

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K02344

研究課題名(和文) 地域活性化を視野に近畿圏産伝統野菜の抗アレルギー成分の検索と免疫応答性の解明

研究課題名(英文) Antiallergic activities of Japanese leaf burdock extract in a rat basophilic leukemia cell line

研究代表者

高橋 享子 (TAKAHASHI, Kyoko)

武庫川女子大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号：50175428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー症状の治療には、薬剤だけでなく食品由来の天然成分も注目されている。そこで、八尾若ごぼう茎部に着目し、アレルギーモデル細胞を用いた抗アレルギー効果の探索並びに成分同定、作用機序を検討した。その結果、熱水抽出部をHP-20カラムに吸着し99%エタノール分画部をHPLC, LC-MS, NMRで解析した結果、抗アレルギー性成分は、オノポルドピクリン(OPP)と同定された。また、PMA/A23187刺激によるヒスタミン放出に対してもOPPは抑制効果を示した。さらに、OPPは、シグナル伝達タンパク質IKK のチオール基に結合することにより、アレルギーのシグナル伝達を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国全人口の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患し、近年急速に患者が増加している。症状として、くしゃみや鼻汁、鼻づまり、目のかゆみなどが引き起こされ、日常生活に大きな支障をきたしQOLの低下を招く。そのため、食品由来の天然成分として、地場特産野菜の若ごぼうに着目し、抗アレルギー成分を精製し、LC-MS, NMRによりオノポルドピクリン(OPP)と同定した。OPPは、ヒスタミン放出抑制やアレルギーシグナルタンパク質の活性を抑制することも明らかにした。この結果から、OPPのヒトに対する安全性などを確認し、安全性のある抗アレルギー性機能成分とした研究デザインに期待される。

研究成果の概要(英文)：In addition to drugs, natural ingredients derived from food are also attracting attention for the treatment of allergic symptoms. Therefore, we focused on the stems of Yao-young burdock and investigated the anti-allergic effect using allergy model cells, as well as identifying the components and investigating the mechanism of action. As a result, the hot water extract was adsorbed onto an HP-20 column and the 99% ethanol fraction was analyzed by HPLC, LC-MS, and NMR, and the anti-allergic component was identified as onopoldopicrin (OPP). OPP also showed an inhibitory effect on histamine release induced by PMA/A23187 stimulation. Furthermore, we revealed that OPP inhibits allergic signal transduction by binding to the thiol group of the signal transduction protein IKK .

研究分野：栄養免疫学

キーワード：抗アレルギー成分 OPP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に罹患し、近年急速に患者が増加している。なかでも、アトピー性皮膚炎や花粉を含む鼻アレルギー症状の有病率は 12%と 47%と深刻な問題を有している。アレルギー疾患の発症は、肥満細胞から放出されるヒスタミンやセロトニンの脱顆粒が原因である。代表的な症状として、くしゃみや鼻汁、鼻づまり、目のかゆみなどが引き起こされ、アレルギー症状は日常生活に大きな支障をきたし QOL の低下を招く。そのため、薬剤だけでなく食品由来の天然成分も注目されている。

我が国の地方自治体では地域のブランド化を進めており、地域の特産野菜 (地場特産野菜) を活用する団体も存在する。また、教育面においても、学校給食に於ける「伝統的食文化の継承」および「地産地消の推進」は食育の重点事項である。また、一般野菜と地場特産野菜の違いを代謝産物レベルで比較し、付加価値の更なる向上を目指した。

そのため、地場特産野菜の付加価値発掘は、多分野 (食品機能、学校教育、農業) を巻き込み国家の重要課題 (アレルギー有病者の QOL 向上並びに地元食材を活用した地域活性化・食育活動) の解決を目指すモデル事業と考えた。

2. 研究の目的

地場特産野菜 (特に近畿圏) に着目し、アレルギーモデル細胞を用いた抗アレルギー効果の探索並びに成分同定、作用機序を検討する。さらに、LC-MS による網羅的成分を行い、活性成分の植物内生成過程の推定も試みた。

3. 研究の方法

兵庫県・大阪府を中心に季節の地場特産野菜を実験試料とした。地場特産野菜は部位ごとに分けた後、凍結乾燥し、熱水や 70% エタノールで成分を抽出した。抗アレルギー効果の認められた野菜試料は、HP-20 カラム樹脂を用いたオープンカラムクロマトグラフィーや HPLC による単離精製を行い、成分の同定を行った。

抗アレルギー効果のスクリーニングには、ラット好塩基球白血病 (RBL-2H3) 細胞を用いた。抗アレルギー効果は、細胞からのアレルギー関連成分 (β -ヘキソサミニダーゼ、ヒスタミン、サイトカイン 他) の放出阻害率で評価した。

4. 研究成果

(1) 抗アレルギー効果を持つ地場特産野菜の発掘と活性成分の同定

12 種類のうち、八尾若ごぼう茎部の熱水抽出物に最も強い抗アレルギー効果が認められた。八尾若ごぼう茎部の熱水抽出物を HP-20 カラムを用いたエタノールステップワイズ法で分画した結果、99% エタノール溶出画分 (99% EtEx) に最も強い抗アレルギー活性が認められた。この分画部を HPLC 分析したところ、3 つのピークが認められた。3 つのピークのうち 1 つに強い抗アレルギー効果が認められた。このピークを LC-MS と NMR で解析した結果、オノポルドピクリン (OPP) と同定された (図 1)。精製した OPP を用いて細胞実験を行った結果、アレルギー刺激による脱顆粒を添加量依存的に阻害した。また、PMA/A23187 刺激によるヒスタミン放出に対しても OPP は抑制効果を示した。以上の結果より、八尾若ごぼうの抗アレルギー効果に OPP が関与していることが明らかとなった。

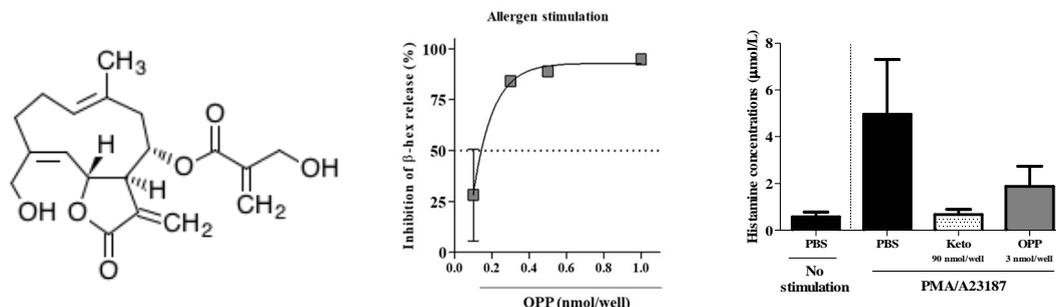


図 1. OPP の構造 (KEGG:C09520) と抗アレルギー実験結果

(2) OPP の抗アレルギー作用機序

OPP はセスキテルペンラクトンのゲルマクラノリド類に分類される化合物である。この構造の最も基本的な化合物として、コスツノリドがある。この化合物は、IKKβ の 179 番目のシステインに結合し、IKKβ 活性を阻害することが報告されている。この IKKβ は脱顆粒反応において非常に重要な役割を果たす。そこで、OPP の抗アレルギー作用機序として、タンパク質のシステイン残基 (チオール基) への結合性と IKKβ の活性阻害に着目した。

OPP のシステイン残基への結合性をシステアミンで消失させた結果、OPP による抗アレルギー効果も消失した。また、OPP は IKKβ の活性を濃度依存的に抑制した。以上の結果より、OPP は IKKβ などのシグナル伝達タンパク質のチオール基へ結合し、抗アレルギー効果を発揮していると示唆された。

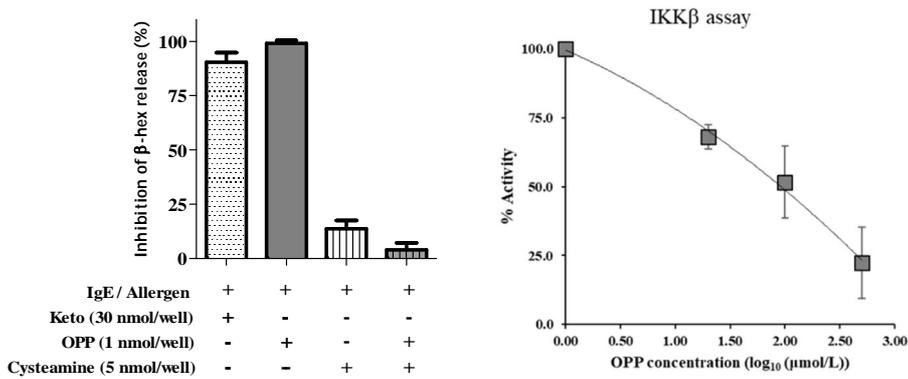


図 2. OPP の抗アレルギー作用機序の検討

(3) 八尾若ゴボウにおける OPP 生合成過程の推定

2019 年と 2021 年に複数の農家 (各年 3 カ所, 計 6 カ所) より八尾若ゴボウを購入し、凍結乾燥後に 70%エタノールで抽出し OPP 含量を HPLC で測定した結果、若ごぼう葉部の OPP 量は茎部よりも 27 倍高かった (2133±612 vs 91.7±47.6 μg/g of 凍結乾燥試料)。

2019 年収穫で OPP 含量が多い葉 (19H-L, 3063 μg/g) と少ない葉 (19L-L, 1415 μg/g) 並びに 2021 年収穫で OPP 含量が多い葉 (21H-L, 2541 μg/g) と少ない葉 (19L-L, 1656 μg/g) を LC-MS で代謝物を網羅的に測定した。その結果、6335 個のピークが検出された。溶出時間 18.3 分の分子量は OPP と同じであった。また、19H-L のピーク面積を 100 とした時の各試料の比率は、21H-L で 76、19L-L で 59、21L-L で 63 であった。19H-L の OPP 含量を 100 とした時の各試料の比率は、21H-L で 83、19L-L で 46、21L-L で 54 であった。LC-MS のピーク面積と HPLC の OPP 含量の比率が似た傾向を示したことから、溶出時間 18.3 分のピークは OPP であると示唆された。推定された OPP の溶出時間とピーク面積を踏まえて、OPP の類縁化合物である Arctiopicrin と Eupatoriopicrin を推定した。さらに、中間代謝産物 (関連化合物 X) についても、OPP との類似構造であることを踏まえて推定した。これらの分析結果と過去の文献報告 (Farnesyl diphosphate Eupatolide Eupatoriopicrin) を踏まえて、八尾若ゴボウの OPP 生合成過程を図 3 のように推定した。

表 1 . 八尾若ゴボウの網羅的代謝産物分析結果 (一部抜粋)

m/z [M+H] ⁺	推定 分子式	溶出 時間 (min)	ピーク面積				推定 化合物
			19H-L	21H-L	19L-L	21L-L	
333.170	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	18.55	96,548	73,731	46,330	60,663	関連化合物 X
351.180	C₁₉H₂₄O₆	18.30	14,182,850	10,725,283	8,320,827	8,896,958	OPP
335.185	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	23.20	459,110	388,535	1,045,375	169,263	関連無
349.165	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	18.55	87,907	94,246	39,062	74,694	Arctiopicrin
	C ₂₀ H ₂₆ O ₆		ピークが検出されなかった。				
363.180	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	16.94	214,525	51,228	35,458	36,377	Eupatoriopicrin

推定化合物は、推定分子式と溶出時間、ピーク面積などから推定した。

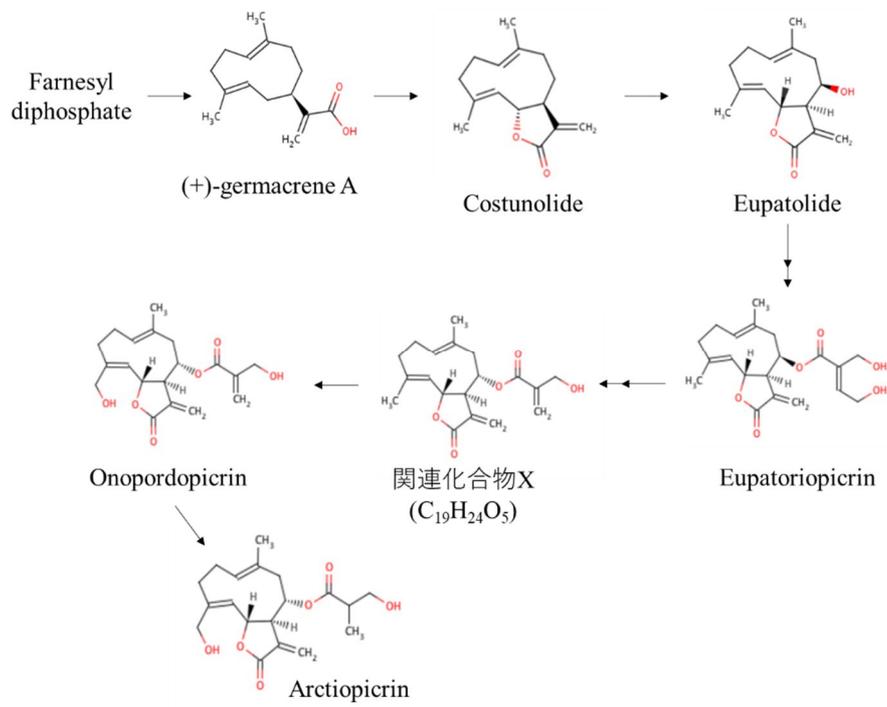


図 3. 八尾若ゴボウにおける OPP の推定生成過程

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 石川朋華、前田晃宏、高橋享子	4. 巻 11
2. 論文標題 兵庫県産短根ごぼう茎の脱顆粒抑制効果と活性成分の同定	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 栄養科学研究雑誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeta Akihiro, Ishikawa Honoka, Takahashi Kyoko	4. 巻 45
2. 論文標題 Antiallergic activities of Japanese leaf burdock extract in a rat basophilic leukemia cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Food Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.13996	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 Ishikawa H, Maeta A, Takahashi K
2. 発表標題 Anti-allergic effect of onopordopicrin containing Japanese leaf burdock
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川朋華、前田晃宏、高橋享子
2. 発表標題 抗アレルギー作用を有する近畿圏内地場産物の探索
3. 学会等名 第60回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------