

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K18025  
研究課題名(和文)山椒由来アレルギー(脱顆粒)抑制物質の分子・細胞から生体レベルでの作用機序の解明  
  
研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of Japanese pepper(Zanthoxylum piperitum)-derived degranulation inhibitors  
  
研究代表者  
河野 良平 (Ryohei, Kono)  
  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
  
研究者番号：70569110  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、山椒(ZP)由来の脱顆粒抑制物質を新たに特定しその作用機序を明らかにすることを目的とした。IgEを介したマスト細胞脱顆粒に対する抑制効果に基づく分離により、ZP由来の脱顆粒抑制化合物として1-acetoxy-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2E,5E-diene(ZP1)および8-hydroxygeranyl acetate(ZP2)を特定した。ZP1またはZP2の経口投与は、マウスのIgEを介した受動皮膚アナフィラキシー反応を減弱した。ZP1とZP2はIgE介在性脱顆粒を阻害することでアレルギー反応を減弱することが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では山椒から新たに二つの脱顆粒抑制物質を単離、同定し、その作用機序を明らかにした。アレルギー疾患に対する治療方法は複数あるが、その選択肢を増やすことは有意義である。さらに山椒そのものを食生活に取り入れることで、アレルギー予防・改善が期待される

研究成果の概要(英文)：Zanthoxylum piperitum (ZP, 'Japanese pepper') is a traditional medicine and pepper used in Asian countries such as Japan. The current study aims to newly identify anti-allergic compounds derived from ZP. By inhibitory effect-guided isolation based on IgE-mediated mast cell degranulation, we identified degranulation inhibitory compounds derived from ZP fruit: 1-acetoxy-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2E,5E-diene (ZP1) and 8-hydroxygeranyl acetate (ZP2). Our findings suggest the inhibition of degranulation by ZP1 and ZP2 was by inhibition of Lyn phosphorylation, followed by inhibition of intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, protein kinase C alpha phosphorylation, membrane ruffling and granule-to-plasma membrane fusion. Oral administration of ZP1 or ZP2 attenuated an IgE-mediated passive cutaneous anaphylactic reaction in mice. These findings indicate that ZP1 and ZP2 attenuate allergic reaction via inhibition of IgE-mediated mast cell degranulation.

研究分野：機能性食品学、細胞生物学

キーワード：アレルギー 山椒 花粉症 脱顆粒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

花粉症などの型アレルギー疾患の患者数は増加の一途を辿り、社会的な問題となっている。型アレルギーは、その患者数の増加の原因に環境変化や食生活の変化が考えられ、現代病とも言われる撲滅が困難な疾患である。アレルギー疾患の治療の問題点として、治療に用いられる薬物には副作用の強いものがあること、アレルギー疾患の完全な治療は困難であることが挙げられる。そのため、アレルギー疾患を予防・改善する安全かつ副作用の少ない治療が強く望まれている。近年では食生活に取り入れることのできる食品由来の抗アレルギー成分に期待が寄せられている。そこで様々な効能を有する山椒に着目して研究を実施した。

### 2. 研究の目的

山椒(*Zanthoxylum piperitum*)はサンショオール、サンショアミド、リモネン、ゲラニオールなどを含有しており、利尿作用、抗菌作用、健胃作用などがあるとされ、古くから漢方薬の成分として用いられている食品である。これまでの研究から、アレルギー反応に深く関与するマスト細胞の脱顆粒を抑制する成分 2 種 (1-acetoxy-7-hydroxy-3,7-dimethyl-cta-2E,5E-diene (ZP1) および、8-hydroxygeranyl acetate (ZP2)) を、食品である山椒から単離・同定した。本研究計画では、培養細胞を用いて山椒由来脱顆粒抑制物質の分子・細胞レベルでの詳細な作用機序を解明するとともに、動物実験でその有効性を確認し、生体レベルでの作用機序も解明することでアレルギー疾患の予防・改善に貢献することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) IgE 介在性脱顆粒に対する効果

マスト細胞として扱われるラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 を用い、IgE 介在性脱顆粒への ZP1 および ZP2 の効果を調べた。抗 DNP(ジニトロフェニル)-IgE 抗体で一晩感作した RBL-2H3 を抗原となる DNP-BSA で刺激して脱顆粒を惹起させた。脱顆粒の際に化学伝達物質とともに細胞外へ放出される ヘキソサミニダーゼの活性を測定し、脱顆粒の指標とした。また、正常なマスト細胞に対する効果を調べるために、マウス骨髄よりマスト細胞 (BMHC) を分化誘導させて上記と同様の方法により IgE 介在性脱顆粒に対する効果を調べた。

#### (2) IgE 介在性細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇に対する効果

脱顆粒抑制作用の作用機序を解明するために、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化を捉えるためのカルシウムイメージングを実施した。IgE 介在性細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇に対する効果を調べるために、抗 DNP-IgE 抗体で一晩感作した RBL-2H3 にカルシウム指示薬を導入し、抗原刺激によって上昇する細胞内  $Ca^{2+}$ を共焦点レーザー顕微鏡でモニターした。抗原刺激の前に ZP1 または ZP2 を培地中に添加することで、抗原刺激による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を抑制するかどうかを測定した。

#### (3) IgE 非介在性細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇に対する効果

IgE 非介在的に細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させるイオノフォア A23187 を用いて IgE 非介在性脱顆粒および細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇に対する効果を調べた。

#### (4) IgE 介在性細胞内シグナルに対する効果

詳細な作用機序を解明するために、ウエスタンブロット法により細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇が起きるよりもさらに上流のシグナルとして Lyn を、また、カルシウムイオン依存的に活性化される PKC を採用し、そのリン酸化に対する ZP1 および ZP2 の効果を調べた。抗原刺激後に RBL-2H3 細胞より蛋白質を抽出し、解析に用いた。

#### (5) マウス皮膚受動アナフィラキシー (PCA) 反応に対する効果

マウスの耳介に DNP-IgE 抗体を投与し、その翌日、ZP1 と ZP2 を経口ゾンデで摂取させたあと、抗原を尾静脈から投与することでアレルギー反応を惹起した。この反応を可視化するために

抗原とともに青色色素であるエバンスブルー投与した。抗体投与を行った組織においてアレルギー反応である血管透過性の亢進が起こり、血液とともに青色色素が組織中に溶出するため、その色素量によってアレルギー反応の程度を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ZP1 および ZP2 の IgE 介在性脱顆粒抑制効果

これまでに山椒に含まれる IgE 介在性脱顆粒抑制物質の候補としてヒドロキシサンショール (HAS) が挙げられていたが、本研究において HAS は脱顆粒抑制効果をほとんど示さず、それに比較して ZP1 および ZP2 は強い脱顆粒抑制効果を示した。また、ZP1 と ZP2 は正常なマスト細胞 BMMC に対しても脱顆粒抑制効果を示した。脱顆粒刺激後の細胞形態を走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、脱顆粒の際に生じる膜ラッフリングを ZP1 および ZP2 が抑制することが明らかとなった。

##### (2) IgE 介在性細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇抑制作用

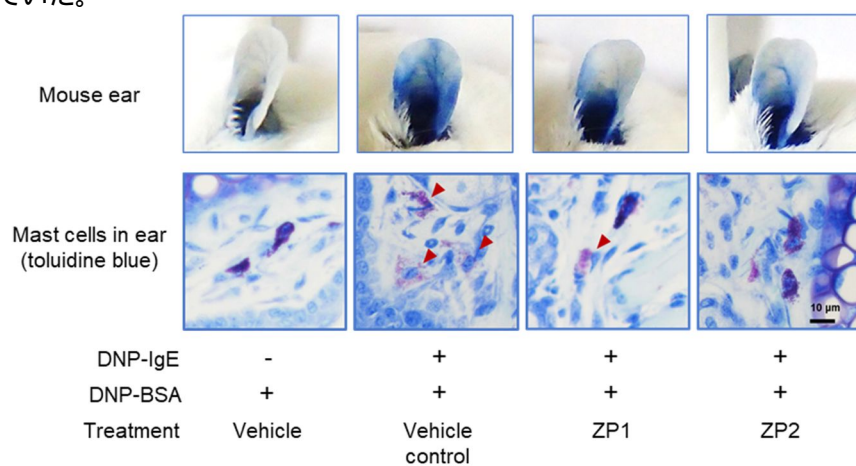
ZP1 と ZP2 はいずれも抗原刺激による IgE 介在性細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制することが明らかとなった。したがって、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇よりも上流のシグナルを抑制することが考えられた。実際に、タンパク質リン酸化解析から、ZP1 と ZP2 は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇よりも上流のシグナルである Lyn のリン酸化を抑制することが判明した。また、Ca<sup>2+</sup>依存的に活性化される PKC のリン酸化についても抑制した。

##### (3) IgE 非介在刺激に対する作用

ZP1 と ZP2 はいずれもイオノフォア A23187 刺激による IgE 非介在性脱顆粒を抑制したが、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇については抑制しなかった。A23187 は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を強制的に上昇させることで脱顆粒を誘発することから、ZP1 と ZP2 は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇後の pathway も抑制することが示唆された。

##### (4) PCA 反応に対する効果

ZP1 と ZP2 を経口投与することで、IgE 介在性の PCA 反応が抑制された (図)。耳介組織をトルイジンブルーによりマスト細胞を染色して観察したところ、ZP1 および ZP2 投与群で脱顆粒が抑制されていた。



(図) PCA 反応後の耳介と耳介中のマスト細胞

##### (5) 結論

山椒由来の ZP1 および ZP2 はこれまでに示されてきた山椒成分の中でも強い脱顆粒抑制作用を示し、生体レベルでも脱顆粒抑制を介した PCA 反応抑制効果を発揮した。その機序は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇よりも上流のシグナルである Lyn のリン酸化を抑制するだけでなく、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇後に起こる顆粒と細胞膜の融合や、アクチンの再構築等に関連する経路を抑制することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kono Ryohei, Nakamura Misa, Nomura Sachiko, Kitano Naomi, Kagiya Tomoko, Okuno Yoshiharu, Inada Ken-ichi, Tokuda Akihiko, Utsunomiya Hirotooshi, Ueno Masami	4. 巻 8
2. 論文標題 Biological and epidemiological evidence of anti-allergic effects of traditional Japanese food ume (Prunus mume)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30086-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野良平、野村幸子、鍵弥朋子、奥野祥治、中村美砂、宇都宮洋才
2. 発表標題 山椒の抗アレルギー効果について
3. 学会等名 第24回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野良平、野村幸子、奥野祥治、鍵弥朋子、中村美砂、宇都宮洋才
2. 発表標題 山椒由来geranyl acetate誘導体はマスト細胞の脱顆粒を抑制する
3. 学会等名 第26回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----