

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18697

研究課題名(和文)新規抗アレルギー食品成分シフォナキサンチンの有効利用のための基盤構築

研究課題名(英文)A basic study for utilization of siphonaxanthin as a new anti-allergic compound

研究代表者

真鍋 祐樹 (Manabe, Yuki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20730104

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)：海ぶどうなどの食用海藻に含まれるカロテノイドのシフォナキサンチンについて、個体レベルでの抗炎症作用の評価と既知の抗アレルギー食品成分との併用効果の検討を進めた。シフォナキサンチンの経口摂取によって、マウスの皮膚炎症状が改善する可能性が示された。予想外なことに、皮膚にはシフォナキサンチンよりもむしろシフォナキサンチンの代謝産物の方が多く蓄積しており、今後はそれらの代謝産物の抗炎症作用も明らかにする必要がある。また、シフォナキサンチンの抗炎症作用を増強するような食品成分の発見には至らなかったが、ビタミンE類などによって、シフォナキサンチンの消化管吸収が阻害される可能性が見つかった。

研究成果の概要(英文)：Siphonaxanthin is one of the major carotenoids in some edible green algae, such as *Caulerpa lentillifera*. In this study, we evaluated an anti-inflammatory effect of siphonaxanthin against a dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced mouse dermatitis model. Orally administration of siphonaxanthin significantly suppressed ear swelling induced by DNFB. Surprisingly, metabolites of siphonaxanthin were more accumulated in the skin than the intact form. Hence, it is required to evaluate their biological activities including an anti-inflammatory effect. We also evaluate combined effects between siphonaxanthin and the other well-known anti-allergic compounds. We unfortunately could not find out some anti-allergic compounds which enhanced the anti-inflammatory activity or bioavailability of siphonaxanthin. However, we found that vitamin E such as  $\alpha$ -tocopherol inhibits the uptake of siphonaxanthin by differentiated Caco-2 cells.

研究分野：食品機能学

キーワード：カロテノイド 抗炎症作用 マスト細胞 消化管吸収

## 1. 研究開始当初の背景

日本国におけるアレルギー疾患の罹患者数は増加の一途をたどっており、昨今では、国民のおよそ2人に1人が何らかのアレルギー疾患を罹患していると言われている。そのため、アレルギー体質を改善するような健康志向型食品の開発は喫緊の課題といえる。くしゃみや鼻汁といったアレルギー症状は、主にマスト細胞の過剰な活性化によって引き起こされるため、これを抑制するような食品成分の探索が盛んに進められている。研究代表者もいくつかのカロテノイドのマスト細胞活性化抑制作用を見出している (*J. Oleo Sci.*, 2014)。探索のみならず、作用メカニズムの解明にも特に力を入れており、これまでに、クビレズタ (海ぶどう) やミルなどの一部の大型緑藻に含まれるカロテノイドのシフォナキサンチンが、細胞膜の構成成分のひとつであるスフィンゴミエリンを増加させることによってマスト細胞の活性化を強く抑制することを見出した。マスト細胞の活性化とスフィンゴミエリン量に注目した研究例はほとんど無く、極めてユニークな作用メカニズムであった。

シフォナキサンチンは、古来より食経験のある海藻に含まれるため、安全性についても問題がないと考えられる。また、シフォナキサンチンのみならず、カロテノイドは生体内に蓄積しやすいため、効能 (抗アレルギー作用など) が持続しやすいと予想される。すなわち、シフォナキサンチンは、マスト細胞の活性化抑制を作用機序とする新規のアレルギー体質改善成分となり得る。さらに、極めてユニークな作用メカニズムを介してマスト細胞の活性化を抑制するため、他の抗アレルギー食品成分との併用効果も期待される。

## 2. 研究の目的

上述のような背景から、培養細胞レベルでのシフォナキサンチンのマスト細胞活性化抑制作用を、個体レベルでのアレルギー改善作用にまで昇華させることは、日本国民のQOLの向上につながると考えられた。さらに、消費者が自由に選択し、自由なタイミングで、自由に食するという食品成分の特性上、複数の抗アレルギー食品成分が併用されることも十分に予想される。そのため、シフォナキサンチンと他の抗アレルギー食品成分との相互作用 (併用効果や食べ合わせなど) に関する知見の蓄積は、今後、シフォナキサンチンを抗アレルギー食品成分として有効利用する上で極めて重要と考えた。そこで本研究では、以下の3つの項目を明らかにすることを研究の目的とした。

### (1) 実験動物レベルでのシフォナキサンチンの抗アレルギー作用

(2) マスト細胞の活性化におけるシフォナキサンチンと他の抗アレルギー食品成分の相互作用

(3) 消化管吸収におけるシフォナキサンチンと他の抗アレルギー食品成分の相互作用

## 3. 研究の方法

シフォナキサンチンは、ミル (*Codium fragile*) の凍結乾燥粉末より有機溶媒を用いて抽出し、シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーと逆相 HPLC を組み合わせて純度 97%以上にまで精製したものを実験に用いた。

### (1) 実験動物モデルを用いたシフォナキサンチンの抗アレルギー作用の評価

アトピー性皮膚炎モデルとして利用される NC/Nga マウスを用い、シフォナキサンチンの抗アレルギー作用を評価した。具体的には、7週齢の雄性 NC/Nga マウスを1週間馴化飼育し、その後、6匹ずつ4群に分けた (Day0)。剃毛した背部および耳介にジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を反復塗布 (Day3, 6, 9, 12, 15) することによって皮膚炎を誘導し、シフォナキサンチンは Day9 から Day15 までの7日間、胃ゾンデを用いて毎日経口投与した。なおシフォナキサンチンの投与量は1日あたり2および20 mg/kg 体重とし、タウロコール酸ナトリウム、モノオレイン、オレイン酸、リゾホスファチジルコリンと共にミセル化して与えた。また、電子ノギスを用いて耳介の厚さ (耳介浮腫の程度) を測定することによって、炎症の程度を評価した。

### (2) マスト細胞の脱顆粒反応における抗アレルギー食品成分間の相互作用の解析

ラット好塩基性白血球細胞株 RBL-2H3 をマスト細胞のモデルとして実験を進めた。シフォナキサンチンまたは DMSO (溶媒) で24時間処理した細胞に、各種抗アレルギー食品成分を取り込ませ、その後、抗原刺激を与えて脱顆粒反応を誘導した。脱顆粒反応の程度は、培養上清の $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって評価した。

### (3) 消化管吸収における抗アレルギー食品成分間の相互作用の解析

ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2 から成る小腸上皮様モデルを用いて解析した。シフォナキサンチンはタウロコール酸ナトリウム、モノオレイン、オレイン酸、リゾホスファチジルコリンを用いてミセル化し、当該ミセルを含んだ培地中で、小腸上皮モデルを一定時間培養することによってシフォナキサンチンを取り込ませた。Bligh-Dyer 法を用いて細

胞から総脂質を抽出し、HPLC-PDA に供して細胞内に取り込まれたシフォナキサンチン量を定量した。なお、被験物質となる抗アレルギー食品成分を、前もって小腸上皮モデルに取り込ませる場合と、シフォナキサンチンと同時に処理する場合の2通りの実験条件で相互作用を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験動物モデルを用いたシフォナキサンチンの抗アレルギー作用の評価

DNFB の反復塗布によって耳介の厚さは有意に増加した。それに対し、シフォナキサンチンを2 mg/kg 体重だけ摂取させたマウスでは、Day9, 12, 15において耳介の厚さが有意に減少した (図1)。

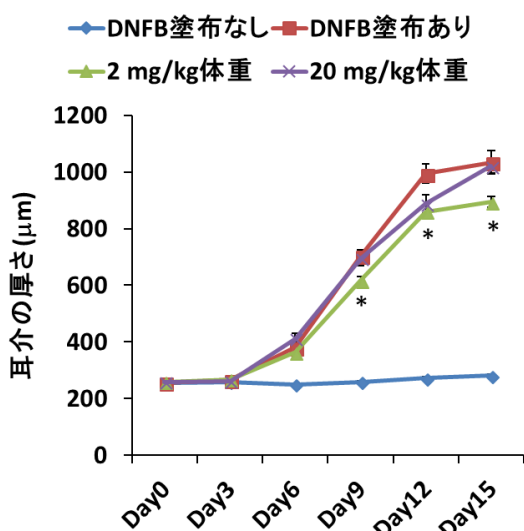


図1. 試験期間中のマウスの耳介の厚さ  
\* $P < 0.05$  vs. DNFB 塗布あり

高容量の投与では抗アレルギー作用が認められなかったが、2 mg/kg 体重の投与では、投与後のすべての測定日において、数値の低下が認められ、個体レベルにおけるシフォナキサンチンの抗アレルギー作用が示された。

また、マスト細胞が局在すると考えられる皮膚の真皮層では、シフォナキサンチンよりもむしろ、その酵素酸化物の方が多く蓄積することがわかり、シフォナキサンチン酵素酸化物のマスト細胞活性化抑制作用や作用メカニズムにも興味をもたれた。

##### (2) マスト細胞の脱顆粒反応における抗アレルギー食品成分間の相互作用の解析

本研究では、抗アレルギー食品成分として、ルテオリン、ケルセチン、エピガロカテキンガレート (EGCG)、レスベラトロール、ロスマリン酸、クロロゲン酸、 $\alpha$ -マンゴスチン、 $\gamma$ -トコトリエノールの8種類について、シフォナキサンチンとの併用効果を評価した。これらの被験物質は全てエタノールを溶媒として培地中に分散させ、抗原刺激の30分前

に添加した。

また、結果はコントロール (DMSO またはシフォナキサンチン含有培地で培養し、上記の被験物質を添加していない細胞) の脱顆粒率を100%とした相対値で表した (図2)。

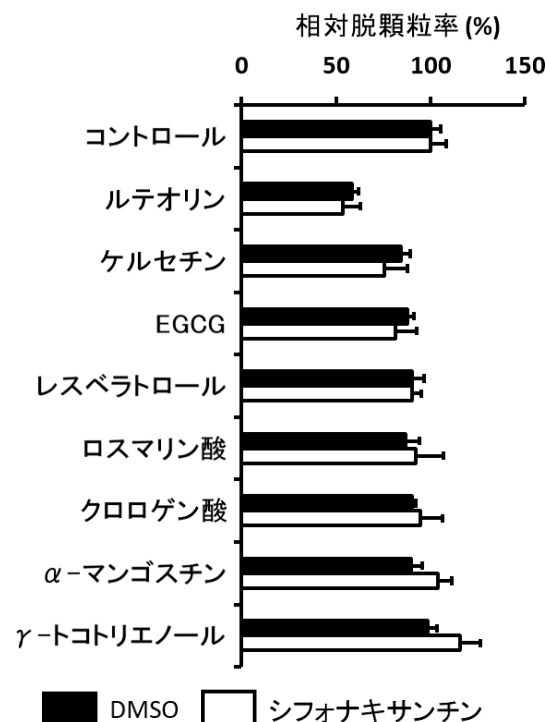


図2. シフォナキサンチンと抗アレルギー食品成分の併用効果

それぞれの被験物質で処理した際の相対脱顆粒率について、DMSO 培養群とシフォナキサンチン培養群の間に統計的に有意な増減は認められなかった。すなわち、本研究では、シフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用を打ち消してしまうような抗アレルギー食品成分も見つからず、また逆に、シフォナキサンチンもルテオリンやケルセチンなどが有する脱顆粒抑制作用を妨げないことがわかった。

##### (3) 消化管吸収における抗アレルギー食品成分間の相互作用の解析

はじめに、Caco-2 細胞によるシフォナキサンチンの取り込みの経時変化を調べた (図3)。

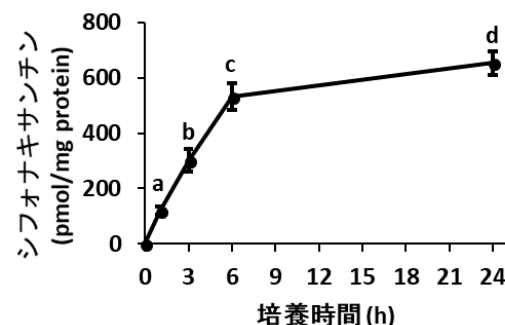


図3. シフォナキサンチン量の経時変化  
異なる符号間に有意差あり  $P < 0.05$

Caco-2 細胞によるシフォナキサンチンの取り込みは、培養開始から 6 時間までは直線的に増加し、その後、プラトーに達することがわかった。また、培養開始 3 時間の時点では、シフォナキサンチン代謝産物のピークは認められなかった。以上の結果より、Caco-2 細胞によるシフォナキサンチンの取り込み量を評価するには、培養開始 3 時間後に細胞を回収することが適当と考えた。

#### ① 抗アレルギー食品成分で処理した Caco-2 細胞によるシフォナキサンチンの取り込み

ルテオリン、ケルセチン、EGCG、レスバトロール、ロスマリン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコトリエノールを被験物質とした。これらの被験物質を含む培地中で Caco-2 細胞を 24 時間培養し、その後、上述の方法でシフォナキサンチンの取り込み量を測定した。その結果、ルテオリン (25, 50  $\mu$ M) によって、シフォナキサンチンの取り込みが有意に抑制されることがわかった (図 4)。

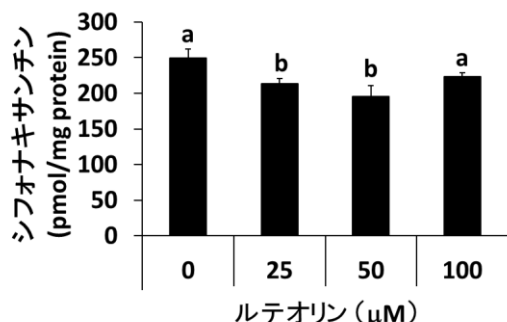


図 4. ルテオリンによるシフォナキサンチンの取り込みの阻害  
異なる符号間に有意差あり  $P < 0.05$

コレステロールのトランスポーターである NPC1L1 は、一部のカロテノイドの取り込みに関与していると報告されている。また、ルテオリンは NPC1L1 の発現量を低下させることが知られている。そこで NPC1L1 に注目して解析を進めたところ、50  $\mu$ M、24 時間のルテオリン処理によって、Caco-2 細胞における NPC1L1 の mRNA 発現が抑制される傾向を認めた。

#### ② 抗アレルギー食品成分がミセル中に共存した場合の Caco-2 細胞によるシフォナキサンチンの取り込み

次にシフォナキサンチンと①の被験物質をミセル中に共存させ、当該ミセルを含んだ培地中で Caco-2 細胞を 3 時間培養し、取り込まれたシフォナキサンチン量を定量した。その結果、 $\alpha$ -トコフェロール、または $\gamma$ -トコトリエノールが共存した際に、シフォナキサンチンの取り込みが有意に抑制されることがわかった (図 5)。

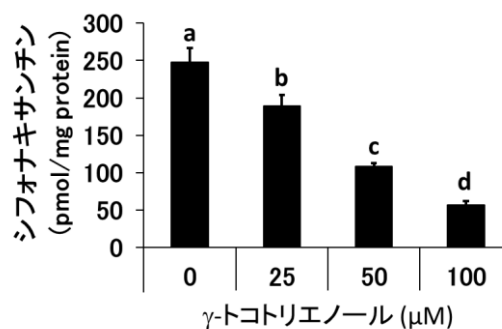


図 5.  $\gamma$ -トコトリエノールによるシフォナキサンチンの取り込みの阻害  
異なる符号間に有意差あり  $P < 0.05$

$\gamma$ -トコトリエノールもまた、NPC1L1 によって取り込まれることが報告されている。また、①の実験において、 $\gamma$ -トコトリエノールの前処理はシフォナキサンチンの取り込みを抑制しないことがわかっているため、ミセル中に共存した際の $\gamma$ -トコトリエノールによるシフォナキサンチンの取り込みの抑制は、NPC1L1 における競合阻害と考えられた。

$\beta$ -カロテンなどの低極性カロテノイドの消化管吸収には、SR-BI と NPC1L1 が関与していると報告されている。本研究結果よりシフォナキサンチンの消化管吸収にも NPC1L1 が関与していると考えられ、阻害剤を用いた検討からも NPC1L1 の関与を示すデータが得られている。他のカロテノイドと比較して、シフォナキサンチンは極性が高いにも関わらず、NPC1L1 によって輸送され得ることは予想外な結果であり、詳細な消化管吸収メカニズムにも興味をもたれた。

### 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)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yuki Manabe, Takashi Hirata, and Tatsuya Sugawara, "Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, attenuates mast cell degranulation by regulating sphingolipid metabolism", ACN2015 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, 2015.
- ② Yuki Manabe, Takashi Hirata, and Tatsuya Sugawara, "Carotenoid from green algae effectively suppresses mast cell degranulation via an alteration of cellular sphingomyelin metabolism", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015.
- ③ 真鍋 祐樹, 平田 孝, 菅原 達也, 「緑藻由来カロテノイドの抗炎症作用の評価」, 第 70 回 日本栄養・食糧学会大会, 2016.

- ④ 真鍋 祐樹, 平田 孝, 菅原 達也, 「緑藻由来カロテノイドはスフィンゴ脂質代謝の変動を介してマスト細胞の脱顆粒反応を抑制する」, 第 11 回 スフィンゴテラピイ研究会, 2016.
- ⑤ 真鍋 祐樹, 岡崎 俊朗, 平田 孝, 菅原 達也, 「スフィンゴミエリンの合成促進を介したシフォナキサンチンの脱顆粒抑制作用」, 平成 29 年度 日本水産学会春季大会, 2017.
- ⑥ 真鍋 祐樹, 岡崎 俊朗, 平田 孝, 菅原 達也, 「スフィンゴミエリンの合成促進を介した緑藻由来カロテノイドのマスト細胞脱顆粒抑制作用」, 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会, 2017.
- ⑦ 新多 智明, 李 卓思, 市原 美里, 真鍋 祐樹, 眞岡 孝至, 菅原 達也, 「食餌性緑藻由来シフォナキサンチンの体内分布と代謝」, 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会, 2017.
- ⑧ 市原 美里, 真鍋 祐樹, 菅原 達也, 「Caco-2 細胞におけるシフォナキサンチンの吸収に及ぼす食品成分の影響」, 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会, 2017.
- ⑨ 真鍋 祐樹, 岡崎 俊朗, 平田 孝, 菅原 達也, 「スフィンゴミエリンの合成の促進を介したシフォナキサンチンの抗炎症作用」, 第 31 回 カロテノイド研究談話会, 2017.
- ⑩ 新多 智明, 李 卓思, 市原 美里, 真鍋 祐樹, 眞岡 孝至, 菅原 達也, 「マウスにおける緑藻由来シフォナキサンチンの代謝」, 第 31 回 カロテノイド研究談話会, 2017.
- ⑪ 真鍋 祐樹, 「マリンカロテノイドの生物活性の探索」, マリンケミカルバイオロジー研究会 2018 講演会, 2018.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

真鍋 祐樹 (Manabe, Yuki)  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：20730104