

氏名	KARIYAWASAM, Kariyawasam Majuwana Gamage Renuka Menike
本籍（国籍）	スリランカ民主社会主義共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 761 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on the effects of edible mushroom <i>Grifola frondosa</i> on intestinal homeostasis （食用キノコ（マイタケ、 <i>Grifola frondosa</i> ）の腸管恒常性への効果に関する研究）
学位審査委員	主査 帯広畜産大学教授 木下 幹朗 副査 大和田 琢二(帯広 教授), 前多 隼人(弘前 准教授), 伊藤 芳明(岩手 准教授), 山下 慎司(帯広 助教)

### 論文の内容の要旨

Intestinal homeostasis plays a vital role in maintaining not only gastrointestinal health but also the overall systemic health. The complex interactions between epithelial cells, immune cells, stroma cells, and gut inhabitant regulate a number of diverse mechanisms in order to maintain intestinal homeostasis. A breakdown in these pathways can disrupt the homeostatic mechanisms and lead to chronic intestinal inflammation and inflammatory-related health consequences, such as inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, and bowel cancer. Gut inflammation is frequently accompanied by imbalance in the intestinal microflora. Particularly, probiotic bacteria, that can be regarded as part of the natural human microbiota, engage in improving homeostasis through counteracting the inflammation process by stabilizing the gut microbial environment and gut barrier function and mediating pro and anti-inflammatory cytokines. Several mushroom bioactive components including polysaccharides, glycoproteins, proteins, lipids, and secondary metabolites, are known to be involved in the induction and maintenance of intestinal homeostasis. *Grifola frondosa*, commonly known as maitake, is an edible mushroom, that

has been shown to possess various biological activities against several metabolic disorders including cardiovascular disease, diabetes, hypertension, inflammatory bowel disease, and cancers of the stomach, breast, and pancreas. However, the effects of maitake on the maintenance of intestinal homeostasis are still unclear. Therefore, the purpose of our study was to identify the effects of maitake on gut homeostasis, colorectal cancer development, and growth of probiotics. The effects of maitake and the synergistic inhibitory effect of maitake when combined with milk on aberrant crypt foci (ACF) formation, colonic inflammation, and suppression of colorectal cancer were evaluated using 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mouse model of colon carcinogenesis. In addition, the impact of maitake fruiting bodies, maitake extracts, and purified fractions on the growth of colon probiotic microorganisms were assessed and specific maitake glucans were isolated and characterized.

In chapter 1, the chemopreventive properties of maitake, and the synergistic effects when combined with milk against colon carcinoma in Balb/c mice treated with DMH colon carcinogenesis were investigated. Further, the possible mechanisms by which maitake and milk may exert their actions together or individually were also studied. Animals fed with AIN-76 standard diet were used as positive and negative controls, while AIN-76 supplemented with either 10% milk (10MK), 10% maitake (10MM), 5% milk + 5% maitake (5Mix), or 10% milk + 10% maitake (10Mix) diets were used for experimental groups. Supplementation with maitake, milk, and their combinations showed significant effect on suppressing DMH-induced ACF formation compared to mice treated with DMH positive control with the highest effect observed in the 10Mix group. Cecal pH was significantly lower in the 10MM and 10Mix groups than that of control and, maitake and, its combinations were able to remarkably increase cecum short chain fatty acid levels (SCFA) which were reduced by DMH treatments. Although, no significant difference was observed among samples regarding the liver weight, the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the liver which were significantly increased by DMH

treatment, were remarkably lower in the dietary treatment groups, and the effect was more pronounced in the 10Mix group. Further, all the tested diets were able to modulate pro-inflammatory cytokines; TNF- $\alpha$  and IL16, anti-inflammatory cytokine; IL-1ra, and chemokine; IP 10. Particularly, TNF- $\alpha$  level was considerably lower in the 10Mix group and was comparable with the DMH negative control showing the highest suppression of colon inflammation, induced by DMH administration. On the other hand, supplementation with these food components significantly reduced anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-x, MCL1, XIAP, and p27/Kip while increasing apoptosis-related protein p53, cytochrome c, Bad, TRAIL R2, TNF R1, and Fas in comparison to the DMH positive control, thus suggesting the involvement of apoptosis in suppression of DMH-induced colon carcinogenesis. Compared to all the other dietary treatments, the 10Mix combination treatment showed the highest protection against colon carcinogenesis. Taken together, these results suggest that maitake, dietary milk, and the combination diets can suppress colon inflammation and upregulated muted cell apoptosis to suppress ACF formation and colorectal cancer development. Importantly, the synergistic inhibitory effect of maitake in combination with milk may be an effective nutritional chemoprevention agent against colon carcinogenesis.

In chapter 2, the synbiotic effect of maitake, maitake extractions and further purified fractions were evaluated using *in vitro* bacterial culture models and the responsible maitake polysaccharides were identified and elucidated. Maitake glucans were isolated from fruiting bodies through subsequent boiling water, ethanol, and alkali extraction steps. The water soluble (ER1), ethanol soluble (ER2), cold alkali soluble (ER3), hot alkali soluble (ER4,) and insoluble (ER5) extracts were characterized by various analytical methods and further tested for prebiotic activity. The NMR spectroscopic analysis identified the glucans in all the extracts as belonging to the  $\beta$  type. Evaluation of the synbiotic effect of maitake extracts showed that all extracts (ER1-ER5) facilitated the growth of seven tested colon probiotic microorganisms; *Lactobacillus. rhamnosus* (ATCC 53103), *Lactobacillus*

*acidophilus* (JCM 1132), *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (ATCC 11842), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 14931), *Bifidobacterium longum* (BB 536), *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 1275), and *Bifidobacterium animalis* subsp *animalis* (ATCC 1253). Among the maitake extracts, ER1 showed remarkably different growth characteristics, which were similar to that of positive control (glucose). The ER1 extract was further characterized by methylation analysis and was identified as 1,3-β D-glucan and the molecular weight as revealed by HPLC was around  $2.1 \times 10^5$  Da. The ER1 extract was further purified using anion exchange chromatography and divided into three fractions (ER1-F1, ER1-F2, and ER1-F3) based on the carbohydrate contents, and tested for prebiotic activity. Even though, all three fractions were able to stimulate the growth of all probiotics tested, ER1-F2 and ER1-F3 showed a remarkably different effects compared to ER1-F1. The ER1-F2 and ER1-F3 fractions were further divided using a molecular weight cutoff value of 10 kDa. The ER1-F2 and ER1-F3 fractions with molecular weight >10 kDa showed significant effects on the growth of *L. rhamnosus* (ATCC 53103), *B. longum* (BB 536) and *B. adolescentis* (ATCC 1275). These findings indicate that maitake can be used as potential prebiotic agent to facilitate the growth of colonic probiotic bacteria and 1,3-β D-glucan from maitake water extracts may be responsible for the observed synbiotic effect.

In conclusion, the findings of this study suggest that fruiting bodies and polysaccharide fraction of maitake may be involved in facilitating the growth of colon probiotics microorganisms, suppression of ACF development and colon carcinogenesis and regulation of intestinal homeostasis.

(和文)

腸の恒常性は、腸だけでなく、全身の健康を維持する上で重要であり、腸内の上皮細胞、免疫細胞、間質細胞、及び腸内微生物間の複雑な相互作用により維持している。恒常性の崩壊は、炎症性腸疾患、大腸癌など炎症が関与する疾患へ進展する可能性がある。腸内細菌叢の不均衡は腸の炎症誘発し、特に、プロバイオティクス細菌は、腸の微生物環境と腸のバリア機能を安定させ、炎症性と抗炎症性サイトカインのバランスを維持することにより恒常性の維持をしていると考えられる。

マイタケ *Grifola frondosa* は食用キノコでありその多糖類, 糖タンパク質, タンパク質, 脂質, 及び二次代謝産物は, 腸の恒常性の誘導と維持に関与すること報告されているだけでなく、心血管疾患, 糖尿病, 高血圧, 炎症性腸疾患, 胃がん, 乳がん, 膵臓がんへの効能が報告されている。しかし, 腸の恒常性の維持に対するマイタケの効果はまだ不明点が多い。

本研究の目的は、マイタケが腸の恒常性の維持を介して、異常陰窩巣 (ACF) 形成への効果を、ミルクと組み合わせた場合のマイタケの相乗効果を、1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) 誘発マウスモデルを使用して評価し、さらに、マイタケの子実体からマイタケグルカンの分離を試み、これらの結腸プロバイオティクス微生物の成長に及ぼす影響を評価した。

第 1 章では、DMH 投与により誘導されるマウス大腸腺腫発症モデル系においての、食餌性マイタケ並びに牛乳 (ミルク) の効果について検討した。AIN-76 とし、試験食群として、10% ミルク (10MK)、10% マイタケ (10MM)、5% ミルク + 5% マイタケ (5Mix) 並びに 10% ミルク + 10% (10Mix) マイタケの群を設定し。DMH は週一回ごと腹腔内へ、15mg/Kg 体重投与し、10 週間試験飼育を行った。その結果、マイタケ並びにミルクの摂取は ACF の生成を有意に抑制し、また、ミルクとマイタケの共投与群が、ACF の生成を最も抑制した。盲腸の pH は、10MM 及び 10Mix グループでコントロール及びマイタケのそれよりも有意に低く盲腸短鎖脂肪酸イール (SCFA) を著しく増加した。肝臓のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) のレベルは、DMH 投与により上昇したが、マイタケ並びにミルクの投与群で著しく低く、10Mix 群において効果はより顕著であった。また、10Mix 群において 炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  及び IL16 が抑制された。アポトーシス関連タンパク質については p53、シトクロム c、Bad、TRAIL R2、TNF R1 が増加し、抗アポトーシスタンパク質については Bcl-2、Bcl-x、MCL1、XIAP、及び p27 / Kip を有意に減少した。これらの結果は癌の抑制におけるアポトーシスの関与を示唆する。

以上の結果より、マイタケ、牛乳、及び両者の併用食が結腸炎症を抑制し、アポトーシスを上方制御して、ACF 形成および結腸直腸癌の発生を抑制する可能性を示唆した。以上の結果はマイタケと牛乳の併用による相乗的な抑制効果は、大腸がん発症を予防する食品である可能性を示唆した。

第 2 章では、マイタケの腸内機能性を調べるために、マイタケから、溶媒分画法によって得られた多糖類の画分に対して *in vitro* の腸内細菌培養モデルを使用して、その効果を検討した。水溶性 (ER1)、エタノール可溶性 (ER2)、冷アルカリ可溶性 (ER3)、高温アルカリ可溶性 (ER4)、及び不溶性 (ER5) を H1-NMR を用いて解析したところすべての画分中のグルカンが  $\beta$  型であった。また全画分において供試した 7 種のプロバイオティクス微生物 (*Lactobacillus. rhamnosus* (ATCC 53103), *Lactobacillus acidophilus* (JCM 1132), *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (ATCC 11842), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 14931), *Bifidobacterium longum* (BB 536), *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 1275), and *Bifidobacterium animalis* subsp *animalis* (ATCC 1253)) の成長を促進した。その中でも特に 水溶性 (ER1) はブドウ糖を用いた陽性対照群と類似しており、この画分はメ

チル化分析により 1,3- $\beta$ D-グルカンと同定され、HPLC によって明らかにされた分子量は約  $2.1 \times 10^5$  Da であった。さらにイオン交換クロマトグラフィーを用いて 3 画分に分画した。ケルろ過により (10kda カットオフ) 分子量を分画したところ、*L. amnosus* (ATCC 53103)、*Blongum* (BB 536)、及び *B. adolescentis* (ATCC 1275) の成長を有意に促進した画分が認められた。これらの結果は、1,3- $\beta$ D-グルカンが観察されたシンバイオティクス効果の原因である可能性があることを示した。結論として、この研究の結果は、マイタケの子実体と多糖類画分が、結腸プロバイオティクス微生物の成長、ACF の発生と結腸発癌の抑制、及び腸の恒常性の調節に関与している可能性があることを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、マイタケの腸における恒常性維持の効果を検証する目的で、異常陰窩巢 (ACF) 形成抑制効果を、1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) 誘発マウスモデルを使用して評価し、近年、大腸がん抑制効果が報告されているミルクと組み合わせた場合相乗効果も検証した。さらに、マイタケの子実体からマイタケグルカンを分離し、これらの結腸プロバイオティクス微生物の成長に及ぼす影響を評価した。

第 1 章では、DMH 投与により誘導されるマウス大腸腺腫発症モデル系においての、食餌性マイタケ並びに牛乳 (ミルク) の効果について検討した。AIN-76 を基本食として、試験食群は、10%ミルク (10MK)、10%マイタケ (10MM)、5%ミルク+ 5%マイタケ (5Mix) 並びに 10%ミルク+ 10%+マイタケ 10%(10Mix)の群を設定し、DMH は週一回ごと腹腔内へ、15mg/Kg 体重投与し、10 週間試験飼育を行った。その結果、マイタケ並びにミルクの摂取は ACF の生成を有意に抑制し、また、ミルクとマイタケの共投与群が、ACF の生成を最も抑制した。盲腸の pH は、10MM 及び 10Mix グループでコントロール及びマイタケのそれよりも有意に低く盲腸短鎖脂肪酸レベル(SCFA)を著しく増加した。肝臓のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) のレベルは、DMH 投与により上昇したが、マイタケ並びにミルクの投与群で著しく低く、10Mix 群において効果はより顕著であった。また、10Mix 群において 炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IL16 が抑制された。アポトーシス関連タンパク質については p53、シトクロム c、Bad、TRAIL R2、TNF R1 が増加し、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2、Bcl-x、MCL1、XIAP、および p27 / Kip を有意に減少した。これらの結果は癌の抑制におけるアポトーシスの関与を示唆する。

以上の結果より、マイタケ、牛乳、及び両者の併用食が結腸炎症を抑制し、アポトーシスを上方制御して、ACF 形成及び結腸直腸癌の発生を抑制する可能性を示唆し、マイタケと牛乳の併用による相乗的な抑制効果は、大腸がん発症を予防する食品である可能性を示唆した。

第 2 章では、マイタケの腸内機能性を調べるために、マイタケから、溶媒分画法によって得られた多糖類の画分に対して *in vitro* の腸内細菌培養モデルを使用して、その効果を検討した。溶媒分画した画分を H1-NMR を用いて解析したところすべての画分中のグルカンが  $\beta$  型であった。また全画分において供試した 7 種のプロバイオティクス微生物の成長を促進した。その中でも特に 水溶性 (ER1) はブドウ糖を用いた陽性対照群と類似しており、この画分はメチル化分析により 1,3- $\beta$ D-グルカンとして同定された。これらの画分の中にはプロバイオ

ティクス微生物の成長を有意に促進した画分が認められ、1,3-βD-グルカンがシンバイオティクス効果の原因である可能性があることを示した。

結論として、この研究の結果は、マイタケの子実体と多糖類画分が、結腸プロバイオティクス微生物の成長、ACF の生成と結腸発癌の抑制、および腸の恒常性の調節に関与している可能性があることを示唆している。

以上の結果は、進歩性並びに新規性に富んだ内容と判断でき、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文  
主論文

KMGRM Kariyawasam, Yamashita, S., Fukuda, K., Ohwada, T., Kinoshita, M. (2019)

Preventing the formation of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by dietary milk and maitake mushroom (*Grifola frondosa*)

*Milk Science* 68(2): 85-93