

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度
 課題番号：23780134
 研究課題名（和文） 腸管上皮細胞を介した樹状細胞制御能を有する食品成分の探索及び作用機序の解明
 研究課題名（英文） Search for food factors which regulate dendritic cells function via intestinal epithelial cells
 研究代表者
 西谷 洋輔（NISHITANI YOSUKE）
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教
 研究者番号：80457093

研究成果の概要（和文）：

樹状細胞は、宿主免疫システムにおいて、T 細胞分化の方向性を担う重要な免疫担当細胞である。しかしながら、食品成分が上皮細胞を介して樹状細胞にどのような影響を及ぼすのか、依然として明らかになっていない。本研究では、*in vitro* 培養系を構築し、炎症抑制能を有する食品成分の探索と、腸管上皮細胞を介した機序を明らかにすることを目的とした。マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）と腸上皮由来細胞株 Caco-2 細胞を共培養し、LPS を添加することによって炎症を誘導する実験系を確立した。本実験系において、シイタケ由来 β -グルカンであるレンチナンに抗炎症作用が認められた。さらに、レンチナンについて *in vivo* における効果および *in vitro* における作用機序の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

Dendritic cells decide direction of T cell differentiation. However, the effect of food factors on dendritic cells via intestinal epithelial cells is unclear. In this study, we developed a novel *in vitro* model for assessing an immunomodulating activity of food factors on dendritic cells function. We searched for a food factor which possesses intestinal anti-inflammatory effect by using this model. The *in vitro* model is comprised of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and intestinal epithelial cell-like Caco-2 cells. In this system, the stimulation of BMDC with lipopolysaccharide was followed by an increase in TNF- α production from BMDC and IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells. Treatment of lentinan, shiitake mushroom-derived β -glucan, significantly inhibited IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells without reducing TNF- α production from BMDC. We investigated gut anti-inflammatory activity of lentinan *in vivo* and the mechanism underlying the effect in the present study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品科学、免疫学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品化学

キーワード：樹状細胞、腸管上皮細胞、食品因子

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) の患者数が若年層を中心に増加の一途をたどって

いる。IBD は、クローン病 (Crohn's disease; CD) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) に大別され、いずれも腹痛・下痢・血便などを伴う QOL の悪い消化管の慢性炎症疾患で

あり、難病に指定されている。その原因として、食事性抗原や腸内細菌に対する宿主免疫システムの異常な活性化が挙げられている。ステロイド剤などの免疫抑制作用のある薬剤を用いた治療が行われるが、その副作用が問題となっている。他方、宿主腸管免疫システムでは、腸管上皮細胞直下の粘膜固有層に樹状細胞をはじめとする抗原提示能を持った貪食細胞が存在し、M細胞によって運搬された腸管腔側の抗原を取り込み、抗原提示を行う。通常、腸管粘膜固有層に存在する抗原提示細胞は、IL-10などの抗炎症性サイトカインの産生や、同じくIL-10を高産生する制御性T細胞を誘導することによって、常在細菌などに対して炎症応答を起ささないことが知られている (Andrew et al. *Immunology Letters* 119:22-31, 2008)。しかしながら、IBD患者の腸管粘膜においては、TNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインを過剰に産生する抗原提示細胞およびT細胞の存在が報告されている (Kamada et al. *J. Clin. Invest.* 118:2269-2280, 2008)。樹状細胞は、抗原提示およびサイトカインの産生によって、未分化のT細胞に対する分化誘導能を有する唯一の抗原提示細胞であることから、すなわち、腸管粘膜固有層に存在する樹状細胞を制御できればIBDの改善に寄与できると考えられる。

腸管は食物を消化および吸収する場であるとともに、異物認識に代表される免疫応答を担う生体防御器官としても重要な役割を担っている。しかしながら、腸管そのものは複数の特化された細胞種が階層をなす器官であり、機能的にも複雑過ぎる。したがって、実際に動物実験によってIBD発症モデルを開発したとしても、免疫応答における制御機構を解明するのは難しい。そこで申請者らは、これまでに腸管上皮細胞および抗原提示細胞であるマクロファージの2つの細胞株を共存培養し、マクロファージをリポ多糖(LPS)で刺激することによって活性化させ、*in vitro*で腸管炎症を再現したシステムを構築した (Tanoue et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374:565-569, 2008)。この実験系を用いて、コンブ由来のフコイダン、カスピ海ヨーグルト由来の乳酸菌株 (Nishitani et al. *Int. Immunopharmacol.* 9:1444-1451, 2009)、シソやピーマン由来ポリフェノール類であるルテオリンに、腸管上皮細胞を介したマクロファージ活性化の抑制作用を見出した。乳酸菌株とルテオリンについては、動物レベルの実験でも同様の作用を認めていることから、構築した*in vitro*実験系の有用性が確認されている。このなかで高分子多糖類のフコイダンおよび乳酸菌は、上皮細胞単層膜を通過しないにもかかわらず、直下の免疫細胞の活性化を抑制した。これは、腸管上

皮細胞が食品成分の刺激に応答し、免疫細胞と協働して腸管免疫システムの制御を行っていることを示唆している。最近の他者による報告でも、腸管粘膜に存在する樹状細胞は上皮細胞と協働して免疫抑制性のT細胞を分化誘導することが示されている (Iliev et al. *Mucosal Immunol.* 2:340-350, 2009)。食経験があり安全性が認められている食品由来成分を用いたIBDの改善効果を報告した論文は多数ある一方、腸管上皮を介して免疫システムをどのように制御しているのかについては殆ど明らかになっていない。以上より、食品由来成分は、腸管免疫システムの「司令塔」である樹状細胞に対し、上皮細胞を介した作用を及ぼすのではないかという、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*培養系を構築し、免疫抑制能を有する樹状細胞へと誘導する食品成分の探索と、腸管上皮細胞を介した機序を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) IBDを反映した共培養実験系の構築

IBDを発症した患者の腸管上皮細胞においては、活性化したマクロファージや樹状細胞が観察される。これらの免疫担当細胞からは主要な炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-1 β などが過剰産生され (Murch et al., *Gut.* 34:1705-1709, 1993)、腸管上皮細胞やその他の免疫担当細胞であるT細胞などを刺激し、最終的には腸上皮細胞は更なる炎症性サイトカインやIL-8に代表される白血球遊走因子のケモカインを産生する (Kucharzik and Williams, *Pathobiology.* 70:143-149, 2003)。その結果、自身が構成する腸管上皮単層膜の崩壊が起こり腸管腔内に存在する異物の透過性が増大するなどして炎症状態の増幅が生じている (Perdue et al., *Am. J. Pathol.* 158:1101-1109, 2001)。この状態を*in vitro*で再現するため、トランズウェルを用いて、腸管腔側に小腸様上皮培養細胞であるCaco-2細胞を、基底膜側にマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)を配置し、BMDCをリポ多糖(LPS)で刺激することを試みた。BMDCは、骨髄より前駆細胞を採取し、既報に従いGM-CSFおよびIL-4存在下で培養した後、樹状細胞のマーカーとして知られるCD11cに対する抗体を用いて精製した。LPSを添加して基底膜側に炎症を起させた状態で、炎症マーカーとして樹状細胞からのTNF- α 産生量およびCaco-2細胞中のIL-8 mRNA発現量を調べた。

(2) 免疫抑制を惹起する食品因子の探索

(1)で確立した共培養実験系の腸管腔側に

食品因子を添加し、2つの炎症マーカーに対する影響を調べた。その際、抗炎症薬として用いられているブデソニドを、炎症抑制の陽性コントロールとして、腸管腔側から添加した。

(3) 共培養実験系で免疫抑制を惹起した食品因子の *in vivo* における効果について

(2) で炎症抑制作用が確認された食品因子(シイタケ由来β-グルカンのレンチナン)について、*in vivo* における効果を検討するため、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎マウスモデルを用いた。サンプルはゾンデを用いて胃内投与した。連日、体重測定を行った。終了時に屠殺・解剖を行い、結腸の長さを測定した。また、結腸組織切片のHE染色像の観察から病理学的スコアを算出した。結腸組織中の炎症性サイトカイン mRNA 発現量は、Real-time PCR によって解析を行った。

(4) レンチナンによる炎症抑制作用機序の解明

レンチナンによる抗炎症作用の機序を *in vitro* で検討を行った。その際、十分な細胞量を確保する必要があったため、まずは BMDC ではなくマウスマクロファージ様株化細胞である RAW264.7 細胞を用いて、Caco-2 細胞との共培養を行った。Caco-2 細胞中の NF-κB の核内移行は、特異抗体を用いたウェスタンブロットティングもしくは蛍光顕微鏡を用いた画像解析により行った。Caco-2 細胞表層の TNFR1 タンパク質の発現量については、特異抗体による染色およびフローサイトメーターを用いた解析を行った。TNFR1 のエンドサイトーシス阻害剤として、cytochalasin D および monodansylcadaverine を用いた。

4. 研究成果

(1) IBD を反映した共培養実験系の構築

特異抗体を用いて分離した CD11c 陽性細胞を 1×10^6 cells/well となるように 12 ウェルプレートに播種し、あらかじめ分化させた Caco-2 細胞と 3 時間共培養を行った。その後、LPS を添加し、さらに 3 時間培養を行った。その結果、LPS 刺激によって BMDC より TNF-α 産生がみられた(図 1)。Caco-2 細胞においても LPS 刺激により IL-8 mRNA の有意な発現の亢進が認められた(図 1)。さらに、Budesonide (1 μM) 処理区では、TNF-α 産生が有意に抑制され、Caco-2 細胞中の IL-8 mRNA 発現についても同様であった(図 1)。このことから、BMDC および Caco-2 細胞の共培養系に LPS を添加する実験モデルは、IBD における腸粘膜の状態を疑似的に再現していることが示された。

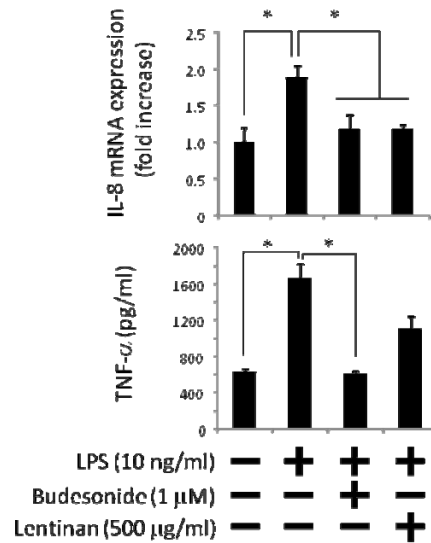


図1. BMDCおよびCaco-2細胞共培養実験系の確立とレンチナンの影響

(2) 免疫抑制を惹起する食品因子の探索

次に、免疫抑制能を有する食品因子を探索するにあたり、我々の研究室でマクロファージ様株化細胞 RAW264.7 細胞および Caco-2 細胞との共培養系で炎症抑制作用が認められている、シイタケ由来β-グルカンのレンチナンを本実験系に供試した。その結果、樹状細胞からの TNF-α 産生に変化は認められなかった一方、Caco-2 細胞中の IL-8 mRNA 発現が LPS 刺激時と比較して有意に抑制された(図 1)。これは、RAW264.7 細胞と Caco-2 細胞の共培養実験系にレンチナンを供試した際の結果と同様であった。

(3) 共培養実験系で免疫抑制を惹起した食品因子の *in vivo* における効果について

DSS 腸炎誘導マウスモデルにレンチナンを投与したところ、腸炎に伴う体重の減少が有意に抑制された(図 2)。また、結腸の長さについても、レンチナンの投与によって短縮が有意に抑制された。結腸組織について、HE 染色を行い顕微鏡観察による組織学的解析を行ったところ、レンチナン投与により結腸

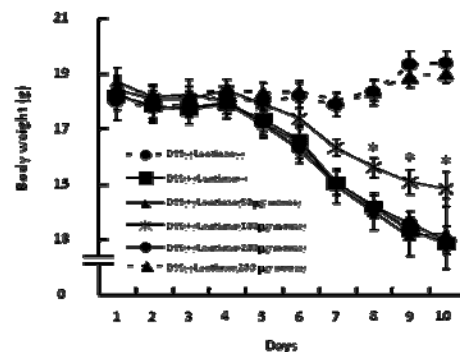


図2. DSS腸炎モデルにおけるマウス体重変化に対するレンチナンの影響

における組織学的スコアが有意に改善した。また、結腸組織中の炎症性サイトカイン mRNA 発現を調べたところ、レンチナン投与により IFN- γ および IL-1 β mRNA 発現が有意に抑制された。これらの結果から、レンチナンは *in vivo* において腸炎抑制作用を有することが明らかとなった。また、本研究で確立された *in vitro* 共培養実験系で得られた結果が *in vivo* においても効果が確認されたことから、本実験系が炎症抑制作用を有する食品因子の探索に有用なツールであることが示唆された。

(4) レンチナンによる炎症抑制作用機序の解明

レンチナンの抗炎症作用機序を解明するにあたって *in vitro* 実験系を用いた。以下の各実験には充分量の細胞数を確保する必要があったこと、さらにレンチナンによる効果が同様であったため、BMDC ではなく株化細胞である RAW264.7 細胞を用いた。

In vitro 実験系において、レンチナンは BMDC および RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生に影響することなく Caco-2 細胞中の IL-8 mRNA 発現を抑制したことから、まず Caco-2 細胞中の NF- κ B について検討を行った。ウェスタンブロット法および免疫染色による顕微鏡画像解析より、レンチナン処理によって Caco-2 細胞における NF- κ B の核内移行が有意に抑制されることが明らかとなった。

次に、NF- κ B シグナル経路の上流にある TNFR1 に対するレンチナンの影響を検討した。Caco-2 細胞表層の TNFR1 について、特異抗体を用いて発現量を調べたところ、レンチナン処理によって発現量が低下した(図3)。

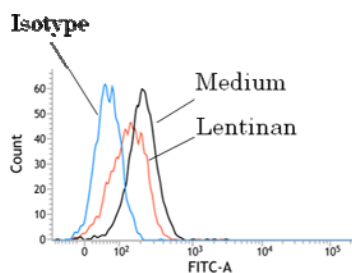


図3. Caco-2細胞表面のTNFR1発現に対するレンチナンの影響

また、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤である monodansylcadaverine を処理したところ、レンチナンによる Caco-2 細胞中の IL-8 mRNA 発現の抑制が解除された。これらの結果から、レンチナンによって Caco-2 細胞表層の TNFR1 がエンドサイトーシスを起こすことが示唆された。さらに、抗レンチナン抗体をレンチナンに前処理すると、レンチナンによる Caco-2 細胞中の IL-8

mRNA 発現の抑制が解除された。したがって、レンチナンによる Caco-2 細胞 TNFR1 のエンドサイトーシスには、細胞表層の何らかの受容体が関係していることが示唆された。以上の結果をまとめると、レンチナンは腸上皮細胞に作用し TNFR1 のエンドサイトーシスを起こすことによって、腸上皮細胞の TNF- α に対する感受性を低下させ、抗炎症作用を発揮していると考えられた。今後は、BMDC を用いても同様の作用がみられるのか検討する必要がある。

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1件)

Yosuke Nishitani, Ling Zhang, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma, Kazuki Kanazawa, Takashi Hashimoto, Masashi Mizuno, Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Lentinan: Influence on IL-8 and TNFR1 Expression in Intestinal Epithelial Cells, PLOS ONE, 査読有, 8(4), e62441, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062441

[学会発表] (計6件)

- ① Nishitani, Y., Zhang, L., Mizuno, M. Gut anti-inflammatory activity of lentinan: influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial-like Caco-2 cells, 16th European Carbohydrate Symposium, Hilton Sorrento Palace Congress Centre, Sorrento, Naples, Italy, 2011年7月5日.
- ② Nishitani, Y., Zhang, L., Kanazawa, K., Mizuno, M. Lentinan ameliorates gut inflammation in an *in vivo* and an *in vitro* model: a possible inhibition mechanism on IL-8 mRNA expression in intestinal epithelial cells, The 6th International Medicinal Mushrooms Conference, Hotel Antunovic, Zagreb, Croatia, 2011年9月26日.
- ③ Nishitani, Y., Mizuno, M. Lentinan inhibits gut inflammation through alteration of TNFR1 distribution in intestinal epithelial cells, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, Royton Sapporo,

Sapporo, Japan, 2011年11月14日.

④ 西谷洋輔、水野雅史、レンチナンの腸管炎症抑制機構：小腸上皮様Caco-2細胞のTNFR1の局在に及ぼす影響について、日本農芸化学会平成24年度大会、京都女子大学、京都、2012年3月27日.

⑤ Nishitani, Y., Anti-inflammatory activity of Shiitake mushroom-derived β -1,3;1,6-glucan, lentinan, through modulation of TNF receptor 1 (TNFR1) distribution in intestinal epithelial cells, 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Philadelphia, USA, 2012年8月21日.

⑥ Nishitani, Y., Induction of TNF receptor 1 (TNFR1) endocytosis by shiitake mushroom-derived β -1,3;1,6-glucan, lentinan, attenuates IL-8 mRNA expression in intestinal epithelial cells in an *in vitro* gut inflammation model, Functional Foods in Health and Disease, Conference 2012, Dallas, USA, 2012年12月1日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 洋輔 (NISHITANI YOSUKE)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点

研究部・助教

研究者番号：80457093