

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05891

研究課題名（和文）魚油代謝物のアレルギー症状緩和作用の機序解明と、その類縁体の構造活性相関解析

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying the anti-allergy activity of fish oil metabolites and the structure-anti-allergy activity relationship of ethanolamides of long-chain fatty acids

研究代表者

西 甲介（Nishi, Kosuke）

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80578097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：魚油の主成分であるドコサヘキサエン酸の代謝物の一つであるドコサヘキサエノイルエタノールアミドにアレルギー発症予防の可能性を見出した。また、長鎖脂肪酸と2-アミノエタノールとの縮合体を種々合成し、ラット好塩基球細胞株RBL-2H3細胞の抗原誘導性脱顆粒への影響を評価した結果、n-3多価不飽和脂肪酸エタノールアミドは脱顆粒を抑制すること、n-6多価不飽和脂肪酸エタノールアミドは脱顆粒を抑制しないことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本人の約半数がなんらかのアレルギー疾患に罹患しているといわれており、アレルギーは現代の日本人にとって、最も身近な非感染性疾患の一つである。アレルギーの治療には主に抗ヒスタミン薬が使用されるが、眠気、口渇、頭痛などの有害な副作用を伴う場合が多い。本研究の成果として、魚油の摂取がアレルギー発症の予防に関連する可能性を示すことができた。また、各種脂肪酸の摂取とアレルギー予防との関連性の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：We have found that docosahexaenoyl ethanolamide, a metabolite of docosahexaenoic acid that is the main component of fish oil, may prevent the onset of allergic diseases. In addition, we synthesized ethanolamides of various long-chain fatty acids and evaluated their effect on the degranulation of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. We found that ethanolamides of n-3 polyunsaturated long-chain fatty acids inhibit the degranulation whereas ethanolamides of n-6 polyunsaturated long-chain fatty acids do not.

研究分野：食品機能学

キーワード：ドコサヘキサエン酸 アレルギー 魚油 マスト細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の約半数がなんらかのアレルギー疾患に罹患しているといわれており、アレルギーは現代の日本人にとって、最も身近な非感染性疾患の一つである。なかでも花粉症は、国民の3人に1人が罹患しており、国民病といわれている。アレルギー患者には主に抗ヒスタミン薬が処方される。これはアレルギー症状の緩和に有効であるが、眠気、口渇、頭痛などの有害な副作用を伴う場合が多い。そのため、副作用を伴わないアレルギー症状緩和手段への期待が広がっている。

複数の疫学研究や動物実験の結果から、魚の摂取はアレルギーの発症予防や症状緩和と密接な関係があることと示唆されている。しかし、魚の摂取による抗アレルギー効果の作用機序について様々な仮説が提示されているものの、未だ明確にされていない。そこで申請者は、魚の抗アレルギー作用に焦点を当てた研究を展開した。

2. 研究の目的

アレルギー患者では、アレルゲン特異的な IgE 抗体が皮下組織や粘膜組織中のマスト細胞に結合している。アレルゲンに曝露するとマスト細胞上で抗原抗体反応が生じ、細胞内顆粒からヒスタミンなどのケミカルメディエーターが放出(脱顆粒)され、アレルギー反応を誘発する。先行研究¹において申請者は、魚油に含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)の脱顆粒抑制効果は極めて弱いが、DHAがヒト体内で代謝されて生じる Docosahexaenoyl ethanolamide (DHEA) に強い脱顆粒抑制作用があることを発見した。また、DHEAを一定期間、スギ花粉症モデルマウスに経口投与した結果、花粉症の症状が緩和されることを発見した。脾臓にはリンパ球が多く存在し、その中でも特に T 細胞がアレルギー関連サイトカインの主要な産生細胞であると考えられる。これらの結果を踏まえて、本研究では、DHEAによるアレルギー発症予防効果の検証と、DHEA 類縁体を用いた構造活性相関の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸アミドの合成

各種脂肪酸と 2-アミノエタノール、4-ジメチルアミノピリジンをジクロロメタンに溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を加えて、一晚反応させた。酢酸エチルで抽出した後、1 M 塩酸と飽和食塩水で洗浄後、シリカゲルカラムで精製した。

(2) 食物アレルギーモデルマウスに対するアレルギー発症予防効果評価試験

5週齢の BALB/c マウスをランダムに二群に分けた。DHEA 投与群には DHEA を、Control 群には水をそれぞれ一日おきに 49日間 (Day 1~Day 49) 経口投与した。Day 8 にマウスの背中を剃毛し、4%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を塗って皮膚バリアを破壊した。その後、オパールブミン(OVA)水溶液をパッチテスターに含ませて3日連続で4週間貼付し、OVAへの感作を誘導した (Day 8~Day 31)。その後、OVA水溶液を一日おきに強制経口投与して食物アレルギー反応を誘導した (Day 36~Day 50)。Day 50 に OVA 水溶液を強制経口投与した後、40分後の直腸温を測定した。また、血清を回収し、血中 IgE レベルを ELISA 法により測定した。

(3) 細胞毒性試験

RBL-2H3 細胞を 96 穴培養プレートに播種した。一晚培養後、各種脂肪酸アミドを含む培地で細胞を 24 時間培養した。その後、WST-8 含有培地で培養後、吸光マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、脂肪酸アミドの細胞毒性を算出した。

(4) -ヘキソサミニダーゼ放出試験

ラット好塩基球白血球細胞株 RBL-2H3 細胞を 96 穴培養プレートに播種し、抗ジニトロフェニル (DNP) IgE 抗体を一晚感作させた。培地を除去した後、各種脂肪酸アミドを含むタイロード緩衝液で細胞を 30 分間培養した。その後、DNP 結合ヒト血清アルブミン (DNP-HSA) で細胞を 30 分間刺激した後、上清を回収した。次いで、細胞を 0.1% Triton X-100 含有タイロード緩衝液で溶解した。培養上清と細胞溶解液に -ヘキソサミニダーゼの発色基質である 4-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside を加えた。酵素反応を停止させた後、吸光マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定し、-ヘキソサミニダーゼの酵素活性を測定した。測定結果をもとに、細胞の -ヘキソサミニダーゼ放出率を算出した。

4. 研究成果

(1) 各種脂肪酸アミドの合成

反応を行った後、生成物を NMR と LC-ToFMS により分析した。その結果、各種脂肪酸アミドが生成されていることを確認した。また、各種脂肪酸アミドが高純度で精製されていることを確認した。

(2) 食物アレルギーモデルマウスに対するアレルギー発症予防効果評価試験

食物アレルギーによるアナフィラキシー症状(低体温症)を評価するために、Day 50 に OVA を強制経口投与した後、直腸温を測定した。投与前の直腸温と比較した結果、Control 群では直腸温が低下しており、食物アレルギーによるアナフィラキシー反応が誘導されたことを確認した(図1)。一方、DHEA 投与群では直腸温の低下は認められず、Control 群と比べて有意に直腸温が高かった($P < 0.01$ vs control by Mann-Whitney test)。この結果から、DHEA の継続的な摂取により、アレルギー感作が予防されたと考えられる。

一方、回収した血清中の IgE 抗体レベルを ELISA 法で測定した結果、DHEA 非投与群と DHEA 投与群間で血中 IgE レベルに有意な差は認められなかった(図2)。また、血中 OVA 特異的 IgE 濃度については、DHEA 群の平均値は Control 群より低いものの、有意差は認められなかった(図3)。これらの結果から、DHEA のアレルギー発症予防効果は、IgE 抗体産生の抑制によるものではなく、別のメカニズムによるものであることが判明した。

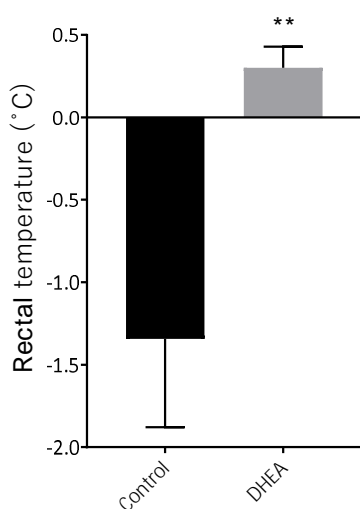


図1. 直腸温度の変化
** $P < 0.01$ vs control

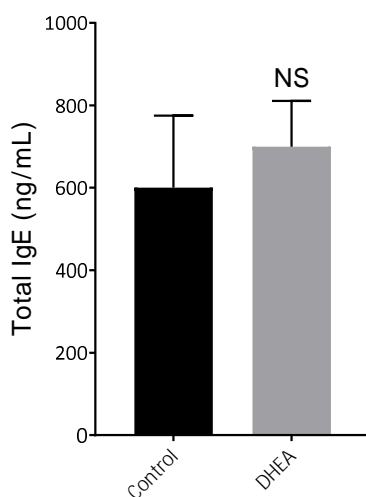


図2. 血清IgE濃度
NS; not significant vs control

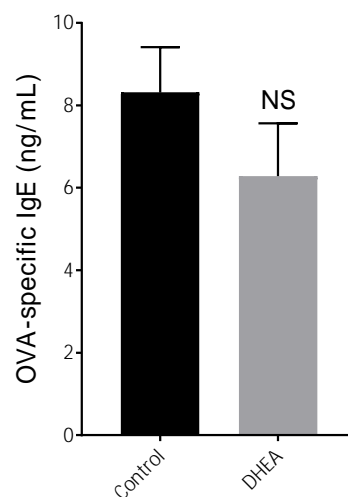


図3. 血清抗OVA-IgE濃度
NS; not significant vs control

(3) 細胞毒性試験

試験の結果、 γ -ヘキソサミニダーゼ放出試験を行った濃度範囲で、各種脂肪酸アミドは RBL-2H3 細胞に対して細胞毒性を示さなかった。そのため、 γ -ヘキソサミニダーゼ放出試験を行った濃度範囲で以降の実験を行った。

(4) γ -ヘキソサミニダーゼ放出試験

試験の結果、DHA を含めて、長鎖脂肪酸は RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制しないことが判明した。一方、DHEA は RBL-2H3 細胞の脱顆粒を有意に抑制した。また、 γ -リノレン酸とエイコサペンタエン酸のエタノールアミドも DHEA と同等の脱顆粒抑制効果を示した。一方、n-6 長鎖多価不飽和脂肪酸と n-9 長鎖不飽和脂肪酸のエタノールアミドは脱顆粒抑制活性を示さなかった。したがって、n-3 長鎖多価不飽和脂肪酸のエタノールアミドのみが脱顆粒抑制活性を有することを確認した。

<引用文献>

1. Nishi K, Kanayama Y, Kim IH, Nakata A, Nishiwaki H, Sugahara T. Docosahexaenoyl ethanolamide mitigates IgE-mediated allergic reactions by inhibiting mast cell degranulation and regulating allergy-related immune cells. Sci Rep. 2019;9(1):16213.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nishi Kosuke, Ito Takako, Kadota Ayumu, Ishida Momoko, Nishiwaki Hisashi, Fukuda Naohiro, Kanamoto Naoaki, Nagata Yoko, Sugahara Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Aqueous Extract from Leaves of Citrus unshiu Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in a Mouse Model of Systemic Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10081708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 西 甲介	4. 巻 74
2. 論文標題 Docosahexaenoyl ethanolamideのIgE依存性アレルギー反応への影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 39 ~ 43
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 Santoso William Halim, Ishida Momoko, Nishi Kosuke, Sugahara Takuya, Putra Agus Budiawan Naro	4. 巻 2
2. 論文標題 Anti-Allergy Potential of Averrhoa bilimbi Linn. Fruit Water Extract Shown by Its Suppressive Effect on the Degranulation of RBL-2H3 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Food and Nutraceutical	6. 最初と最後の頁 81 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33555/jffn.v2i2.62	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishida Momoko, Miyagawa Fuka, Nishi Kosuke, Sugahara Takuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Aqueous Extract from Cuminum cyminum L. Seed Alleviates Ovalbumin-Induced Allergic Rhinitis in Mouse via Balancing of Helper T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 3224 ~ 3224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods11203224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Yurika, Nishi Kosuke, Ishida Momoko, Nishimoto Sogo, Sugahara Takuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Anti-Allergic Effect of Aqueous Extract of Coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.) Leaf in RBL-2H3 Cells and Cedar Pollinosis Model Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutraceuticals	6. 最初と最後の頁 170 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nutraceuticals2030013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小野智幹、石田萌子、西甲介、小原理加、菊崎泰枝、吉野七海、菅原卓也
2. 発表標題 クマリン類の抗アレルギー効果に関する研究
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiki Kanayama, In-Hae Kim, Takuya Sugahara, Kosuke Nishi
2. 発表標題 Effect of docosahexaenoyl ethanolamide, a metabolite of docosahexaenoic acid, on allergic responses
3. 学会等名 The 33rd Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2020 FUCHU) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako Ito, Kosuke Nishi, Momoko Ishida, Ayumu Kadota, Takuya Sugahara
2. 発表標題 Effect of Citrus unshiu leaf water-extract on inflammation-induced mouse macrophage cell line RAW264.7 cells
3. 学会等名 The 33rd Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2020 FUCHU) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森川 敏生ら	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 353
3. 書名 スパイス・ハーブの機能と応用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PPAR 2 産生活性化剤、アディポネクチン産生活性化剤、及びMCP-1産生抑制剤	発明者 菅原 卓也、西 甲 介、石田 萌子、恩田 浩幸、吉野七海	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-113973	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/read0152614 食品機能学/動物細胞工学教育分野のホームページ http://web-amb.agr.ehime-u.ac.jp/ 機能性食品成分の探索と作用メカニズムの解明 https://www.ehime-u.ac.jp/data_study/nishi-kousuke/
--

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
研究協力者	金 仁恵 (Kim In-Hae)	愛媛大学・大学院農学研究科・研究員	
研究協力者	西脇 寿 (Nishiwaki Hisashi)	愛媛大学・大学院農学研究科・教授	

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
---------	---------