

氏名（本籍）	いしもと ゆいな 石本 由維菜（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 278 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	低分子可溶性 β -glucan の創製と自然免疫受容体 dectin-1 に対する免疫応答性の解析
論文審査委員	（主査） 教授 大野 尚仁 教授 高木 教夫 教授 野口 雅久

論文内容の要旨

緒論

医療費の増大は、我が国の重要な課題となっている。医療費削減のため、ジェネリック医薬品の利用拡大を推進しているが、超高齢社会といわれている日本では、この対策だけでは医療費増大に歯止めをかけることは困難である。このような背景の中、健康の自己管理に重きを置くセルフメディケーションや予防医学の重要性が注目されている。個人の健康管理に注目が集まる背景を受け、多くの栄養機能食品や特定保健用食品が市場に出回るようになった。食品と免疫の関係については、腸管免疫系と腸内細菌叢との関係について強い興味向けられており多くの研究がなされている。特に、プロバイオティクスによる感染予防・アレルギー軽減・炎症性腸疾患の抑制作用について言及されており、中でも乳酸菌などの代謝産物である短鎖脂肪酸が、免疫の過剰活性を抑制する Treg 細胞誘導に関与していることが数多く報告されている。

人々の健康志向の高まりとともに、機能性食品としての β -glucan に注目が集まってきた。また、 β -glucan 受容体として dectin-1 が見出され、分子レベルでの解析が可能となってきた。 β -glucan の免疫賦活化作用に関する報告は、粒子状または高分子量 β -glucan を用いて行われてきた。低分子量の可溶性 β -glucan の機能性には興味を持たれてきたが、製造法が十分に確立されておらず、十分な研究が行われてこなかった。

本研究では、低分子可溶性 β -glucan の創製とその免疫系への影響ならびにその有用性について解析を行うことを目的とした。第 1 章では、酵母細胞壁 β -glucan の低分子可溶化法の確立・物性について解析した。第 2 章では、 β -glucan の分子量変化に伴う応答性の違いについて検討した。第 3 章では、第 1 章で作成した ad-sBBG のアレルギーモデルマウスに対する影響について検討した。

第1章 酵母細胞壁 β -glucanの低分子可溶化法の検討

酵母は、短時間において安定した品質での大量培養が可能であり、安価に製造できるという利点から、多くの人々の健康を支える機能性食品として有用な素材であると考えられる。そこで、パン酵母由来 β -glucan (BBG) を用いて、低分子量可溶性 β -glucan を人への応用可能な方法で可溶化する方法を検討した。

第1節では、熱分解法による可溶化法について検討した。その結果、135℃ 4時間以上の

熱分解により80%以上が可溶化することが明らかとなった。熱分解によって可溶化された画分のNMR解析の結果、 β -1,3-glucanと β -1,6-glucanの比率に変化はなく、糖鎖構造を維持したまま分解されたことが示唆された。第2節では、熱分解による欠点を克服し、さらに低分子化する方法として酸分解法による可溶化法について検討した。酸分解では、45%硫酸 20℃ 3時間で分解したとき最も高い可溶化率であった。これをacid degraded soluble BBG (ad-sBBG)とした。ad-sBBGをHPLCにより高分子量 (ad-sBBG-high) と低分子量 (ad-sBBG-low) に分画したところ、ad-sBBG-highに酵母細胞壁に含まれているmannanが多く含まれていた。ad-sBBG-highを取り除くことにより可溶性低分子 β -1,3-glucan画分を調製することが可能となった。第3節では、酸分解可溶性 β -glucanの細分画を試みた。エタノールを段階的に加え分別沈殿したところ、高分子量から低分子量画分まで (ad-sBBG ep1 ~ ad-sBBG ep4) を簡易的に分画することが可能となった。さらに、エタノール沈殿画分をNMR解析した結果、低分子量画分に β -1,3-glucanが、高分子量画分に β -1,6-glucanが含まれていることが明らかとなった (Fig.1)。この方法を用いることにより、大量の低分子可溶性 β -glucanを簡便な方法で作成することが可能となった。

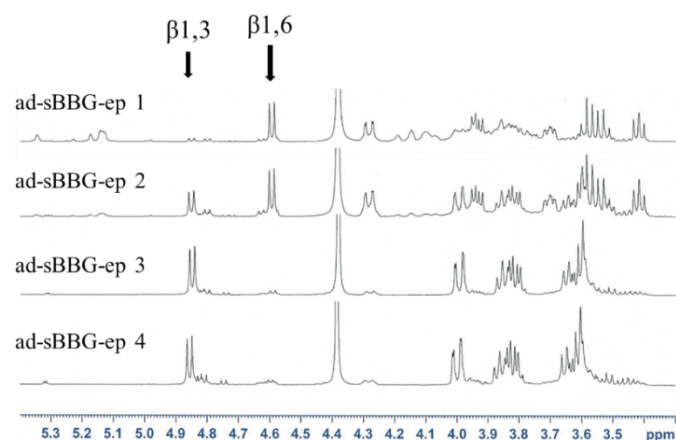


Fig. 1 NMR spectra of ad-sBBG

Each solubilized ad-sBBG, Laminarin was lyophilized, dissolved in D₂O, and then lyophilized again to make the exchangeable proton deuterium. The resulting product was dissolved in D₂O and ¹H-NMR spectra were measured at 70°C. Bruker DPX400 instruments equipped with 'Bruker Top spin3.2' software were used.

第2章 ad-sBBGの自然免疫受容体 dectin-1 に対する in vitro における作用

真菌の細胞壁構成成分の一つである β -glucanを認識する受容体の一つに dectin-1 がある。この dectin-1 は、マクロファージや樹状細胞、好中球などの免疫担当細胞に発現しており、自然免疫応答に関わっている。 β -glucan に対する dectin-1 の応答性には、 β -glucan の可溶性・不溶性の違いや分子量の違いによって大きく変化することが知られている。第1章にて作成した ad-sBBG を用いて、dectin-1 結合性とマクロファージや樹状細胞の応答性との関連性について検討した。第1節では、ad-sBBG の dectin-1

に対する結合性について ELISA 法を用いて検討した。その結果、高分子量画分の ad-sBBG-high の方が dectin-1 に対する親和性が強く、低分子量画分の ad-sBBG-low では、dectin-1 に対する結合性は確認されたものの、高分子量画分と比較してその親和性は低かった。dectin-1 に対する結合性の分子量分布あたりの変化を確認するため、ad-sBBG を HPLC にて 30 秒間隔で細分画し、dectin-1 に対する結合性を ELISA 法にて確認した。その結果、分子量約 4000 から急激に結合力が低下することが明らかとなった。第 2 節では、ad-sBBG のマクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞における応答性について検討した。低分子可溶性 β -glucan である laminarin は、dectin-1 に対してアンタゴニスト活性を示すことが報告されている。そこで、laminarin と同程度の分子量である ad-sBBG のアンタゴニスト活性の有無について検討した。4%チオグリコレート培地誘導性腹腔内マクロファージ(PEC) を用い粒子状 β -glucan (OX-CA) の応答性に対する影響を検討した。その結果、ad-sBBG は、OX-CA における TNF- α 産生を抑制した。この作用を ad-sBBG ep3 と ad-sBBG ep4 で比較したところ、ad-sBBG ep3 の方が強く抑制した。これは、第 1 節で示した dectin-1 に対する結合能と類しており、dectin-1 アンタゴニスト活性は、dectin-1 との結合が重要であることが明らかとなった (Fig. 2.)。さらに、樹状細胞上の dectin-1 に対しても同様に検討した。その結果、PEC での結果と異なり、dectin-1 による刺激によって TNF- α 産生を誘導した (Fig.3.)。

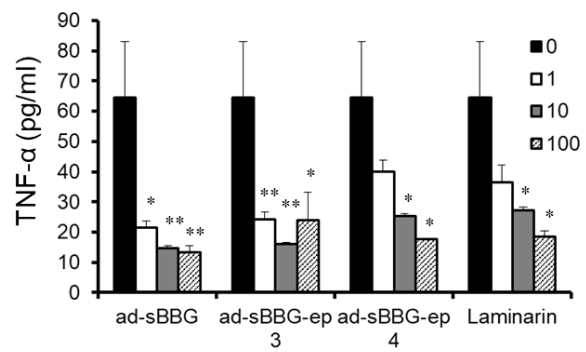


Fig. 2 Effects of each ad-sBBGs on TNF- α production in PEC stimulated with OX-CA. PECs were stimulated with GM-CSF (1ng/mL) for 24h. PECs were stimulated with OX-CA (50 μ g/mL) and several ad-sBBGs, laminarin (0–100 μ g/mL).

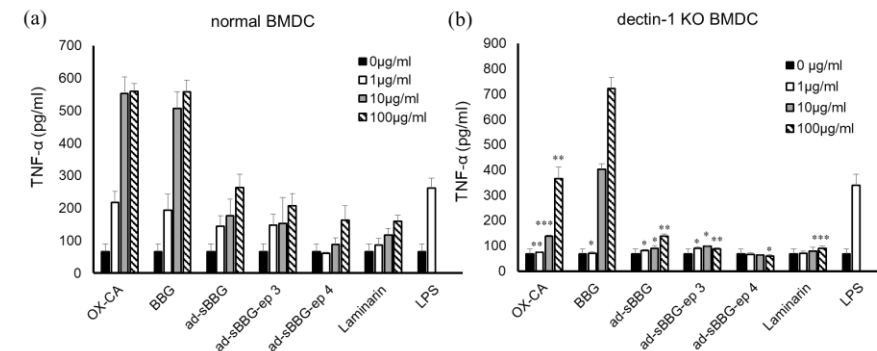


Fig. 3. Effects of each ad-sBBGs on TNF- α production in murine BMDCs. (a) Normal BMDCs or (b) dectin-1 deficient BMDCs were stimulated with several ad-sBBGs, laminarin (0–100 μ g/mL). After 48h, the supernatants were collected and concentrations of TNF- α were measured by ELISA. Significant difference from normal BMDCs: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

これまでの報告では、dectin-1 によるシグナルを伝達するには、不溶性 β -glucan によって dectin-1 を凝集させ、膜上に存在している CD45 \cdot CD138 のフォスファターゼを凝集した周りに集まることが必要であるとされている。しかし、今回の結果では、可溶性 β -glucan によって dectin-1 シグナルが伝達されていることから、dectin-1 のシグナルを伝達するには必ずしも不溶性である必要はないことが明らかとなった。これらのことから、細胞種の役割の違いによって β -1,3-glucan から

dectin-1 へのシグナル伝達に質的な違いがあることが示唆された。

第3章 ad-sBBG ep3 のアレルギーモデルマウスに対する影響

近年になり、潰瘍性大腸炎の動物モデルに対して laminarin を経口投与すると腸内細菌叢に変化をもたらし、制御性 T 細胞 (Treg) を誘導し、病態を改善するという報告がなされた。わが国ではおよそ 3 人に 1 人の割合で何らかのアレルギーに罹患していることが報告されている。アレルギーと腸管免疫には深い関わりがあることが知られており、腸内細菌叢により Treg 細胞を誘導し、アレルギー抑制効果を示すことに注目が集まっている。そこで、低分子可溶性 β -glucan の Treg 細胞誘導性に着目し、ad-sBBG ep3 のアレルギー抑制作用について検討した。第1節では、BALB/c マウスに ad-sBBG を自由飲水させ脾臓細胞の免疫応答性の変化について検討した。その結果、脾細胞から IFN- γ 産生が誘導された。また、マウスの腸内細菌叢を測定した結果、*Clostridium* subcluster XIVa, IV の有意な増加が認められた。第2節では、アレルギーモデルマウスに対する ad-sBBG ep3 の効果について検討した。OVA + Alum を腹腔内投与することにより、OVA アレルギーモデルマウスを作成した。モデルマウスに対し、ad-sBBG ep3 を実験の終了時まで自由飲水させ対照群と比較した。その結果、ad-sBBG 自由飲水群において、脾細胞からの IL-4 産生が有意に減少し、IFN- γ 産生が上昇した。また、血清中の total IgE ならびに OVA specific IgE のいずれもが優位に減少した (Fig. 4)。また、腸管リンパ節中の Treg 細胞を測定したところ、ad-sBBG ep3 投与群において上昇傾向にあった。これらのことから、ad-sBBG ep3 の経口投与によって *Clostridium* subcluster XIVa, IV を増加させ、Treg 細胞を誘導したことがアレルギーを減弱させた要因の一つであることが考えられた。

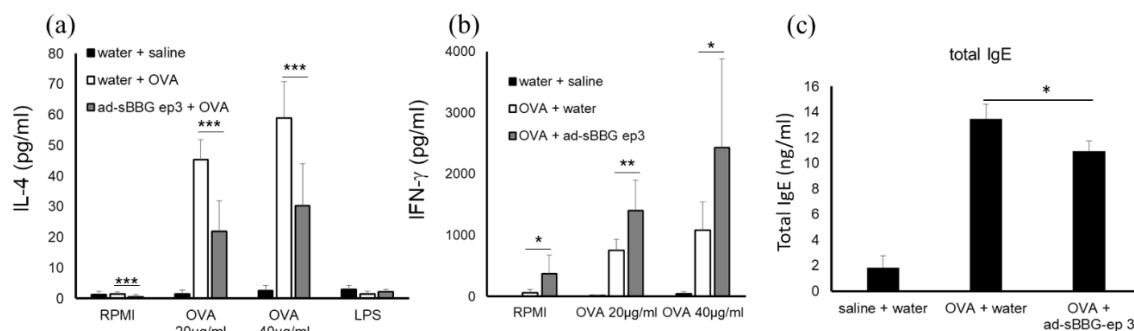


Fig. 4. Effect of ad-sBBG in drinking water for allergy model mouse. BALB/c mice administered water or ad-sBBG ep3 in drinking water ad libitum for 15 days. On day 7 after oral administration, a mixture of OVA (1 mg / head) and Alum at a ratio of 1: 3 was intraperitoneally administered on day 7, day 14. Splenocytes were isolated from day 15 BALB /c mice. Supernatants of cell culture were collected to measure the concentrations of cytokines using ELISA (a) IL-4, (b) IFN- γ (c) measurement of total IgE antibody in blood of allergy model mice. Significantly different from water-administrated mice: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

総括

本研究において、強固で低分子化が困難な β -glucan の低分子可溶化法を確立し、研

究レベル並びに工業レベルの生産を可能とした．さらに，ad-sBBG の簡易分画法の確立により， β -1,3-glucan を主とする低分子可溶性 β -glucan の分取を可能とした．さらに，ad-sBBG を用いることで，dectin-1 を介した低分子 β -glucan の認識と応答は細胞種ごとに役割に違いがある可能性が示唆された．また，ad-sBBG のヒトに対する応用性を見出すため，マウスに対して非侵襲的な自由飲水という方法で投与を行った結果，T reg 細胞の誘導能を示すことを見出すことが出来，新たな食品としての健康維持に役立つものとして利用可能である可能性が示唆された．

【研究結果の掲載誌】

- 1) Int J Biol Macromol. **104**. 367-376. (2017)
- 2) Int J Biol Macromol. **107**. 2269-2278. (2018)

論文審査の結果の要旨

β -glucan (BG)は細菌、真菌、植物など様々な生物が産生する多糖であり、ヒトや動物に対して様々な機能性を発揮している。2007年にBG受容体としてdectin-1が見出されて以来、病原性真菌の病原因子として、また自然免疫を活性化する機能性分子として注目されている。BGは、分岐度、分子量、溶解性など多様性を示し、活性を左右しているが、低分子可溶性BGの研究報告は少ない。本研究では、酵母細胞壁BGの低分子可溶化法を検討し(第一章)、得られたad-sBBGを用いて自然免疫受容体dectin-1に対する作用をin vitro(第2章)ならびにin vivo(第3章)で解析した。

第1章「酵母細胞壁 β -glucanの低分子可溶化法の検討」では、パン酵母由来BG(BBG)を出発物質とし、熱分解(第1節)ならびに酸分解(第2節)を用いて低分子化を試みた。その結果、水懸濁液を135°C4時間以上の熱分解することにより80%以上を可溶化することができた。また、酸分解では、45%硫酸3時間で分解することで最も効率良く可溶化できた(ad-sBBG)。熱分解に比べ酸分解の低分子化率が高かったため、酸分解物を用いて、細分画法を検討した(第3節)。エタノールを段階的に添加し分別沈殿を行ったところ(ad-sBBG ep1~ad-sBBG ep4)、低分子量画分(ep3, ep4)から低分子 β -1,3-glucanが効率よく回収することに成功した。

第2章「ad-sBBGの自然免疫受容体dectin-1に対するin vitroにおける作用」では、第1章にて作成したad-sBBGを用いて、dectin-1結合性とマクロファージや樹状細胞の応答性との関連性について検討した。第一節では、ad-sBBGのdectin-1に対する結合性についてELISA法を用いて検討した。その結果、dectin-1に対する親和性は低分子量画分に比べ高分子量画分の方が強い傾向を示した。また、HPLCで細分画したところ、分子量約4000から急激に結合力が低下することを明示した。第二節では、ad-sBBGのマクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞における応答性について検討した。4%チオグリコレート培地誘導性腹腔内マクロファージ(PEC)における粒子状BG(OX-CA)の応答性に対する影響について検討したところad-sBBGは、OX-CAによるTNF- α 産生やROS産生を抑制した。また、ep4にくらべep3の方が強い抑制効果を示した。次に、樹状細胞上のdectin-1に対して同様の検討を行ったところ、ep3ならびにep4は単独でTNF- α 産生を誘導したことから、細胞の種類によって、アゴニスト・アンタゴニストの分子量依存性が異なる可能性のあることが示唆された。dectin-1のシグナル伝達には、リガンドがdectin-1を凝集させ、膜上のCD45・CD138の局在を変えることが必要とされている。本研究結果から、膜上の分子の局在化制御は、細胞ごとに異なる可能性のあることが示唆された。

第3章「ad-sBBG ep3のアレルギーモデルマウスに対する影響」では、BGフリーの飼料を用いて飼育したBALB/cマウスを用い、OVAアレルギーモデルに対する、ad-sBBGep3の効果を検討した。第1節では、BALB/cマウスにad-sBBGを自由飲水させ脾臓細胞の免疫応答性の変化について検討を行った。その結果、脾細胞からのIFN- γ 産生が誘導されることが明らかとなった。ま

た、マウスの腸内細菌叢を測定した結果、*Clostridium* subcluster XIVa、IV の有意な増加が認められた。第二節では、OVA+Alum を腹腔内投与することにより、OVA アレルギーモデルマウスを作成した。モデルマウスに対し、ad-sBBG ep3 を最終日まで自由飲水させ各種パラメータの変化を測定した。その結果、ad-sBBG 自由飲水群において、脾細胞からの IL-4 産生が有意に減少し、IFN- γ 産生が上昇した。また、血清中の total IgE のみならず OVA specific IgE も優位に減少した。また、腸管リンパ節中の Treg 細胞も上昇する傾向を示した。これらのことから、ad-sBBG ep3 の経口投与によって *Clostridium* subcluster XIVa、IV を増加させ、T reg 細胞を誘導し、アレルギーを減弱させることを強く示唆した。

以上、本研究において、強固な酵母細胞壁 BG を酸分解することで低分子可溶化する方法を見出し、工業レベルの低分子可溶性 BG の生産を可能とした。さらに、本研究で創成した ad-sBBG を用いることで、低分子 BG に対する dectin-1 の応答性が細胞種ごとに異なることを見出した。さらに、マウスモデルにおいて ad-sBBG の自由飲水によって腸管に T reg 細胞を誘導できることを見出した。

本研究内容は、低分子可溶性 BG の製造方法を開発し、dectin-1 受容体を介したシグナル伝達機構の特徴を見出し、アレルギーへの応用の可能性を見出したものであり、博士(薬学)の学位論文として相応しい価値あるものと判断する。