

レンコン由来抗アレルギー化合物の単離と効果

2020

湧川朝治

第1章 緒言

アレルギー疾患は遺伝子発現異常を伴う難治性多因子疾患であり、異常発現した疾患感受性遺伝子発現を制御する薬物は有効な抗アレルギー薬となることが期待される。

代表的なアレルギー疾患の一つに花粉症がある。花粉症は樹木や草の花粉により誘発される季節性鼻過敏症であり、日本人の約 29.8%が罹患している国民病である¹⁾。我々はアレルギー症状と遺伝子発現状態が相関する遺伝子をアレルギー疾患感受性遺伝子と位置付けており、これまでに花粉症のアレルギー疾患感受性遺伝子としてヒスタミン H₁ 受容体 (H₁R) 遺伝子を見出した^{2,5)}。H₁R の遺伝子発現亢進はヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬 (抗ヒスタミン薬) の長期投与により抑制される。しかし、toluene 2,4-diisocyanate (TDI) 感作鼻過敏症モデルラットやスギ花粉症患者において、H₁R の遺伝子発現亢進をほぼ完全に抑制したにもかかわらず症状を完全には抑制することができなかった^{4,6)}。このことから、H₁R の遺伝子発現亢進に関与する細胞内シグナルのほかにもアレルギー疾患に深くかかわる細胞内シグナルが存在することが示唆された。

我々は Th2 サイトカイン阻害薬として臨床的に用いられているトシル酸スプラタストが、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおける鼻アレルギー様症状を抑制することを見出した⁷⁾。また、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおいて、抗ヒスタミン薬とスプラタストの併用投与により抗ヒスタミン薬単独投与の場合よりも鼻アレルギー様症状を有意に抑制したことから、スプラタストは抗ヒスタミン薬とは異なる作用機序で鼻アレルギー様症状を抑制していることが考えられた。我々は、スプラタストが Nuclear Factor of activated T cells (NFAT) シグナルを抑制すること、NFAT シグナルが Th2 サイトカインの一種であるインターロイキン(IL)-9 の遺伝子発現亢進に関与していることを見出した⁸⁾。

スプラタストと同様に、レンコン熱水抽出物もまた、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおいて、抗ヒスタミン薬との併用投与により抗ヒスタミン薬単独投与の場合に比べて有意に鼻アレルギー症状を改善した。また、レンコン熱水抽出物が RBL-2H3 細胞において IL-9 遺伝子発現亢進を抑制した。これらのことから、レンコンに含まれる成分は IL-9 遺伝子発現を抑制することでアレルギー症状を改善すると考えられた。

近年、レンコン破砕物の抗アレルギー活性について報告されているが、その生理活性の分子基盤に関する研究は多くない。本研究ではより有効なアレルギー疾患の治療法の開発のために、RBL-2H3 細胞におけるイオノマイシン刺激に伴う IL-9 遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標にレンコン節精製水抽出液に含まれる抗アレルギー化合物の単離・同定を行い、動物モデルにおける効果を検討した。

第2章 実験方法

2.1. RBL-2H3 細胞の培養

2.1.1. 使用細胞

ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 細胞を用いた。RBL-2H3 細胞では MEM を用いてそれぞれ培養シャーレにまき、37°C、5%CO₂ インキュベーターにて静置培養した。

2.1.2. Minimum Essential Medium (MEM) の調整

約 800 ml の水に MEM (with Earle's salts, with L-glutamine, with non-essential amino acids, without sodium bicarbonate) の粉末 10.1 g と NaHCO₃ 2.2 g を添加して完全に溶解させた後、水で最終液量を 1,000 ml とした。この溶液を濾過滅菌し、2 本の 500 ml 用培養瓶に 500 ml ずつ分注した。次に、無菌的にこの溶液 500 ml に対し抗生物質 (10,000 Units/ml penicillinG sodium, 10 mg/ml streptomycin in 0.9 % saline) を 6 ml、56°C で 30 min インキュベートし非働化した、ウシ胎児血清(FBS)を最終濃度が 10%となるように添加した。

2.1.3. Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS(-)) の調整

約 800 ml の水に試薬 (2.68 mM KCl, 136.1 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄) を添加し、完全に溶解させた。その後、最終液量を 1,000 ml に合わせ、2 本の 500 ml 用培養瓶に 500 ml ずつ分注しオートクレーブ滅菌後使用した。

2.1.4. 細胞の継代

コンフルエントな状態まで培養した細胞を PBS(-) で洗浄後、trypsin/EDTA 液を加え細胞を剥がした。その後、MEM を加え、チューブに移して 1,000 rpm で 3 分間遠心した。上清を抜き取り、遠心管底部のペレット状の細胞に適量の培地を加えて再懸濁し、シャーレに播種した。

2.1.5. 細胞の凍結

コンフルエントな状態まで培養した細胞を PBS(-) で洗浄後、trypsin/EDTA 液を加え細胞を剥がし MEM を加え、1,000 rpm で 3 分間遠心した。上清を除きセルバンカーを加えて 5×10⁵~5×10⁶ cells/ml になるように希釈し、1 ml ずつ 2 ml Freestanding Cryogenic Vial に分注した。250 ml Isopropanol を入れた細胞凍結用容器 (NALGEN : Cryo 1°C Freezing Container) に分注した細胞溶液をセットし、-80°C deep freezer にて overnight で緩やかに凍結させた後、-180°C の液体窒素中に移し保存した。

2.1.6. 細胞の解凍

細胞の入った Cryogenic Vial を -180°C の液体窒素から出し、直ちに 37°C の恒温槽に入れ速やかに解凍した。その後、適当な濃度に希釈してシャーレに播種した。

2.2. リアルタイム RT-PCR 法

2.2.1. RBL-2H3 細胞の調整

RBL-2H3 細胞を 6well プレートに培養し、レンコン抽出物で処置後 22 時間インキュベートし、 $1\ \mu\text{M}$ の ionomycin を加え、2 時間刺激を行った後のサンプルを使用した。

2.2.2. ラット鼻粘膜組織、RBL-2H3 細胞からの total RNA 抽出

RNA later に保存していたラット鼻粘膜組織を溶液から取り出し、組織量の 10 倍量の RNAiso Plus (TaKaRa, Shiga) に浸漬し、直ちにホモジナイズ (POLYTRON RT10-35 (Model PT-K; kinematica AG, Littau/Luzern, Switzerland)) して細胞を粉砕した後、遠心 ($12,000\ \text{rpm}$, $10\ \text{min}$, 4°C) して、可溶化されないゴミを沈殿させて取り除き、上清を以下の操作に用いた。

細胞は $35\ \text{mm}$ ディッシュで培養し刺激後 PBS(-) で 2 回洗浄した後、RNAiso Plus を $700\ \mu\text{l}$ 加えセルスクレーパーを用いてかきとった。

ホモジナイズしたラット鼻粘膜やかきとった細胞に対して chloroform を $210\ \mu\text{l}$ 加え、15 秒間強く振盪後、 $15,000\ \text{rpm}$ 、15 分、 4°C で遠心した。分離した 2 層のうち RNA を含む上層を採取し、上層と同量の isopropanol を加え、15 秒間強く振盪し、 $15,000\ \text{rpm}$ 、15 分、 4°C で遠心することで、ペレット状の RNA を得た。このペレットに 75% エタノール (-20°C) を $0.5\ \text{ml}$ 加え洗浄した。さらに、 $15,000\ \text{rpm}$ 、15 分、 4°C で遠心後、エタノールを除き、得られたペレットに diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え、RNA solution とした。分光光度計 (Nanodrop ND-1000, Thermo) により、波長 $260\ \text{nm}$ 、 $280\ \text{nm}$ で吸光度を測定し、 $260\ \text{nm}$ の吸光度と 2 つの波長の比による検定で、各サンプルの total RNA 濃度と純度を測定した。

2.2.3. cDNA 合成

サンプルチューブに total RNA $1.0\ \mu\text{g}$ 相当の RNA solution となるように DEPC 水を加え、全量を $5\ \mu\text{l}$ とした。PrimeScript® RT reagent Kit を用いてサーマルサイクラー (T3000 thermocycler, Biometra) で以下のプログラムにより逆転写反応を行った。

組成	Volume/Tube (μl)
RNA solution (1.0 μg/Tube 相当)	5.0
5 × PrimeScript Buffer	2.0
Oligo dT Primer	0.5
Random 6 mers	2.0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
Total	10.0

PrimeScript® RT reagent Kit を用いた逆転写プログラム

	Step1	Step2	Step3
Temperature (°C)	37	85	4
Time	15min	5sec	∞

2.2.4. リアルタイム PCR

以下の試薬を混合し、Micro Amp Optical 96-well Reaction Plate の 1well 当たり 18 μl の試薬を調整した。Sequence Detector(Gene Amp 7300 Sequence Detection System ; GE Applied Biosystems)にて PCR 反応を行い、PCR 産物の増幅曲線をリアルタイムで検出し、Sequence Detection ソフトウェアを用いて解析、定量化した。

組成	Volume/well (μl)
cDNA	2.0
Premix Ex Taq	10.0
ROX Reference Dye	0.4
11 μM IL-9 Forward Primer	0.4
11 μM IL-9 Reverse Primer	0.4
5.5 μM IL-9 Probe	0.8
10 μM Rodent GAPDH Forward Primer	0.275
10 μM Rodent GAPDH Reverse Primer	0.275
5.5 μM Rodent GAPDH Probe	0.8
DEPC 水	4.65
Total	20.0

定量的 RT-PCR の主な変動の要因である RNA の純度や逆転写効率の差を補正する内部標準 (internal control) として、細胞の活性化あるいは増殖といった環境条件に伴う発現の変動が理論上なく、常に一定レベルで発現していると考えられるハウスキーピング

遺伝子の GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を用いた。なお、定量法としては mRNA 発現量の相対値を求める、Relative Standard Curve Method (Separate Tubes) を用いた。

また、以下のプログラムで反応させる。

	Initial steps	Melt	Anneal/Extend
Stage	Hold	Cycle(40cycles)	
Temperature (°C)	95.0	95.0	60.0
Time (min)	0:30	0:05	0:31

用いた rat IL-9 の Primer 及び Probe を以下に示す。なお、rat GAPDH の primer 及び probe は市販の製品 (TaqMan Rodent GAPDH control reagents, Applied Biosystems) を用いた。

Gene name	Sequence
Rat IL-9	F : 5'-GAC GAC CCA TCA TCAAAA TGC-3' R : 5'-CTGTGA CATTCC CTC CTG GAA-3' P : FAM-TTG TGC CTC CCC ATC CCA TCT GAT-TAMRA

2.3. レンコン由来成分の抽出

2.3.1. 抽出

レンコン 40g を 500 ml の蒸留水で 30 分間沸騰させて熱水抽出を行い、3,000 g で 10 分間遠心し不溶物を除去した。上清を濾過し、得られた濾液を凍結乾燥したものをレンコン熱水抽出物とした。

レンコン節部粉碎物 4212 g に精製水 8424 g を加え、攪拌機により室温で 3 時間攪拌処理を行った。その後 4200 rpm、20°C で 30 分間遠心し、不溶物を除去した。上清を 0.2 μ m フィルター濾過処理し、濾液を凍結乾燥処理したものをレンコン精製水抽出物とした。

2.3.2. エタノール沈殿

レンコン精製水抽出物に対してエタノール沈殿を行い、上清と沈殿物に分離し上清画分と沈殿画分を作成した。

2.3.3 カラムクロマトグラフィー

エタノール沈殿画分をカラムクロマトグラフィーにより分離、精製した。
エタノール沈殿画分をカラム(内径 2.5 cm)、精製水で膨潤させた充填剤(Sephadex LH-20)を用い、アセトンで溶出して、素通り画分と 50%アセトン溶出画分の 2 つのフラクションに分離した。
50%アセトン溶出画分を 99.5%エタノールで膨潤させた Sephadex LH-20 を用いて分離し、素通り画分、99.5%エタノール画分、90%エタノール画分、80%エタノール画分、50%エタノール画分、50%アセトン画分を作成した。また、80%エタノール画分をレンコン精製品とした。

2.3.4. チオール分解

再度 Sephadex LH-20 による分離を行った素通り画分、99.5%エタノール画分、90%エタノール画分、80%エタノール画分、50%エタノール画分、50%アセトン画分をメタノールに溶解し、それぞれの画分にベンジルメルカプタンを加え 40°C で 1 時間加熱し、チオール分解を行った。

2.3.5. 構造決定

チオール分解を行ったサンプルを HPLC によって分離し、得られた化合物を、1 次元 ¹H-NMR、¹³C-NMR によって構造決定した。

2.4. 鼻過敏症モデルラットの作製

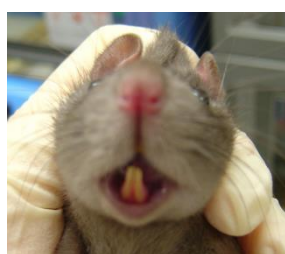
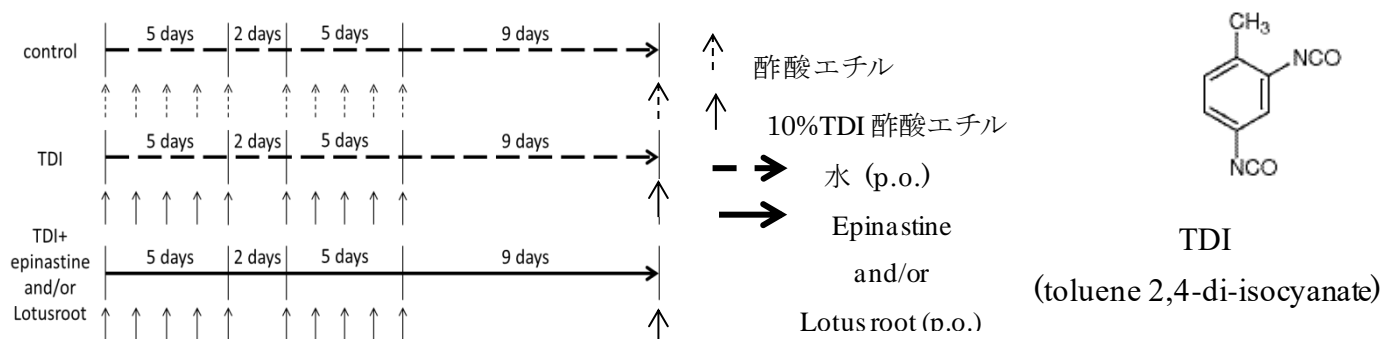
2.4.1. 実験動物

ラットは6週齢 Brown-Norway 系雄性ラット(SLC, Hamamatsu, Japan)を使用した。動物は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の室温で12時間毎の昼夜サイクルで飼育した。

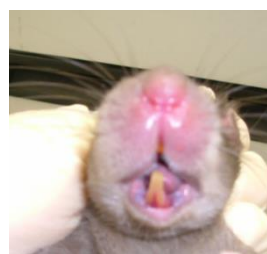
2.4.2. TDI (toluene 2,4-diisocyanate)感作

TDI 感作は、Tanaka らの方法⁹⁾の変法を用いた。TDI 感作として、ラットの両側鼻前庭に極細耳鼻用綿棒を用い、10 μl の10% toluene 2,4-diisocyanate (TDI)-酢酸エチル溶液を1日1回連日2週間塗布した。その後1週間無処置期間をおき、再度10% TDI 溶液を鼻前庭に塗布することでTDIを誘発した(Figure. 1)。

なお、以上の実験における症状の観察および実験結果の比較のため、TDI 塗布と同時に同回数酢酸エチルのみを塗布した対照動物を用いた。



Normal rat



TDI rat

Figure 1. 鼻過敏症モデルラット作製スケジュール

2.4.3 花粉症症状の評価方法

鼻過敏症症状は、水溶性鼻漏や鼻の腫れ、発赤の観点から、0 から 3 のスコアで評価した (Figure 2.)。

鼻症状	スコア			
	0	1	2	3
水様性鼻漏	(-)	鼻腔中	1と3の間	鼻から落ちる
鼻の腫れ及び発赤	(-)	少し膨らむ	1と3の間	強く腫れ上がる

Figure 2. 鼻過敏症症状の評価方法

2.4.4 ラット鼻粘膜組織の調整

TDI 誘発 4 時間後に断頭し、鼻粘膜組織を採取して、mRNA の定量に供した。なお、採取した組織サンプルは後で処理するため、解剖後直ちに 500 μ L の RNA later (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)中に浸漬し、-80°Cで保存した。

2.5. 使用試薬

2.6.1.細胞培養関連試薬

・水；すべてミリ Q (MILLIPORE 社：MilliQ SP reagent water system) で調製した純水 (endotoxin free) を用いた。なお同装置を用いて作成した水中に含有される endotoxin の濃度はリムルステストで測定した場合 1 pg/ml 以下であった。

・ Potassium chloride	Wako
・ potassium Dihydrogenphosphate	Wako
・ Sodium chloride	nacalai tesque
・ Sodium dihydrogenphosphate	SIGMA-ALDRICH
・ MEM(with Earle's salts, with L-glutamine, with non-essential amino acid, without sodium bicarbonate)	GIBCO
・ Sodium hydrogencarbonate	Wako
・ Fetal bovine serum	EuroClone
・ Trypsin-EDTA	GIBCO
・ Penicillin G sodium salt	SIGMA
・ Streptomycin sulfate salt	SIGMA

2.6.2. リアルタイム PCR 関連試薬

- RNAiso plus TaKaRa
- Chloroform SIGMA-ALDRICH
- Isopropanol Wako
- Ethanol SIGMA-ALDRICH
- Diethylpyrocarbonate SIGMA-ALDRICH
- PrimeScript[®] RT reagent Kit TaKaRa
 - 5× PrimeScript Buffer
 - Oligo dT primer
 - Random 6 mers
 - PrimeScript RT Enzyme mix I
- Premix Ex Taq[™] TaKaRa
 - Premix Ex Taq
 - ROX Reference Dye
- rat IL-9 primer ジーンデザイン
- TaqMan rat IL-9 probe ジーンデザイン
- TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents
 - Rodent GAPDH Probe
 - Rodent GAPDH Forward Primer
 - Rodent GAPDH Reverse Primer

2.6.3 動物実験関連試薬

- TDI (toluene 2,4-diisocyanate) Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan
- 酢酸エチル
- RNA later Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- エピナスチン

2.6. 統計処理

実験データは Mean value ± S.E.M で示し One-way ANOVA および Dunnet's multiple comparison test を用いて統計処理を行った。

第3章 実験結果

3.1. RBL-2H3細胞におけるIL-9遺伝子発現亢進に対するレンコンの影響の検討

3.1.1. レンコンの部位による検討

レンコンの部位について比較を行ったところ、レンコンの葉、茎、種には活性は見られなかったが、レンコンの節部に強い活性が見られた (Figure 3)。

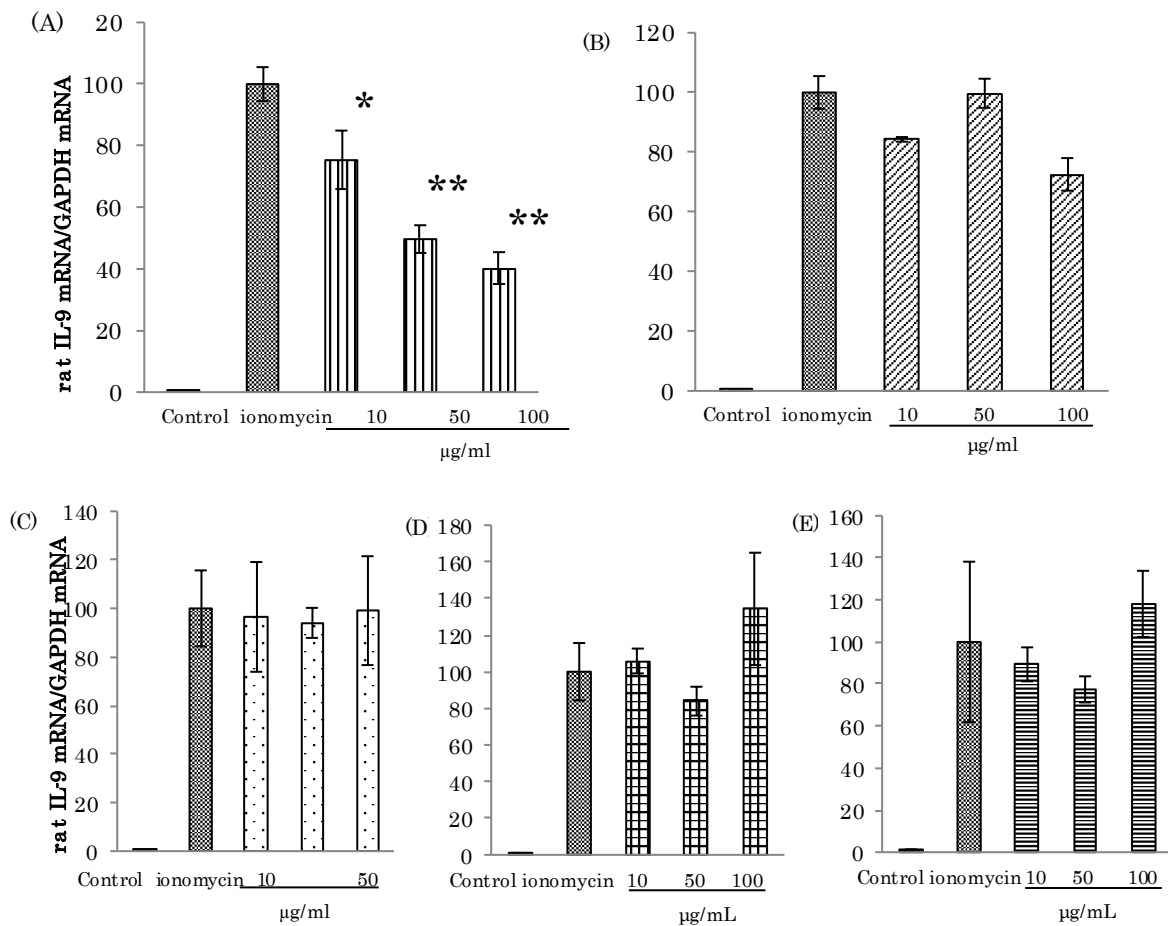


Figure 3. レンコンの部位による比較

RBL-2H3細胞にレンコンの節部、可食部、葉部、茎部、種子部抽出物で処置後22時間インキュベートし、1 µM ionomycinを加え、2時間刺激後、IL-9 mRNAレベルをリアルタイムRT-PCR法により測定を行った (A:節部、B:可食部、C:葉部、D:茎部、E:種子部)。

*P < 0.01 vs. ionomycin, **P < 0.05 vs. ionomycin (N=3~4)

3.1.2. レンコン節部から可食部にかけての検討

レンコンの節部から可食部にかけて IL-9 遺伝子発現亢進に対する影響を検討したところ、節部、節部から 1cm に活性がみられたが、1cm~2cm には活性がみられなかった。

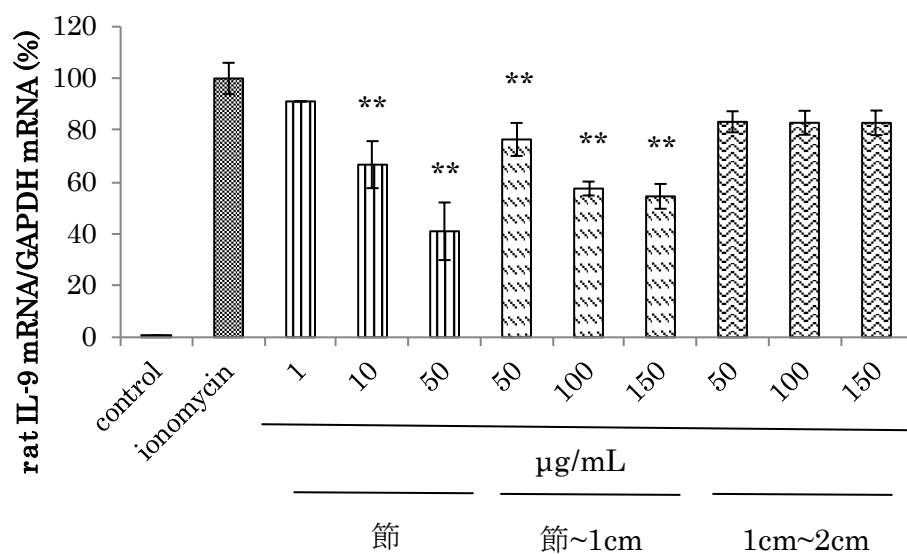
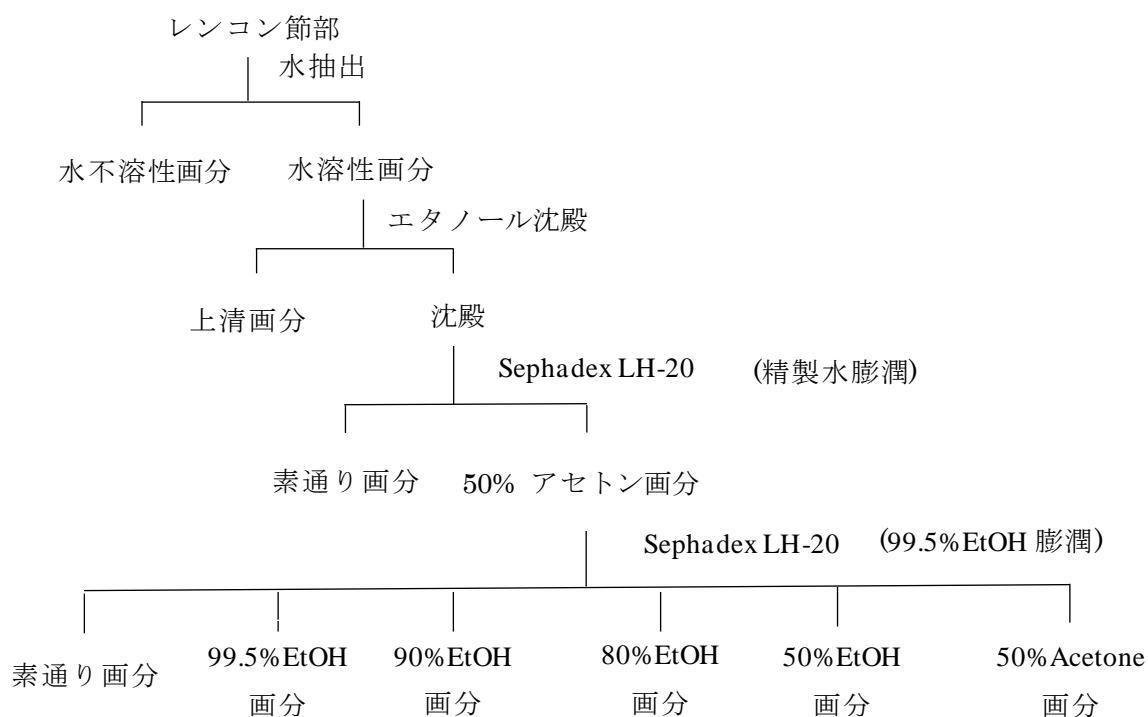


Figure 4. 徳島県産備中の部位による比較

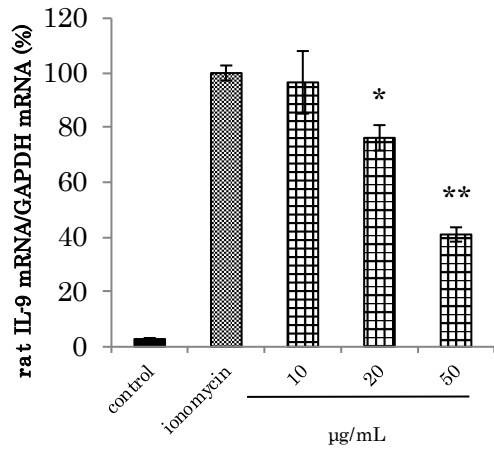
RBL-2H3 細胞に徳島県産備中の節部、節部~1cm、1cm~2cm の部位の抽出物で処置後 22 時間インキュベートし、1 µM ionomycin を加え、2 時間刺激後、IL-9 mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により測定を行った。 **P<0.05 vs. ionomycin (N=3~4)

3.1.3. IL-9 遺伝子発現に対する抑制活性を指標とした精製

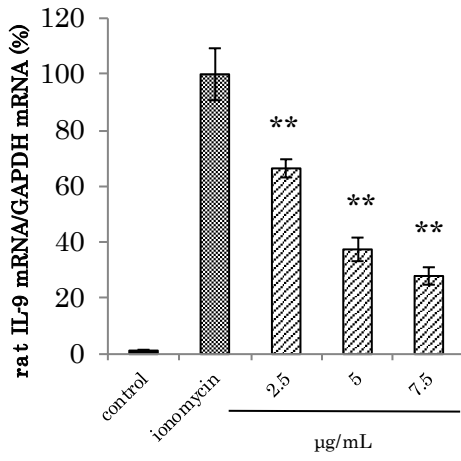
徳島県産備中の節部を原料に、IL-9 遺伝子発現に対する抑制活性を指標に、以下のよう
に精製を行ったところ、沈殿に活性が認められた (Figure 5-1.)。次に、抑制活性が見
られたエタノール沈殿物を Sephadex LH-20 を充填剤として分画した。素通り成分には
活性は見られなかったが、50%アセトン溶出画分に強い抑制活性が認められた (Figure
5-1.)。そこで、50%アセトン溶出画分を 99.5%エタノールで膨潤させた Sephadex LH-20
に吸着させ、エタノールの濃度を変えて溶出することで分画し、最後に 50%アセトンで
溶出し分画した。素通り画分、99.5%エタノール画分、90%エタノール画分には抑制活
性が認められなかったが、80%エタノール画分、50%エタノール画分、50%アセトン画
分に強い抑制活性が認められた (Figure 5-2.)。



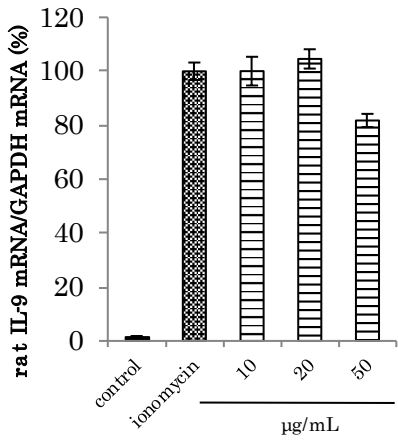
1-(A)



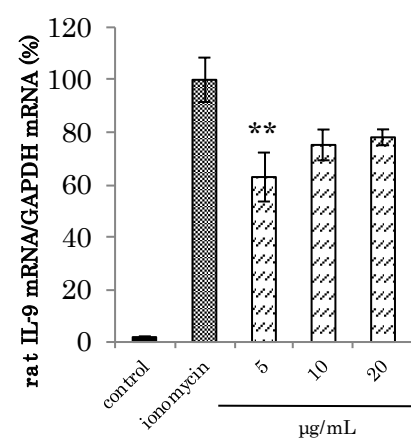
(B)



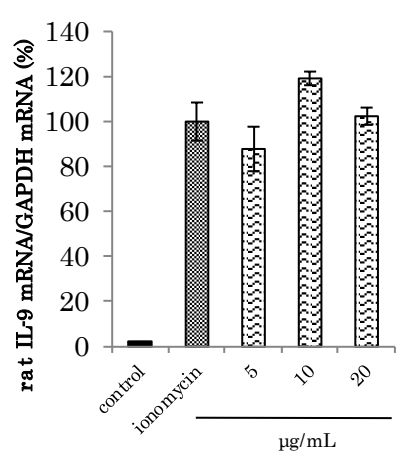
2-(A)



(B)



(C)



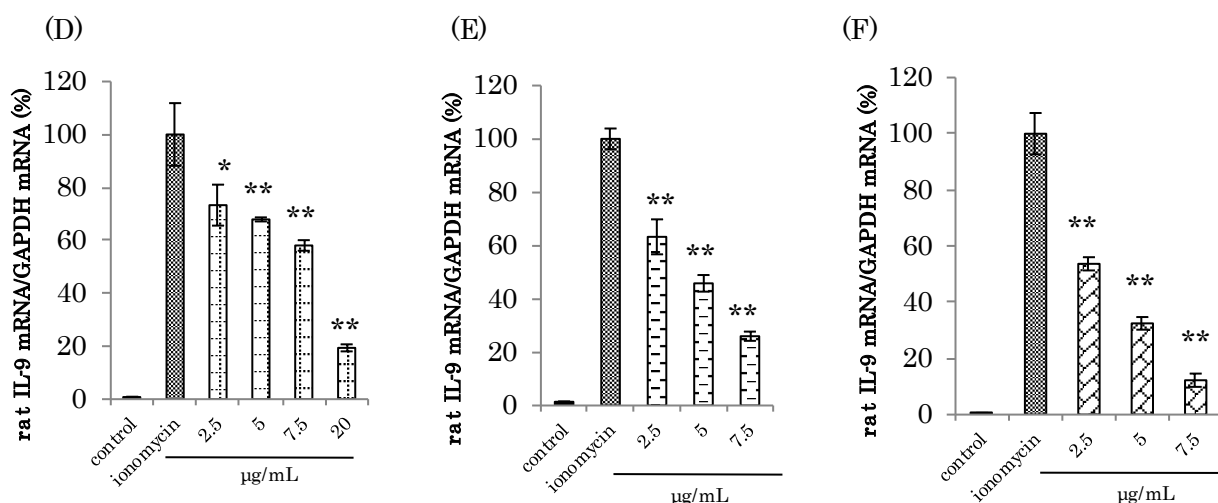


Figure 5. レンコン節部からの精製

RBL-2H3 細胞にレンコン節部からの精製成分をそれぞれ処置後 22 時間インキュベートし、1 μ M ionomycin を加え、2 時間刺激後、IL-9 mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により測定を行った (1-A: エタノール沈殿沈殿成分、B:Sephadex LH-20 50%アセトン溶出成分、2-A:再Sephadex LH-20 カラム素通り成分、B: 99.5%エタノール溶出成分、C:90%エタノール溶出成分、D:80%エタノール溶出成分、E:50%エタノール溶出成分、D:50%アセトン溶出成分)。

*P < 0.01 vs. ionomycin, **P < 0.05 vs. ionomycin (N=3~4)

抑制活性の認められた各々の画分について精製表を作成し、IL-9 遺伝子発現に対する抑制活性を指標に行った精製の評価とした (Table 2.)。

	総量 (g)	IC50 (μ g/mL)	S.A (unit/mg)	T.A. (unit/mg)	Recovery (%)
水抽出物	120.13	27	1	120.1	100
エタノール沈殿物	76.49	34.9	0.77	59.2	49.3
LH-20 50%アセトン溶出画分	11.12	3.88	6.96	77.4	64.4
再 LH-20 80%エタノール溶出画分	0.73	7.8	3.46	2.5	2.11
再 LH-20 50%エタノール溶出画分	0.73	3.85	7.01	5.1	4.27
再 LH-20 50%アセトン溶出画分	2.95	2.76	9.78	28.8	24

Table 2. レンコン節部からの精製

RBL-2H3 細胞にレンコン節部からの精製成分をそれぞれ処置後 22 時間インキュベートし、1 μ M ionomycin を加え、2 時間刺激後、IL-9 mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により測定を行った。

3.2.1 構造決定

再度 Sephadex LH-20 による分離を行った素通り画分、99.5%エタノール画分、90%エタノール画分、80%エタノール画分、50%エタノール画分、50%アセトン画分をチオール分解し、HPLC により重合度を確認した(Figure6.)。また、ピーク③、④、⑤を回収し、再びチオール分解を行った。得られた化合物を、1次元 1H-NMR、13C-NMR を用いて解析したところ、ガロカテキン、エピガロカテキンが同定され、80%エタノール画分に含まれる IL-9 遺伝子発現亢進抑制化合物がプロアントシアニジン 4 量体であることが明らかになった。

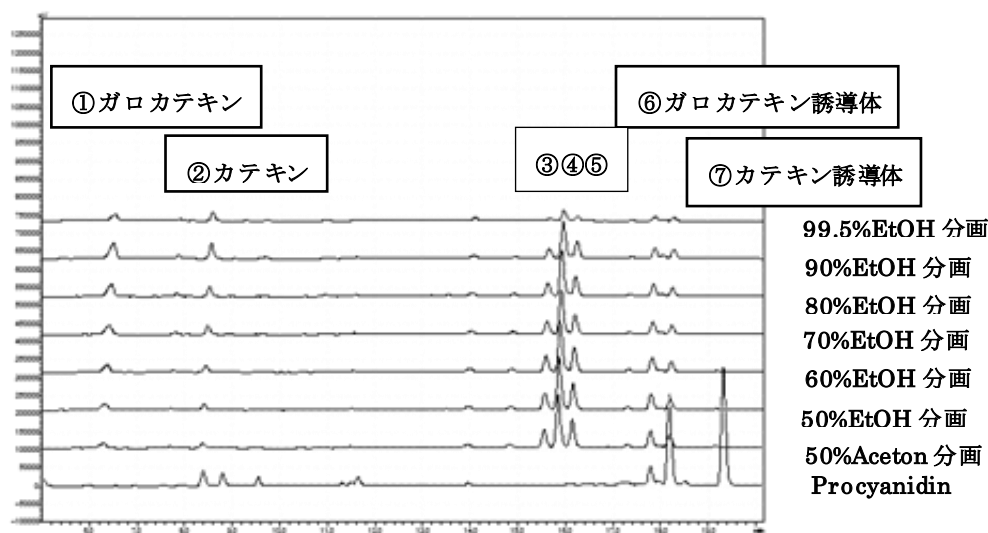


Figure 6. HPLC による分離

チオール分解後 ODS C18 カラムを用いて分離した。溶媒 0.05%TFA/精製水から 0.05%TFA/アセトニトリルまでリニアグラジエントで展開。室温で流速 1 mL/min、280nm で検出した。

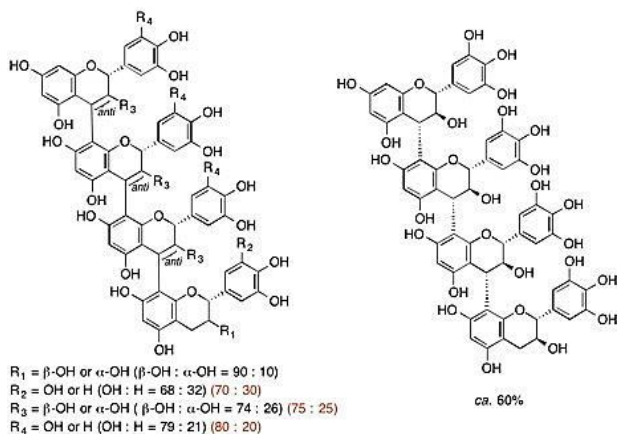


Figure 7. 80%エタノール画分の構造

3.1. TDI モデルラットにおける花粉症症状に対するレンコン精製品の

の効果の検討

TDI モデルラットにおける鼻過敏症に対するレンコン節部精製成分単独及び抗ヒスタミン薬との併用の効果を検討するため 80%エタノール画分をレンコン精製品として動物実験に供した。

レンコン精製品単独投与において鼻症状の改善はみられなかったが、レンコン精製品を抗ヒスタミン薬と併用投与することで、抗ヒスタミン薬単独に比べて有意に鼻症状を改善し、ほぼ完全に鼻症状を改善した。TDI モデルラットの鼻粘膜において IL-9 遺伝子発現亢進に対する影響を検討したところ、抗ヒスタミン薬単独では抑制しなかったが、レンコン精製品単独および抗ヒスタミン薬との併用群において IL-9 遺伝子発現亢進を抑制した(Figure 8.)。

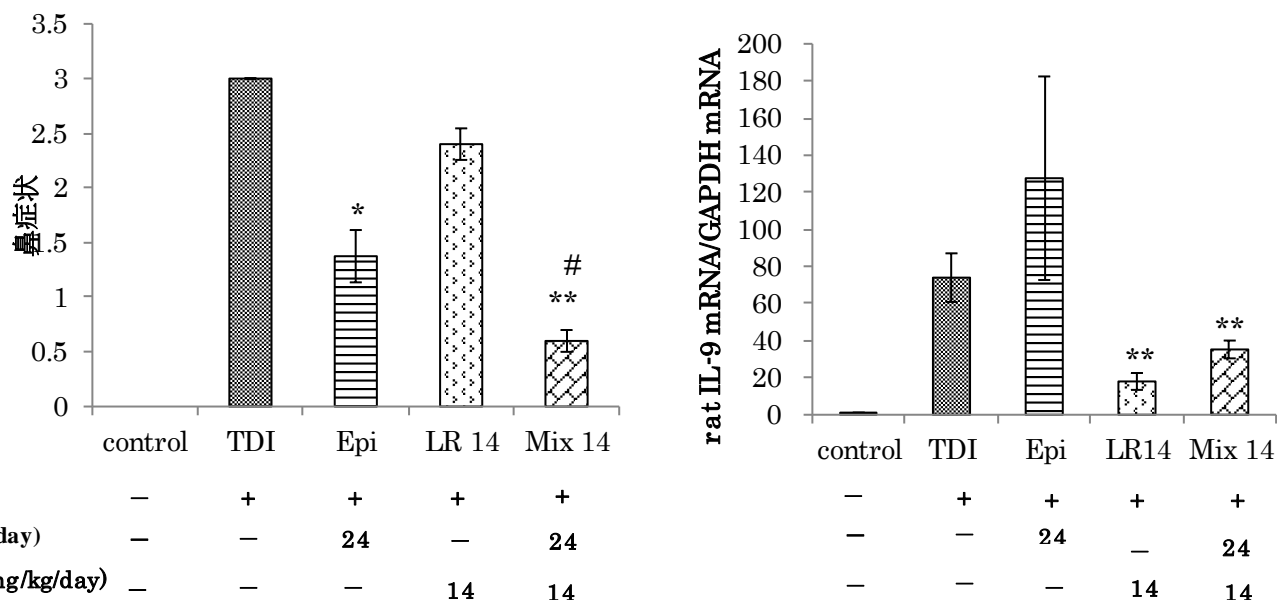


Figure 8. TDI モデルラットにおけるレンコン節部精製品の効果および抗ヒスタミン薬との併用効果

TDI モデルラットに抗ヒスタミン薬であるエピナスチンとレンコン精製品をそれぞれ単独、併用投与した。TDI 塗布開始から解剖まで、1日1回、3週間連日経口投与した。

** : $P < 0.01$ vs. TDI, # : $P < 0.05$ vs. Epi (N=3~5)

第4章 考察

IL-9 遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標にレンコンの部位による差異を検討したところ、レンコンの節部の熱水抽出物に抑制活性が認められた。検討により、熱水抽出物と精製水抽出物との間に IL-9 遺伝子発現亢進に対する抑制活性に違いがないことが確認されたので、レンコン節部の精製水抽出物を原料に抗アレルギー成分の精製を行った。

精製水抽出成分にエタノール沈殿を行ったところ、上清画分には活性がなく、沈殿画分に強い活性があることが明らかになった。また、得られた沈殿画分を Sephadex LH-20 を充填剤としてカラムクロマトグラフィーを行ったところ、カラムに吸着しなかった成分には抑制活性は見られなかったが 50%アセトンで溶出した画分において強い抑制活性が認められた。この画分を再度 Sephadex LH-20 に吸着させ、エタノールの濃度を変えて溶出させることで分離した。その画分をチオール分解することで、単量体に分解し、HPLC によって分離、NMR によって構造を決定した。その結果、ガロカテキン、エピガロカテキンからなるプロアントシアニジン重合体の構造であった。80%エタノール画分が、最も分子量が小さく、IL-9 遺伝子発現亢進を抑制したことから、この画分をレンコン精製品とした。

プロアントシアニジンの重合度によって IL-9 遺伝子発現亢進の抑制活性が異なっていたことから、プロアントシアニジンの IL-9 遺伝子発現亢進抑制活性には、重合度が 4 以上であることが重要である可能性が示唆された。

レンコン精製品の抗アレルギー効果を鼻過敏症モデルラットを用いて検討した。その結果、レンコン精製品単独では鼻症状を抑制しなかったが、抗ヒスタミン薬と併用することで、ほぼ完全に症状を改善し、抗ヒスタミン薬単独と比較しても有意に症状を改善した。また、鼻粘膜において IL-9 遺伝子発現亢進を抗ヒスタミン薬が抑制しないが、レンコン精製品は抑制した。これらのことから、レンコン精製品が IL-9 遺伝子発現亢進を抑制することでアレルギー症状を改善したことが示唆された。

これまで IL-9 は T 細胞や肥満細胞の成長因子であり、B 細胞からの IgE 産生を誘導することが知られている。IL-9 とアレルギー疾患の関連については、アレルギー性鼻炎患者における末梢血の単球で IL-9 産生が亢進し¹⁰⁾、抗 IL-9 抗体で中和すると鼻粘膜への好酸球の浸潤が抑制されて鼻炎症状が軽減されることが報告されている¹¹⁾。今回の検討により、アレルギー疾患において、IL-9 遺伝子発現亢進を抑制することが治療に有効であり、IL-9 遺伝子発現機構が新たな治療標的となる可能性が示唆された。

今後、レンコン精製品の標的を明らかにすることで、より有効なアレルギー治療の開発につながると考えられる。

第 5 章 参考文献

1. Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011; 60:171-89
2. Kitamura, Y., Miyoshi, A., Murata, Y., Kalubi, B., Fukui, H. and Takeda, N.: Effect of glucocorticoid on up-regulation of H1R mRNA in nasal mucosa of rats sensitized by exposure to toluene diisocyanate. *Acta Otolaryngol.* 2004; 124:1053-1058.
3. Murata, Y., Miyoshi, A., Kitamura, Y., Takeda, N. and Fukui, H.: Up-regulation of H1Rs in an allergic rat nasal mucosa model. *Inflamm. Res.* 2004; 53:11-12.
4. Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H: Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses [corrected] transcriptional up-regulations of histamine H(1) receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108:480-6.
5. Mizuguchi H, Kitamura Y, Kondo Y, Kuroda W, Yoshida H, Miyamoto Y, Hattori M, Fukui H, Takeda N: Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses nasal symptoms and expression of histamine H₁ receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010; 32:745-8
6. Fukui H: Progress in allergy signal research on mast cells: up-regulation of histamine signal-related gene expression in allergy model rats. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106:325-331
7. Shahriar M, Mizuguchi H, Maeyama K, Kitamura Y, Orimoto N, Horio S, Umehara H, Hattori M, Takeda N, Fukui H: Suplatast tosilate inhibits histamine signaling by direct and indirect down-regulation of histamine H1 receptor gene expression through suppression of histidine decarboxylase and IL-4 gene transcriptions. *J Immunol.* 2009; 183:2133-2141
8. Mizuguchi H, Orimoto N, Kadota T, Kominami T, Das AK, Sawada A, Tamada M, Miyagi K, Adachi Matsumoto M, Kosaka T, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H.: Suplatast tosilate alleviates nasal symptoms through the suppression of nuclear factor of activated T-cells-mediated IL-9 gene expression in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2016;
9. Abe, Y., Ogino, S., Irifune, M., Imamura, I., Liu, Y. Q., Fukui, H. and Matsunaga, T.: Histamine content, synthesis and degradation in nasal mucosa and lung of guinea-pigs treated with toluene diisocyanate (TDI). *Clin. Exp. Allergy*, **23**, 512-517, 1993.
10. Sun J, Wong B, Cundall M et al. Immunoreactivity profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with ragweed-induced allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 2007; 37: 901-908.
11. Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-9 ameliorates symptoms of

allergic rhinitis by reducing Th2, Th9, and Th17 responses and increasing the Treg response in a murine model. *Oncotarget* 2017; 8: 14314– 14324. 25

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し終始御親切なる御指導、御鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部生命薬理学分野 藤野 裕道 教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部耳鼻咽喉科学分野 武田 憲昭 教授、北村 嘉章 准教授、大阪大谷大学薬学部薬理学講座 水口 博之 教授、医療法人錦秀会顧問・大阪大谷大学客員研究員 福井 裕行 先生に厚く感謝の意を表します。さらに、本研究にご協力くださいました徳島大学薬学部生薬学分野 柏田 良樹 教授、徳島県立農林水産総合技術センター 沢田 英司 様、篠原 啓子 様、(株)ニチレイバイオサイエンス 永峰 賢一 様、そして徳島大学薬学部生命薬理学分野の皆様方に心より感謝致します。

2020 年
湧川朝治