



Title	脱顆粒抑制効果を示すフィットケミカルの作用機序の解明及び抗アレルギー効果の評価
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95179
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	いいぬまこうた 飯沼宏太	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	2年				
ふりがな 共同 研究者氏 名	いのうえわかな 井上和香奈	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	2年				
	きだわらそうた 木俵爽太		薬学部 薬学科		2年				
	きむらしずき 木村寧希		薬学部 薬学科		2年				
	たかのはるか 高野はるか		薬学部 薬学科		2年				
アドバイザー教員 氏名	齊藤達哉	所属	大学院薬学研究科						
研究課題名	脱顆粒抑制効果を示すフィトケミカルの 作用機序の解明及び抗アレルギー効果の評価								
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）								

◆研究目的

現在、花粉症などのアレルギーに苦しんでいる人の数は年々増加しており、アレルギー対策は喫緊の課題となっている。問題となっているアレルギー症状のほとんどがI型に分類され、次の順序で発症すると考えられている。①体内に侵入したアレルゲンに対して特異的に結合する IgE 抗体が産生される。②IgE 抗体が肥満細胞に発現している受容体に結合する(感作)、③アレルゲンが体内に再び侵入して IgE 抗体との結合を介して肥満細胞を活性化し、ヒスタミンをはじめとする炎症誘発物質が放出されて種々のアレルギー症状が起こる。市販の抗アレルギー薬は脱顆粒で放出された炎症誘発物質の働きを抑えることで重症化を防ぐ。一方で、脱顆粒を阻害する化合物も一定数見出されており、アレルギーの発症を予防するという観点から研究が進められている。前年度の自主研究で、日常的な食事を介してアレルギー症状を軽減させる新たな対策を提案したいと考え、肥満細胞のモデル細胞として頻用されているラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 を用いて食品由来のフィトケミカル(植物に含まれている活性成分)の脱顆粒抑制効果について調べたところ、いくつかのフィトケミカルが抑制効果を示す事がわかった。本研究では、フィトケミカルの中で特に強い脱顆粒抑制効果を示した Oridonin に着目し、その作用機序や生体での抗アレルギー効果について解析することを目的とした。

◆研究計画・方法

本研究では、以下の3つの実験を行った。

<実験I> マウス初代培養肥満細胞を用いた Oridonin の脱顆粒抑制効果の解析

本実験の基本条件は参考文献(1)に従った。マウス的大腿骨から骨髓細胞を回収し、IL-3を含む培地中で肥満細胞に分化させた。同細胞を 1.5 mL エッペンチューブに移し、抗 dinitrophenyl (DNP) -IgE 抗体 (Sigma-Aldrich) を添加した培地中で一晚培養して、細胞に抗体を感作させた。翌日、脱顆粒試験に頻用される HEPES buffer で細胞を洗浄した。その後、HEPES buffer に細胞を懸濁した上で、96 ウェル平底プレートに播種した。そこに、Oridonin を含む HEPES buffer を添加し、30 分間インキュベートした。その後、抗原となる DNP-human serum albumin (DNP-HSA、Sigma-Aldrich) を作用させ、脱顆粒を誘導した。培養上清を回収後、顆粒成分である β -hexosaminidase の放出量について酵素基質反応を利用して測定し、脱顆粒の指標とした。具体的には、 β -hexosaminidase の働きにより呈色する β -D-N-アセチルガラクトサミン (Nacalai tesque) を含む基質溶液と、回収した培養上清を混合して 90 分間 37℃でインキュベートし、吸光度 (OD₄₀₅₋₆₀₀) を測定した。コントロールの吸光度から抗原未刺激時の吸光度を差し引いた値を 100%の β -hexosaminidase 放出量とし、各フィトケミカルで処理した場合の β -hexosaminidase 放出量を百分率で算出した。

<実験II> Oridonin の脱顆粒抑制効果の作用機序の解析

実験Iと同様の手法で、マウス骨髓から調製した肥満細胞や RBL-2H3 細胞を感作させ、Oridonin で処理した後に刺激した。刺激後の細胞を Lysis Buffer (20 mM Tris-HCL、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、protease inhibitor を含む) で溶解し、サンプル中のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分離した後、ウェスタンブロッティングを行った。IgE を介した脱顆粒誘導を担う主要シグナル分子である Syk、Lyn、PLC γ 1 とそれぞれのリン酸化

体を特異的抗体 (Cell Signaling Technology ; #2712、#2710、#2732、#2731、#2822、#2821) で検出した。

<実験 III> マウスにおける Oridonin の抗アレルギー効果の検証

5 週齢、雌性の BALB/c マウスを清水実験材料から購入し、Oridonin の前投与も卵白アルブミン (OVA) による抗原曝露も行わない A 群、Oridonin の前投与は行わずに抗原曝露する B 群、Oridonin を 10 mg/kg あるいは 20 mg/kg で前投与した後に抗原曝露する C 群と D 群、以上 4 つの群に各 8 匹ずつを振り分けた。参考文献 (3) を参考にアレルギー性鼻炎モデルを作製した。0 日目、7 日目、14 日目にすべてのマウスに OVA (50 μ g/匹) と Alum (Thermo Fisher Scientific、1 mg/匹) の混合溶液を腹腔投与した。21-28 日目に、Isoflurane を用いて吸入麻酔を行い、PBS あるいは OVA 溶液 (10 mg/mL) を 20 μ L 経鼻投与した。C 群と D 群に対しては、OVA 溶液を投与する 30 分前に Oridonin 溶液を腹腔投与した。最終日である 28 日目では、PBS または OVA 溶液を投与してから 20 分間のうちにマウスが鼻を擦った回数を計測し、アレルギー症状の尺度とした。

◆研究結果

<実験I>

昨年度の自主研究で解析に用いた RBL-2H3 細胞は好塩基球の細胞株であったため、正常な肥満細胞に対しても Oridonin が脱顆粒抑制効果を発揮するのかを評価した。マウスの骨髓から分化させた肥満細胞に対して、Oridonin の脱顆粒抑制効果を 10 μ M および 20 μ M の濃度で評価したところ、図 1 のような結果を得た。Oridonin による処理無しおよび 10 μ M での処理の条件において、triplicate のうちの 1 サンプルが大きく外れた値を示したため、Oridonin 処理について有意な影響は認められなかった。ただし、平均値の推移から、正常細胞においても Oridonin は濃度依存的な脱顆粒抑制効果を示すであろうことが期待されるため、実験の精度を高めて再度検証する必要がある。

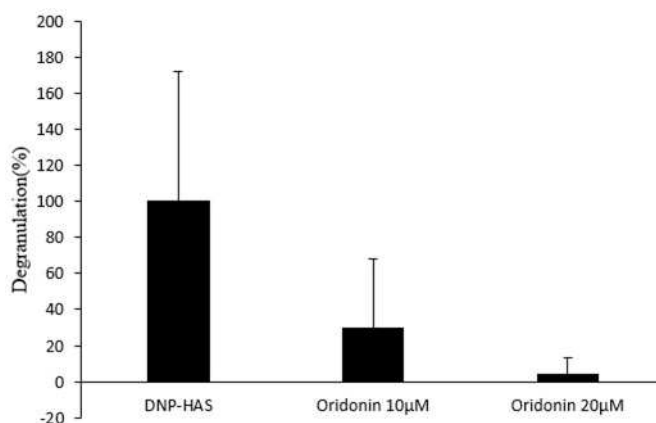


図 1 Oridonin による脱顆粒抑制効果の評価

各条件は triplicate で行った。結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

<実験II>

細胞の種類、サンプル回収時間、ウェスタンブロッティングに用いるブロッキング剤の種類や抗体の濃度など、様々な条件の最適化を試みた。しかしながら、解析標的とするタンパ

ク質のバンドが既報の通りに検出できない、あるいはバンドが見られたとしても抗原刺激による影響さえもが理論的な結果として表れず Oridonin の効果を正しく評価できない、という問題を解決できなかった。さらなる条件検討や、実験技術の熟練が必要である。

<実験III>

アレルギー性鼻炎マウスモデルを用いて、Oridonin の効果を評価した。抗原投与した後にマウスが鼻を擦る回数を計数したところ、Oridonin を投与しなかった場合と比べて、Oridonin を投与した場合にはその回数が有意に減少すること、またその効果は投与量に依存して強まる傾向があることがわかった (図3)。

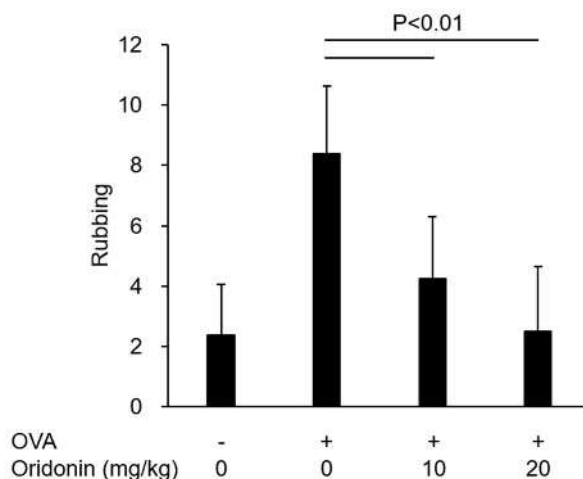


図3 アレルギー性鼻炎マウスモデルを用いた Oridonin の抗アレルギー効果の評価
結果は平均値±標準偏差で示した。P 値は Tukey-Kramer post-hoc test により算出した。

◆考察・まとめ

今回の実験より、Oridonin はマウスの生体においてアレルギー症状を抑えることが分かった。また、実験Iの結果から、Oridonin は正常細胞でも脱顆粒を抑制するであろうことが期待された。これらの結果から、Oridonin は生体でも脱顆粒を抑制することで抗アレルギー効果を発揮したと予想される。将来的には、マウスの鼻腔洗浄液や血清における顆粒成分の濃度などを調べることで、実際に脱顆粒を抑制しているのかを調べたい。さらに、日常の食事に近づけた条件として、Oridonin を経口摂取させた場合の効果も調べたい。

◆参考文献

- 1, Kuehn HS, Radinger M, Gilfillan AM. Measuring mast cell mediator release. Curr Protoc Immunol. 2010;Chapter 7:Unit7.38.
- 2, Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. Nat Rev Immunol. 2006;6(3):218-30.
- 3 Lee KJ, Nam HJ, Kim YB. Effect of Tongqiao-tang on OVA Induced Allergic Rhinitis Mouse Model. J Korean Med. 2008;29(5): 0