

<平成23年度助成>

山椒による食物アレルギーの治療に関する研究

林 周作・王 暁宇・山本 武・門脇 真

(富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野)

緒 言

食物アレルギーは、原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介し生体にとって不利益な症状(蕁麻疹、血管性浮腫または呼吸困難等)が惹起される現象であり、厚生労働省による調査では、約33万人の児童が食物アレルギーを罹患していることが報告されている。これまで食物アレルギーに対しては有効な治療薬が見出されておらず、原因食物の除去といった対処療法的な対策しか取られていない¹⁾。しかし、卵や牛乳などの原因食物の完全な排除が困難な場合が多いこと、原因食物として挙げられる食物は高栄養の食品が多く、除去によって幼児の身体的および精神的育成に支障をきたす場合もあること、また食物アレルギーによりアナフィラキシーなど生命に関わる症状が惹起される可能性があることから、食物アレルギーに対する根治的な治療薬の創製が期待されている。報告者らはヒト食物アレルギーの病態に類似したマウス病態モデルを確立し、腸管で粘膜型マスト細胞が著しく増多すること、腸管マスト細胞を欠損したマウスにおいて食物アレルギーが発症しないことなどから、粘膜型マスト細胞が食物アレルギーの発症に深く関与することを明らかにしている²⁾。さらに、ヒトにおいても粘膜型マスト細胞が、食物アレルギーの病態形成に関与することが知られている。そこで、食物アレルギーに対して治療効果を示す薬剤を和漢薬や薬用植物の中から探索することを目的として、マスト細胞株RBL-2H3細胞を用い、抗原刺激に伴いマスト細

胞から放出される β -hexosaminidaseを脱顆粒の指標とし、80種類の生薬抽出物の効果を検討した。その結果、檳榔子、桂皮、鬱金、大黃および山椒の水抽出物に強い脱顆粒抑制作用を見出した。さらに食物アレルギーモデルマウスを用いた予備検討において、山椒抽出物がアレルギー性下痢症状の発症を抑制する知見を得た。そこで、報告者らは山椒抽出物の粘膜型マスト細胞に対する直接作用を検討するため、BALB/cマウスの骨髄細胞から粘膜型マスト細胞(mucosal-type murine bone marrow-derived mast cells; mBMMCs)を分化誘導し、山椒抽出物が抗原刺激によるmBMMCsの脱顆粒を強力に抑制することを見出した。

本研究は、mBMMCsを用い、山椒抽出物による粘膜型マスト細胞の活性化抑制作用の詳細な機序を解明するとともに、食物アレルギーモデルマウスを用いた*in vivo*解析により、個体レベルでの抗アレルギー作用も明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 粘膜型骨髄由来マスト細胞(mBMMCs)の培養

6週齢の雄性BALB/cマウスの両足大腿骨および頸骨より骨髄細胞を採取し、20ng/ml interleukin (IL)-3および40ng/ml stem cell factorを添加した10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地にて、37°C、5% CO₂存在下で培養を行った。培養10日後から前述の培地に0.5ng/ml IL-9および1ng/ml transforming growth factor- β 1を追加した培地に交換し、培養開始日より4週間後の浮遊細胞をmBMMCとして実験に使用した³⁾。

2. mBMMCsの活性化

mBMMCsを1.5 $\mu\text{g/ml}$ マウス抗 DNP-IgE で6時間感作し、その後100ng/ml DNP-BSAを加え1時間刺激した。山椒抽出物はDNP-BSA刺激30分前に適用した。抗原刺激終了後、細胞を回収し、脱顆粒は β -hexosaminidase 放出を指標とし吸光度法を用い、mRNA発現はリアルタイムPCR法を用い、また網羅的全遺伝子発現解析はDNAマイクロアレイを用い検討を行った。

3. 食物アレルギーモデルマウス

BALB/c マウスに抗原である卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 50 μg とアジュバントである aluminum hydroxide gel との混合物を2週間毎に計2回腹腔内投与し、全身感作を行った。さらにその2週間後より隔日に50mg OVAの経口投与を行い、投与1時間後にアレルギー性下痢症状の有無を評価した。山椒抽出物の投与はOVAの経口投与1時間前に経口にて行った。

4. 統計学的処理

データは全て平均値 \pm 標準偏差で表示した。統計学的有意差はStudentの*t*-検定またはDunnettの多重比較検定を用いて検討し、危険率 $P < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

結果および考察

1. 山椒抽出物は抗原刺激によるmBMMCsの活性化を抑制する

まず初めに、抗原刺激によるmBMMCsの脱顆粒に対する山椒抽出物(0.1~1mg/ml)の効果について検討を行った。山椒抽出物は濃度依存的に抗原刺激によるmBMMCsの脱顆粒を抑制し、対照群と比較し0.32mg/ml以上の濃度においてその抑制効果は有意であった(図1)。一方、mBMMCsの細胞生存率に対しては0.32mg/ml山椒抽出物は何ら影響を与えなかったことから、山椒抽出物による脱顆粒抑制作用はその毒性によるものではないことが示された。これらの結果から、以降の検討においては0.32mg/ml山椒抽出物を用いた。

マスト細胞は様々な刺激により炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、Th2サイトカインであるIL-4、IL-13などを産生し放出する。抗原刺激は、mBMMCsにおけるTNF- α 、IL-4およびIL-13のmRNA発現を対照群と比較し著明に増大させた(図2)。山椒抽出物は、抗原刺激によるこれらサイトカインmRNA

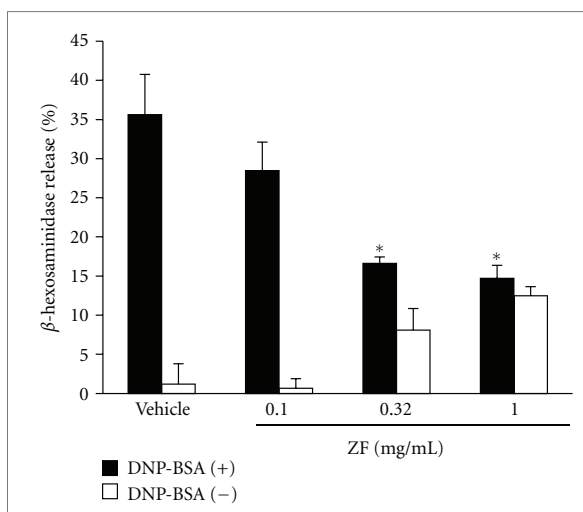


図1 抗原刺激によるmBMMCsの脱顆粒に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

mBMMCsはDNP-IgE(1.5 $\mu\text{g/ml}$)で6時間感作し、DNP-BSA(100ng/ml)を加え抗原刺激を行った。山椒抽出物(0.1-1mg/ml)は抗原刺激30分前に適用した。脱顆粒はmBMMCsからの β -hexosaminidaseの放出を指標とし測定を行った。
* $P < 0.05$ vs Vehicle (n=4).

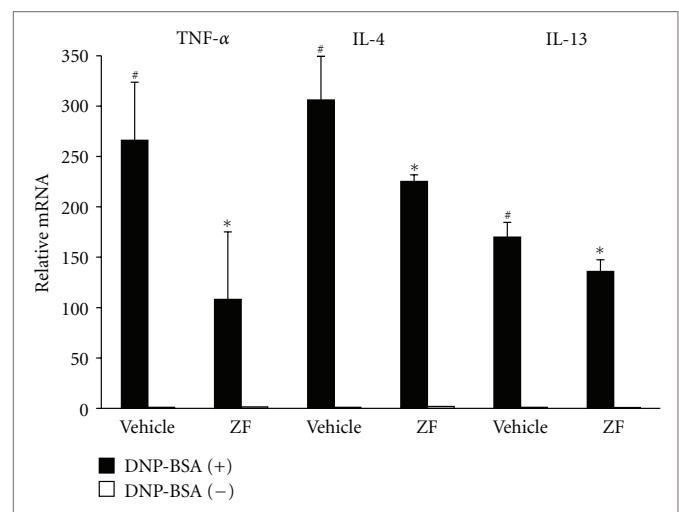


図2 mBMMCsにおけるサイトカインのmRNA発現に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

mBMMCsはDNP-IgE(1.5 $\mu\text{g/ml}$)で6時間感作し、DNP-BSA(100ng/ml)を加え抗原刺激を行った。山椒抽出物(ZF; 0.32mg/ml)は抗原刺激30分前に適用した。その後RNAを抽出し、リアルタイムPCRにて解析を行った。# $P < 0.05$ vs DNP-BSA (-), * $P < 0.05$ vs Vehicle (n=4).

発現の増大を有意に抑制した。さらに、山椒抽出物は抗原刺激によるmBMMCの細胞内カルシウム濃度の上昇反応を減弱させた。以上のことから、山椒抽出物は細胞内カルシウム濃度の上昇抑制を介し粘膜型マスト細胞を不活性化させることが示唆された。

2. 山椒抽出物のmBMMC活性化抑制作用はSphk1に依存する

山椒抽出物による粘膜型マスト細胞の活性化抑制作用の詳細な機序を検討するため、DNAマイクロアレイを用い、山椒抽出物の標的遺伝子を網羅的に解析した。28,853個の Maus 遺伝子のうち、山椒抽出物は抗原刺激により発現が増加した49個の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。これら遺伝子の中で、抗原刺激は sphingosine kinase 1 (Sphk1) の発現を定常mBMMCの5.7倍に上昇させ、山椒抽出物の前処置は上昇したSphk1の発現を16%まで減少させた。さらに、リアルタイムPCRを用いてmBMMCにおけるSphk1のmRNA発現に対する山椒抽出物の効果について検討を行ったところ、網羅的遺伝子解析と同様に、抗原刺激によるSphk1の発現亢進は山椒抽出物によって著明に抑制された(図3)。マスト細胞は抗原刺激によりSphk1およびSphk2を誘導し、sphingosine 1-phosphate (SIP)を産生する。SIPはマスト細胞の生存、増殖および細胞内カルシウムの動員においてセカンドメッセンジャーとして働くことが報告されている。最近、骨髄由来マスト細胞を用いた検討において、Sphk1が抗原刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇、脱顆粒およびサイトカイン産生に関与し、Sphk2は関与しないことが示された^{4,5)}。さらに報告者らは、mBMMCにおけるSphk2のmRNA発現は抗原刺激により影響を受けないことを認めている。よって、mBMMCにおける山椒抽出物の標的因子としてSphk1に着目し以降の検討を行った。

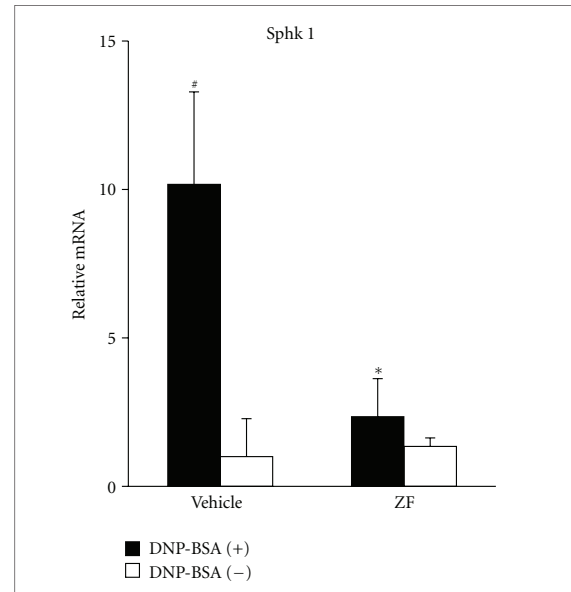


図3 mBMMCにおけるSphk1 mRNA発現に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

mBMMCはDNP-IgE (1.5 μg/ml)で6時間感作し、DNP-BSA (100 ng/ml)を加え抗原刺激を行った。山椒抽出物(ZF; 0.32 mg/ml)は抗原刺激30分前に適用した。その後RNAを抽出し、リアルタイムPCRにて解析を行った。#P<0.05 vs DNP-BSA (-), *P<0.05 vs Vehicle (n=4)。

粘膜型マスト細胞の脱顆粒におけるSphk1の関与を明らかにするため、抗原刺激によるmBMMCの脱顆粒に対するSphksの阻害薬であるN,N-dimethylsphingosine (DMS)の効果について検討を行った。DMSは抗原刺激によるmBMMCの脱顆粒を有意に抑制した。以上の結果から、Sphk1は抗原刺激によるmBMMCの活性化に関与することが明らかとなり、山椒抽出物はSphk1のmRNA発現を抑制し、細胞内カルシウム濃度の上昇を阻害することでmBMMCを不活性化することが示唆された。

3. 山椒抽出物は食物アレルギーモデルマウスにおける下痢症状を抑制する

食物アレルギーモデルマウスを用い、アレルギー性下痢症状に対する山椒抽出物の効果について検討を行った。対照(Vehicle)群におけるアレルギー性下痢症状の発症率はOVA投与3回目から認められ、OVA投与6回目ではほぼ100%に達した(図4)。山椒抽出物(320 mg/kg)の投与はOVA誘発アレルギー性下痢症状の発症率を有

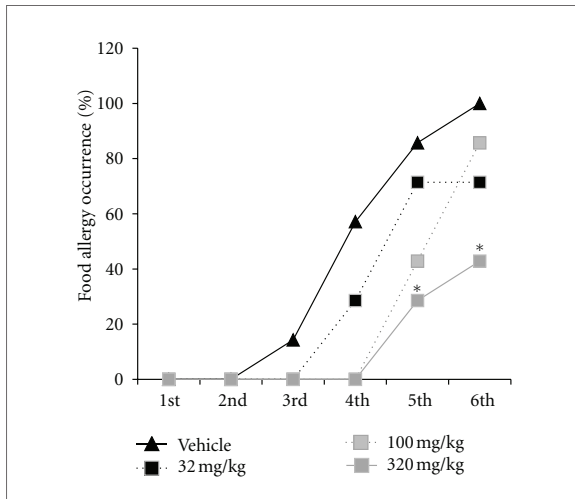


図4 食物アレルギーモデルマウスにおける下痢症状に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

BALB/cマウスに50 μ g OVAを腹腔内投与し、全身感作を行った。さらにその2週間後より隔日に50mg OVAの経口投与を行い、投与1時間後にアレルギー性下痢症状の有無を評価した。山椒抽出物の投与はOVAの経口投与1時間前に経口にて行った。
*P<0.05 vs Vehicle (n=8).

意に抑制し、OVA投与6回目における発症率は約40%であった。同様にDMS(1mg/kg)の投与もアレルギー性下痢症状の発症率を有意に抑制した。さらに、免疫組織化学を用いマウス近位結腸における粘膜型マスト細胞について解析を行った。正常マウスの近位結腸において粘膜型マスト細胞はほとんど観察されなかったが、Vehicle群では粘膜型マスト細胞の顕著な増多が認められた(図5)。山椒抽出物の投与は粘膜型マスト細胞の増多を抑制した。また、山椒抽出物の投与はVehicle群の近位結腸におけるIL-4およびSphk1

のmRNA発現を有意に抑制した(図6)。これらの知見から、山椒抽出物は個体レベルにおいても抗原刺激によるSphk1の発現亢進の抑制を介し、粘膜型マスト細胞の活性化を阻害することが示唆された。

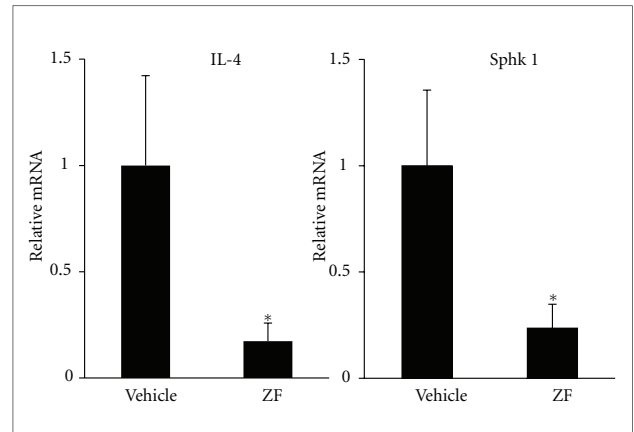


図6 食物アレルギーモデルマウスにおけるサイトカインmRNA発現に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

BALB/cマウスに50 μ g OVAを腹腔内投与し、全身感作を行った。さらにその2週間後より隔日に50mg OVAの経口投与を行い、食物アレルギーモデルマウスを作製した。山椒抽出物(ZF; 320mg/kg)の投与はOVAの経口投与1時間前に経口にて行った。OVAの経口投与6回目終了後に各群マウスから近位結腸を採取し、RNA抽出を行いリアルタイムPCRにて解析を行った。
*P<0.05 vs Vehicle (n=5).

結 論

本研究において、報告者らは山椒抽出物が抗原刺激による粘膜型マスト細胞の活性化を*in vitro*及び*in vivo*において抑制することを明らかにした。また、この作用は主としてSphk1のmRNA

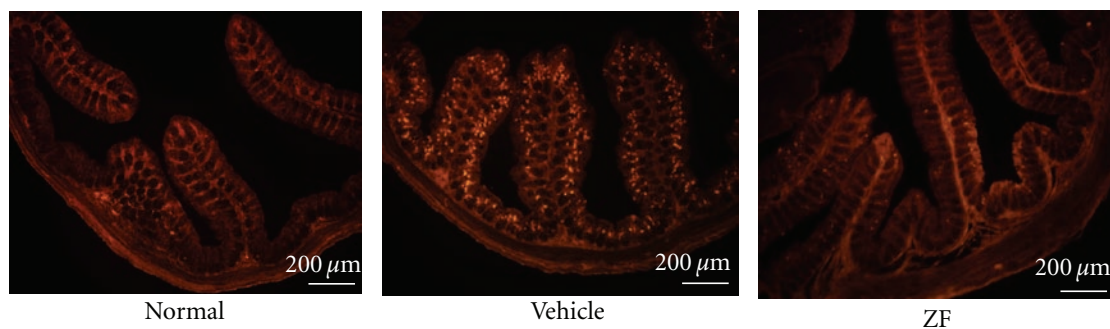


図5 食物アレルギーモデルマウスにおける粘膜型マスト細胞の増多に対する山椒抽出物(ZF)の抑制効果

BALB/cマウスに50 μ g OVAを腹腔内投与し、全身感作を行った。さらにその2週間後より隔日に50mg OVAの経口投与を行い、食物アレルギーモデルマウスを作製した。山椒抽出物(ZF; 320mg/kg)の投与はOVAの経口投与1時間前に経口にて行った。OVAの経口投与6回目終了後に各群マウスから近位結腸を採取し、粘膜型マスト細胞のマーカーである抗mMCP-1抗体を用い、免疫組織化学を行った。

発現の抑制を介したものであることが示された。よって、本研究で得られた知見は有効な治療薬が存在しない食物アレルギーに対し、Sphk1の発現抑制を目的とした新たな治療戦略の提供に応用することができる。さらに、山椒抽出物またはその主要活性成分が新規治療薬のリード化合物となる可能性が期待される。

謝 辞

本研究は(公財)浦上食品・食文化振興財団の研究助成により遂行することができました。貴財

団の多大なご支援に対し心より感謝いたします。

文 献

- 1) Sicherer SH, *et al*: J Allergy Clin Immunol (2006) 117: S470-475.
- 2) Yamamoto T, *et al*: Int Arch Allergy Immunol (2009) 148: 175-185.
- 3) Kageyama-Yahara N, *et al*: FEBS letters (2010) 584: 111-118.
- 4) Oskeritzian CA, *et al*: Blood (2008) 111: 4193-4200.
- 5) Pushparaj PN, *et al*: J Immunol (2009) 183: 221-227.

***Zanthoxyli Fructus*, Sansho, Ameliorate Food Allergies Through the Suppression of Mucosal Mast Cell Activation**

Shusaku Hayashi, Xiaoyu Wang, Takeshi Yamamoto, and Makoto Kadowaki
*Division of Gastrointestinal Pathophysiology, Institute of Natural Medicine
University of Toyama*

Introduction: Food allergy (FA) is relatively a common disease in infants, but effective drug therapies are not yet available. Notably, mucosal mast cells, but not connective-tissue mast cells, play important roles in food allergic reactions via the release of inflammatory mediators. Therefore, we screened 80 constituent medicinal herbs of traditional Japanese formulae which are frequently used in Japan using rat basophilic leukemia (RBL)-2H3 mast-like cells. Of the 80 medicinal herbs, the water extracts of *Zanthoxyli Fructus* (ZF), which is called Sansho in Japanese, significantly inhibited antigen-induced degranulation. It has been reported that ZF has anti-inflammatory properties. However, it remains unclear whether ZF has suppressive effect on the activation of mucosal mast cells and the development of FA. In the present study, we examined the effect of ZF on mucosal-type murine bone marrow-derived mast cells (mBMMCs), and investigated the underlying mechanisms of the inhibitory action.

Methods: The mBMMCs were prepared from the femurs of BALB/c mice and cultured with a combination of stem cell factors, interleukin (IL)-3, IL-9 and transforming growth factor- β 1. The mBMMCs were sensitized by anti-DNP IgE and pretreated with ZF for 30 min before the stimulation with antigen, DNP-BSA. The degree of degranulation was assessed by measuring β -hexosaminidase release. The expression levels of cytokines mRNA in mBMMCs were examined by real-time PCR. In murine FA model experiments, BALB/c mice were systemically sensitized twice with ovalbumin (OVA) and then were repeatedly given orally OVA. ZF was administered orally before the OVA challenges.

Results and Discussion: ZF significantly inhibited the degranulation of mBMMCs induced by antigen in a concentration-dependent manner. In addition, ZF significantly suppressed the degranulation induced by calcium ionophore A23187 in mBMMCs. ZF suppressed the increase of intracellular calcium concentration triggered by the antigen in mBMMCs. The expression levels of tumor necrosis factor- α , IL-4 and IL-13 mRNA were extremely enhanced by antigen in mBMMCs, which was almost completely suppressed by ZF. To investigate the pharmacological mechanism underlying the inhibitory effect of ZF, we examined the global mRNA expression profiles of normal mBMMCs, antigen-stimulated mBMMCs (activated mBMMCs), and ZF-pretreated activated mBMMCs using mouse GeneChip. The expression level of sphingosine kinase 1 (Sphk1), which plays an important role in the antigen-induced immune responses in mast cells, was markedly increased in the activated mBMMCs compared with normal mBMMCs, and these events were almost totally inhibited by pretreatment of ZF. Furthermore, ZF inhibited allergic symptoms in an OVA-induced murine FA model and decreased the number of infiltrating mucosal mast cells and the enhanced mRNA expression levels of IL-4 and Sphk1 in the FA mice colons.

Conclusion: The present study reveals that ZF suppresses the activation of mucosal mast cells mainly through Sphk1-dependent mechanism. Therefore, our findings suggest that ZF is utilized for the development of a novel, potent anti-FA agent.