイン

- ⑤ 湊健一郎, マクロファージ分化におけるキノコ由来多糖の影響, 日本応用糖質科学会第42回近畿支部会講演, 2016年11月, 神戸
- ⑥ 湊健一郎, 自然免疫系細胞に対する機能性多糖およびその他食品成分の免疫調節作用, 第63回日本食品科学工学会大会シンポジウム, 2016年08月, 名古屋

[その他]

ホームページ等

<https://kyoinjoho.meijo-u.ac.jp/search/profile/ja.2beb5eb2f00d9983.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊健一郎 (MINATO, Ken-ichiro)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号: 10341728