

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590554
 研究課題名（和文） フラボノイドによる抗アレルギー活性の新規作用機序の検討
 研究課題名（英文） Heme oxygenase-1 mediates the anti-allergic actions of flavonoids in mast cells
 研究代表者
 高木 健三 (TAKAGI KENZO)
 名古屋大学・医学部（保健学科）・教授
 研究者番号：50093050

研究成果の概要：

健康補助食品として知られているフラボノイドは抗アレルギー作用など様々な効果を持つことが知られているが、その作用機序については不明であった。本研究によって、フラボノイドの一種であるミリセチンおよびケンフェロールは肥満細胞において HO-1 の発現および活性を増加させることにより抗アレルギー作用を示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

近年、生活環境の変化などによりアレルギー患者の増加が大きな社会問題となっており、人々の健康に対する意識が高まるなかサプリメント等の健康補助食品が注目されている。サプリメントとして用いられているフラボノイドはポリフェノールの一種で、種々の野菜や果物に存在し、抗炎症作用、抗酸化作用、抗菌作用、抗腫瘍作用などの生理作用を有し、現在いくつかのフラボノイドがサプリメントとして商品化されている。しかし、アマメシバ(*Sauropus androgynus*) から調製したサプリメントで難治性の呼吸器疾患である閉塞性細気管支炎が発症したことは記憶に新しく、現在簡単に手に入るサプリメント

についても再評価する必要がある。

フラボノイドの一種であるケルセチンは、肥満細胞や好塩基球を安定化させ、ヒスタミンの放出を抑制する効果が期待されている。近年、種々のポリフェノールが細胞保護作用を持つことが報告され、これらの中には細胞保護作用が heme oxygenase (HO)-1 の酵素活性を介していることが報告されている(Juan SH., et al. *Biochem Pharmacol* 69:41, 2005; Wung BS., et al. *Pharmacol Res* 53:113, 2006.)。HO-1 は heme oxygenases の 3 つの isoform の 1 つであり、サイトカインやマイトジェンなどの他さまざまな細胞に対するストレスで発現誘導され、ヘムを代謝することにより産生されるビリベルジンや一酸化炭素(CO)によ

り抗酸化活性を發揮する酵素である(Morse D., et al. *Am J Respir Crit Care Med* 172:660, 2005.)。一方、ヘムの代謝産物であるビリベルジン(さらにビリルビン)や CO はアレルギー反応を抑制することが既に報告されている。しかしながら、ケルセチンの抗炎症反応抑制機構、特に抗アレルギー活性発現の作用機序については現在までのところまだ明確にされていない。

2. 研究の目的

ポリフェノールのひとつであるフラボノイドは果物や野菜などに多く含まれ、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗酸化作用、抗ガン作用などの生理活性を持つことから健康補助食品として期待されている。フラボノイドは 2 つのベンゼン環 (A 環および B 環) が 3 つの炭素原子 (C 環) でつながった構造を基本骨格とし、C 環上の二重結合や化学基によっていくつかの種類に分類される。これまでに 4,000 種以上ものフラボノイドが見つかり、現在活発な研究が行われている。最近フラボノイドは抗炎症活性を持つ酵素である heme oxygenase (HO)-1 を介して細胞保護作用を示すことが報告された。HO-1 はヘムの分解酵素であり、この酵素によりヘムはビリベルジン、鉄、一酸化炭素 (CO)、さらにはビリルビンに分解される。これらの生成物のうち CO およびビリルビンは肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することが報告されている。したがって、フラボノイドの抗アレルギー作用は HO-1 を介している可能性が考えられる。そこで本研究では、フラボノイドの一種であるケルセチン、ミリセチン、ケンフェロールの抗アレルギー作用と HO-1 の関係について検討した。

本研究は抗アレルギー活性を持つフラボノイドについてケルセチンを代表としてその作用機序を解明し、解明した機序をもとに抗アレルギー活性を持つフラボノイド、さらにはその誘導体を用いて新規抗アレルギーさらには抗炎症活性を持つ新規薬剤を開発することを目的とするとともにサプリメントの作用機序について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ポリフェノールの中には HO-1 を誘導し、HO-1 の酵素活性を介して細胞保護作用を發揮するものが報告されている(Juan SH., et al. *Biochem Pharmacol* 69:41, 2005; Wung BS., et al. *Pharmacol Res* 53:113, 2006.)。またマクロファージはケルセチン存在下に HO-1 を発現し、

iNOS を抑制していることが報告されている (Chow JM., et al. *Biochem Pharmacol* 69:1839, 2005; Lin HY., et al. *Biochem Pharmacol* 66:1821, 2003)。そこで予備実験で既に確認している肥満細胞でのケルセチンによる HO-1 発現誘導について詳細に検討した。HO-1 は抑制性のサイトカインの代表である IL-10 のシグナル下で発現し、IL-10 の重要な効果相のタンパク質であることが報告されている (Lee TS. and Chau LY. *Nat. Med.* 8:240, 2002)。また、HO-1 がヘムを代謝することにより産生されるビリルビンや一酸化炭素(CO)は、全く別の研究よりそれぞれ単独でアレルギー性炎症を軽快させることが報告されている。このような過去の報告を総合して研究を計画し、推進した。

1. フラボノイドによる肥満細胞での HO-1 誘導の確認

肥満細胞にフラボノイドを曝露させ HO-1 の発現量を確認した。発現量は real-time PCR 法を用いて mRNA および Western blot 法によりタンパク質を検討した。肥満細胞には 2 種類存在するので、粘膜型肥満細胞としてラット肥満細胞株 (RBL-2H3) および IL-3 存在下に骨髓より誘導した肥満細胞を、また結合組織型肥満細胞としてラット腹腔滲出細胞 (PEC) を用いて検討した。

2. 肥満細胞でフラボノイドにより誘導された HO-1 の脱顆粒抑制効果についての確認

フラボノイドにより誘導された HO-1 が実際に肥満細胞の脱顆粒抑制効果に関与しているかどうかを確認するために HO-1 の誘導剤である hemin ならびに阻害剤である tin protoporphyrin IV (SnPP) を用いた。肥満細胞に脱顆粒を誘導する刺激としては A23187、ならびにより生理的な IgE からのシグナルを用いた。脱顆粒の指標としてはヒスタミン濃度を HPLC によりあるいは β -hexosaminidase 活性を吸光度により測定した。

3. 肥満細胞でのフラボノイドによる HO-1 誘導に関わる経路についての検討

HO-1 の発現は転写活性化因子 Nrf2 と転写抑制因子 Bach1 により拮抗的に制御されることが既に知られている。フラボノイド存在下で肥満細胞に HO-1 の発現が見られたので、Nrf2 の核内移行について、免疫蛍光染色で評価した。

4. 研究成果

1. フラボノイドによる抗アレルギー作用

はじめにフラボノイドの抗アレルギー作用を確認した。その結果、フラボノイドは濃度および曝露時間依存的に脱顆粒を抑制し

た。図 1 にケルセチンによる脱顆粒抑制効果を示す。

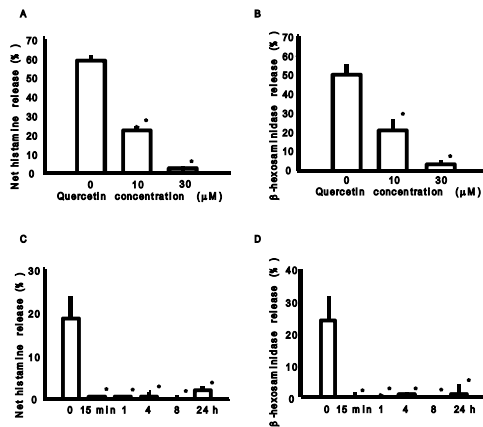


Fig. 1. Effect of quercetin on degranulation in RBL-2H3 cells.

(A, B) Cells were exposed to various concentrations (0, 10, 30 mM) of quercetin for 15 min. At the end of incubation, cells were stimulated with A23187 (5×10^{-7} M) for 15 min. (C, D) Cells were exposed to quercetin (30 mM) for the indicated times (0, 15 min, 1, 4, 8, 24 hours). At the end of the incubation, cells were stimulated with A23187 (5×10^{-7} M) for 15 min. The release of histamine (A, C) and β-hexosaminidase (B, D) was determined, and values are expressed as mean \pm S.D. of a representative result in triplicate of three independent experiments. *, Significantly different from the data at concentration and time zero of quercetin treated, respectively ($p < 0.05$).

2. フラボノイドによる HO-1 の発現誘導効果

次に RBL-2H3 細胞においてフラボノイドによる HO-1 の発現を評価した。フラボノイドは曝露により HO-1 mRNA および 蛋白の発現を誘導し、その発現は 24 時間後まで持続することが明らかとなった。また、免疫組織化学染色においてもフラボノイド曝露によって HO-1 蛋白の発現を確認することができた。図 2 にケルセチンによる HO-1 の発現誘導効果を示す。

以上の結果より、フラボノイドは肥満細胞において HO-1 の発現を増加させることが明らかとなった。

3. フラボノイドの脱顆粒抑制効果と HO-1 の関係

次にフラボノイドの脱顆粒の抑制効果と HO-1 の関与について HO-1 の拮抗阻害剤である SnPP および HO-1 の誘導剤である hemin を用いて検討した。その結果、SnPP によってフラボノイドによる脱顆粒の抑制が解除され、フラボノイドの抗アレルギー作用には HO-1 が関与していることが明らかとなった。さらに、フラボノイド曝露後すぐに HO 活性が上がることも明らかとなった。図 3 にケルセチンでの結果を示す。

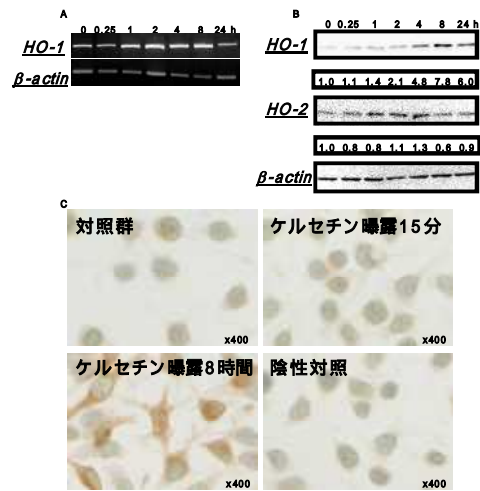


Fig. 2. Expression levels of HO-1 mRNA and protein in RBL-2H3 cells.

RBL-2H3 cells were treated with quercetin (30 mM) for the indicated times (0, 15 min, 1, 2, 4, 8, 24 hours). The expression of HO-1 mRNA were shown by RT-PCR (A, upper) and determined quantitative changes by real-time PCR (A, lower). The expression of HO-1 protein was determined by Western blotting (B) and immunocytochemistry (a; 0 min, b; 15 min, c; 8 hours, d; negative control) (C). Experiments were run independently three times and a representative result is shown.

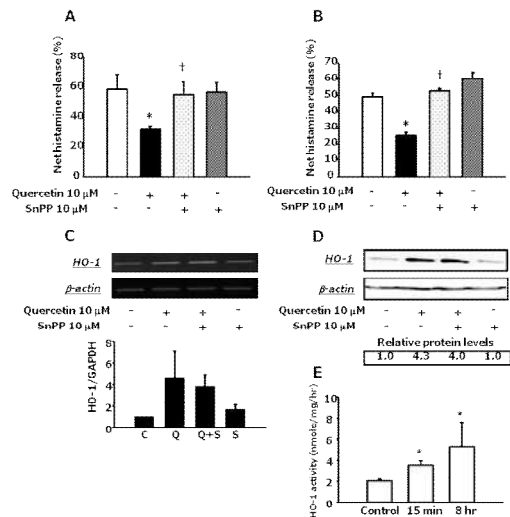


Fig. 3. Effect of SnPP on degranulation and HO-1 mRNA and protein levels after exposure to quercetin.

Cells were treated with or without SnPP (10 mM) for 1 h, following treatment with quercetin (10 mM) for 15 min (A) and 8 hours (B). At the end of incubation, cells were stimulated with A23187 (5×10^{-7} M) for 15 min. The release of histamine was determined. Values are expressed as a percentage of total histamine release. Expression of HO-1 mRNA and protein after exposure to quercetin for 8 hours were shown by RT-PCR (C, upper), real-time PCR (C, lower), and Western blotting (C, control; Q, quercetin; S, SnPP, Q+S, quercetin+SnPP) (D). Microsomal fraction of treated cells was performed for measurement of HO activity (E). Values are expressed as mean \pm S.D. of a representative result in triplicate of three independent experiments. *, Significantly different from the data at concentration zero of quercetin and SnPP ($p < 0.05$). †, Significantly different from the data at concentration 10 mM of quercetin ($p < 0.05$).

4. hemin による脱顆粒抑制効果

hemin は HO-1 発現誘導剤である。Hemin はフラボノイドと同様に脱顆粒を抑制し、HO-1 には脱顆粒を抑制する効果を示すことも明らかとなった (図 4)。

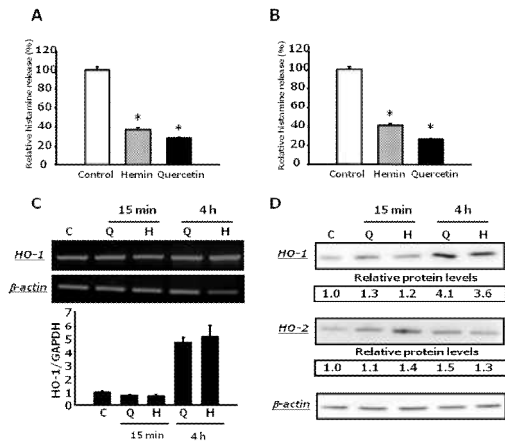


Fig. 4. Effect of hemin on degranulation and HO-1 mRNA and protein levels in RBL-2H3 cells. Cells were treated with hemin (100 mM) or quercetin (10 mM) for 4 hours (A) or 15 min (B). At the end of incubation, cells were stimulated with A23187 (5×10^{-7} M) for 15 min. Release of histamine was determined, and the results were shown as the relative histamine release compared to control. Expression of HO-1 mRNA was shown by RT-PCR (C, upper) and determined quantitative changes by real-time PCR (C, lower). The expression of HO-1 protein were determined by Western blotting (D). Values are expressed as mean \pm S.D. of a representative result in triplicate of three independent experiments. *, Significantly different from the data of control ($p < 0.05$).

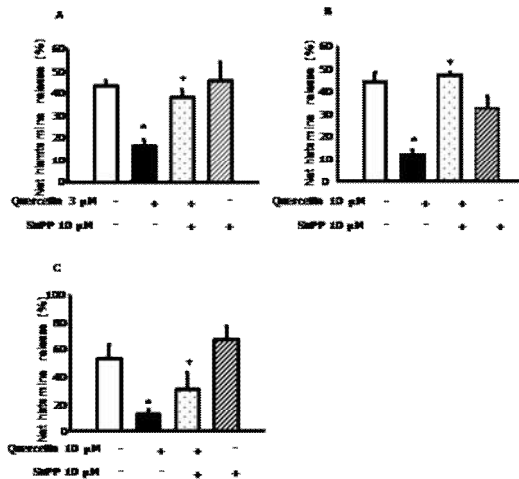


Fig. 5. (A) Effect of HO-1 induced by quercetin on IgE-mediated degranulation in mast cells. Cells were treated with or without SnPP (10 mM) for 1 hour, following treatment with quercetin (3 mM) for 15 min. At the end of incubation, cells were stimulated with DNP-IgE and DNP-BSA. (B) Effect of HO-1 induced by quercetin on degranulation in primary-cultured mast cells. Rat PEC (B) and mouse BMMC (C) were treated with or without SnPP (10 mM) for 1 hour, following treatment with quercetin (10 mM) for 15 min. At the end of incubation, cells were stimulated with A23187. Release of histamine was determined. Values are expressed as mean \pm S.D. of a representative result in triplicate of three independent experiments. *, Significantly different from the data at concentration zero of quercetin and SnPP ($p < 0.05$). †, Significantly different from the data at concentration 10 mM of quercetin ($p < 0.05$).

5. フラボノイドによる IgE 刺激による脱顆粒抑制効果と HO-1 の関係

フラボノイドは IgE 刺激における脱顆粒も抑制し、この脱顆粒抑制効果は HO-1 阻害剤

によって抑制された。さらに、ラット腹腔肥満細胞およびマウス骨髄由来肥満細胞でも同様の効果が確認できた。図 5 にケルセチンを用いた脱顆粒抑制効果の結果を示す。

6. フラボノイドによる Nrf2 の核内移行と HO-1 代謝産物による脱顆粒抑制効果

HO-1 の代謝産物であるビリルビンおよび CO は脱顆粒を抑制し、フラボノイド曝露後、Nrf2 を核内へ移行することも明らかとなった (図 6)。以上の結果より、フラボノイドによる HO-1 の発現増強には Nrf2 が関与しており、さらに HO-1 によって産生された CO が抗アレルギー作用に関与している可能性が示唆された。

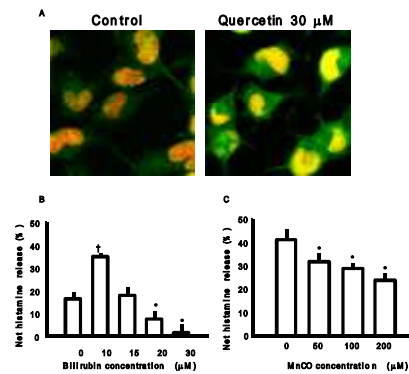


Fig. 6. Effects of Nrf2 translocation, bilirubin, and CO on degranulation by quercetin in RBL-2H3 cells. Immunofluorescent staining of Nrf2 in RBL-2H3 cells (A). Cells were exposed to quercetin for 4 hours and stained for Nrf2 using FITC-labeled anti-Nrf2 antibody. Nuclei were detected with PI. Cells were treated with various concentrations of bilirubin (0, 10, 15, 20, 30 μM) (B) and MnCO (0, 50, 100, 200 mM) (C) for 15 min, following stimulation with A23187 (5×10^{-7} M) for another 15 min. Release of histamine was determined. Values are expressed as mean \pm S.D. of a representative result in triplicate of three independent experiments. *, †, Significantly different from the data at concentration zero of bilirubin ($p < 0.05$).

以上の結果より、肥満細胞においてフラボノイドは HO-1 蛋白の発現および HO 活性を増加させることによって抗アレルギー作用を示すことが明らかとなった。今後、抗アレルギー作用を持つ様々なフラボノイドとその構造の相関を検討し、抗アレルギー作用を示すのに重要な構造を探索することで新規抗アレルギー薬の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Ota Y., Matsushima M., Ogawa M., Hirose E., Hirayama T., Yuasa E., Yabuta K., Baba K., Hasegawa Y., Takagi K., Kawabe T. Inhibition of Degranulation by Myricetin-induced Heme Oxygenase-1 in Mast Cells. *Occupational and*

- Environmental Allergy*, **16** (2) 61-73. 2009 査読有
2. Matsushima M., Hirose E., **Takagi K.**, Ota Y., Ishigami K., Hirayama T., Hayashi Y., Nakamura T., Hashimoto N., Imaizumi K., Baba K., Hasegawa Y., **Kawabe T.** Involvement of Heme Oxygenase-1 in Kaempferol-induced Anti-allergic Actions in RBL-2H3 Cells. *Inflammation*, **32** (2) 99-108, 2009 査読有
 3. Matsumoto N., Okochi M., Matsushima M., Ogawa A., Takase T., Yohida Y., Kawase M., Isobe K., **Kawabe T.**, Honda H. Development of peptide arrays for detection of IgE-binding epitopes in cow's milk allergens. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **107** (3) 324-330, 2009 査読有

〔学会発表〕(計13件)

1. 太田裕以、松島充代子、平山達也、**川部 勤**. Myricetin involved heme oxygenase-1 in its anti-allergic actions. **第38回日本免疫学会**, 2008. 12. 1 京都
2. **川部 勤**、松島充代子、松本直樹、伊藤浩明、坂本龍雄. ミルクアレルギー患者のIgE認識エピトープの高集密ペプチドアレイによる検討. **第58回日本アレルギー学会総会**, 2008. 11. 29 東京
3. 平山達也、**川部 勤**、松島充代子、太田裕以、**高木健三**. グレリンによる肥満細胞活性化機序の検討. **第58回日本アレルギー学会総会**, 2008. 11. 27 東京
4. 太田裕以、**川部 勤**、松島充代子、平山達也、**高木健三**. 構造によるフラボノイドの抗アレルギー作用の検討. **第58回日本アレルギー学会総会**, 2008. 11. 27 東京
5. 本多裕之、加藤竜司、竹下敏一、大河内美奈、**川部 勤**、松島充代子、松本直樹、坂本龍雄、廣瀬悦子、川瀬三雄、吉田安子、高瀬智和、小川昭子. ミルクアレルギー診断のための高集密ペプチドアレイの作製と解析. **化学工学会第40回秋季大会**, 2008. 9. 25
6. 太田裕以、**川部 勤**、松島充代子、廣瀬悦子、平山達也、**高木健三**. ケンフェロールの抗アレルギー活性発現におけるHO-1の役割. **第39回日本職業・環境アレルギー学会**, 2008. 7. 19
7. 太田裕以、**川部 勤**、松島充代子、平山達也、**高木健三**. ミリセチンの抗アレルギー作用機序の検討. **第20回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 2008. 6. 12
8. 松島充代子、**川部 勤**、廣瀬悦子、太田裕以、平山達也、**高木健三**. 肥満細胞におけるケルセチンの抗アレルギー作用機序の検討. **第128回日本薬学会**, 2008. 3. 28
9. 太田裕以、**川部 勤**、松島充代子、廣瀬悦子、**高木健三**. heme oxygenase(HO)-1誘導を介したミリセチンによる脱顆粒の抑制. **第128回日本薬学会**, 2008. 3. 27
10. 松島充代子、**川部 勤**、廣瀬悦子、太田裕以、**高木健三**. Anti-allergic actions of quercetin are mediated by heme oxygenase-1 in RBL-2H3 cells. **第37回日本免疫学会**, 2007. 11. 21 東京
11. 太田裕以、**川部 勤**、松島充代子、松本直樹、廣瀬悦子、**高木健三**. 肥満細胞におけるケルセチンのHO-1活性化制御の検討. **第57回日本アレルギー学会総会**, 2007. 11. 2 東京
12. 廣瀬悦子、**川部 勤**、松島充代子、松本直樹、太田裕以、**高木健三**. ケンフェロールの抗アレルギー作用におけるHeme oxygenase (HO)-1の役割. **第57回日本アレルギー学会総会**, 2007. 11. 2 東京
13. 松島充代子、**川部 勤**、小川三由紀、廣瀬悦子、古部裕子、太田裕以、安部文江、**高木健三**. ケルセチンの抗アレルギー作用におけるheme oxygenase (HO)-1の役割. **第19回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 2007.6.30 横浜.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 健三 (TAKAGI KENZO)
名古屋大学・医学部(保健学科)・教授
研究者番号: 50093050

(2)研究分担者

川部 勤 (KAWABE TSUTOMU)
名古屋大学・医学部(保健学科)・准教授
研究者番号: 20378219