

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02902

研究課題名(和文) D-マンノース骨格を持つ糖鎖による免疫・炎症反応制御とその分子基盤の解析

研究課題名(英文) Analysis of immunological properties of mannose-based molecules and its action mechanisms.

研究代表者

戸田 雅子 (Toda, Masako)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10828429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマンノース骨格を持つ分子の免疫機能性と機能発現機序の解明を目的とした。型マンノオリゴ糖に関しては、鎖長の長い α -1,6結合を持つ分子が、リポ多糖類(LPS)に対する骨髄由来マウス樹状細胞の応答を抑制した。型マンノオリゴ糖に関しては、 α -1,4-マンノピオースがトル様受容体4を介して樹状細胞を賦活化することを明らかにした。一方、酵母由来マンナンはLPSと共刺激により、樹状細胞における抗炎症性応答を促進した。細胞メタボローム解析の結果、解糖系産物乳酸レベルの亢進やTCA回路・炎症性代謝物コハク酸レベルの抑制などの代謝介入が型マンナンによる抗炎症性応答誘導に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品や微生物にはマンノース骨格を持つ分子が含まれており、健康増進への活用が期待されている。本研究では、各種マンノース骨格を持つ分子の免疫機能性やその機能性発現機序を明らかにした。型マンノオリゴ糖の中では α -1,4-マンノピオースが樹状細胞に対して賦活化能を持ち、一方、酵母由来マンナンは抗炎症性を誘導することを示した。特に、酵母由来マンナンによる樹状細胞メタボローム変化についての知見は、細胞代謝やエピジェネティックな遺伝子発現を介した樹状細胞応答のさらなる新規機序の解明、そして免疫制御のストラテジー確立に結びつく。また、本研究は科学的根拠に基づく免疫機能食品の開発にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify immunological function of mannose-based molecules and its action mechanisms. Among α -mannooligosaccharides, long chain molecules such as α -Man-(1-6)-Man4 inhibited lipopolysaccharide (LPS)-stimulated activation of bone marrow derived murine dendritic cells (BMDC). In contrast, among α -mannooligosaccharides, α -Man-(1-4)-Man activated BMDC via engagement of toll-like receptor 4. We also found that α -mannan from yeast promotes anti-inflammatory responses (e.g., IL-10 production) in BMDC when it was stimulated with LPS. Metabolome analysis showed that α -mannan altered levels of many metabolites in BMDC, e.g., an increased level of lactic acid, the final product of glycolysis, and a reduced level of succinic acid, an inflammatory metabolite of TCA cycle. The results suggest that α -mannan induces reprogram of cellular metabolism and thereby promotes anti-inflammatory response in BMDC.

研究分野：食品免疫学

キーワード：mannose mannan dendritic cells

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国においてアレルギー・や加齢性疾患など、アレルギー・反応や慢性炎症が発症・増悪因子となる疾患の患者数が増加し、大きな社会問題となっている。アレルギー・反応や慢性炎症は過剰な免疫反応が原因となり起こるため、免疫調節機能をもつ食品成分の同定やその作用機序の解明が求められている。真菌類や植物類に含まれるマンナンは、免疫調節機能が期待されている多糖類である。真菌類や植物の細胞壁には結合様式の異なる様々な型と型のマンナン(D-マンノースを含む多糖類)が含まれる。マンナンは「免疫系に対する機能を持つ食品成分」と注目され、その機能性の科学的解析が求められている。

2. 研究の目的

本研究はマンノース骨格を持つ分子の免疫機能性とその作用メカニズムの解明を目指すものである。我々は「マンナン骨格の種類や重合度」が樹状細胞(自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しとなる免疫細胞)の活性化レベルを決定し、細胞のメタボロム(代謝反応の総体)を変え、炎症性あるいは調節性のどちらの免疫へ向かうかを決定する、という仮説を立てた。免疫機能性を発現するマンナン骨格を、樹状細胞の培養系や炎症疾患マウスモデルにおいて同定し、免疫調節性マンナンが誘導する「樹状細胞のメタボロム」を解析することで、調節性免疫の誘導機序を解明することを目的とした。さらに真菌類の一種である「麹菌」を用いて、マンノース骨格を付加するマンノシル化アレルギーを発現させるなど、麹菌の免疫機能性の解析も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫機能性を発現するマンノース骨格の同定

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)を用いて、型や型マンナンのコア構造を持つ多糖やオリゴ糖などのサンプルに対する応答を解析した。解析に用いた7種類の型マンノオリゴ糖(-Man-(1 2)-Man、-Man-(1 2)-Man2、-Man-(1 2)-Man3、-Man-(1 6)-Man、-Man-(1 6)-Man2、-Man-(1 6)-Man3、-Man-(1 6)-Man4)は半重合型合成法を用いて合成した。7種類の型マンノオリゴ糖(-Man-(1 4)-Man、-Man-(1 4)-Man2、-Man-(1 4)-Man3、-Man-(1 4)-Man4、-Man-(1 4)-Glc、-Glc-(1 4)-Man、-Man-(1 4)-GlcNAc)は酵素合成法により調製した。各種サンプルでBMDCを刺激後、細胞表面上における活性化マーカー(CD40、CD80、CD86など)の発現レベルをFACSにより解析した。BMDCのサイトカイン産生をELISAにより測定した。また、細胞刺激後にcell lysateを調製し、map kinase signaling pathwayやmTOR signaling pathwayに關与する分子の活性化をwestern blottingにより解析した。サンプルが結合する樹状細胞表面上の受容体を、トル様受容体やC型レクチン受容体、補体受容体の阻害剤を用いることで同定した。さらにBMDCとCD4⁺T細胞の共培養系を用いて、サンプル処理したBMDCのT細胞刺激能を解析した。

(2) マンナンが樹状細胞の代謝に及ぼす影響の解析

酵母由来マンナンあるいはまた炎症性分子であるリポ多糖(LPS)でBMDCを刺激した。刺激18時間後に細胞に含まれる代謝物レベルをGC-MS/MS TQ8040(島津製作所)により測定した。Negative controlとして無刺激の細胞を用いた。

(3) 麹菌の免疫機能性の解析

卵白アレルギーであるオボアルブミン(Ovalbumin: OVA)のcDNAを麹菌グルコアミラーゼglAの触媒ドメインをコードするDNAの下流に連結し、GlA-OVA融合タンパク質として麹菌で発現させた。OVAのコドンと麹菌のコドンに最適化した発現コンストラクトも作製し、発現を試みた。また麹菌と酵母を高圧処理し、可溶性画分サンプルのBMDCに対する賦活化能を解析した。

4. 研究成果

(1) マンノオリゴ糖の樹状細胞における機能発現メカニズム

本研究では最初に、型マンノオリゴ糖や型マンノオリゴ糖の樹状細胞モデルBMDCに対する機能性を解析した。型マンノオリゴ糖は単独処理ではBMDCに反応を誘導せず、LPSと共に細胞を処置した場合には、鎖長の長い-Man-(1 2)-Man3や-Man-(1 6)-Man4がLPSに対する細胞応答を阻害した。LPSはTLR4受容体とMD2共受容体の複合体の疎水ポケットなどと結合し、細胞を活性化する。型オリゴ糖は、そのようなLPS/MD2複合体における疎水性ポケットに結合することでLPSの作用を阻害することが示唆された(Fig. 1A: 次ページ)。

型マンノオリゴ糖に関しては、ピオース構造を持つ分子がBMDCを賦活化し、特に-Man-(1 4)-Man(1,4マンノピオース)が細胞表面における活性化マーカー発現や各種サイトカイン産生を高レベルに誘導した。受容体阻害剤を用いた実験から、1,4マンノピオースはTLR4受容体やC3a補体受容体に結合することで、BMDCを賦活化することが示唆された(Fig. 1B)。

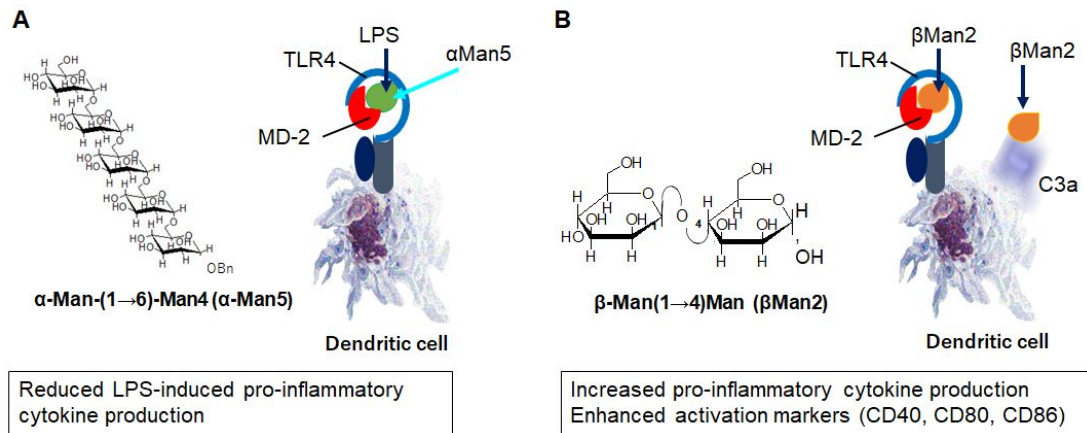


Fig. 1. Differential effects of mannose-based oligomers on DC activation. α -Man-(1→6)-Man4 inhibits LPS-induced DC activation, whereas β -Man-(1→4)-Man activates DC via TLR4 and C3a receptor engagement.

また 1,4 マンノピオースで刺激した BMDC ではグルコースの取り込みが亢進し、NF- κ B や MAPKs (p38, p42/44, SAP/JNK) のリン酸化が誘導されたが、mTOR 関連 p70S6kinase の活性化レベルは低かった。以上より、1,4 マンノピオースは map kinase signaling pathway を介して BMDC を賦活化すること、また代謝経路のリプログラミングが細胞の賦活化に伴うことが示唆された。

(2) マンナンによる樹状細胞における抗炎症化メカニズム

我々が解析したマンノ-ス骨格を持つ分子の中で免疫調整性を示したサンプルは、酵母由来マンナンであった。酵母由来マンナンは C 型レクチン受容体 CD209 のリガンドである。BMDC を炎症性分子 LPS と共にマンナンで処理すると、炎症性サイトカイン IL-1 の産生が抑制される一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 産生が顕著に増強された。さらに BMDC の網羅的メタボローム解析により、(i) LPS は解糖系の最終代謝物・乳酸レベルや TCA 回路におけるクエン酸やコハク酸レベルを増加させること、(ii) マンナンは乳酸レベルとクエン酸レベルをさらに増加するがコハク酸レベルを低下させること、(iii) マンナンはフェニルアラニンやチロシン、セリンなどのアミノ酸濃度を亢進するが、ヒドロキシプロリン濃度を低下させることが明らかになった。乳酸は IL-10 産生を、コハク酸は IL-1 産生を誘導することが報告されている。また、TCA 回路で生成されたクエン酸の一部はミトコンドリから細胞質に出て、ATP クエン酸リアーゼによってアセチル CoA に変換されることが明らかになっている。細胞内アセチル CoA はヒストンアセチルトランスフェラーゼによるヒストンのアセチル化に用いられる。ヒストンのアセチル化はエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与する。以上より、マンナンは樹状細胞の細胞代謝に干渉し抗炎症応答を誘導すること、細胞代謝のリプログラミングがサイトカイン産生におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが示唆された。

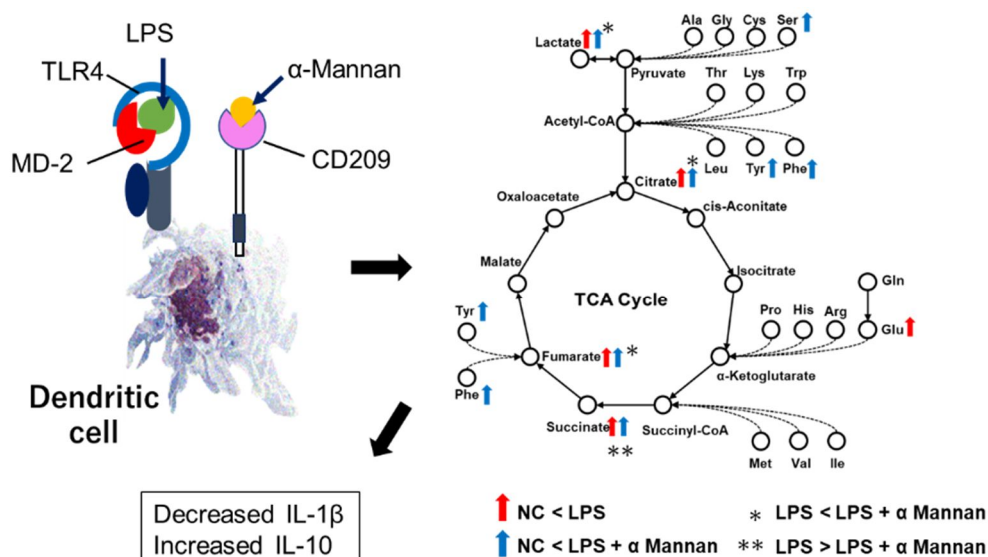


Fig. 2. Altered metabolite levels in BMDC upon LPS and/or α -mannan stimulation. α -mannan increases anti-inflammatory IL-10 production and reduces pro-inflammatory IL-1 β production in LPS-stimulated DC, that is accompanied by altered levels of metabolites including lactate, citrate, succinate, fumarate and many other amino acids.

(3) 麹菌におけるアレルゲン発現について

卵白アレルゲン OVA をモデルアレルゲンとして麹菌による OVA 発現系の構築を試みた。しかしながら OVA 発現レベルは低く、cOVA のコドンを最適化しても発現効率の改善は認められなかった。麹菌による異種タンパク質の発現は難しく、マンノシル化アレルゲンの調製には酵母による発現を試みることとなった。

総括

本研究は、樹状細胞に対して賦活性を持つ マンノピオースが同定し、さらにその細胞賦活化メカニズムを明らかにした。また酵母由来 マンナンが免疫調整性を示し、樹状細胞における炎症性サイトカイン産生の増強や炎症性サイトカイン産生の抑制を誘導することを示した。マンナンによる刺激は樹状細胞の代謝に影響し、その代謝変化がエピジェネティックな遺伝子発現制御を引き起し、抗炎症性サイトカイン産生の増強や炎症性サイトカイン産生の抑制を誘導することが示唆された。麹菌の免疫機能性に関しては、免疫賦活性を持つ可能性が示唆された。このように、本研究により、各種マンノース骨格を持つ分子の免疫機能性やその機能性発現機構に関する新たな知見を得ることができた。本研究で得られた樹状細胞メタボロームに関する知見は、代謝を介した免疫応答の制御のためのストラテジー確立に結びつき、今後の発展が期待される。また、本研究は科学的根拠に基づく免疫機能食品の開発に貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toda M	4. 巻 65(Supplement)
2. 論文標題 Rice Components with Immunomodulatory Function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 S9-S12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.S9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Cheng Ting-Yu, Yen-Ju Lin, Wataru Saburi, Stefan Vieths, Stephan Scheurer, Stefan Schuelke, Masako Toda	4. 巻 14
2. 論文標題 -(1-4)-Mannobiose Acts as an Immunostimulatory Molecule in Murine Dendritic Cells by Binding the TLR4/MD-2 Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10071774.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鄭廷宇、佐分利亘、戸田雅子
2. 発表標題 型D-マンノ - ス骨格を持つオリゴ糖の免疫賦活化能についての解析
3. 学会等名 2020年度日本栄養食糧学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田雅子
2. 発表標題 アレルギーの糖鎖修飾や糖化修飾がアレルギー発症に与える影響について
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会フォーラム「糖質によるタンパク質の翻訳後修飾と疾患」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鄭廷宇、Yen-Ju Lin、佐分利亘、Stefan Schuelke、戸田雅子
2. 発表標題 マンノオリゴ糖による樹状細胞活性化機構の解析
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田雅子
2. 発表標題 食のもつ抗アレルギーのポテンシャル
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ting Yu Cheng、Yen-Ju Lin、Wataru Saburi、Stefan Schuelke、Masako Toda
2. 発表標題 Analysis of mechanism for dendritic cell activation by mannooligosaccharides
3. 学会等名 International symposium on lipids and food ingredients for health promotion (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鄭廷宇、今埜望、戸田雅子
2. 発表標題 多糖類マンナンによる免疫調節機能解析のためのヒトマクロファ - ジモデルの確立
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野沢里緒、樋口央紀、戸田雅子
2. 発表標題 穀物成分の自然免疫活性化能の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鄭廷宇、佐分利亘、戸田雅子
2. 発表標題 型D-マンノ - ス骨格を持つオリゴ糖の免疫賦活化能についての解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鄭廷宇、Yen-Ju Lin、佐分利亘、Stefan Scheulke、戸田雅子
2. 発表標題 1-4マンノピオースによるI型インターフェロン誘導効果の解析
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会 (オンライン大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masako Toda
2. 発表標題 Immunological function of phytonutrients
3. 学会等名 10th International Phytonutrient Symposium 2021, online, Thailand (招待講演) (国際学会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鄭廷宇、安部知純、水田悠帆、宮澤大樹、戸田雅子
2. 発表標題 -Mannanによる 樹状細胞における代謝変化の解析
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐分利 亘 (Saburi Wataru) (00598089)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	比能 洋 (Hinou Hiroshi) (70333333)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	新谷 尚弘 (Shintani takahiro) (70374973)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------