

研究課題名	腸管免疫系におけるペクチン認識機構の解明
フリガナ	キタグチ コウジ
代表者名	北口 公司
所属機関（機関名） （役職名）	岐阜大学 応用生物科学部 助教
本助成金による発表論文，学会発表	前田絢香，津田明里，岩城佳那，矢部富雄，北口公司：ペクチンが好塩基球と抗原提示細胞に及ぼす影響の解析，日本農芸化学会中部支部第 177 回例会，名古屋，2016 年 9 月 24 日 前田絢香，矢部富雄，北口公司：シトラスペクチンの摂取がアレルギー性皮膚炎に及ぼす影響の解析，第 65 回日本応用糖質科学会中部支部講演会，名古屋，2017 年 3 月 10 日

## 研究結果要約

水溶性食物繊維のペクチンは，アレルギー応答を調節し得る食品成分である可能性が示唆されているが，食物アレルギーに対する効果は不明な点が多い。本研究では，食物アレルギーモデルマウスにシトラス由来ペクチン添加飼料を給餌し，食物アレルギー病態と腸管免疫細胞に及ぼす影響を調査し，食物アレルギー予防食品素材としてのペクチンの利用の可能性を検討した。卵白オボアルブミン(OVA)をアレルゲンとする食物アレルギーモデルマウスにシトラス由来ペクチン添加飼料を給餌した結果，血中 IgE と IgG1 濃度がペクチン添加により有意に低下した。さらに，OVA の経口投与により誘導されるアレルギー性の下痢の発症率がペクチン添加により減少する傾向が観察された。ペクチン添加飼料を摂取したマウスの腸間膜リンパ節では，Gata-3 と IL-4 の遺伝子発現量が有意に低下していた。さらに，骨髄由来樹状細胞にペクチンを添加したところ，樹状細胞の成熟に伴う MHC クラス II と CD80 の発現量の上昇が抑制される傾向が観察された。一方，受動性アナフィラキシーに対するペクチン給餌の抑制効果はみられなかった。以上の結果より，ペクチンは腸管樹状細胞に直接作用し，抗体産生を調節することで食物アレルギーの発症を予防していることが示唆された。この結果は，腸管樹状細胞に作用するペクチン由来のオリゴ糖が，新たなアレルギー予防食品素材として利用できる可能性を示している。

## 研究目的

### 【目的】

果実や野菜中に含まれる水溶性食物繊維のペクチンは、ガラクトuron酸が  $\alpha$ -1,4 結合した主鎖に中性糖で構成される側鎖が付加した複合多糖類であり、アレルギー応答を調節し得る食品成分である可能性が示唆されている。経口摂取されたペクチンは、ヒトの上部消化管では分解を受けずに大腸にまで到達し、腸内細菌により代謝・分解される。近年、腸内細菌がペクチンを代謝した結果生じる短鎖脂肪酸を介してアレルギー性喘息が抑制されること<sup>1)</sup>が報告されたが、食物アレルギーに対するペクチンの効果は不明な点が多い。食物アレルゲンが感作される腸管には、免疫応答や炎症に抑制的に働く特徴的な免疫細胞亜集団が存在すること<sup>2)</sup>が報告されており、ペクチンが腸内細菌に対するプレバイオティクス効果のみならず、腸管免疫細胞へも作用することで食物アレルギーを抑制している可能性が考えられた。そこで本研究では、腸管免疫細胞に及ぼすペクチンの免疫調節作用を調査し、食物アレルギーの発症予防メカニズムを解明することを目的とする。

### 【意義】

平成 17 年及び 18 年国民健康・栄養調査によると、食物繊維の摂取量は目標量に達していないことが明らかになっている。本研究により、食物アレルギー抑制活性を有するペクチンの化学構造と作用機序が明らかになれば、通常食物繊維の摂取よりも少量かつ効果の高い食物アレルギー予防食品が創製できる。ペクチンには、ほとんど全ての陸上植物に含まれているため、安価に調製できること、上部消化管で分解・吸収されずに、効率的に腸管の免疫細胞へ作用できること、食品工業の分野で食品添加剤として広く使用されており、食経験も豊富で毒性を示さないことなど多くの利点を有しているおり、新たな機能性食品素材として有望である。

## 研究計画及び研究手法

### 【研究計画】

本研究では、ペクチンを給餌したアレルギーモデルマウスの病態を調査し、ペクチンの抗アレルギー効果と作用点を明らかにする。次いで、ペクチンが直接免疫細胞に作用し、その機能を調節しているのかを培養細胞を用いた *in vitro* 実験系により調査する。さらに、ペクチンの抗アレルギー活性本体化学構造とその認識分子を同定することを最終的な目標とする。

### 【研究手法】

#### ①ペクチンの摂取が食物アレルギー病態へ及ぼす影響の解析

ペクチンが影響を及ぼしている免疫細胞の存在と抗アレルギー作用機序の一端を明らかにするため、*in vivo* におけるペクチン摂取の影響を調査した。シトラス由来のペクチンを 5, 10, 20% 添加した飼料を Balb/c マウスに給餌した後、水酸化アルミニウムゲルアジュバントと卵白オボアルブミン

(OVA)で免疫した。OVA 感作後、経時的に採血し、抗体価を ELISA 法により測定した。また、感作 2 週間後に追加免疫した後、OVA を経口投与することでアレルギー性の下痢を誘導した。OVA の経口投与 10 日後に脾臓と腸間膜リンパ節(MLN)を採取し、T 細胞分化関連転写因子とサイトカイン発現量を qPCR 法により測定した。

#### ② ペクチンの摂取が受動性アナフィラキシーへ及ぼす影響の解析

ペクチンがエフェクター相でも抗アレルギー活性を示すのかを調査した。ペクチンを 14 日間経口摂取させた Balb/c マウスに抗 OVA IgE 抗体を腹腔投与した。IgE 抗体投与 24 時間後、OVA を投与し、経時的に直腸温を測定することでアナフィラキシーの症状を観察した。

#### ③ ペクチンの摂取が接触性皮膚炎へ及ぼす影響の解析

ペクチンが Th1 型のアレルギー炎症も抑制するのか否かを調査するため、当初の予定にはなかったが接触性皮膚炎病態の影響も調査した。C57BL/6 マウスにシトラスペクチンを 5, 10, 20%添加した飼料を給餌した後、0.5% DNFB 溶液を除毛した腹部に塗布することで感作した。感作 6 日後に 0.3% DNFB 溶液を右耳に塗布し、皮膚炎を誘導した後、耳介の厚さと遺伝子発現量を測定した。

#### ④ ペクチンの添加が好塩基球に及ぼす影響の解析

ペクチンがマスト細胞や好塩基球の機能を直接制御しているのかを調査した。ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 へペクチンを添加した後、イオノマイシンならびに IgE 架橋刺激により脱顆粒を誘導した。脱顆粒の測定は、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性を指標として比色法により測定した。また、イオノマイシン刺激後の IL-4 と IL-13 の遺伝子発現量を qPCR 法により測定した。

#### ⑤ ペクチンの添加が抗原提示細胞に及ぼす影響の解析

ペクチンが抗原提示細胞を直接制御しているのかを調査した。マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で培養し、骨髄由来樹状細胞(BMDC)を誘導した。BMDC にペクチンを添加した後、LPS 刺激を加え、MHC class II と共刺激分子の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。

上記の③以外は、当初の予定通りに実施できた。当初予定していた抗生剤投与除菌マウスによるアレルギー病態の解析は技術的な問題により実施できなかった。また、ペクチンの抗アレルギー活性本体化学構造の同定には至れなかったため、今後の研究の課題として進めたい。

## 結果と考察

食物アレルギーモデルマウスヘシトラス由来ペクチンを 5, 10, 20%添加した飼料を給餌した結果、追加免疫後の血中 IgE 濃度の上昇が 10%および 20%ペクチン添加飼料摂取群において有意に低下した。また、感作後の血中 IgG<sub>1</sub>濃度は、10%および 20%ペクチン添加飼料摂取群において有意に低下した。さらに、20%ペクチン添加飼料摂取群ではアレルギー性の下痢の発症率が、コントロールに比べ 60%程度低下していた。以上の結果より、ペクチンの摂取により抗体産生が抑制され、食物

アレルギーの発症を予防できる可能性が示唆された。

アレルギー発症後の MLN の遺伝子発現量を測定した結果、Th2 細胞のマスター転写因子である Gata-3 の mRNA 発現レベルが 10%および 20%ペクチン添加飼料摂取群において有意に低下していた。さらに、コントロール群と比較して、ペクチン添加飼料摂取群では Th2 細胞が産生するアレルギー関連サイトカインの IL-4 と IL-10 の mRNA 発現レベルが有意に減少していた。IL-10 は制御性 T 細胞(Treg)が産生するサイトカインでもあるが、Treg のマスター転写因子である Foxp3 と Treg 細胞が産生する抗炎症性サイトカイン TGF- $\beta$  の mRNA 発現レベルはコントロール群とペクチン添加飼料摂取群で有意な変化は観察されなかった。したがって、ペクチン摂取により、Th2 細胞分化が抑制される可能性が考えられた。IL-4 は B 細胞の IgE と IgG<sub>1</sub> へのクラススイッチを促進するサイトカインであることから、CD4 陽性ナイーブ T 細胞から Th2 細胞の分化の抑制が抗体産生の低下に関与している可能性が考えられた。一方で、脾臓においては、コントロール群とペクチン摂取群で Gata-3、IL-4 の mRNA 発現レベルに有意な変化は観察されなかった。以上の結果より、ペクチン摂取は、腸管の所属リンパ節である MLN の Th2 細胞の分化や増殖に影響を与えることで IL-4 の産生を抑制し、B 細胞の IgE、IgG<sub>1</sub> へのクラススイッチを制御する可能性が示唆された。

次に、ペクチンの摂取によるアレルギー性の下痢症状の抑制が抗体産生の低下に起因するのかを調査した。本実験で使用した食物アレルギーモデルは小腸へマスト細胞が浸潤する事が報告されている。そこで、受動性アナフィラキシーを誘導し、マスト細胞に対するペクチン給餌の影響を検討した。その結果、ペクチン摂取群とコントロール群では、アナフィラキシー誘導後の体温の低下は同程度であった。また、ラット好塩基球細胞株の RBL-2H3 細胞へペクチンを添加し、脱顆粒能を測定した結果、ペクチン添加による抑制は確認できなかった。イオノマイシンで刺激した RBL-2H3 細胞の IL-4 と IL-13 発現量にも、ペクチン添加による抑制はみられなかったことから、ペクチンはマスト細胞や好塩基球には直接影響を及ぼさない可能性が示唆された。

ペクチンを含めた酸性オリゴ糖の給餌により Th1/Th2 バランスを Th1 型にシフトさせる事<sup>3)</sup>が報告されている。ペクチンが Th1 への分化を促進するならば、Th2 優位な食物アレルギーなどの I 型アレルギーには保護的に、Th1 優位な IV 型アレルギーは増悪化に働く可能性が考えられた。そこで、Th1 優位な接触性皮膚炎モデルマウスにペクチンを給餌し、その影響を調査した。その結果、10%および 20%ペクチン添加飼料摂取群では、コントロール群に比べて接触性皮膚炎の症状が有意に軽減された。ペクチン摂取群の炎症部位では Foxp3 と IL-10 の発現量が有意に亢進していたことから、ペクチンは Treg を介して Th1 型のアレルギー性炎症も抑制している可能性が示唆された。

以上の結果から、ペクチンは T 細胞の分化を調節している可能性が示唆された。これまでの研究代表者らの研究では、経口摂取されたペクチンはパイエル板のミエロイド系細胞に作用して、炎症を調節する可能性を見出していることから、ペクチンが直接抗原提示細胞に作用し、抗原提示能を

調節する事で、T細胞分化を制御している可能性が考えられた。そこで、BMDCにペクチンを添加し、抗原提示に関わる分子群の細胞表面発現量をフローサイトメトリー分析により測定した。その結果、ペクチン添加群では、BMDCの成熟に伴うMHC class IIと共刺激分子CD80の発現上昇が抑制される傾向が観察された。一方、CD40やCD86の発現量はペクチン添加による変化は見られなかった。したがって、ペクチンは抗原提示細胞の抗原提示関連分子の発現を調節する事で、T細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。

これまでに報告されているペクチンの食物アレルギーの抑制機序としては、腸内細菌の短鎖脂肪酸を介したプレバイティクス効果<sup>2)</sup>が示唆されている。水溶性食物繊維の摂取により、Tregが誘導され、抗炎症性サイトカインによる抗アレルギー効果、経口免疫寛容の増強作用などが報告されている。一方、ペクチンがアレルギー応答を調節する可能性を示唆する報告は多数あるものの、アレルギーの増悪化・抑制といった、相反する作用が報告されており、統一した見解は得られていない。卵の主要アレルゲンであるOVAやオボムコイドとヒトIgEの結合性がペクチンの存在下で上昇する報告やペクチンがマウスのOVAへの免疫寛容を抑制する<sup>4)</sup>という報告もある。ペクチンの抗アレルギー作用に関しては、統一した見解が得られておらず、作用点と機序も明らかにされていない。とりわけ食物アレルギーの症状に対するペクチン摂取の影響について不明な点も多い。本研究では、ペクチンの摂取により食物アレルギーの発症を予防できることを*in vivo*で明らかにすることができた。また、その作用機序としては、Th2細胞分化を調節している可能性が示された。一方で、本研究ではTregの関与は限定的であることも示されており、これまでに報告されている抗アレルギー機構とは異なる結果となった。少なくとも接触性皮膚炎モデルではTregの関与が示唆されたことから、より精度の高い解析法で食物アレルギーモデルでもTregの関与を確かめる必要があると考えられる。また、本研究では、抗原提示細胞にペクチンが直接作用している可能性も示された。抗原提示細胞には機能とリガンドが未知のレクチン様受容体が数種類発現しており、抑制性のシグナルを細胞へ導入する受容体の存在も示唆されている<sup>5)</sup>。食品多糖であるペクチンがこれら免疫抑制性受容体のリガンドとなり、抑制機能を発現する可能性が考えられたが、これまでのところ、菌体多糖の一種であるβ-グルカンを認識する受容体Dectin-1が樹状細胞やマクロファージの細胞表面に発現し、免疫賦活作用を発揮することが明らかにされている<sup>6)</sup>のみで、食品多糖認識受容体の報告は皆無である。ペクチンの認識機構の解明は、新規免疫調節受容体とアレルギー予防食品の開発につながるものと考えられる。

本年度の研究では、当初予定していた免疫細胞におけるペクチン認識機構の解明という最終ゴールには至れなかった。しかしながら、ペクチンの標的細胞と抗アレルギー作用機序の一端を明らかにすることはできた。今後は、本研究で得られた知見を学会で発表すると同時に、論文の投稿に必要なデータを採取する予定である。1年以内に追加実験を実施し、本成果を食品科学関連の雑誌に投

稿する予定である。

### 今後の研究活動について

本研究の結果、ペクチンは主に感作相で抗体産生を調節することで食物アレルギーの発症を予防できる可能性が示唆された。樹状細胞の共刺激分子発現を調節している可能性が *in vitro* の実験結果より示唆されたため、今後は腸管樹状細胞に焦点を当て、ペクチンによる抗原呈示機能調節メカニズムを解明する予定である。とりわけ腸管には経口免疫寛容に関与する CD103 陽性樹状細胞が存在することから、腸管樹状細胞の亜集団の中からペクチンの標的細胞を明らかにする必要があると考えられる。研究代表者らはすでに阻害剤を用いた細胞培養試験により、マクロファージにおけるペクチンの抑制作用には PI3 キナーゼが必要であることを見出している。今後は、樹状細胞においても同様に阻害剤を用いた機能解析を進め、抗原呈示分子発現調節に必要なシグナル伝達分子を明らかにし、その上流に発現していると考えられるペクチン受容体の同定を目指す。また、ペクチンは骨格であるポリガラクトロン酸に様々な中性糖で構成される側鎖が付加した複雑な構造であるが、研究代表者らマクロファージの自然免疫応答の抑制には側鎖が必要であることを見出している。今後は、アレルギー応答の調節においてもペクチン側鎖が関与しているのか否かをペクチンの酵素分解物を用いて調査を進め、抗アレルギー活性化学構造を明らかにする予定である。ペクチン化学構造と樹状細胞機能の両面からペクチンの抗アレルギー機構を明らかにする予定である。

### 参考文献

- 1) Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Jun T, Nicod LP, Harris NL, Marsland BJ. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014. Feb;20(2):159-166.
- 2) Tan J, McKenzie C, Vuillermin PJ, Goverse G, Vinuesa CG, Mebius RE, Macia L, Mackay CR. Dietary fiber and bacterial SCFA enhance oral tolerance and protect against food allergy through diverse cellular pathways. *Cell Rep.* 2016. Jun;15(12):2809-2824.
- 3) Vos AP, van Esch BC, Stahl B, M'Rabet L, Folkerts G, Nijkamp FP, Garssen J. Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol.* 2007. Dec;7(12):1582-1587.
- 4) Khramova DS, Popov SV, Golovchenko VV, Vityazev FV, Paderin NM, Ovodov YS. Abrogation of the oral tolerance to ovalbumin in mice by citrus pectin. *Nutrition.* 2009. Feb;25(2):226-232.

- 5) Hoffmann SC, Schellack C, Textor S, Konold S, Schmitz D, Cerwenka A, Pflanz S, Watzl C. Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells. *J Biol Chem.* 2007. Aug;282(31):22370-22375.
- 6) Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001. Sep;413(6851):36-37.

以上