

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590406

研究課題名（和文）真菌PAMPsの免疫毒性と感染症ならびに難治性疾患における意義の解明

研究課題名（英文） Characterization of immunotoxicological and immunopathological roles of fungal PAMPs

研究代表者 大野 尚仁 (OHNO NAOHITO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80152213

研究成果の概要（和文）：200字

DBA/2 マウスは真菌 PAMPs であるベータグルカン(BG)に対して、高い感受性を示し、in vitro においては、高い炎症性サイトカインの産生能を示すとともに、プロスタグランジン等の炎症メディエータ産生能も高い。また、in vivo においては、BG 特異抗体の産生能が高く、致死毒性も示す。この機序をさまざまな観点から解析したところ、GM-CSF 産生のが高く、自然免疫受容体である、dectin-1 の発現レベルも高いことが明らかとなった。また、この発現は細胞骨格系に制御されており、骨格機能の障害は、持続的なサイトカイン産生へとつながることがわかった。このモデルは、PAMPs の免疫毒性と難治性疾患の解析に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

DBA/2 is a strain, specifically higher response to fungal PAMPs, beta-glucan. In the present study, immunotoxicological and immunopathological roles of fungal PAMPs were examined. From the results of this study, we have demonstrated that DBA/2 mice is a highly sensitive strain to produce high level of inflammatory cytokine in vitro and in vivo. In vitro study, DBA/2 mice produced significantly high level of inflammatory cytokines, such as GM-CSF, IFN-gamma, and TNF-alpha. It is highly sensitive to the cross-linking of cytoskeleton and modulated by disrupting actin polymerization. In vivo study, producing high concentration of anti-beta-glucan antibody and induce lethal toxicity. From these findings, it is a good tool to analyze beta-glucan mediated immunotoxicological response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含 真菌学）

キーワード：感染免疫、PAMPs

1. 研究開始当初の背景

微生物由来の免疫刺激物質（PAMPs: pathogen associated molecular patterns）は、様々な受容体（Toll like receptors、C-type lectins、etc）を介して宿主免疫系を刺激する。適度な刺激は免疫系の活性化と発達に

において重要であるが、過度な刺激は組織を障害する。PAMPs の示す有用性と有害性については、エンドトキシン研究が先導し確立されてきた。我々は 1980 年代初頭から真菌細胞壁の主要構成成分である 6-branched-1、3-β-glucan（ベータグルカン、BG）の構造と

活性との関連性に興味を持って研究を続けてきた。BG の PAMPs としての歴史はエンドトキシンとは異なり、有用性について圧倒的に多くの研究がなされてきた。これらの研究の成果として、BG は医薬品として癌治療に用いられるほか、ワクチンアジュバントとしての有用性や機能性食品としての応用が現在でも期待され研究が推進されているところである。

一方、BG は深在性真菌症の患者血中から検出され、早期診断に汎用されることから、治療に係わる器具、機材、医薬品、培養装置などの BG 汚染は早期診断を惑わせることとなり問題視されている。現段階では、汚染を疑わせるプロセスを経た患者検体には適応しないこととして運用されているが、あくまでも消極的な対応である。このような対応となっている根本的な課題は、BG には有害性は全く無いのか、BG の有害性は全く配慮する必要がないのか、という点について明確な回答が得られていないからである。

2. 研究の目的

BG が有害性を発揮する可能性については様々な傍証が得られてはきたが、これまでのところ、有害性を明快に証明するに至っていない。我々は、BG の生物活性に関する広範な解析の課程で、様々な系統のマウスを用いて検討を重ねてきたところ、DBA/2 マウスの脾臓細胞ならびに骨髄由来の樹状細胞は BG に対して著しく感受性が高く、様々なサイトカインを産生することを明らかにした。さらに、この感受性には GM-CSF 産生ならびに樹状細胞と Th 細胞の細胞間相互作用が密接に係わっていることを見出した。さらに、DBA/2 マウスを用いて *in vivo* にて検討したところ、BG 単独投与で数日以内に死亡することを見出した。汎用される C57Bl/6、Balb/c、C3H/He などのマウスでは、全く副反応を認めることは無かったので、これは DBA/2 マウスにおいて BG 特異的に誘発される新規の生物反応であるものと予測された。そこで、DBA/2 マウスの致死作用について、分子レベルで詳細にメカニズムを解析することは、BG の有害性を明確にする上で重要な知見を与えるものと考え、本研究を企画した。

3. 研究の方法

本研究では、BG の毒性をマウスの *in vivo* での解析を中心に評価し、メカニズム解析を行う。そのために、以下に示す項目について検討する。

(1) DBA/2 マウスを基本系統として用い、BG 投与後の病理学的変化を臓器、組織、ならびに細胞レベルで解析する。

(2) 臓器の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、致死に係わる遺伝子群を特定する。

(3) リンパ球のポピュレーション変化ならびに活性化能を解析する。

(4) 炎症性ならびに抗炎症性サイトカインを中心に遺伝子導入を行い、致死ならびに治療効果を判定する。

(5) 遺伝子欠損マウス (dectin-1、CR3、GM-CSF など) を用い責任遺伝子を解明する。

(6) 関連遺伝子についてヒトでの遺伝子多形の解析を行い、各個人のリスクを分析する。

以上の成果を総合的に解釈することによって、BG による致死毒性の分子メカニズムを明らかにして有害性を解明すると共に、BG 測定の診断ならびに治療上の有用性を提言する。

4. 研究成果

(1) SCG によるサイトカイン産生誘導の経時変化

DBA/2 マウス脾細胞培養系における SCG のサイトカイン産生誘導に必要な培養時間は、48 時間であり、24 時間後の培養上清中には SCG により誘導されるサイトカインがほとんど検出されないことがすでに判明している。これは、細胞が SCG に応答し、サイトカイン産生誘導に関わるシグナルが伝達されるまでに 48 時間を必要とすることを示唆している。そこで、このことを確かめるために BG への応答性を高めた状態で、SCG のサイトカイン誘導に関する経時変化を検討した。

まず我々は前培養した脾細胞を用いることで、SCG によるサイトカイン産生誘導の経時変化に影響を及ぼすか検討した。DBA/2 マウス脾細胞に培養開始後 0 時間後、24 時間後、または 30 時間後に SCG (100 μ g/ml) を添加した。培養開始 48 時間後に上清を回収し、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF を ELISA にて測定した。SCG を 0 時間後に添加した群において、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF が有意に上昇した (Fig. 1 IFN- γ のみ示す)。SCG を 24 時間後に添加した群は、0 時間後に添加した群と比較すると、GM-CSF 産生が減少していた。一方、SCG による IFN- γ 産生誘導は、24 時間後に添加した群において、0 時間後に添加した群によりも有意な上昇が観察された。24 時間後に添加した群は 0 時間後に添加した群と比較すると SCG の刺激時間が 24 時間少ないにも関わらず、サイトカイン産生量が増加、または同程度であることから、DBA/2 マウス脾細胞培養系は、培養 24 時間の間は BG に対する応答性を高める期間であり、SCG の直接的なサイトカイン産生誘導は行われていないと示唆される。

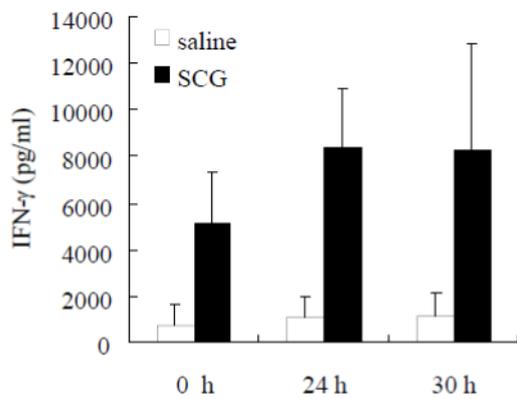


Fig. 1 Cytokine induction of SCG in splenocytes from DBA/2 mice in vitro.

Splenocytes were isolated from DBA/2 mice and cell suspensions were adjusted to 5×10^6 cells/ml in 10% FCS/RPMI medium. Cells were stimulated with SCG (100 μ g/ml) at 0, 24 or 30 h, and incubated for 48 h. After incubation, the concentrations of IFN- γ in the supernatant were determined by ELISA. Data were pooled from three identical experiments, with similar results, each evaluating at least two mice per group. Values represent the mean \pm SD.

次に、SCG による直接的なサイトカイン産生誘導に関する経時変化を検討するために、BG に対する応答性を高めた条件下で検討した。DBA/2 マウス脾細胞を Fig.1 よりさらに長時間の 36 時間あらかじめ培養し、その後 SCG (100 μ g/ml) を添加し、40 時間、42 時間、45 時間後に培養上清を回収した。その結果、最短 4 時間の反応でサイトカインが産生誘導され、その後経時的に上昇した。以上の結果から、脾細胞培養系の SCG 感受性が亢進し、サイトカイン産生誘導に必要な条件が整った状態であれば、SCG は 4 時間でサイトカイン産生を誘導できると示唆された。

(2) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

我々は、in vitro において BG により誘導される因子を、主にサイトカインに着目し、探索を試みてきた。しかしながら前述のとおり、SCG によるサイトカイン産生誘導はあらかじめ条件が整った状態を作ることが重要であると示唆され、それには複雑な因子が関与しているものと推測される。そこで in vitro において BG により誘導される現象をサイトカイン以外の視点から捉える目的で、SCG により発現誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。DBA/2 マウス脾細胞を 36 時間培養し、その後 saline または SCG (100 μ g/ml) を添加し、更にその 4

時間後に RNA を調製し遺伝子発現を DNA マイクロアレイにて解析した。

Table 1 は、SCG により 1.75 倍以上亢進する遺伝子のリストである。SCG により発現が 2 倍以上亢進する遺伝子は 18 種類であった。これらの高発現遺伝子には、ケモカイン、サイトカインに関わる遺伝子群 (Cxc12, Ccl14, Il1a, Gm1960, Il1b, Ccl13, Il122), C-type レクチンに関わる遺伝子 (Clec-4e), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), endothelin 1 (Edn1) が見受けられた。また、やや発現増強した遺伝子 (1.5 倍) まで含め、サイトカイン、ケモカインに関する遺伝子を抽出したところ、16 種類の遺伝子が発現亢進すると示唆された。その他、同解析において発現増強した遺伝子として、Hspala, Cd14, Ifit1, Ifit2, Cd69, Ifit3, Icam1, Cd9 なども含まれた。

Table 1 Top genes upregulated in splenocytes stimulated with SCG

GeneName	Description	FoldChange
Cxc12	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	4.16
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	3.21
Edn1	endothelin 1	3.19
Ptx3	pentaxin related gene	2.52
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	2.51
Il1a	interleukin 1 alpha	2.49
Gm1960	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	2.44
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor	2.44
F3	coagulation factor III	2.34
Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	2.27
Il1b	interleukin 1 beta	2.18
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2.16
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	2.12
Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	2.10
Slc2a3	glucose transporter type 3	2.06
Inlba	inhibin beta-A	2.04
Il122	interleukin 22	2.03
Fos12	fos-like antigen 2	2.00
Il6	interleukin 6	1.98
Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	1.95
Npn3	neoplastic progression 3 (Npn3)	1.93
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	1.92
Hspala	heat shock protein 1A	1.92
Luc7l2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	1.91
Atp5g3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 c subunit c (subunit 9), isoform 3	1.89
Paqr3	progesterone and adipoQ receptor family member III	1.88
Plkb	protein kinase inhibitor (testicular isoform)	1.88
Txnll	thioredoxin-like 1	1.83
Ifng	interferon gamma	1.81
Hoxd13	homeobox D13	1.78
Cxc110	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1.76

(3) 細胞骨格破壊による β グルカンによるサイトカイン産生増強

β グルカンによる脾臓細胞の in vitro 刺激の分子機構を解析するため、種々の阻害剤を添加しサイトカイン産生能を比較した。多くの試薬ではサイトカイン産生が抑制される傾向を示したが、サイトカラシン D (CytD) 添加では、増強効果を示した (Fig. 2)。この結果は、アクチン重合にともない、dectin-1 の細胞内への移行により、シグナル伝達が終了することを示唆している。同類の機能を示す化合物は、自然界には存在する可能性もあるので、そのような状況では、 β グルカン刺激が増強される可能性がある。

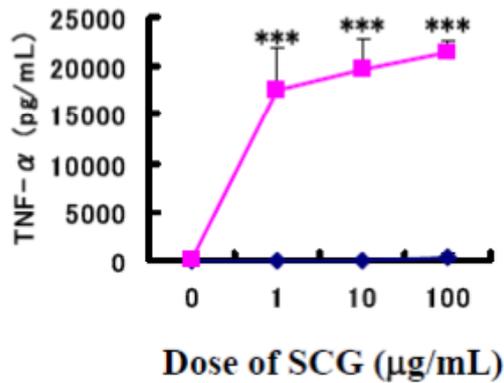


Fig. 2 Effect of cytochalasin D on cytokine induction of CRDO in splenocytes from DBA/2 mice.

Cell suspensions were adjusted to 5×10^6 cells/mL in 10% FCS/RPMI medium. Cells were incubated in the presence or absence of cytochalasin D ($2 \mu\text{g/mL}$) for 1 h and then exposed to SCG (0, 1, 10, $100 \mu\text{g/mL}$) or saline. After 48 h of incubation, the supernatant was collected, and the concentration of TNF- α was determined by ELISA. Significant difference from saline, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

β グルカンの基礎的な解析はいくつかの観点からステップアップした。第一には、Dectin-1に代表される受容体発見である。作用機序が分子レベルで解明できる可能性が高まり機能性を示す上で力となる。第二には微生物ゲノム解析の進歩である。そのような微生物が有用な多糖を産生しているのか、どのようにしたら産生の効率は高まるのか。これらの間の答えられるようになる。 β グルカンの理化学的手法を用いた解析には特殊性と限界が付きまとい、人々を遠ざけてきた。関連する知見が急速に増えており、新たな展開が期待できる。

β グルカンの副作用や有害性については、あまり議論された経緯がない。これは、作用自体が穏やかであり、急性期の反応を惹起しにくいことにも起因している。本研究で、DBA/2 マウスは応答性も強いが、毒性も出やすいことを解析してきた。また、一方では、ヒトにはさまざまな多様性があることも同時に解析している。有用性のみならず、有害性についても目をむけ、 β グルカンの活用範囲が広がることをこれからも期待したい。

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 5 件)

- ① A. Shibata, TH. Hida, K. Ishibashi, N. N. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, Disruption of Actin Cytoskeleton Enhanced Cytokine Synthesis of Splenocytes Stimulated with Beta-Glucan from the Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* Wulf. :Fr. (Higher Basidiomycetes) *in Vitro*.、Int J Med Mushrooms.、査読有、14 巻、3 号、2012、257-269、DOI: 10.1615/IntJMedMushr. v14. i3. 30
- ② R. Tada, Y. Takano, H. Murakami, K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno、Vasculitis and anaphylactoid shock in mice induced by the polysaccharide fraction secreted into culture supernatants by the fungus *Candida metapsilosis*、Microbiol Immunol、査読有、55 巻、2011、357-365、DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00326.x.
- ③ 飛田 敏江、川南 裕美、石橋 健一、三浦典子、安達 禎之、大野 尚仁、マウス脾細胞における beta-glucan 応答性遺伝子の網羅的解析、日本医真菌学会雑誌、査読有、51 巻、4 号、2010、pp. 199-206、DOI:http://dx.doi.org/10.3314/jjmm.51.199

[学会発表] (計 11 件)

- ① N. Ohno, A. Shibata, K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, Disruption of actin cytoskeleton enhanced cytokine synthesis of splenocytes stimulated with beta-glucan in vitro、18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 20120611, Berlin, Germany
- ② N. Ohno, A. Shibata, TH. Hida, K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi、Augmentation of cytokine synthesis of splenocytes stimulated with soluble β -Glucan in vitro by inhibiting actin polymerization、IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011、20110906、札幌市
- ③ TH. Hida, K. Ishibashi, NN. Miura, Y. Adachi, N. Ohno、Gene expression of splenocytes induced by beta-glucan SCG in DBA/2 mice、14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY、20100822、神戸市

[図書] (計 1 件)

- ① 大野尚仁、安達禎之、三浦典子、石橋健一、飛田敏江、山中大輔、シーエムシー

出版、βグルカンの基礎と応用—感染、
抗がん、ならびに機能性食品へのβグル
カンの関与—、2010、283頁

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.toyaku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 尚仁 (OHNO NAOHITO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80152213

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安達 禎之 (ADACHI YOSHIYUKI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60222634

三浦 典子 (MIURA NORIKO)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：30218036

石橋 健一 (ISHIBASHI KEN-ICHI)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20453805