

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：37102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580151
 研究課題名（和文） 活性酸素種および脂質過酸化物が抗体産生へ及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of reactive oxygen species and lipid peroxide on antibodies production
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：脂質過酸化物の二次分解物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールは濃度依存的に IgA 産生を抑制した。また、4-ヒドロキシ-2-ノネナールが細胞内シグナル分子のリン酸化に及ぼす影響を調べた結果、4-ヒドロキシ-2-ノネナール添加 12 時間後のチロシンリン酸化が抑制されていた。これらの結果は、4-ヒドロキシ-2-ノネナールが IgA 産生を抑制することでアレルギー促進的に作用する可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：4-hydroxy-2-nonenal, a secondary product generated by decomposition of lipid hydroperoxides, suppressed IgA production from KHM-1B in a dose-dependent manner. Tyrosine phosphorylations of signal molecules around 64 kDa were inhibited by 4-hydroxy-2-nonenal in twelve-hour culture. These data suggest that 4-hydroxy-2-nonenal might facilitate allergy reaction by suppression of IgA production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品科学

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

日本のアレルギー罹患率は増加傾向にあり、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言われている。これまでに、アレルギーの原因物質であるアレルゲンが同定されており、その多くはタンパク質および糖タンパク質であることが明らかとなっているが、日本人のタンパク質摂取量はほとんど変わっていない。このことから、アレルギー罹患率の増加には、タンパク質以外の物

質が関与している可能性が考えられる。

アレルギーはその発症メカニズムにより I～IV型に分類されるが、食物アレルギーや花粉症などの多くは I 型アレルギーによるものである。I 型アレルギー患者は、血中の IgE 濃度が高いことが知られており、IgE が I 型アレルギーの原因抗体であると言われている。体内に侵入したアレルゲンと抗原提示細胞および B リンパ球との相互作用により、アレルゲンに特異的な IgE が産生される。産

生された IgE はマスト細胞表面に結合し、再侵入したアレルゲンと IgE の架橋結合が起こるとマスト細胞内に貯留されていたヒスタミンや細胞膜リン脂質のアラキドン酸から合成されるロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出され、平滑筋収縮や粘液分泌亢進などが起こり、アレルギー症状を呈する。また、I 型アレルギーには IgE だけでなく IgA も重要な役割を果たしている。腸管や鼻腔などの粘膜組織には分泌型 IgA が存在し、アレルゲンの体内への侵入を未然に防いでいる。すなわち、B リンパ球による IgE 産生の上昇および IgA 産生の低下がアレルギー症状を促進すると考えられる。抗体産生調節を介したアレルギー反応促進物質については、ある種の食用色素が IgE 産生を促進することが報告されているが、脾臓リンパ球を用いた現象報告にとどまり、メカニズムの解明には至っていない。

生体内における活性酸素種の生成は、脂質、タンパク質、核酸などを酸化修飾し、さまざまな生理機能障害をもたらすが、アレルギー反応との関連についてはこれまで十分に調べられていない。申請者の研究グループは、種々の食品成分が免疫応答やアレルギー反応に影響を及ぼすこと、ポリフェノールなどの抗酸化成分がアレルギー反応を抑制する可能性があること、活性酸素種による膜リン脂質およびリポタンパク質の酸化反応メカニズム、などについてこれまでに報告している。

2. 研究の目的

ヒト骨髄腫由来 IgE 産生細胞株 U266 およびヒト骨髄腫由来 IgA 産生細胞株 KHM-1B を用い、IgE および IgA 産生調節機能の評価系を確立し、これらの方法を用いて、脂質過酸化物の二次分解物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが IgE および IgA 産生に及ぼす影響を検討する。また、4-ヒドロキシ-2-ノネナールが細胞内シグナル分子のチロシンリン酸化に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) IgE および IgA 産生細胞株を用いた抗体産生調節機能評価系の確立

IgE 産生細胞株 U266 を 15%FCS 含有 RPMI-1640 培地に $0.125 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml に懸濁して 48 well ディッシュに 500 μ l ずつ播種し、24 時間培養した。細胞懸濁液を遠心分離し (1,500 rpm/4°C/5 分)、上清を回収した。上清中の IgE 量は ELISA で定量した。

IgA 産生細胞株 KHM-1B については、細胞を 15%FCS 含有 RPMI-1640 培地に $0.25 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml に懸濁して同様の検討

を行った。

(2) ELISA による IgE および IgA の定量

抗ヒト IgE、HRP 標識抗ヒト IgE、IgE 標準抗体、抗ヒト IgA、HRP 標識抗ヒト IgA、IgA 標準抗体は Bethyl より入手した。

一次抗体を 50 mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) で 100 倍に希釈し、96 well マイクロプレートに 100 μ l ずつ分注した。1 時間後、洗浄液 (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween20) で 5 回洗浄し、200 μ l のブロッキング液 (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA) で 30 分間ブロッキングした。5 回洗浄後、100 μ l の標準液または培養上清を各 well に添加し、室温で 1 時間静置した。5 回洗浄後、1%BSA 含有ブロッキング液で 100,000 倍希釈した HRP 標識抗体を 100 μ l ずつ各 well に分注し、室温で 1 時間静置した。5 回洗浄した後、発色基質である TMB 溶液を 100 μ l ずつ分注し、遮光下で 5 分間静置した後 0.18 M 硫酸で発色反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

(3) 4-ヒドロキシ-2-ノネナールの細胞毒性

U266 または KHM-1B を 1.0×10^5 cells/ml に調整し、48 well ディッシュに 500 μ l ずつ播種した。これらの細胞に 4-ヒドロキシ-2-ノネナールを終濃度 0~40 μ M で添加して 24 時間培養し、トリパンブルー色素排除法により、総細胞数および生細胞率を求めた。

(4) 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが IgE および IgA 産生に及ぼす影響

U266 および KHM-1B をそれぞれ 2×10^5 cells/ml と 0.5×10^4 cells/ml に調整し、4-ヒドロキシ-2-ノネナールを終濃度 0~10 μ M を添加して 24 時間培養した。細胞懸濁液を回収して遠心分離し (1,500 rpm/4°C/5 分)、上清中の IgE および IgA 量を ELISA で測定した。

(5) 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが KHM-1B の細胞内チロシンリン酸化に及ぼす影響

KHM-1B を 2×10^7 cells/ml に調整し、250 μ l ずつ 48 well ディッシュに播種した。4-ヒドロキシ-2-ノネナールを終濃度 10 μ M で添加して培養し、0、1、3、6、12、18、24 時間後に細胞を回収して、PBS で洗浄した後に lysis buffer (1% Triton-X100, 50 mM NaF, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-2Na, 1 mM Na₃VO₄, 1/200 vol. protease inhibitor cocktail, 1/100 vol. phosphatase inhibitor cocktail) を加えて 4°C で 30 分間、細胞を可溶化した。細胞可溶化液を遠心分離 (13,000 rpm/4°C/10 分) し、上清に 2x SDS-PAGE sample buffer を等量加え、5 分間煮沸した。電気泳動でタンパク

質を分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、odyssey blocking buffer でブロッキングした。抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) およびIRDye800 標識抗マウス IgG でリン酸化チロシンを検出した。

4. 研究成果

(1) IgE および IgA 産生細胞株を用いた抗体産生調節機能評価系の確立

IgE 産生細胞株 U266 を $0.125 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml に調整して、24 時間培養し、培養上清中の IgE を ELISA で定量した。その結果、 2×10^5 cells/ml で 24 時間培養した時の培地中の IgE 濃度が検量線の範囲内であったことから、至適細胞密度は 2×10^5 cells/ml であると判断した。

IgA 産生細胞株 KHM-1B を用いて至適細胞密度を検討した結果、 0.5×10^4 cells/ml で 24 時間培養した時の培地中の IgA 濃度が検量線の範囲内であったことから、至適細胞密度を 0.5×10^4 cells/ml と決定した。

(2) 4-ヒドロキシ-2-ノネナールの細胞毒性

U266 を 1.0×10^5 cells/ml に調整し、4-ヒドロキシ-2-ノネナールを終濃度 $0 \sim 40 \mu\text{M}$ で添加して 24 時間培養し、トリパンプル色素排除法により、総細胞数と生細胞率を調べた。その結果、生細胞率には大きな変化が見られなかったものの、終濃度 20 および $40 \mu\text{M}$ では総細胞数が減少する傾向が認められた。(図 1)。

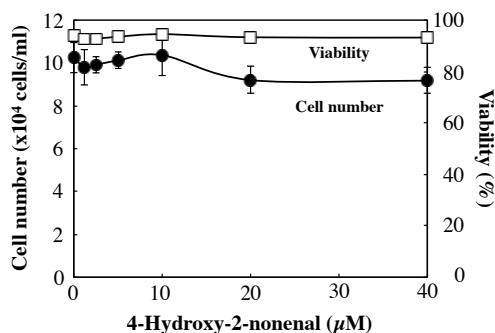


図1 4-ヒドロキシ-2-ノネナールがU266の総細胞数および生細胞率に及ぼす影響

KHM-1B についても同様の検討を行った結果、終濃度 $10 \mu\text{M}$ までは、総細胞数および生細胞率に大きな変化は見られなかったが、濃度 $20 \mu\text{M}$ から総細胞数の減少傾向が認められ、終濃度 20 および $40 \mu\text{M}$ で生細胞率の顕著な減少が認められた(図 2)。

酸化されていない脂肪酸においては、終濃度 $50 \sim 100 \mu\text{M}$ で添加して 24 時間培養しても細胞毒性はほとんど認められないのに対し(データ記載せず)、脂質過酸化物の二次分解物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールでは、終濃度 $20 \mu\text{M}$ と比較的低い濃度で添加した場合にも総細胞数および生細胞率の減少が

認められたことから、細胞に対して強い毒性を示すことが明らかとなった。

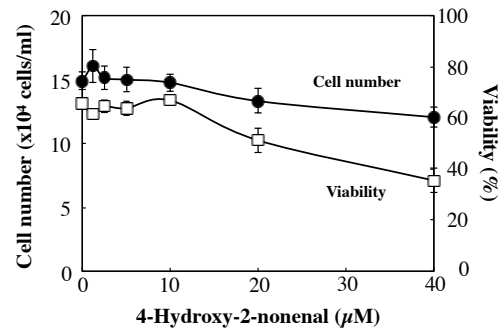


図2 4-ヒドロキシ-2-ノネナールがKHM-1Bの総細胞数および生細胞率に及ぼす影響

(3) 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが IgE および IgA 産生に及ぼす影響

U266 に 4-ヒドロキシ-2-ノネナールを細胞毒性を示さない終濃度 $0 \sim 10 \mu\text{M}$ で添加して 24 時間培養し、上清中に放出された IgE を定量した。その結果、終濃度 $10 \mu\text{M}$ では IgE 産生を抑制する傾向が認められたが、強い抑制作用ではなかった(図 3)。

KHM-1B に 4-ヒドロキシ-2-ノネナールを終濃度 $0 \sim 10 \mu\text{M}$ で添加して 24 時間培養し、上清中に放出された IgA を定量した。その結

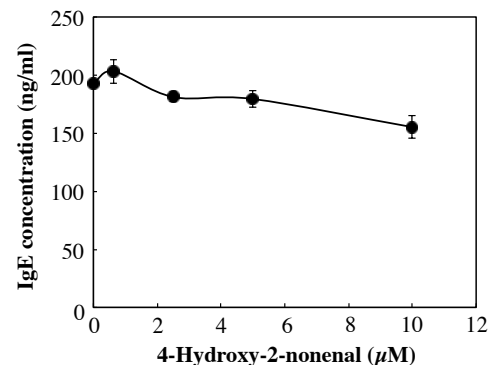


図3 4-ヒドロキシ-2-ノネナールがIgE産生に及ぼす影響

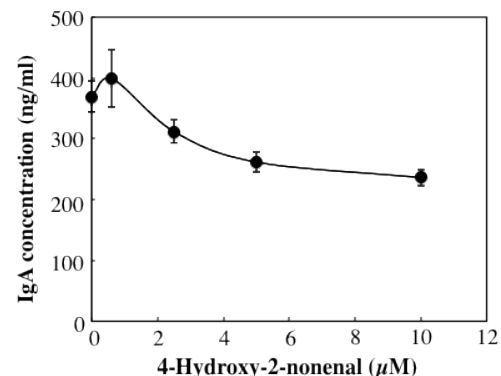


図4 4-ヒドロキシ-2-ノネナールがIgA産生に及ぼす影響

果、終濃度 2 μM 以上で濃度依存的に IgA 産生を抑制しており、終濃度 10 μM では 4-ヒドロキシ-2-ノネナル無添加における IgA 産生量の約 64%であった (図 4)。

(4) 4-ヒドロキシ-2-ノネナルが細胞内チロシンリン酸化に及ぼす影響

10 μM の 4-ヒドロキシ-2-ノネナル存在下で 0~24 時間培養したときの細胞内チロシンリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。その結果、培養 12 時間後に 64 kDa 付近の複数のタンパク質のリン酸化が抑制される傾向が認められた。この結果から 4-ヒドロキシ-2-ノネナルは細胞内シグナル分子のチロシンリン酸化を抑制することで IgA 産生を抑制していると考えられる。

これらの結果は、4-ヒドロキシ-2-ノネナルは IgA 産生細胞株 KHM-1B の細胞内シグナル分子のチロシンリン酸化を抑制することで、IgA 産生を抑制し、アレルギー促進的に作用する可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Mikako Takasugi, Toshitaka Hirata, Saki Matsumoto, Shogo Sekimoto, Ryota Hosomi, Kenji Fukunaga, Hirofumi Arai
Effect of 4-hydroxy-2-nonenal on chemical mediators release from mast cells.
104th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo.
2013 年 4 月 28 日~5 月 1 日
Palais de congress de Montreal, Montreal, Quebec, Canada.
- ② 平田俊貴, 松本紗貴, 関本将吾, 高杉美佳子, 新井博文.
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第 59 回大会
2012 年 8 月 29~31 日
北海道札幌市, 藤女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

新井 博文 (ARAI HIROFUMI)

北見工業大学・工学部・准教授
研究者番号：70295848
山田 耕路 (YAMADA KOJI)
九州大学・農学研究科・教授
研究者番号：60158186