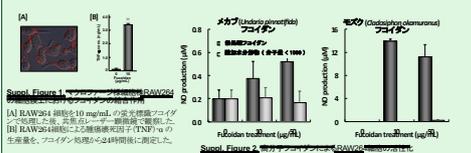


発表要旨

フコイダンは、褐藻類由来の天然硫酸化多糖類であり、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、免疫調節作用など様々な生理活性が報告されています。これまでに我々は、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 由来のフコイダンを、サッカロミセス酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のβ-グルカンであるザイモザンと協調して、マウスマクロファージ様細胞株RAW264を活性化することを明らかにしてきました。その一方で、フコイダンは細菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) に反応した際生じるRAW264細胞による一酸化窒素 (NO) および炎症性サイトカインの過剰産生を抑制することが報告されています。そこで、本研究では、メカブ (*Undaria pinnatifida*) 由来のフコイダンを、病原体成分による刺激に対するRAW264細胞の過剰な活性化を抑制する可能性を検討しました。RAW264細胞を96穴培養プレートに1穴あたり2万個播種し、24時間の回復培養後、マクロファージの病原体認識にはたらくToll様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体 (PRR) に対する至適濃度のリガンド (病原体成分) の存在または非存在下でフコイダン処理を行いました。その結果、RAW細胞におけるNO産生は、フコイダン単独では有意に増加しましたが、Pam3CSK4 (TLR1/TLR2リガンド)、リスチア (*Listeria monocytogenes*) 加熱死菌体 (HKLM, TLR2リガンド)、LPS (TLR4リガンド)、Pam2CGDPKPKSF (FSL-1, TLR2/TLR6リガンド) 刺激下では、フコイダンによって用量依存的に阻害されました。これらの結果から、フコイダンは適切な免疫パラメータを維持するはたらきを持ち、病原性感染症における過剰な炎症反応を緩和に有効であると考えられます。

研究背景

褐藻類から抽出されるフコイダンは、抗ウイルス作用、抗がん作用および免疫調節作用などの有益な生理機能を有することが知られています。先の研究で我々は、フコイダンをマクロファージの細胞表面上に結合し、免疫細胞の活性化を誘導することを明らかにしました (aFig. 1, Ref. 1)。また、マクロファージの機能を向上させるフコイダンの効果は、酸加水分解した低分子フコイダンでは失われてしまうことから (aFig. 2)、細胞表面上の受容体と相互作用するための高分子構造が、フコイダンが免疫増強作用を発揮するために必要であると示されました。



一方で、幾つかの先行研究では、炎症やアレルギー疾患において生じる過剰な免疫活性化に対して、フコイダンが抗炎症作用を示すことが報告されています。しかし、病原体刺激によって誘導される炎症応答の制御におけるフコイダンの詳細な作用機序は、未だ明らかにされていません。本研究では、感染症における病的な炎症の緩和におけるフコイダンの有効性を評価することを目的としました。

まとめ

本研究では、メカブおよびオキナワモズク由来フコイダンが、TLR1/TLR2, TLR2/TLR6, TLR4およびTLR7などのToll様受容体 (TLR) を介した病原体刺激を受けて異常に活性化されたマクロファージ様細胞株における過剰な炎症反応を効果的に抑制することを明らかにしました。この結果から、感染性肺炎やサイトカインストームのような過剰な炎症の治療や適切な免疫パラメータの維持において、フコイダンが有益な能力を持つことを示しています。

試料と実験方法

- フコイダン: 以下の食用海藻から調製された噴霧乾燥水抽出物, *Undaria pinnatifida* (メカブ), 分子量 >10,000, 85%)
Cladosiphon okamuranus (オキナワモズク, 分子量 >10,000, 90%)
- 細胞株と培養: マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 および J774細胞は、それぞれ 2×10^4 および 5×10^4 cells/well の細胞密度数となるよう96穴細胞培養プレートに播種し、24時間前培養の後、Table 1 に示す至適濃度の各PRRリガンドで30分間で処理した。リガンド刺激の後、各細胞を0-50 mg/mL のフコイダン存在下で培養した。
- 測定: 24時間のフコイダン処理の後、細胞培養液中に分泌された一酸化窒素 (NO) 量をグリース試験を用いて測定した。また、mRNA発現量は、フコイダン刺激の4時間後にRT-real time qPCR法により測定した。

結果

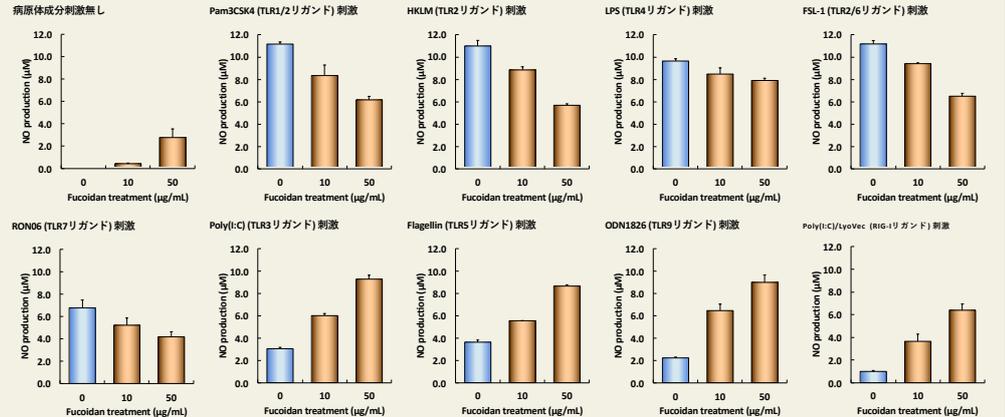


Figure 1. メカブ (*Undaria pinnatifida*) 由来フコイダンのRAW264細胞によるPRR刺激誘導性のNO産生に対する効果。Pam3CSK4 (TLR1/TLR2リガンド), HKLM (TLR2リガンド), LPS (TLR4リガンド), FSL-1 (TLR2/TLR6リガンド) および RON6 (TLR7リガンド) で刺激したRAW264細胞では一酸化窒素 (NO) 産生の亢進を認め、メカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダン処理によって過剰なNO産生が効果的に抑制された。一方で、フコイダン単独もしくは中程度の刺激を与えるTLR3, 5, 9 および RIG-IリガンドでRAW264細胞を処理した場合は、フコイダンは濃度依存的にNO産生を増強した。

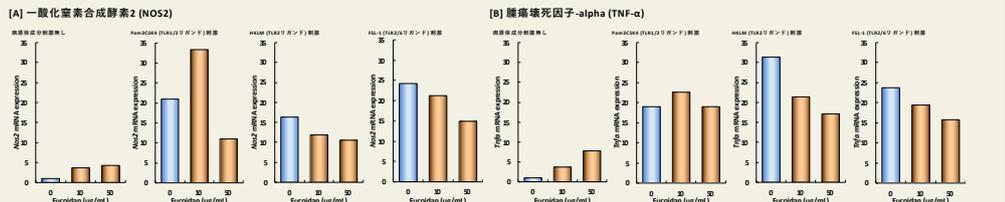


Figure 2. メカブ (*Undaria pinnatifida*) 由来フコイダンのRAW264細胞におけるPRR刺激誘導性のmRNA発現に対する効果。RAW264細胞におけるNOS2 mRNA発現は、メカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダンの単独処理によって増強されたが、TLRリガンド刺激に伴う発現上昇は、Figure 1に示すNO産生と同様にフコイダンによって抑制された。さらに、メカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダンの同様の生理作用が、PRRリガンドで刺激したまたは無刺激のRAW264細胞におけるTNF-α mRNA発現でも観察された。

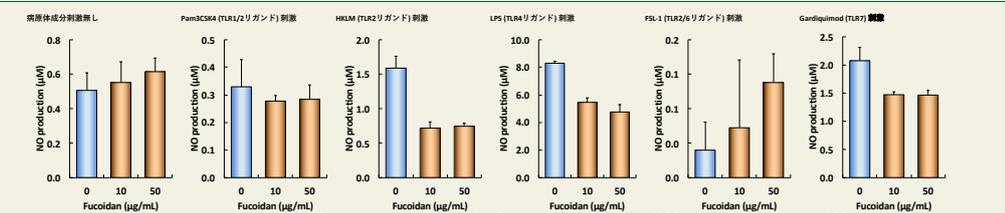


Figure 3. メカブ (*Undaria pinnatifida*) 由来フコイダンのJ774細胞によるPRR刺激誘導性のNO産生に対する効果。メカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダンは、FSL-1 (TLR2/TLR6リガンド) を除き、Pam3CSK4 (TLR1/TLR2リガンド), HKLM (TLR2リガンド), LPS (TLR4リガンド) および gardiquimod (TLR7リガンド) 処理によって増強されたJ774細胞によるNO産生をRAW264細胞の場合と同様、濃度依存的に抑制した。

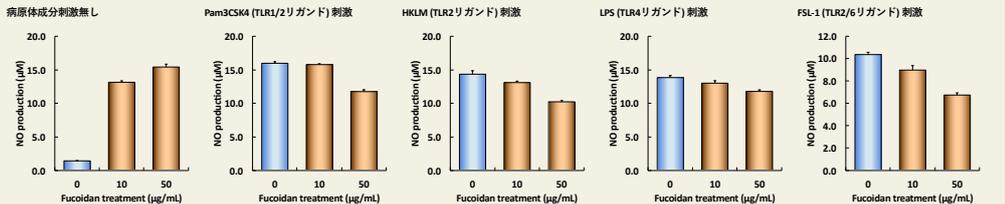


Figure 4. オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 由来フコイダンのRAW264細胞によるPRR刺激誘導性NO産生に対する効果。オキナワモズク (*C. okamuranus*) 由来フコイダンは、メカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダンよりも強くRAW264細胞のNO産生を亢進させ、一方で、Pam3CSK4 (TLR1/TLR2リガンド), HKLM (TLR2リガンド), LPS (TLR4リガンド), FSL-1 (TLR2/TLR6リガンド) 刺激によるNO産生増強はメカブ (*U. pinnatifida*) 由来フコイダンと比較して強度は弱いものの、濃度依存的に抑制した。

表 1 病原体に特有の分子構造 (PAMPs: 病原体関連分子パターン) を含むリガンドとそれに対応する異物認識受容体 (PRR)

PAMPリガンド	異物認識受容体	作用濃度	特徴
Pam3CSK4	TLR1/2	250 ng/ml	Pam3CSK4/SerLys4. 細菌リポタンパク質のアリル化N-末端領域に類似する合成/リポペプチドを持つリポペプチド
HKLM	TLR2	2.5x10 ⁷ cells/ml	菌性熱性グラム陰性細菌内生細菌 <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) の死菌体凍結乾燥物
Poly(I:C)/HMW	TLR3	100 μg/ml	ウイルス複製に関連する分子/タンパク質であるポリ(I)/ポリ(C)リボヌクレオチド
LPS	TLR4	10 μg/ml	大腸菌由来のリポ多糖 (LPS), グラム陰性細菌の主要な構成成分
Flagellin	TLR5	250 ng/ml	サルモネラ菌由来の48kDa/菌体からなるタンパク質。細菌鞭毛の主要構成成分
FSL-1	TLR2/6	250 ng/ml	Pam2CGDPKPKSF, 44-42aaのリポタンパク質 (LP40) のN末端領域を模倣する合成リポタンパク質
RON6/LyoVeo	TLR7	5 μg/ml	ssRNAの免疫活性化に寄与するオリゴA/G/C/U配列を含む一本鎖RNAオリゴヌクレオチド
Gardiquimod	TLR7	1 μg/ml	1 μg/ml以下で効果を発揮するイミダゾキノリン化合物
ODN1828	TLR9	2 μg/ml	非メチル化CpG二ヌクレオチド特定配列 (CpGモチーフ) を含む合成二重鎖DNAオリゴヌクレオチド (ODN)
Poly(I:C)/LyoVeo	RIG-I/MDA-5	10 μg/ml	Poly(I:C) と同性質を主成分とする遺伝子導入剤LyoVeoの混合組成品

TLR: toll-like receptor (Toll様受容体), RIG-I/MDA-5: retinoic acid-inducible protein 1/melanoma differentiation-associated gene 5 (レチノイン酸誘導性タンパク質1/メラノマ分化関連遺伝子)

Reference

1 Miyazaki Y et al. オキナワモズク由来フコイダンおよびサッカロミセス酵母由来β-グルカンによる協調的なマクロファージ活性化の誘導
Biochemical and Biophysical Research Communications 516, 245-250 (2019)

Acknowledgements

本研究は、日本学術振興会による科学研究費助成事業の支援を受けて実施されました (JSPS KAKENHI Grant Number 21K05423 to Y.M.).

Contact Information

Yoshiyuki Miyazaki, Ph.D.
e-mail: miyazaki@agr.kyushu-u.ac.jp Lab HP: <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/bapsa/>

COI Disclosure Information

Yoshiyuki Miyazaki, Toshiya Satoyama
以下の金銭的関係を開示します: 株式会社ヴェントゥーノからの寄附講座 "食品免疫分析学講座" 開設のための研究資金