

氏名・本籍	森下 雄太 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第31号
学位授与の日付	平成28年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の抗アレルギー作用に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 田井 章博 副査 教授 小西 博昭 准教授 野下 俊朗 名誉教授 武藤 徳男

学位論文の要旨

第1章の緒言では、花粉症に代表される I 型アレルギーの発症やその治療に関わる薬物療法の流れについてまとめ、食品中に有効成分を探索するという本研究の目的について述べる。現在の日本においては国民病とさえ言われるアレルギー疾患は生体に備わった免疫機構の過剰反応として理解され、人々の QOL にも強く影響を及ぼしている。特に、I 型アレルギーは、環境中に存在する通常無害な花粉やハウスダストなど身近な物質に対してアレルギー症状を示すもので、その治療は化学合成により開発される薬剤による対処療法が主である。そこで本研究では、アレルギー症状の予防や改善に効果的な機能性成分を食資源から探索することとし、強い活性を認めたホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) 由来脱顆粒抑制物質についてその抗アレルギー作用を評価解析することを目的とする。

第2章では、ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の単離及び構造解析について述べる。脱顆粒抑制物質の精製は、抗アレルギー活性物質の一次スクリーニングに汎用されるラット好塩基球性白血病細胞株 (RBL-2H3 細胞) を使用し、抗原抗体刺激により細胞から遊離される顆粒成分である β -ヘキソサミニダーゼ量を指標にして評価した。多様な地域農産物について探索し、その中で脱顆粒抑制活性の認められたホウレンソウ熱水抽出物から、各種のクロマトグラフィーにより 3 成分 (S0-1、S0-2、S0-3) を精製し、それぞれ NMR、MS による構造解析を行った。3 成分ともに 3-メトキシフラボンのグルクロン酸配糖体と同定し、これら化合物について新規な生物活性であることを確認した。3 化合物のうち S0-1 が最も高活性であり、抗原抗体刺激による脱顆粒を 50%抑制する濃度 (IC₅₀) は 1.85×10^{-6} M であり、既存の抗アレルギー薬 (ケトチフェンマレートやトラニラスト) よりも強いことを認めた。一方、S0-2 や S0-3 の脱顆粒抑制活性は弱く、これら 3 化合物の構造活性相関について推論した。さらに、S0-1 から酵素処理で調製されたアグリコンの脱顆粒抑制活性は、S0-1 よりも高活性で、IC₅₀ は

1.47・Mであった。このことから、ハウレンソウから単離されたS0-1及びそのアグリコンは食素材起源の非常に有望な脱顆粒抑制物質であることが明らかになった。

第3章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の脱顆粒に至るシグナル伝達経路の作用部位に関する解析について述べる。強い脱顆粒抑制活性を示したS0-1とS0-1アグリコンを用いて、RBL-2H3細胞内におけるシグナル伝達因子に対する影響をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、いずれの化合物ともに1・g/ml (S0-1; 1.9・M, S0-1アグリコン; 2.9・M)、10・g/ml (S0-1; 19.2・M, S0-1アグリコン; 29.0・M)でシグナルカスケードの上流に位置する2つのチロシンキナーゼ (SykとLyn) のリン酸化を抑制することが認められた。また時間ごとのリン酸化Syk、Lynの発現を観察した結果、長時間になるとLynのリン酸化の抑制活性は消失し、Sykのリン酸化の抑制のみが認められた。加えて、脱顆粒シグナル伝達で生じる細胞内Ca²⁺濃度の上昇をともに抑制することも明らかにした。これらの結果から、S0-1とS0-1アグリコンともに同一の作用点であると推定され、細胞膜表面における抗原抗体結合部位の近傍に作用することが示唆された。

第4章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の実験動物における抗アレルギー作用の評価について述べる。得られたハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質 (S0-1とS0-1アグリコン) を用いて、ICR系雄性マウスにおける耳介受動皮膚アナフィラキシー反応 (PCA反応) とヒスタミンまたはセロトニン惹起血管透過性亢進反応に対する抑制活性を評価した。その結果、PCA反応ではS0-1は52 mg/kgで73.5%の抑制を示し、S0-1アグリコンは8.5 mg/kgでほぼ100%の抑制率を示した。特に、アグリコンの活性はオキサトミド (ポジティブコントロール、43 mg/kgで約60%の抑制率) より顕著に強かった。またヒスタミンやセロトニンによる血管透過性亢進に対する効果も確認されたことから、これら化合物は個体レベルでも抗アレルギー活性を発揮することが明らかになった。

第5章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の有する抗酸化活性について述べる。ポリフェノール化合物には抗アレルギー作用とともに抗酸化活性を有するものが知られているため、その活性相関について解析した。フラボノイド系グルクロン酸配糖体であるS0-1とそのアグリコンの有する抗酸化活性については、S0-1は弱いものに対して、アグリコンは強い活性を発揮した。このことは抗酸化活性発現にはフラボノイドC環のカテコール構造が必須であることを示すものであり、両活性の直接の相関はないと示唆された。

第6章では、本研究の総括を行い、食資源の有する機能性の活用に関する将来展望について述べる。本研究において、食資源であるハウレンソウから抗アレルギー作用を有する化合物を初めて単離同定し、その作用解析を細胞レベル及び個体レベルで行うことで、その機能性を科学的に証明した。ハウレンソウ中の成分が抗アレルギー作用を有することが認められたことから、ハウレンソウの食資源としての活用を図ることで日常的な体質改善や予防効果につながることを期待される。またハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質は、動物実験で有効性が確認されたことから、消化管を経た吸収・代謝の面でも他の抗アレルギー作用を示すフラボノイドよりも有用であると考えられ、食資源としての活用の外にもS0-1をシーズとした新たな抗アレルギー薬の開発も期待される。

審査の結果の要旨

本研究は、花粉症をはじめとするアレルギー疾患の予防や改善に効果的な機能性食資源を探索することをめざして、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) から単離した脱顆粒抑制物質の抗アレルギー作用を解明することを目的とした。

本論文は、6章から構成される。第1章は緒言で、本研究の背景と関連する知見を要約しており、花粉症に代表される I 型アレルギーの予防や改善に関わる食素材について科学的検証をする意義を述べた。第2章では、ホウレンソウ葉熱水抽出物から好塩基球形白血球細胞を用いた活性評価により脱顆粒抑制物質を3成分 (S0-1, S0-2, S0-3) 単離し、それぞれ NMR や MS による構造解析を行った。3成分ともに3-メトキシフラボンのグルクロン酸配糖体と同定し、新規な生物活性であることを見いだした。このうち S0-1 が最も高活性であり (抗原抗体刺激応答の 50%抑制濃度は $1.85 \cdot \mu\text{M}$)、既知抗アレルギー薬よりも強い活性を示すこと、また S0-1 から酵素処理で調製したアグリコンも同等の活性を示すことを明らかにした。第3章では、S0-1 とそのアグリコンを用いて脱顆粒に至る細胞内シグナル伝達経路の作用点に関する解析を行い、シグナルカスケードの上流に位置する2つのチロシンキナーゼ (Syk と Lyn) のリン酸化を阻害することを明らかにした。この結果から両化合物ともに同じ作用点であると推定し、細胞膜表面における抗原抗体結合複合体の近傍に作用することを示唆した。第4章では、S0-1 とそのアグリコンの実験動物における抗アレルギー作用の評価を行い、ICR 系雄性マウスにおける耳介受動皮膚アナフィラキシー反応やヒスタミンまたはセロトニン惹起血管透過性亢進反応を顕著に抑制することを認め、いずれも経口摂取で抗アレルギー活性を発揮することを明らかにした。第5章では、抗酸化活性と脱顆粒抑制活性の連関について解析し、S0-1 とそのアグリコンには両活性の相関がないことを結論づけた。第6章は総括である。

本研究は、食資源であるホウレンソウから初めて抗アレルギー作用を有する化合物を単離、同定し、その作用解析を細胞レベルおよび個体レベルで行うことでその機能性を科学的に証明したものである。これらの成果は、新たな医薬品シーズとなる可能性のみならず、アレルギー体質の改善や予防に寄与することを期待したホウレンソウの利活用を推進することにつながる点で高く評価される。よって、本論文は博士 (生命システム科学) の学位に値するものと認められる。