

# 抗感染因子としてのミルクオリゴ糖の動態に関する研究

研究室 乳衛生研究分野  
Lab for Milk hygiene

事業推進担当者 浦島 匡 (Tadasu Urashima), 中村 正 (Tadashi Nakamura)

## 研究要旨

病原性細菌やウイルス、原虫が宿主に侵入する際、宿主上皮細胞上の複合糖質の糖鎖をレセプターとして付着し、感染を開始することが知られている。ヒトなどのミルクオリゴ糖はレセプターと化学構造が類似しており、可溶性レセプターアナログとして病原体の宿主への付着を阻止したり、乳児腸管内でビフィズス菌の増殖を促進する働きが知られている。しかし多数のヒトミルクオリゴ糖の個々の詳細な機能については、十分な解明がされていない。その解明の一環として、泌乳開始1~3日間の乳において代表的なミルクオリゴ糖の定量分析を行い、*Campylobacter jejuni*による乳児下痢予防効果をもつ2'-FLは1日目に含量が高いこと、プレバイオティクス作用の示唆されるLNTは1日目よりも2日目、3日目で増加することを明らかにした。また、全ヒトミルクオリゴ糖画分や代表的な個々のオリゴ糖について、ヒト腸管由来細胞の病原菌認識分子 Toll 様受容体 (TLR) の発現への影響を調査し、TLR2, 4, 6 などの発現上昇への影響を明らかにした。一方、各種の病原体感染のレセプター構造調査のためのツールとして活用目的で、広範囲な動物の乳からミルクオリゴ糖ライブラリーの構築を行った。他機関においてその一部を活用し、*Laishmania major*の宿主侵入機構解明にも役立てられた。

## ヒト初乳における中性および酸性オリゴ糖の定量分析

ミルクオリゴ糖はヒト初乳中に22~24g/L、常乳中に12~13g/Lの濃度で含まれる。それは人乳中ではラクトース、脂質につぐ3番目の固形成分である。その生理的役割は、レセプターアナログとして乳児腸管上皮に病原性細菌が付着するのを阻止する、プレバイオティクスとして乳児腸管内ビフィズスフローラの形成を促進する、抗炎症作用などの免疫調整作用を有するなどが示唆されているが、個々のオリゴ糖が実際にどの程度含まれ、どのような生理的意義を有するか、明らかにされていない。本研究では、代表的な中性オリゴ糖10種類、酸性オリゴ糖9種類について、糖鎖の標識方法の検討を行い、逆相系における高速液体クロマトグラフィーの条件を検討して、泌乳開始1~3日での定量分析を行った。その結果、ミルクオリゴ糖の中でとくに優先的なのは、2'-FL, LNFP1, LNDFH1, LNTであり、*Campylobacter jejuni*による下痢防止に効果をもつ2'-FLは泌乳開始1日目にとくに含量が高いこと、ビフィズス因子の本体と仮説化されているLNTは泌乳開始日より2~3日で増加することが示された。これは乳児に対し、ミルクオリゴ糖によるレセプターアナログとしての感染防御効果は出生直後にとくに重要であり、その後そのプレバイオティクス作用によってビフィズスフローラが形成され、間接的な感染防御効果が高まることを示唆している。ま

た、*Helicobacter pylori*による感染に防御効果のある3'-SLは泌乳開始日に含有量が高く、母から子への同菌の感染をミルクオリゴ糖が予防することを示唆している。一方、それらの定量によってヒトの乳においては、タイプ1型のミルクオリゴ糖 (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAcを含む)がタイプ2型のもの (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc)よりも優先的であることが明らかになった。類人猿を含めて他種の乳ではタイプ2型のものしか含まないか、タイプ2型の方が優先的である。上の性質はヒトの進化過程で獲得されたものであり、乳児腸管内ビフィズスフローラ形成への寄与による新生児保護機構がヒトの生存に重要な役割をもった可能性を示唆している。

## ミルクオリゴ糖がヒト腸管由来細胞 HT-29 の Toll 様受容体発現に及ぼす影響

ミルクオリゴ糖にはレセプターアナログとしての感染予防効果、ビフィズス菌の定着、増殖を促進する効果、ならびに乳酸菌などのプロバイオティクスと組み合わせることによる免疫調整効果のあることが知られている。感染防御の機構としては、病原菌が付着するレセプター糖鎖とミルクオリゴ糖の構造類似性による付着拮抗阻害が示唆されているが、一方においてミルクオリゴ糖による病原菌認識分子 Toll 様受容体 (TLR) への刺激も予想される。ミルクオリゴ糖による腸管内有用菌定着ならびに病原菌排除のメカニズムの解明と、産業的に使用可能なオリゴ糖のプロバイオティクスおよびシンバイオティクスとしての利用目的のために、全ヒトミルクオリゴ糖画分 (HMO)、ウシ初乳酸性オリゴ糖画分 (aBMO)、市販のガラクトオリゴ糖 (GL) および人乳中に代表的なオリゴ糖 (2'-FL, 3-FL, LNT, LNFP1, 3'-SL, 6'-SL, LST c) および粗精製したガラクトオリゴ糖 (4'-GL, 6'-GL) を用いて、ヒト腸管由来 HT-29細胞における TLR 発現への影響を検討した。プレートに培養した HT-29細胞にそれぞれの画分を2段階の濃度で投与して、さらに24時間培養し、細胞を回収してから TLR2, TLR4, TLR6 および MD2mRNA 発現量を逆転写 Real-Time PCR を用いて比較検討した。HMO の投与区では、濃度によって TLR2mRNA また TLR4mRNA 発現量が有意に上昇した。GL 投与区では、低い方の濃度で TLR2mRNA 発現量が有意に上昇した。その結果、ヒトミルクオリゴ糖や市販ガラクトオリゴ糖が病原菌認識分子 Toll 様受容体を刺激することが示唆された。精製したオリゴ糖を用いた分析では、6'-SL, 6'-GL 投与が TLR2発現量を有意に上昇し、TLR4発現に対しては LNFP1, また6'-GL 投与が有意に上昇した他、3'-SL, また6'-SL 投与でも増加の傾向が見られた。TLR6発現に対しては、6'-GL 投与が有意に上昇した。この結果から、これらの受容体の発現に対し、ガラクトースの6位に置換を受けた糖が効果を有することが示唆された。一方、MD2mRNA 発現に対しては、いずれのオリゴ糖投与区も効果をもたなかった。これら



の結果、ミルクオリゴ糖による有用菌の定着また病原菌の排除機構として、ミルクオリゴ糖自身による腸管細胞の刺激の関与がはじめて提案された。

## 糖鎖を介した相互作用解析用ツールとしてのミルクオリゴ糖ライブラリーの構築

病原性細菌やウイルス、原虫の宿主上皮細胞への感染は、宿主細胞表面における糖タンパク質や糖脂質の糖鎖と病原体のレクチンとの相互作用や、反対に宿主側のレクチンと病原体表面の糖鎖との相互作用を介して開始する。一方、炎症反応にも糖鎖を介したクロストークの関与が示されている。すなわち、炎症をもたらす内皮細胞と血小板や白血球との接着には、P、E-セレクトインとシアリルルイスxなどの糖鎖との相互作用が関与している。そのような各種の病原体や病原体の生産する毒素のレセプター糖鎖を解析し、将来的に糖鎖を感染予防、治療剤として利用するためには、多様な構造をもった糖鎖をライブラリーとして揃えることが必要である。ライブラリー

用の糖鎖としては糖タンパク質や糖脂質から切り出した糖鎖の他、複合糖質の糖鎖と類似した多様な化学構造をもち、グラム単位での回収が見込まれるミルクオリゴ糖もその重要な対象である。浦島はこれまでに、ヒト、ウシなどの家畜、各種の野生動物の乳から、ABH抗原、 $\alpha$ -Gal エピトープ、Lewis a, b, x, y などの多様な構造をもったミルクオリゴ糖を分離、精製、構造解析し、ミルクオリゴ糖ライブラリーの構築に努めている。また上のような糖鎖を介した相互作用を研究対象としている研究機関に供与し、病原体の感染機構の解明にも役立っている。一例としては、病原性原虫 *Leishmania major* が宿主に感染する際に、その表面糖鎖と宿主側のガレクチンとの相互作用の関与が示唆されてきたが、その関与には病原体側のポリガラクトンと宿主側のガレクチン-3および9との親和性が係ることが、供与したワラビー由来のミルクオリゴ糖を使用したモデル実験などによって、国内外の他研究機関によって調べられた。このように糖鎖を介した相互作用の解析用ツールとしてミルクオリゴ糖ライブラリー構築は、今後も求められている。

## 発表論文

著者名	論文タイトル	掲載雑誌	巻	ページ	発行年
T. Urashima, S. Asakuma, M. Messer	Milk Oligosaccharides	Comprehensive Glycoscience (ed. J. P. Kamerling), Elsevier		印刷中	
T. Urashima, M. Kitaoka, S. Asakuma, M. Messer	Milk Oligosaccharides	Advanced Dairy Chemistry, The 3rd ed. (eds. P. McSweeney and P. Fox), Springer		印刷中	
S. Asakuma, T. Urashima, M. Akahori, H. Obayashi, T. Nakamura, K. Kimura, Y. Watanabe, I. Arai, Y. Sanai	Variation of neutral oligosaccharides levels in human colostrum	Eur. J. Clin. Nutr.		印刷中	
Y. Uemura, S. Asakuma, T. Nakamura, I. Arai, T. Urashima	Occurrence of a unique sialyl tetrasaccharide in colostrum of a bottlenose dolphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Biochim. Biophys. Acta	1725	290-297	2005
T. Nakamura, H. Kawase, K. Kimura, Y. Watanabe, M. Ohtani, I. Arai, T. Urashima	Changes in bovine colostrum of milk sialylglycoconjugates during early lactation	J. Dairy. Sci.	86	1315-1320	2003

## 泌乳初期におけるヒトミルクオリゴ糖含量とその意義

乳等省令により家畜初乳は廃棄される → 有効利用できないか？  
 家畜初乳中に様々なオリゴ糖を発見！  
 Journal of Dairy Science 86: 1315-1320 (2003)

ヒトミルク中のオリゴ糖は測定方法も確立されていない

→測定法開発と各種ヒトミルクオリゴ糖濃度測定を行った(下表)

	Day of lactation (n=12, Means $\pm$ SD, g/L)			P Value
	Day 1	Day 2	Day 3	
2'-FL	2.49 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	1.58 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	< 0.0001
3'-FL	0.26 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.26	0.20 $\pm$ 0.13	N.S.
LDFT	0.42 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	0.0054
LNT	0.89 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	1.44 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	1.45 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	0.0014
LNTI	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.0229
LNTPI I	1.47 $\pm$ 1.01	2.08 $\pm$ 1.67	1.67 $\pm$ 1.03	N.S.
LNTPI II	0.38 $\pm$ 0.24	0.45 $\pm$ 0.26	0.42 $\pm$ 0.33	N.S.
LNTFII I	1.27 $\pm$ 0.54	1.87 $\pm$ 1.55	1.41 $\pm$ 0.66	N.S.
LNTFII II	0.017 $\pm$ 0.018	0.020 $\pm$ 0.025	0.019 $\pm$ 0.028	N.S.

	Day of lactation (n=20, Means $\pm$ SD, g/L)			P Value
	Day 1	Day 2	Day 3	
3'-SL	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	< 0.0001
6'-SL	0.34 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.0071
LSTa	0.11 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	< 0.0001
LSTb	0.068 $\pm$ 0.02	0.064 $\pm$ 0.02	0.062 $\pm$ 0.03	N.S.
LSTc	0.66 $\pm$ 0.29	0.71 $\pm$ 0.26	0.69 $\pm$ 0.24	N.S.
SLNPP I	0.076 $\pm$ 0.05	0.080 $\pm$ 0.04	0.078 $\pm$ 0.07	N.S.
DSLNT	0.48 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.11	0.46 $\pm$ 0.15	N.S.
3'S-3FL-SLNPP II	0.15 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.04	N.S.

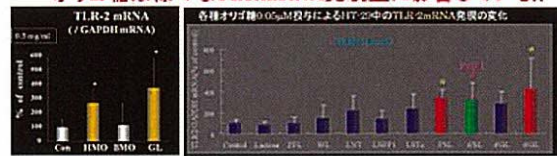
図1：主要なヒトミルクオリゴ糖のうち、*Campylobacter jejuni* に対する感染防御能のある2'-FLは、泌乳開始1日で高く、ピフィス因子と考えられるLNTは2~3日で増加する

## ミルクオリゴ糖によるシンバイオティクス効果

シンバイオティクス  
 プロバイオティクス菌(乳酸菌など) + プレバイオティクス菌(オリゴ糖)  
 Toll 様受容体 (TLR) ファミリー

プロバイオティクス菌単独よりも免疫調節作用が強い！  
 ⇒オリゴ糖がプロバイオティクス作用を強化？

プロバイオティクス菌の免疫調節作用  
 ⇒主にToll様受容体を介して作用  
 ⇒オリゴ糖のToll様受容体発現への影響は？  
 オリゴ糖は様々なTLRmRNA発現量に影響している!!



※図はヒト腸管由来細胞HT-29におけるHMO(ヒトミルクオリゴ糖)、BMO(ウシミルクオリゴ糖)、GL(ガラクトオリゴ糖)のTLR2mRNA発現の例。Dunnettの検定 \*p<0.05 vs Control

図2：ヒトミルクオリゴ糖はヒト腸管細胞の病原性認識分子 Toll 様受容体 mRNA 発現を刺激する