

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 安永 翔
Name

学位論文題目： ノビレチンの保健機能とその作用機構の解明に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

【研究背景・目的】

I型アレルギーは、即時型アレルギー、あるいはアナフィラキシー型とも呼ばれ、アレルゲン刺激により組織に存在するマスト細胞が種々のケミカルメディエーターを放出（脱顆粒）することで発症する。I型アレルギー反応による代表的疾病にはアレルギー性鼻炎（花粉症）、蕁麻疹、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどが挙げられ、近年、罹患者の増加が社会的問題となっている。一方、これまでに茶のカテキンなど、食品成分によるアレルギー症状の緩和作用の研究が盛んに行われており、機能性食品の活用がアレルギー症状の改善策として期待されている。

柑橘類にはビタミンC、葉酸、カリウム、ペクチンの他、フラボノイド類を筆頭とした様々な機能性成分が含まれており、疾病予防における柑橘類の有効性が高く評価されている。特に、柑橘類に特有のポリメトキシフラボノイドであるノビレチンは、抗炎症作用、抗ガン作用、抗糖尿病効果など、さまざまな生理活性をもつことが報告されている。ノビレチンの抗アレルギー効果についても報告例があり、培養細胞のAktリン酸化を阻害することで脱顆粒を抑制することが明らかにされているものの、詳細な作用機序の解明には至っていない。本研究では、ノビレチンの機能性食品素材としての可能性を評価することを目的とし、ノビレチンの抗アレルギー効果に関する詳細な作用機構の解明し、ノビレチンを含有する温州ミカン果皮の摂取が種々のアレルギー疾患モデルマウスに及ぼす効果について検討した。

【結果・考察】

ノビレチンの抗アレルギー効果とその作用機構の解明

ノビレチンの抗アレルギー効果の作用機構の解明の一環として、培養細胞を用いてI型アレルギーの基本的な反応である脱顆粒に及ぼすノビレチンの影響について検討した。その結果、ノビレチンは細胞株であるRBL-2H3細胞、及び初代マスト細胞であるBMMCの脱顆粒を有意に抑制した。さらにノビレチンは、カルシウムイオノフォアA23187により誘導されるRBL-2H3細胞の脱顆粒を抑制し、細胞内へのカルシウムイオン流入を阻害した。これらのことから、ノビレチンは細胞内カルシウムイオン濃度を制御するFcεRIシグナルを阻害することが示唆された。そこで、細胞内のシグナル伝達因子のリン酸化レベルを解析した結果、ノビレチンはPI3K、Akt、及びPLCγ1のリン酸化を抑制することが確認された(図1)。このことから、ノビレチンは報告例にあるAktよりさらに上流のシグナル伝達因子であるPI3Kのリン酸化を阻害することで、Akt及びPLCγ1のリン酸化を下方制御し、脱顆粒反応を抑制すると推察された。

さらに生体内のアレルギー反応に対するノビレチンの摂取効果について検討した結果、I型アレルギー反応によるPCAモデルマウスの血管透過性の亢進が、ノビレチンの経口投与により有意に抑制された。このことから、ノビレチンの摂取はI型アレルギー疾患の緩和に有効であることが推察された。

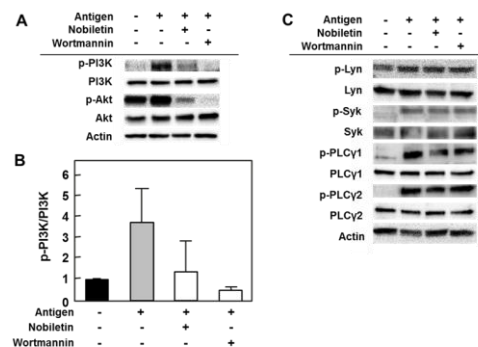


図1 RBL-2H3細胞の脱顆粒シグナル伝達経路に及ぼすノビレチンの影響

I型アレルギーに対するノビレチンとβ-ラクトグロブリンの共同的な抗アレルギー効果の検討

ノビレチンの脱顆粒抑制効果における作用機構が明らかになったことから、ノビレチンを高含有する柑橘果皮を用いた抗アレルギー効果のある機能性食品の開発を検討した。そこで、他の抗アレルギー効果のある食品素材と組み合わせることを着想し、ノビレチンとの組み合わせで抗アレルギー効果が高まる素材として、脱顆粒抑制効果を有する乳清タンパク質の一種である β-ラクトグロブリンに着目した。まず、RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応に対するノビレチンと β-ラクトグロブリンの複合効果について検討したところ、これらの同時処理によって、単独処理と比較して脱顆粒反応が強く抑制されることが明らかになった。このことから、両成分の併用はアレルギー症状の緩和に有効である可能性が示唆された。さらに、単独処理と比べてノビレチンと β-ラクトグロブリンの同時処理により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が顕著に抑制され、脱顆粒を誘導する細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を共同的に抑制することが明らかになった。細胞内のシグナル伝達因子のリン酸化レベルを解析した結果、ノビレチンは Akt 及び PI3K のリン酸化を抑制し、Syk のリン酸化には影響しないことが確認された。一方で、β-ラクトグロブリンは Syk のリン酸化を抑制した。加えて、ノビレチンと β-ラクトグロブリンの共作用により、Akt、PI3K、Syk のリン酸化が同時に阻害されることが明らかになった。これらの結果から、ノビレチンと β-ラクトグロブリンの組み合わせは単独処理と比較してより効率的に好塩基球の脱顆粒反応に関連したシグナル伝達系を抑制することが示唆された。

I型アレルギーモデルマウスに対するこれらの物質の効果を評価した結果、マウスに誘導した PCA 反応はノビレチンまたは β-ラクトグロブリンの単独投与によって抑制され、さらに、両物質の混合投与により、最も顕著に抑制された。次に、ノビレチンと β-ラクトグロブリンをそれぞれ含有する食品素材として、温州ミカン (*Citrus unshiu*) とヨーグルト乳清を用い、その効果を検討した。その結果、これらの食品素材の同時投与によって、単独投与群と比較して強い抗アレルギー作用が認められた。このことから、ノビレチンを含有する温州ミカン果皮と β-ラクトグロブリンを含むヨーグルト乳清を含むヨーグルト乳清の摂取によっても、両成分 (ノビレチンと β-ラクトグロブリン) の抗アレルギー効果が生体内で十分に発揮されることが確認された。

さらに、スギ花粉アレルギーである Cry j1 で感作したスギ花粉症モデルマウスのアレルギー症状を観察することにより、これら食品素材の同時摂取によるスギ花粉症の症状緩和効果を評価した。その結果、温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の混合投与により、スギ花粉症の症状であるくしゃみの頻度が、コントロールに対して有意に減少した (図 2)。即時型アレルギーの発症にはアレルギーの曝露により IgE 抗体産生を誘導する免疫応答が必須であり、スギ花粉症モデルマウスにおいても Cry j1 の感作により血液中の IgE 濃度の増加、リンパ球の IL-4 及び IL-5 の分泌の増加が認められた。しかし、投与マウスの血中 IgE レベルやリンパ球の Th2 型サイトカイン発現の変化は全く認められなかった。これらのことから、スギ花粉症マウスに対する症状緩和効果は、これまでに述べたノビレチン及び β-ラクトグロブリンの共同的な脱顆粒抑制効果を反映しており、温州ミカン果皮とヨーグルトの同時摂取がアレルギー疾患の緩和に有効であることが示唆された。

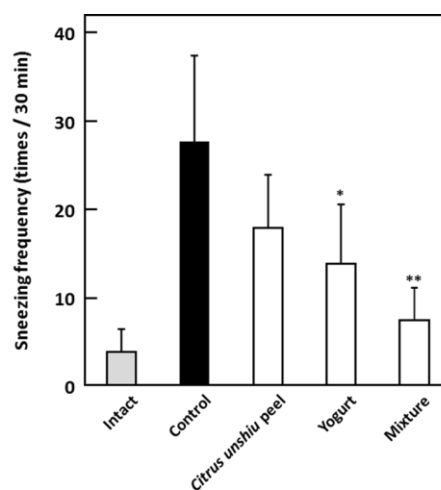


図2 温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の同時摂取によるスギ花粉症モデルマウスに対する症状緩和効果

結膜抗原誘発試験による温州ミカン果皮配合ヨーグルトのアレルギー症状緩和効果の検討

これまでの知見を基に、これらの食品素材を組み合わせたアレルギー症状を緩和する機能性食品の開発について検討した。そこで、温州ミカン果皮を配合したヨーグルトを開発し、介入試験によりヒトのスギ花粉症の症状に対する緩和効果を検討することを目的とし、スギ花粉アレルギー既往者にスギ花粉抗原を点眼することで誘発したアレルギー性結膜炎症状に及ぼす温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取効果を検討した。温州ミカン果皮配合ヨーグルト摂取期間前後で誘発したアレルギー性結膜炎症状を診断したところ、被験者の自覚的症状並びに他覚的所見に基づく症状においても、温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取による結膜炎症状の軽減が認められた。また、温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取によって、抗原点眼による結膜表面の温度上昇が有意に抑制されることが明らかになった (図3)。このことから、スギ花粉抗原により誘発される浮腫や炎症といった眼症状が、温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取により有意に改善されることが示唆され、スギ花粉症モデルマウスで得られた知見と同様、温州ミカン果皮とヨーグルト、あるいは、ノビレチンとβ-ラクトグロブリンの同時摂取によって、ヒトのスギ花粉症の症状が顕著に緩和されることが明らかになった。

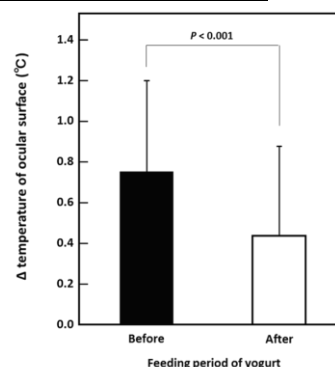


図3 結膜表面温度上昇に及ぼす温州ミカン果皮配合ヨーグルトの摂取効果

接触性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎の症状緩和効果の検討

アレルギー疾患は多因子性の疾患であり、治療薬などの開発には様々なアレルギー疾患モデル動物を目的に応じて適切に組み合わせ、検討することが重要となる。そこで本研究では、接触性皮膚炎モデルマウスあるいはアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いることで、IV型アレルギーや慢性炎症に対する温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の同時摂取による緩和効果について検討した。

接触性皮膚炎モデルマウスで見られる浮腫を指標として症状を評価したところ、温州ミカン果皮の単独投与により有意な症状の軽減が認められた。さらに、ヨーグルト乳清との混合投与により耳介浮腫がより顕著に抑制された (図4)。しかし、接触性皮膚炎の誘導により、マウス血液中のIgE濃度は大きく増加したものの、温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の投与による影響は認められなかった。このことから、温州ミカン果皮とヨーグルト乳清の投与による接触性皮膚炎の症状緩和効果は、Th2型免疫応答の抑制には寄与しておらず、Th1型免疫応答や浸潤したマクロファージの活性化機構などに作用することにより、皮膚の浮腫が抑制される可能性が推察された。また、炎症を起こした皮膚における炎症関連遺伝子の発現を解析したところ、MCP-1やRANTESといった炎症性細胞の遊走を惹起するケモカインの遺伝子発現が混合投与により有意に低下した。このことから、混合投与により炎症部位へのマクロファージの浸潤が抑制されることが示唆された。

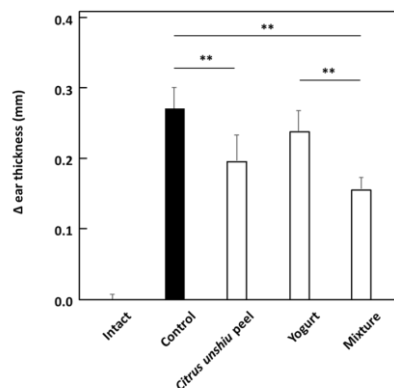


図4 温州ミカン果皮とヨーグルトの同時摂取による接触性皮膚炎モデルマウスの耳介浮腫に及ぼす影響

さらに、NC/Ngaマウスにおけるアトピー性皮膚炎の症状が、温州ミカン果皮の単独投与、及びヨーグルトとの混合投与により有意に改善された (図5)。組織染色法による皮膚の組織学的解析からも、温州ミカン果皮単独投与群と混合投与群で耳介と背部皮膚における浮腫の軽減が認められた。温州ミカン果皮の投与によるアトピー性皮膚炎症状の緩和効果がIFN-γを誘導するTh1型免疫応答に影響しているかどうか検

(様式 5) (Style5)

討するため、アトピー性皮膚炎モデルマウスの脾臓リンパ球の IFN- γ 発現を解析した。その結果、アトピー性皮膚炎の誘導により惹起されたリンパ球の IFN- γ 産生は、温州ミカン果皮やヨーグルトの投与の影響を受けず、Th1 リンパ球のポピュレーションの変化も認められなかった。これらのことから、温州ミカン果皮のアトピー性皮膚炎の症状緩和効果には Th1 免疫応答の抑制は関与しておらず、接触性皮膚炎モデルで見られた炎症応答の抑制など、他の作用機構が寄与している可能性が推察された。

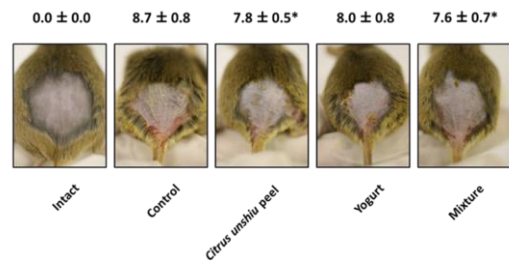


図5 温州ミカン果皮とヨーグルトの同時摂取によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎スコアに及ぼす影響

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。