



Title	Fisetin, a flavonol, inhibits T helper 2 (Th2) type cytokine production by activated human basophils
Author(s)	比嘉, 慎二
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43893
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	比嘉慎二
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17627号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Fisetin, a flavonol, inhibits T helper 2 (Th2) type cytokine production by activated human basophils (フィセチンはヒト活性化好塩基球からの Th2 タイプサイトカイン産生を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

[目的]

喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症などのアレルギー疾患は、遺伝要因と環境要因との相互作用により発症すると考えられているが、この数十年間での急激な発症率の増加は遺伝要因だけでは説明がつかず、環境要因の変化、すなわちアレルゲンの増加、感染症のパターンの変化、衛生状態の変化等による影響が大きいものと考えられる。食習慣の変化もその一因と考えられているが、われわれは、抗アレルギー作用を有する物質を含む食物の摂取不足がアレルギー発症を高めている可能性を考え、アトピー性皮膚炎に対し臨床効果が認められたある民間療法の解析から、抗酸化作用や抗炎症作用など多彩な生理作用を有することが報告されているフラボノイドと総称される天然物質群に注目した。これまでに柿葉抽出物およびその主要フラボノイド (astragalin) は、in vitro においてヒト好塩基球細胞株 KU812 からのヒスタミン分泌を抑制することを報告したが、さらに astragalin と類似構造を有する数種類のフラボノイドにおける抗アレルギー作用についてヒト好塩基球細胞、およびアトピー性皮膚炎モデルマウス (NC/Nga) を用い検討した。

[方法ならびに成績]

(1) Cell line での検討

ヒト好塩基球細胞株 KU812 に各フラボノイドを添加培養後、A23187 刺激にて誘導されるサイトカインの発現を RT-PCR 法にて検討した結果 IL-4、IL-5 について fisetin に強い発現抑制作用を認め、kaempferol、quercetin にも弱いながらも抑制作用が認められた。特に fisetin は、Th2 タイプサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) に対し著明な発現抑制作用を認めたが、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の発現には影響を与えたなかった。蛋白レベルでの検討 (ELISA 法) においても fisetin は IL-4、IL-5、IL-13 産生を著明に抑制した。 (IC50 = 19.4 μ M (IL-4)、17.7 μ M (IL-5)、17.4 μ M (IL-13))。さらに類似構造を有する 20 種類のフラボノイドのスクリーニングにより fisetin、apigenin、luteolin、kaempferol、quercetin に Th2 タイプサイトカイン産生抑制作用が認められ、またその抑制活性のための基本骨格が明らかとなった。

(2)ヒト正常好塩基球における検討

Cell line で認められた作用が正常細胞においても同様に認められるかどうか確認するため、健常人ドナー由来バフィーコート、あるいはスギ花粉症患者末梢血より Percoll 比重遠沈法 + magnet beads による negative selection にて末梢血好塩基球（純度 90% 以上）を採取し検討した。抗 IgE 抗体 (1 μ g/ml) あるいはスギ allergen (Cedar pollen extract·Cj (10 ng/ml)) 刺激にて誘導されるサイトカイン (IL-4, IL-13) 産生を fisetin は用量依存的に抑制した (IC50 = 4.8~5.1 μ M (IL-4)、6.2 μ M (IL-13))。RT-PCR による検討において fisetin は上記サイトカイン発現を抑制したが myricetin は抑制しなかった。

(3)サイトカイン発現抑制メカニズムに関する検討

IL-4、IL-5、IL-13 の発現調節に共通に関わる転写因子として NFAT や GATA family が知られている。フラボノイドがこれらのサイトカイン発現に関わる転写因子活性に影響を与えるのかどうか、NFAT をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。その結果 fisetin (30 μ M) は、KU812 細胞に対し A23187 刺激にて誘導される NFAT の DNA 結合活性を抑制した。またシクロスボリン A もこの活性を完全に抑制したが、サイトカイン産生を抑制しない myricetin ではこの作用は認められなかった。

(4)in vivo (アトピー性皮膚炎モデルマウス) での検討

アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウス NC/Nga に発症前 5 W より 13 W まで、柿葉抽出物 (250 mg/kg) もしくは astragalbin (β -glucosidase により kaempferol として吸収される) (1.5 mg/kg) を経口摂取させると、皮膚炎の発症とともに、血清 IgE 値の上昇が抑制された。組織学的検索においても、コントロール群で認められる表皮と真皮の肥厚や、角化亢進を伴ったケラチノサイトの過形成、脱顆粒をおこしたマスト細胞や好酸球等の炎症細胞の真皮への浸潤が、柿葉抽出物や astragalbin 投与群では著明に抑制された。

[総括]

fisetin などのフラボノイドは好塩基球からの Th2 タイプのサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) の発現抑制という新規の抗アレルギー作用を認め、その作用機序として Ca/CaM-Calcineurin-NFAT 経路の関与が示唆された。また抑制のためのフラボノイドの基本骨格が明らかとなった。In vivo においても柿葉抽出物とその主要フラボノイドである astragalbin を経口摂取することにより、アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga の皮膚炎発症や、血清 IgE の上昇が抑制された。アレルギー疾患有するヒトでの検討は今後の課題であるが、このような新規な作用を有するフラボノイドは、アレルギー疾患の発症予防の一つの手段とともに alternative and complementary medicine としての有用性が期待される。

論文審査の結果の要旨

アレルギー疾患は近年増加傾向にあるがその発症要因として遺伝要因よりも環境要因の悪化が示唆されている。食生活の変化もそのひとつと考えられ、抗アレルギー作用を含む物質の摂取不足がアレルギー疾患発症増加の一因となっているとの観点から食食能性因子について注目した。茶、野菜、果実などに豊富に含まれるフラボノイドと総称される天然ポリフェノールは、抗炎症作用や抗酸化作用など多彩な生理作用を有することが知られている。本研究では、難治性アトピー性皮膚炎に対し有効性が認められたある民間療法の解析を出発点とし、フラボノイドの抗アレルギー作用に関してヒト好塩基球細胞のサイトカイン発現に及ぼす効果を RT-PCR 法、および ELISA 法にて検討し、さらにフラボノイド存在下での転写因子 NFAT の DNA 結合活性を gel shift assay を行い検討した。フラボノイドの fisetin は、ヒト好塩基球からの Th2 タイプサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) の発現を抑制 (IC50 = 4.8~6.2 microM) するという新規な作用を見い出し、その作用機序として上記サイトカイン発現に共通に関わる転写因子 NFAT の活性化を fisetin は抑制することを明らかにした。さらに 20 種類のフラボノイドのスクリーニングによりヒト好塩基球からの Th2 タイプサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) の発現抑制に必要なフラボノイドの基本骨格が明らかとなった。また動物モデルにおいても発症前よりフラボノイドを経口投与することで、アトピー性皮膚炎モデルマウス NC/Nga

の皮膚炎発症や IgE 産生が抑制された。これらの結果は、好塩基球（マスト細胞）からの Th2 タイプサイトカイン産生を抑制するフラボノイドによるアレルギー疾患の発症予防や補完代替療法の可能性を示唆するものである。

以上のことから、本論文はフラボノイドによる抗アレルギー作用に関する新たな知見を生み出したものであり、学位授与に値すると考える。