

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07458

研究課題名(和文) 冬虫夏草菌シアル酸結合性レクチンを用いた糖尿病性インスリンレセプターの回復技術

研究課題名(英文) Reactivation of insulin receptor by using lectins derived from Cordyceps.

研究代表者

小川 由起子(Ogawa, Yukiko)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40275607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- α 共存下で細胞分化が阻害されている前駆脂肪細胞に、冬虫夏草からの抽出物を共存させることにより、前駆細胞から脂肪細胞への分化が認められたこと、およびインスリンの作用を正常にすると考えられるアディポネクチン産生量の低下を抑制することを明らかにした。これらの結果より、冬虫夏草抽出液にはインスリン抵抗性糖尿病を改善する可能性があることを見出した。これに加え、冬虫夏草抽出液中にガングリオシドと結合する活性成分の含まれる可能性が示唆された。認識する構造など、検証をさらに進めてゆく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食事などの取り込みにより毒性を持たない冬虫夏草の抽出液の成分が、間接的にアディポネクチンの産生を増やし、糖尿病の原因となる脂肪細胞の分化を促進させた結果から、インスリン抵抗性糖尿病の制御を研究する天然の分子ツールが冬虫夏草から発見された。その機序は未明であるが、糖尿病を理解し治療する新たな制御方法として、学術的、社会的に非常に有意義な知見を残すことができた。

研究成果の概要(英文)：It was clarified that the differentiation from the precursor cell to the adipocyte was observed and the lowering of the adiponectin production quantity which seems to normalize the action of insulin was suppressed by coexisting the extract from genus Cordyceps with the precursor adipocyte in which the cell differentiation is inhibited under the coexistence of TNF- α . From these results, it was found that the extract of genus Cordyceps might improve insulin resistant diabetes. In addition, it was suggested that the extract of Cordyceps sinensis might contain active components that bind to gangliosides. We will further verify the structure of recognition.

研究分野：糖鎖生物学、微生物学、生化学

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 冬虫夏草 アディポネクチン ガングリオシド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症では、肥満細胞の表面に糖脂質グリオシド GM3 が過剰に作られる。これが血糖を低下させるホルモンであるインスリンの受容体と異常に結合する。それによりインスリン受容体にインスリンが結合しても、シグナル伝達が攪乱され、細胞内へ糖の吸収が正しく行われないことが実験的に証明されている。一方、子実体に多くの生薬成分をもつ冬虫夏草菌には、老化防止や滋養競争成分が発見されており、糖尿病への効果も報告されている。医用冬虫夏草の子実体を大量に入手出来る方法として、報告者は、培養系の確立に成功し、人工培養により冬虫夏草の化学成分を大量に得る実験系を有し、シアル酸結合性レクチンの存在を確認していた。この技術を用いて肥満細胞の機能異常に関する研究を構想した。

2. 研究の目的

医薬用麦角菌を液体培養し、その培養上清に含まれるシアル酸結合性レクチンに着目した解析を行う。特に GM3 ガングリオシド (Sia α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-セラミド)への結合性によるインスリンレセプターへの影響の解析に取り組む。糖尿病のインスリン抵抗性は腫瘍壊死因子(TNF)- α により惹起され、その作用はTNF- α と立体の似る血清タンパク「アディポネクチン」の存在で拮抗的に抑制されることから、冬虫夏草中によるアディポネクチンの産生誘導活性についても糖尿病の改善として解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 冬虫夏草の人工培養

東北に生息する新鮮な *Cordyceps pentatomi* (CP)、*Cordyceps roseostromata* (CR)、*Cordyceps militaris* (CM) および *Ophiocordyceps pulvinata* (OCP) を採取後、分生子柄束から無菌的に孢子を採取し、6ヶ月間静置培養した。培養後菌糸と代謝液を分けてる過し、凍結乾燥して実験に用いた。

(2) 冬虫夏草の脂肪細胞分化に対する影響

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 にデキサメサゾン、インスリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、(以下 MDI)を処理して分化した脂肪細胞を分化した脂肪細胞のポジティブコントロールに用いた。その対照区には、MDI 処理時に腫瘍壊死因子 TNF- α を加えたものをインスリン抵抗性細胞として調製した。インスリン抵抗性細胞に冬虫夏草の抽出液を投与し、6日間培養し、脂肪細胞への分化を脂肪滴の産生を oil red O で染色することで評価した。

(3) 冬虫夏草抽出物によるインスリン抵抗性細胞に対する脂肪細胞への分化能の評価

MDI 存在下冬虫夏草エキスを加え 6日間培養し、RIPA buffer で細胞溶解液を調整した。Western Blot 法により、インスリン抵抗性細胞の回復に関するアディポネクチンおよび脂肪細胞分化のマスターレギュレーターPPAR についてタンパク質の産生量を測定した。

(4) 冬虫夏草の抗腫瘍効果

ヒト白血病 U937、Jurkat、ヒト乳癌 MCF-7、MDA-MB-231 細胞、ヒト前立腺がん LNCap 細胞、ヒト子宮体癌 HEC-1 細胞、ヒト胆管がん TYBDC 細胞、ヒト大腸がん HCT15 細胞、ヒト肺がん HARA 細胞、ヒトメラノーマ GAK 細胞及び正常ヒト皮膚繊維芽細胞に対する各種冬

虫夏草エキスの抗腫瘍効果を MTT 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 冬虫夏草抽出液による細胞内脂質量の減少

3T3-L-1 細胞を用いて冬虫夏草エキス (CP, CR 及び CM) による脂肪細胞の分化に及ぼす影響を確認した。定法に従い、MDI (3-イソブチル-1-メチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリン) とともに冬虫夏草抽出液を加え、培養後、oil red O 染色により脂肪滴の蓄積量を測定した。その結果、脂質の細胞内蓄積量がいずれの冬虫夏草の抽出液でも濃度に依存し減少した。用いた抽出物の濃度範囲では、細胞毒性は認められなかった (Fig.1)。

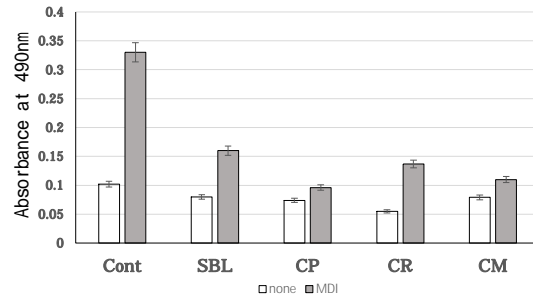


Fig.1. 冬虫夏草による脂肪細胞分化抑制

(2) 脂肪細胞分化に関わる因子の発現

脂肪細胞の分化に関わる因子の発現をタンパク質レベルで調べたところ、PPAR の発現の抑制が認められた。これらのことから、CP、CR 及び CM は、脂肪細胞分化のマスター・レギュレーター PPAR の発現を低下させることで脂質代謝を改善し、肥満を抑制していることが考察された (Fig.2)。

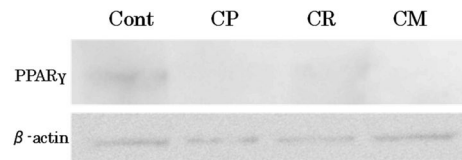


Fig.2. 冬虫夏草エキスによる PPAR γ の発現抑制

(3) TNF- α による脂肪細胞への分化阻害に対する効果

培地のみで 3T3-L-1 細胞を 6 日間培養した冬虫夏草抽出液未処理群は、脂肪細胞への分化は認められなかった。一方、MDI 処理群では、約 90% の細胞が脂肪滴を細胞質に含む脂肪細胞へ分化した。さらに、MDI と TNF- α を同時に添加した群での脂肪細胞への分化は、MDI 処理区の 30 ~ 40% 程度が抑制した。これに対し、冬虫夏草エキス (OCP) を MDI と TNF- α 添加群に同時に添加すると、添加濃度依存的にオイルレッド O に染まる細胞が増加した (Fig.3)。

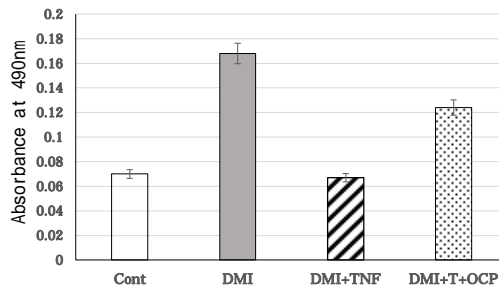


Fig.3. TNF- α による脂肪細胞への分化阻害に対する冬虫夏草の効果

(4) 冬虫夏草エキスのアディポネクチン産生に対する影響

脂肪細胞のアディポネクチン産生は冬虫夏草抽出液を加えることにより増加した。3T3-基本培地のみで 3T3-L-1 細胞を培養した未処理群では、アディポネクチンはほぼ産生されず、MDI 群ではアディポネクチン産生が培養上清中に認められた。さらに MDI と TNF- α とを同時に与えた群では、アディポネクチンの量は有意に抑制された。これに対して、冬草夏草エキスを TNF- α 添加以降 5 日間継続的に添加す

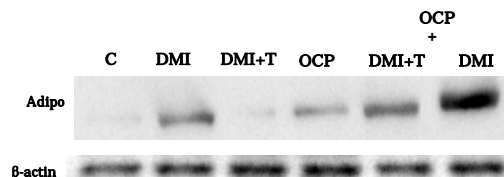


Fig.4. TNF- α によるアディポネクチン産生低下に対する冬虫夏草の効果

は有意に抑制された。これに対して、冬草夏草エキスを TNF- α 添加以降 5 日間継続的に添加す

ると、アディポネクチン産生増加が認められた (Fig.4)。

本研究は、冬虫夏草エキスを対象として、脂肪細胞分化を指標に脂肪細胞分化調節作用及び TNF- α による脂肪細胞分化阻害とアディポネクチン産生低下を解除する作用について検討した。その結果、TNF- α による脂肪細胞への分化阻害下において OCP は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進した。さらに、TNF- α によるアディポネクチン産生低下も有意に抑制することが明らかになった。以上のことから、冬虫夏草エキスには、インスリン抵抗性糖尿病を改善する活性のあることが示唆された。

(5) 冬虫夏草エキスの抗腫瘍効果

冬虫夏草エキス (CR, OCP) は、ヒト白血病細胞およびヒト乳癌細胞に対し濃度依存的に有意な抗腫瘍効果を示した (Figs.5,6)。

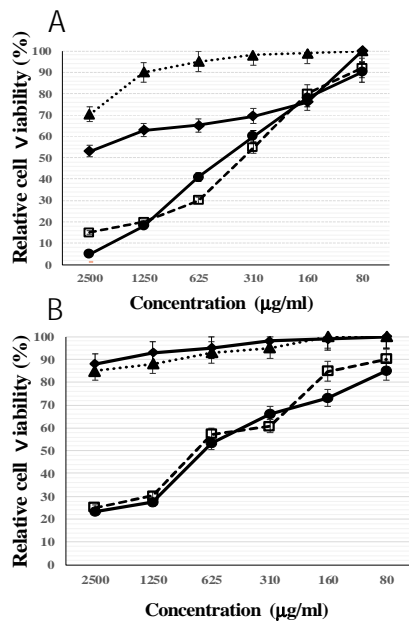


Fig.5. 各種癌細胞に対するにOCPの抗腫瘍効果 (A) U937(), Jurkat(), LNCap() and HEC-1(). (B) MDA-MB-231(), MCF7(), TYBDC-1() and NHDF().

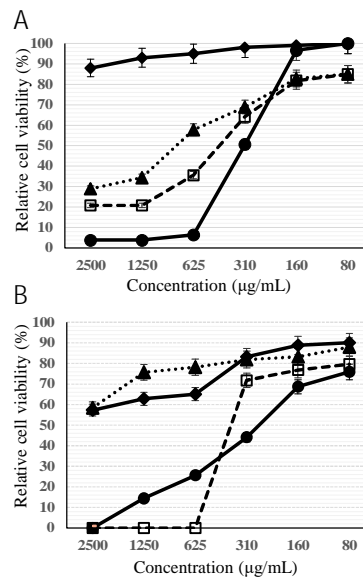


Fig.6. 各種癌細胞に対するにCRの抗腫瘍効果 (A) MDA-MB-231(), MCF7(), HCT15() and NHDF(). (B) U937(), Jurkat(), GAK() and HARA().

Cordyceps militaris には、コルジセピンが含まれており、コルジセピンには抗腫瘍効果や抗肥満作用があることが知られている。しかし今回用いた *Cordyceps pentatomi* Koval (CP)、*Cordyceps roseostromata* (CR) および *Ophiocordyceps pulvinata* (OCP) には、コルジセピンは含まれないことから別の化合物が効果を発揮したと考える。今回の研究において、添加する冬虫夏草抽出物の濃度の違いで異なる効能を示すことが明らかとなった。また、インスリン抵抗性では、インスリン受容体のカベオラマイクロドメインへの局在化が消失する報告があり、冬虫夏草の中には、GM3 と結合する物質も含まれている可能性が示唆された。ガングリオシド GM3 をコートした ELISA プレートに各種濃度に希釈した冬虫夏草抽出液を添加し、再び GM3 を加えて反応させ、プレートを洗浄後、抗 GM3 抗体で冬虫夏草抽出物中の GM3 結合分子の存在を解析した。その結果、結合は弱いものの、抗 GM3 抗体による反応が検出された。この結合が GM3 糖鎖構造を直接認識したものかの検証は、ひきつづき解析を進め、明らかにしてゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogawa Y., Takano F., Yahagi N., Yahagi M., Kobayashi Y., Kobayashi H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Specific Antiproliferative Activity against Several Human Cancer Cells with Metabolites from <i>Onygena corvina</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.	6. 最初と最後の頁 1659-1668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20546/ijcmas.2019.801.174	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 Ogawa Y., Murakami H., Kuraoka T., Mine R., Kobayashi H	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Specific Antiproliferative Activity against Several Human Cancer Cells Possessed by <i>Cordyceps militaris</i> Grown in Viable Pupa of Silkworm Raised under Sterile Environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.	6. 最初と最後の頁 988-997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20546/ijcmas.2019.801.174	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 Fujii Yuki, Gerdol Marco, Kawsar Sarkar M. A., Hasan Imtiaj, Spazzali Francesca, Yoshida Tatsusada, Ogawa Yukiko, Rajia Sultana, Kamata Kenichi, Koide Yasuhiro, Sugawara Shigeki, Hosono Masahiro, Tame Jeremy R. H., Fujita Hideaki, Pallavicini Alberto, Ozeki Yasuhiro	4. 巻 287
2. 論文標題 A GM1b/asialo GM1 oligosaccharide binding R type lectin from purplish bifurcate mussels <i>Mytilisepta virgata</i> and its effect on MAP kinases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2612 ~ 2630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小川由起子	4. 巻 46(1)
2. 論文標題 冬虫夏草菌シアル酸結合性レクチンを用いた糖尿病性インスリンレセプターの回復技術	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Med. Sci. Digest	6. 最初と最後の頁 59-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小川由起子	4. 巻 35 (13)
2. 論文標題 糖尿病治療への新たなアプローチ～冬虫夏草菌シアル酸結合性レクチンを用いた糖尿病性インスリンレセプターの回復技術～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 82-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石山泰成、多々良知法、田中宏光、立田岳生、菅原栄紀、細野雅祐、藤井佑樹、大関泰裕、小林秀光、小川由起子
2. 発表標題 シアル酸結合性レクチンの抗微生物活性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 多々良知法、石山泰成、長谷亜耶、西田成吾、村上弘子、峯隆吉、倉岡卓也、小林秀光、小川由起子
2. 発表標題 Cordyceps militarisの生理機能
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井佑樹、マルコゲルドル、小川由起子、吉田達貞、大関泰裕、藤田英明
2. 発表標題 レクチンSeviLの糖鎖結合プロファイル解析
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 佑樹、Marco Gerdoi、小川 由起子、松崎 理佐、藤田 英明、大関 泰裕
2. 発表標題 イガイ科R型レクチンの発見とスフィンゴ糖脂質を介した細胞増殖の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷垂耶、西田成吾、村上弘子、倉岡卓也、峯隆吉、小林秀光、小川由起子
2. 発表標題 無菌飼育カイコの生きたサナギを宿主とした冬虫夏草サナギタケの数種のヒト癌細胞に対する特異的増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田成吾、長谷垂耶1、森永紀、青木結以、藤井佑樹、倉岡卓也、矢萩信夫、小林秀光、小川由起子
2. 発表標題 Coordyceps pentatomi Koval 二次代謝産物のメラニン生成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井佑樹、小川由起子、Imtiaj Hasan、小出康裕、大関泰裕、藤田英明
2. 発表標題 イガイ科R-型レクチン家系の発見とアジアロGM1を介す新たな糖鎖シグナル
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉岡卓也、國村愛、安田郁希、小川由起子、小林秀光
2. 発表標題 無菌蚕の蛹を培地として生育したサナギタケの α -グルコシダーゼ及びキサンチンオキシダーゼの阻害効果について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田百香、吉田史姫、下地弘人、藤井佑樹、倉岡卓也、小林秀光、小川由起子
2. 発表標題 冬虫夏草によるインスリン抵抗性改善作用
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田史姫、福田百香、田中宏光、立田岳生、菅原栄紀、細野雅祐、藤井佑樹、大関泰裕、小川由起子
2. 発表標題 シアル酸結合性レクチンの抗微生物活性
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021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	藤井 佑樹 (Fujii Yuki) (80610063)	長崎国際大学・薬学部・講師 (37303)	

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
---------	---------