29P01-177

シイタケ菌糸体培養培地抽出物（LEM）が腸管免疫系に及ぼす影響

○森　稜太[1]，坂本　大輔[1]，佐藤　朝光[1]，入江　圭一[1]，
飯塚　博[2]，久保田　真[2]，中島　幸彦[1]，鹿志毛　信広[1]

（[1]福岡大薬，[2]野田食菌工業）

日本薬学会第141年会
利益相反の開示

発表者名：森　稜太

私は今回の演題に関連して、
開示すべき利益相反はありません。

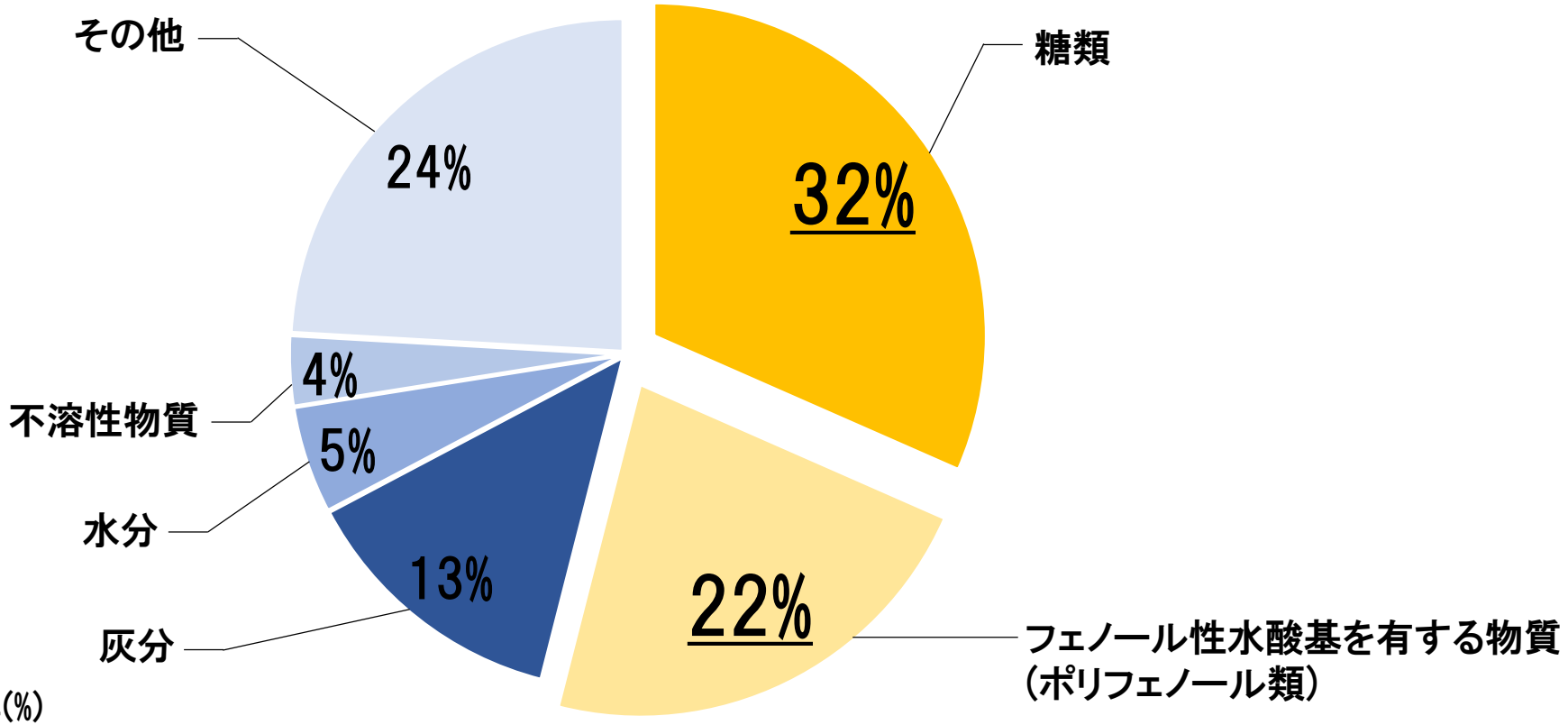
Introduction

LEM (The extract from the Cultured Solid Medium of *Lentinula Edodes* Mycelia) とは …

シイタケ菌糸体培養培地抽出物のことで、シイタケの菌糸体を固体培地(主成分:バガスと脱脂米糠)で長期間培養し、温水にてエキスを抽出し、エキスを粉末化したもの。

※ バガス: サトウキビから砂糖成分を圧搾したあとに得られる残渣

LEMの成分 (野田食菌工業)

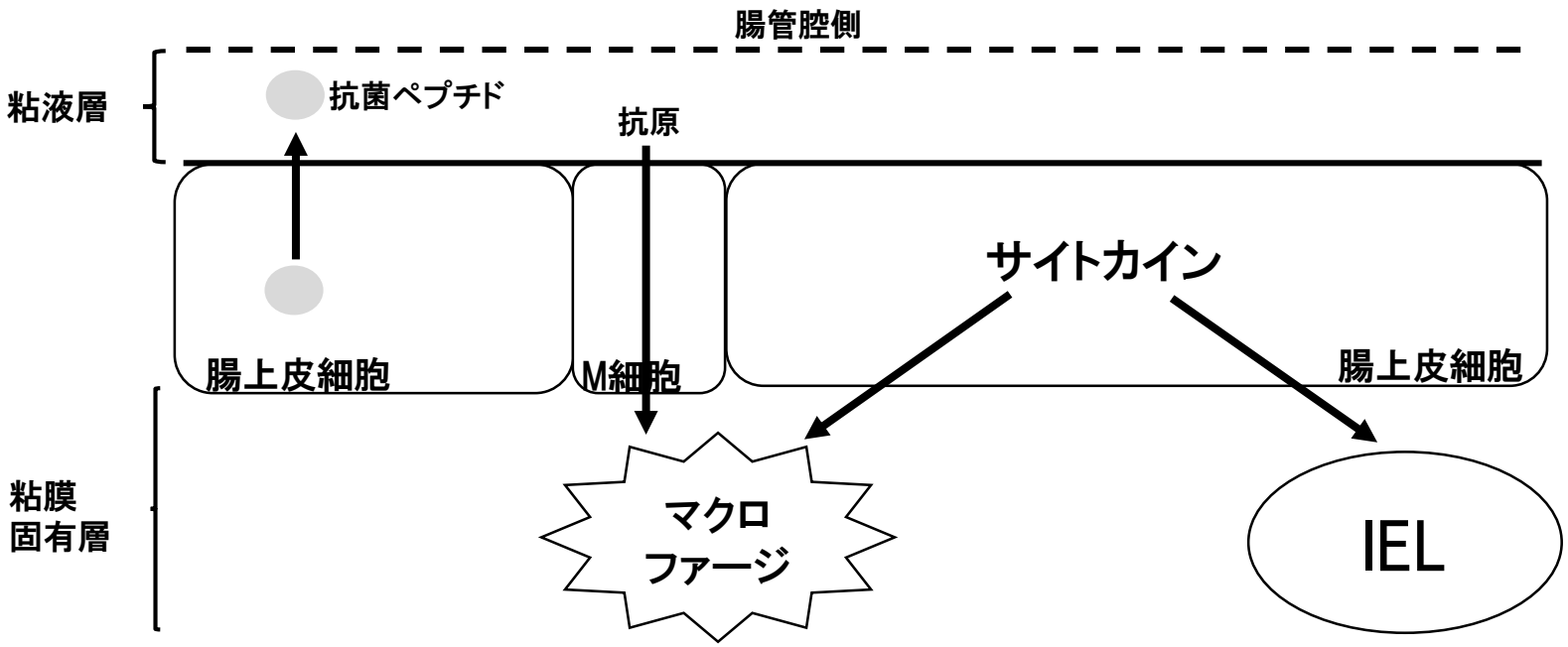


LEMの免疫賦活化作用

効果	方法	対象	引用
Ⅰ型IFN応答	経鼻、経口	インフルエンザウイルスA型を感染させたマウス	**Kuroki T, et al.** *Front Microbiol* 2018;9:1164.
IFN-γ産生	経口	癌ホルモン療法患者	**Suzuki N, et al.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(6):3469-3472.
NK細胞活性化	経口	癌化学療法患者	**Nagashima Y, et al.** *Onco Targets Ther* 2013;6:853-859.
NK細胞活性化	LEMに含まれるリグニンを曝露	マウスの脾臓細胞	**Yamamoto Y, et al.** *Biosci BiotechnolBiochem* 1997;61(11):1909-1912.

腸管免疫における腸管上皮の重要性

抗原(細菌やウイルス)に対する生体防御の最前線



腸上皮細胞

- 抗菌ペプチドを産生。
- 腸上皮細胞由来のサイトカインは、マクロファージを活性化。IEL(腸上皮間リンパ球)の増殖を促す。

M細胞

- 抗原を取り込みマクロファージなどに提示

LEMが腸上皮細胞に及ぼす影響について報告がない

Introduction

- Caco-2細胞にLEMを曝露させて遺伝子の発現変動をMicroarray法を用いて調べた。

- 上記の結果から免疫関連遺伝子を抽出し、詳細に調べた。

- 免疫関連遺伝子の発現量の比較をリアルタイムPCR法を用いて行った。

Materials and Methods

LEM

野田食菌工業（株）製造品を使用した。
実験に使用する際は、LEM粉末を滅菌水で溶解した。

Caco-2細胞培養

10% FBS(BioWest)と1% ペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco)を添加したMEMで培養した。5% CO_2、37℃環境下でインキュベートした。2～3日ごとに培地交換を行い、細胞が80～90% コンフルエントになったとき、継代を行った。

LEM曝露によるCaco-2細胞の生存率測定

① Caco-2細胞を24well plate(2×10^5 cells/well/500μl)に分注し、18h培養。
② LEM(0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 mg/ml)を24h曝露。

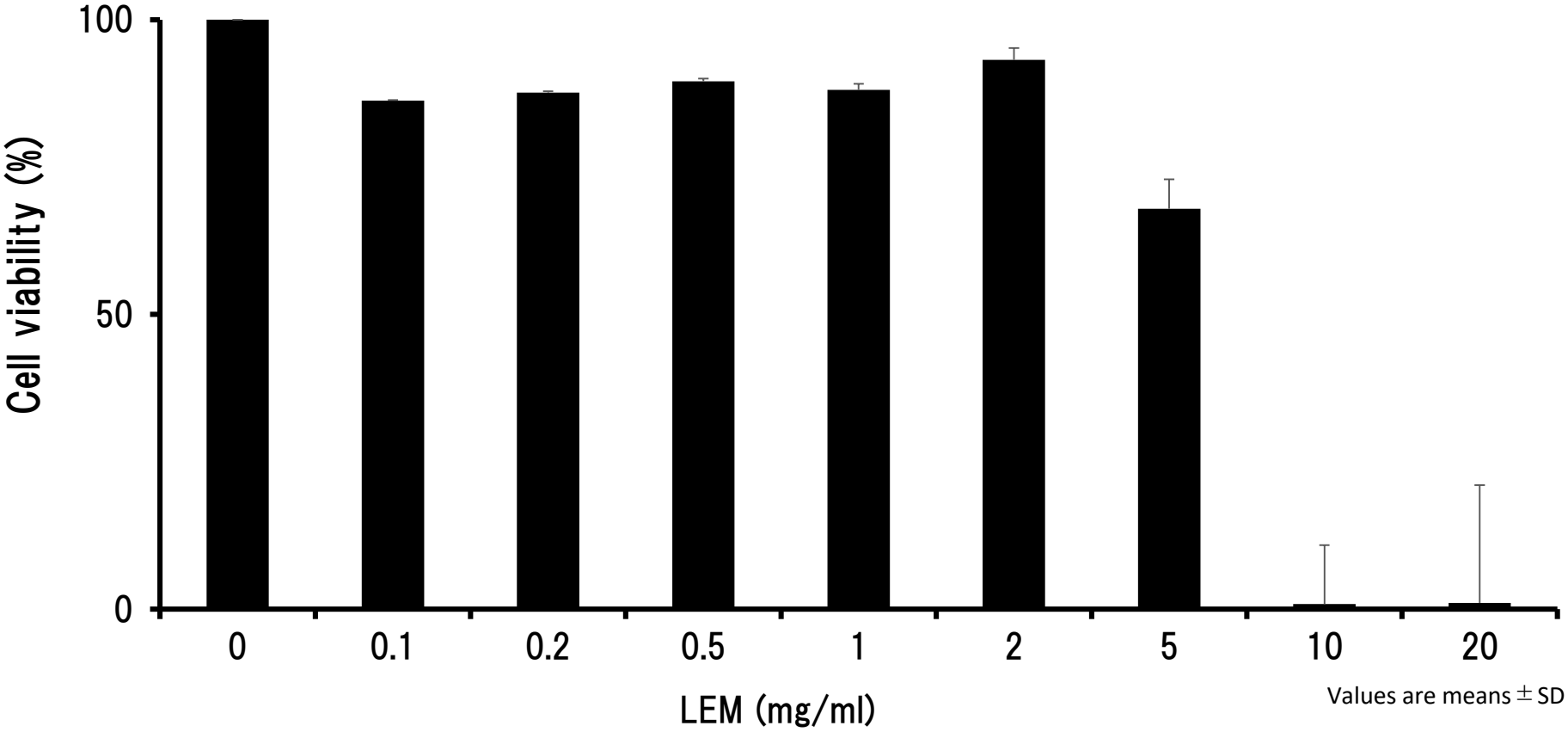
③ 培養上清を除去し、1% FBSを添加したMEMで10倍に希釈したPremix WST-1(TaKaRa Bio)を500μl/well添加し、2時間培養。

④ OD450nmとOD630nmをマイクロプレートリーダー(TECAN)を用いて測定。

$$\text{生存率}(\%) = \frac{\mathrm{OD450nm-OD630nm(Sample)}}{\mathrm{OD450nm-OD630nm(Control)}} \times 100$$

Results

LEMがCaco-2細胞の生存に与える影響



- 5mg/ml LEMで生存率の低下がみられた。
- 今後の実験は、2mg/ml LEM以下の濃度で行った。

Materials and Methods

Caco-2細胞の遺伝子発現変動解析

① Caco-2細胞を24well plate(2×10^5cells/well)に分注し、18h培養。
② LEM(2mg/ml)を24h曝露。

③ ISOGEN(NIPPON GENE)を用いて、Total RNAを抽出。

④ Low-Input QuickAmplabeling Kit(Agilent)を用いて、cRNA合成とラベリング。

⑤ Sure print G3 Human GE Microarray Kit(Agilent、遺伝子数 51680個)を用いて、マイクロアレイ。

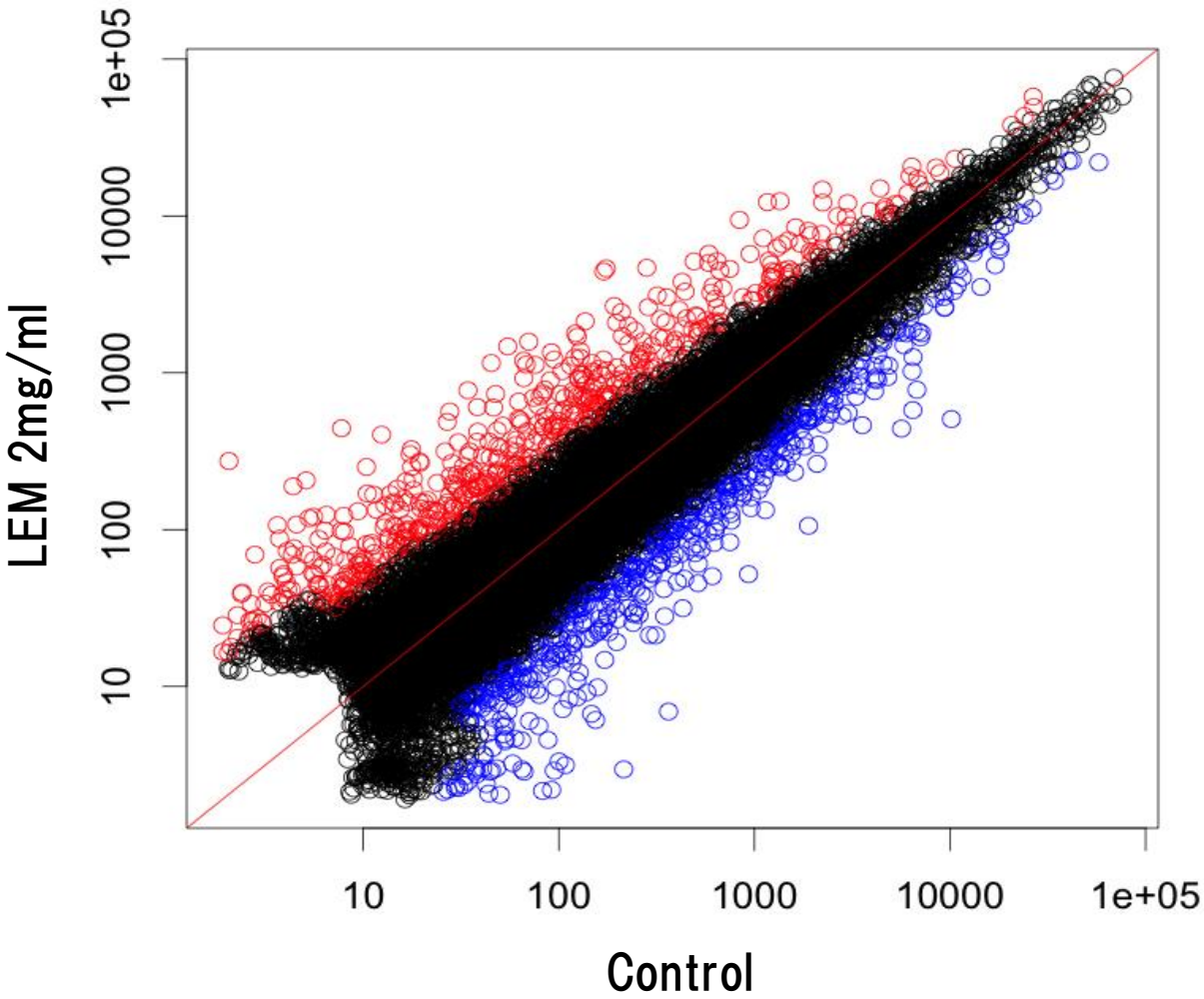
⑥ Feature Extraction ソフトウェア(Agilent)用いて、データの数値化(シグナル値)。

⑦ Rを用いて、quantile法で正規化。

⑧ 遺伝子発現変動の判定は、ZscoreとRatioを用いた。
増加(Zscore >= 2.0 かつ Ratio >= 1.5)
減少(Zscore <= -2.0 かつ Ratio >= 0.66)

Results

LEM曝露によるCaco-2細胞の遺伝子発現変動



・551個の遺伝子発現増加、528個の遺伝子発現の減少がみられ

免疫関連遺伝子の抽出

Gene ontology databaseを用いて51680個の遺伝子の中から
タームに Immuneを含む遺伝子を抽出

Results　免疫関連遺伝子の発現変動(遺伝子数:1482個)

Gene name	Zscore	Ratio
Defensin beta 1	-2.04	0.33
Fibrinogen beta chain	-4.19	0.05
Homo sapiens galectin 3	-2.00	0.47
Ribosomal protein L39	-2.34	0.42
CD86 molecule	-6.28	0.04
Collagen type I alpha 1 chain	-2.00	0.24
Apolipoprotein A1	-2.16	0.35
CD24 molecule	-2.20	0.30
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	-3.80	0.06
Hemopexin	-2.93	0.15
Orosomucoid 1	-3.14	0.18
Orosomucoid 2	-2.74	0.26
CD24 molecule	-2.20	0.30
Ribosomal protein S6	-2.12	0.56
Adenylate cyclase 7	-2.51	0.20
LGALS3	-2.00	0.47
Collagen type IV alpha 3 binding protein	-2.51	0.25
Optineurin	-2.66	0.18
TRAF3 interacting protein 2	-2.14	0.26

・19個の遺伝子発現減少がみられた。

Results

Gene name	Zscore	Ratio
A-kinase anchoring protein 8	2.25	5.11
AXL receptor tyrosine kinase	2.47	5.98
Annexin A1	3.92	11.8
Aadenosine deaminase, RNA specific	4.43	14.6
Capping protein of muscle Z-line subunit alpha 1	2.30	4.25
E74 like ETS transcription factor 4	3.85	10.3
NLR family apoptosis inhibitory protein	2.19	3.98
RNA polymerase III subunit G	3.73	14.7
High mobility group box 3	3.90	10.6
Histone cluster 1 H2B family member f	3.74	14.8
Transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member	3.14	7.20
Poliovirus receptor	3.40	7.88
Chitinase 1	3.11	9.43
poliovirus receptor	3.40	7.88
Interleukin 18	2.43	4.37
Ribosomal protein S19	2.20	1.84
Interleukin 2 receptor subunit gamma	2.60	4.85
PPRELI domain containing 1	2.43	3.18
Trascription factor 12	2.69	5.45
UL16 binding protein 1	2.07	4.50

・20個の遺伝子発現増加がみられた。

Materials and Methods

IL-18遺伝子発現量の比較

① Caco-2細胞を24well plate(2×10^5cells/well)に分注し、18h培養。
② LEM(0.5、1、2 mg/ml)を24h、48h、72h曝露。

③ ISOGEN(NIPPON GENE)を用いて、Total RNA抽出。

④ ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(TOYOBO)を用いて、逆転写。

⑤ THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いて、リアルタイムPCR。

⑥ 遺伝子発現量の算出方法は、△△Ct法を用いて行い、コントロールは、GAPDHを使用。

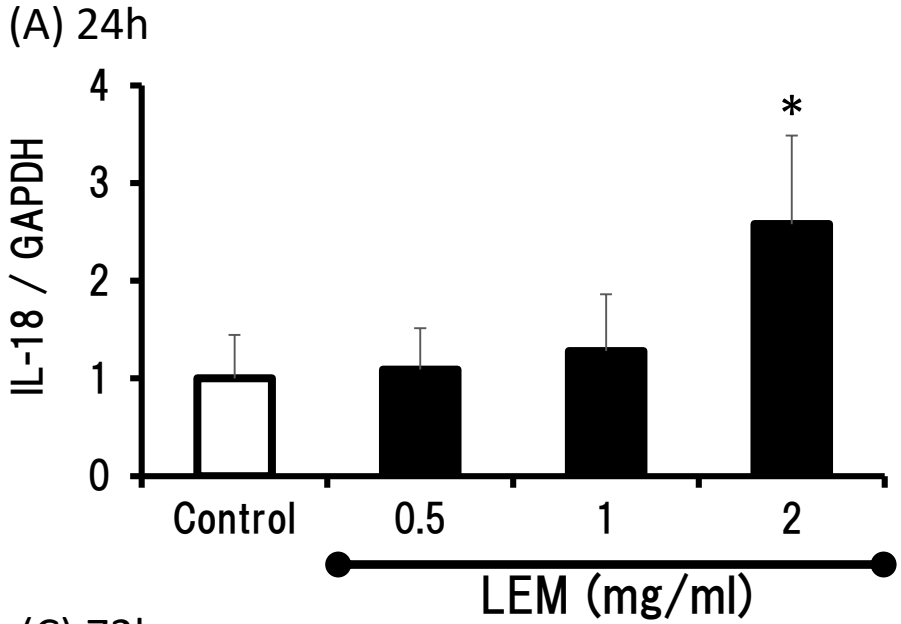
リアルタイムPCRで使用したプライマー

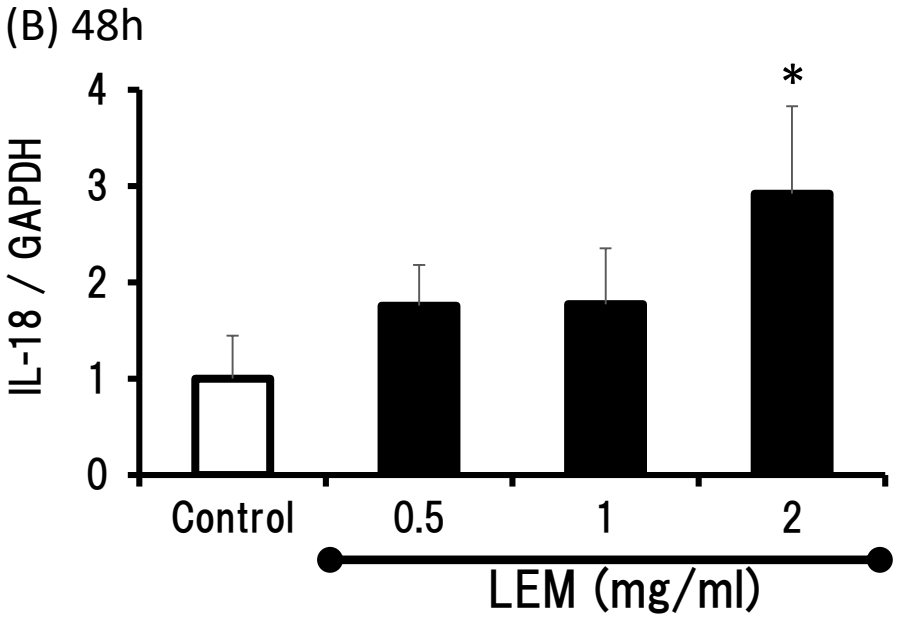
遺伝子	Sense (5´→ 3´)	Anti-sense (5´→ 3´)	引用
IL-18 (Target)	ATCGCTTCCTCTCGCAACAA	CTTCTACTGGTTCAGCAGCCATCT	Mao, X, et al. Cytokine (2020) 126, 154882.
GAPDH (Control)	ATTCCACCCATGGCAAATTC	GATGGGATTTCCATTGATGACA	Mao, X, et al. Cytokine (2020) 126, 154882.

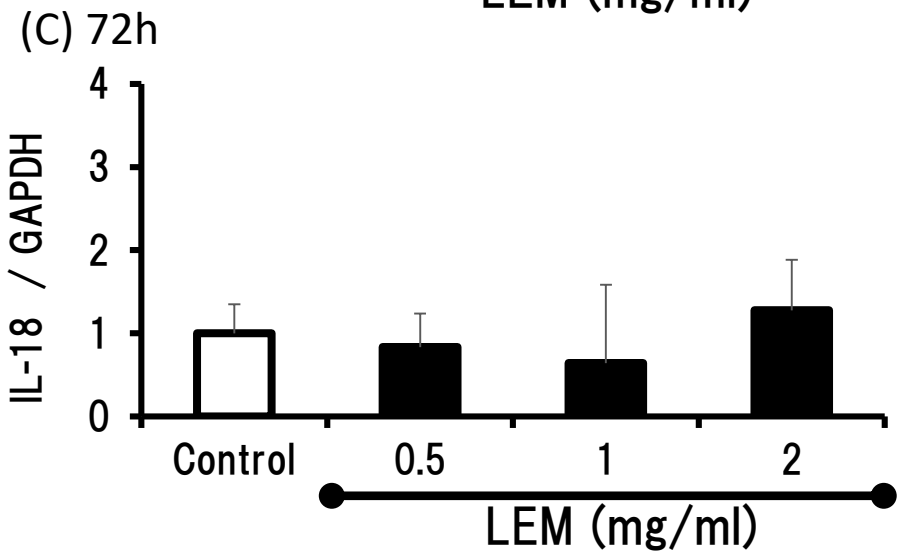
Results

LEMを曝露したCaco-2細胞におけるIL-18遺伝子発現誘導

Values are means ± SD (*P < 0.05)





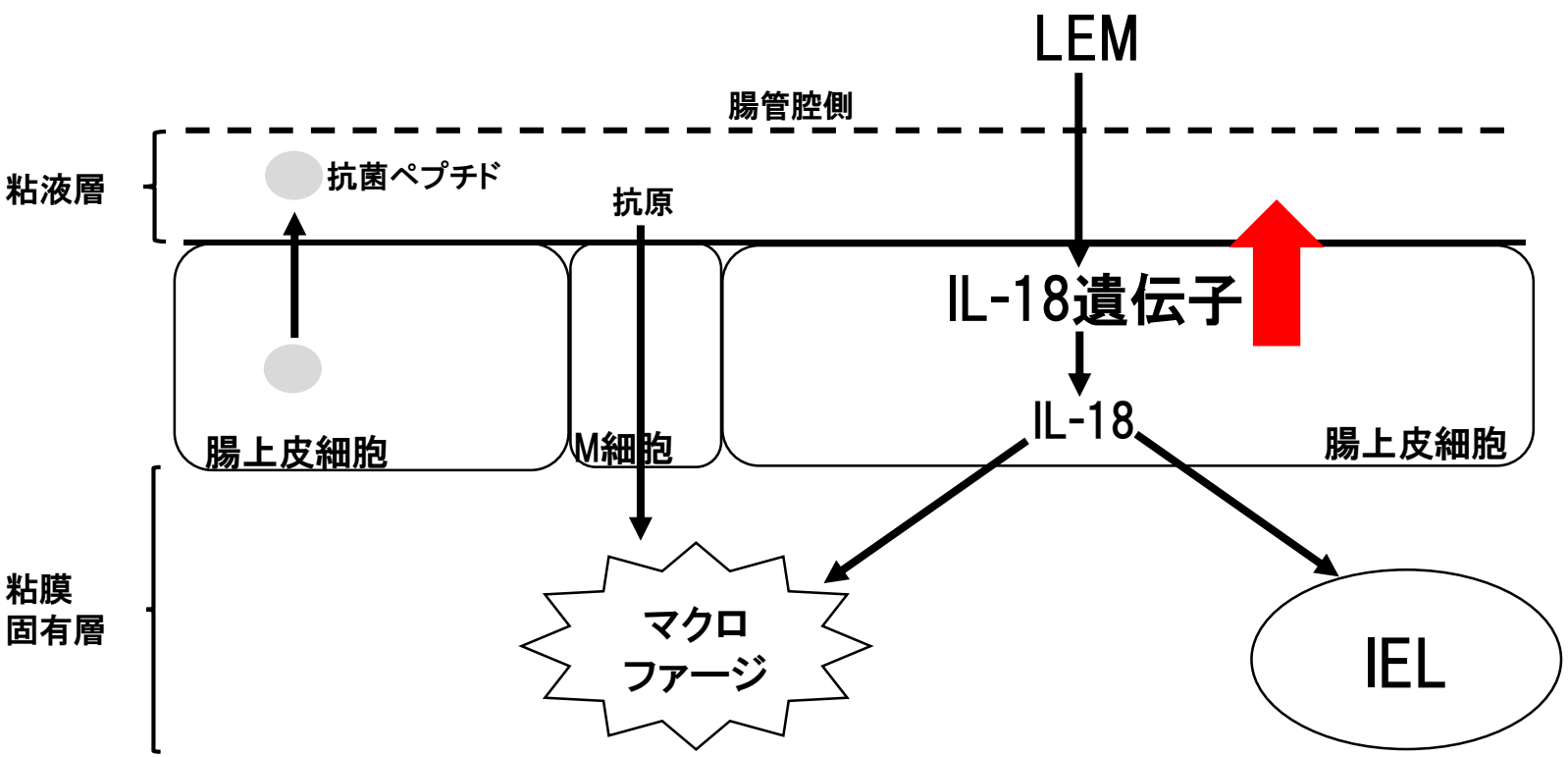


- 2mg/ml LEMの曝露によりControlと比較して2.58倍(24h)、2.92倍(48h)と有意に増加がみられた。
- 72hのLEM曝露では、どの濃度もIL-18遺伝子の発現増加がみられなかった。

Conclusion

- 2mg/ml LEMの曝露までは、Caco-2細胞の生存に影響を与えなかった。
- 2mg/ml LEMの曝露によって51680個(プローブ数)のうち、551個の遺伝子発現増加と528個の遺伝子発現減少が確認された。
- 51680個のうち1482個の免疫関連遺伝子を抽出した。
- 1482個の免疫関連遺伝子の中で20個の遺伝子発現増加と19個の遺伝子発現減少が確認された。
- 免疫関連遺伝子の中で発現増加がみられたものにIL-18遺伝子が含まれていた。
- IL-18遺伝子の発現量を比較した結果、2mg/ml LEM曝露24h、48h後に有意にIL-18遺伝子発現増加が確認された。

Discussion



・LEMは、サイトカインの一種であるIL-18遺伝子の発現を増加させ、IEL増殖、
　マクロファージ活性化に関与する可能性がある。