

研究課題名	免疫調節活性を有する腸内微生物由来コンドロイチン硫酸代謝物の探索
フリガナ	ヒガシ キョウヘイ
代表者名	東 恭平
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学大学院薬学研究院 助教
本助成金による発表論文，学会発表	無し

研究結果要約

コンドロイチン硫酸 (CS)はグルクロン酸 (GlcA)とN-アセチルガラクトサミン (GalNAc)との二糖繰り返し構造からなる直鎖状酸性多糖類である。CSは膝関節炎の疼痛寛解作用が一般的に知られ、医薬品・機能性食品として流通している。実際、オボアルブミン免疫マウスにCSを長期投与させると抗アレルギー効果が報告されているが、分子レベルでの作用メカニズムはほとんど明らかとなっていない。我々は免疫調節活性を有する腸内微生物由来CS代謝産物を糞便中から同定すべく、検討を行ってきた。その結果、1) CS投与の有無に関わらずPBSを用いて調製した糞便上清は脾細胞のTh1サイトカイン産生に対して抑制的に働くこと、2) Th2サイトカインの産生には影響を及ぼさないこと、3) 0.1%抗生物質Aを1週間自由接種させて得た糞便上清は免疫調節活性が減弱すること、4) CS投与の有無で腸内細菌叢、ムチン量およびIgA量にはほとんど影響を及ぼさないことを明らかにした。また糞便上清は、LPSと同様にマクロファージのTNF- α やIL-6の産生量を増加させたことから、細胞毒性はほとんど認められなかった。以上の結果より、糞便には抗生物質A感受性腸内細菌が産生する免疫調節物質が存在し、CSは腸管における免疫調節物質の吸収効率を促進している可能性が考えられた。

研究目的

我々の研究室ではこれまでに、オボアルブミン感作マウスに 1%CS を 3 週間自由摂取させると、非投与群に比べてピクリルクロリドによる耳介腫脹が抑えられること、血中 IgE およびヒスタミン濃度が減少することから、CS の経口投与は即時型アレルギーに対して抑制的に働くことを明らかにした^{1,2)}。更に、CS の長期摂取は腸管免疫系のみならず、二次リンパ節の脾細胞の分化にも影響を

及ぼしていることが明らかとなった^{1,2)}。しかしながら、CSは分子量が5~50 kDaであり硫酸基など負電荷を有することからほとんど吸収されることはない³⁾。また血中半減期も15分以内であることから、抗炎症効果に対するCSの直接的な影響は小さいと考えられる⁴⁾。従って、CS摂取による分子レベルでの作用メカニズム解明は、ほとんど進展していないのが現状である。近年、腸内細菌が可溶性食物繊維や難消化性でんぷんを大腸において発酵分解し、様々な二次代謝産物を産生すること、その代表例が酪酸といった短鎖脂肪酸であり、腸管免疫系の分化に影響を及ぼすことが報告された⁵⁾。腸内細菌由来のCS代謝産物が全身免疫系に影響を及ぼすのであれば、CSの生理作用解明が大幅に進展するだけでなく、腸内細菌と末梢組織との情報伝達についての理解が更に深まることが期待される。本研究では、免疫調節活性を有する腸内微生物由来CS代謝産物を糞便中から探索・同定することを目的とした。

研究計画及び研究手法

CSの長期摂取による生理作用は、腸内細菌により産生されたCS代謝産物が発揮しているものと考えられる。本研究では、この仮説に基づいて免疫調節活性を有する糞便の上清を調製し、その活性成分を同定することを目的とした。

1. オボアルブミン免疫マウスの作製と脾細胞の調製方法

アレルギーモデルマウスは、オボアルブミン(OVA) 20 µg および ALUM 2 mg を 400 µL の生理食塩水に溶かして調製した OVA 溶液をマウスに腹腔内投与 (一次免疫) し、10 日後に同量の投与 (2 次免疫) を施すことで作製した。1% CS 含有水は、一次免疫の一週間前から自由摂取させた。2 次免疫の 1 週間後に脾臓の摘出を行った。脾細胞は、摘出した脾臓を裁断し懸濁した後、セルストレイナーで濾して調製した。脾細胞は OVA (100 µg/mL) 存在下で培養し (1×10⁷ 細胞)、培養液に含まれるサイトカイン量を ELISA で調べた。

2. 免疫調節活性を有する糞便上清の調製

BALB/c マウスにオボアルブミンによる抗原感作を施した際に、1% CS で調製した飲み水を約 3 週間与え、糞便は脾細胞を摘出する当日に採取した。糞便 1 個を 100 mg/mL (w/v) になるように PBS を添加しバイオマッシャーII (Wako) でホモジナイズした後、遠心して得られた上清をフィルター滅菌 (0.22 µm) した。また腸内細菌の関与を確認するため、0.1% の抗生物質 (A、B、C および D) を飲み水としてマウスに与え、上述の通り糞便の上清を得た。免疫調節活性は、CS 投与群又は非投与群から調製した脾細胞に糞便の上清 (10 µL) を添加し、培地中に含まれる Th1 および Th2 サイトカイン量を ELISA 法で測定することで評価した。

3. ELISA によるサイトカイン濃度測定

脾細胞が産生するサイトカイン (IFN-γ、IL-2、IL-5、IL-10、TNF-α および IL-6) 濃度は、

ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience)を用いて調べた。

4. 腸内細菌叢の解析

糞便に含まれる DNA の抽出は、QIAamp[®]DNA Stool kit (QIAGEN)を用いて行った。次世代シーケンスによる腸内細菌叢の解析は、FASMAC に委託した。腸管内の IgA は、Mouse IgA ELISA Quantitation SET (BETYL Laboratories)を用いて測定した。腸管内のムチンは、Fecal Mucin Assay Kit (COSMO BIO)を用いて測定した。

5. 糞便抽出物に含まれる免疫調節活性物質の探索

糞便 10 mg を 80% (v/v)メタノールで懸濁し、遠心して得られた上清をフィルター (0.22 μm) 濾過した。得られた上澄みをメタノール:クロロホルム:水 (5:5:2)と混合し、遠心して得られた上澄みを CE-TOFMS を用いたメタボローム解析を行った。

結果と考察

BALB/c マウスにオボアルブミン (OVA)による抗原感作を施した際に 1%CS で調製した飲み水を約 3 週間与え、糞便は脾細胞を摘出する当日に採取した。糞便上清は、糞便 1 個を 100 mg/mL になるように PBS でホモジナイズし、遠心して得た上澄みをフィルター滅菌することで調製した。糞便上清を CS 非投与群から調製した脾細胞に添加して培養し、サイトカイン産生に対する糞便上清の効果を ELISA 法により調べた。その結果、CS 投与群の糞便上清でのみ効果があるのではという予想を覆し、CS 投与の有無に関わらず糞便上清は Th1 サイトカイン (IL-2 および IFN-γ) の産生を著しく阻害した (図 1)。一方、Th2 サイトカインである IL-5、IL-10 の産生に影響はなか

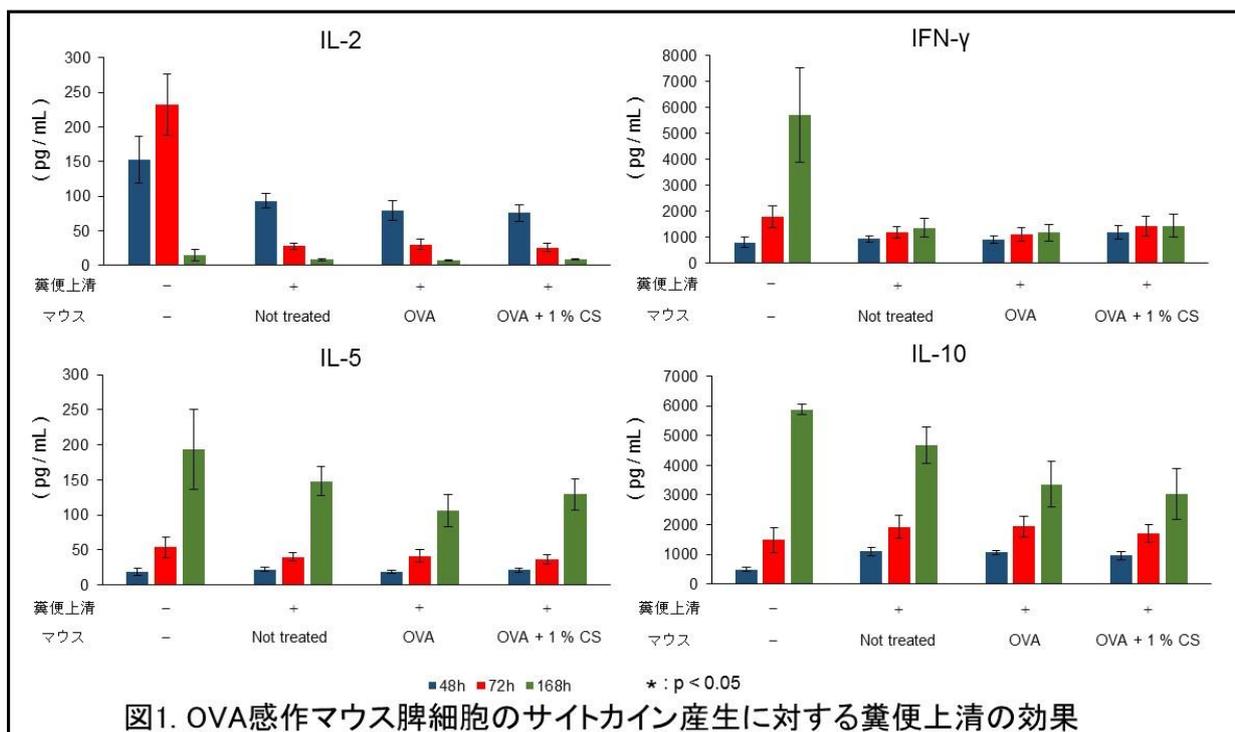
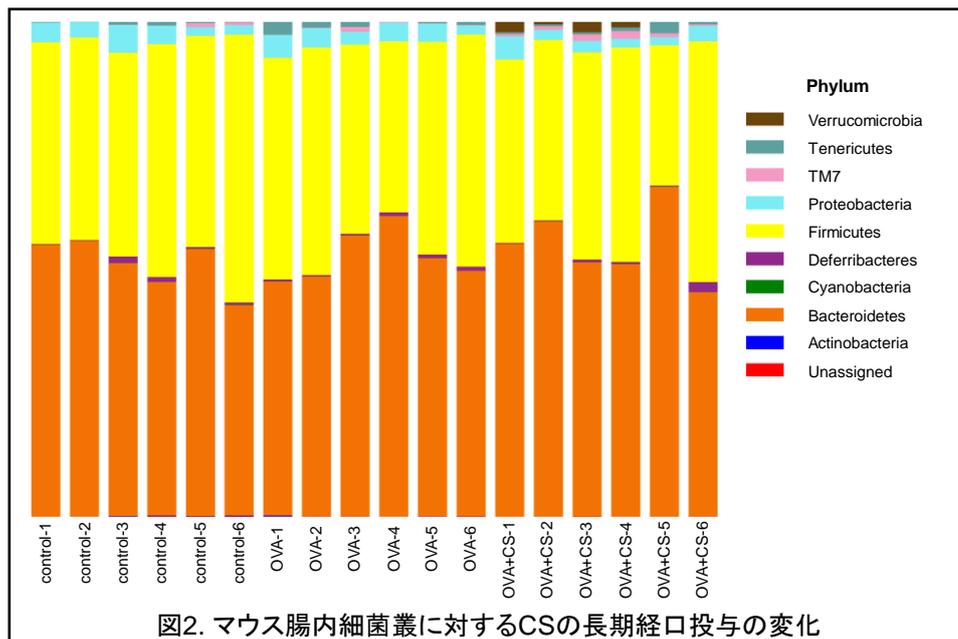


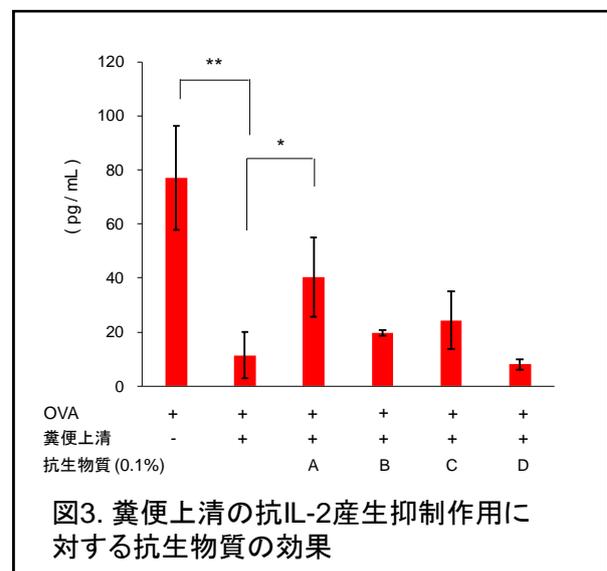
図1. OVA感作マウス脾細胞のサイトカイン産生に対する糞便上清の効果

った (図 1)。CS 投与群から調製した脾細胞においても、糞便上清は CS の有無に関わらず Th1 サイトカインの産生を抑制した (データ示さず)。また、糞便上清は LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と同様にマウスマクロファージ(RAW264.7)の TNF- α や IL-6 産生を増加したことから、細胞毒性はほとんど認められなかった (データ示さず)。

次に腸内容物から DNA を抽出し、腸内細菌叢を次世代シーケンスで解析した。その結果、OVA 感作+CS 投与群の腸内細菌叢は OVA 感作群および OVA 非感作群とともにほとんど同じであった (図 2)。また、OVA 感作群および OVA 感作+CS 投与群における腸管内の IgA とムチン量を調べたが、非感作(-CS)群とほとんど変化が認められなかった (データ示さず)。



次に、糞便上清に含まれる免疫調節物質が腸内細菌由来であるかどうかを種々の抗生物質 (A、B、C および D)を飲み水としてマウスに投与し、糞便上清を調製して Th1 サイトカイン産生に対する影響を調べた。その結果、0.1%抗生物質 A 投与群から得た糞便上清は Th1 サイトカインの抑制効果が減弱した (図 3)。以上の結果より、糞便には抗生物質 A 感受性腸内細菌が産生する免疫調節物質が存在し、CS は腸管における免疫調節物質の吸収効率を促進していることが考えられた。最後に、抗生物質 A の有無で糞便上清を調製し、CE-TOFMS (Agilent Technologies)により



メタボローム解析を行った。ネガティブイオンモードで測定し 58 種の標準品と比較した結果、抗生物質 A 投与群では 12 種類の低分子化合物濃度が著しく減少していた。また、次世代シーケンスにより腸内細菌叢を調べた結果、フィルミテクス門およびバクテロイデス門の比率が著しく減少していた(データ示さず)。以上の結果より、抗生物質 A 感受性腸内細菌が免疫調節物質を産生していることが示唆された。今後は、糞便上清に含まれる免疫調節物質を同定し、CS による抗炎症効果とどのように関連しているかを解明し、速やかに学会発表と論文発表を行いたいと考えています。

今後の研究活動について

今後は以下の研究を行っていきたいと考えています。

1. 免疫調節物質を探索することを目的に、CE-TOFMSで見出した候補物質を脾細胞に添加し、サイトカイン産生への影響をELISA法で調べる。
2. 免疫調節物質を同定後、その経口吸収効率並びに消化管吸収におけるCSの影響を検討する。免疫調節物質の消化管吸収はCSに依存する可能性が高いため、CS投与量、投与回数および投与期間など徹底的に検討する。本研究で用いたCSはコンドロイチン6硫酸(CS-C)であるが、仮に多くの投与回数や投与期間を要した場合は、硫酸化度が高いコンドロイチン4,6硫酸 (CS-E)¹⁾か、CS分解酵素に耐性のCS⁶⁾で検討する。
3. 免疫調節物質が即時型アレルギーに有効かどうかを調べる。具体的には、OVA感作マウスに免疫調節物質を経口投与した際に血中IgEおよびヒスタミン濃度が変動するかをELISA法を用いて調べる。
4. 免疫調節物質の吸収並びにCSの影響が再現できるか調べることを目的として、Caco-2細胞をTranswellインサート内で培養し単層を形成させた後に物質透過実験法を行う。

参考文献

- 1) Akiyama H, Sakai S, Linhardt RJ, Goda Y, Toida T, Maitani T. Chondroitin sulphate structure affects its immunological activities on murine splenocytes sensitized with ovalbumin. *Biochem J*. 2004 Aug;382(Pt1):269-278.
- 2) Sakai S, Akiyama H, Sato Y, Yoshioka Y, Linhardt RJ, Goda Y, Maitani T, Toida T. Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice. *J Biol Chem*. 2006 Jul;281(29):19872-19880.
- 3) Ge D, Higashi K, Ito D, Nagano K, Ishikawa R, Terui Y, Higashi K, Moribe K, Linhardt RJ, Toida T. Poly-ion Complex of Chondroitin Sulfate and Spermine and Its Effect on Oral Chondroitin Sulfate Bioavailability. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2016 2016;64(5):390-398.

- 4) Sakai S1, Onose J, Nakamura H, Toyoda H, Toida T, Imanari T, Linhardt RJ. Pretreatment procedure for the microdetermination of chondroitin sulfate in plasma and urine. *Anal Biochem.* 2002 Mar;302(2):169-174.
- 5) Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffe PJ, Rudensky AY. *Nature.* 2013 Dec;504(7480):451-455.
- 6) Higashi K, Takeda K, Mukuno A, Okamoto Y, Masuko S, Linhardt RJ, Toida T. Identification of keratan sulfate disaccharide at C-3 position of glucuronate of chondroitin sulfate from *Mactra chinensis*. *Biochem J.* 2016 Nov;473(22):4145-4158.

以上