

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05895

研究課題名(和文) パッションフルーツ種子に含まれる機能成分スキルプシンBの保健機能と作用機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of health functions of scirpusin B from passion fruit seeds

研究代表者

菅原 卓也 (Sugahara, Takuya)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：00263963

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)：抗アレルギー効果として脱顆粒抑制効果を検討したところ、IgE産生抑制効果に加え、trans-Scirpusin B(t-SB)は、脱顆粒を抑制した。これは、脱顆粒の際に生じる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制による作用であった。IgE産生抑制効果についてはGnetin Cの比活性はt-SBの約5倍であり、脱顆粒抑制効果に関してはt-SBが最も強かった。スチルベン骨格の水酸基の数が抗アレルギー効果の強さに関係していると推察された。鼻炎モデルマウスに対するt-SBの経口投与により、鼻炎症状に減少傾向、血中IgEおよびIgG1に減少傾向が認められた。血中IL-4は、非感作群と同レベルまで低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、パッションフルーツ種子に多く含まれるResveratrol、Piceatannol、trans-Scirpusin BおよびGnetin Cといった類縁化合物の抗アレルギー効果および抗炎症効果、およびその作用メカニズムが明らかになった。また、類縁化合物の構造活性相関研究から、スチルベン骨格の水酸基の数が抗アレルギー効果には重要であることが推察された。現在、パッションフルーツ種子は、機能性素材として注目されてきており、この研究成果は、パッションフルーツ種子を活用した機能性食品、特に抗アレルギー効果のある製品開発を加速すると期待でき、学術的意義に加え、社会的意義もある成果である。

研究成果の概要(英文)：When the degranulation inhibitory effect was examined as an antiallergic effect, trans-Scirpusin B (t-SB) suppressed degranulation in addition to the IgE production inhibitory effect. This was due to the suppression of the increase in intracellular calcium ion concentration that occurs during degranulation. The specific activity of Gnetin C was about 5 times higher than that of t-SB for the effect on suppressing IgE production, and t-SB was the strongest for the effect on suppressing degranulation. It was speculated that the number of hydroxyl groups in the stilbene skeleton is related to the strength of the anti-allergic effect. Oral administration of t-SB to rhinitis model mice showed a tendency to decrease in rhinitis symptoms and a tendency to decrease blood IgE and IgG1. Blood IL-4 decreased to the same level as in the non-sensitized group.

研究分野：食品機能学

キーワード：パッションフルーツ スキルプシンB 抗アレルギー効果 抗炎症効果 脱顆粒抑制効果 グネチンC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パッションフルーツ種子の機能性食品素材としての有効活用を目的として研究を開始した。パッションフルーツ種子は、ジュース製造の際、その多くが廃棄されているものの、生物資源の有効活用の観点から、パッションフルーツ種子成分の保健機能の解明に取り組んだ。種子成分を種々の溶媒で抽出し、その保健機能を検討した結果、花粉症などの Ⅰ型アレルギーの発症原因である IgE 抗体の産生を抑制する効果 (B リンパ球に対する効果) および IgE 抗体とアレルゲンによる刺激で誘導されるヒスタミン (アレルギー症状を発症する原因物質) の放出 (脱顆粒) を抑制する効果 (好塩基球やマスト細胞に対する効果) があることが明らかになった。パッションフルーツ成分の脱顆粒抑制効果については、レスベラトロールやピセアタンノールなど既報であったため、IgE 産生抑制効果に着目して研究を進めたところ、パッションフルーツ種子に特徴的に含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールおよびピセアタンノールが活性物質であることが明らかになり、報告した (*J. Funct. Foods*, 32, 176-184, 2017)。さらに研究を進めたところ、ピセアタンノールの二量体であり、パッションフルーツ種子に豊富に含まれる *trans*-スキルプシン B にも IgE 産生抑制効果および脱顆粒抑制効果があることが確認された。これまで、スキルプシン B の機能性に関する研究報告は極めて少ない。スキルプシン B の培養系および生体内における抗アレルギー効果をはじめとする保健機能の解明、および類縁化合物の活性を比較することによる構造活性相関の解明は、学術的意義が高いと考え、スキルプシン B の保健機能の解明を目標とするとともに、パッションフルーツ種子の機能性食品素材としての高付加価値化への糸口を見出すことを目指した。

2. 研究の目的

本研究は、下記の 3 点を明らかにすることを目指した。

- (1) スキルプシン B およびその類縁化合物の IgE 産生抑制と脱顆粒抑制による抗アレルギー効果および抗炎症効果の解明
- (2) オポアルブミン誘導性アレルギー性鼻炎モデルマウスに対するスキルプシン B の経口投与の効果の解明
- (3) スキルプシン B 類縁化合物の構造活性相関の解明

パッションフルーツの種子に特徴的に含まれるスキルプシン B およびその類縁化合物 (図 1) の保健機能を学術的に明らかにすることにより、これまで利用が進んでおらず、多くが廃棄されているパッションフルーツ種子の機能性食品素材としての活用が期待できる。本研究で得られた成果を発展させ、将来的にはヒト介入試験により摂取効果を実証することでパッションフルーツ種子を用いた機能性食品を開発し、本研究で得られた学術的成果の社会実装を目指すことを目的とした。

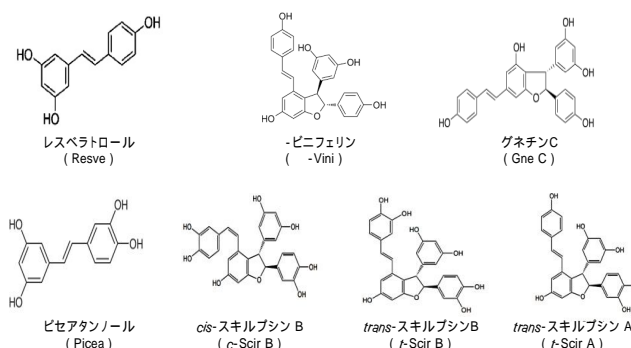


図 1 スキルプシン B 類縁化合物

3. 研究の方法

(1) 抗アレルギー効果の評価

花粉症に代表されるアレルギーは、Ⅰ型アレルギーに分類され、リンパ球の一種である B 細胞が産生する IgE が原因となり発症する。花粉症の場合、体内に侵入した花粉を抗原 (アレルゲン) として特異的に認識し結合する IgE が形質細胞 (B 細胞が成熟した細胞) により産生される。IgE は、好塩基球やマスト細胞の細胞表面上に存在する高親和性 IgE 受容体 RceRI に結合する。そこに、抗原である花粉が再度体内に侵入すると、花粉は IgE と結合し、これが刺激となり好塩基球やマスト細胞内に脱顆粒シグナルが伝達され、ヒスタミンなどのアレルギー症状を引き起こす物質を内包した顆粒が細胞外に放出される。これを脱顆粒という。放出されたヒスタミンが粘膜細胞や血管内皮細胞を刺激し、アレルギー症状を発症する。アレルギー症状を軽減するには、形質細胞による IgE の産生を抑制するか、あるいは好塩基球やマスト細胞による脱顆粒を抑制するか、いずれかの方法が有効である。

IgE 産生抑制効果

IgE を産生するヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞を、サンプルを添加した RPMI 1640 培地に 1×10^5 cells/mL の細胞密度で 96 穴培養プレートに接種し、24 時間培養後に培養上清中の IgE 濃度を酵素抗体法で測定した。また、細胞毒性は WST-8 法で測定した。

脱顆粒抑制効果

ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞を用い、ジニトロフェニル (DNP) 特異的 IgE を加えた 5% ウシ胎児血清添加 DMEM 培地で 20 時間、96 穴培養プレートで前培養した。培養液を除去し、タイロッド緩衝液で 2 回細胞を洗浄した後に、サンプルを添加したタイロッド緩衝液を加え、40 分間インキュベートした。タイロッド緩衝液を除去した後に、抗原である DNP-ヒト血清アルブミン複合体を加えたタイロッド緩衝液に交換し、30 分間インキュベートした。その後、96 穴培養プレートを 10 分間氷冷した後、上清を回収した。上清回収後、プレートに 0.1% TritonX-100 溶液を添加し、細胞を超音波により破碎し、細胞破碎液を調製した。

回収した上清と調製した細胞破碎液について、ヒスタミンと同様に顆粒中に内包されている -ヘキソサミニダーゼの酵素活性を定量評価し、顆粒放出率(上清の -ヘキソサミニダーゼ量を、上清と細胞破碎液の -ヘキソサミニダーゼ量の合計で除したものを)を算出した。また、細胞毒性は WST-8 法で測定した。

(2) 抗炎症効果の評価

微生物細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) で炎症応答を誘導したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞のインターロイキン (IL)-6 および腫瘍壊死因子 (TNF)- α 産生に及ぼす効果の評価した。RAW264.7 細胞を細胞密度 1×10^5 cells/mL となるように、サンプルを添加した 10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地に接種した。96 穴培養プレートにて 6 時間培養後、培養上清中の IL-6 および TNF- α 濃度を ELISA キット (BioLegend 社製) を用いて測定した。また、細胞毒性は WST-8 法で測定した。

(3) アレルギー性皮膚炎モデルマウスに対する投与効果の評価

メス 4 週齢の BALB/c マウスを搬入後、一週間馴化させた後に、非感作群、対照群、*trans*-スキルプシン B (*t*-Scir B) 群、およびピセアタンノール (Picea) 群に群分けし、非感作群以外のマウス腹腔に、2 mg の水酸化アルミニウムを含む水溶液に 25 μ g の卵白アルブミン (OVA) 水溶液を混合して注射した。飼育 0 日目、7 日目、14 日目に注射を繰り返した。

飼育 21 日目から 27 日目までは、毎日、非感作群以外のマウスをイソフルランにより深麻酔した後、10 μ L の OVA 水溶液 (40 mg/mL) を鼻腔内投与し、アレルギー性鼻炎を誘発した。同時に、21 日目から 27 日目の間、*t*-Scir B および Picea を 7.5 mg/kg 体重/day で、毎日単回経口投与した。対照群には、溶媒であるミネラルオイルを同量経口投与した。27 日目に、全個体に 10 μ L の OVA 水溶液 (40 mg/mL) を鼻腔内投与し、くしゃみおよび引っ掻き行動の回数を 10 分間計測した。28 日目に、全個体をイソフルランにより深麻酔し、心臓より全採血を行い安楽死させ、種々の血中パラメータを測定した。なお、本動物実験は、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における実験動物等の実施に関する基本指針」、「動物の処分方法に関する指針」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に定められている実施基準を遵守するとともに、愛媛大学が定める「愛媛大学実験動物規則」を厳に遵守して適正に実施された。また、本研究に関する動物実験の実施は、愛媛大学動物実験委員会により、「アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた食品成分の抗アレルギー効果の評価」(08U24-1) として承認されたプロトコルに基づいて実施された。

4. 研究成果

(1) スキルプシン B およびその類縁化合物の IgE 産生抑制と脱顆粒抑制による抗アレルギー効果および抗炎症効果の解明

IgE 産生抑制効果

レスベラトロール (Resve)、ピセアタンノール (Picea)、その二量体である *trans*-スキルプシン B (*t*-Scir B) をはじめとする計 7 種の類縁化合物について、抗アレルギー効果および抗炎症効果とその作用機構について検討した。

まず、U266 細胞の IgE 産生に対する抑制効果について検討した。検討した 7 種の類縁化合物すべてにおいて、細胞毒性なく IgE 産生を抑制することが明らかになった。中でも、Resve の二量体であるグネチン C (Gne C) の IgE 産生抑制効果は、他の類縁化合物と比較して顕著であり、比活性は、Resve の約 10 倍、*t*-Scir B の約 5 倍であった (図 2)。

IgE 産生抑制効果について、その作用機構を明らかにするため、IgE をコードする mRNA の転写活性に及ぼす効果を検討した。その結果、これら 7 化合物はいずれも IgE の遺伝子発現を抑制した。特に、最も IgE 産生抑制効果が強い Gne C の遺伝子発現抑制作用は顕著であった。IgE 遺伝子発現が抑制されたことから、転写因子である NF- κ B の核内移行に及ぼす *t*-Scir B、Resve、

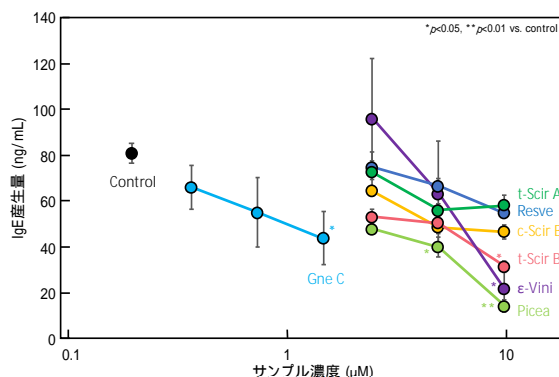


図 2 IgE 産生抑制効果

Picea および Gne C の影響を検討した。その結果、これら 4 化合物はいずれも NF- κ B の核内移行を抑制し、特に Gne C の NF- κ B の核内移行抑制作用は顕著であった。これらの結果から、転写因子の核内移行の抑制により IgE 遺伝子発現が抑制され、産生量の低下に繋がったと示唆された。

脱顆粒抑制効果

ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞に対する α -ヘキソサミニダーゼ放出を指標とした脱顆粒抑制効果（ヒスタミン放出抑制効果）を検討したところ、*t*-Scir B は、細胞毒性なく濃度依存的に脱顆粒を抑制した（図 3）。一方、*cis*-スキルプシン B (*c*-Scir B) および *trans*-スキルプシン A (*t*-Scir A) の脱顆粒抑制効果は、*t*-Scir B よりも弱い効果であることが明らかになった。また、類縁化合物である Picea は非常に強い脱顆粒を抑制効果を示した。一方、図には示していないが、Resve の二量体であり IgE 産生抑制効果が顕著であった Gne C には、脱顆粒抑制効果は認められなかった。

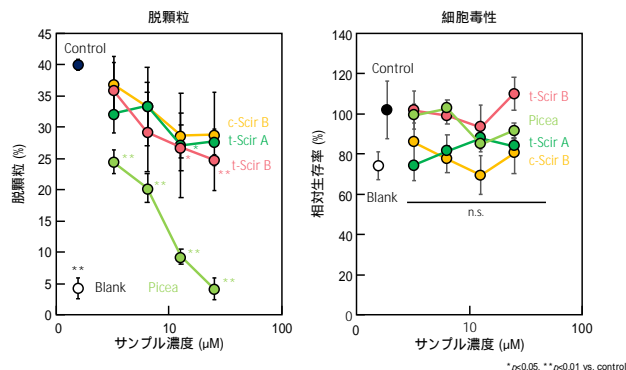


図 3 脱顆粒抑制効果

t-Scir B の脱顆粒抑制効果に関する作用機構を検討したところ、脱顆粒の際に生じる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制することによる効果であることが明らかになった。

抗炎症効果

次に、リポ多糖で炎症誘導したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の炎症性免疫タンパク質であるインターロイキン(IL)-6 産生に及ぼす *t*-Scir B および *c*-Scir B の影響を評価したところ、両化合物に炎症性サイトカイン産生抑制効果が認められたことから、抗炎症効果を持つことが明らかになった。また、類縁化合物である *t*-Scir A および Gne C について検討したところ、特に Gne C は、*c*-Scir B および *t*-Scir A と比較して、わずかな細胞毒性を伴うものの、5 倍程度高い比活性を示した。これら類縁化合物の分子構造の違いは、幾何異性体あるいは数個の水酸基の有無であることから、これらの位置や数が、細胞表面上の受容体との相互作用の強度に影響し、それが活性の強さの違いにつながったのではないかと推察された。また、U266 細胞に対する IgE 産生抑制効果について、転写因子である NF- κ B の核内移行が抑制されることによる効果であることが明らかになっている。また、マクロファージに対する炎症誘導においても NF- κ B の核内移行が促進されることで炎症性サイトカイン産生が亢進することから、これら化合物の抗炎症効果も NF- κ B の核内移行の抑制による効果であると推察された。

(2) オボアルブミン誘導性アレルギー性鼻炎モデルマウスに対するスキルプシン B の経口投与の効果の解明

生体内における抗アレルギー効果を検討するため、OVA によって誘導されたアレルギー性鼻炎に対する *t*-Scir B およびその単量体である Picea の摂取効果を検討した。その結果、Picea の経口投与により、アレルギー性鼻炎症状であるくしゃみおよび引っ掻き行動の回数に、有意ではなかったものの、減少傾向が認められた（図 4）。一方、*t*-Scir B には、症状改善効果は認められなかった。

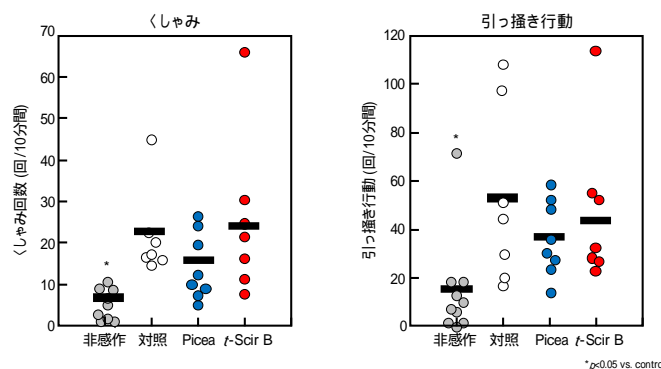


図 4 鼻炎症状改善効果

また、飼育 28 日目の最終感作後の血清中に含まれる抗体およびサイトカイン量について検討したところ、総 IgE 量、抗原特異的 IgE 量、総 IgG1 量、抗原特異的 IgG1 量に関しては、*t*-Scir B および Picea の投与による有意な効果は確認できなかったものの、減少の傾向は観察された。

OVA によるアレルギー誘導に及ぼす効果を検討するため、Th1 サイトカインである IFN- γ 、Th2 サイトカインである IL-4 の血中濃度を測定した。その結果、血中 IL-4 濃度において、コントロール群に対して有意差は認められなかったものの、*t*-Scir B および Picea の経口投与により、非感作群と同レベルまで低下することが確認された。血中 IFN- γ 量については、*t*-Scir B の投与により低下していたことから、抗原誘導性アレルギー応答に何らかの影響を及ぼしていると推察された。今後、さらに詳細な検討が必要である。

(3) スキルブシン B 類縁化合物の構造活性相関の解明

脱顆粒抑制効果に着目して、Scir B およびその類縁化合物の活性と効果との関連性について解析した。強い脱顆粒抑制効果を示した Picea と *t*-Scir B は、スチルベン骨格の 3' 位に水酸基が一つ多く結合していることから、水酸基の数が抗アレルギー効果の強さに関係していると推察された。また、*t*-Scir B と *c*-Scir B を比較すると、結合の方向が変わったことにより、*c*-Scir B は 6 員環および水酸基同士の距離が離れており、このことから水酸基同士の密度が抗アレルギー効果に関係しているのではないかと推察した。

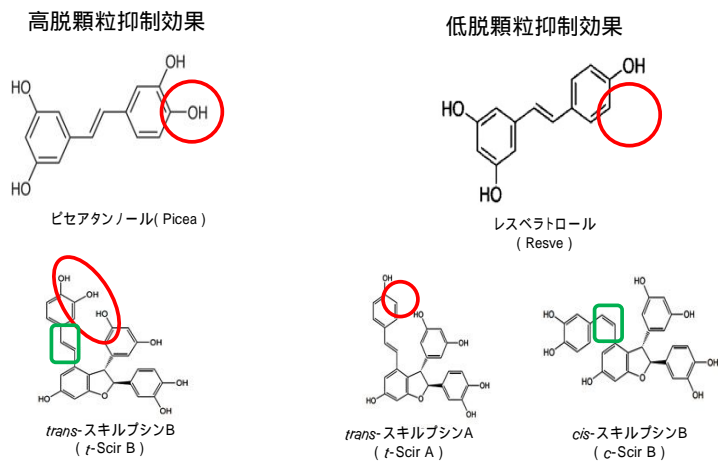


図 5 構造活性相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Ishida, C. Takekuni, K. Nishi, T. Sugahara	4. 巻 13
2. 論文標題 p-Synephrine suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and alleviates systemic inflammatory response syndrome in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food and Function	6. 最初と最後の頁 5229-5239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2F000299J	査読の有無 有
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 Santoso W.H, Ishida M, Nishi K, Sugahara T, Putra A.B.N	4. 巻 In Press
2. 論文標題 Anti-allergy potential of Averrhoa bilimbi Linn. fruit water extract shown by its suppressive effect on the degranulation of RBL-2H3 cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Food and Nutraceutical	6. 最初と最後の頁 In press
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 有
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 該当する

1. 著者名 S. Yamauchi, A. Nishimoto, H. Nishiwaki, K. Nishi, T. Sugahara	4. 巻 30
2. 論文標題 Discovery of stereospecific cytotoxicity of (8R,8'R)-trans-arctigenin against insect cells and structure-activity relationship on aromatic ring.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127191	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuya Sugahara, Ai Mizusaki, Yuki Murakami, Momoko Ishida, Kosuke Nishi
2. 発表標題 Anti-allergy effect of passion fruit seed ethanol extract and identification of the active substances
3. 学会等名 21st World Congress of Food Science & Technology Future of Food: Innovation, Sustainability & Health (IUFoST2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上裕紀, 石田萌子, 西 甲介, 菅原卓也
2. 発表標題 Piceatannol及びその類縁化合物の抗アレルギー効果に関する研究
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上裕紀・水崎 愛・西 甲介・石田萌子・菅原卓也
2. 発表標題 レスベラトロールおよびその類縁化合物の抗アレルギー効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水崎 愛、石田萌子、西 甲介、菅原卓也
2. 発表標題 パッションフルーツ種子成分の抗アレルギー効果に関する研究
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugahara T, Mizusaki A., Ishida M. and Nishi K.
2. 発表標題 Passion fruit seed extract suppressed IgE production.
3. 学会等名 The 16th ASEAN Food Conference 2019 (AFC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学大学院農学研究科 生命機能学専攻 動物細胞工学教育分野/食品機能学教育分野
<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~act/Default.html>

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			
インドネシア	Gadjah Mada University			
インドネシア	i3L			
インドネシア	Indonesian Institute of Sciences			