



Novel anti-inflammatory property of polysaccharides from *Lentinula edodes* on colitis through necroptosis inhibition

ALAGBAOSO CHIDUBE ANTHONY

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Date of Publication)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8081号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008081>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



別紙様式 3 (博士論文審査等内規第 2 条関係)

博士論文内容の要旨

氏名 ALAGBAOSO CHIDUBE ANTHONY専攻・講座 APPLIED CHEMISTRY IN BIOSCIENCE, AGROBIOSCIENCE

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Novel anti-inflammatory property of polysaccharides from *Lentinula edodes* oncolitis through necroptosis inhibitionシイタケ由来多糖類によるネクロトーシスを介した新規腸炎抑制効果指導教員 MASASHI MIZUNO**Chapter 2: Inhibitory Effect of Polysaccharides from *Lentinula edodes* (shiitake) against Ulcerative Colitis**

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammation of the gastrointestinal tract, with an increasing global incidence and prevalence. It is subdivided into Crohn's disease and ulcerative colitis, and it affects people of all age groups, and negatively impacts on every aspect of lives of the victims. There is currently no cure for the disease, and the pathogenesis is not completely understood. Edible mushrooms have long served as a source of food and medicinal compounds in many parts of the world. Many of the beneficial health effects derived from mushrooms are triggered by their polysaccharide contents. In this chapter polysaccharide extracted from *Lentinula edodes* was orally administered to ulcerative colitis mice to investigate whether the polysaccharide sample inhibited ulcerative colitis. It was observed that the polysaccharide sample exhibited inhibitory activity against ulcerative colitis. The anti-inflammatory activity was demonstrated to be dependent on the carbohydrate-rich fraction.

Chapter 3: Differential Activity of Polysaccharides from Strains of *Lentinula edodes* against Ulcerative Colitis

The physiological properties of polysaccharides are dependent on the primary structure, solubility, degree of branching, molecular weight, charge of polymer, and structure in aqueous media. In this chapter, the anti-inflammatory activity of crude polysaccharides extracted from two strains of *Lentinula edodes* were investigated. It was observed that they differentially affected ulcerative colitis in mice. Also, column chromatographic separation of the crude polysaccharide indicated different peaks on the elution profiles. This suggested that the anti-inflammatory activities of the crude polysaccharide extracts may be strain-dependent.

Chapter 4: Anti-necroptosis Activity of Polysaccharides from *Lentinula edodes*

Necroptosis is a caspase-independent form of pro-inflammatory programmed cell death. It plays active role in the etiology, pathogenesis, and progression of ulcerative colitis. Inhibition of necroptosis also inhibited ulcerative colitis, which is an indication that necroptosis resulted in colitis. In this chapter, it was demonstrated that the polysaccharide sample from *Lentinula edodes* inhibited necroptosis in both *in vitro* and

(氏 名 : Alagbaoso Chidube Anthony NO. 2)

in vivo models, suggesting that its anti-necroptosis activity may partly be responsible for its activity against ulcerative colitis.

Chapter 5: Effect of *Lentinula edodes* Polysaccharides on the Expression of Inflammatory Cytokines in Ulcerative Colitis

Necroptosis signaling stimulates the expression of inflammatory cytokines which together with DAMPs (damage associated molecular patterns) are released into the extracellular environment upon cell membrane rupture, and which results in the promotion and worsening of inflammatory conditions. In this chapter, it was observed that the expression of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , and CCL-2) was up-regulated in the colon of ulcerative colitis mice and in Caco-2 cells (IL-8) undergoing necroptosis, which may have resulted from the activation of necroptotic signaling pathways in the colon and Caco-2 cells. However, the polysaccharide extracts down-regulated the expression of inflammatory cytokines, which suggested that the down-regulation of inflammatory cytokines may have directly resulted from the inhibition of necroptosis by the polysaccharide sample. It was also demonstrated that the anti-necroptosis activity of the polysaccharide sample and its inhibitory effects on the expression of inflammatory cytokines were independent of the expression of TNFR1 on the cell surface, thereby suggesting a direct effect on necroptosis mediators.

氏名	ALAGBAOSO CHIDUBE ANTHONY		
論文 題目	Novel anti-inflammatory property of polysaccharides from <i>Lentinula edodes</i> on colitis through necroptosis inhibition (シイタケ由来多糖類によるネクロトーシスを介した新規腸炎抑制効果)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	水野 雅史
	副 査	教授	竹中 慎治
	副 査	教授	湊 健一郎
	副 査	准教授	久世 雅樹
	副 査		
印			
要 旨			
<p>概要</p> <p>担子菌の一種であるシイタケ (<i>Lentinula edodes</i>) に含まれる多糖類が有する生理活性については様々な報告がなされており、代表的なものとしては抗腫瘍性、抗炎症性、抗菌性、抗アレルギーなどがある。その一方で、これらの生理活性の発現機構については、抗腫瘍性に関しては宿主介在性の免疫賦活化能による異物認識機構の活性化によることが明らかにされている以外は、未だ不明な点が多い。本学位論文草稿では、炎症性腸疾患モデルマウスにおけるシイタケ由来多糖による疾病抑制、さらに培養細胞を用いたネクロトーシス抑制、および品種の違いと生理活性との関係について検討している。</p> <p>本学位論文草稿は、以下の通り序章と5章から構成されている。</p> <p>序章 (第1章) では、腸管上皮細胞の役割と炎症下での影響、本研究の課題でもある炎症性腸疾患の発症原因、アポトーシスとネクロトーシスの相違、供試材料であるシイタケの生理機能および各章毎の概要が述べられている。</p> <p>第2章では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によって誘導された潰瘍性大腸炎モデルマウスにシイタケ由来の粗多糖類 (LeP1) を経口投与し、その抗炎症作用を調べた。その結果、マウスの潰瘍性大腸炎発症を抑制した。さらに、粗多糖類に対してトリクロロ酢酸を用いて脱タンパク化した画分を調整し同様に経口投与した場合でも抗炎症活性が維持されたことから、多糖類の有効成分が炭水化物を多く含む画分であることが示唆された。これらのデータは、シイタケ中に含まれる多糖類として良く研究がなされているレンチナンが、TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-1β などのプロ炎症性サイトカインの発現を阻害することで、マウスの潰瘍性大腸炎を抑制することを示した Nishitani らの報告と一致していた。さらに、本多糖類の腸炎抑制効果は濃度依存的であり 200 μg/マウス/日で最も活性を示した。以上のことから、シイタケ由来多糖類画分が潰瘍性大腸炎を用量依存的に抑制できることを示しており、潰瘍性大腸炎患者に対してシイタケの食事摂取は、潰瘍性大腸炎の制御に有用である可能性を示唆した。この章の内容は、<i>International Journal of Medicinal Mushroom</i> に掲載予定である。</p> <p>第3章では、シイタケの品種の違いと腸炎抑制効果の関連性を検討している。多糖類の生理的性質は、一次構造、溶解度、分岐度、分子量、ポリマーの電荷、水性媒体中での構造に依存していることが報じられている。また、Enman らは、シイタケの菌株によって異なる生理活性化合物を保有していることが示されている。本研究で用いた2種類のシイタケの外観を物理的に観察したところ、形態学的特徴が異なり、熱水抽出による多糖類の収量も異なっていた。また、熱水抽出物中に含まれる多糖含量も同様に異なっていた。そこで生理活性への影響を調べるため、第2章と同様潰瘍性大腸炎に対</p>			

氏名	ALAGBAOSO CHIDUBE ANTHONY
<p>する作用を調べるために、大腸炎マウスに2種類の品種から調整した多糖類画分である LeAP と LeBP を経口投与して検討した。その結果、LeAP は潰瘍性大腸炎を予防したが、LeBP は潰瘍性大腸炎に対して抑制効果を示さなかったことから、シイタケ由来多糖による腸炎抑制効果は品種に依存することを明らかにした。さらに、構造的相違に関して情報を得るため粗多糖類を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して分析を行った。その結果、LeAP が2つのピークを示すのに対し、LeBP は3つのピークを示すなど、溶出プロファイルが異なっていることが判明した。このことは、両菌株の多糖類の構造的特徴に違いがあることを示唆しているが、これを明らかにするためにはさらなる構造研究することで、生理活性と構造との相関が解明できる可能性を示唆した。</p>	
<p>第4章では、腸上皮様細胞株である Caco-2 細胞を用いて LeP1 による腸炎抑制効果の作用機序を検討した。既にシイタケ由来多糖であるレンチナンによる腸炎抑制機構については、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子-α (TNF-α) を認識する受容体 TNFR1 の腸上皮細胞内から細胞膜への輸送が抑制されるため、細胞膜上の TNFR1 発現量が減少する。そのため、結果として TNF-α に対する感知低下が起り、最終的には TNF-α による腸管バリアー破壊が抑制されることが知られていた。しかしながら、最近になってネクロプトーシスが腸内炎症の発症と進行に重要な役割を果たすことが報告された。そこで、シイタケ由来多糖類による腸炎抑制効果にネクロプトーシスが関与しているかを検討した。Caco-2 細胞をカパーゼ阻害剤 (zVAD-fmk) の存在下で TNF-α 刺激するとネクロプトーシスにより Caco-2 細胞は死滅し、TNF-α 量に対して濃度依存的に反応することがわかった。この条件下で LeP1 を前処理すると、Caco-2 細胞は TNF-α 誘導性壊死から有意に回避することが観察された。さらにこの作用機序を検討するため、先ず receptor interacting protein kinases (RIPK1) に着目した。RIPK1 は、そのキナーゼ活性を介してアポトーシスとネクロプトーシスの両方を誘導することが知られており、キナーゼ活性を阻害することでネクロプトーシスとアポトーシスの両方を効果的に阻害できることが示唆されている。その結果、興味深いことに LeP1 前処理することで、Caco-2 細胞において TNF-α 誘導性ネクロプトーシスおよび TNF-α 誘導性外因性アポトーシスの両方を抑制することが明らかとなった。このことは、多糖類が RIPK1 を抑制する効果を発揮し、その下流エフェクターである mixed lineage kinase domain-like pseudokinase (MLKL) のリン酸化レベルを低下させている可能性を始めて示唆した。以上のことから、シイタケ由来多糖類によるネクロプトーシスの阻害が、腸内炎症に対する活性の一端を担っている可能性を強く示唆した。</p>	
<p>潰瘍性大腸炎の発症・進展にはネクロプトーシスが積極的に関与しており、潰瘍性大腸炎で観察されるような炎症性サイトカインの発現亢進にはネクロプトーシス関連シグナル伝達分子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで第5章では、第2章で行った動物実験の腸管を用いて炎症性サイトカイン産生量への影響について検討した。その結果、潰瘍性大腸炎マウスの大腸内で炎症性サイトカイン (TNF-α, Interleukin (IL)-6, IL-1β, IFN-γ, CCL-2) の発現がアップレギュレーションされているのに対して、LeP1 投与した群では炎症性サイトカインの発現がダウンレギュレーションされていた。これらの結果は、ネクロプトーシス阻害剤が潰瘍性大腸炎を改善し、炎症性サイトカインの発現増加を抑制したと報告した他の研究者の報告と一致しており、シイタケ由来多糖類による腸炎抑制効果の一因は、腸管におけるネクロプトーシス抑制に起因することを提唱した。さらに、シイタケ中に含まれる多糖類であるレンチナンによる腸炎抑制が TNFR1 の膜移行抑制であることが報告されていることから、この受容体に対する影響についても検討したが、対照的に TNFR1 発現には何ら影響を示さなかった。今回用いた多糖類試料のネクロプトーシス抑制と炎症性サイトカインの発現抑制効果は、細胞表面の TNFR1 の発現とは独立した経路を介して起っている可能性を提示した。</p>	
<p>第6章では、第2章から第5章までの研究結果を総合的にまとめ、シイタケ由来多糖類による腸炎抑制機序をもとに、機能的食品素材としての有効性について考察している。</p>	
<p>本研究は、担子菌であるシイタケ中に含まれる多糖類が、難病とされている炎症性腸疾患改善に有用である食品因子であることについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であることを認める。よって、学位申請者 ALAGBAOSO CHIDUBE ANTHONY は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。</p>	