

令和元年6月19日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21075

研究課題名(和文)ペクチンの抗炎症活性構造の同定と作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of chemical structure of pectin for anti-inflammatory activity and its protective mechanism against inflammatory diseases

研究代表者

北口 公司 (KITAGUCHI, Kohji)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50508372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食物繊維の摂取が炎症性疾患発症のリスクを低下させること示唆されている。この抗炎症作用の一部は腸内細菌を介していることが判明しているが、水溶性食物繊維の一種であるペクチンは、直接宿主細胞に働きかけ、炎症応答を調節する可能性が示唆されている。しかしながら、その作用機構は不明である。TLR刺激RAW264.7細胞からのIL-6産生がペクチンの添加で抑制され、この抑制は主鎖分解ペクチンでも維持されていることを発見した。さらに、ペクチン投与マウスでは、LPS誘導性の炎症応答が減弱し、パイエル板の炎症性サイトカイン発現量も低下した。以上より、ペクチン側鎖がTLRシグナルを抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣病のみならず、がんや神経変性疾患などの基盤病態として、免疫系細胞の過剰な活性化と慢性的な炎症応答の持続が指摘されている。本研究成果より、ペクチンを摂取することで、腸管免疫系を介して過剰な免疫細胞の活性化や炎症を制御でき、炎症が関与する様々な慢性疾患や生活習慣病の予防や治療に応用できる可能性が示された。また本研究により、ペクチン分子内の抗炎症活性の発現に必要な化学構造が推定できた。この活性成分のみを濃縮・添加することにより、少量の摂取で十分にペクチンの抗炎症機能を発揮できる新たな機能性食品を創出できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dietary fiber intake has been reported to decrease the risk of developing inflammatory diseases. This anti-inflammatory effect is at least partially due to fermentation of dietary fiber by the colonic microbiota. In addition it has been suggested that pectin, a water-soluble dietary, directly influence host cells and thereby modulate inflammatory responses. However, the underlying mechanism by which pectin exerts its protective effect against inflammatory diseases remains unknown. IL-6 secretion from TLR-activated RAW264.7 cells was suppressed by pretreatment with pectin. This suppression was observed even with degraded pectin pretreatment but not with polygalacturonic acid, as the principal constituent of the pectin backbone. Furthermore, we found that pectin-administered mice showed attenuation of LPS-induced inflammatory responses and reduced levels of inflammatory cytokine in Peyer's patches. These results suggest that pectin suppresses TLR signaling by its side chains.

研究分野：食品免疫学

キーワード：食物繊維 炎症 腸管免疫 マクロファージ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年の健康志向の高まりから、日々の食生活を改善し、肥満や糖尿病、動脈硬化等の生活習慣病の予防・治療することが期待されている。とりわけ食物繊維は、血糖上昇抑制、血中コレステロール低減作用や便秘改善作用などの生体調節機能を有し、特定保健用食品の素材としても広く利用されている。さらに、食物繊維は、腸内細菌叢の組成を変化させることで、保健機能を発揮するプレバイオティクスとしての効能を有し、生活習慣病の改善と密接に関わっていることが明らかにされつつある。一方で、食物繊維が直接、腸管の細胞に作用し、その細胞機能を調節している可能性も示唆されている。とりわけ腸管組織には全末梢リンパ球の7割にも及ぶリンパ球が集積しており、腸管局所のみならず、全身性の免疫応答を調節していることが明らかとなっていることから、食物繊維が腸管免疫細胞に直接作用し、その機能を調節する可能性が考えられた。近年、生活習慣病のみならず、がんや神経変性疾患などの基盤病態として、免疫系細胞の過剰な活性化と慢性的な炎症応答の持続が指摘されており、特定の食物繊維の摂取により、腸管免疫系を介して過剰な免疫細胞の活性化や炎症を制御できれば、炎症が関与する様々な慢性疾患や生活習慣病の予防や治療に資する食品を創生できる可能性が考えられる。水溶性食物繊維のペクチンは、ガラクトツロン酸が $\alpha$ -1,4結合した主鎖に中性糖で構成される側鎖が付加した複合多糖類の一種であり、直接免疫細胞に作用することで抗炎症作用を示す可能性が示唆されている。しかしながら、ペクチンと腸管免疫細胞との直接の相互作用ならびにその炎症調節機構には不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、食物繊維の一種であるペクチンの新たな炎症調節機能を明らかにすることを目的とし、以下の2点に着目して研究を実施した。

- (1) 抗炎症活性に重要なペクチンの化学構造を同定すること
- (2) 腸管免疫系におけるペクチンの抗炎症作用機序を明らかにすること

### 3. 研究の方法

(1) マクロファージは、病原体関連分子パターンを認識することで炎症性サイトカインを放出し、炎症の起点に働く細胞であることから、ペクチンがマクロファージに直接作用している可能性が考えられた。そこで、マクロファージ様細胞株 RAW264.7 をペクチンと共培養した後、リポ多糖(LPS)で RAW264.7 細胞を刺激し、炎症性サイトカインの産生を誘導した。炎症性サイトカイン遺伝子発現量や培地に放出された炎症性サイトカインの一つ IL-6 のタンパク質を測定し、ペクチンの添加により炎症性サイトカイン産生が抑制されるのかを調査した。

(2) C57BL/6 マウスにペクチンを経口投与した後、LPS を腹腔内に投与することで、全身性の炎症を誘導した。LPS 投与後の体温低下や炎症性サイトカイン発現量を測定し、ペクチンを摂取することで炎症が抑制されるのかを調査した。また、ペクチン含有飼料を摂取させたマウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を飲水投与することで、実験的大腸炎を誘導し、ペクチンの摂取で大腸炎が緩和されるのかを調査した。

### 4. 研究成果

(1) LPS 刺激で誘導される TNF- $\alpha$  や IL-6、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現量の上昇が、ペクチンを添加することで有意に低下した。培地中の IL-6 もペクチン添加用量依存的にタンパク質レベルで濃度が低下した(図1)ことから、ペクチンがマクロファージに直接作用して、炎症性サイトカインの産生を抑制している可能性が示唆された。この IL-6 抑制効果は、ペクチンを構成する中性糖からなる側鎖のみを添加した場合でも観察されたが、ポリガラクトツロン酸(側鎖を含まない主鎖のみの多糖)の添加では、IL-6 産生抑制効果がみられなかった。さらに、LPS のみならず、他の Toll-like receptor(TLR)リガンドで RAW264.7 細胞を刺激した際に誘導される IL-6 産生もペクチンの添加で抑制された。以上の結果より、ペクチンの側鎖が直接マクロファージに認識され、抑制性のシグナルを細胞内に導入することで、催炎症シグナル経路である TLR-MyD88 経路を抑制している可能性が示唆された。

(2) LPS 投与により全身性の炎症を誘導したマウスは、エンドトキシンショックにより体温が低下するが、ペクチンを摂取することで体温の低下が有意に緩和された(図2)。腸間膜リンパ節、パイエル板および脾臓の炎症性サイトカイン発現量を測定した結果、パイエル板でのみペクチン摂取マウスの炎症性サイトカイン発現量が有意に低下した。したがってパイエル板細胞にペクチンが作用した可能性が考えられたため、ペクチ

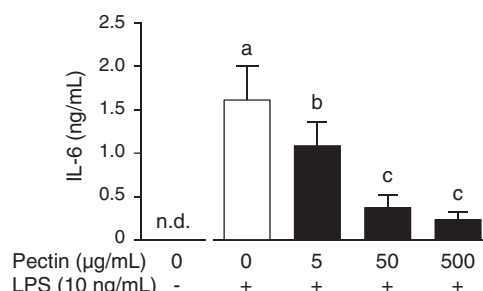


図1. LPS刺激RAW264.7細胞におけるIL-6産生量

ンを経口投与したマウスからパイエル板細胞を採取し、ex vivo で LPS 刺激による IL-6 産生量を測定した。その結果、マクロファージや樹状細胞を含むパイエル板 CD11c 陽性細胞では、ペクチン摂取により IL-6 産生量が有意に低下したが、CD11c 陰性細胞や B 細胞を含む B220 陽性細胞ではペクチン摂取による影響はみられなかった。以上の結果から、経口摂取したペクチンがパイエル板のマクロファージや樹状細胞に作用している可能性が示唆された(図 3)。さらに、in vitro の実験結果から、ペクチンの側鎖が炎症抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆されたことから、DSS 大腸炎モデルマウスに側鎖含有率の異なるペクチンを給餌し、ペクチン側鎖が大腸炎病態に及ぼす影響を調査した。側鎖含有率の高いペクチンを摂取したマウスでは、大腸炎に進行に伴う体重低下や大腸の萎縮および炎症性サイトカイン発現量の亢進が、側鎖含有率の低いペクチンを摂取したマウスに比べて有意に改善していた。以上の結果より、ペクチン側鎖には腸管の炎症を抑制するオリゴ糖・多糖構造が含まれている可能性が示唆された。

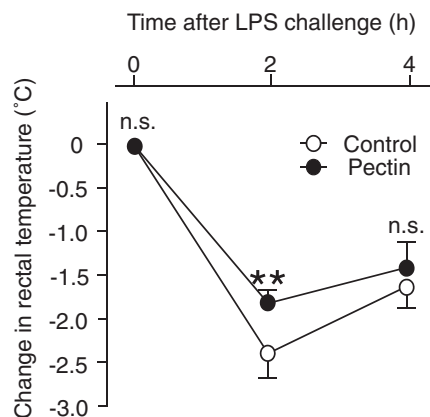


図2. LPS投与マウスの体温変化

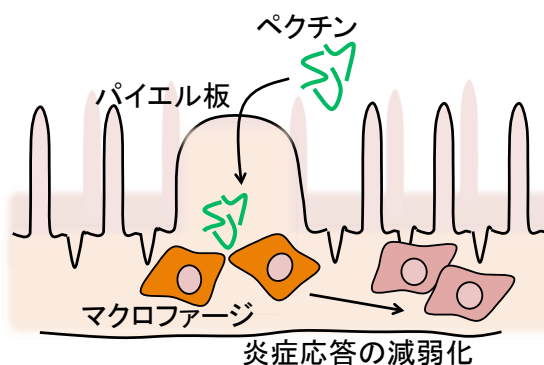


図3. 経口摂取ペクチンが腸管免疫細胞に作用する経路の予想

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Kitaguchi K and Yabe T: Dietary fiber pectin is recognized in a structure-specific manner by intestinal cells. Trends Glycosci. Glycotechnol., in press, 2019. (査読有)
- ② Ishisono K, Yabe T and Kitaguchi K: Citrus pectin attenuates endotoxin shock via suppression of Toll-like receptor signaling in Peyer's patch myeloid cells. J. Nutr. Biochem., 50, 38-45, 2017. (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① 真野敏行, 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: 構造の異なるペクチンの給餌が大腸炎病態に及ぼす影響の解析, 日本応用糖質学会中部支部金沢講演会, 金沢, 2018年12月14日
- ② Kitaguchi K, Ishisono K and Yabe T: Anti-inflammatory effects of pectin in intestinal macrophages, AC21 Joint Mini-Symposium on Agro-Industry Research for Well-Being 2018, Bangkok, Thailand, 2018年11月12日
- ③ 北口公司: ペクチンによる腸管マクロファージの制御機構, 第3回若手企画サイエンスキャンプ〜アニマルサイエンスのフロンティア〜 (日本畜産学会主催・旗影会協賛), 広島, 2018年8月7日
- ④ 真野敏行, 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: シトラスおよびオレンジペクチンの給餌が実験的大腸炎保護効果に及ぼす影響の比較解析, 日本農芸化学会2018年度大会, 名古屋, 2018年3月16日
- ⑤ 石其慧太, 神戸智代, 山元宏貴, 森雄一郎, 矢部富雄, 北口公司: プルーンペクチンによる腸管免疫活性化機構の解析, 日本応用糖質学会中部支部静岡講演会, 静岡, 2018年3月9日
- ⑥ 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: 食物繊維ペクチンによるパイエル板ミエロイド細胞の活性化制御機構の解析, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月19日
- ⑦ 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: ペクチンによるパイエル板細胞の炎症性サイトカイン発現の制御, 日本食物繊維学会第21回学術集会, 静岡, 2016年11月26日
- ⑧ 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: シトラスペクチンによる炎症制御機構の解析, 第63回日本食品科学工学会大会, 名古屋, 2016年8月27日

⑨ 石其慧太, 北口公司, 矢部富雄: 敗血症モデルマウスにおけるシトラスペクチン抗炎症作用機序の解析, 第70回日本栄養・食糧学会大会, 神戸, 2016年5月15日

[その他]

ホームページ等

<http://gifu.yabets.info>