

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450191

研究課題名(和文)加水分解性タンニンのIgE産生抑制メカニズムおよび構造活性相関の解明

研究課題名(英文) Suppression of IgE production by hydrolyzable tannins and elucidation of the mechanisms and structure-activity relationship

研究代表者

高杉 美佳子 (TAKASUGI, MIKAKO)

九州産業大学・工学部・准教授

研究者番号：60305802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：加水分解性タンニン類のIgE産生抑制活性を調べた。その結果、テリマグランジンI、テリマグランジンII、カスアリクチンおよびペンタガロイルグルコースは濃度依存的にIgE産生を抑制した。これに対し、ストリクチンのIgE産生抑制活性は非常に低かった。これらの結果は、加水分解性タンニン類のIgE産生抑制活性にはガロイル基が4つ相当必要であること、加水分解性タンニン類がIgE産生を抑制することでアレルギー症状を緩和する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Effects of hydrolyzable tannins on IgE production were examined. Tellimagrandin I, Tellimagrandin II, Casarictin, and Pentagalloylglucose suppressed IgE production in a dose-dependent manner. In contrast, Strictinin had little effect on IgE production. These results suggest that four galloyl groups or equivalent are needed to exert IgE suppressive effect and hydrolyzable tannins may mitigate allergic symptoms by suppression of IgE production.

研究分野：食品機能学

キーワード：アレルギー 加水分解性タンニン IgE

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギーの発症メカニズム

我が国のアレルギー罹患率は増加傾向にあり、国民の約30%が食物アレルギーや花粉症などのアレルギー性疾患をもっていると言われている。アレルギーはその発症メカニズムによりI~V型に分類されるが、患者数の多い食物アレルギーや花粉症などは主にI型アレルギーによるものである。I型アレルギーには、IgEとマスト細胞が深く関わっている。体内にアレルゲンが侵入するとIgM産生B細胞はIgE産生B細胞に分化(クラススイッチ)し、IgEを産生・放出する。放出されたIgEはマスト細胞表面に結合し、再侵入したアレルゲンが2分子以上のIgEを架橋することでマスト細胞内に貯留されているヒスタミンなどの化学伝達物質が放出される。この化学伝達物質により平滑筋収縮や粘液分泌亢進などが起こり、いわゆるアレルギー症状を呈する(図1)。

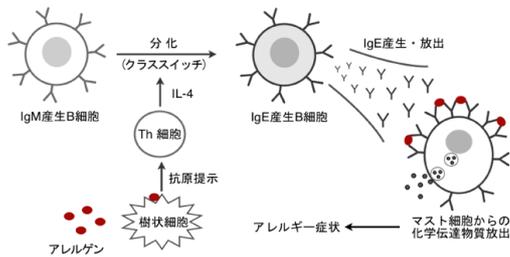


図1 I型アレルギーの作用メカニズム

(2) 食品成分によるアレルギーの抑制

アレルギーを予防・軽減する対策の一つとして、食品由来のアレルギー抑制成分の利用が考えられる。食品成分によるアレルギー症状の改善は、医薬品に比べて作用が穏やかであることや副作用が少ないことなどの理由からその有用性が期待されている。また、食品中に含まれる機能性因子を生体機能調節化学物質とみなし、機能性食品因子の作用メカニズムを解析することが、生体内標的分子の同定、機能性食品因子の構造活性相関の解明、より活性の強い機能性因子の創製などにつながると考えられている。緑茶に含まれる加水分解性タンニンであるストリクチンはIgE産生型B細胞への分化を抑制することが報告されており(Tachibana et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001)、申請者はストリクチンがIgE産生そのものを抑制することを見出していった。ストリクチンは、グルコースの水酸基にガロイル基あるいはガロイル基2分子が結合したヘキサヒドロジフェノイル基が結合しているが、植物中には、グルコースにガロイル基またはヘキサヒドロジフェノイル基が複数結合した加水分解性タンニンが他にも存在する(図2)。これらのことから、加水分解性タンニン類はIgE産生を抑制することで、アレルギー症状を抑えられると考えられた。

ヘキサヒドロジフェノイル基

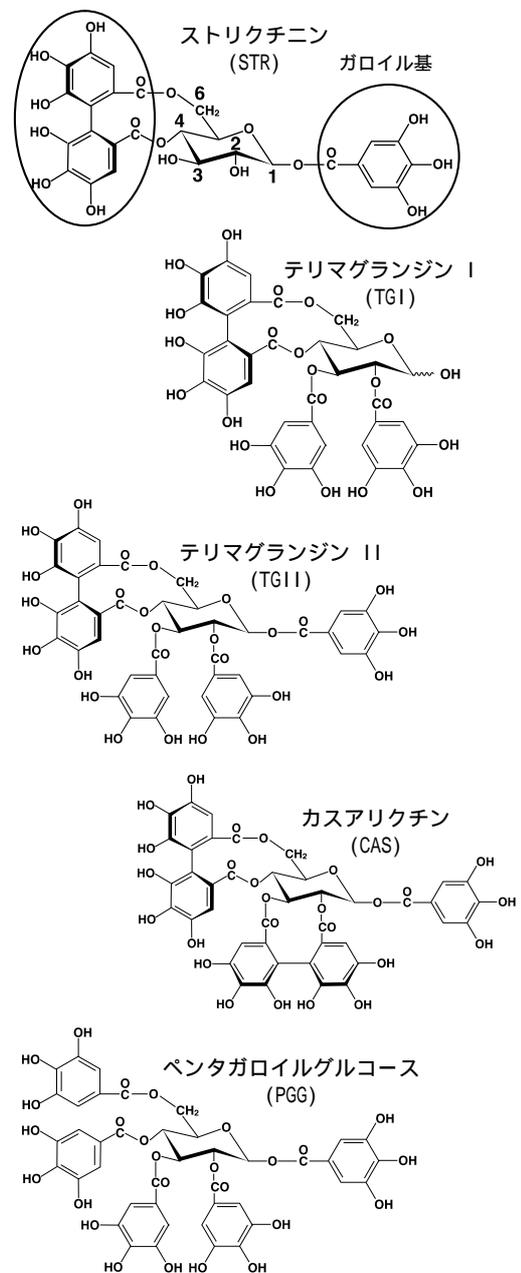


図2 加水分解性タンニン類の構造

2. 研究の目的

(1) 加水分解性タンニン類の細胞毒性評価
加水分解性タンニン類が毒性を示さない濃度でIgE産生調節作用を検討するため、最大添加濃度(100 μM)の加水分解性タンニン類を細胞に添加し、総細胞数および生細胞率を調べ、細胞毒性を評価する。

(2) 加水分解性タンニン類のIgE産生への影響

加水分解性タンニン類がIgE産生抑制活性を有するかどうかを評価するために、加水分解性タンニン類存在下でIgE産生細胞株U266を培養し、産生されたIgEをELISAで定量

する。

(3) 加水分解性タンニン類の IgE mRNA 発現への影響

IgE 産生抑制作用が認められた加水分解性タンニン類については、mRNA の発現が抑えられているかを調べることで、IgE 産生抑制メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 加水分解性タンニン類の細胞毒性評価

IgE 産生細胞株 U266 に加水分解性タンニン類であるストリクチニン (STR)、テリマグランジン I (TGI)、テリマグランジン II (TGII)、カスアリクチン (CAS) およびペンタガロイルグルコース (PGG) を 100 μ M 添加し、0、1、3、6 および 24 時間後に細胞を回収した。セルカウンターで総細胞数を測定するとともに、トリパンブルー染色で生細胞率を調べた。

(2) 加水分解性タンニン類の IgE 産生への影響

U266 に STR、TGI、TGII、CAS および PGG を添加して 3 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の IgE 量を ELISA で定量し、サンプル無添加の IgE 産生量に対する相対量で表した。

(3) 加水分解性タンニン類の IgE mRNA 発現への影響

TGI、TGII、CAS および PGG 存在下で U266 を 3 時間培養後、細胞を回収し、トータル RNA を抽出した。トータル RNA より cDNA を合成し、リアルタイム PCR で IgE の mRNA 発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) 加水分解性タンニン類の細胞毒性評価

加水分解性タンニン類 (100 μ M) の総細胞数および生細胞率への影響を検討した。その結果、加水分解性タンニン類添加によって総細胞数に大きな違いは認められなかった。

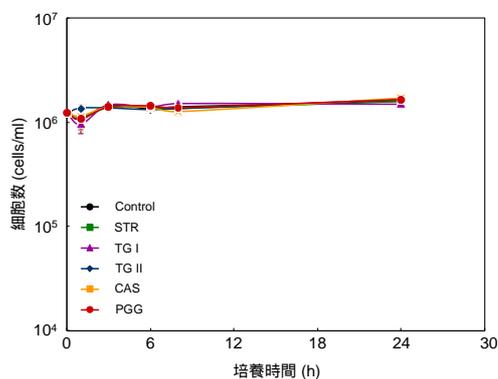


図 3 加水分解性タンニン類の細胞数への影響

これに対し、生細胞率は、加水分解性タンニン類添加後 6 時間以降、無添加のコントロールと比べて低下していた。培養 24 時間の細胞毒性は STR < CAS < TGI < PGG < TGII の順であった。この結果より、加水分解性タンニン類の IgE 産生抑制作用の検討は、細胞毒性が見られない 3 時間培養で行うこととした。

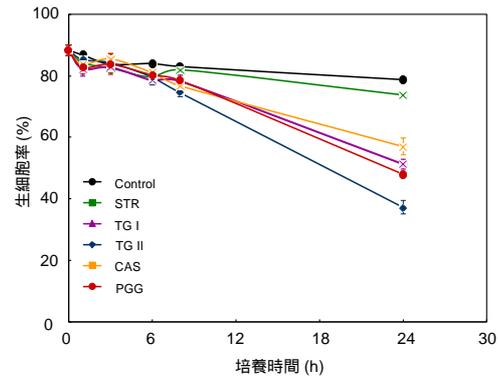


図 4 加水分解性タンニン類の細胞毒性

(2) 加水分解性タンニン類の IgE 産生への影響

100 μ M の加水分解性タンニン類を U266 に添加し、3 時間後の培養上清中の IgE 量を測定した。その結果、STR はコントロールに対して約 10% 程度しか IgE 産生を抑制しておらず、非常に弱い抑制作用であった。また、TGI、TGII、CAS および PGG は、IgE 産生を約 20~40% 程度抑制していた。

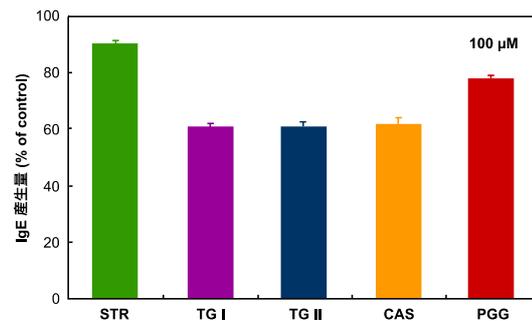


図 5 加水分解性タンニン類の IgE 産生への影響

IgE 産生抑制活性が認められた加水分解性タンニン類について、0~100 μ M で U266 に添加し、IgE 産生抑制活性の濃度依存性を調べた。TGI は、40 μ M までは IgE 産生抑制活性は認められなかったが、60 μ M 以上では IgE 抑制活性が認められた。TGII は、20 μ M では IgE 産生抑制活性は認められなかったものの、40 μ M 以上では濃度依存的に IgE 産生を抑制した。CAS および PGG は、20 μ M から IgE 産生抑制活性を示した。60 μ M までは CAS よりも PGG の方が活性が強い傾向を示した。これらの結果は、IgE 産生抑制効果に

はガロイル基が4つ相当以上必要であることを示唆している。

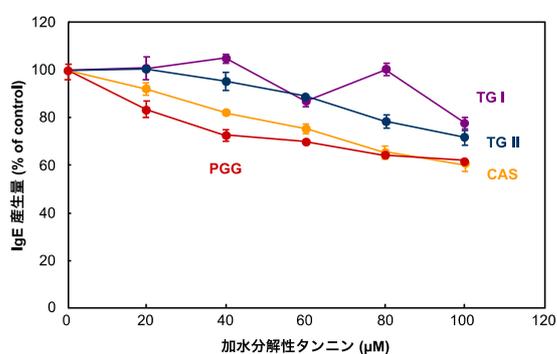


図6 U266のIgE産生における加水分解性タンニン類の濃度依存性

(3) 加水分解性タンニン類のIgE mRNA発現への影響

IgE産生抑制効果が認められた加水分解性タンニン類の存在下で3時間培養したU266のIgE mRNA発現量を調べた。しかしながら、加水分解性タンニンによるmRNA発現量への顕著な影響は認められなかった。作用メカニズムを解明するためには、培養1~2時間後のmRNA発現量を調べるとともに、IgE合成・放出への影響についても調べる必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

高杉 美佳子 他
加水分解性タンニン類のI型アレルギー抑制作用
第71回日本栄養・食糧学会大会
2017年4月、沖縄県宜野湾市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高杉 美佳子 (TAKASUGI, Mikako)
九州産業大学・工学部・准教授
研究者番号：60305802

(2) 研究分担者

山田 耕路 (YAMADA Koji)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：60158186