

平成30年6月6日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02897

研究課題名(和文) 小腸上皮多糖受容体を介した自然免疫修飾を利用した健康増強に資する高機能性食品開発

研究課題名(英文) Functional foods development to contribute to the healthy reinforcement using the innate immunity through receptor recognizing polysaccharide on small intestine epithelium

研究代表者

水野 雅史 (Mizuno, Masashi)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：00212233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：レンチナンによる腸管炎症抑制の機構としては、腸上皮細胞基底膜側に発現しているTNF- α 受容体であるTNFR1の発現量が減少し、それに伴いNF- κ Bの核内移行、炎症性サイトカインの産生が抑制されると想定されている。そこで本研究では、レンチナンが誘導する細胞膜でのTNFR1の発現変化を可視化することによって検討した。TNFR1-GFP融合タンパク質の細胞膜での発現量が、レンチナン処理により有意に低下することが明らかになった。さらに、全反射照明蛍光顕微鏡観察により、レンチナンによる細胞膜に存在するTNFR1量の減少は、TNFR1の細胞膜への輸送が抑制されるためであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lentinan, α -1,3-1,6- glucan extracted from Lentinula edodes, has been shown that suppressed the intestinal inflammation. The suppressive mechanism of the gut inflammation induced by lentinan was demonstrated that the TNF- α receptor 1 (TNFR1) expressed on basal membrane of IECs was decreased. To elucidate the mechanism to regulate of TNFR1 expression on cell membrane by lentinan, the plasmid encoding TNFR1 and green fluorescent protein (GFP) fusion protein was transfected into Caco-2 cells and monitored the effect of lentinan on TNFR1 on the membrane. The expression level of TNFR1-GFP on the cell membrane decreased when Caco-2 cells were treated with lentinan. Furthermore, it made clear in total internal reflection fluorescence microscope observation that the number of TNFR1 appeared on cell membrane decreased by lentinan treatment, whereas that of TNFR1 disappeared from the membrane was nearly unchanged.

研究分野：食品化学

キーワード：レンチナン 抗炎症作用 炎症性腸疾患 腫瘍壊死因子受容体 Dectin-1

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別され、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。治療としては、ステロイド剤などの免疫抑制作用のある薬剤が使われているが、その副作用が問題となっている。他方、宿主腸管免疫システムでは、腸管上皮細胞直下の粘膜固有層に樹状細胞をはじめとする抗原提示能を持った貪食細胞が存在し、M 細胞によって運搬された腸管腔側の抗原を取り込み抗原提示を行う。正常下では、腸管粘膜固有層に存在する抗原提示細胞は、IL-10 などの抗炎症性サイトカインの産生や、同じく IL-10 を高産生する制御性 T 細胞 (regulatory T 細胞 ; Treg 細胞) を誘導することによって、常在細菌などに対して炎症応答を起ささないようになっている (Andrew et al. *Immunology Letters* 119:22-31, 2008)。この Treg 細胞は、CD4 陽性 T 細胞の一亜群であり、転写因子 forkhead box P3 (Foxp3) を発現することを特徴としており (Cell. 133, 775-787, 2008.) IL-10 を産生することで自己反応性 T 細胞の増殖・活性化を抑え、免疫寛容の維持、過剰な免疫応答の抑制に必須の細胞として働いている。Treg 細胞は、全身のあらゆる臓器に存在しており、CD4 陽性 T 細胞の約 10% をしめる。一方、小腸・大腸においては、Treg 細胞の割合は極めて高く、CD4 陽性 T 細胞の約 30% 以上を占めている。このことは、消化管においては Treg 細胞が免疫応答において重要な働きをしていることを意味している。

2. 研究の目的

日々摂取する食品の量的・質的コントロールによって、食品因子 小腸上皮細胞 免疫システム 腸神経系の機能的連結を統制することが可能であることが明らかとなってきた。すなわち、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に統制する方法やこれに基づく応用技術を開発することで、免疫応答の異常が引き金となっている炎症性腸疾患 (IBD)、アレルギーや自己免疫疾患を治療あるいは予防すること

ができると考えられる。本研究では、小腸上皮様培養細胞とナイーブ T 細胞を用いた新規共培養系モデルを開発し、腸管を介して免疫細胞応答の異常を抑制する食品因子の探索および免疫細胞への情報伝達の解明を行う。

レンチナンはシイタケの子実体に含まれる多糖、-1,3-1,6-グルカンである。我々の研究室では、レンチナンが *in vivo*, *in vitro* 腸管炎症モデルで抗炎症効果を示すこと、および腸上皮細胞に発現している何らかの受容体によって認識されることを明らかにした。また、この腸管炎症抑制の機構としては、腸上皮細胞基底膜側に発現している TNF- α 受容体である TNFR1 の発現量が減少し、それに伴い NF- κ B の核内移行が抑制され、IL-8 の産生量が減少することが明らかになっている。そこで本研究では、レンチナンが誘導する腸上皮細胞における TNFR1 の細胞膜発現調節機構を TNFR1-GFP 融合タンパク質を用いて可視化することで検証した。

3. 研究の方法

小腸上皮細胞上のレンチナン受容体の同定

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小腸上皮細胞は食物繊維を認識するのかを特定するため、それぞれの受容体中和抗体を用いて Caco-2 細胞に処理した後、レンチナンあるいはフコイダンを追加し、Caco-2 からの TGF- β 産生増強が打破されるかどうかを検討する。また、特にレンチナンについては、最近になって β -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する。

レンチナン受容体の再確認

特定できた受容体が本当に機能しているのかを確認するために、受容体をノックダウンした Caco-2 細胞を作成して、疑似腸管インビトロモデルシステムに応用し同様の実験を行う。

TNFR1-GFP 融合タンパク質によるレンチナン処理化での動態

TNFR1 と GFP の融合タンパク質を Caco-2

細胞に発現させ、レンチナンを添加し6時間反応させた後に、抗 TNFR1 抗体で細胞膜上に発現する TNFR1 を蛍光免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLFM) を用いて観察し細胞膜上の TNFR1 の発現変化を評価した。また細胞膜上に発現・消失する1分子 TNFR1 の動きを、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 自然免疫で知られている受容体の中和抗体を *in vitro* 腸管炎症モデル系の小腸上皮細胞側(Caco-2 細胞)に前処理したところ、Dectin-1 処理区でのみ有意な抑制が認められた(図1)。このことを *in vivo* でも確認する

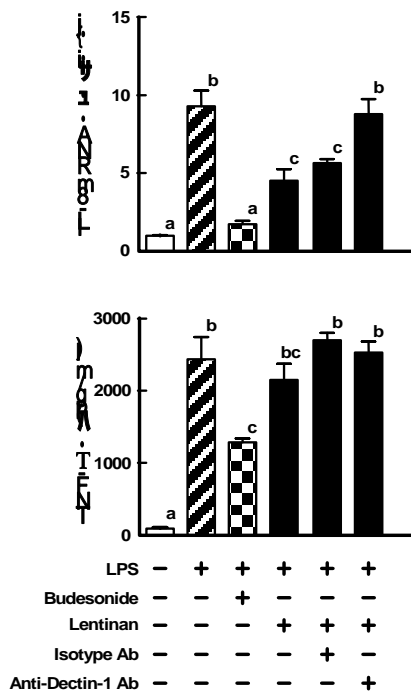


図1. 腸管炎症モデルにおける抗Dectin-1抗体の効果

ため、Dectin-1 KO マウスを用いた DSS 誘導腸炎モデルマウスを行った。その結果、Wild 型ではレンチナンによる抑制が認められたのに対して、KO マウスではその効果は予想通り キャンセルされた。以上の結果から、レンチナンによる抗炎症効果は、腸上皮細胞に発現している Dectin-1 を介して引き起こされることが明らかとなった。

(2) レンチナンによる腸管炎症抑制の機構としては、腸上皮細胞基底膜側に発現している TNF- 受容体である TNFR1 の発現量が減

少し、それに伴い NF- κ B の核内移行が抑制され、IL-8 の産生量が減少することが明らかになっている。そこで本研究では、レンチナンが誘導する腸上皮細胞における TNFR1 の細胞膜発現調節機構を可視化することで検証した。TNFR1 と GFP の融合タンパク質を Caco-2 細胞 に発現させ、レンチナンを添加し6時間反応させた後に、抗 TNFR1 抗体で細胞膜上に発現する TNFR1 を蛍光免疫染色後、共焦点レーザー 顕微鏡 (CLFM) を用いて観察し細胞膜上の TNFR1 の発現変化を評価した。GFP 発現細胞のうち、GFP の蛍光が膜上の TNFR1 と共存する細胞の数を比較したところ、内部ドメインを除去するほどに、細胞膜での発現率が上昇することが明らかになった。従って、内部ドメインすべてを除去した TNFR1 と GFP を融合させた TNFR1-GFP を実験で用いた。

CLFM での観察により、TNFR1 と GFP の融合タンパク質では Caco-2 細胞の細胞膜上には発現しないが、内部ドメインを除去した TNFR1 と GFP の融合タンパク質は細胞膜上に発現するようになること、またその内部ドメイン除去 TNFR1-GFP 融合タンパク質の細胞膜での発現量が、レンチナン処理により有意に低下することが明らかになった(図2)。

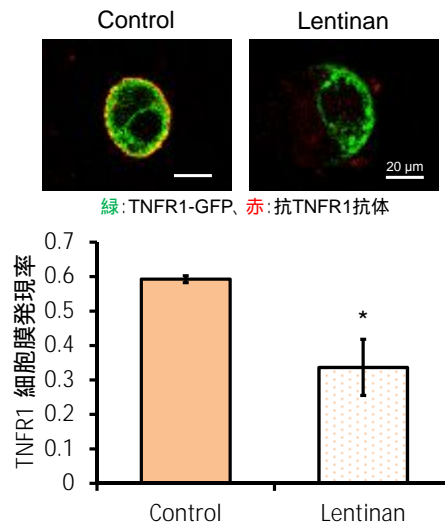


図2. TNFR1-GFPの細胞膜上発現におけるレンチナンの影響

さらに、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) での観察により、レンチナン 処理によって細胞膜上に発現してくる TNFR1 数が減少したのに対して、消失していく数は大きく変化しなかったことから、レンチナン による細胞膜に存在する TNFR1 量の減少は、TNFR1 の

細胞膜への輸送が抑制されるためであることが明らかとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Masashi Mizuno, Keigo Oura and Takashi Hashimoto, Anti-inflammatory property of orally administered lentinan through intestinal immunity in ileum in DSS-induced colitis mice, The 8th International Medicinal Mushroom Conference, Manizales, Colombia, 2015
2. 水野雅史、食品に含まれる多糖類の機能性、日本応用糖質科学会 第40回近畿支部会、2015
3. 坂口香奈、橋本堂史、伊藤俊樹、白井康仁、水野雅史、レンチナンによって誘導される TNFR1 発現変化の可視化による炎症抑制機構の解明、日本食品科学工学会第63回大会、2016
4. Kana Sakaguchi, Takashi Hashimoto, Toshiki Itoh, Yasuhito Shirai, and Masashi Mizuno, The elucidation of the mechanism of lentinan-induced inflammatory suppression by visualizing TNFR1 on the membrane, Functional and Medical Foods for Chronic Diseases: Bioactive Compounds and Biomarkers, Boston, 2016
5. 水野雅史、食品中多糖類の腸管上皮細胞を介した炎症抑制機構、共同開催フォーラム第7回 食の安全研究ホットトピックス、2017
6. Masashi Mizuno, Ken-ichoro Minato, and Takashi Hashimoto, Lentinan exerts anti-inflammatory activity by suppression of transfer of tumor necrosis factor receptor 1 to surface on intestinal epithelial cell through Dectin-1 receptor, The 9th International Medicinal Mushroom Conference, Palermo, Italy, 2017
7. 水野雅史、食品に含まれる高分子多糖の機能、第3回日本農芸化学会関西支部産学官連携シンポジウム、2017

〔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 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

<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 (Masashi Mizuno)

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

白井 康仁 (Shirai Yasuhito)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 60263399

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()