

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34447

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05441

研究課題名（和文）ウメのアレルギー疾患および性差に対する影響を明らかにする

研究課題名（英文）Clarifying the effects of Prunus mume on allergic diseases and gender differences

研究代表者

河野 良平（Kono, Ryohei）

大阪河崎リハビリテーション大学・リハビリテーション学部・講師

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）：スギ花粉症モデルマウスを雌雄両性で作出し、ウメ（Prunus mume）を摂取することによる花粉症症状に対する効果を検討するとともに花粉症症状およびウメの作用に性差があるかを研究した。花粉症マウスへの花粉点鼻刺激により生じるアレルギー反応である、ひっかき行動はウメ摂取により軽減される傾向が見られ、くしゃみは有意に軽減された。これらのアレルギー症状やウメ摂取によるアレルギー症状軽減効果に性差は認められなかった。また、ウメ摂取群のオスでは炎症関連遺伝子の発現が低いこと、メスではアクチビン受容体遺伝子の発現が低いことから、ウメの抗アレルギー作用は雌雄で別の経路を経て発揮され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

アレルギー疾患の患者数は増加の一途を辿り、世界的な問題となっている。ウメは食品であることから普段の食生活に取り入れることで毎日の食事でアレルギー症状が緩和でききることに期待が寄せられる。また、ウメは日本やアジアで食されるが、本研究により男女問わず花粉症予防に適する食品であることが明らかとなったことから、日本だけでなく海外に日本のウメが認知されれば輸出量が増加する可能性があり地域産業への貢献にも繋がると期待される。ウメが抗アレルギー作用を発揮する機序は即時型のアレルギー反応では男女で共通であり、慢性的な炎症に対しては異なる可能性が示唆され、学術的に大変興味深い結果となった。

研究成果の概要（英文）：We prepared a model of cedar pollen allergy in both male and female mice and investigated the effects of consuming Japanese apricot (Prunus mume, called Ume in Japanese) on allergic symptoms, as well as any potential sex differences in these effects. In the pollen allergy mice, nasal stimulation with pollen induced allergic reactions, such as scratching behavior, which tended to be alleviated by the consumption of Ume. Additionally, sneezing was significantly reduced by the consumption of Ume. No sex differences were observed in the allergic symptoms or in the reduction of allergic symptoms due to Ume consumption. Moreover, lower expression of inflammation-related genes was observed in the Ume-consuming male mice, while lower expression of activin receptor genes was noted in the female mice, suggesting that the anti-allergic effects of Ume might be exerted through different pathways in males and females.

研究分野：食品化学

キーワード：花粉症 ウメ アレルギー 性差 マウス

### 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、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。近年では食品成分による抗アレルギー作用が注目され、食事でアレルギーを予防することに期待が寄せられている。

これまでの簡易アレルギーモデル動物実験(受動皮膚アナフィラキシー反応試験)および培養細胞実験により、日本の伝統食品であるウメ(*Pruuns mume*)から、アレルギー反応に関与するマスト細胞の脱顆粒反応を抑制する物質として、Vanillin, p-Coumaric acid, Protocatechuic aldehyde, Syringic acid, Lyoniresinolなどを特定し、それらの作用機序の一端を解明した。さらにヒトを対象とした疫学研究から、ウメの摂取習慣がある場合にアレルギー症状を有する割合が低く、特に女性において顕著であること、アレルギー症状を有する割合に性差があることが明らかとなった。また、ウメに含まれる成分が性ホルモン分泌にも影響することが示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究計画ではヒトが発症するアレルギー性鼻炎の内、季節性アレルギー性鼻炎であるスギ花粉症を模したスギ花粉症マウスを雌雄両性で作出し、ウメのアレルギー症状に対する影響を詳細に調査することで、ウメの抗アレルギー作用の証明やその機序を解明するだけでなく、ウメの性差に対する効果も明らかにし、アレルギー疾患の予防・改善のみならず、性差のある疾患に対して医学的かつ食生活学的に貢献することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 花粉症マウスの作出

花粉症マウス作出には6週齢のBALB/c系マウスを雌雄各15匹ずつ用いた。雌雄ともに、スギ花粉感作群(感作群)5匹、スギ花粉感作+梅抽出物投与(ウメ群)5匹、非感作群(非感作群)5匹の3群の計6群に分けた。1週間の馴化の後、感作群とウメ群に、一次免疫として100 $\mu$ gスギ花粉抗原(*Cryptomeria japonica* pollen crude extract-cj, コスモバイオ)/アジュバント懸濁液の皮下投与を0、7日目に行った。さらに14日目から23日目まで1日1回スギ花粉抗原(100 $\mu$ g/ml生理食塩水中)を左右の鼻腔内にそれぞれ10 $\mu$ l注入して点鼻感作を行った。24日目から27日目には点鼻感作は実施せず通常飼育を行い、最終日28日目にスギ花粉抗原点鼻刺激により惹起されるアレルギー症状に関する行動観察後、麻酔下で採血、採材した。

#### (2) 投与ウメエキス調整

塩漬けの後天日干しされた梅干し(南高梅、和歌山県みなべ町産)の種を除去し、果肉部分500gをミキサーによりペーストにした。ペーストを凍結乾燥することで水分を除去し、凍結乾燥粉末180gを得た。さらに凍結乾燥粉末をメタノールで抽出し、続いてロータリーエバポレーターにより溶媒を除去した梅干し梅凍結乾燥メタノール抽出物(Ume, 108g)を飲水中に0.03%となるように添加した。本研究下でのマウスの一日平均飲水量は約4mL、平均体重は約25gであり、これらからマウスは1日当たり抽出物を1.2mg摂取することに相当する。この抽出物1.2mgを梅干しに換算すると5.6mgに相当し、マウス25g体重当たり5.6mgの梅干しを摂取することになる。

#### (3) 行動観察とスケジュール

1次免疫後、14日目の点鼻感作開始日と同日にウメ群に投与を開始した。投与は飲水中に0.03%Umeとなるように溶かして最終日28日まで自由摂取させた。感作群と非感作群には水を与えた。感作群と梅投与群について14、16、19、21、23、28日目に行動観察を行い、鼻をひっかいた回数とくしゃみの回数を測定した。測定時間は10分間とし測定者3人の平均値をとった。また、24日目から27日の間は点鼻感作は実施せず、最終日28日目にスギ花粉点鼻刺激後に行動観察し、麻酔下で安楽死させ解剖、採材した。

#### (4) 抗体測定

マウス尾静脈からの採血を0、7、14、21日目に行い、最終日28日目にも解剖時に採血した。血液は血清に分画したのち直接ELISA法でスギ花粉特異的IgE抗体およびIgG抗体をそれぞれ測定した。スギ花粉特異的IgE抗体は吸光度値(OD450)で、スギ花粉特異的IgG抗体は濃度で求めた。

#### (5) RNAマイクロアレイ解析

28日目に一連の試験終了後の採材時に、鼻腔粘膜組織を滅菌した精密綿棒を用いて回収しRNAsave中でRNA抽出まで冷凍保存した。鼻腔組織よりRNAを抽出しcDNAを合成し、サー

モフィッシャーサイエンティフィック社の遺伝子発現解析用マイクロアレイ GeneChip を用いた RNA マイクロアレイ解析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血中スギ花粉特異的 IgE と IgG

血中のスギ花粉特異的 IgE 抗体および IgG 抗体はスギ花粉感作により、21 日目から点鼻感作経過にともない増加が見られ、最終日 28 日には非感作群と比較して雌雄ともに感作群、ウメ群で有意に高値を示した。最終日 28 日の IgE 値を雌雄で比較すると感作群と非感作群では差は見られず、ウメ群ではメスの IgE 値が低値を示す傾向にあった。メスの IgE 値を最終日 28 日と 21 日で比較すると梅投与群の 28 日目の IgE 値が有意に減少に転じた。一方オスでは IgE 値の減少は見られなかった。

血中 IgG 値を雌雄で比較するといずれの群でも有意な差は見られなかったが、28 日目のメスのウメ群の IgG 値がオスの IgG 値よりも高値を示す傾向が見られた。

##### (2) ウメ摂取はくしゃみを有意に軽減する

感作群と梅投与群でひっかき回数とくしゃみ回数を比較したところ、ひっかき回数は梅投与開始 5 日目から、くしゃみ回数は投与開始 2 日目から低値を示す傾向にあり、23、28 日目にはくしゃみ回数に有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。ひっかき回数とくしゃみ回数に性差は認められなかった。

##### (3) 花粉症に伴う遺伝子発現には性差が見られる

非感作群、感作群、ウメ群それぞれのオスとメスの鼻腔周辺組織より RNA を抽出し cDNA を合成しマイクロアレイ解析に用い pathway 解析を行った。非感作群と比較して感作群のメスでは貪食作用に関連する遺伝子発現が低下し、炎症に関連する TNF- $\alpha$  遺伝子の発現が上昇した。感作群のオスでは遺伝子発現の有意な増加は見られず、アポトーシス抑制に関連する遺伝子の減少が見られ、雌雄で花粉症となったときの遺伝子発現に差異が見られた。非感作群の雌雄の比較では炎症に関連する遺伝子発現に差は見られなかったが、感作群の雌雄の比較ではオスの方が TNF 関連遺伝子 NF- $\kappa$ B の発現が高かった。

##### (4) ウメの摂取は性差に影響されず花粉症症状を軽減するが遺伝子変化は異なる

感作群と比較してウメ群のメスではアクチビン受容体遺伝子の発現が低下した。花粉症では Th2 応答が過剰となることが原因の一つとされ、アクチビン受容体が Th2 応答制御に関与しているが、ウメ群でアクチビン受容体遺伝子の発現が低かったことから、ウメ摂取により Th2 過剰状態が抑制されたと示唆された。オスでは TNF 伝達経路や TGF- $\beta$  を上方制御する遺伝子の発現低下が見られた。TNF は炎症誘導のため、TGF- $\beta$  は炎症時に抗炎症のために発現するが、ウメ群ではいずれも発現が低かったことから、ウメ摂取により花粉症症状が抑制された結果と考えられた。

#### 5. 考察

ひっかき行動やくしゃみなどの抗原刺激に対する即時的なアレルギー反応はどちらもマスト細胞からのヒスタミン放出が関与すると考えられており、本研究で雌雄両性でみられたウメのひっかき行動やくしゃみの抑制はマスト細胞の脱顆粒抑制によると示唆される。この結果は、過去の皮膚受動アナフィラキシー反応試験やマスト細胞を用いた研究結果と一致した。

血清中スギ花粉特異的 IgG と IgE は感作群、ウメ群ともに点鼻感作の経過に伴い増加し、この変化に性差は見られなかったが、メスの血清 IgE 値は数日間の非点鼻期間をおくとウメ群で減少に転じたことから、メスではウメ摂取によりスギ花粉特異的 IgE レベルが低下し、花粉症症状が緩和される可能性が示唆された。一方、オスでは抗体産生に対する影響は見られず、ウメ摂取による抗体産生への影響はメスのみで見られた。

非感作群と比較して感作群のメスでは炎症に関連する TNF- $\alpha$  遺伝子の発現が上昇したが、オスでは見られず、メスの方が免疫が過剰に働いているという一般的な知見と一致した。感作群と比較してウメ群のメスでは Th2 応答を促進するアクチビン受容体遺伝子の発現が低下したこと、オスでは TGF- $\beta$  や TNF 伝達経路を上方制御する遺伝子の発現低下が見られたことは、ウメ摂取による花粉症症状軽減作用と矛盾しない結果であった。ヒトの場合、女性は男性と比較して一般に免疫応答が活発であるとされるが、本研究のマウスにおいても花粉症症状に関連する遺伝子発現や花粉症症状に性差が見られ、その知見と一致する結果であった。また、ウメ摂取は性差に関係なく花粉症症状、特にくしゃみを軽減するには即時応答の脱顆粒を抑制することに加え、オスでは TNF 経路抑制により炎症が抑制される可能性、メスではアクチビン受容体発現抑制により Th2 応答が抑制される可能性が示唆された。

以上から、花粉症となることで変化する遺伝子には性差があり、ウメ摂取により変化する遺伝子にも性差があるが、ウメの摂取は雌雄問わず花粉症症状を軽減するのに有効であることが明らかとなった。花粉症マウスの遺伝子発現に性差があるにもかかわらず、ウメが性差に関わらず花粉症症状軽減作用に有効であるのは、ウメには複数の脱顆粒抑制成分が含まれることと同様に、複数の成分が多様な作用を発揮するためと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuno Keisuke, Torimoto Keiichi, Kuroda Ryohei, Cicalese Stephanie M., Okuno Yoshiharu, Kono Ryohei, Marumoto Shinsuke, Utsunomiya Hirotohi, Eguchi Satoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Infused juice concentrate of Japanese plum <i>Prunus mume</i> attenuates inflammatory vascular remodeling in a mouse model of hypertension induced by angiotensin II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1923 ~ 1933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-023-01332-9	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 該当する

1. 著者名 河野良平、奥野祥治、中村美砂、宇都宮智子、宇都宮洋才	4. 巻 17
2. 論文標題 和歌山農産物の健康効果	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 大阪河崎リハビリテーション大学紀要	6. 最初と最後の頁 6-17
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 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 Nomura Sachiko, Kono Ryohei, Imaoka Masakazu, Tazaki Fumie, Okuno Yoshiharu, Utsunomiya Hirotohi, Takeda Masatoshi, Nakamura Misa	4. 巻 86
2. 論文標題 Traditional Japanese apricot ( <i>Prunus mume</i> ) induces osteocalcin in osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 528 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac013	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇都宮洋才、奥野圭佑、黒田亮平、鳥本佳一、河野良平、奥野祥治、江口暁
2. 発表標題 梅肉エキスの高血圧予防効果、アンジオテンシンII投与マウスおよび血管平滑筋細胞での検討
3. 学会等名 第20回日本機能性食品医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 夏美宙茉、楠部千帆、河野良平、宇都宮洋才、奥野祥治
2. 発表標題 梅干し製造過程における果実および梅酢の化学成分と機能性変化
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	奥野 祥治  (Okuno Yoshiharu)  (60458073)	和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・教授    (54701)	

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