

ニッポンハム食の未来財団 設立記念研究助成 研究完了報告書（1）

平成 28 年 4 月 27 日

一般財団法人ニッポンハム食の未来財団
理事長 山田良司 殿

研究課題名	アレルギー抑制食品の探索とその機能性の分子基盤解明		
フリガナ	カタクラヨシノリ		
代表者名	片倉 喜範		
所属機関	（機関名）九州大学大学院農学研究院 （役職名）准教授		
所属機関住所	〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1		
連絡先	Tel: 092-642-3050 Fax: 092-642-3050 E-mail: katakura@grt.kyushu-u.ac.jp		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
本助成金による発表論文、学会発表			

代表者名	片倉喜範
------	------

1. 研究結果概要

本研究では、モデル細胞としてヒト幼若好塩基球前駆細胞（KU812F）を用い、抗原刺激後の1）カルシウム流入、2）カルシウム流入後のヒスタミン遊離、及び3）ヒスタミン合成酵素発現を指標に、抗アレルギー活性を有する乳酸菌の探索を行った。62種の乳酸菌を用いて検証した結果、1）～3）それぞれにおいて活性を有する乳酸菌を数多く同定することができ、その結果をもとに、乳酸菌の抗アレルギー活性パネルを作成することができた。そのなかでも特に、*Pediococcus acidilactici* 属に属する H0709 株は、1）～3）の活性を非常に強く有していることが明らかとなり、抗アレルギー活性を高いレベルで有する有望な抗アレルギー乳酸菌であると予想された。

今後はモデルマウスを用いた *in vivo* 解析を中心に研究を進め、H0709 株のアレルギー抑制活性を検証していく予定である。

2. 研究目的

本研究では、新たな視点から抗アレルギー食品を探索するための独自のシステムを構築するとともに、ここで得られた抗アレルギー食品の機能性の分子基盤を明らかにするための研究を行う。

アレルギー反応は、Th2型サイトカインにより活性化されたB細胞が抗原特異的なIgE抗体を分泌し、肥満細胞や好塩基球上で高親和性IgEレセプターをクロスリンクすることで、ヒスタミンを含む化学メディエーターを放出することが起点となる。つまり、IgEと高親和性IgEレセプターとのクロスリンク後に引き起こされるメディエーター細胞の活性化状態が、アレルギーを抑制するための食品開発にとっての重要なターゲットとなり得るものと考えられた。

そこで本研究では、IgEと高親和性IgEレセプターとのクロスリンク後に引き起こされる重要な細胞内シグナルであるCa²⁺流入にまず着目し、そのCa²⁺流入を抑制することのできる食品成分を探索することを第一の目的とする。次に、Ca²⁺流入が引き起こされた後の化学メディエーター（ヒスタミン）の放出を抑制することのできる食品の探索を行う。さらに、ヒスタミンの合成酵素（ヒスチジン脱炭酸酵素）に着目し、その発現を抑制する食品を探索する。

以上の研究を通じ、食品の抗アレルギー活性を多面的に評価することが可能となり、それぞれ異なった機能を有する抗アレルギー食品を用いることで、アレルギー症状の抑制が可能になるものと期待される。

代表者名	片倉喜範
------	------

3. 研究計画及び研究手法

1. クロスリンク後の Ca^{2+} 流入抑制食品の探索：

モデル細胞としては、ヒト幼若好塩基球前駆細胞 KU812F（ヒューマンサイエンス資源バンク）を用いた。KU812F 細胞は、IL-4（R&D Sytetems）及び GM-CSF（PeproTech）を用いて分化誘導後、10%非働化血清を含む RPMI-1640 培地を用い、37°C、5%CO₂ 環境下で培養を行った。食品成分としては、日本ハム株式会社より供与された 62 種の乳酸菌株を用いた。乳酸菌菌体は、100°C、30 分処理後、凍結乾燥し PBS により懸濁したものをを用いた。KU812 細胞をまず 10 µg/mL の乳酸菌で 3 日間処理を行い、次にヒト IgE 抗体および抗ヒト IgE 抗体でクロスリンクを行った。一定時間静置後、 Ca^{2+} の流入を Fluo-8 蛍光試薬（Screen Quest Fluo-8 NW Calcium Assay kit, ABD Bioquest Inc.）を用い、フローサイトメーターにより検出し、定量化した。陰性コントロールには、EGTA を用いた。解析には、解析ソフト FlowJo（Tree Star 社）を用いた。

2. Ca^{2+} 流入後のヒスタミン遊離抑制食品の探索：

KU812F 細胞をまず 10 µg/mL の乳酸菌で 3 日間処理を行い、次に 10 µM の Ionomycin で 37°C 1 時間処理をした。放出されたヒスタミン量は、2 mM の p-ニトロフェニル-N-アセチル-B-D-グルコサミドを基質として用い、β-ヒキソサミニダーゼ活性を測定することで、評価した。上記算出値から、食品のヒスタミン遊離抑制活性を評価した。

3. ヒスタミン合成酵素抑制食品の探索：

まず、ヒトヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase: HDC）のプロモーター領域をヒトゲノム DNA より PCR 法により取得した。得られたプロモーター領域（HDC プロモーター）を、YFP 発現ベクターの CMV プロモーターと置換したりポーターベクターを構築した（HDCp-YFP）。当該ベクターを KU812F に導入し、安定発現株を取得した（KU812F（HDCp-YFP））。当該細胞（KU812F（HDCp-YFP））に乳酸菌の加熱死菌体を 10 µg/mL の濃度で添加し、3 日間培養した。YFP 蛍光強度はフローサイトメーターにより追跡し、HDC プロモーター活性を抑制することのできる食品成分を探索した。

4. 抗アレルギー乳酸菌パネルの作成：

62 種の乳酸菌株をも用いて上記 1~3 の解析を行うことで、乳酸菌の抗アレルギー活性パネルの作成を行った。

代表者名	片倉喜範
------	------

4. 結果について

1. クロスリンク後の Ca^{2+} 流入抑制食品の探索 :

今回、本研究に用いた KU812F 細胞において、IgE 架橋によるカルシウム流入が起こるか検証した結果、IL-4 及び GM-CSF で分化誘導した KU812F において、IgE 架橋によるカルシウム流入が観測された。次に、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳酸菌で 3 日間処理をした KU812F における、IgE 架橋に伴うカルシウム流入を検証したところ、特に乳酸菌株、H0709、C0102、H1001、T2101、及び C2701 に強いカルシウム流入の抑制を見出した。逆に、SK0605、C0101、及び C1908 を添加した KU812F 細胞では、カルシウム流入の促進が見られた。さらに、グラム陽性菌の病原性リステリアとグラム陰性菌の大腸菌でもカルシウム流入の促進が観察された。

2. Ca^{2+} 流入後のヒスタミン遊離抑制食品の探索 :

1.0 $\times 10^6$ cell/mL の KU812F に 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳酸菌を添加して、3 日間培養した後、ヒスタミン遊離及び蓄積の評価試験を行った。細胞懸濁液の遠心分離後の細胞ペレットをタイロード液で 2 回洗浄後、終濃度 10 μM となるようにイオノマイシンを添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、遠心後上清を回収した。沈殿は、Triton-X100 で溶解後、アッセイに供した。それぞれ 40 μL を用いて前述の方法でヒスタミン遊離量及びヒスタミン蓄積量を評価した。

ヒスタミン蓄積量 = 上清中ヒスタミン + 溶解物中ヒスタミン
とした。

ここで、62 種類の乳酸菌の、イオノマイシン刺激に伴うヒスタミン遊離及び蓄積に対する効果を検証した。1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の乳酸菌を添加して、3 日間処理したものについて、検討したところ、ヒスタミン遊離及び蓄積を抑制する乳酸菌が認められた。特に、ヒスタミン遊離を強く抑制したのは、C0102、C0201、C1103、H0709、T2002、T2101、及び NHMN1 であり、ヒスタミン蓄積を抑制したのは、H1001、T1802、NHT3、C2301、C2401、C2701、及び C2702 であった。以上の結果から、イオノマイシン刺激に伴うヒスタミン遊離及び蓄積を抑制する乳酸菌が存在することが明らかとなった。

3. ヒスタミン合成酵素抑制食品の探索 :

HDCp-YFP を導入した KU812F に乳酸菌を 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、7 日間培養したものを

代表者名	片倉喜範
------	------

4. 結果について（続き）

フローサイトメーターに供し、HDC プロモーター活性の変化を追跡した。PBS を添加したコントロールを 100%として、測定した結果を換算し、HDC プロモーター抑制活性を定量的に評価した。その結果、PBS を添加したコントロールと比較して、HDC プロモーターを抑制する乳酸菌が数多く見出された。ここで HDC プロモーターを 20%以上抑制した乳酸菌は、C0301、C1101、H0709、T1802、T2102、NHK1、NHK2、C2401、C2501、C2502、C2802、C2902、及び C2903 であった。さらに、H0701、H1001、NHH8、NHT3、NHMF2、C2601、C2701、及び C2702 は 20%弱の抑制効果を示した。また逆に、C0201 は HDC プロモーター活性を増強する傾向が認められた。乳酸菌はグラム陽性菌であるが、同じくグラム陽性菌のコントロールである病原性リステリア (*Listeria monocytogenes*)、グラム陰性菌のコントロールである大腸菌 (*Escherichia coli*) においては、コントロールと比較して、HDC プロモーター活性の上昇が観察された。

4. 抗アレルギー乳酸菌パネルの作成：

日本ハム株式会社より供与された 62 種の乳酸菌株をも用いて、上記 1~3 の解析を行うことで、乳酸菌の抗アレルギー活性パネルの作成（図）を行った。カルシウム流入抑制、ヒスタミン遊離抑制、HDC プロモーター抑制それぞれの活性を示す乳酸菌が同定されるとともに、特に H0709 株はこれら 3 つを強く抑制しうることが明らかとなり、抗アレルギー乳酸菌として有望であると考えられた。

5. 残された課題：

今後は、モデルマウスを用いた *in vivo* 解析を中心に研究を進め、特に H0709 株のアレルギー抑制活性を評価していく予定である。

6. 論文発表の予定：

in vivo 解析の結果が出た時点で、論文発表を予定している。

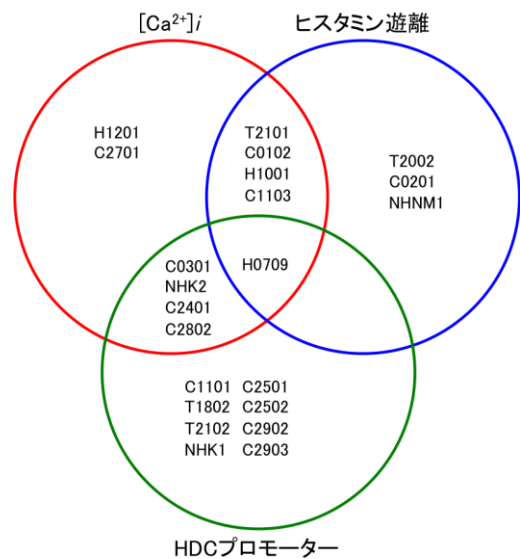


図 抗アレルギー乳酸菌活性パネル

代表者名	片倉喜範
------	------

5. 今後の研究活動について

本助成研究の結果から、好塩基球でのカルシウム流入、ヒスタミン遊離及び HDC プロモーター活性を指標に、抗アレルギー乳酸菌を探索する独自のシステムを構築することができた。特に、カルシウム流入と HDC プロモーター活性を指標にした抗アレルギー乳酸菌探索に関しては報告が無く、これまでにない新しい作用機序を有する抗アレルギー乳酸菌を多数同定することができた。特に、H0709 株は、上記 3 つの活性をいずれも強く有しており、抗アレルギー乳酸菌として有望な菌であると考えている。今後は、モデルマウスを用いた *in vivo* 解析を始め、ヒト介入試験を通じて、H0709 株の抗アレルギー活性を明らかにしていきたいと考えている。

また、H0709 株の属する *Pediococcus acidilactici* 属は、発酵食肉製品や漬物等で見られる乳酸菌であることから、H0709 株配合の抗アレルギー活性を有する新たな発酵食品の創製も可能であると予想しており、今後、その可能性を追求するための研究も進展させていきたいと考えている。

以上