

Title	タモキ `タケ熱水抽出物の抗カンシ `タ `菌効果および `上皮細胞における テ `ィフェンシン発現増強作用
Author(s)	佐藤, 惇; 佐藤, 英樹; 高井, 理衣; 吉田, 光希; 山崎, 真美; 西村, 学子; 富山, 隆広; 安彦, 善裕
Journal	日本口腔検査学会雑誌, 5(1): 12-17
URL	http://hdl.handle.net/10130/3077
Right	

タモギタケ熱水抽出物の抗カンジダ菌効果および上皮細胞における β ディフェンシン発現増強作用

佐藤 惇¹⁾、佐藤英樹¹⁾、高井理衣¹⁾、吉田光希¹⁾、山崎真美¹⁾、西村学子¹⁾、富山隆広²⁾、
安彦善裕^{1)*}

1) 北海道医療大学 歯学部 生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野

2) 株式会社 スリービー

抄 録

目的：タモギタケ抽出物のカンジダに対する抗菌効果と上皮細胞の β ディフェンシン (hBD) の発現上昇効果の有無について検討した。

方法：抽出物を添加した液体培地における *C.albicans* の増殖率を吸光度測定法にて観察した。また上皮細胞の培養液へ抽出物を添加し、一定時間培養後の hBD の mRNA 発現変化を、定量的 RT-PCR 法にて観察した。

結果：タモギタケ抽出物の添加により、*C.albicans* の増殖の抑制が認められた。上皮細胞における検討では、 β ディフェンシン 2(hBD-2) および 3(hBD-3) の mRNA 発現の上昇が認められた。またタモギタケより精製したエルゴチオネインの添加により、 β ディフェンシン 1(hBD-1)、-2 および -3 の発現上昇がみられた。

結論：タモギタケ抽出物は、*C.albicans* の増殖抑制効果を有すること、また上皮細胞からの hBD の発現上昇作用を有することが示唆された。

Key words : beta-defensin, Keratinocyte , Tamogitake mushroom, ergothioneine, Antifungal activity

受付：2012年12月20日 受理：2013年2月20日

緒 言

タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) は、主に北海道および東北に天然分布する食用の茸であり、初夏から秋にかけてニレ類を主とする広葉樹の伐根や倒木から発生する。北海道では昭和 40 年代後半から施設栽培が開始され、北海道立林産試験場で開発された品種によって、国内生産量の 8 割程度が生産されるまでになっている。近年ではタモギタケは食材としてのみならず、乾燥粉末や抽出物にされ、健康補助食品や機能性食品としても利用されている。動物実験において、抽出物に抗腫瘍作用¹⁾、血圧降下作用²⁾、血糖値上昇抑制作用³⁾ が確認されており、ヒトでの経口摂

取でも、NK 活性を上昇させ抗癌剤による免疫抑制を補完する可能性が示唆されている⁴⁾。キノコ類には、抗菌効果を示すもののあることと⁵⁾、上皮細胞が産生する抗菌ペプチド β ディフェンシンは、キノコ類にも多量に含まれる β -グルカンの刺激により TLR2 を介して発現が上昇することから⁶⁾、タモギタケの抽出物にも抗菌効果や β ディフェンシンの発現が上昇する可能性が考えられる。

β ディフェンシン (hBD) は上皮細胞から産生される広域スペクトラムを有する抗菌ペプチドの一種である。口腔内では、歯周病原菌、う蝕原因菌はもとより⁷⁾、カンジダを初めとした真菌⁸⁾、ウイルス⁹⁾ に

*：〒 061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

TEL 0133-23-1390 FAX 0133-23-1390

e-mail: yoshi-ab@hoku-iryo-u.ac.jp

表1 定量的 RT-PCR に用いたプライマー

TaqMan Gene Expression Assays	Assay ID
hBD-1	Hs 00608345_m1
hBD-2	Hs 00823638_m1
hBD-3	Hs 00218678_m1
GAPDH	Hs 99999905_m1

も効果を示すことが明らかになっている。口腔粘膜上皮での発現も明らかとなっており、口腔粘膜の感染防御機構に重要な役割を担っていることが知られている。hBD にはいくつかのタイプのもがあり、hBD-1、-2、-3 はその発現調節機構や役割について詳細な検索が行われてきている。一般に、hBD-1 は恒常的に発現しており、hBD-2 と -3 は微生物またはその成分、炎症性サイトカインなどにより発現が誘導されることが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。

カンジダ菌は口腔常在菌であるが、免疫機能の低下時の日和見感染の原因となるのみならず、ドライマウスや義歯清掃不良などの口腔環境の僅かな変化によっても増殖し、カンジダ性口内炎や舌痛の原因になることがある¹²⁾¹³⁾。カンジダ菌の増殖の際には、抗真菌薬が使われるが、増殖予防のための素材の開発が望まれる。

そこで、本研究では、タモギタケがカンジダ菌増殖予防のための素材となりうるか否かをについて検証するために、タモギタケ熱水抽出物のカンジダに対する直接的な抗菌効果と、上皮細胞のβディフェンシンの発現上昇効果について検討した。

材料および方法

1. タモギタケ熱抽出物の調整

人工栽培されたタモギタケ子実体を 5 倍量の沸騰

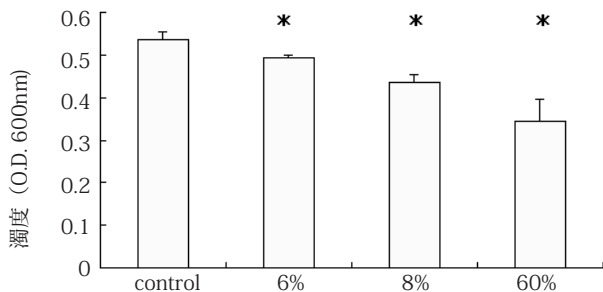


図1 吸光度測定法によるタモギタケ熱水抽出物の抗カンジダ効果測定の結果

16 時間培養後の結果において、タモギタケ熱水抽出物の添加により control と比較し 6% 濃度では約 92%、8% 濃度では約 82%、60% 濃度では約 58 ~ 71% の増殖率であった。

(*P<0.05 Mann-Whitney の U 検定)

水に 10 分間浸漬し、得られた抽出液を減圧濃縮して固形分 2.5% の濃縮液を得た。濃縮液を 120℃、2 気圧、15 分間加熱殺菌処理し、タモギタケ熱水抽出物 (Bio) とした。またタモギタケ抽出物中の有効成分の検討として、茸由来βグルカンとしてスエヒロタケ由来βグルカンであるソニフィラン (Soni) (科研製薬, 東京) を用いた。またタモギタケ由来エルゴチオネイン (EGT) を、Bio より活性炭カラムを用いて精製し、これを得た。

2. 抗カンジダ菌効果の検討

抗カンジダ効果は、吸光度測定法により *Candida albicans* の増殖抑制効果を測定することにより検討した。*Candida albicans* には ATCC90028 株 (関東化学, 東京) を用い、6 ウェルプレート中 (旭テクノグラス, 千葉) の BHI 液体培地 (MERCK 社, Darmstadt, GER) に播種し、6%、8% および 60% の各濃度のタモギタケ熱水抽出物を培養液に添加した。それぞれの添加量と同量の滅菌蒸留水を添加したものを control とした。25℃にて 16 時間培養後、分光光度計 (Bio-Rad 社, CA, USA) を用いて波長 600nm における濁度を測定することにより、液体培地中のカンジダ菌の増殖を測定した。

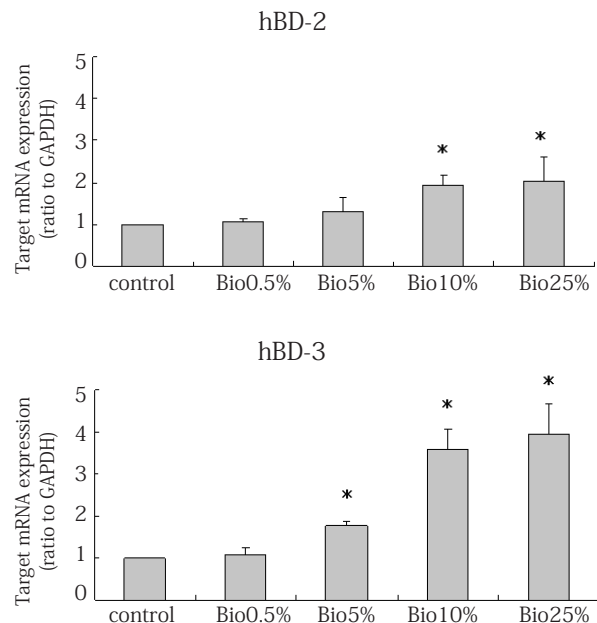


図2

タモギタケ熱水抽出物の HaCaT 細胞培養液への添加による hBD 発現量の変化

タモギタケ熱水抽出物の添加により、表皮角化細胞株における濃度依存的な hBD-2 および hBD-3 の mRNA 発現の上昇が認められた。

(*P<0.05 Mann-Whitney の U 検定)

3. 細胞培養

上皮細胞での hBD-1、-2、-3 の発現変化の検討において、Bio および β グルカンにおける検討ではヒト表皮角化細胞株である HaCaT を用いた。2% ペニシリン - ストレプトマイシン, 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Sigma-Aldrich 社, MO, USA) にて、37℃、5%CO₂ の環境下で培養した。また EGT における検討では、ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) (CELLNTEC 社, CA,USA) を用い、CnT-24 メディウム (CELLNTEC 社) にて、37℃、5%CO₂ の環境下で培養、継代 5 代目を実験に用いた。

Bio の効果の検討では HaCaT の培養液に Bio を 0.5%、5%、10% および 25% の濃度で添加し、2 時間培養した。β グルカンの効果の検討では、HaCaT の培養液に Soni を 1 μ M および 10 μ M の濃度で添加し、24 時間培養した。EGT の効果の検討では、HGEP の培養液に EGT を 0.1mM、1mM および 5mM 添加し、2 時間および 24 時間培養した。Bio、Soni、および EGT どちらにおいても溶媒である滅菌蒸留水を、試薬添加量と同量添加したものを control サンプルとした。

4. 定量的 RT-PCR

HaCaT 細胞および HGEP 細胞に RNA 抽出用薬剤 (Trizol Reagent, Invitrogen 社, CA, USA) を加え、total RNA を抽出した。得られた total RNA は Oligo(dT)¹² -¹⁸ プライマーおよび Superscript reverse transcriptase(Invitrogen 社) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA は、TaqMan プライマープローブセット (Applied Biosystems 社, CA,USA)(表 1) および TaqMan Universal Master Mix(Applied Biosystems 社) を使用し、Gene Amp 5700 Sequence Detection System(Applied Biosystems 社) にて mRNA の発現変化を定量した。内在性 control にはヒト GAPDH を control とし、解析には ΔΔ Ct 法を用いた¹⁴⁾。

5. 細胞内伝達経路の検討

HGEP 細胞における EGT による hBD の発現変化における細胞内伝達経路を検討するために、阻害剤の有無による発現変化の比較を行った。培養液への EGT の添加に先立って、p38 MAPK 阻害剤として SB203580(MERCK 社)、JNK 阻害剤として

SP600125(AG scientific 社, CA,USA) の各経路の阻害剤を添加し、1 時間プレインキュベートした後に EGT を 1mM 添加、24 時間後に定量的 RT-PCR にて mRNA の発現変化を測定した。

6. 統計学的手法

統計分析は、統計ソフト PASW Statistics 18 (IBM, NY, USA) にて Mann-Whitney の U 検定を行った。有意差は危険率 5% 以下とした。

結果

1. タモギタケ熱水抽出物のカンジダ菌増殖抑制効果の検討

Bio のカンジダ菌培養液への添加において、control と比較し濃度依存的なカンジダ菌の増殖抑制効果がみられた。Bio の添加により 16 時間培養後の結果に

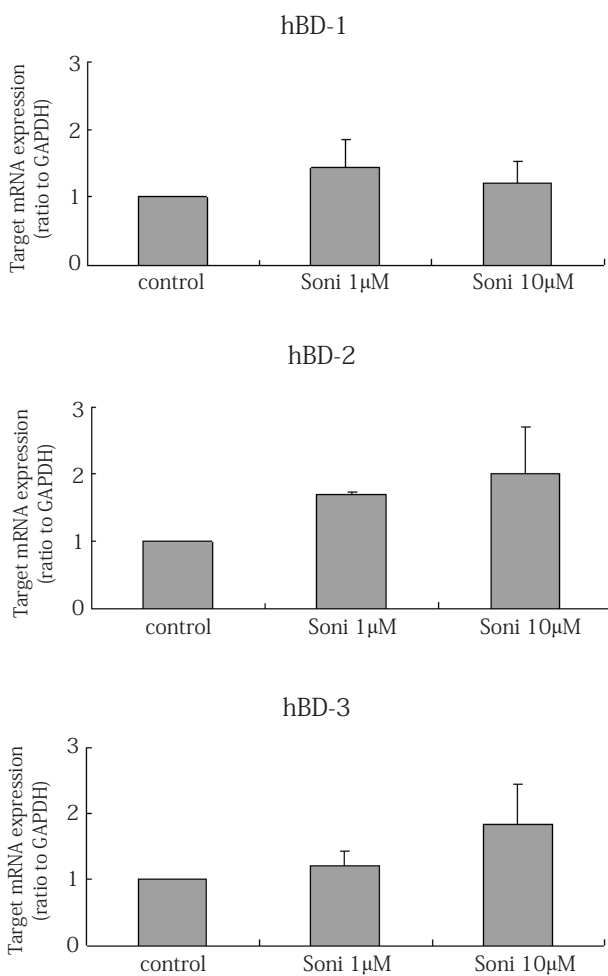


図3 β グルカンの添加による HaCaT 細胞における hBD の発現変化
Soni の添加による、表皮角化細胞株における hBD の mRNA 発現の変化は認められなかった。

において、controlと比較し6%濃度では約92%、8%濃度では約82%、60%濃度では約58～71%の増殖率であった(n=3)(図1)。

2. タモギタケ熱水抽出物、β-グルカンおよびエルゴチオネインのhBD発現増強効果の検討

Bioの、HaCaT細胞培養液への添加によって、添加後2時間でhBD-2およびhBD-3において、濃度依存的なmRNAの有意な発現増強作用がみられた(図2)。尚、hBD-1においては、有意な発現の変化はみられなかった。(data not shown)

Soniの、HaCaT細胞培養液への添加によって、添加後24時間においてすべての濃度において、hBD-1、hBD-2およびhBD-3のいずれにおいても有意なmRNAの発現変化はみられなかった(図3)。

EGTの、HGEP細胞培養液への添加によって、すべての濃度の添加後24時間後において、hBD-1、hBD-2およびhBD-3のmRNAの有意な発現増強作用がみられた(図4)。

3. エルゴチオネインによるhBD発現増強作用の細胞内伝達経路の検討

各種の阻害薬の添加により細胞内伝達経路の検討を行ったところ、EGTによるhBDの発現上昇は、hBD-1においてP38 MAPK阻害およびJNK阻害によりhBD-1の発現上昇の消失が認められた。またhBD-2においてはP38 MAPK阻害のみで発現上昇の低下が認められた。hBD-3においては発現上昇の低下は認められなかった(図5)。

考察

本研究では、タモギタケ熱水抽出物がカンジダ菌に対して直接的な抗菌作用を示すことと、hBD-2および-3の発現を上昇させることが明らかとなった。hBD-2および-3には抗カンジダ効果のあることも明らかとなっていることから⁸⁾、タモギタケ熱水抽出物は、カンジダ菌に直接的に作用するのみならず、上皮細胞のhBD-2および-3の発現上昇を介し間接的にもカンジダの増殖を抑制することが示唆された。

抗菌効果を示すキノコ類の中でシイタケでは、レシチンに抗菌効果があるとされているが¹⁵⁾、その他のものでは抗菌効果のメカニズムの詳細は明らかとなっていない^{16) - 18)}。本研究での、タモギタケの直

接的な抗カンジダ効果のメカニズムも不明であり、さらなる検討が必要である。

タモギタケがキノコ類の中で最も多い含有物にエルゴチオネインがある。シイタケの約7倍の含有率と言われており¹⁹⁾、βグルカンと並んでタモギタケの主成分といわれており¹⁹⁾、抗酸化作用が強いことから抗腫瘍やアンチエイジングへの応用が期待されている²⁰⁾。そこで、タモギタケから抽出されたエルゴチオネインと、βグルカンがhBDの発現を上昇させるか否かについて検討した。その結果、エルゴチオネインではhBD-1、-2、-3のいずれにおいても2時間では発現の上昇はみられなかったものの、24時間でいずれの濃度においても有意な発現上昇が確認された。タモギタケ熱水抽出物でhBD-2、-3の発現

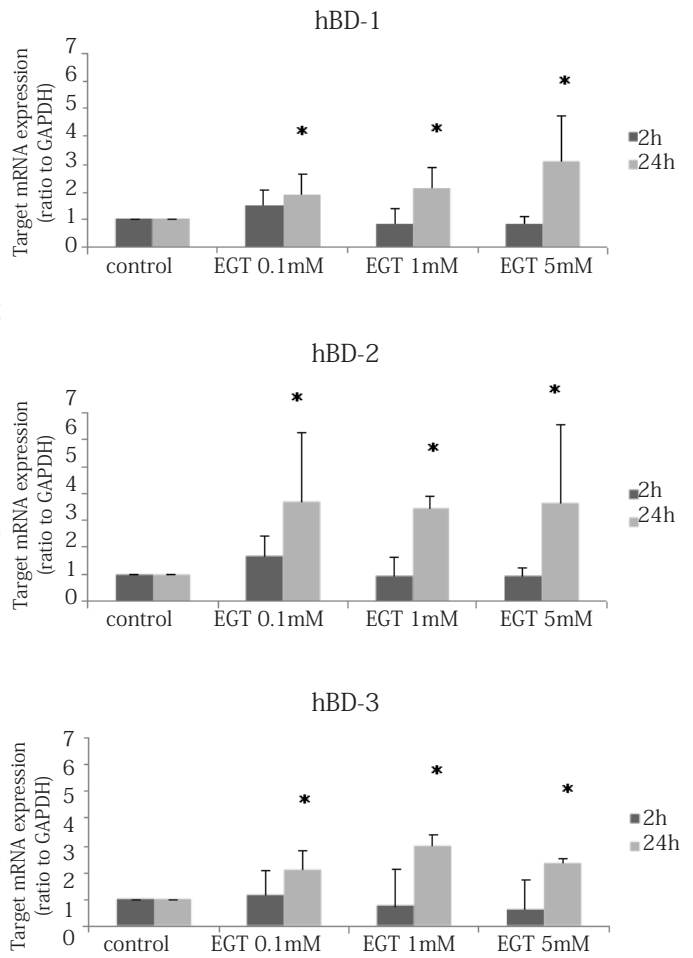


図4 エルゴチオネインの添加によるHGEPにおけるhBDの発現変化
EGTのHGEP細胞培養液への添加によって、添加後24時間において、hBD-1、hBD-2およびhBD-3のmRNAの有意な発現増強作用がみられた (*P<0.05 Mann-WhitneyのU検定)

上昇の少なくとも一部にエルゴチオネインの効果が関与していることが示唆された。hBD-1 は上皮細胞で恒常的に発現しているものの、hBD-2、-3 は感染や炎症性刺激によって発現が上昇することが広く知られている¹⁰⁾¹¹⁾。細菌感染によるhBD-2、-3の発現上昇はTLR2を介し²¹⁾²²⁾、真菌ではDectin-1レセプターを介して同様な反応を示すと言われている²³⁾。タモギタケのもう一つの主成分であるβグルカンはTLR2とDectin-1レセプターのリガンドとなりうることから²⁴⁾、タモギタケ熱水抽出物によるhBD-2、-3の発現上昇に含有しているβグルカンが関与して

いることが推測された。しかしながら、βグルカンによりhBD-2、-3の発現上昇は確認されず、タモギタケ熱水抽出物によるhBD-2、-3の発現上昇にβグルカンの関与は少ないものと思われた。

タモギタケ熱水抽出物では、hBD-1の発現上昇は確認されなかったものの、エルゴチオネインでは、BD-2、-3以外にhBD-1の発現の上昇も確認された。このことから、タモギタケ熱水抽出物でもhBD-1の発現が上昇しているもののその程度は僅かであるか、抽出物中にhBD-1発現上昇の阻害因子のあることが推測される。この点については更なる検討が必要である。hBD-1の発現が上昇する因子として、IFN-γなどのサイトカイン⁷⁾や、表皮角化細胞の分化が上げられている²⁵⁾。病原細菌の感染によるhBD-2の発現上昇では転写因子NF-κBが重要な役割を担うが、hBD-1や-3の発現上昇や、他の因子によるhBD-2の発現上昇にはMAP kinase (MAPK)が中心的役割を担うことから^{26)–29)}、MAP Kinase inhibitorを用いて、エルゴチオネインによるhBD-1、-2の発現上昇にMAP Kinaseが関与しているか否かについて検討した。その結果、hBD-1の発現上昇はp38MAPとJNKを介しており、hBD-2の発現上昇はp38MAPKを示唆する結果となっていた。hBD-3はいずれのinhibitorによっても発現が抑制されず他の経路によるものと思われた。

以上のことから、タモギタケ熱抽出物やタモギタケ由来のエルゴチオネインは口腔粘膜でのカンジダの増殖抑制に寄与するものと考えられた。近年増加傾向にあるドライマウス患者では、合併症として唾液分泌量低下によるカンジダの増殖が多い。ドライマウス患者の対照療法として用いられる保湿剤等にタモギタケの成分を含有することでカンジダの増殖を抑制できるものと考えられる。また、hBD-1は、がん抑制遺伝子としての役割が示唆されていることから³⁰⁾、エルゴチオネインによるhBD-1の発現上昇は抗腫瘍性の役割も担う可能性が示唆された。

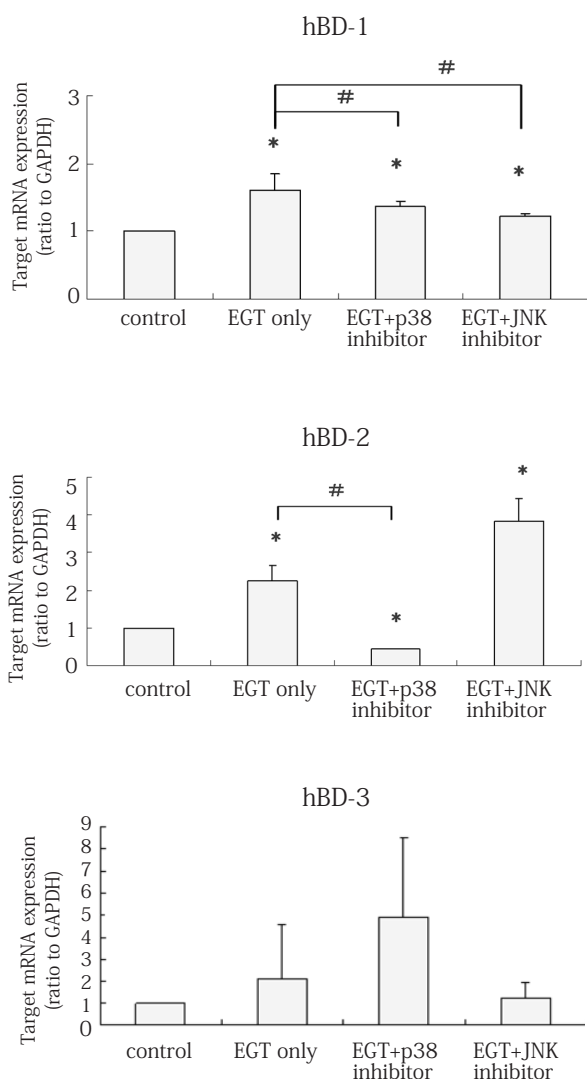


図5 エルゴチオネインによるhBD発現増強作用の細胞内伝達経路の検討
各種阻害薬で1時間preincubateした後にEGTを添加、24時間後のmRNA発現量を観察したところ、hBD-1ではp38MAPKとJNKの阻害薬によって、hBD-2ではP38 MAPKの阻害薬によって発現上昇の有意な減弱が認められた
(*P<0.05 # P<0.05 Mann-WhitneyのU検定)

参考文献

- 1) 三崎 旭、松井元子、浜田澄子:キシメジ科食用茸(ヒラタケ、タモギタケ)の多糖の化学的性質および抗腫瘍作用、大阪市立大学生活科学部紀要 39:1、1991
- 2) Hagiwara S, Takahashi M, Shen Y, Kaihou S, Tomiyama T, Yazawa M, Tamai Y, Sin Y, Kazusaka A, Terazawa M: A phytochemical in the edible tamogi-take mushroom (Pleurotus cornucopiae), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously

- hypertensive rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 69: 1603, 2005
- 3) 藤野正行, 何 普明: タモギタケ熱水抽出物によるII型糖尿病モデルマウスの血糖値抑制, *日本食品科学工学会誌*, 45: 618, 1998
 - 4) 坂牧純夫: タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) 熱水抽出物の併用効果が観察された尿管上皮癌の一症例, *機能的食品と薬理栄養*, 5: 443, 2009
 - 5) Rao JR, Smyth TJ, Millar BC, Moore JE: Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*), *Int J Antimicrob Agents*, 33:591-592, 2009
 - 6) Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes, *Br J Dermatol*, 160: 297-304, 2009
 - 7) Joly S, Maze C, McCray PB Jr, Guthmiller JM: Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms, *J Clin Microbiol*, 42: 1024-1029, 2004
 - 8) Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M: Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption, *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 154-161, 2007
 - 9) Scudiero O, Galdiero S, Cantisani M, Di Noto R, Vitiello M, Galdiero M, Naclerio G, Cassiman JJ, Pedone C, Castaldo G, Salvatore F: Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity, *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2312-2322, 2010
 - 10) Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T: Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease, *Med Mol Morphol*, 40(4):179-184, 2007
 - 11) Abiko Y, Saitoh M: Salivary defensins and their importance in oral health and disease, *Curr Pharm Des*, 13: 3065-3072, 2007
 - 12) Muzika BC, De Rossi SS: A review of burning mouth syndrome, *Cutis*, 64: 29-35, 1999
 - 13) Grushka M, Epstein JB, Gorsky M: Burning mouth syndrome: differential diagnosis, *Dermatologic Therapy*, 15: 287-291, 2003
 - 14) Livak KJ & Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25: 402-408, 2001
 - 15) Spratt DA, Daglia M, Papetti A, Stauder M, O'Donnell D, Ciric L, Tymon A, Repetto B, Signoretto C, Hourri-Haddad Y, Feldman M, Steinberg D, Lawton S, Lingström P, Pratten J, Zaura E, Gazzani G, Pruzzo C, Wilson M: Evaluation of plant and fungal extracts for their potential antigingivitis and anticaries activity, *J Biomed Biotechnol*, 2012: 510198
 - 16) Hirasawa M, Shouji N, Neta T, Fukushima K, Takada K: Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom), *Int J Antimicrob Agents*, 11: 151-157, 1998
 - 17) Venturini ME, Rivera CS, Gonzalez C, Blanco D: Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains, *J Food Prot*, 71: 1701-1706, 2008
 - 18) Hearst R, Nelson D, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Rao JR, Moore JE: An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms, *Complement Ther Clin Pract*, 15: 5-7, 2009
 - 19) Bao HN, Osako K, Ohshima T: Value-added use of mushroom ergothioneine as a colour stabilizer in processed fish meats, *J Sci Food Agric*, 90:1634-1641, 2010
 - 20) Cheah IK, Halliwell B: Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease, *Biochim Biophys Acta*, 1822: 784-793, 2012
 - 21) Shin JE, Choi Y: *Treponema denticola* suppresses expression of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells through inhibition of TNFalpha production and TLR2 activation, *Mol Cells*, 29: 407-412, 2010
 - 22) Shin JE, Kim YS, Oh JE, Min BM, Choi Y: *Treponema denticola* suppresses expression of human {beta}-defensin-3 in gingival epithelial cells through inhibition of the toll-like receptor 2 axis, *Infect Immun*, 78: 672-679, 2010
 - 23) Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes, *Br J Dermatol*, 160: 297-304, 2009
 - 24) Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM: Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2, *J Exp Med*, 197: 1107-1117, 2003
 - 25) Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Yamazaki M, Arakawa T, Takuma T, Kaku T: Upregulated expression of human beta defensin-1 and -3 mRNA during differentiation of keratinocyte immortalized cell lines, HaCaT and PHK16-Ob, *J Dermatol Sci*, 31: 225-228, 2003
 - 26) Lewis JP, Macrina FL: IS195, an insertion sequence-like element associated with protease genes in *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun*, 66: 3035-3042, 1998
 - 27) Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA: Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family, *J Immunol*, 168: 316-324, 2002
 - 28) Chung WO, Dale BA: Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species, *Infect Immun*, 72: 352-358, 2004
 - 29) Chung WO, Dommisch H, Yin L, Dale BA: Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease, *Curr Pharm Des*, 13: 3073-3083, 2007
 - 30) Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA: Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma, *Cancer Res*, 66: 8542-8549, 2006