

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380069

研究課題名(和文) 食餌性 β-グルカンによる腸管粘膜上皮のウイルス抵抗性増強効果と機能発現機構

研究課題名(英文) Effect of dietary beta-glucan on the resistibility of intestinal epithelia to intestinal viruses and its mechanisms

研究代表者

松田 幹 (Matsuda, Tsukasa)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20144131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：β-グルカンは、植物、藻類、菌類、酵母などの細胞壁に含まれる多糖で、ブドウ糖を構成成分とするが、消化酵素による分解を受けない食物繊維の一つである。β-グルカンが腸管から体内に取込まれて腸管免疫系を活性化する可能性を、腸粘膜上皮を模倣した細胞培養系とウイルスおよびウイルス様粒子を用いて解析した。貪食系細胞に取込まれたβ-グルカンは細胞内で部分分解されて細胞外に放出され、周辺の細胞を刺激し活性化すること、さらに活性化された細胞から多様な液性因子が放出されることなどを明らかに、それらにより腸管粘膜上皮のウイルス抵抗性が増すことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：β-Glucan is a polysaccharide contained as a cell wall component of plant, algae, fungi, yeast, etc. It is a glucose-polymer classified into a dietary fiber because of its indigestibility. Possible absorption of dietary β-glucan and activation of intestinal immune system by the absorbed β-glucan were investigated using cell culture systems mimicking intestinal epithelia and viruses as well as virus-like particles (VLPs). β-Glucan taken up by phagocytes was degraded and released, and the released β-glucan activated neighboring cells, resulting in the release of various humoral factors. The β-glucan taken up and degraded by phagocytes was suggested to affect the resistibility of intestinal epithelia to intestinal viruses.

研究分野：食品科学

キーワード：β-グルカン 腸上皮細胞 マクロファージ 腸管ウイルス 食物繊維

1. 研究開始当初の背景

(1) β -グルカン

β -グルカンは、植物、藻類、菌類、酵母などの細胞壁に含まれる多糖で、グルコースの β -グリコシド結合の直鎖構造が一般的であるが、中には、短い分岐鎖を持つものも存在する。酵母のザイモザンやシイタケのレンチナンが良く知られているが、これらを含み、 β -グリコシド結合を持つ多糖を β -グルカンと総称している。一般に、アルカリには可溶であるが、生理的な環境では不溶性であり、高等動物は分解酵素を持たないため難消化性である。*In vitro*あるいは体内に投与された場合に、酵母のザイモザンやシイタケのレンチナンが免疫賦活作用やそれを介した抗腫瘍作用を示すことが知られていた。

β -グルカンは、鎖長や分岐が異なる多様な分子の混合物で、水に不溶/難溶であるため水溶液中では分子間で会合し多様な大きさの粒子状、繊維状の重合体として存在する。生物活性の研究では溶液中に微粒子として分散させて実験に用いられているため、不均一であり、濃度を定義することが難しい。また、これまでは β -グルカンを検出する良いプローブがなく、食品や実験に用いるサンプルや溶液中の β -グルカンを定量的に解析することは困難であった。

マクロファージや樹状細胞に発現するレクチンドメインを持つ膜タンパク質、Dectin-1 が β -1,3-グルカンの受容体として同定され、 β -グルカンによる自然免疫活性化機構に関する研究の端緒が開かれた。これにより、 β -グルカンは、本来は病原性真菌を認識する受容体に結合することで免疫系に影響を及ぼす、という理論的根拠が得られたが、食餌性 β -グルカンがマクロファージや樹状細胞に遭遇する経路と場は不明のままであった。シイタケの β -グルカン(レンチナン)を超微粒子化することで経口投与によっても腫瘍免疫を増強することがマウスモデル系で示されていた。また、酵母 β -グルカンの経口投与は、マウスにおいて腸上皮内リンパ球を増加させるとともに IFN- γ の発現を上昇させること、ブタにおいて抗インフルエンザウイルス効果を示すことが報告され、さらに、健康人に β -グルカンを経口投与すると唾液中のIgA濃度が上昇することも報告されていた。

(2) 腸管ウイルスの培養細胞での感染実験

腸管ウイルスの感染実験での宿主細胞には、感染・増殖効率の高いサル腎臓由来の細胞(MA104)が多用されていた。また、ノロウイルスでは感染・増殖させることができる細胞培養実験系は確立されていなかった。ロタウイルスに関して、MA104細胞や幼マウスを用いて乳タンパク質のウイルス中和活性を評価した研究は報告されていたが、ヒト腸上皮細胞を宿主細胞に用いたウイルス感染実験に関する先行研究は少なかった。

2. 研究の目的

これまでに、マウス Dectin-1 の細胞外ドメインを2種の融合タンパク質として動物細胞で発現・分泌させ、これを β -グルカン特異的プローブとしてマクロファージに貪食された β -グルカンの検出が可能であることを確認していた。さらに、2種の可溶性受容体タンパク質を用いたサンドイッチ ELISA 系を構築し、微粒子可溶性 β -1,3-グルカンを標準として 10 ng/ml レベルの高感度で定量することが可能となった。そこで、まずは抗体などの特異的プローブが存在しないために困難であった β -グルカンの動態解析や定量的な実験が可能になると考え、Dectin-1 を用いた β -グルカンの検出・定量分析系の確立と改良を目的とした。

一方、 β -グルカンを胃内投与したマウスの腸管組織を、可溶性受容体プローブを用いて蛍光免疫染色すると、小腸パイエル板内に斑点状に β -グルカンの蛍光シグナルが検出され、さらにマクロファージのマーカー抗原と共局在することから、マクロファージに貪食されていると推定された。このように食餌性 β -グルカンはパイエル板など腸上皮に散在する M 細胞を経由して体内に取り込まれ、濾胞内や粘膜固有層に常在するマクロファージや樹状細胞に貪食されるものと考えられた。そこで、マクロファージに貪食された β -グルカン粒子が細胞内で非酵素的に分解されて再放出され周囲の腸管免疫系細胞と腸上皮細胞に作用しウイルス抵抗性を増強する可能性を追究することを目的とした(図1)。さらに、ノロウイルスウイルス様粒子(VLPs)がヒト腸上皮様 Caco-2 細胞の頂端側表面に結合し、一部が細胞内に取り込まれることを明らかにしており、このノロウイルス感染モデル系は腸上皮細胞のノロウイルス抵抗性の評価に応用する基盤を構築することも目的とした。

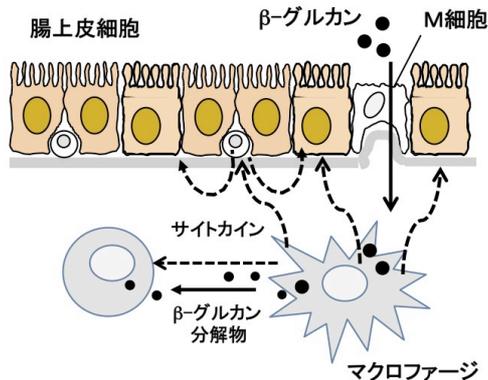


図1: 腸管における β グルカンの取込みと腸管免疫細胞および腸上皮細胞への作用

3. 研究の方法

本件においては β -グルカンとして β -1,3 直鎖で側鎖をもたないカードランを用いた。市販の試薬用カードラン(粒子状)および、細胞系に添加して分散させるために微粒子化

したカードラン票品を研究目的により使い分けた。貪食系の細胞としては、ヒトマクロファージ様細胞株である THP-1 を用い、前処理培養によりマクロファージ様に分化誘導した後、実験に用いた。また、目的に応じて他の貪食系細胞も用いた。Dectin-1 のタンパク質レベルでの発現は、特異抗体を用いた免疫ブロット法により解析した。

Dectin-1 受容体を介した β -グルカン刺激によるナイーブマクロファージの活性化は、NF- κ B エンハンサー配列を組み込んだレポーターシフエラーゼ遺伝子を導入したマクロファージ細胞株を用いて、NF- κ B の活性化に伴うルシフェラーゼ遺伝子の発現を酵素活性として高感度測定した。

ヒトおよびマウス Dectin-1 の糖鎖認識ドメイン (CRD) をコードする cDNA を昆虫細胞発現ベクター (pMT/BiP/V5/His) に組み込みショウジョウバエ由来マクロファージ様 S2 細胞で分泌発現させた。培養上清から His-tag を利用して分泌された CRD-V5-His タンパク質を Ni アフィニティーカラムで分離、濃縮した。

ヒト腸上皮様細胞株 (Caco-2 および HT-29) を 96 穴プレートあるいは多孔性膜上で培養し、ヒトロタウイルス KU 株、サルロタウイルス SA11 等を感染させた。トリプシン処理により活性化したロタウイルスを培養細胞 (多孔性膜上で培養した場合には、頂端側かに) に添加し、一定時間培養して結合と内在化を促進し、その後 1-2 日間培養してウイルスを複製増殖させた。培養上清は、そのまま、あるいは超遠心分離法によりウイルス粒子を濃縮してニトロセルロース膜にスポットし、ロタウイルスカプシドタンパク質抗原に対する特異抗体を用いた蛍光免疫染色により、増殖して細胞外に放出されたロタウイルスを検出した。また、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、蛍光抗体染色し、細胞内で増殖したロタウイルスおよび合成されたカプシドタンパク質をマイクロプレートリーダーおよび蛍光顕微鏡を用いて蛍光シグナルとして半定量的に解析した。

活性化した貪食系細胞から分泌される種々のサイトカインを含むと推定される β -グルカン粒子を取込ませた貪食細胞の培養上清 (慣化培地) には、 β -グルカン存在下で貪食系細胞を培養し、その培養上清を遠心分離した上清を用いた。その培養上清に含まれる各種サイトカインを ELISA キットにより測定した。

ノロウイルスの細胞への感染のモデルとしてノロウイルスのウイルス様粒子 (VLPs) と腸上皮様細胞株 Caco-2 を用いた。ウイルスカプシドタンパク質をバキュロウイルス発現系で高発現させ、その自己会合により形成した VLPs を超遠心分離法により分離精製した。ノロウイルス VLPs を培養細胞の培地中に添加し、培養後、細胞を固定して抗 VLP 抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点レーザ

顕微鏡で腸上皮細胞への結合および内在化を解析した。また、ヒト腸管生検組織を用いたノロウイルス VLPs の粘膜上皮への結合及び取込みの研究は、国立感染症研究所および防衛医科大学校の共同研究者により行われた。ヒト腸管組織小片をノロウイルス VLPs とインキュベートし、洗浄した後、組織を固定し、凍結薄片を作製した。抗 VLP 抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点レーザ顕微鏡で腸上皮細胞への結合および内在化を解析した。

4. 研究成果

β -グルカンにより活性化されると想定されるマクロファージを用いて β -グルカンの作用を解析した。まず、 β -グルカン受容体である Dectin-1 の発現について、ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 と Dectin-1 特異抗体を用いて、タンパク質レベルでの発現を免疫ブロット法で解析した。培地中に微粒子化した β -グルカンを添加して培養し、細胞溶解液のタンパク質を分析すると、添加濃度に依存して、また培養時間依存的に Dectin-1 の 25kDa のバンド強度が上昇した。添加する β -グルカン濃度をさらに上げると Dectin-1 の発現は低下し、また、培養時間についても 24 時間をピークとしてそれ以降は低下した。マクロファージは、 β -グルカンを貪食した後、その受容体 Dectin-1 の発現を誘導し、その後、減衰させるようなフィードバック機構を持つと考えられた。マクロファージにより貪食された β -グルカン粒子が、微粒子化さら再度放出される現象を見つけた。この再放出された微粒子化 β -グルカンがナイーブなマクロファージを活性化するか否かを、活性化を高感度に定量できるレポーター遺伝子を組み込んだマクロファージ細胞株を用いて解析した結果、再放出された微粒子化 β -グルカンは高効率にナイーブなマクロファージを活性化することが明らかとなった。

一方、食餌性 β -グルカンの機能性発現において重要な役割を果たす β -グルカン受容体分子で、マクロファージや樹状細胞で発現する Dectin-1 の β -グルカン認識特異性についても解析した。ヒトおよびマウス Dectin-1 の糖鎖認識ドメイン (CRD) をコードする cDNA を昆虫細胞発現ベクターに組み込み S2 細胞で分泌発現させた。これらの組換え Dectin-1CRD と種々の β -グルカン糖鎖との反応性を調べた結果、ヒトとマウスの CRD では反応性が異なることが明らかとなった。両者の CRD ではアミノ酸配列および N-型糖鎖結合もチーフの有無など一次構造上の差異が見られ、これらの差異が糖鎖結合特異性に寄与していることが示唆された。

また、ヒトロタウイルスの培養腸上皮細胞を用いた感染、増殖のアッセイ系を確立し、腸上皮細胞のウイルス抵抗性の評価に適した条件を設定した。この培養腸上皮細胞を用いた感染、増殖のアッセイ系を用いて、各種

サイトカインによる腸上皮細胞のウイルス抵抗性の増強効果を確認するために、感染細胞の培養上清中に放出されたウイルス粒子を、特異抗体を用いたドットプロット法により定量的に解析した。また、細胞を固定して蛍光免疫染色により細胞内でのウイルスの増殖を評価した。その結果、培養細胞の状態およびウイルスを細胞に感染させる際のトリプシン処理条件など複数の因子によりウイルスの感染増殖速度に差異が生じることが明らかとなり、ウイルス感染の定量的な解析のための今後の検討課題となった(図2)。

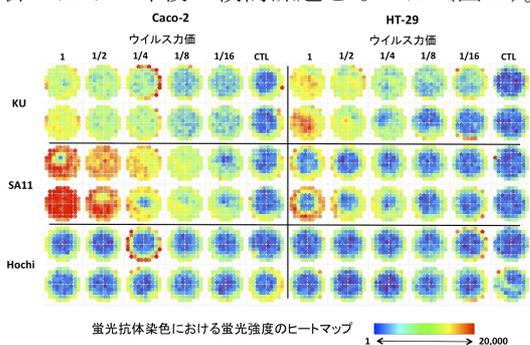


図2: ヒト腸上皮細胞に感染・増殖させたロタウイルスの蛍光抗体染色および蛍光マイクロプレートリーダーを用いた半定量解析

貪食細胞に取込まれたβ-グルカン粒子が細胞内で非酵素的に分解されて再放出され周囲の腸管免疫系細胞と腸上皮細胞に作用しウイルス抵抗性を増強する可能性を追究するために、β-グルカン粒子を取込ませた貪食細胞を培養し、その培養上清(慣化培地)に含まれるサイトカインを測定した。その結果、数種のサイトカイン分泌が、β-グルカン粒子の取込みにより上昇することが明らかとなった。この結果は、研究開始当初に想定した、β-グルカンを取込んだ腸管の貪食細胞がサイトカインを分泌し、それらが腸上皮細胞に作用して粘膜上皮の腸管ウイルス抵抗性を増強するという作業仮説を支持するものであった。

ノロウイルス組換えVLPsのヒト腸上皮様Caco-2細胞頂端側表面への結合と、一部の細胞内への取り込みを観察できるノロウイルス感染モデル系を腸上皮細胞のノロウイルス抵抗性の評価に応用する基盤を構築するために、腸上皮細胞表面のノロウイルスVLPsの受容体候補分子の探索を試みた。膜タンパク質画分の質量分析による網羅的解析を行ったが現時点で同定までには至っていない。一方で、無細胞系での生化学反応に基づく先行研究によりノロウイルス受容体として示唆されていた血液型抗原糖鎖について、培養腸上皮細胞とノロウイルスVLPsを用いて詳細に解析し、必ずしも血液型糖鎖抗原だけが受容体ではないことを明らかにし、さらに新鮮なヒト腸組織票品を用いたVLPsの結合、取込み実験により血液型糖鎖抗原以外にノロウイルス受容体が存在することを確認した。

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2件)

- 1) Hino S, Sato H, Matsuda T, Morita T. Measurement of barley β-glucan concentration in the plasma by sandwich ELISA using rat dectin-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(2):413-5.
- 2) Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6):e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534.

[学会発表] (計3件)

- 1) Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Takashi Shimoike, Yoshiki Fujii, Young Bin Park, Reiko Todaka, Takaji Wakita1, Tsukasa Matsuda, Kazuhiko Katayama: Screening for candidate receptor on Caco-2 involved in norovirus binding by mass spectrometry from different approaches, 日本分子生物学会年会、2012/12/13
- 2) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田幹、片山和彦: ノロウイルス様中空粒子の腸上皮細胞株 Caco-2 への結合に関与するタンパク質のプロテオミクス解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013/3/25
- 3) 秋山 友香、前田紗希、大島 健司、灘野大太、新光一郎、若林裕之、阿部文明、河本聡志、谷口孝喜、松田 幹: ヒト腸上皮様細胞株 Caco-2 および HT-29 へのロタウイルス感染に対するラクトフェリンの抑制作用、日本ラクトフェリン学会第6回学術集会、つくば、2014/11/08

[その他]

ホームページ等

所属研究室ホームページ、研究紹介、外来抗原の消化管粘膜上皮からの取込みと免疫系による認識・応答機構

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molreg00/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 幹 (MATSUDA, Tsukasa)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 20144131

(2) 研究分担者

大島健司 (Oshima, Kenzi)

研究者番号: 90391888

(3) 連携研究者

片山和彦 (KATAYAMA, Kazuhiko)

研究者番号: 60342903