

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870636

研究課題名(和文)山椒由来抗アレルギー成分探索とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification of anti-allergic compounds from Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) and elucidation of its mechanism

研究代表者

河野 良平 (Kono, Ryohei)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70569110

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)：本研究では山椒由来抗アレルギー物質を特定し、その作用機序を解明することを目的とした。ラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3を用い、抗原刺激によって惹起される化学伝達物質遊離(脱顆粒)反応を抑制する作用を指標として山椒抽出物のスクリーニングを行った。その結果、脱顆粒反応を抑制する山椒由来化合物2種を単離・同定した。これらの化合物は脱顆粒に關与する細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑制した。また、顆粒の細胞膜への遊走に關わるFynのリン酸化、細胞内Ca²⁺濃度上昇に關与するLynのリン酸化の抑制に關与することが明らかとなった。さらに、これらの化合物は脱顆粒の際に生じる膜ラッフリングも抑制した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify anti-allergic compounds from Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*, ZP) and to elucidate the mechanism. Using famous rat mast cell line RBL-2H3, we screened the Japanese pepper extract on the basis of an inhibitory effect on a release of chemical mediator (degranulation) of IgE sensitized mast cell by antigen stimulation. As a result of this study, two inhibitory compounds were isolated from ZP. These two compounds attenuated intracellular Ca²⁺ mobilization induced by antigen stimulation. In addition, those inhibited the phosphorylation of Fyn related with migration of granule to the cell membrane, and the phosphorylation of Lyn which is upstream signal of intracellular Ca²⁺ mobilization. Furthermore, these compounds prevented membrane ruffling which is caused while degranulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アレルギー 花粉症 脱顆粒 山椒 食品

1. 研究開始当初の背景

花粉症などの型アレルギー疾患の患者数は増加の一途を辿り、日本人の3~4人は何らかの型アレルギーであるとされるほど社会的な問題となっている。アレルギー疾患の治療の問題点として、治療に用いられる薬物には副作用の強いものがあること、アレルギー疾患の完全な治療は困難であることが挙げられる。そのため、アレルギー疾患を予防・改善する安全かつ副作用の少ない治療が強く望まれている。普段から食されている食品であれば、その食品を食生活に取り入れることで、無理なくアレルギー症状の予防・改善ができること、安全性も高いこと等の理由から、近年では食品由来の抗アレルギー成分の探索が盛んに行われている。申請者は予備実験により食品である山椒が抗アレルギー作用を有する可能性を見出したことから、主に山椒を研究対象とすることとした。

2. 研究の目的

山椒(*Zanthoxylum piperitum*)はサンシオール、サンシヨアミド、リモネン、ゲラニオールなどを含有しており、利尿作用、抗菌作用、健胃作用などがあるとされ、古くから漢方薬の成分として用いられている食品であるが、抗アレルギー作用を有する成分の単離・同定は未だ成されていない。申請者の予備実験から、山椒のメタノール抽出物を水に溶解後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで順次転溶して得た抽出物(水、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル抽出物)のうち、ヘキサンとジクロロメタン抽出物に強い化学伝達物質遊離抑制作用があることを見出した。そこで本研究では、山椒由来の抗アレルギー作用を有する成分を単離・同定し、その作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脱顆粒抑制作用を指標とした抗アレルギー物質の探索

肥満細胞として扱われるラット好塩基球形白血病細胞株 RBL-2H3 を用い、抗原刺激によって惹起される化学伝達物質遊離(脱顆粒)反応を抑制する作用を指標として山椒抽出物のスクリーニングを行った。具体的には、抗 DNP(ジニトロフェニル)-IgE 抗体で一晩感作した RBL-2H3 を抗原となる DNP-BSA で刺激し、その結果起こる脱顆粒の際に化学伝達物質とともに細胞外へ放出されるヘキサミンダーゼの活性を測定し、脱顆粒の指標とした。

和歌山県産の山椒を用い、メタノールで3回抽出を行った。そのメタノール抽出物を水

に溶解後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで順次転溶して各抽出物を得た。これらの抽出物の内、ヘキサン抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーに供し、さらに分画を行い、抗アレルギー物質の精製を進めた。最終的に脱顆粒抑制作用を有する物質2種の組成・構造を LC-MS および NMR によって決定した。

(2) 細胞内カルシウムシグナリングへの効果

脱顆粒抑制作用の作用機序を解明するために、まずは細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を捉えるためのカルシウムイメージングを実施した。抗 DNP(ジニトロフェニル)-IgE 抗体で一晩感作した RBL-2H3 にカルシウム指示薬を導入し、抗原刺激によって上昇する細胞内 Ca^{2+} を共焦点レーザー顕微鏡でモニターした。また、抗原刺激の前に山椒由来脱顆粒抑制物質を培地中に添加することで、抗原刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制するかどうかを測定した。

(3) ウエスタンブロット法によるリン酸化解析

詳細な作用機序を解明するために、ウエスタンブロット法により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起きるよりもさらに上流のシグナル伝達と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与しないシグナル伝達に着目し、蛋白質リン酸化の解析を行った。リン酸化の解析対象として Lyn、Fyn を採用した。抗原刺激後に RBL-2H3 細胞より蛋白質を抽出し、解析に用いた。

(4) 脱顆粒にともなう形態変化の観察

肥満細胞は脱顆粒にともない細胞膜の波打ち現象(膜ラフリング)を起こす。抗原刺激後に細胞を固定し、走査型電子顕微鏡(SEM)観察および走査型レーザー顕微鏡(LSM)観察に供した。SEM観察では、細胞を脱水乾燥後、Auコートして観察した。LSM観察では細胞のactinを蛍光ファロイジンで処理し蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) 山椒由来物質の脱顆粒抑制作用

抗原抗体反応による脱顆粒を抑制する物質として、二つの化合物を特定した。それらの組成・構造を詳細に解析した結果、一つは、1-acetoxy-7-hydroxy-3,7-dimethyl-cta-2E,5E-diene (ZP1)、もう一つは、

8-hydroxygeranyl acetate (ZP2) であることが判明した。精製された ZP1 と ZP2 はどちらも強い脱顆粒抑制作用を示した(図1)

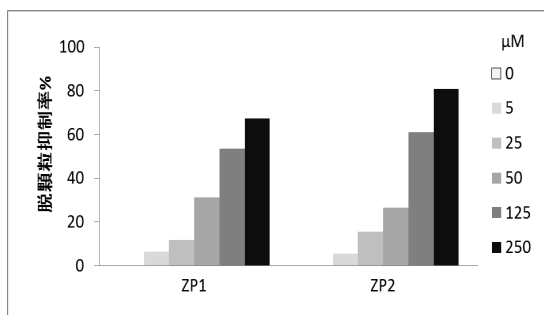


図1 . 山椒由来物質の脱顆粒抑制率

(2) 細胞内カルシウムイオン濃度上昇抑制作用

感作した RBL-2H3 を抗原で刺激することによって、脱顆粒の前に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こるが、ZP1 と ZP2 はその上昇を抑制することが判明した(図2)

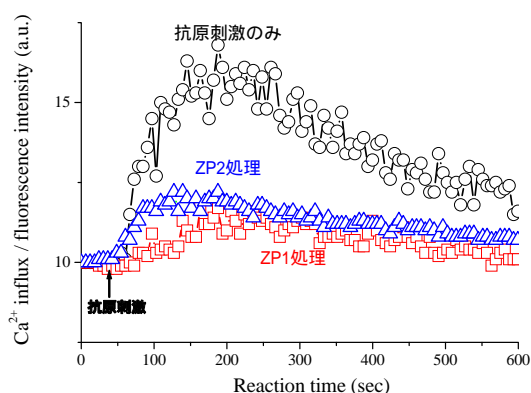


図2 . 細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する ZP1 と ZP2 の効果

(3) シグナル伝達への効果

詳細な作用機序を解明するために、ウエスタンブロット法により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起きるよりもさらに上流のシグナル伝達と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与しないシグナル伝達に着目し、蛋白質リン酸化の解析を行った。その結果、ZP1,2 とともに細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に非依存的であり顆粒の細胞膜への遊走に関わる Fyn のリン酸化を抑制した。また細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与する Lyn の活性化抑制にも関与している可能性が明らかとなった。

(4) 膜ラッフリングへの効果

脱顆粒にともなう膜ラッフリングを SEM および LSM で観察し、どちらの手法でも膜ラッフリングを観察することが可能であった。抗原刺激前に ZP1 または ZP2 で細胞を処理すると、膜ラッフリングが抑制されることが SEM (図3) および LSM による形態観察によって明らかとなった。

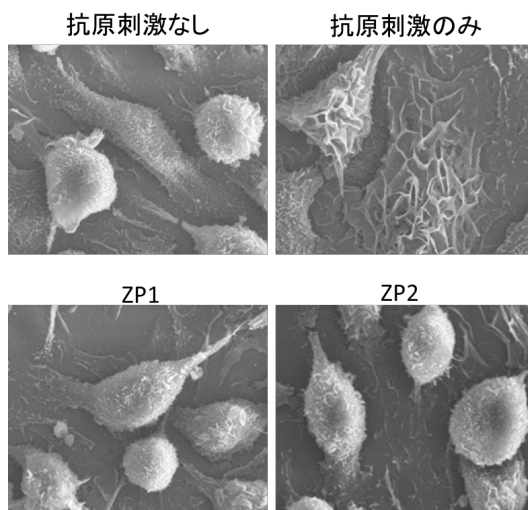


図3 . SEM による RBL-2H3 の形態観察

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 2 件)

河野良平、野村幸子、鍵弥朋子、前野覚大、奥野祥治、宇都宮洋才、梅 (Prunus mume)種成分の抗アレルギー作用、第 59 回 TEAC 討論会、平成 27 年 9 月 6 日、大阪

奥野祥治、大浦雄貴、古川和樹、原田悠希、宇都宮洋才、河野良平、野村幸子、前野覚大、山椒に含まれるアポトーシス誘導物質、第 59 回 TEAC 討論会、平成 27 年 9 月 6 日、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 良平 (KONO Ryohei)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：70569110

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：