

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19741

研究課題名(和文) IgEに対して高親和性レクチン分泌を惹起する食品因子による新規アレルギー抑制効果

研究課題名(英文) A novel anti-allergic property by food factor possessing high affinity lectin-like protein against IgE

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：まずHT-29細胞とRBL-2H3細胞からなる供培養系を構築し、フコイダン添加量に依存して基底膜側へのGal9分泌、また経時的分泌量およびGal9 mRNA発現量の増加を確認した。さらにRBL-2H3細胞の脱顆粒も抑制されることも明らかとなった。次に、TLR9の関与を明らかにするため、TLR9 siRNA配列をトランスフェクションさせたTLR9ノックダウンHT-29細胞を用いると、基底膜側に分泌されるGal9量の減少が観察された。以上のことより、フコイダン経口摂取により、腸管上皮細胞に発現しているTLR9受容体を介して血中にGal9を産生することで、型アレルギーが抑制され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

フコイダン経口摂取により、TLR9を介してIgE高親和性のガレクチン9が血中に分泌されるので、例えば既に花粉症などのアレルギー疾患を罹患した後でもその発症を抑制できることを示唆しており、これまでの抗アレルギー抑制機構とは全く異なった新規抑制機構を提唱できる。すなわち、これまでアレルギーを抑制する目的で着目されて来たTh1/Th2バランスの崩れを改善することを目的としていないため、細胞性あるいは体液性免疫への影響することなくアレルギーを改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of Galectin 9 (Gal9) production by fucoidan administration, a culture system consisting of HT-29/RBL-2H3 cells was first constructed. It was demonstrated that the amount of Gal9 secreted to the basolateral side was increased with dose-dependent manner, and the amount of Gal9 secreted and Gal9 mRNA expression increased over time depending on the amount of fucoidan added. Furthermore, degranulation of RBL-2H3 cells was also suppressed. Next, to clarify the involvement of TLR9 as the fucoidan receptor, we evaluated its effect on Gal9 release using a TLR9 knockdown strain of HT-29 cells transfected with a TLR9 siRNA sequence. As a result, a decrease in the amount of Gal9 secreted to the basolateral side was observed upon TLR9 knockdown. In conclusion, we demonstrated that oral fucoidan suppresses type I allergy by producing Gal9 in the blood via TLR9 receptors expressed on intestinal epithelial cells.

研究分野：食品機能学

キーワード：型アレルギー 腸上皮細胞 ガレクチン9 フコイダン コンブ

1. 研究開始当初の背景

Kuchroo ら (*J. Immunol.*, 85(3), 1383-1392, 2010) によってガレクチン 9 は、CD4⁺Th1 細胞や CD8⁺Tc1 細胞に特異的に発現している Tim-3 のリガンドであり、自己免疫やアレルギー発症の調節に重要な機能を果たしていることが示された。最近、この物質は Tim-3 陽性細胞のアポトーシスを誘導することによって自己免疫反応を抑制することができる可能性が示された (Zhu et al., *Nat. Immunol.*, 6(12), 1245-52, 2005)。さらに、Treg 誘導、炎症型ヘルパー T 細胞である Th1 や Th17 に発現している Tim-3 を介してアポトーシスを誘導し、自己免疫疾患を抑制することも明らかにされた。従って、Th1/Th2 バランスが Th2 型に偏ることで発症するアレルギー反応においてもガレクチン 9 が機能しうると考えた。すなわち、ガレクチン 9 分泌を促進する食品を摂取することで Tim-3 を発現している肥満細胞と結合し、脱感作能を利用してアレルギー疾患を抑制できると予想した。本研究の成果は、これまで抗原提示細胞→Th0→Th2→B 細胞→IgE 分泌といった I 型アレルギー発症における Th2 型優位を緩和して Th1 型へと移行させるサイトカイン分泌促進がアレルギー抑制に有効であるとされてきたが、ガレクチン 9 による肥満細胞の脱感作によってアレルギーを抑制できることが明らかにできれば、医薬品に頼らない新たなアレルギー抑制法の開発へと展開できると考えた。

2. 研究の目的

ガレクチン 9 は、過剰免疫状態では免疫の抑制を免疫低下状態では免疫増強を発揮する作用を有しており、免疫反応における恒常性維持 (ホメオスタシス) を司る物質として最近注目されている。一方、褐藻類特に昆布に含まれている多糖体であるフコイダンが、I 型アレルギーの受動皮膚アナフラキシー (PCA) 反応試験において耳介浮腫を抑制することを見出した。また、その抑制機構がフコイタンを経口摂取することで、血中へのガレクチン 9 分泌が促され、このタンパク質が IgE との高親和性のために結合することで、肥満細胞と IgE の結合が抑制されるためであることを明らかにしてきた (Tanino et al., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 59(1), 25-30, 2016)。アレルギーによる I 型アレルギー発症機構は、(1) アレルギーによる抗原提示細胞の認識、(2) ナイーブヘルパー細胞 (Th0) から Th2 への分化、(3) B 細胞における IgE 産生という過程を経て、(4) 最終的に肥満細胞と IgE の結合が起こり感作が成立、(5) その後再びアレルギーに曝露されるとアレルギーが発症する。この過程において、ガレクチン 9 が存在すると過程 (4) が抑制される可能性が考えられるので、まず能動的アナフラキシー反応である OVA 感作実験を行う。次に、同じ系を用いて既に感作された状態でもフコイタン摂取によるガレクチン 9 分泌を介して IgE 結合肥満細胞からの IgE 離脱が起こり、アレルギー発症が抑制されるか否かを確認する。一方、フコイタンは経口投与すると血中のガレクチン 9 分泌が起こるが、腹腔内投与では起こらないことから、腸管上皮細胞を介することが重要であることが示唆される。申請者はこれまでにシイタケに含まれる多糖類であるレンチナンが腸管上皮細胞に発現しており、自然免疫に重要は働きをしている Dectin-1 受容体を介して抗炎症性を示すことや、ポリフェノールの一種であるルテオリンが腸管上皮細胞から吸収され、マクロファージに作用して転写因子である NF- κ B を不活化することで TNF- α 産生を抑制することなど、腸管上皮細胞と食品因子との関連について共培養系を用いて解明してきた。そこで、腸管上皮細胞と肥満細胞による共培養系を構築し、ガレクチン 9 分泌を指標にフコイタン認識受容体を探索する。仮に受容体が同定できれば、その受容体のアゴニストを調べることで、ガレクチン 9 分泌を促進する食品因子の探索に用いることができ、医薬品に頼らない新たなアレルギー抑制法の開発が期待できる。

3. 研究の方法

①腸管細胞と肥満細胞からなるアレルギー発症疑似モデルシステムの構築

トランズウェルを用いて、ガレクチン9を分泌するヒト結腸がん由来 T84 細胞を管腔側、基底膜側に肥満細胞 (RBL-2H3) を配置した共培養モデルを作成する。アレルギーが起こっているかどうかは、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することで判断する。RBL-2H3 細胞を抗 DNP-IgE で抗体で感作させ洗浄後、管腔側にフコイダンを添加する。6 時間反応後、基底膜側に抗原として DNP-アルブミンを添加することで脱顆粒を誘引し、RBL-2H3 細胞から基底膜側の上清に放出された β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定し脱顆粒の指標とした。また、基底膜側に分泌されたガレクチン9は、抗 DNP-IgE 抗体と結合していることが予測されるので、抗ガレクチン9抗体で免疫沈降させて後、抗 IgE 抗体でウェスタンブロットにより、ガレクチン9の確認を行う。これにより、フコイダンによる抗アレルギー効果を評価すると共に、ガレクチン9分泌への影響も同時に判断できる。

②アレルギー発症疑似モデルを用いたフコイダン認識受容体の同定

腸上皮細胞を介したガレクチン9分泌のメカニズムは、いまだ世界的に解明されていない。最近、腸上皮細胞によるガレクチン9の放出に TLR9 シグナルが関与していることが示唆されその証拠がいくつか得られている。例えば、比較的短鎖ガラクトオリゴ糖、長鎖フラクトオリゴ糖、2-フコシラクトースなどの難消化性オリゴ糖が、トル様受容体 (TLR) 9 リガンドであるバクテリア DNA (CpG-DNA) との相乗効果で、上皮細胞からガレクチン9放出を促進することが報告されている。TLR9 の関与を明らかにするため、HT-29 細胞をフコイダン溶液及び合成 TLR9 アゴニスト (CpG-ODN, M 362) に暴露し、*Igals9* mRNA 発現を定量 RT-PCR で、ガレクチン-9 のタンパク質発現を ELISA 法で分析した。さらに、TLR9 siRNA 配列を lipofectamineTM RNAiMAX transfection reagent を用いてトランスフェクションさせた HT-29 細胞 TLR9 ノックダウンを作成し、フコイダン刺激によるガレクチン9放出量への影響を ELISA 法によって定量した。

③供試材料の純度および分子量

常法に従い抽出したフコイダン画分を用いて、Toyopearl DEAE-650M による陰イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephacryl S-400 HR gel によるゲルクロマトグラフィーを用いて、今回用いたフコイダンの純度および分子量を測定した。

4. 研究成果

(1) HT-29 細胞を用いてフコイダン刺激によるガレクチン9分泌における経時的変化について検討した。フコイダンによるガレクチン9の発現上昇を *in vitro* で評価する系を構築した。腸管上皮細胞である HT-29 細胞にフコイダン溶液 (0.05 %, 0.1%, 0.2% w/v) を直接作用させ、HT-29 細胞中のガレクチン9 (*Igals9*) mRNA 発現と培地中のガレクチン9 タンパク質産生量を評価した。その結果、フコイダンの添加量と反応時間により、ガレクチン9 の mRNA 発現 (図1) とタンパク質の放出 (図2) が経時的に促進されることが判明した。また、腸上皮細胞である Caco-2 細胞とは違って、HT-29 細胞を用いることでフコイダンによるガレクチン9分泌を *in vitro* 系で検証できる測定系を構築することができた。

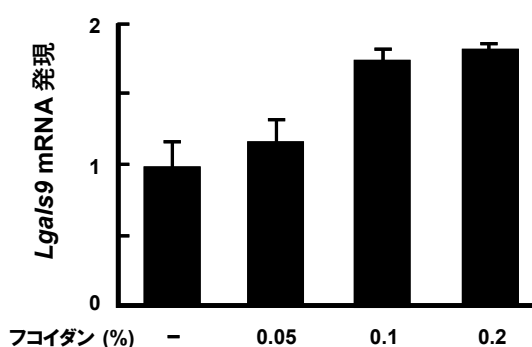


図1 HT-29細胞中の*Igals9* mRNA 発現

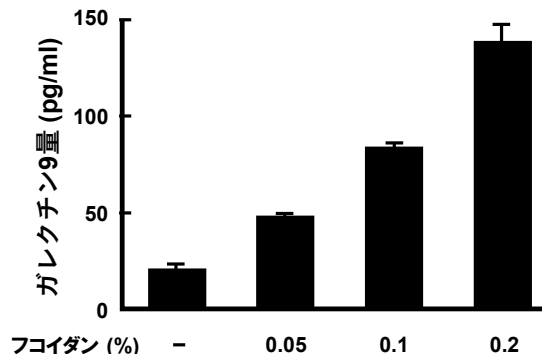


図2 HT-29からのガレクチン9産生量の変化

(2) HT-29 細胞で TLR9 をノックダウンすると、フコイダンに誘導されるガレクチン9タンパク質が減少する傾向が観察された (図3)。一方で、HT-29 細胞の管腔側からフコイダンで刺激した際、基底膜側へのガレクチン9の産生は、TLR9 アゴニスト処

理と同様の水準で促進した。さらに興味深いのは、フコイダンと TLR9 アゴニストの併用でガレクチン9 産生量はさらに増強されることも見いだした。従って生体内では、フコイダン摂取により、より効率的にガレクチン9 分泌が起こる可能性が考えられた。これらの結果は、フコイダンの腸上皮細胞への曝露によるガレクチン9 の増加およびその分泌には、TLR9 が大きく関与していることを示唆した。

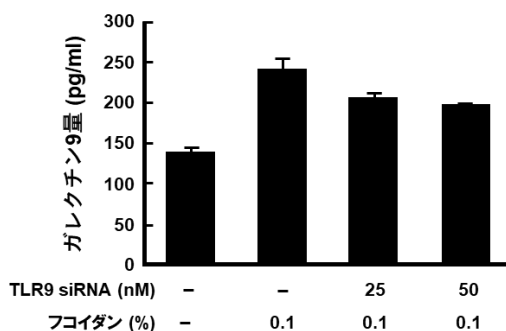


図3 ガレクチン9産生におけるTLR9 siRNAの影響

(3) 今回用いたフコイダンの純度および分子量を測定した。マコンブ粉末を 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) に浸漬し 4℃下で一昼夜攪拌しながら抽出した。その後ろ過し、そのろ液を蒸留水に対して透析した。得られた溶液を凍結乾燥し、粗フコイダン画分とし、先ず陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果、これまでの報告と同様塩濃度の上昇に伴い A、B、C の 3 画分に分離された (図4)。これら 3 画分のうち、PCA 反応において活性が認められることが分かっている最初の画分 (A画分) を分取し、上述と同様透析後再び凍結乾燥した。次いでゲルろ過クロマトグラフィーに供し、精製度および分子量を推定した (図5)。その結果、本実験に用いたフコイダンはゲルろ過クロマトグラムの結果からほぼ単一の物質であり、分子量は約 200 万であることが判明した。

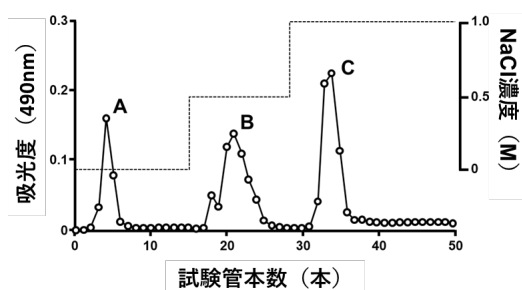


図4 陰イオンクロマトグラム

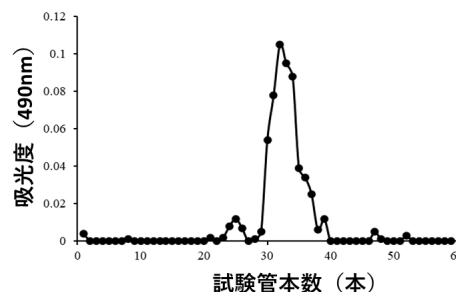


図5 ゲルクロマトグラム

以上をまとめると、マコンブに含まれる高分子多糖フコイダンのアレルギー抑制効果は、経口摂取したフコイダンは腸管上皮細胞に発現している TLR9 受容体を介して認識された後、血中に IgE に高親和性のレクチン用タンパク質であるガレクチン9 を分泌することで、IgE の肥満細胞への結合を阻害するために起こることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ezan Gnagnan J. E., Mizuno Masashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Toll-like receptor 9 is involved in the induction of galectin-9 protein by dietary anti-allergic compound fucoidan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 AIMS Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/Allergy.2023002	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 Mizuno, M., Sakaguchi, K. and Sakane, I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Oral administration of fucoidan can exert anti-allergic activity after allergen sensitization by enhancement of galectin-9 secretion in blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10020258	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 Morita, A., Tanino, Y., Ojima, T. and Mizuno, M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Influence of temperature on anti-allergic activity of fucoidan extracted from Saccharina japonica	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 607-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.25.607	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 EZAN EPIPHANIE, MIZUNO MASASHI
2. 発表標題 TLR9 is involved in fucoidan-induced galectin-9 upregulation in vitro
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masashi Mizuno, Atsuko Morita, Ken-ichiro Minato
2. 発表標題 276.Structural change of fucoidan extracted from Saccharina japonica by heat treatment and its anti-allergy property
3. 学会等名 30th Annual Conference of the Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田温子、水野雅史
2. 発表標題 フコイダンが有する抗アレルギー効果の安定性について
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成31年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田温子、水野雅史
2. 発表標題 加熱処理によるフコイダン分解物の抗アレルギー効果への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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