

ニッポンハム食の未来財団 2019 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	水溶解メラニンによるアナフィラキシー応答制御と作用機序の解明
フリガナ	カワモト ヨシユキ
代表者名	川本 善之
所属機関 (機関名) (役職名)	中部大学 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	現在、国際誌への論文投稿準備中である。

研究結果要約

天然化合物であるメラニンは、あらゆる溶媒に不溶であることが知られているが、申請者は水溶性のメラニン合成法を独自に開発し、これがマスト細胞の脱顆粒反応を強力に抑制することを初めて見出した。メラニンは食材にも使われるイカ墨色素の主成分でもあり、自然界にありふれた色素性物質である。抗原特異的 IgE 抗体を腹腔内投与して強制的に感作したマウスに対し、水溶解メラニンをゾンデ投与により服用させた後に抗原を腹腔内投与したところ、全身性アナフィラキシー応答が有意に抑制される知見を得た。このように、水溶解メラニンは新規の抗アレルギー剤として利用できる可能性があると考えられた。そこで本研究は、水溶解メラニンによる食物アレルギー応答の重症化軽減およびアレルギー感作予防の効果の有無を検証し、そのメカニズムの解析と解明を目的として研究を進めた。

オボアルブミンによる食物アレルギーモデルに対して、水溶解メラニンを 1. 抗原感作期間のみ 2. 抗原負荷期間のみ 3. 抗原感作および負荷期間 に投与した群を作成し、比較した。その結果、水溶解メラニンを抗原負荷期間のみに投与した群で有意なアナフィラキシーの抑制効果が見られた。今回の検討で、水溶解メラニンは抗原負荷時における免疫応答を負に制御し、食物アレルギーの重症化抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究目的

メラニンは広く生物界において分布しており、我々ヒトでは毛髪色素や紫外線に反応して皮膚で作られる黒色色素としてよく知られている天然物資である。一般的にほとんどの溶媒に不溶性のため、細胞や生体へ投与し、何らかの応答を評価する検討はほとんどなされてきていなかった。我々はメラニンを溶解する方法を開発し、さらに水溶解性メラニンの合成法を独自に確立した。生化学的緩衝液、もしくは純水に溶解したメラニンは、即時型アレルギー反応で主要な働きを担うマスト細胞の活性化を強力に抑制することを見出した¹⁾。このように、水溶解メラニンは新規の抗アレルギー剤として利用できる可能性が高いと考えられた。

食物アレルギーは即時型アレルギーに分類され、日本では有病率が年々増加している^{2),3)}。1才未満の乳児で最も多く発症するが、小児から成人まで幅広く認められており、重篤化した場合はアナフィラキシーショックを引き起こすことがある。現在の治療法は経口免疫療法があるが、依然として研究段階であり、さらなるアプローチの開発が期待されている。

我々の培養細胞を用いた実験結果では、水溶解メラニンに暴露されたマスト細胞は、既存薬を処理した場合とほぼ同等の脱顆粒抑制反応が認められたが、食物アレルギーモデルにおいて、メラニンの投与で効果を示すかどうか明らかになっていない。そこで本研究は、1. 水溶解メラニンによる食物アレルギー応答の重症化軽減およびアレルギー感作予防の効果 2. そのメカニズムの解析と説明 に関する研究を進め、メラニンによる食物アレルギー制御剤の開発の足掛かりとすることを目的とする。

メラニンに関する研究は数多く、化学構造や生合成経路、生産とターンオーバー、美白のための

制御研究等、国内外問わず古くから行われている。最もよく知られているのは、メラニンが紫外線を吸収し、紫外線傷害から深部の細胞を保護する機能を持つことかもしれない⁴⁾。しかしメラニンを、生物学的活性をもつ物質として利用する試みは極めて少なく、人工合成メラニンによる HIV 複製阻害⁵⁾、サイトカイン調整能⁶⁾、といった先行研究は存在するが、抗アレルギーを目的とした利用への発明報告は国内外を問わずなされていない。本研究は新たな抗アレルギー剤としてのメラニンの効果を検証し、成果は今後、メラニンが新たな医薬素材として認知されていく可能性に繋がる意義を持つと考える。

研究計画及び研究手法

検討 1. 水溶解メラニンの短期経口摂取による急性毒性の有無

Balb/c マウス(日本チャールス・リバー、15 週齢、雌)に、1 日平均飲水量から水溶解メラニン（以下メラニン）を 2000mg/kg (OECD TG420 急性経口毒性試験(固定用量法)ガイドラインに例示された最大用量)となるように給水瓶にて 7 日間、自由摂取させた。投与前後のマウスの体重を測定し、最終日に解剖後、各臓器（肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸）の重量、肉眼所見による異常の有無の観察を行った。本計画は実施予定に加えていなかったが、メラニンの経口投与によるアナフィラキシー応答の抑制効果を調べる上で重要と判断し、実施した。

検討 2. 水溶解メラニンによる食物アレルギー感作予防効果及び食物アレルギー応答の重症化軽減

メラニンが「食物アレルギーの感作予防に効果を持つかどうか」、または抗原感作後のメラニンの摂取により、「食物アレルギーの重症化を抑制できるか」を調べた。すなわち、抗原感作期間のみにメラニンを投与する実験群①（2 日間隔 14 日間）、抗原負荷期間のみにメラニンを投与する実験群②(2 日間隔 14 日間)、感作期間と負荷期間すべての期間にメラニンを投与する実験群③(2 日間隔 28 日間)の比較を行うこととした。

【食物アレルギーモデルの作製と各実験群のデザイン】

Balb/c マウス(日本チャールス・リバー、7 週齢、雌) を購入し、7 日間の環境馴化飼育後、陰性対照群(G1)、陽性対照群(G2)、実験群①(G3)、実験群②(G4)、実験群③(G5) の 5 群(n=6/群) に分け、ケージあたりの飼育数を 3 匹とした。OVA (100 μ g) とアジュバント(Alum、1mg)をマウスの腹腔内へ投与し、初回免疫とした(感作開始)。G1 は OVA に変えて PBS を投与した。G3 および G5 はメラニンを 1000mg/kg となるように経口投与を開始した。他の群はメラニンに変えて水を経口投与した。以後、2 日おきに経口投与を実施した。7 日目に OVA (100 μ g) とアジュバント(Alum、1mg)を G2~G5 に施し、追加免疫を行った。G1 は PBS を投与した。14 日目から OVA(20mg/マウス)を 2 日おきに 26 日目まで、経口投与による抗原負荷(Challenge)を開始した。G1 は PBS を投与した。なお、G3 への合成メラニン投与は終了し、G4 および G5 に対し、OVA の負荷 30 分前にメラニンを 1000mg/kg となるように経口投与した。G1、G2、G3 はメラニンに変えて水を投与した。

【食物アレルギーの評価】

(1) 下痢スコア

22 日目から 24 日目にかけての便の様子を観察し、状態に応じて 4 段階に分類しスコア化した。

スコア 0：硬い便（軽く押さえても潰れない）

スコア 1：軟便（軽く押さえると容易に潰れる）

スコア 2：水分を多少含む便（軽度の下痢）

スコア 3：水分の方が多い便（重度の下痢）

(2) アナフィラキシーの誘導

36 日目にアナフィラキシー応答を誘発した。高用量(50mg)の OVA を経口投与し、体温（直腸温）を 12 分毎に 72 分まで測定した。なお、G4 は OVA 負荷 30 分前にメラニン(1000mg/kg)を経口投与した。他の群は水を経口投与した。

(3) 血清中 OVA 特異的 IgE の定量

抗原負荷開始前の 14 日目と、抗原負荷後 28 日目それぞれにおいて、各マウスより採血用ランセットを用いて静脈血を採取し、血清を分離した。これを市販のキットのマニュアルに従い、血中 OVA 特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。

結果と考察

結果 1. メラニンの経口摂取による急性毒性の有無

Balb/c マウスを用い、水溶解メラニンを 1 週間自由摂取させ、体重変化を調べたところ、対照群と比較して有意な差は見られなかった。また、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸を摘出し比較したところ、肉眼所見でとりわけ目立った傷害は見られず、臓器重量にも差異は認められなかった。ただし、メラニン投与群の盲腸は黒ずんでおり、メラニンが滞留してる可能性が示唆された。

今回は 7 日間という短期投与の結果では、少なくとも急性毒性は見られなかったが、盲腸でのメラニン滞留の意義は現時点では不明である。中長期において何らかの異常をきたす可能性もあり、長期暴露による慢性毒性や遺伝毒性、変異原性などさらに詳細な毒性試験も必要であると考えられる。また、メラニンは正確な構造は未解明であるが、巨大ポリマー分子であり、経口摂取された大部分は吸収されずに便とともに排出されると推定されるが、経口摂取後の吸収や代謝といった、bioavailability に関する知見がなく、引き続き検討が重要である。

結果 2. 食物アレルギーモデルにおける水溶解メラニンの効果

(1) 下痢スコア

OVA の負荷 22 日目の便の状態をスコア (Diarrhea score) 化し比較したところ、陽性対照群 (G2) と抗原負荷時のみにメラニンを事前投与した実験群②(G4)との間に有意差が認められた。陰性対照群を除き、G2 と他の群とに有意差は見られなかった。この結果から、抗原負荷時のみにメラニンを事前投与することで、アレルギー症状が抑制される可能性が示唆された。

(2) アナフィラキシー誘導に対する効果

高用量の抗原負荷によるアナフィラキシー誘導によって、陽性対照群(G2)では急激な体温低下が認められた。これと比較し、実験群②(G4)は体温低下の有意な抑制が認められた。他の群との比較では、有意差は認められなかった。この結果からも、抗原負荷時のみにメラニンを事前投与することで、アナフィラキシー応答が抑制されることが示唆された。

(3) OVA 特異的 IgE 抗体の定量

OVA 特異的 IgE 産生が抑制されているかどうか検証するために、ELISA による IgE 抗体の定量を行った。その結果、陽性対照群(G2)で明らかな OVA 特異的 IgE の産生は確認されたが、メラニンを投与した実験群①、②、③いずれも、少なくとも抑制されていることはなかった。実験群③(G5)ではむしろ IgE 産生が亢進されているほどであった。

以上の結果から、実験群②で見られたアレルギー反応の抑制は、OVA 特異的 IgE 産生の抑制ではないことが示唆された。同時に、メラニンを感作時より投与した実験群①や実験群③で OVA・特異的 IgE 産生の抑制が見られなかったことから、メラニンはアレルゲンに対する抗体産生を抑制する可能性は低いと考えられた。

以上、本研究の結果から、合成水溶解メラニンは短期においては経口投与による明らかな毒性（急性毒性）をもたらす可能性は低い、一定の抗原性が有る可能性が高いことが新たに分かった。今回、メラニンの経口投与で、食物アレルギーの感作を抑制することができるかどうか、あるいはアレルゲン感作後のアレルギー反応を抑制することができるかどうかを検討した結果、抗原特異的 IgE の産生の抑制効果が見られなかったが、アレルゲン侵入前に前処置として服用すると、下痢やアナフィラキシー反応の抑制が見られた。すなわち、メラニンの経口投与は、感作を抑制することはできないが、アレルギー症状の緩和に寄与できる可能性があることが分かった。しかし、感作時より長期にわたり連続的にメラニンを服用するとアレルゲンとして作用する可能性も見出された（詳細非公開）。食物アレルギーモデルの検討で、実験群①(G3)および実験群③(G5)で下痢や体温低下の抑制効果が弱かった理由として、メラニンそのもののアレルギー反応が内在し、OVA に対する

免疫応答の抑制と相殺された結果として現れた可能性も考えられる。

残された課題として、食物アレルギーにおけるメラニンの抑制機序が、マスト細胞の活性化抑制によるものかどうかさらに詳細に調べる必要がある。また、長期暴露による慢性毒性の有無、制御性 T 細胞(Treg)の関与の有無、消化管への吸着度と代謝吸収、bioavailability に関する知見も重要と考える。

本研究結果をまとめ、査読付き国際雑誌への論文投稿を予定している。

今後の研究活動について

我々は受動全身アナフィラキシー(PSA)モデルにおいて、水溶解メラニンの服用はアナフィラキシー応答を有意に抑制すると報告したが¹⁾、本研究により新たに、合成水溶解メラニンの予防的服用により、食物アレルギーに対する免疫応答を軽減できる可能性が示された。これらはマスト細胞と IgE が関与する I 型アレルギーであるが、II 型、や III 型を含めた即時型アレルギーに対する効果についてはまだ不明である。また、T 細胞が関わる IV 型（遅延型）アレルギーに対しては、予備検討の段階ではあるが、メラニン投与による抑制効果が得られていない。さらに、炎症性腸炎ではマスト細胞が関わることを報告されていることから^{7), 8)}、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性炎症性腸疾患モデルを用いて解析したところ、水溶解性メラニンは一定の抑制効果を示し、一方で 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎モデルに対する効果は現時点で著効は見られない。このように、発症機序が異なるアレルギー性疾患や炎症性疾患モデルを多く解析することで、作用点や機序、応用範囲の可能性がより詳細に明らかになると期待され、さらに検討を進めていきたい。

参考文献

- 1) Kawamoto Y, Kondo H, Hasegawa M, et al. Inhibition of mast cell degranulation by melanin. *Biochem Pharmacol.* 2019 May;163:178-193.

- 2) Okada Y, Yamashita T, Kumagai H, Morikawa Y, Akasawa A. Accurate Determination of Childhood Food Allergy Prevalence and Correction of Unnecessary Avoidance. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017 Jul;9(4):322-328.
- 3) 楠 隆. 疫学データから考える食物アレルギーの発症機序 (AYUMI 食物アレルギー : 研究と臨床の最新情報). *医学のあゆみ.* 2015 2015/02/28;252(9):923-926.
- 4) Ham WT, Jr., Ruffolo JJ, Jr., Mueller HA, Guerry D, 3rd. The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time. *Vision Res.* 1980;20(12):1105-1111.
- 5) Montefiori DC, Zhou JY. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Res.* 1991 Jan;15(1):11-25.
- 6) Mohagheghpour N, Waleh N, Garger SJ, Dousman L, Grill LK, Tuse D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell Immunol.* 2000 Jan;199(1):25-36.
- 7) Dvorak AM, Monahan RA, Osage JE, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol.* 1980 Nov;11(6):606-619.
- 8) Nolte H, Spjeldnaes N, Kruse A, Windelborg B. Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. 1990 *Gut.* Jul;31(7):791-794.

以上