

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：26401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750051

研究課題名(和文)牛乳由来ペプチドはアレルギー症状及び発症を抑制できるのか

研究課題名(英文)Can the peptides from milk inhibit the development of allergic symptoms?

研究代表者

田中 守 (Tanaka, Mamoru)

高知県立大学・その他部局等・助教

研究者番号：00612350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食物アレルギーモデル実験系を用いて、これまでに細胞培養系で明らかにしたカゼイン由来HAQペプチドの抗アレルギー作用、さらに、抗アレルギー作用を持つペプチドの特性を明らかにすることを目的として実施した。結果、HAQペプチドの継続投与が、型アレルギーに関係する抗体産生を抑制するものではなく、別の作用機序によって抗アレルギー作用を示すのではないかと推測された。さらに、イミダゾールペプチドによる脱顆粒抑制効果のレベルはヒスチジン残基の数及び配列特異性が関係していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I evaluated anti-allergic effects of the HAQ peptide were investigated by using a mouse model and examined characteristic of peptides with anti-allergic effect using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells (RBL-2H3). As a result, it is suggested that continuous administration of HAQ peptide wasn't suppressed antibodies production, but anti-allergic effects were suppressed by another mechanisms of action. Furthermore, the level of degranulation inhibitory activity depended on the number of histidine residues in peptide, and peptide sequence specificity is important for the manifestation of degranulation inhibitory activity.

研究分野：食品栄養学

キーワード：抗アレルギー作用 牛乳由来ペプチド 食物アレルギーモデルマウス RBL-2H3 アナフィラキシー評価
脱顆粒阻害

1. 研究開始当初の背景

近年、花粉症やアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患患者は日本を含めた先進国を中心に増加の一途を辿っている。これまで、食品由来のカテキンなどのポリフェノール化合物が抗アレルギー効果を示すことが報告されているが、ペプチドについての報告はほとんどない。しかし、近年の申請者の研究でカゼイン由来ペプチド細胞培養系において抗アレルギー作用を有することがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究では、食物アレルギーモデル実験系を用いて、これまでに細胞培養実験系で明らかにしたカゼイン由来 HAQ ペプチドの抗アレルギー作用、さらに、抗アレルギー作用を持つペプチドの特性を明らかにすること目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける卵白リゾチームモデル系の確立

5週齢の BALB/c マウス、C3H/HeJ マウス、B10.A マウスの腹腔内に卵白リゾチーム(LHE, 和光純薬)を含むアルミニウムアジュバントを7日毎に5回免疫し、感作マウスを作製した。感作成立の判定は、血清中 LHE 特異 IgE 値及び IgG1 値を指標とし、ELISA 法により求めた。感作マウスの胃内に 10 mg の LHE を投与し、アナフィラキシー評価の指標として直腸温とスコアを測定した。スコアは Li¹⁾ のアナフィラキシー症状の5段階評価を用いた。スコアは以下の通り評価した：0 = 症状なし；1 = 鼻の周りや頭を掻く；2 = 目や口の周りが腫れ、毛が逆立つ・活動量の低下・呼吸数の増加；3 = ゼーゼーという・努力性呼吸を行う・口や尾部にチアノーゼが見られる；4 = 刺激しても動かない・痙攣が起こる；5 = 死亡。

(2) HAQ ペプチドの継続投与が LHE 感作マウスに与える影響

LHE 感作マウスを用いて、14 日間の HAQ ペプチド継続投与による血清中 LHE 特異 IgE 及び IgG1 産生、ならびに LHE 投与後のアナフィラキシー症状に与える影響を検討した。アナフィラキシー評価の指標として直腸温とスコアを測定した。

(3) HAQ ペプチドの継続投与が脾臓リンパ球のサイトカイン産生に与える影響

Balb/c マウスに 1 mg の HAQ ペプチドを含む 0.5 ml の PBS を週に 3 回、35 日間経口投与した。なお、非感作群と OVA 群は 0.5 ml の PBS を経口投与した。OVA 感作は 1 匹あたり、50 µg のオボアルブミン (OVA, Sigma) と 1 mg の Imject Alum を含む 0.2 ml の PBS を、マウスの腹腔内に 8, 18, 25 日目に投与

した。なお、非感作群は 1 mg の Imject Alum を含む 0.2 ml の PBS を腹腔内投与した。実験開始 37 日目に OVA 感作マウスから脾臓を採取し、Limら²⁾の方法に従い、Lympholyte-M Cell Separation Media (Cedarlane Laboratories Ltd.) を用いてリンパ球を分離した。分離したリンパ球に 50 µg の HAQ ペプチドを添加した後、CO₂ インキュベーター内で 37 °C、120 時間培養し、培養上清を回収した。回収した上清培地中に含まれる IFN- γ 及び IL-4 産生量をそれぞれのサイトカイン測定キット (R&D systems) を用いて測定した。

(4) ペプチド結合、アミノ酸配列特異性及びイミダゾールペプチドの脱顆粒に及ぼす影響

アミノ酸は L-ヒスチジン、L-アラニン、L-グルタミンを、合成ペプチドである HAQ (His-Ala- Gln), AQH (Ala- Gln- His), QHA (Gln- His - Ala), HH (His- His) 及び HHH (His- His- His) を用いた。

抗体感作されたラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 に、各試料を 10 分間作用させた後、抗原との共刺激 30 分後の β -hexosaminidase 放出活性を測定し、脱顆粒レベルを評価した。

(5) 統計解析

測定値は平均 \pm 標準偏差で示した。統計ソフトは PASW Statistics 21 を使用した。独立した 2 群の差の検定には Student の *t* 検定を用いた。独立した多群の差の検定には一元配置の分散分析 (ANOVA) を用い、その後 Post hoc 検定として Turkey 検定を用いた。危険率は 5% 未満を採用した。

4. 研究成果

(1) マウスにおける卵白リゾチームモデル系の確立

本研究では、*in vivo* でのカゼイン由来 HAQ ペプチドの抗アレルギー作用、さらに、抗アレルギー作用を持つペプチドの特性を明らかにすること目的とした。始めに LHE を抗原とし、3 種類の系統のマウスを用いて免疫回数がマウスの抗体産生に与える影響とマウスの種の違いがアナフィラキシー症状に与える影響を明らかにすることを目的とし、食物アレルギー動物モデルとしての実験条件を設定した。結果、マウスの血清中 LHE 特異 IgE (図 1) は 2 回の免疫で最も高値を示し、血清中 LHE 特異 IgG1 (図 2) においても 2 回の免疫以降で有意に高値を示した。さらに、アナフィラキシー症状は、マウスの種で異なり直腸温、スコアで共に C3H/HeJ マウスで最も強く惹起された (図 3a, b)³⁾。

(2) HAQ ペプチドの継続投与が LHE 感作マウスに与える影響

(1) で確率した食物アレルギー動物モデルを用いて HAQ ペプチドの抗アレルギー作用の

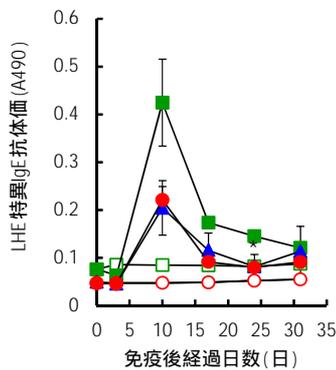


図1 BALB/c マウス, C3H/HeJ マウス及び B10.A マウスの血清中 LHE 特異 IgE
 = BALB/c-非感作群 (n = 6); = BALB/c-感作群 (n = 6); = C3H/HeJ-非感作群 (n = 6); = C3H/HeJ-感作群 (n = 5); = B10.A-非感作群 (n = 6); = B10.A-感作群 (n = 6)

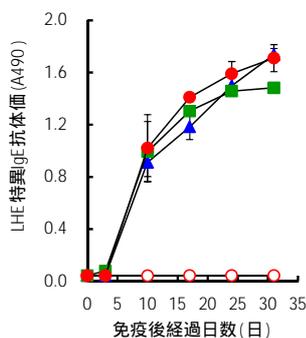


図2 BALB/c マウス, C3H/HeJ マウス及び B10.A マウスの血清中 LHE 特異 IgG1
 = BALB/c-非感作群 (n = 6); = BALB/c-感作群 (n = 6); = C3H/HeJ-非感作群 (n = 6); = C3H/HeJ-感作群 (n = 5); = B10.A-非感作群 (n = 6); = B10.A-感作群 (n = 6)

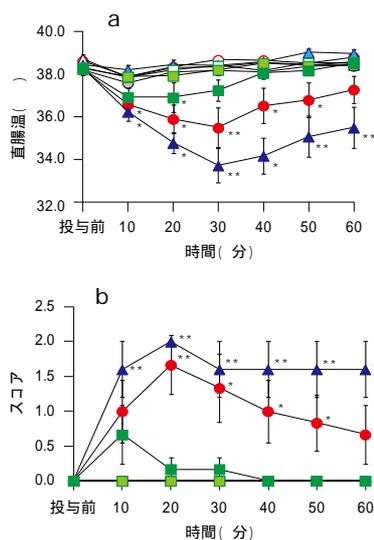


図3 LHE 投与後の直腸温 (a) とスコア (b) の比較
 = BALB/c-非感作-PBS 投与群 (n = 6); = BALB/c-非感作-LHE 投与群 (n = 6); = BALB/c-感作-LHE 投与群 (n = 6); = C3H/HeJ-非感作-PBS 投与群 (n = 5); = C3H/HeJ-非感作-LHE 投与群 (n = 5); = C3H/HeJ-感作-LHE 投与群 (n = 5); = B10.A-非感作-PBS 投与群 (n = 6); = B10.A-非感作-LHE 投与群 (n = 6) と B10.A-感作-LHE 投与群 (n = 6). 測定値は平均値 ± 標準誤差を表す. 他のおいれかの群と比較して** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

評価を行った。結果, HAQ ペプチドの継続投与による血清中 LHE 特異 IgE (図 4a) 及び IgG1 (図 4b) といった型アレルギーに関係する抗体価は, LHE 群と HAQ 群で, コントロール群と比較して有意な上昇が認められたものの, LHE 群と HAQ 群との間に有意な差は認められなかった。

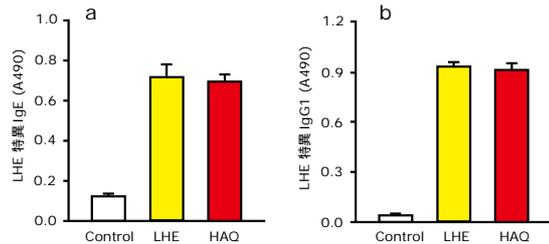


図4 血清中 LHE 特異 IgE (a) 及び IgG1 (b) 産生に及ぼす HAQ ペプチドの効果
 測定値は平均値 ± 標準誤差を表す. 非感作群と比較して** $p < 0.01$,

一方, アナフィラキシー評価では, LHE 群の直腸温はコントロール群, HAQ 群と比較して有意な低下が認められ, HAQ 群においては, コントロール群と比較して有意な差は認められなかった (図 5a)。LHE 群の症状のスコアはコントロール群と比較して有意な上昇が認められ, HAQ 群においては, コントロール群, LHE 群と比較して有意な差は認められなかった (図 5b)。即ち, アナフィラキシー症状の抑制することが認められ, 動物実験系においても細胞培養実験系同様に抗アレルギー作用を有することが示唆された。これらの結果は, HAQ ペプチドの継続投与が型アレルギーに関係する抗体産生を抑制するものではなく, 別の作用機序によって抗アレルギー作用を示すのではないかと推測された。

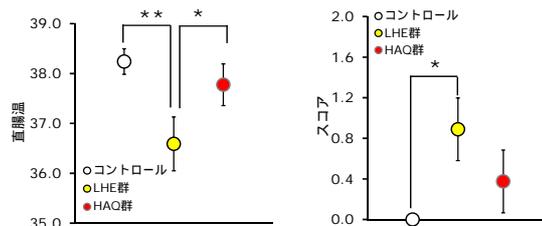


図5 マウスの直腸温 (a) 及びスコア評価に及ぼす HAQ ペプチドの効果
 測定値は平均値 ± 標準誤差を表す. 非感作群と比較して** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

(3) HAQ ペプチドの継続投与が脾臓リンパ球のサイトカイン産生に与える影響

HAQ ペプチド継続投与が脾臓リンパ球のサイトカイン産生に及ぼす影響を明らかにするため, 脾臓リンパ球のサイトカイン産生阻害活性測定を行った。HAQ ペプチド継続投与における IFN- γ 及び IL-4 産生阻害活性では, 非感作群と比較して OVA 群及び HAQ ペプチド群で IFN- γ (図 6a) 及び IL-4 産生 (図 6b) に有意な上昇が認められたものの, OVA 群と HAQ 群の間で有意な差が認められなかった。これらの結果から, HAQ ペプチドの継続投与

が抗体産生に引き続き、脾臓におけるサイトカイン産生を抑制するものではなく、別の作用機序によって抗アレルギー作用を示すのではないかと推測された。

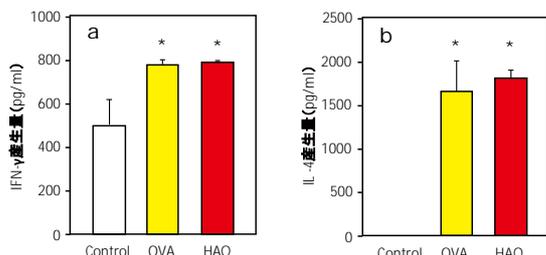


図6 感作マウス脾臓リンパ球の IFN- γ (a) 及び IL-4 (b) 産生に及ぼす HAQ ペプチドの効果
測定値は平均値 \pm 標準誤差を表す。非感作群と比較して* $p < 0.001$ 。

(4) ペプチド結合、アミノ酸配列特異性及びイミダゾールペプチドの脱顆粒に及ぼす影響

抗アレルギー作用を持つペプチドの特性についてペプチド結合、アミノ酸配列特異性及びイミダゾールペプチドの脱顆粒に及ぼす影響について検討した。脱顆粒抑制作用はペプチドの有無で異なることが明らかとなった。即ち、HAQ ペプチドは RBL-2H3 細胞の生存に影響することなく、脱顆粒抑制効果を示すことが示唆されたが、構成アミノ酸であるヒスチジン、アラニン、グルタミンの混合物では脱顆粒抑制効果が認められなかった(図7)。この結果から、脱顆粒抑制作用において、ペプチド結合の重要性が明らかとなった。

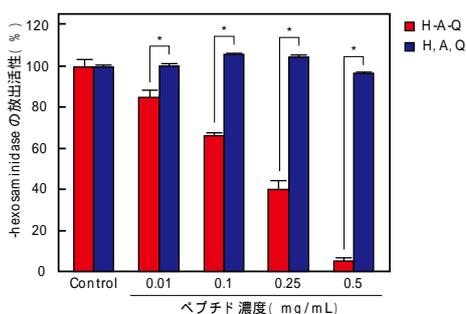


図7 HAQ ペプチドと HAQ ペプチドを構成するアミノ酸混合物が RBL-2H3 細胞の脱顆粒に与える影響
測定値は平均値 \pm 標準誤差を表す。非感作群と比較して* $p < 0.001$ 。

次に、HAQ ペプチドの構成アミノ酸の配列に焦点を当て、L-ヒスチジン、L-アラニン及びL-グルタミンの3つのアミノ酸で構成されるトリペプチド HAQ, AQH, QHA の3種で -hexosaminidase 放出活性及びサイトカイン産生の測定を行った。結果、ペプチドを構成するアミノ酸の配列の違いで脱顆粒抑制効果が異なることが明らかとなった(図8)。また、L-ヒスチジン残基のみで構成されるイミダゾールペプチドは、ペプチドに含まれるヒスチジン残基の数に依存して、脱顆粒抑制効

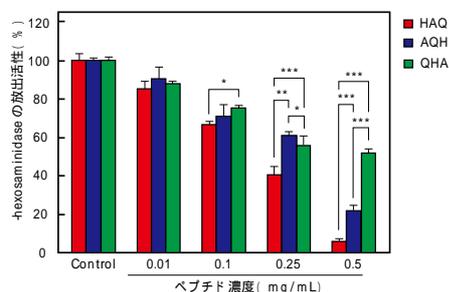


図8 HAQ, AQH, QHA ペプチドが RBL-2H3 細胞の脱顆粒に及ぼす効果
測定値は平均値 \pm 標準誤差を表す。非感作群と比較して*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

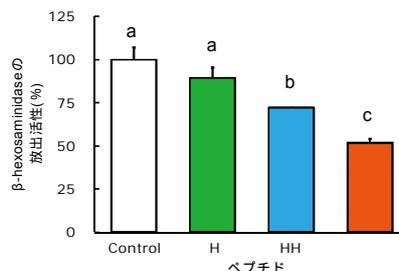


図9 ヒスチジン残基の数と脱顆粒抑制効果との関連
測定値は平均値 \pm 標準誤差を表す。アルファベットの異なるものは $p < 0.05$

果が増強された(図9)。

マスト細胞や好塩基球における脱顆粒抑制反応やサイトカイン産生にはカルシウムイオンや亜鉛イオン濃度が重要であることが明らかとなっている⁵⁾。さらに、HAQ ペプチドを構成している L-ヒスチジンはアミノ酸の中でも、特に金属イオンに対する親和性が著しく大きいこと、銅イオンとのキレート力において L-ヒスチジンがペプチドの N 末端側に位置する方が、C 末端に L-ヒスチジンを配置するより強いキレート力を有することが報告されている⁵⁾。したがって、N 末端側に L-ヒスチジンを配置する HAQ ペプチドは AQH 及び QHA ペプチドより強い脱顆粒抑制効果を示し、脱顆粒抑制効果は金属イオンとのキレート力の増大と関係していることが推察された。

< 引用文献 >

- 1) X.M. Li, B.H. Schofield, C.K. Huang, G.I. Kleiner, H.A. Sampson, A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 103, 206-214, 1999
- 2) B.O. Lim, K. Yamada, K. Yoshimura, T. Watanabe, P. Hung, S. Taniguchi, M. Sugano. Free bile acids inhibit IgE production by mouse spleen lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide and interleukins. Biosci Biotechnol Biochem, 59, 624- 627, 1995
- 3) 田中 守、根津俊大、吉本好延、岡本威明、マウスにおける卵白リゾチーム感作モデル系の確立、高知県立大学健康栄養学部研究

紀要、査読有、63 巻、2014、1-8

4) 西田圭吾、平野俊夫、アレルギー応答における亜鉛 / 亜鉛トランスポーターの役割、9、814-824、2010

5) 村本光二、陳 華敏、斎藤晃一郎、小川智久、大豆由来抗酸化ペプチドと非ペプチド性抗酸化剤の相乗作用、大豆たん白質研究会誌、8、5-61、1997

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

田中 守、根津俊大、吉本好延、岡本威明、マウスにおける卵白リゾチーム感作モデル系の確立、高知県立大学健康栄養学部研究紀要、査読有、63 巻、2014、1-8

〔学会発表〕(計 6 件)

岡本威明、In vivo , in vitro 系におけるイミダゾールペプチドの抗アレルギー効果、日本家政学会第 66 回大会、2014.5.25、北九州国際会議場(福岡・北九州)

M. Tanaka ,Sensitization and elicitation of an allergic reaction to lysozyme from hen egg white in mice ,The 6th Asian Congress of Dietetics, 2014.8.22 ,Taipei (Chinese Taipei)

T. Okamoto , Anti-allergic effect of imidazole peptides in vivo and in vitro. The 6th Asian Congress of Dietetics, 2014.8.22 ,Taipei (Chinese Taipei)

笹沼聖輝、TNF- 産生抑制及び脱顆粒阻害活性に関する高知県産有用植物の評価研究、日本薬学会第 135 年会、2015.3.27、神戸学院大学(兵庫・神戸)

田中 守、牛乳由来ペプチドの抗アレルギー効果、第 34 回食事療法学会、2015.3.29、仙台国際センター(宮城・仙台)

M . Tanaka , Degranulation inhibitory activity may depend on peptide binding and peptide sequence , The 12th Asian Congress of Nutrition , 2015.5.16 , Yokohama (Japan)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 守 (TANAKA Mamoru)

高知県立大学・健康栄養学部・助教

研究者番号：00612350