

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500814

研究課題名（和文） 喘息の慢性化をもたらす気道リモデリングのフラボノイドによる抑制効果の解析

研究課題名（英文） Suppressive effect of flavonoid on mast cell activation related to remodeling in asthma

研究代表者

小堀 真珠子 (KOBORI MASUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：50353941

研究成果の概要（和文）：

活性化T細胞によるマスト細胞の活性化は喘息の慢性化に関わる気道リモデリングに関与している。本研究では、フラボノイドのフィセチンが活性化T細胞によるマスト細胞の活性化を抑制すること、及びその作用機構として、Aktのリン酸化及びそれに続くNF-κB及びMAPキナーゼの活性化を抑制することを明らかにした。フィセチンを含む飼料を自由摂取させることにより、喘息モデルマウスの症状は改善されなかったが、同様のメカニズムで発症する皮膚炎モデルマウスの症状を改善することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mast cell activation by cell-to-cell interaction with activated T cells has been shown to play an important role in remodeling in asthma and other inflammatory responses. The flavonoid fisetin suppressed activation of HMC-1 human mast cells by activated T cell membranes by inhibiting the Akt phosphorylation and the following activation of NF-κB and MAPKs and thereby suppressing gene expression. A diet containing fisetin was suggested to improve the symptoms of dermatitis but not that of asthma in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：フラボノイド、マスト細胞、T細胞、喘息、チロシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) フラボノイドは抗酸化作用、抗がん作用及び抗炎症作用等の様々な生理的機能性を示すが、生体内での作用機構に関しては未だ不明な点も多い。

(2) 一方、喘息の重症化には気道組織のリモ

デリングが深く関与していることが明らかになりつつある。喘息におけるアレルギー症状の慢性化が、平滑筋肥大等の不可逆的な気道リモデリングをひきおこし、一般的な喘息治療薬の効果を無効にすることが報告されている。

(3)気道リモデリングのメカニズムとして、活性化T細胞が接着して起こる炎症組織でのマスト細胞の活性化が示唆されている。

(4)代表研究者らは、フラボノイドが活性化T細胞膜刺激によるHMC-1ヒトマスト細胞活性化に及ぼす影響を検討し、フラボノイドのフィセチンが、活性化T細胞膜刺激により、HMC-1ヒトマスト細胞に誘導される炎症性サイトカインTNF $\alpha$ 等の発現を抑制することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

フラボノイドの気道リモデリング抑制を介したアレルギー抑制機構の解明を最終的な目的として、

(1)活性化T細胞刺激によるマスト細胞の活性化メカニズムの解明及びフィセチン等の抑制機構を検討する。

(2)さらにフラボノイドの組織リモデリングの抑制効果を解明するため、喘息モデル動物等を用いて、フラボノイドのリモデリング阻害作用及び喘息の改善効果を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で活性化させたJurkat T細胞より細胞膜を調整し、培地中に添加して16時間培養することにより、HMC-1ヒトマスト細胞を活性化した。

(2)マスト細胞の活性化はDNAマイクロアレイ(アレルギーチップ ジェノパール®(三菱レイヨン))及びRT-PCR法によるサイトカイン、細胞表面タンパク質等の遺伝子発現変化及びELISA法によるタンパク質発現等により測定した。また、NF- $\kappa$ Bの活性化は、核抽出物のNF- $\kappa$ B p65とDNA結合領域との結合活性として、ELISA法により測定した。MAPキナーゼの活性化は、ERK及びp38のリン酸化活性としてWestern blot法により測定した。

(3)フィセチンまたはI $\kappa$ B $\alpha$ 阻害剤(BAY 11-7082)をHMC-1細胞の培養液に添加し、15分後に活性化T細胞膜を添加して16時間培養することにより、フィセチン及びI $\kappa$ B $\alpha$ 阻害剤のマスト細胞活性化抑制効果等を測定した。

(4) BALB/cマウスにアレルギーであるオボアルブミンを腹腔及び経鼻投与することにより喘息マウスを作成した。また、NC/Ngaマウスにダニ(Dermatophagoides farinae)抗原を連続塗布して皮膚炎モデルマウスを作成し

た。これらの動物モデルにフィセチン添加飼料を自由摂取させて、それぞれ喘息及び皮膚炎の改善効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) これまでに、活性化T細胞膜刺激がHMC-1ヒトマスト細胞を活性化し、TNF $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの発現を誘導すること、及びフラボノイドのフィセチンが活性化T細胞によるHMC-1細胞の活性化を抑制することを明らかにした(図1)。

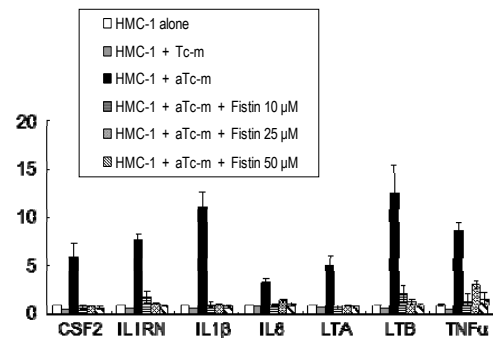


図1 活性化T細胞膜刺激で誘導され、フィセチンで抑制されるHMC-1ヒトマスト細胞のサイトカインの発現  
HMC-1+Tcm,HMC-1細胞に活性化していないT細胞膜を添加; HMC-1+aTcm,HMC-1細胞に活性化T細胞膜を添加; HMC-1+aTcm+Fisetin,HMC-1細胞に活性化T細胞膜及びフィセチンを添加

(2) 活性化T細胞膜によるマスト細胞の活性化及びフィセチンによる抑制に関わるシグナル伝達経路を検討した結果、活性化T細胞膜刺激により、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路が活性化し、フィセチンがこれを抑制することが明らかになった(図2)。

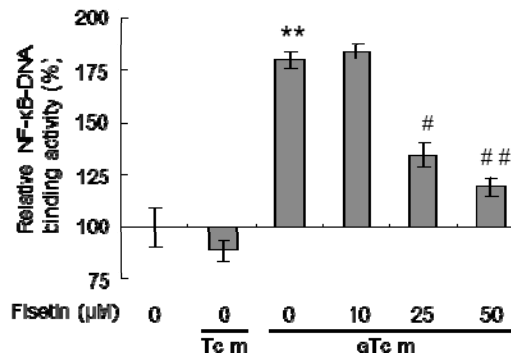


図2 活性化T細胞膜刺激で誘導され、フィセチンで抑制されるHMC-1ヒトマスト細胞のNF- $\kappa$ B活性化  
NF- $\kappa$ Bの活性化はDNA結合活性により測定した。  
Tcm,活性化していないT細胞膜; aTcm, 活性化T細胞膜

(3) また、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するI $\kappa$ B $\alpha$ 阻害剤(BAY 11-7082)により炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ )及びT細胞との接着に働く接着分子ICAM-1の遺伝子発現が抑制されることから、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路がマ

ト細胞における遺伝子発現及び活性化T細胞との接着に重要な役割を担うこと、及びフラボノイドのフィセチンがこの経路を抑制することを明らかにした。(図3)。

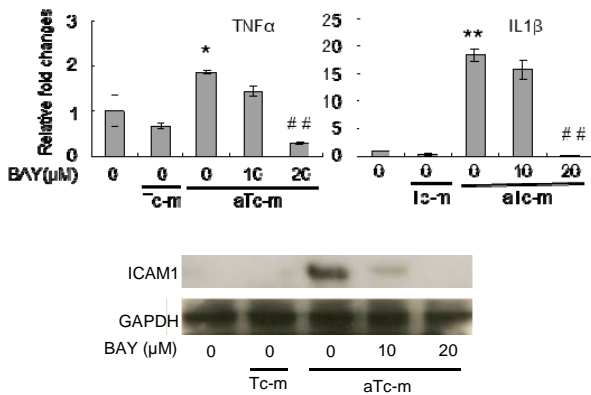


図3 活性化T細胞膜刺激で誘導され、IκBα阻害剤(BAY 11-7082)で抑制されるHMC-1細胞のTNFα、IL1β及びICAM1の発現  
TNFα及びIL1βの遺伝子発現をRT-PCR法により、またICAM1のタンパク質発現をWestern blot法により測定した。Tc-m, 活性化していないT細胞膜; aTc-m, 活性化T細胞膜

また、フィセチンは活性化T細胞膜刺激によるERK及びp38 MAPキナーゼの活性化を抑制した(図4)。さらにフィセチンはAkt(Ser473)のリン酸化を阻害した。

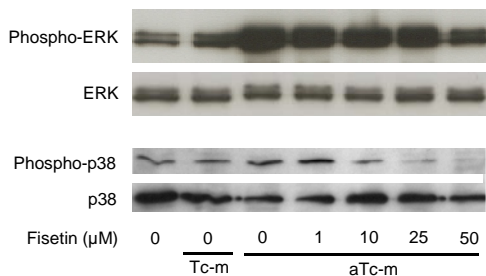


図4 活性化T細胞膜刺激で誘導され、フィセチンで抑制されるHMC-1細胞のMAPキナーゼの活性化  
MAPキナーゼERK及びp38の活性化によるリン酸化を、Western blot法で測定した。Tc-m, 活性化していないT細胞膜; aTc-m, 活性化T細胞膜

(4) 一方、HMC-1細胞の細胞表面にTNF受容体ファミリーCD40が発現しており、活性化T細胞膜刺激により発現が誘導され、フィセチンにより抑制されることが明らかになった(図5)。

CD40は細胞膜上の脂質ラフトに移行し、活性化T細胞膜刺激によるHMC-1細胞の活性化に寄与すると予想されたが、フィセチンによる脂質ラフトの形成阻害作用は認められなかった。

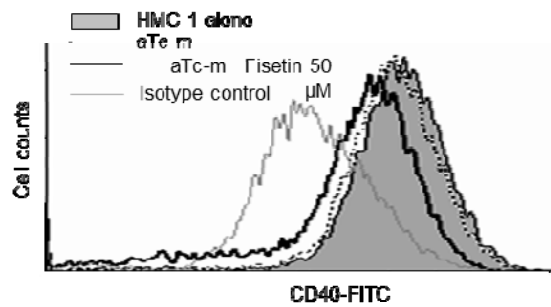


図5 活性化T細胞膜刺激で誘導され、フィセチンで抑制されるHMC-1細胞のMAPキナーゼの活性化  
MAPキナーゼERK及びp38の活性化によるリン酸化を、Western blot法で測定した。Tc-m, 活性化していないT細胞膜; aTc-m, 活性化T細胞膜

(1)-(4)の結果から、フィセチンはAktのリン酸化及びそれに続くNF-κB及びMAPキナーゼの活性化を抑制して、活性化T細胞膜刺激によるマスト細胞の活性化を抑制すると考えられた。

(5) 各種フラボノイドの、活性化T細胞膜刺激によるHMC-1細胞活性化の抑制効果を検討した結果、フィセチンと同様にルテオリン及びアピゲニンで高い抑制効果が観察され、次いでケルセチン及びイソラムネチンに抑制効果が認められた。これらフラボノイドのうち、0.1%及び0.05%のフィセチン及びケルセチン含有飼料を喘息モデルマウスに自由摂取させ、肺の遺伝子発現変化や肺胞洗浄液中の細胞数の増減等を測定したが、アレルギー反応の明らかな抑制効果は認められなかった。そこで、活性化T細胞によるマスト細胞の活性化が関与する皮膚炎のモデルマウスに、0.1%のフィセチン含有飼料を自由摂取させ、フィセチンによる皮膚炎の抑制効果を示唆する結果が得られた。

また、マスト細胞活性化に関わる研究の課程で、新たに高濃度のグルコースがHMC-1及びLAD2ヒトマスト細胞の活性化を誘導することが見いだされ、肥満による高血糖がマスト細胞を活性化する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kanji Nagai, Yumiko Takahashi, Ichihiko Mikamim, Tatsunobu Fukushima, Hideaki Oike and Masuko Kobori. The hydroxyflavone, fisetin, suppresses mast cell activation induced by interaction with activated T cell membranes. *British Journal of Pharmacology* 2009, 158(3), 907-919 2009. 査読有  
[doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00365.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00365.x)

〔学会発表〕（計4件）

- ①永井寛治、福島達伸、大池秀明、小堀真珠子、グルコースがマスト細胞の活性化に及ぼす影響、日本農芸化学会 2012 年度大会要旨集 2012.3.23.京都
- ②永井寛治、福島達伸、大池秀明、小堀真珠子、活性化T細胞刺激によるマスト細胞活性化に対するフラボノイドの抑制効果、日本農芸化学会2011年度大会、2011.3.26.京都（震災のため要旨集のみ）
- ③永井寛治、福島達伸、大池秀明、小堀真珠子グルコースのマスト細胞活性化作用、日本食品科学工学会2010.9.2.東京農大
- ④永井 寛治、小堀真珠子、活性化 T 細胞接着刺激によるマスト細胞の活性化機構、第 39 回日本免疫学会、2009.12.2.大阪

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/introduction/chart/0304/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小堀 真珠子 (KOBORI MASUKO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員  
研究者番号：50353941

### (4)研究協力者

永井 寛治 (NAGAI KANJI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・契約研究員  
研究者番号：なし