

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450160

研究課題名(和文)ハマナス花弁由来加水分解性タンニンによるアレルギー抑制機序の解明

研究課題名(英文) Study on mechanism for anti-allergic effect of hydrolyzable tannin in rugosa rose petals

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在、日本人の約30%が何らかのアレルギーに罹っていることが知られている。花粉症等の即時型アレルギーは、マスト細胞が刺激されることで引き起こされる。本研究では、マスト細胞によるアレルギー反応に対するハマナス花弁由来加水分解性タンニンの効果を培養細胞を用いて調べた。ハマナス花弁由来加水分解性タンニンの一種であるテリマグランジンIは、刺激したマスト細胞からの化学伝達物質の放出を抑制した。また、テリマグランジンIは、細胞内シグナル伝達物質のリン酸化および細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制した。これらの結果から、テリマグランジンIはアレルギーの抑制に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that about 30% of Japanese people have any allergy diseases. Immediate hypersensitivity such as hay fever is induced by mast cells which are stimulated through the antigen-antibody reaction. In the present study, we investigated effects of hydrolyzable tannins in Rugosa rose petals on the allergic reaction in mast cells using cell lines. Tellimagrandin I, a kind of hydrolyzable tannin in Rugosa rose petals, suppressed the chemical mediator release from the stimulated mast cells. Moreover, tellimagrandin I inhibited the phosphorylation of protein kinases and calcium influx in mast cells. These results suggest that tellimagrandin I may have the anti-allergic function.

研究分野：食品機能学

キーワード：アレルギー ポリフェノール タンニン テリマグランジン ヒスタミン ロイコトリエン

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本におけるアレルギー疾患

現在、国民のアレルギー罹患率は約 30%といわれており、さらに増加傾向にあることが示されている。アレルギー疾患は、社会全体の生産効率を低下させ、莫大な経済損失をもたらしていることが指摘されており、その解決が急務となっている。花粉症等の即時型アレルギー疾患では、アレルゲン感作を受けた B 細胞から産生されたアレルゲン特異的 IgE がマスト細胞上の IgE レセプターに結合し、再侵入したアレルゲンによる IgE の架橋によってマスト細胞が刺激され、ヒスタミン等の化学伝達物質を放出することで、過剰な粘液分泌や平滑筋収縮等の症状を呈する。

(2) 食品由来ポリフェノールによるアレルギー抑制

アレルギー疾患の症状を予防・軽減する対策の一つとして、アレルギー抑制物質を含む食品の摂取が注目されており、薬剤の服用に比べて作用が緩やかであることや副作用が少ないこと等の理由からその有用性が期待されている。ハマナス (*Rosa rugosa*) は主に北海道の海岸に広く自生するバラ科植物であり、その花卉は主にハーブティー等の原料として用いられている。アイヌ民族はハマナスを伝統的薬草として利用しており、何らかの薬理的効果を持つと考えられるが、その効果と主要活性物質は特定されていない。これまでに申請者は、ハマナス花卉中のポリフェノールとして加水分解性タンニン単離・同定し、特にテリマグランジン I (図 1) が極めて多く含有されることを報告した(引用文献①)。また、ハマナス花卉の水抽出物およびエタノール抽出物が *in vitro* でのマスト細胞からのヒスタミン放出を有意に抑制することを報告し、特にポリフェノール含量の多いエタノール抽出物に強い活性が認められたことから、加水分解性タンニンが抑制活性に関与することが推測された。

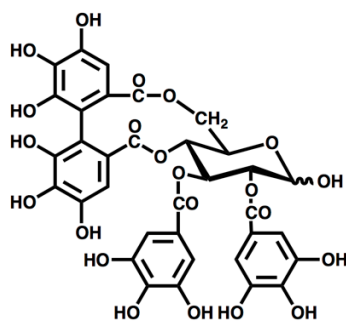


図 1 テリマグランジン I の構造

2. 研究の目的

本研究では、花卉由来加水分解性タンニンであるテリマグランジンのアレルギー抑制効果およびその作用機序を、以下の 2 項目についてマスト細胞株を用いた *in vitro* 実験で明らかにする。

(1) 加水分解性タンニンの単離・精製

ハマナス花卉から加水分解性タンニンを単離・精製・同定する。これを用いて、マスト細胞からの化学伝達物質放出に対する加水分解性タンニンの抑制活性を明らかにする。また、既知の食品由来アレルギー抑制物質(ポリフェノール等)および市販薬剤との活性を比較し、加水分解性タンニンの有用性を評価する。

(2) 加水分解性タンニンのマスト細胞内シグナル伝達抑制効果の解析

マスト細胞のアレルギー反応における細胞内シグナル伝達物質のリン酸化に対する加水分解性タンニンの抑制効果を解析する。また、シグナル伝達の下流に位置する細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に対する加水分解性タンニンの抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ハマナス花卉由来加水分解性タンニンの単離・精製

北見市端野町産ハマナスの花弁からエタノール/水系溶媒によって加水分解性タンニンを抽出し、凍結乾燥後に溶媒分配、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等によって加水分解性タンニンを分取・精製した。テリマグランジン I、テリマグランジン II (オイゲニイン)、カスアリクチンの構造を核磁気共鳴装置、高速液体クロマトグラフ質量分析により同定した。

(2) マスト細胞からの化学伝達物質放出に対する加水分解性タンニンの抑制活性評価

① ヒスタミン放出抑制活性

マスト細胞としてラット好塩基球由来白血病細胞株 (RBL-2H3) を培養し、抗 2,4-ジニトロフェニル-IgE で感作した。加水分解性タンニンとインキュベート後、抗原(アレルゲン)である 2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンを加えて刺激し、脱顆粒を誘導した。培養上清中に放出されるヒスタミンを高速液体クロマトグラフィーで定量した。

② ロイコトリエン B4 放出抑制活性

マスト細胞としてマウス骨髄由来マスト細胞株 (PB-3c) を培養し、加水分解性タンニン共存下でカルシウムイオノフォアを用いて刺激した。細胞が産生したロイコトリエン B4 を高速液体クロマトグラフィーで定量した。

③ 既知のアレルギー抑制物質との活性比較

食品由来ポリフェノールであるケルセチン、エピガロカテキンガレート、市販のアレルギー抑制薬剤 2 種のヒスタミン放出抑制活性を同様に測定し、加水分解性タンニンの活性と比較した。

(3) 加水分解性タンニンによるアレルギー抑制作用機序の解明

加水分解性タンニンの存在下で抗原抗体反

応により RBL-2H3 に刺激を与え、シグナル伝達物質のリン酸化をウエスタンブロット法で解析した。また、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に対する加水分解性タンニンの抑制効果を蛍光プローブ法で調べた。

4. 研究成果

(1) マスト細胞からの化学伝達物質放出に対する加水分解性タンニンの抑制活性評価

① ヒスタミン放出抑制活性

テリマグランジン I、テリマグランジン II (オイゲニン)、カスアリクチンは、抗原抗体反応刺激によるマスト細胞からのヒスタミン放出を有意に抑制し、その効果は濃度依存的であった。テリマグランジン I およびテリマグランジン II のヒスタミン放出抑制活性は同程度であったが、カスアリクチンは両者よりも有意に弱い抑制活性を示した。この結果から、ハマナス花弁中に最も多く存在するテリマグランジン I に注目して以降の研究を進めた。

② ロイコトリエン B4 放出抑制活性

テリマグランジン I は、カルシウムイオンフォア刺激によるマスト細胞からのロイコトリエン B4 の産生を有意に抑制し、その効果は濃度依存的であった。

これらの結果より、テリマグランジン I は、即時型アレルギーにおける主要な化学伝達物質であるヒスタミン放出およびロイコトリエン B4 産生・放出の両方に対して有効な食品由来抑制物質であることが示唆された。

(2) 既知のアレルギー抑制物質との活性比較

① 食品由来ポリフェノールとの活性比較

テリマグランジン I のヒスタミン放出抑制活性は、タマネギ等に含まれるポリフェノールであるケルセチン、緑茶等に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガレートよりも有意に高かった。

② 市販アレルギー抑制薬剤との活性比較

テリマグランジン I のヒスタミン放出抑制活性は、市販のアレルギー抑制薬剤のヒスタミン放出抑制活性よりも有意に高かった。

これらの結果より、テリマグランジン I のアレルギー抑制活性は、これまで報告されているアレルギー抑制化合物よりも生理活性が高いことが示された。

(3) 加水分解性タンニンによるアレルギー抑制作用機序の解明

① 細胞内シグナル伝達物質への影響

マスト細胞による化学伝達物質 (ヒスタミンおよびロイコトリエン B4) 放出時における細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の挙動について SDS-PAGE/ウエスタンブロット法で解析したところ、テリマグランジン I は、化学伝達物質放出に関わるシグナル伝達物質である ERK のリン酸化を抑制することが明らかとなった。

② 細胞内カルシウムイオン濃度への影響

細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の下流に存在するセカンドメッセンジャーである細胞内カルシウムイオン濃度の変化を蛍光プローブ法によって経時的にモニターしたところ、テリマグランジン I は、抗原抗体刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制することがわかった (図 2)。

③ 細胞へのテリマグランジン I の取込み

マスト細胞をテリマグランジン I とインキュベートした後に培養上清中から取り除き、同様にヒスタミン放出実験を行ったところ、テリマグランジン I はマスト細胞からのヒスタミン放出を上記と同様に抑制した。したがって、テリマグランジン I は、細胞に付着または取り込まれた後にヒスタミン抑制効果を示すことが推察された。

以上の結果から、テリマグランジン I は細胞に取り込まれた後に、シグナル伝達を阻害することでアレルギー反応を抑制することが示唆された (図 3)。

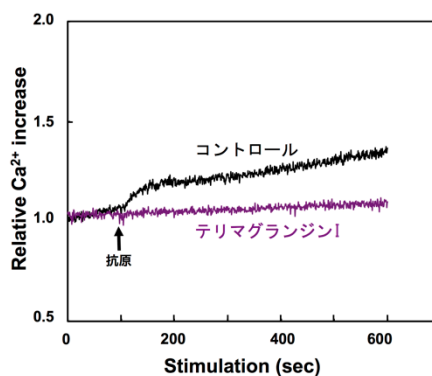


図 2 テリマグランジン I による細胞内カルシウム濃度上昇抑制効果

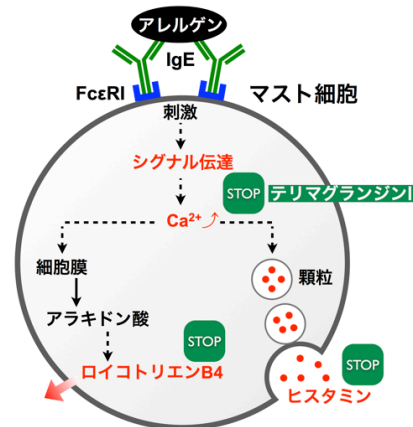


図 3 テリマグランジン I によるアレルギー反応の抑制機序

<引用文献>

① Ochir, S., Ishii, K., Park, B., Matsuta, T., Nishizawa, M., Kanazawa, T., Funaki, M., and Yamagishi, T., Botanical origin of mei-gui hua (petal of a *Rosa* species)., *J. Nat. Med.*, 64, 383-387, 2010.

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4件)

① 新井 博文、テリマグランジンによるアレルギー抑制作用、日本健康医学会総会、2015年11月、愛知医科大学(愛知県長久手市)。

② 笹山 志穂、高谷 祐介、山田 茉未、戸田 一也、高橋 良輔、山岸 喬、高杉 美佳子、新井博文、ハマナス花卉由来加水分解性タンニンによるアレルギー抑制効果、日本農芸化学会北海道支部会、2013年11月、北海道大学(札幌市)。

③ Arai, H., Anti-allergic functions of polyphenols, Antioxidants and Redox Process in Health, Oct. 2013, Sao Paulo (Brazil).

④ Takasugi, M., Sasayama, S., Toda, K., Yamagishi, T., Utsunomiya, A., and Arai, H., Effect of tellimagrandins in *Rosa rugosa* petals on chemical mediators release from mast cells, International Conference of Polyphenols and Health, Oct. 2013, Buenos Aires (Argentina).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他] なし

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

山田 耕路 (YAMADA, Koji)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 60158186

(3) 連携研究者

山岸 喬 (YAMAGISHI, Takashi)
北見工業大学・工学部・特任教授
研究者番号: 80271758