

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617006

研究課題名(和文)食資源由来機能性多糖によるインフルエンザウイルス感染制御基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanisms of prevention of influenza A virus infection by functional polysaccharides from food resources

研究代表者

李 貞範 (Lee, Jung-Bum)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：40332655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：食資源由来機能性多糖のインフルエンザウイルス感染制御機構の解明を行うと同時に、新規機能性多糖の探索も実施した。その結果、メカブ由来フコイダンは直接的な抗ウイルス作用と同時に宿主の免疫機能を介して、抗ウイルス作用を発現することを認めた。また、それらはTLR-4を介して、マクロファージなどの自然免疫系の活性化を回すことを確認した。特に、経口投与した際に腸管のパイエル板に取り込まれていることを確認したことから、経口投与での免疫機能を介して作用であることを示唆した。  
この他にもコシアブラやネギから経口投与でインフルエンザウイルスに有効な多糖体を見出した。

研究成果の概要(英文)： It was performed that the regulatory mechanism(s) of functional polysaccharides from food resources against influenza A virus infection and discovery of novel functional food polysaccharides from food resources. As results, fucoïdan from sporophylls of *Undaria pinnatifida* showed direct anti-influenza A virus effects as same as indirect ones via activation of host immune functions. The fucoïdan was found to activate innate immune function by activation of macrophages via TLR-4 as a receptor. In addition, fluorescent labelled fucoïdan was also found to adsorb at Payer's patch in mouse intestine. Therefore, it was suggested that the polysaccharide stimulates the mucosal immunity by oral administration. In addition, novel functional polysaccharides were isolated from food resources, such as *Acanthopanax sciadophylloides* and *Allium fistulosum*, in Japan.

研究分野：統合栄養科学

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：機能性多糖

## 1. 研究開始当初の背景

補完代替医療が注目されているが、その中でも「食と健康」という観点から、とりわけ機能性食品因子に関心が集まっている。これは東洋の知でもある「薬食同源」思想とも合致し、「ヒトが本来持っている恒常性を維持し、病気に罹患しにくくすることが食によって可能である」とみることができる。特に、生薬などの天然医薬には普段の食習慣の中で摂取される食品も数多く含まれており、それらに含まれる食品因子の機能性を活用することで、食品を疾病予防に活用することは十分実現可能な課題である。

申請代表者は抗ウイルス活性を示す天然物の探索研究と作用機序の解明を行ってきた。その研究成果から特に機能性食品因子である多糖類について、以下の抗ウイルス作用機序を明らかにしている。すなわち(1)直接的な抗ウイルス作用によるウイルス増殖阻害と(2)宿主の免疫機能を介した作用、の二点である。特に後者の作用については多糖類が中和抗体(ウイルス特異的抗体)や粘膜表面で作用する分泌型IgAの産生促進という複数の作用が重要であることを見出してきた。すなわち多糖類は病原体に対する獲得免疫系の機能を増強するという結果である。

しかしながら、これらの多糖類がどのような機構で免疫応答を惹起するのかなど詳細な分子機構は不明であり、さらに経口摂取した場合、どのような動態を示すのかなど、言わばエビデンスに乏しい状況であり、実際に応用するうえで様々な問題が残されている。

## 2. 研究の目的

上記背景をふまえて、本研究では機能性多糖の吸収ルート(作用部位)と免疫担当細胞の標的受容体の同定、個体や細胞レベルでのシステムティックな応答機構の解明、また食資源由来多糖類が機能性を有するために必要な構造的特徴の解明を目指して、研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光標識多糖の調製と経口投与による動態の解析

メカブ由来フコイダンを臭化シアンで pH 10.5 を維持しながら処理することで活性化フコイダンを調製し、ここに4-アミノフルオレセインを加えて一晩、暗所で攪拌することでフルオレセイン標識フコイダン(FI-FU)を調製した。

FI-FU を BALB/c マウスに経口投与し、30分後に腸管を採取した。腸管からパイエル板を含む凍結切片を作成し、一次抗体として抗M細胞抗体、二次抗体としてTexas Red 標識抗ラットIgG、及びDAPIで染色した。切片は蛍光顕微鏡で観察した。

また、これに加えて経口投与したマウスより経時的に糞便を採取した。糞便をホモジナイズ後、除タンパクを行った試料を蛍光検出

器を用いて HPLC (GPC) で分析し、糞便中の FI-FU を分析した。

### (2) 免疫抑制マウスを用いたインフルエンザウイルスに対する免疫応答の解析

免疫抑制マウスモデルとして、5-FU を投与したマウスを用いた。未処理および5-FU 投与マウスのそれぞれに対してインフルエンザウイルス( $2 \times 10^5$  PFU)を経鼻感染させた。フコイダン、オセルタミビル、または蒸留水を投与し、ウイルス増殖量をプラークアッセイで測定した。また、血中およびBALF 中の中和抗体価とウイルス特異的IgA量を測定した。またフコイダン投与による免疫賦活作用をマウスから脾臓を採取して得られた脾細胞のNK活性やマクロファージ、細胞障害性T細胞の活性を測定した。

### (3) パイエル板でのフコイダン投与による遺伝子発現の解析

フコイダン(5 mg/day)を7日間経口投与したBALB/cマウスからパイエル板を採取した。このパイエル板での遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて解析した。対照群としては蒸留水投与群を用いた。

### (4) マクロファージ細胞を用いた解析

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞及びそれにNF- $\kappa$ BおよびAP-1によるレポーター遺伝子として分泌型アルカリホスファターゼを組み込んだRAW-Blue細胞を用いて、フコイダンに対する受容体や関与するシグナル伝達経路を解析した。細胞を想定される受容体(TLR-2, -4, CD14)に対する中和抗体で前処理し、フコイダンを投与し活性化の指標として産生したNO量をグリース法で測定することで評価した。また、同様に学習シグナル伝達阻害剤で細胞を前処理後フコイダンを投与し、NO産生量を指標として関与するシグナル伝達経路を検討した。

マクロファージの応答について、各種サイトカインmRNAの発現をRT-PCRにより検討した。

### (5) 機能性多糖の探索

スクリーニングにより活性が認められた食資源(ネギおよびコシアブラ)より熱水エキスを調製し、各種カラムクロマトグラフィーを行うことで新規機能性多糖類を単離した。それらの構造は化学的方法とNMRやIRスペクトル解析により明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 蛍光標識フコイダンの吸収と動態

蛍光標識フコイダンをマウスに経口投与し、30分後に作成した凍結切片において、Fig. 1のようにFI-FUがM細胞に取り込まれていることを確認した。これまで、多糖類は高分子であるため吸収されないとの見方が多かったが、腸管免疫担当細胞の入り口であるM

細胞に取り込まれることを確認できた。

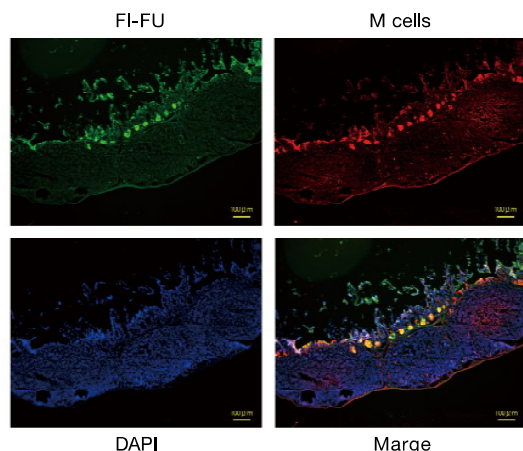


Fig.1 Incorporation of FI-FU into the Peyer's patch through M cells.

また糞便中の FI-FU を HPLC で分析したところ、経口投与 1 時間以降に採取した糞便から検出された。また、GPC パターンより若干低分子化を受けていることが認められた。

#### (2) 個体レベルでの免疫系の活性化

フコイダンにマウスに経口投与し、自然免疫系の機能として NK 活性とマクロファージ貪食能、獲得免疫系について細胞障害性 T 細胞活性とインフルエンザウイルスに対する中和抗体産生を検討したところ、いずれに対しても活性化していることが認められた。NK 活性に関しては未処理のマウスでは活性化は認められなかったが、5-FU 処理した免疫抑制マウスにおいてのみ活性化が認められた。

#### (3) パイエル板での遺伝子発現の解析

フコイダンに 7 日間経口投与したマウスでどのような遺伝子発現が誘導されているか DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Fig. 2 に示したように T 細胞で JAK による STAT3 活性化を抑制する Socs-3、マクロファージでの Mbl2、NK 細胞での Clec2h や Defensin の発現が誘導されていた。またその一方で Ccl28、IL-18、Casp3 などの発現が抑制されていることが認められた。

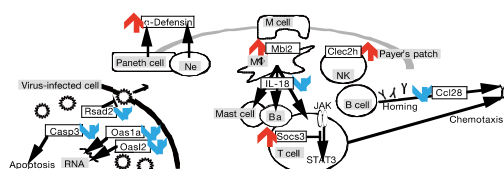


Fig. 2 Effect of Fucoiadan on the gene expression related with immune function in Peyer's patch

#### (4) フコイダンのマクロファージに対する作用機構の解析

フコイダンをマクロファージに投与すると NO 産生など活性化が起こることは確認している。この活性化は、主にフコイダンが TLR4 と CD14 により認識され、引き起こされることが中和抗体を用いた実験により明らかとなった。RT-PCR により各種サイトカイン mRNA の発現について検討した結果、INF- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の発現が誘導されることが認められた。RAW-Blue 細胞を用いて SEAP 発現を指標に NF- $\kappa$ B や AP-1 活性化を検討したところフコイダンは SEAP 活性を促進したため、これらのサイトカイン mRNA の発現誘導には NF- $\kappa$ B などの活性化が関与することが示唆された。そこで、関与するシグナル伝達経路を解明するために SP600125 (JNK/SAPK 阻害剤)、SB202190 (p38 MAPK 阻害剤)、AG490 (JAK2 阻害剤)、MG-132 (I $\kappa$ B 分解阻害剤)、budesonide (NF- $\kappa$ B 阻害剤)、geldanamycin (HSP90 阻害剤) で前処理したところいずれにおいてもフコイダンによる NO 産生が抑制された。また Western blotting によって p38、ERK1/2 および JNK の活性化が認められた。従って、フコイダンによるマクロファージの刺激には p38 MAPK 系、JNK/SAPK 系、JAK/STAR 系、NF- $\kappa$ B および HSP90 の関与が示唆された。

#### (5) 新規食資源由来機能性多糖の探索

新たにネギ *Allium fistulosum* とコシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides* から抗ウイルス活性を有する機能性多糖類を単離した。ネギからは動物モデルで抗インフルエンザウイルス活性を示すフルクタンを、コシアブラからはインフルエンザウイルスには活性を示さず、単純ヘルペスウイルス 2 型に対して抗ウイルス活性を示す 2 種の多糖類 (アラビノガラクトグルコマンナンおよびアラビノガラクトマンナン) を単離した。これらの結果から、機能性多糖類の抗ウイルス活性は構造の違いによって対象とするウイルス、さらには活性の有無が異なることが示唆された。

#### (6) 総括

本研究により、経口投与によりフコイダンが腸管粘膜免疫の担い手であるパイエル板へ M 細胞を介して取り込まれ、そこで種々の免疫担当細胞を刺激し、生体の免疫機能を亢進させることが明らかとなった。特に、M 細胞に取り込まれる現象を可視化できたことは重要な成果の一つであると考えている。さらに、個体レベルおよび細胞レベルでの解析の結果、TLR4/CD14 受容体を介して認識され、さらに種々のシグナル伝達系を活性化し、最終的には NF- $\kappa$ B の活性化により各種サイトカイン mRNA の発現などを誘導することが示唆された。これらの機構を介して、インフルエンザ感染モデルでのウイルス特異的な中和抗体の産生誘導など感染症に有効な応答が引き出されることを見出した。

従来、免疫賦活作用に代表される機能性多糖類の生物活性は非特異的なものと考えら

れる傾向にあったが、今回の研究で受容体を明らかにできたこと、さらには全ての多糖類が類似した作用を示すわけではないことを示す結果を得たことから比較的選択性のある作用であると考えられた。

また、新規機能性多糖の探索を実施した結果、多糖類の構造ごとに生物活性が異なっていた。すなわち、ネギより得られたフルクトンは直接的な抗インフルエンザウイルス作用を示さないにも関わらず、動物感染モデルでは抗ウイルス活性を示したことから、先のフコイダンと同様に腸管免疫機能の活性化を介して生体の抵抗性を高めることが考えられた。このように種々の機能性多糖の構造と活性の相関について知見を蓄積することができた。

本研究によって、食資源由来機能性多糖であるフコイダンのウイルス感染症制御基盤の一端が明らかになったことより、今後さらなる解析が進み、作用発現機構を説明できるエビデンスの提供に繋がることを期待する。

#### 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4件)

Lee Jung-Bum, Tanikawa Tatsuya, Hayashi Kyoko, Asagi Mariko, Kasahara Yoshimasa, Hayashi Toshimitsu, Characterization and biological effects of two polysaccharides from *Acanthopanax sciadophylloides*. *Carbohydr. Polym.*, 査読有, in press.

DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.013

Gopinath C.B. Subash, Hayashi Kyoko, Lee Jung-Bum, Kamori Akiko, Dong Cai-Xia, Hayashi Toshimitsu, Kumar, K.R. Penmetcha, Analysis of compounds that interfere with herpes simplex virus-host receptor interactions using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.*, 査読有, 85, 10455-10462 (2013).

DOI: 10.1021/ac4025522

Hayashi Kyoko, Lee Jung-Bum, Nakano Takahisa, Hayashi Toshimitsu, Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity, *Microbes Infection*, 査読有, 15, 302-309 (2013).

DOI: 10.1016/j.micinf.2012.12.004

Lee Jung-Bum, Miyake Sachi, Umetsu Ryo, Hayashi Kyoko, Chijimatsu Takeshi, Hayashi Toshimitsu, Anti-influenza A virus effects of fructan from Welsh onion (*Allium fistulosum* L.), *Food Chem.*, 査読有, 134, 2164-2168 (2012).

DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04016

〔学会発表〕(計11件)

林京子, 李貞範, 佐々木宏平, 渥美欣也, 栗山裕樹, 倉田稔, 林利光, 微細藻類シールドコリスチスのウイルス感染症治療効果、本薬学会第134年会、2014年3月17-30日、熊本県熊本市

梅津諒, 李貞範, 林京子, 谷川達哉, 笠原義正, 林利光, 黒崎文也, コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides* 由来抗ウイルス活性成分の探索、日本薬学会第134年会、2014年3月17-30日、熊本県熊本市

Lee Jung-Bum, Hayashi Kyoko, Hayashi Toshimitsu, Kurosaki Fumiya, Structure and antiviral activities of botanical polysaccharides, EPNOE 2013 International Polysaccharide Conference, Oct. 21-24, 2013, Nice, France.

谷川達哉, 李貞範, 林京子, 林利光, コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides* 由来多糖体の認識に関わる受容体、日本薬学会第133年会、2013年3月27-30日、神奈川県横浜市

梅津諒, 李貞範, 三宅沙知, 林京子, 林利光, 千々松武司, ネギ由来ペクチンの抗インフルエンザ活性、日本生薬学会第59回年会、2012年9月17,18日、千葉県木更津市

Umetsu Ryo, Miyake Sachi, Lee Jung-Bum, Hayashi Kyoko, Chijimatsu Takeshi, Biological activities of polysaccharides from Welsh onion. Plant and Seaweed Polysaccharides Workshop 2012, July 17-20, 2012, Nantes, France

Tanikawa Tatsuya, Lee Jung-Bum, Hayashi Kyoko, Asagi Mariko, Kasahara Yoshimasa, Effects of polysaccharides on virus replication and macrophage function. Plant and Seaweed Polysaccharides Workshop 2012, July 17-20, 2012, Nantes, France

Sasaki Kohei, Hayashi Kyoko, Lee Jung-Bum, Yoshinaga Keiko, Nakano Takahisa, Therapeutic effect of a fucoidan from *Undaria pinnatifida* in mice infected with influenza virus. Plant and Seaweed Polysaccharides Workshop 2012, July 17-20, 2012, Nantes, France

三宅沙知, 梅津諒, 李貞範, 千々松武司, 林京子, 林利光, ネギ *Allium fistulosum* 由来抗インフルエンザウイルス活性物質に関する研究、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道札幌市

谷川達哉, 李貞範, 林京子, 浅黄真理子, 笠原義正, 林利光, コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides* 由来多糖体の免疫機能刺激効果、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道札幌市

李貞範, 小澤裕, 林京子, 吉永恵子, 仲野隆久, 林利光, メカブフコイダンのマクロファージ活性化機構、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道札幌市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

李 貞範 (LEE JUNG-BUM)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教

研究者番号：4 0 3 3 2 6 5 5

(2)研究分担者

林 京子 (HAYASHI KYOKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
講師

研究者番号：6 0 1 1 0 6 2 3