

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580146

研究課題名（和文） アレルギー反応に及ぼす生体内脂質過酸化の影響

研究課題名（英文） Effect of lipid peroxidation on allergic reaction.

研究代表者

新井 博文（Arai Hirofumi）

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70295848

研究成果の概要（和文）：活性酸素によって生理的に生成すると考えられる過酸化脂質がアレルギー反応に及ぼす影響について培養細胞を用いて試験管内で調べた。アレルギー反応に関与する白血球の一種であるマスト細胞を培養し、人工的に刺激したときに培養上清中に放出されるヒスタミンなどの化学伝達物質を定量したところ、過酸化脂質分解物である4-ヒドロキシ-2-ノネナルはマスト細胞からのヒスタミン放出を促進した。生体内脂質過酸化がアレルギーを悪化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Effect of lipid hydroperoxides which could be physiologically produced by reactive oxygen species on allergy reaction was investigated by using cultured cells *in vitro*. Mast cell line, a kind of white blood cell associated with allergy reaction was cultured and stimulated artificially. The chemical mediators such as histamine released from mast cells were facilitated by 4-hydroxy-2-nonenal, a decomposed product from lipid hydroperoxides. It suggests that lipid peroxidation might deteriorate allergy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アレルギー・活性酸素・脂質・酸化

1. 研究開始当初の背景

（1）生体内における酸化ストレスレベルの上昇は、アテローム性動脈硬化症やガンなどの様々な疾病や老化に関与することが示唆されている。近年、生体内脂質過酸化が炎症反応において重要な役割を持つことが多くの研究で報告されている。しかし、炎症反応の一種であるアレルギー性疾患において過

酸化脂質がどのように関与するかについてはこれまで報告されていない。

（2）日本のアレルギー罹患率は近年増加傾向にあり、国民の約30%が何らかのアレルギー性疾患を持っているといわれている。これまでに様々なアレルゲンが特定されるとともにアレルギー性疾患の発症メカニズムが

研究されている。アレルギーはその発症機構により I～IV型に分類されるが、罹患者の多くは I 型アレルギーによるものであり、花粉症などがこれに含まれる。I 型アレルギー反応では、マスト細胞表面に結合した IgE とアレルギーとの架橋結合によって脱顆粒が起こり、マスト細胞内に貯留されていたヒスタミンなどが放出され、平滑筋収縮や粘液分泌亢進などを引き起こす。一方、脱顆粒とともに細胞膜リン脂質中のアラキドン酸がホスホリパーゼ A₂によって切り出され、5-リポキシゲナーゼなどのアラキドン酸カスケードによってロイコトリエン (LT) が生成・放出される。LT の一種である LTB₄ は好酸球遊走作用を有しており、血液中の好酸球をアレルギー反応部位に集積させる。

2. 研究の目的

アレルギー性疾患の症状を悪化させる物質についてはその存在が予見されているが、これまでのところその特定には至っていない。そこで本研究では、アレルギー促進物質の評価法を確立するとともに、これらの方法を用いて生体内で生成する可能性がある過酸化脂質およびその二次分解産物がアレルギー反応に及ぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞の脱顆粒に伴うケミカルメディエーター放出測定条件の検討

マスト細胞 (RBL-2H3: ラット好塩基球由来、および PB-3c: マウス骨髄由来) の刺激の条件および脱顆粒の指標であるヒスタミンおよび LTB₄ の HPLC による定量法を検討した。

(2) 過酸化脂質がケミカルメディエーター放出へ及ぼす影響

樹立細胞株 RBL-2H3 および PB-3c をそれぞれヒスタミンおよび LTB₄ 放出の評価に用いた。10 μM カルシウムイオノフォア (A23187) により細胞 (1 × 10⁶ cells/ml) を刺激し、培養上清中に放出されたヒスタミンおよび LTB₄ を HPLC により定量した。また、抗ジニトロフェニル (DNP) IgE で感作した RBL-2H3 を DNP-BSA (抗原) で刺激し、放出されるヒスタミンを HPLC で測定した。

(3) 細胞内シグナル伝達への影響

RBL-2H3 を上記の抗原抗体反応で刺激し、可溶化した後に、細胞内シグナル伝達物質のチロシンリン酸化をウエスタンブロットティングで調べた。

4. 研究成果

(1) マスト細胞の脱顆粒に伴うケミカルメディエーター放出測定条件の検討

マスト細胞の脱顆粒の指標として β-ヘキソサミニダーゼの酵素活性を測定する方法が一般的に用いられている。しかし、β-ヘキソサミニダーゼは直接的なアレルギー反応誘導物質ではないことから、ヒスタミンおよび LTB₄ を指標として定量する方法を確立した。

①ヒスタミンを指標とする方法

RBL-2H3 をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激し、培養上清に放出されたヒスタミンを逆相 HPLC 蛍光検出によって定量した。蛍光標識は o-フタルアルデヒドを用い、カラム内反応によって行った。細胞からのヒスタミン放出率は 50% 前後であった。内部標準物質として 1-メチルヒスタミンを用いた。

②LTB₄ を指標とする方法

PB-3c をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激し、培養上清に放出された LTB₄ を逆相 HPLC 紫外検出によって定量した。細胞からの LTB₄ 放出量は 50 pmol/10⁶ cells 前後であった。内部標準物質としてプロスタグランジン B₂ を用いた。

(2) 過酸化脂質がケミカルメディエーター放出へ及ぼす影響

図 1 にリノール酸、13-HPODE および HNE の構造を示した。リノール酸は生体内に最も多く存在する不飽和脂肪酸であり、フリーラジカルなどの活性酸素によって酸化され、13-HPODE などが生成される。また、13-HPODE が分解されると HNE などのアルデヒドが生成する。

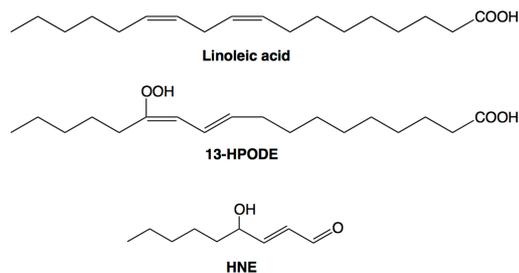


図1 過酸化脂質の構造

①過酸化脂質がカルシウムイオノフォア刺激によるヒスタミン放出に及ぼす影響

これらの化合物の存在下でカルシウムイオノフォアで 20 分間刺激し、ヒスタミン放出量を測定した。図 2 に示すように、未酸化の 32 μM のリノール酸はマスト細胞のヒスタミン放出に影響を及ぼさなかったが、32 μM の 13-HPODE および HNE はコントロールに比べてヒスタミン放出を促進した。なお、この

時に各化合物は細胞毒性を示さなかった（データ示さず）。

さらに HNE は濃度依存的にカルシウムイオノフォアによるヒスタミン放出を促進した（図 3）。

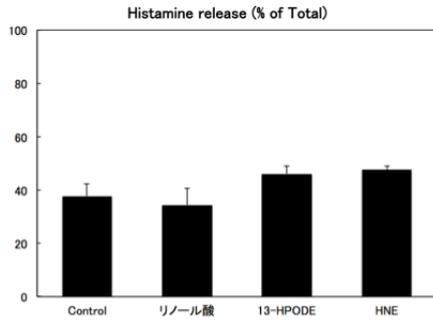


図2 過酸化脂質がヒスタミン放出に及ぼす影響 (カルシウムイオノフォア刺激)

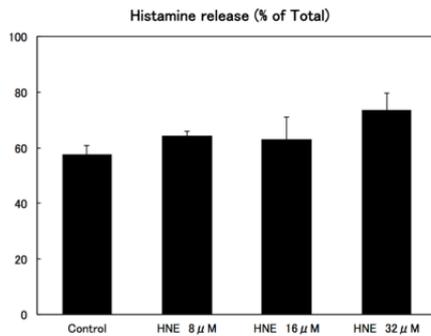


図3 HNE濃度がヒスタミン放出に及ぼす影響 (カルシウムイオノフォア刺激)

②HNE が IgE 感作刺激によるヒスタミン放出に及ぼす影響

次にマスト細胞の刺激方法をより生理的な抗原抗体反応により行った。抗原として DNP-BSA を、抗体として抗 DNP IgE を用いた。図 4 に示すように HNE は濃度依存的にヒスタミン放出を促進する傾向が認められた。

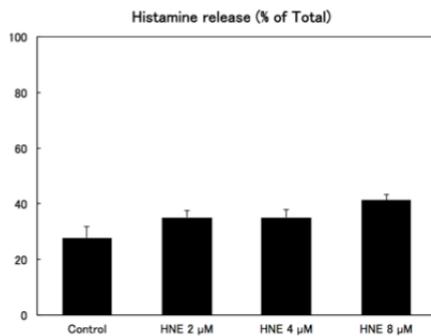


図4 HNE濃度がヒスタミン放出に及ぼす影響 (IgE感作刺激)

次に IgE 感作刺激における HNE のヒスタミ

ン放出促進作用が経時的にどのように変化するかを調べた。図 5 に示すように、刺激 0.5 分から 20 分にかけて 8 μM HNE は常にコントロールよりも高い値を示し、HNE がヒスタミン放出を促進した。

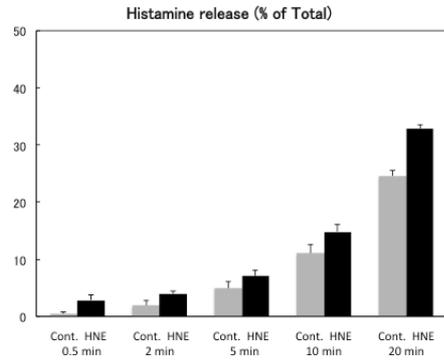


図5 HNEが経時的ヒスタミン放出に及ぼす影響 (IgE感作刺激)

③過酸化脂質がカルシウムイオノフォア刺激による LTB₄ 放出に及ぼす影響

もう一つのケミカルメディエーターである LTB₄ の放出に及ぼす過酸化脂質の影響を調べた。図 6 に示すように 32 μM の 13-HPODE および HNE は、マスト細胞の LTB₄ 放出に影響

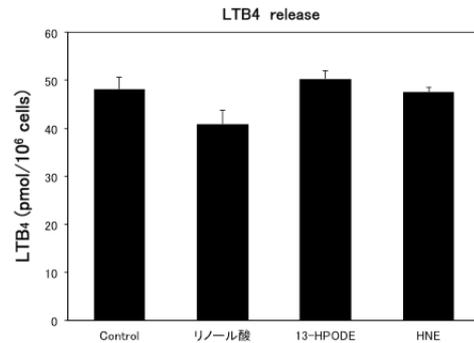


図6 HNEがLTB₄放出に及ぼす影響 (カルシウムイオノフォア刺激)

を及ぼさなかった。

(3) 細胞内シグナル伝達への影響

RBL-2H3 を 8 μM HNE の存在下で IgE 感作で 0~5 分刺激し、可溶化した後に SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングし、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) によって細胞内シグナル伝達物質のリン酸化状態を調べた。

図 7 に示すように HNE は 71 kDa 付近の Syk に影響を及ぼすと考えられるが、今後検出する抗体を変えることなどにより詳細に検討する必要がある。

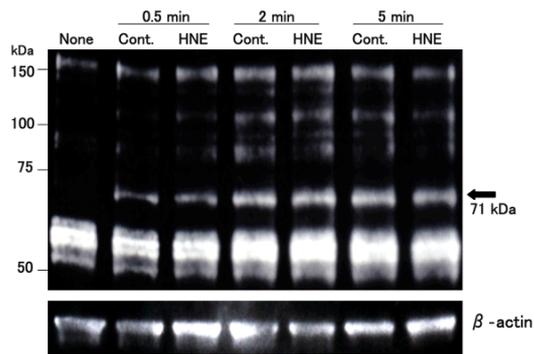


図7 HNEがシグナル伝達物質のリン酸化に及ぼす影響

(4) 結論

以上の結果より、過酸化脂質の分解反応で生じるHNEはマスト細胞の脱顆粒に伴うヒスタミンの放出を促進することでアレルギー反応をより悪化させる可能性が示唆された。そのメカニズムには、 LTB_4 は関与しないと考えられるが、より詳細な検討が必要である。

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)

マスト細胞のケミカルメディエーター放出に及ぼす過酸化脂質の影響
日本食品科学工学会
平成24年8月31日 札幌

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 博文 (ARAI HIROFUMI)
北見工業大学・工学部・准教授
研究者番号：70295848

(2) 研究分担者

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
山田 耕路 (YAMADA KOJI)
九州大学・農学部・教授
研究者番号：60158186