

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：31603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15773

研究課題名（和文）ローヤルゼリー成分由来のペプチド化合物によるアナフィラキシー予防改善効果の検証

研究課題名（英文）Effects of royal jelly-derived peptide compounds on anaphylaxis

研究代表者

佐藤 陽（Sato, Akira）

医療創生大学・薬学部・准教授

研究者番号：20458235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：血小板活性化因子（PAF）は、アナフィラキシーにおける重要な脂質メディエーターであり、その活性を阻害することで致死的症状を予防できる。今回、ローヤルゼリーに含まれるロイヤリシン由来のビオチニル化ペプチドや、脂肪酸の10-ヒドロキシ-2-デセン酸（10-HDA）はいずれも、動物試験において、PAFの活性を抑制し、アナフィラキシーショックによる体温低下を抑制した。10-HDAは経口摂取でも体温低下抑制効果を示した。さらに、10-HDAの代謝酵素阻害薬を用いて検討した結果、10-HDAの中間代謝物（アルデヒド）がアナフィラキシーによる体温低下を有意に阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ローヤルゼリー由来のペプチドや脂肪酸がアナフィラキシーによる体温低下を有意に抑制することが動物試験により明らかとなった。もしこれら化合物がアナフィラキシーの予防・治療薬として実用化された場合、既存薬と併せて用いることで治療効果のさらなる向上や患者の死亡率低下などにつながる事が期待される。さらに、本化合物を健康食品や化粧品などへ利用することによるアナフィラキシー発症予防効果が期待できると考えられる。以上より、本研究成果による社会的波及効果、意義は極めて高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Platelet-activating factor (PAF) is a key lipid mediator in anaphylaxis, and inhibition of its activity can prevent fatal symptoms. In this study, both royal jelly-derived compounds, royalisin-related biotinylated peptide and the fatty acid 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) inhibited the activity of PAF and anaphylactic hypothermia, in vivo. Oral intake of 10-HDA also inhibited hypothermia. Furthermore, it was suggested that intermediate metabolites (aldehydes) of 10-HDA may significantly inhibit hypothermia caused by anaphylaxis.

研究分野：食品化学、衛生薬学

キーワード：ペプチド 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 ローヤルゼリー アナフィラキシー 体温低下 アルデヒド
血小板活性化因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

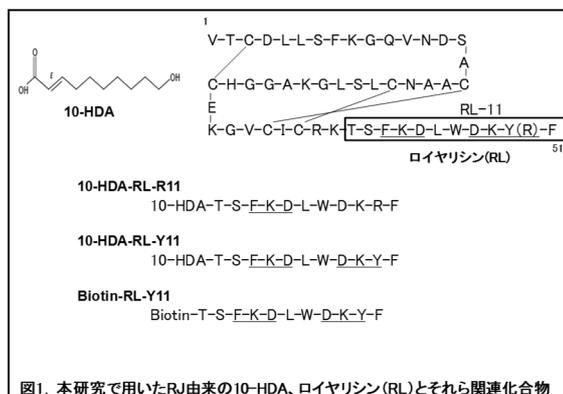
アナフィラキシーは、食物や昆虫、薬物などをアレルゲンとして起こる最も重篤で生命に危険を及ぼす全身性のアレルギー疾患である。アナフィラキシーは抗原曝露すると即時に血圧低下や体温低下、浮腫、じん麻疹などの症状を起こして死亡する危険性が高い。国内でのアナフィラキシーの発症頻度は人口 10 万人あたり 10~20 人/年であり、このうち 5%程度が死亡することが報告されている。特に児童におけるアナフィラキシーの発生頻度は高く、2013 年にアナフィラキシーを起こしたことがある児童 (0.48%) は 2004 年 (0.14%) の 3 倍以上に増加している。従って、アナフィラキシーを未然に予防できる、あるいは発症しても直ぐに服用 (投与) して改善効果が得られるような素材の開発が望まれている。

血小板活性化因子 (PAF) はアナフィラキシーの発症に関与する脂質メディエーターとして知られており、その活性を抑えることで致死的なアナフィラキシーを予防、改善できる。私達はこれまで、PAF を標的としたアナフィラキシー予防改善効果を示す複数種のペプチドを創出してきた (Sato et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2012; Sato et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2015 他)。さらに私達は、これまでの研究成果をもとに、ミツバチが合成・分泌し、健康食品や化粧品などに使用されているローヤルゼリーに着目して研究を行った。その結果、ローヤルゼリー中に約 0.8%含まれる、51 アミノ酸からなるペプチド、ロイヤリシンの C 末端側 11 アミノ酸残基 (41-51 番目部分) からなるペプチド (ロイヤリシン C11, 以下 RL-11 と示す、**図 1**) が、リゾリン脂質や酸化リン脂質に対して特異的結合性を示すことが明らかとなった (Sato et al., *J. Pept. Sci.*, 2018)。PAF はこれら脂質と非常に類似した構造を有することから、私達は RL-11 についてさらに調べ、これまでに以下の点を明らかとしている。

1. RL-11 は、Phe-Lys-Asp (FKD)、Asp-Lys-Tyr (DKY) の両配列を介して、PAF に対して直接的・特異的に結合する。
2. ラットを用いた予備試験の結果、N 末端をビオチニル化したロイヤリシン C11 (Biotin-RL-11) は、PAF 活性を劇的に抑制する。
3. 上記 2. の予備実験において、Biotin-RL-11 は、非ビオチニル化のペプチドよりも PAF 活性を劇的に抑制する。
4. Biotin-RL-11 を動物に高用量投与しても、みかけの副作用は起こらない。

以上より、RL-11、特にその N 末端をビオチニル化した Biotin-RL-11 は、PAF を標的とした新しいアナフィラキシー予防改善素材として期待できると考えた (**図 1**)。

しかし、上記の動物試験結果は予備試験段階であることから、本研究において、Biotin-RL-11 によるアナフィラキシー予防改善効果を検証することとした。さらに、ローヤルゼリー特有の脂肪酸である 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10-HDA) は抗菌作用、抗炎症作用、免疫調節、メタボリックシンドローム予防効果等が知られている。そこで本研究において、私達は 10-HDA のアナフィラキシーに対する効果についても調べることにした。



2. 研究の目的

本研究の目的は、ローヤルゼリー成分由来のビオチニルペプチド化合物や 10-HDA による、PAF を標的としたアナフィラキシー予防改善効果を検証することである。本研究におけるペプチドの主な学術的特色と創造的な点は、本ペプチドが、既知の PAF 関連素材 (PAF 受容体拮抗薬など) とは異なり、PAF 分子を標的としていること (PAF 分子を標的とした素材は私達が見出したペプチド化合物の他に見出されていない) 健康食品や化粧品などに用いられているローヤルゼリーの成分由来であるため、副作用の可能性は低いこと、11 個のアミノ酸およびビオチンからなる低分子化合物であるため、低コストでの合成が可能であること、である。

3. 研究の方法

(1) Biotin-RL-11 とその関連化合物および 10-HDA の PAF 活性に対する効果：ラット PAF 誘発足蹠浮腫試験による評価

Biotin-RL-11 とその関連化合物の作製および 10-HDA の購入

本研究で作成し用いたペプチド化合物は図 2 の通りであり、10-HDA は市販のものを購入した。

ラット PAF 誘発足蹠浮腫試験

Wistar 系ラットに Biotin-RL-11 とその関連化合物や 10-HDA を投与した後、PAF やヒスタミンを足蹠に皮下投与して、浮腫が最大となる 45 分後の足浮腫量を水置換法により測定した(ミリリットル単位で測定した)。これら化合物の PAF 活性に対する効果を、投与経路(静脈内、皮下、経口など)、投与量、投与時間の点から評価した。

(2) 全身性アナフィラキシー症状に対する Biotin-RL-11 とその関連化合物、および 10-HDA の効果：疾患モデル動物を用いた評価

アレルギーモデルマウスに対する全身性アナフィラキシーの誘導

卵白アルブミン(OVA)に特異的 IgE を恒常的に産生する遺伝子改変 BALB/c(OVA-IgE)マウスに、OVA を注射して全身性アナフィラキシーを誘導した。

アナフィラキシー症状の評価の指標：血管透過性、直腸温、血圧の測定

血管透過性は、マウスにエバンスブルー色素を注射して足に漏出した色素の量(程度)から調べる。体温、血圧はそれぞれ、直腸温測定計、血圧計により測定した。本研究では、このうち、体温に対する効果のみについて検討した。

各種ペプチドのアナフィラキシー症状に対する有効性の評価

のマウスに Biotin-RL-11 とその関連化合物や 10-HDA を投与したときの、アナフィラキシー症状(体温低下)に対する効果を、投与経路、投与量、投与時間の点から評価した。

4. 研究成果

(1) Biotin-RL-11 とその関連化合物や 10-HDA の PAF やヒスタミンの各活性に対する効果の検討(ラット足浮腫試験による検討)

Biotin-RL-Y11 および 10-HDA はいずれも、PAF の活性を有意に抑制した一方、本実験で用いた 10-HDA-RL-R11 は PAF 活性を抑制する傾向にあり、10-HDA-RL-Y11 は PAF 活性を抑制しなかった(図 2)。

10-HDA は生体内で速やかに 2-Decenedioic acid(2-DA、主代謝物)、3-Hydroxysebacic acid(3-HSA：副代謝物)に代謝されて、これら代謝物はほぼ全て 24 時間以内に尿中排泄されることが報告されている(図 3)。そこで、前述で得られた 10-HDA による抗 PAF 活性が、それ自体あるいは代謝物(2-DA、3-HSA)によるのかを同様の実験により調べた結果、10-HDA の代謝物である 2-DA、3-HSA はともに抗 PAF 活性を示さなかった(図 4)。

10-HDA は、ヒスタミンの活性を有意に抑制したのに対し、Biotin-RL-Y11 はヒスタミン活性を抑制しなかった。一方、10-HDA の代謝物である 3-HSA はヒスタミン活性を抑制しなかった。以上より、10-HDA はそれ自体が PAF およびヒスタミン、Biotin-RL-Y11 は PAF の各活性を抑制することが明らかとなった(図 5)。

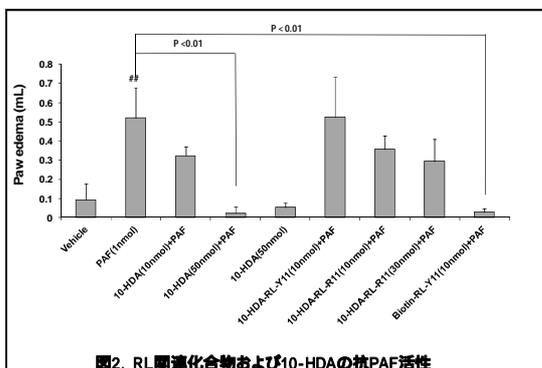
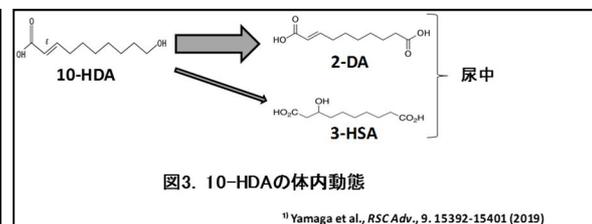


図2. RL関連化合物および10-HDAの抗PAF活性



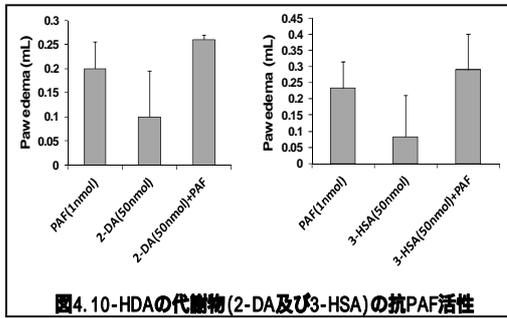


図4. 10-HDAの代謝物(2-DA及び3-HSA)の抗PAF活性

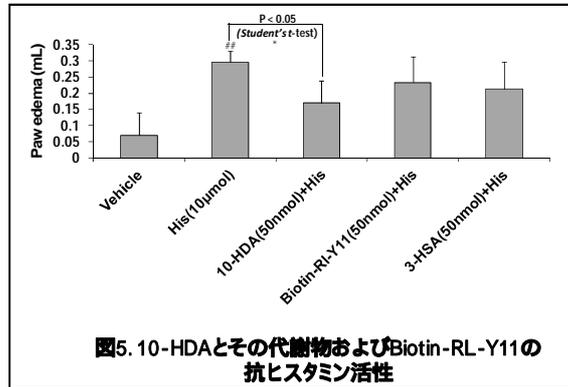


図5. 10-HDAとその代謝物およびBiotin-RL-Y11の抗ヒスタミン活性

(2) アナフィラキシーショックによる体温低下に対する 10-HDA とその代謝物および Biotin-RL-Y11 の効果 (疾患モデル動物を用いた検討)

10-HDA は、注射により、用量依存的にアナフィラキシーショックによる体温低下を抑制した (図6)。10-HDA の代謝物のうち、3-HSA はアナフィラキシーショックによる体温低下をやや抑制する傾向にあったが、10-HDA ほどではなかった。Biotin-RL-Y11 (100 nmol) は、注射により、アナフィラキシーショックによる体温低下を抑制する傾向にあった。10-HDA (1000 nmol) と Biotin-RL-Y11 (100 nmol) の併用投与 (注射) は、アナフィラキシーショックによる体温低下を有意に抑制した。10-HDA は注射だけでなく、経口摂取においても、アナフィラキシーによる体温低下を用量依存的に抑制した (図7)。

さらに、ADL 阻害剤を併用すると、10-HDA の体温低下抑制作用を減弱させ、更に ALDH 阻害剤を併用すると 10-HDA の体温低下抑制作用を促進させることが分かった (図8)。

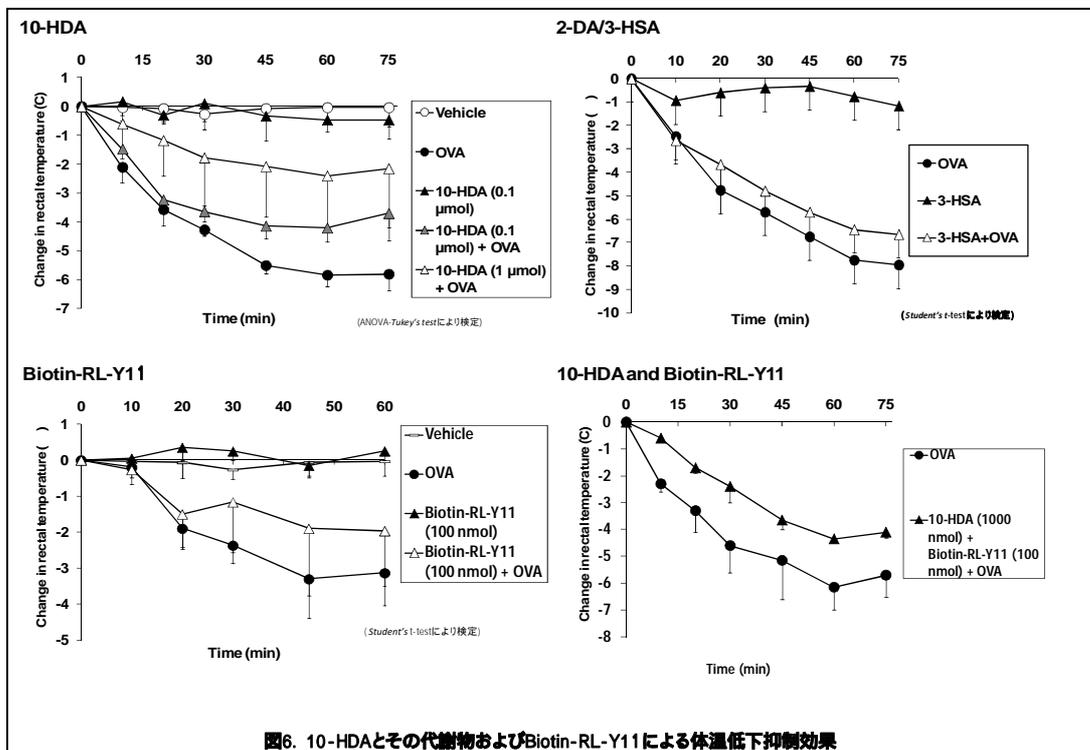


図6. 10-HDAとその代謝物およびBiotin-RL-Y11による体温低下抑制効果

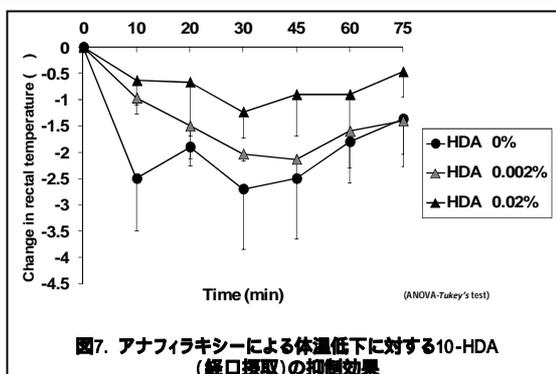


図7. アナフィラキシーによる体温低下に対する10-HDA (経口摂取)の抑制効果

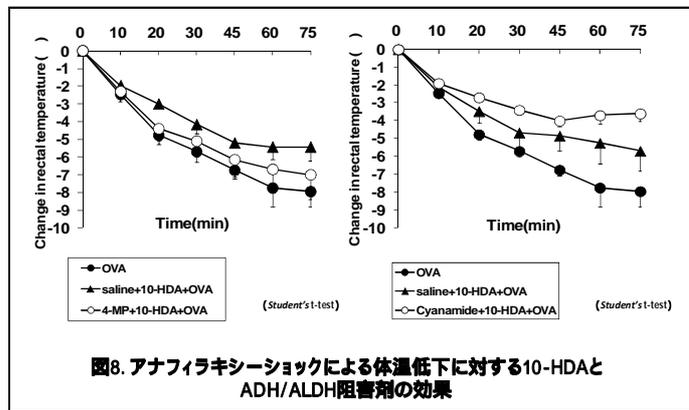


図8. アナフィラキシーショックによる体温低下に対する10-HDAとADH/ALDH阻害剤の効果

5. 総括および今後の展望

本研究において、ローヤルゼリー由来のタンパク質「ロイヤリシン」の部分ペプチド(のビオチニル化体)である Biotin-RL-11 や、ローヤルゼリー特有脂肪酸である 10-HDA はともに、アナフィラキシーの予防・改善に有用であると考えられた。これら化合物が新たなアナフィラキシー予防改善素材として開発、実用化されれば、低コストで生体に安全な、かつ効果的な素材(健康食品、化粧品、薬剤など)としてヒトへ提供することが可能となる。現在のアナフィラキシーの薬物治療としては、アドレナリンを第一選択薬として、抗てんかん薬、抗ヒスタミン薬、気管支拡張薬、ステロイドなどが用いられているが、PAF に関連した治療薬は未だ実用化されていない。従って、本ペプチド化合物が治療薬として実用化された場合、このペプチドを単独または既存薬と併せて用いることで治療効果のさらなる向上や患者の死亡率低下などにつながることを期待される。さらには、上記の化合物のみならず、そのアミノ酸配列を含むローヤルゼリー成分のロイヤリシンも、健康食品や化粧品などへ利用することによるアナフィラキシー発症予防効果が期待できると考えられる。以上より、本研究成果による社会的波及効果、意義は極めて高いと考える。今後は、これら化合物のアナフィラキシー予防・改善素材の実用化へ向けて、さらに研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Sato, Takahiro Fukase, Miyuki Yamazaki, Hinako Watanabe, Keiichi Ebina	4. 巻 12
2. 論文標題 Royal jelly-derived two compounds, 10-hydroxy-2-decenoic acid and a biotinylated royalisin-related peptide, alleviate anaphylactic hypothermia in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biologically Active Products from Nature	6. 最初と最後の頁 159 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/22311866.2022.2034530	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 Akira Sato, Hiroto Unuma, Keiichi Ebina	4. 巻 40
2. 論文標題 Royal jelly proteins inhibit macrophage proliferation: interactions with native- and oxidized-low density lipoprotein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Protein Journal	6. 最初と最後の頁 699 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10930-021-09998-1	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 佐藤 陽	4. 巻 41
2. 論文標題 アナフィラキシーに対するペプチド性薬剤の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 446 ~ 450
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 無
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 Akira Sato, Keiichi Ebina	4. 巻 25
2. 論文標題 A biotinylated peptide, BP21, alleviates hypotension in anaphylactic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3197.	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 佐藤 陽	4. 巻 536
2. 論文標題 高機能性ペプチドを用いた新規アナフィラキシー治療剤の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1163-1167
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 無
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 佐藤 陽	4. 巻 534
2. 論文標題 高機能性ペプチドを用いた新規アナフィラキシー治療剤の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1012-1016
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 無
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 佐藤 陽	4. 巻 540
2. 論文標題 ビオチニル化ペプチドを用いた新たなアナフィラキシー治療薬の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 310-314
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 無
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 Sato Akira, Fukase Takahiro, Ebina Keiichi	4. 巻 21
2. 論文標題 10-Hydroxy-2-decenoic acid-derived aldehydes attenuate anaphylactic hypothermia in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PharmaNutrition	6. 最初と最後の頁 100301 ~ 100301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phanu.2022.100301	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深瀬貴宏, 山崎美幸, 渡辺ひなこ, 蝦名敬一, 佐藤陽
2. 発表標題 ローヤルゼリー由来脂肪酸及びペプチドの抗アナフィラキシー効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋、オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深瀬貴宏, 山崎美幸, 渡辺ひなこ, 蝦名敬一, 佐藤陽
2. 発表標題 ローヤルゼリー由来10-ヒドロキシ-2-デセン酸およびロイヤリシン関連ペプチドのアナフィラキシーショックに対する効果
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 陽
2. 発表標題 新規アナフィラキシー治療薬の開発- ビオチニル化ペプチドの有効性評価-
3. 学会等名 公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 平成30年度研究助成事業 成果報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 陽
2. 発表標題 マクロファージの増殖・泡沫化に対するローヤルゼリータンパク質の影響
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

医療創生大学 教員プロフィール(薬学部・佐藤 陽)
https://www.isu.ac.jp/department/staff/detail.html?sato_akiira
<https://www.isu.ac.jp/department/pharm/staff.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
---------	---------