



琉球松抽出物による小児アレルギー抑制効果品の研究・開発

沖縄工業高等専門学校 生物資源工学科
教授 池松 真也

2024年10月8日

背景

- 食物アレルギーの有病率は年々増加しており、アレルギーを含む食品の摂取回避では食物アレルギー発症予防に有効ではなく、むしろリスクを高める可能性がある。
- 即時型食物アレルギーは乳幼児に極めて高い。乳幼児期に発症した食物アレルギー児は、喘息・アトピー性皮膚炎といった症状を高頻度で発症する「**アレルギーマーチ**」をたどるリスクが高い。

現状とその問題点



【小児アレルギーの問題点】

乳幼児期に発症した食物アレルギー児は、喘息・アトピー性皮膚炎といった症状を高頻度で発症する「アレルギーマーチ」をたどるリスクが高い。

粘膜型マスト細胞誘導系を用いたリュウキュウマツの 抗アレルギー活性の検討

- **粘膜型マスト細胞 (MMC)**

- ・IgEに対して高い親和性のあるIgE受容体を細胞表面に発現している
- ・IgEを介するアレルギーとの架橋により活性化する

- **MCPT-1 (mast cell protease-1)**

- ・粘膜型マスト細胞において特異的に産生されるタンパク質

- **MMCへの分化を抑制する物質を見つけるスクリーニング系**

MMC誘導系を用いて、MMCを選択的に増加させる過程の中で
琉球松熱水抽出物を添加することでMMC分化を抑制する作用の検討



MCPT-1の発現量が指標となる

目的

- アカエゾマツと琉球松抽出物の抗アレルギー活性についてマウス骨髄細胞から粘膜型マスト細胞へと誘導する誘導系を用いた**ELISA**により検討する。



琉球松・アカエゾマツに付加価値をもたらす。

- **アレルギー発症抑制**に関与する発現遺伝子群について解析を行う。

使用する生物資源

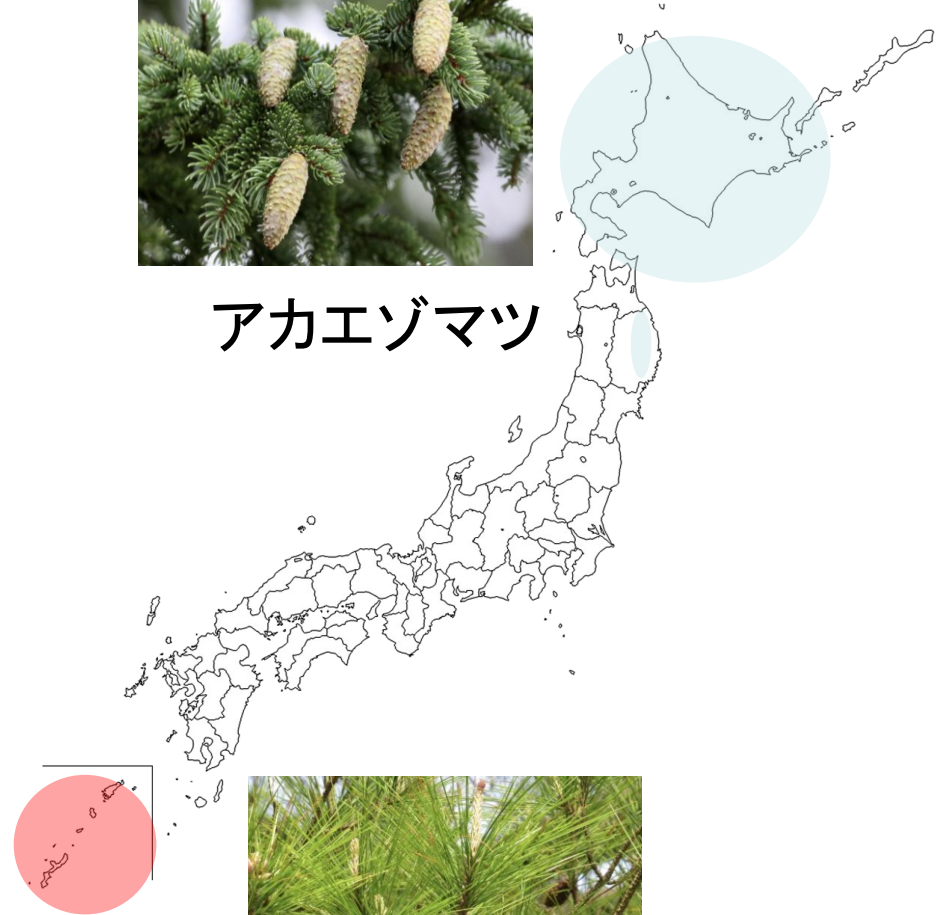
- 琉球松(学名:*Pinus Iuchuensis*)
分布域:暖温帯～亜熱帯
琉球列島
(トカラ列島、奄美諸島、沖縄諸島、先島諸島)
小笠原諸島
- アカエゾマツ(学名:*Picea glehnii*)
分布域:温帯北部～亜寒帯
北海道、岩手県(早池湖山)
南千島、サハリン南部



アカエゾマツ

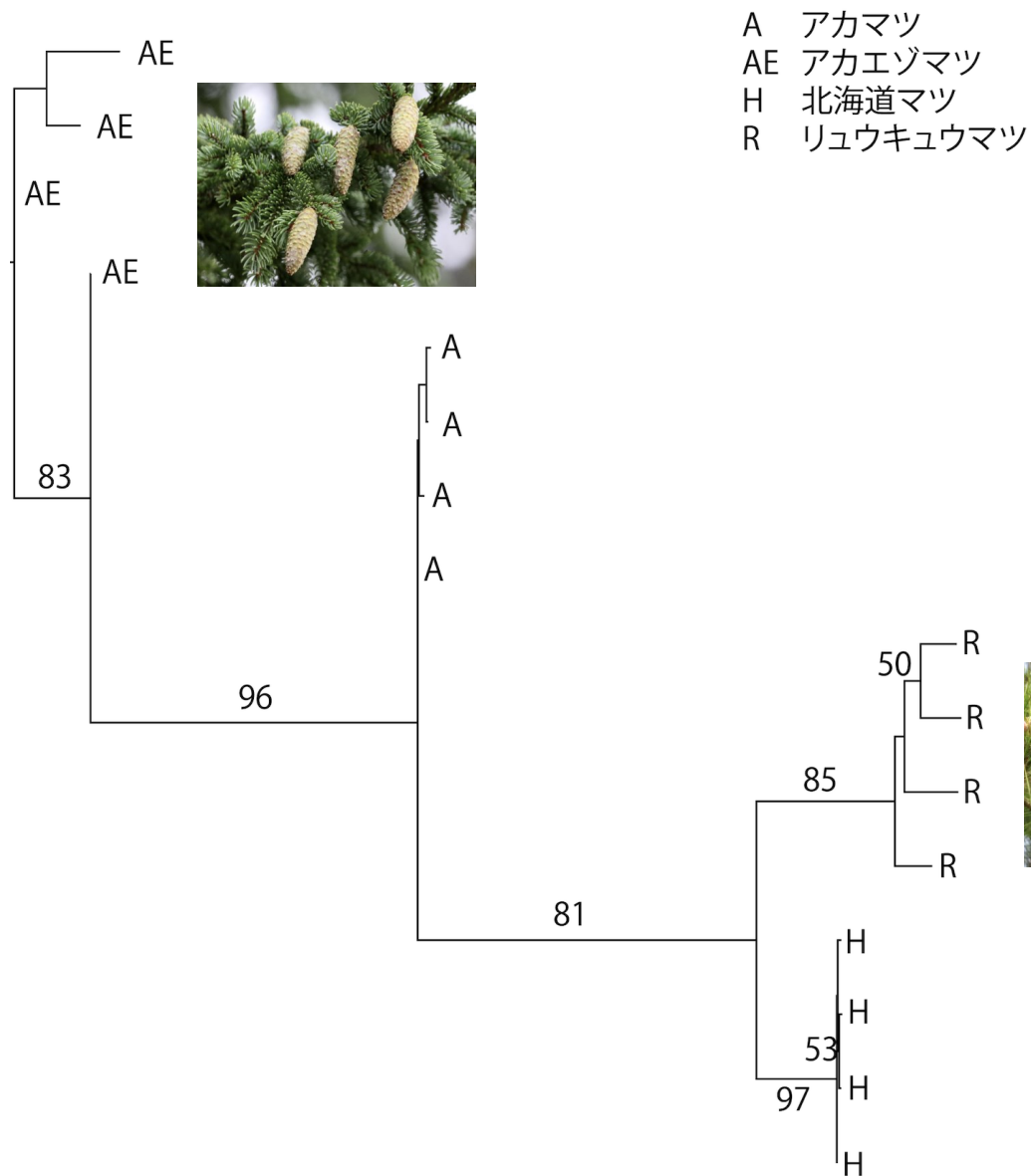


琉球松



マツの系統樹

アカエゾマツと琉球松は比較的離れた種である



実験方法

STEP1

- マウス骨髄細胞の摘出
- マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)へ誘導

STEP2

- リュウキュウマツ抽出物、アカエゾマツ抽出物の添加
- 粘膜型マスト細胞(MMC)へ誘導

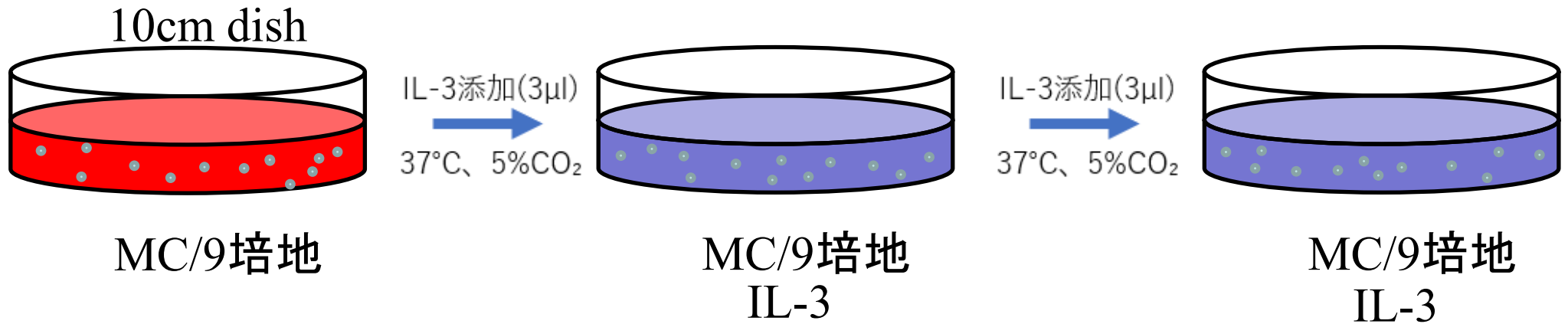
STEP3

- ELISA
- データ解析

実験方法

STEP1

- マウス骨髄細胞の摘出
- マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)へ誘導

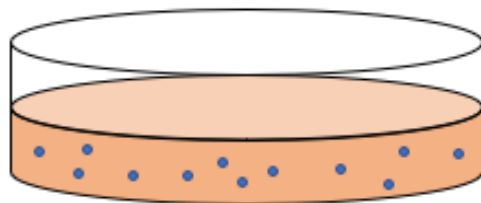


実験方法

STEP2

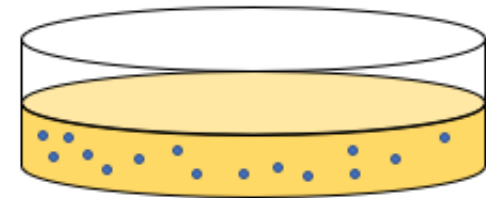
- リュウキュウマツ抽出物、アカエゾマツ抽出物の添加
- 粘膜型マスト細胞(MMC)へ誘導

BMMC
細胞濃度 $5 \times 10^5 \sim 10^6 / 50\text{ml}$



MC/9培地
IL-3

BMMC 50 μl /well
IL-3 50 μl /well
TGF- β (IL-10) 50 μl /well
MC/9培地 50 μl /well
マツ抽出物 50 μl /well

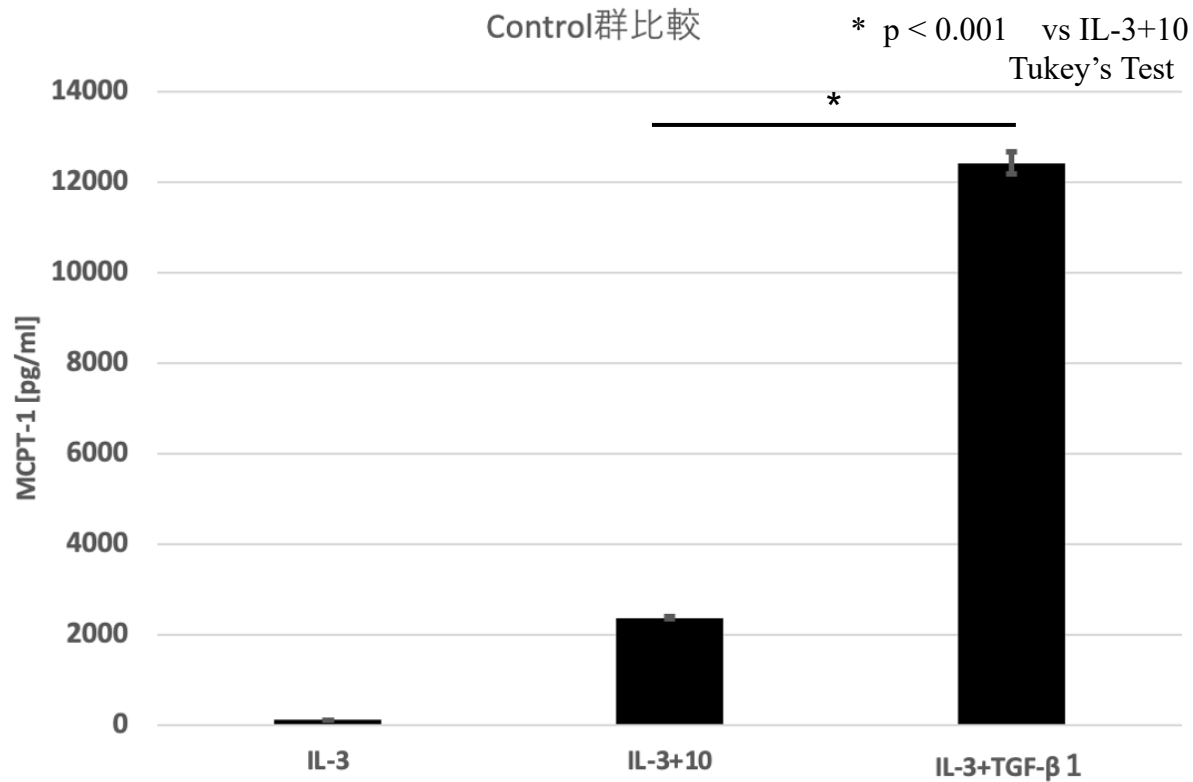


MC/9 培地
IL-3

結果

Control群の有意差検定

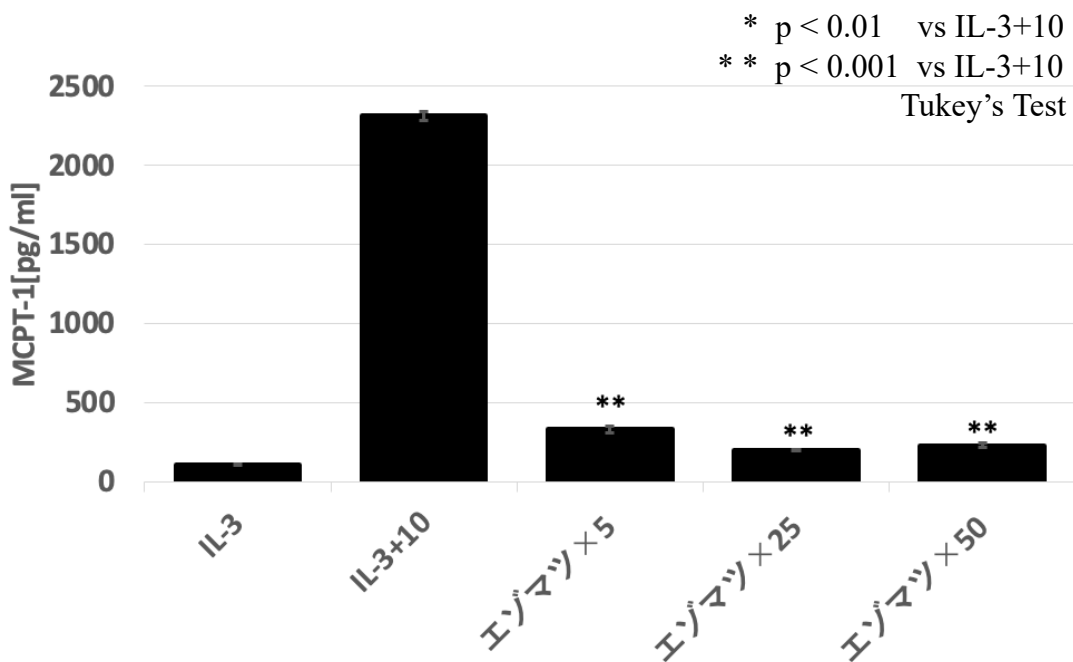
- 【MCPT-1発現量比較】MMC分化誘導剤としてIL-10, TGF- β の比較



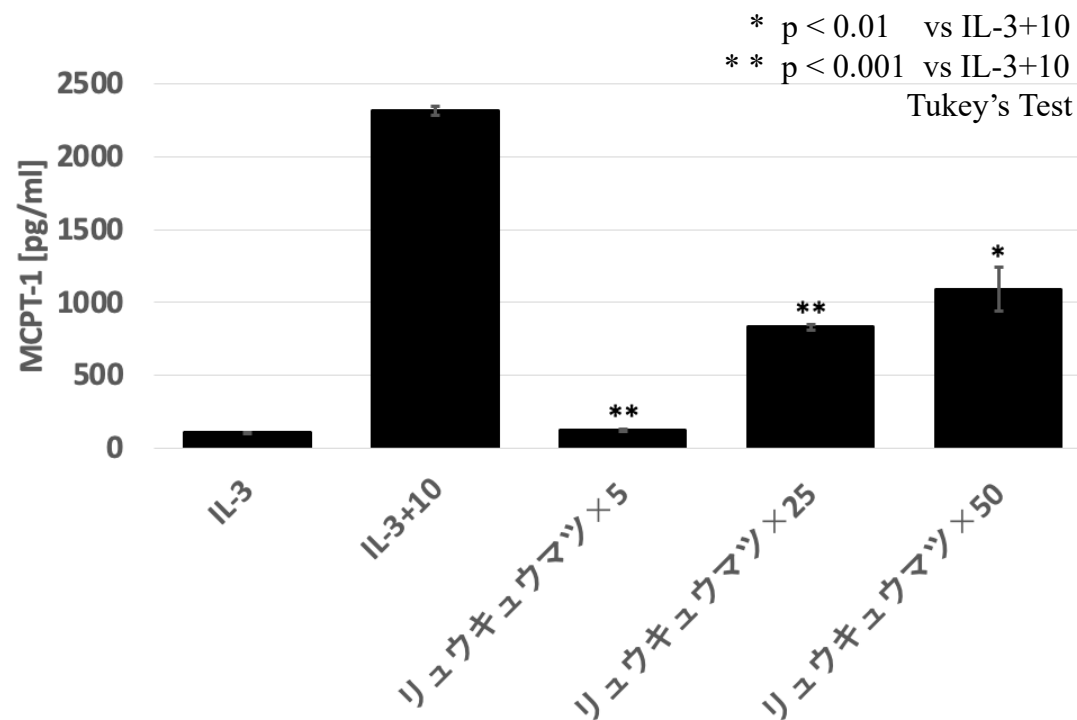
結果 (ELISA)

- MCPT-1発現量

Positive Control (IL-3 のみ) < Negative Control (IL-3 + IL-10 のみ添加)



IL3 + IL-10に加えて

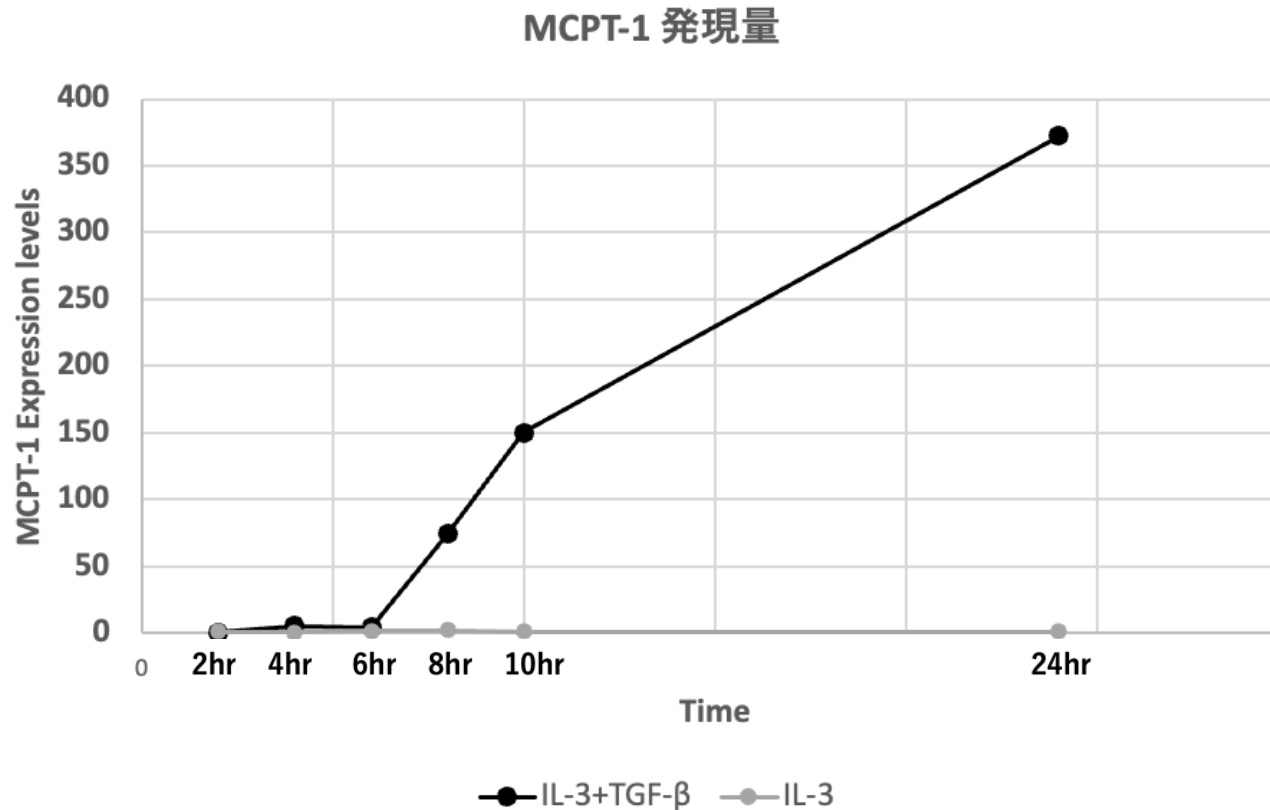


IL3 + IL-10に加えて

結果

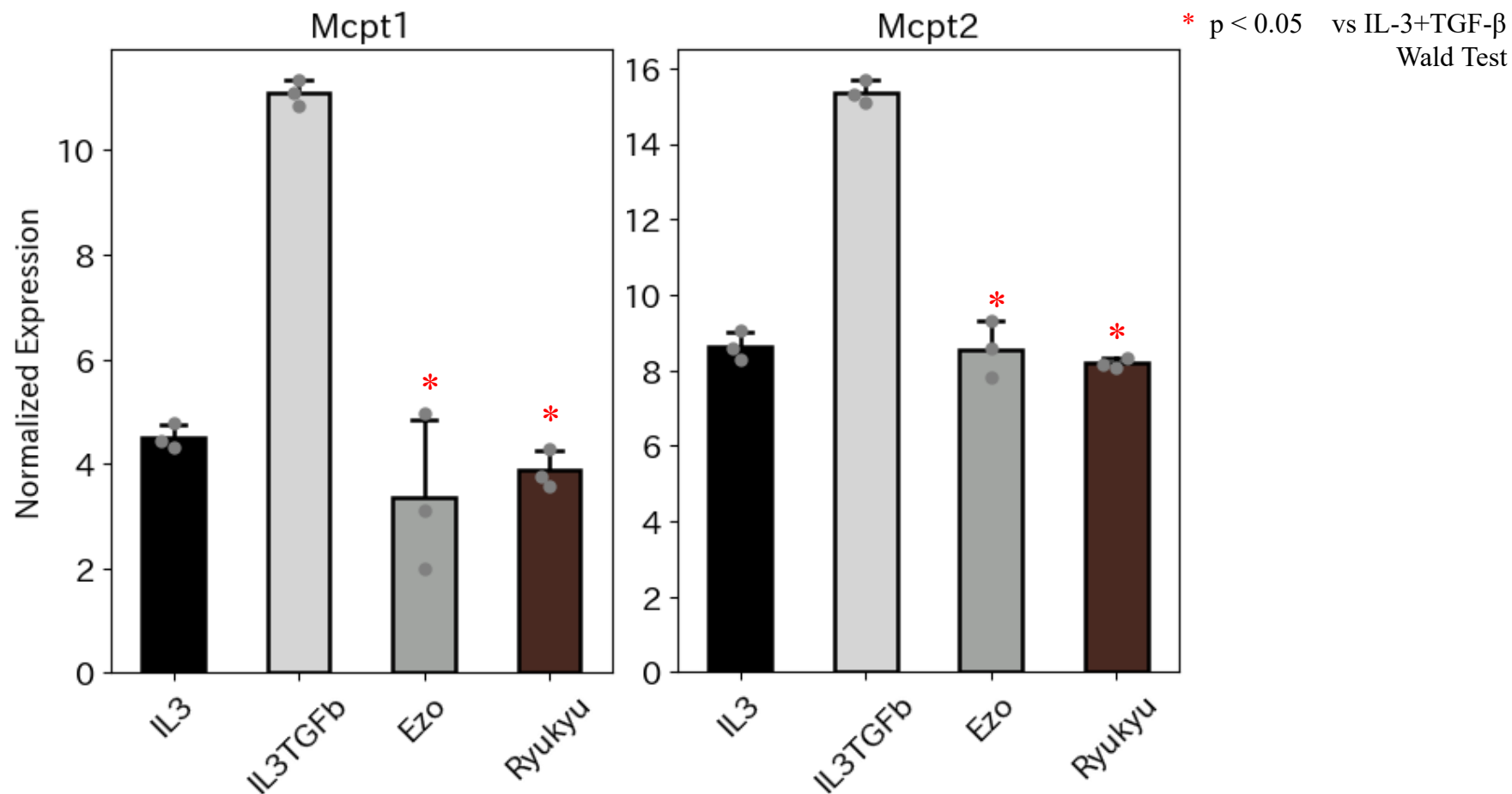
Real-time PCRによるMCPT-1発現量解析

- **TGF- β 添加後**、8hr ~ 10hrでMCPT-1の発現が活発であった



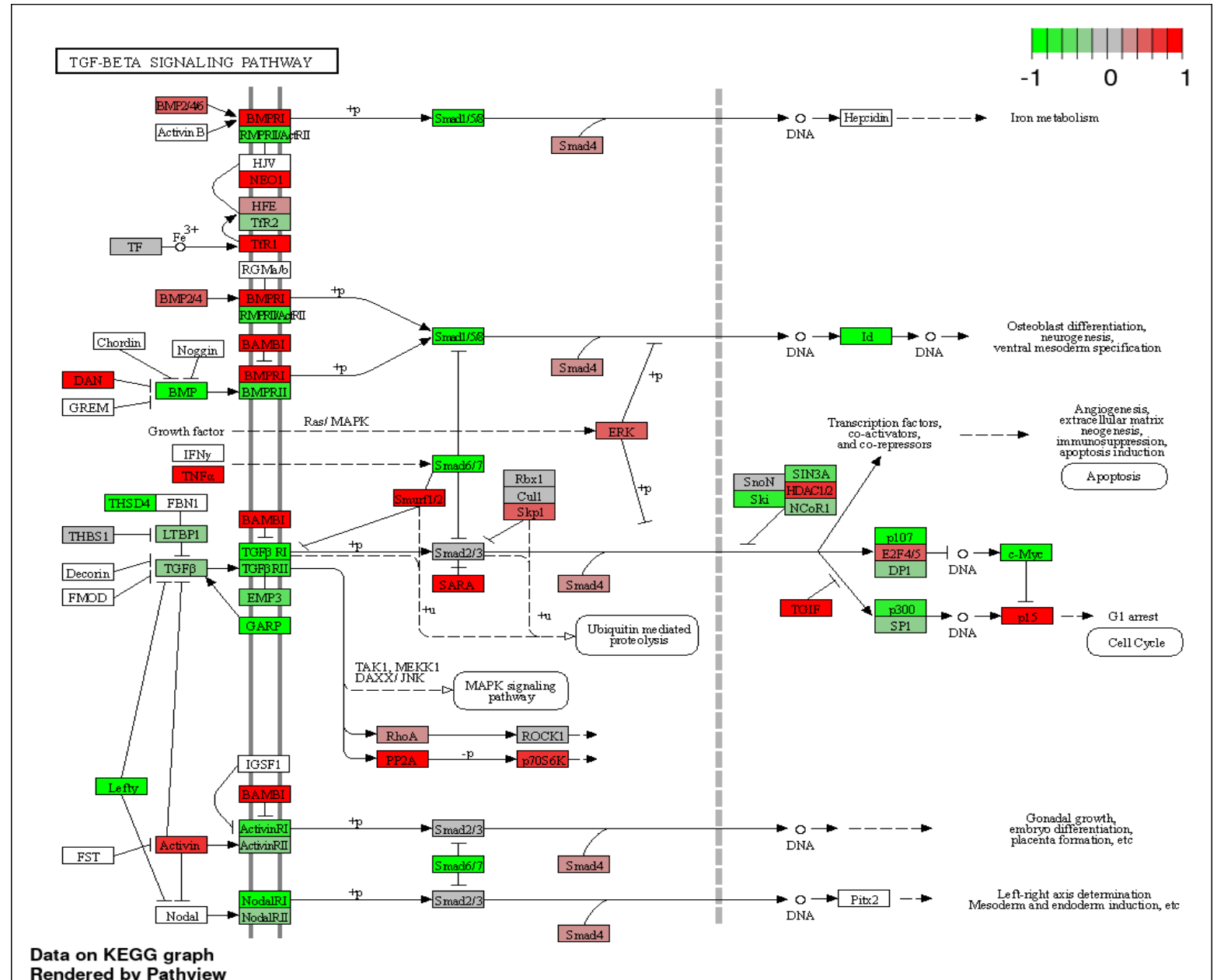
結果 RNA-Seqによる発現量解析

TGF- β 添加、9hr後のMMC分化誘導細胞の遺伝子発現解析を行った



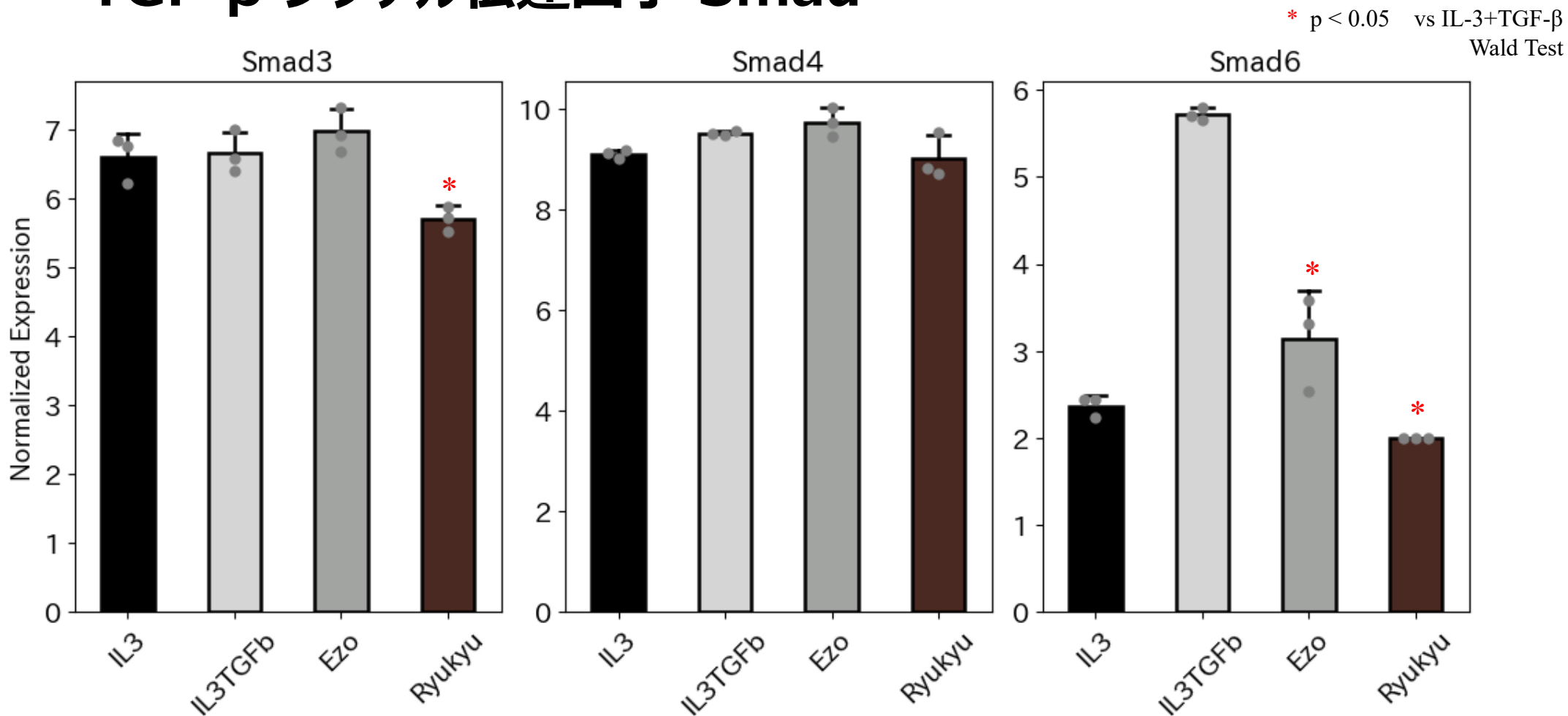
結果 RNA-Seqによる発現量解析

TGF-β Signaling Pathway



結果 RNA-Seqによる発現量解析

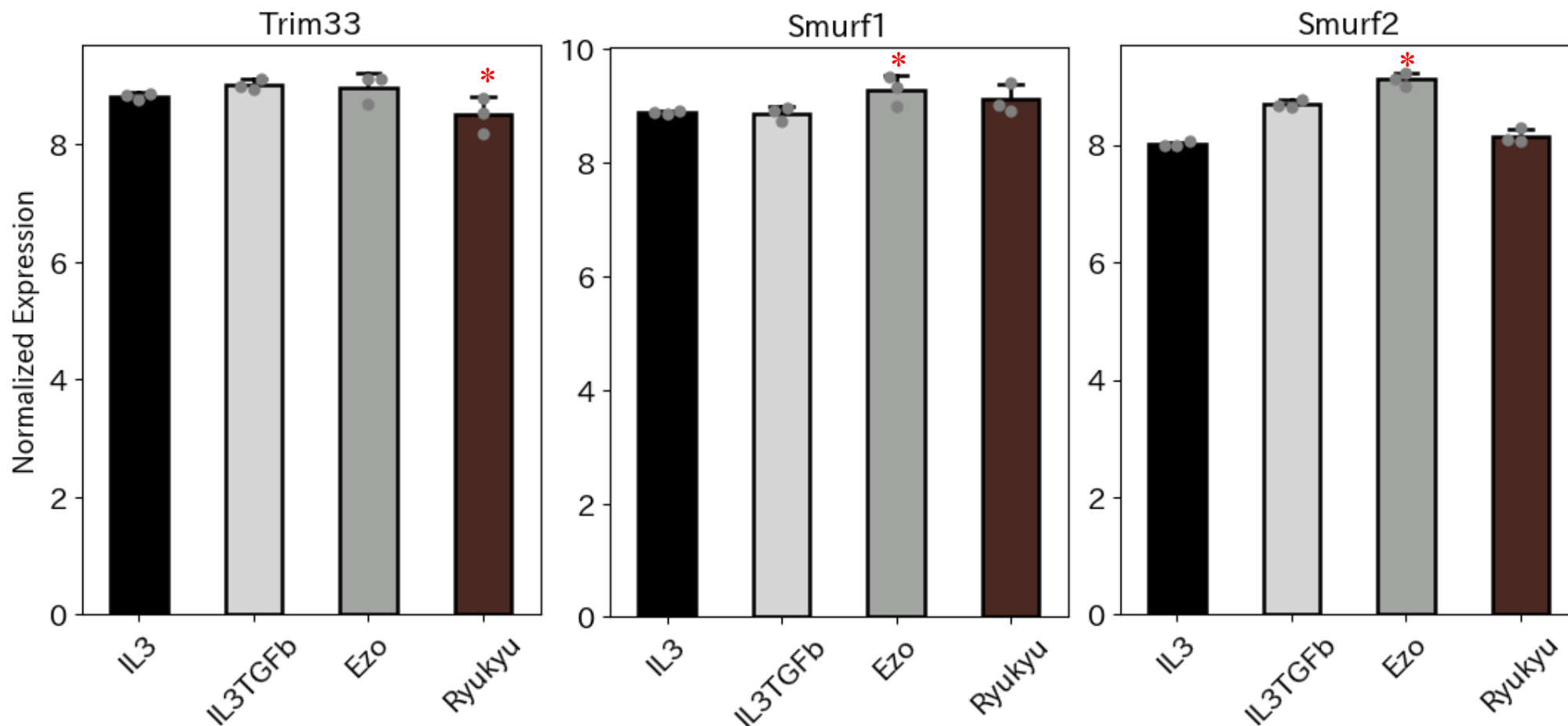
TGF- β シグナル伝達因子 Smad



結果 RNA-Seqによる発現量解析

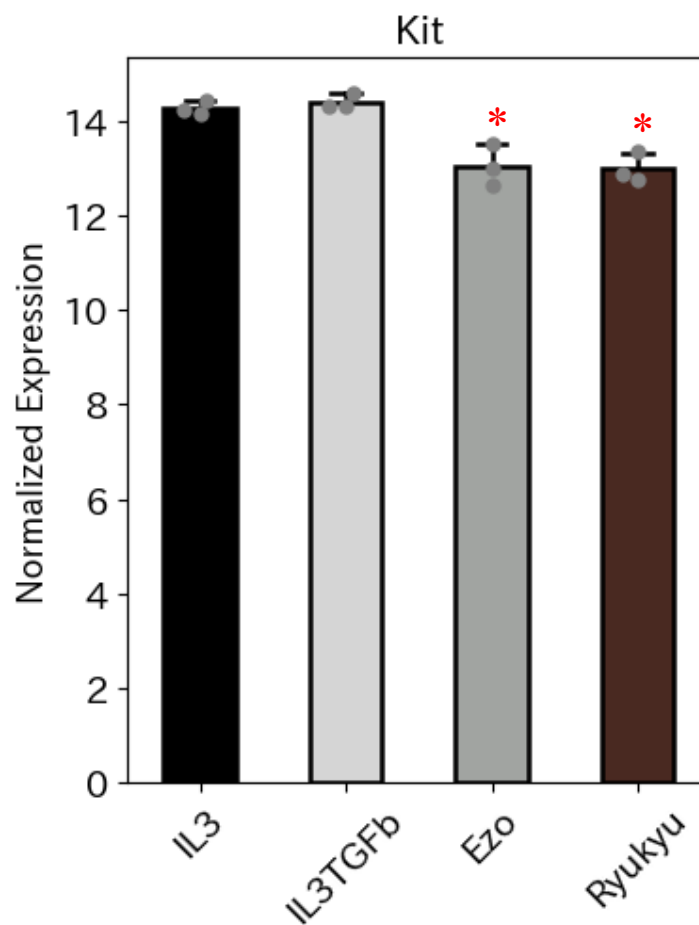
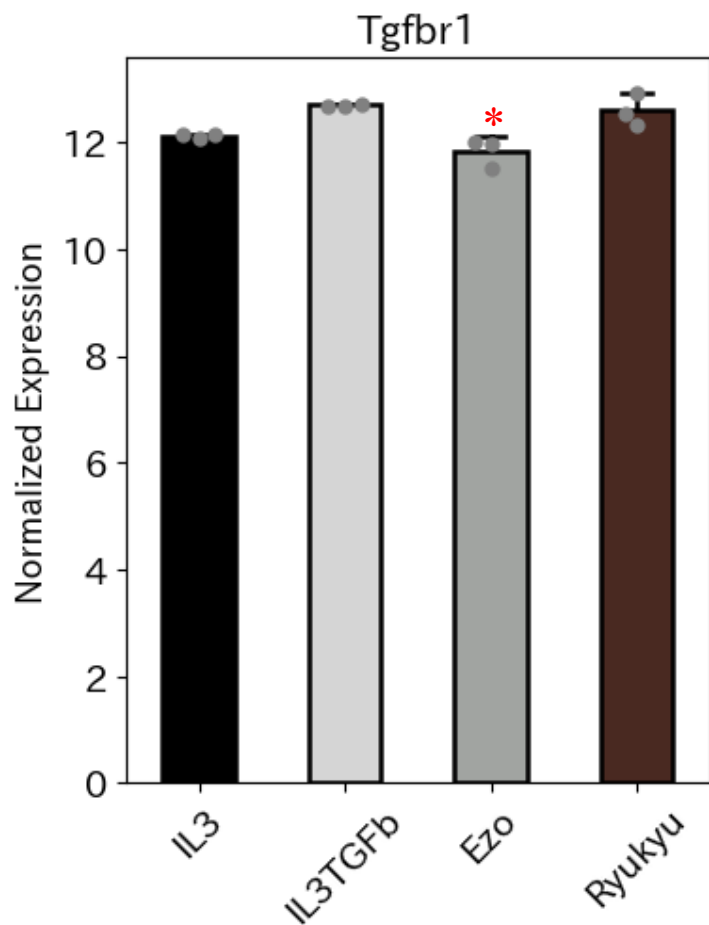
転写コリプレッサー TRIM 33 ユビキチンリガーゼ Smurf 1, Smurf 2

* $p < 0.05$ vs IL-3+TGF- β
Wald Test



結果 RNA-Seqによる発現量解析

TGF- β I型レセプター TGF- β RI 幹細胞因子 SCF レセプター c-kit



* $p < 0.05$ vs IL-3+TGF- β
Wald Test

結果 RNA-Seqによる発現量解析

MMC誘導系におけるマツ熱水抽出物添加群のMMC分化抑制

アカエゾマツ熱水抽出物添加群

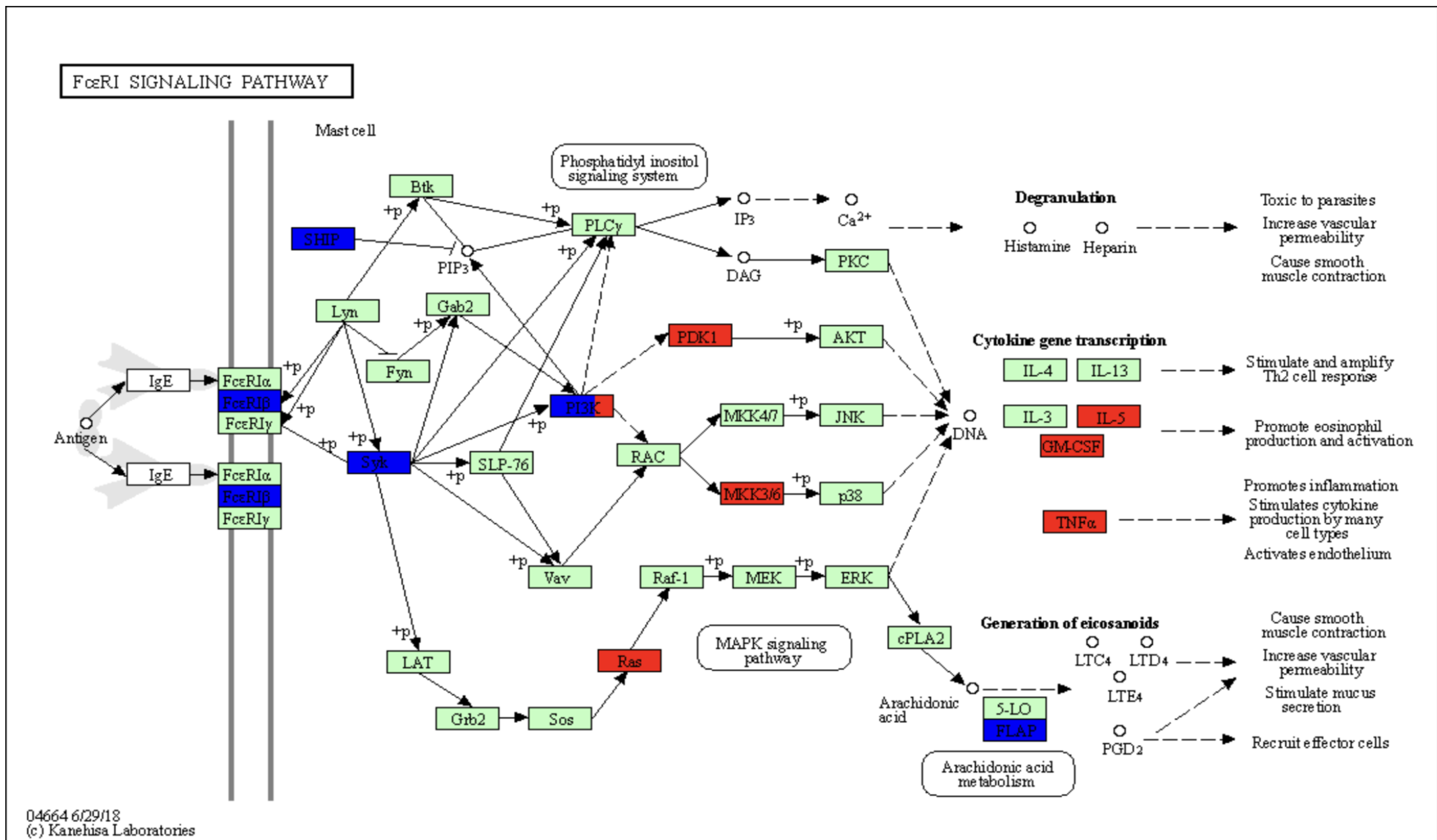
Smad 分解酵素 Smurf 1, Smurf 2	増加
TGF- β I型レセプター TGF- β RI	減少
SCFレセプター c-kit	減少

リュウキュウマツ熱水抽出物添加群

R-Smad (Smad 3)	増加
転写コリプレッサー TRIM 33	減少
SCFレセプター c-kit	減少

結果 RNA-Seqによる発現量解析

FcεRI Signaling Pathway

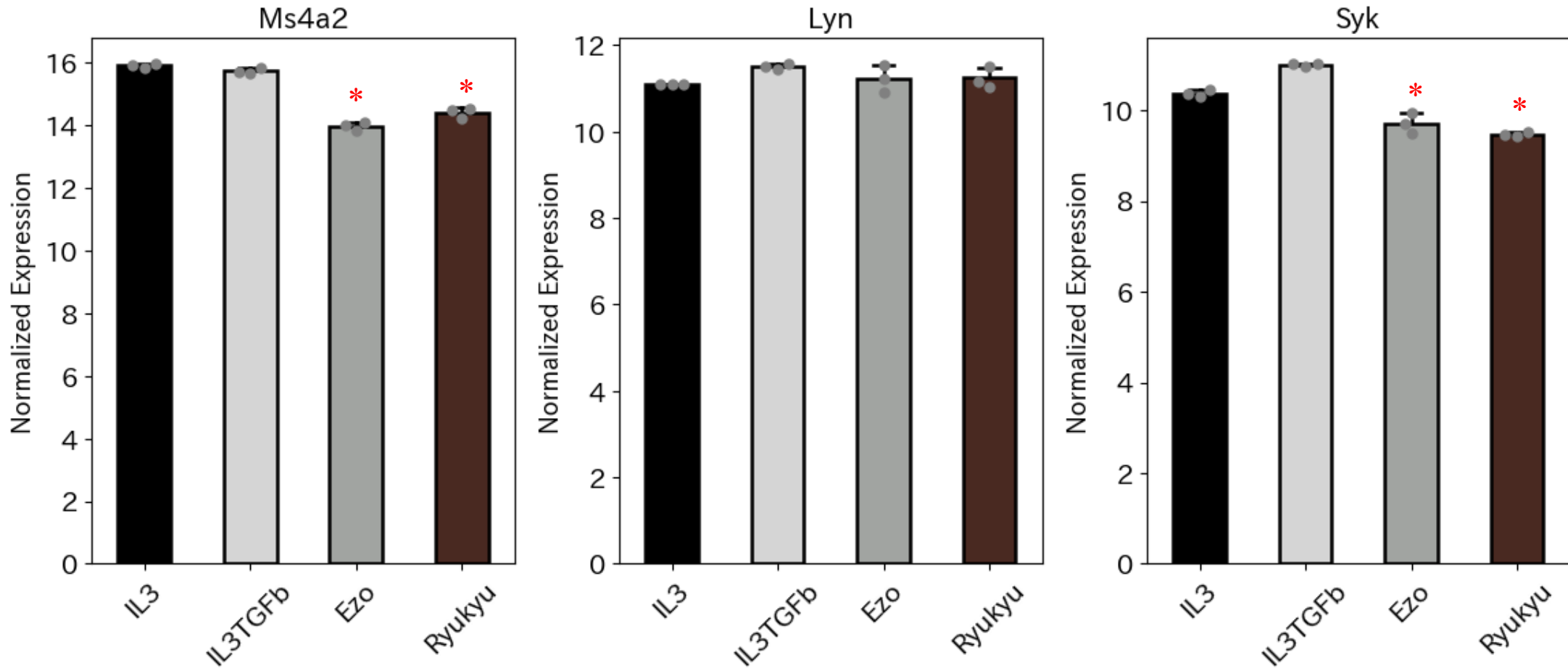


結果 RNA-Seqによる発現量解析 FcεRI Signaling Pathway

高親和性 IgE レセプター FcεRI

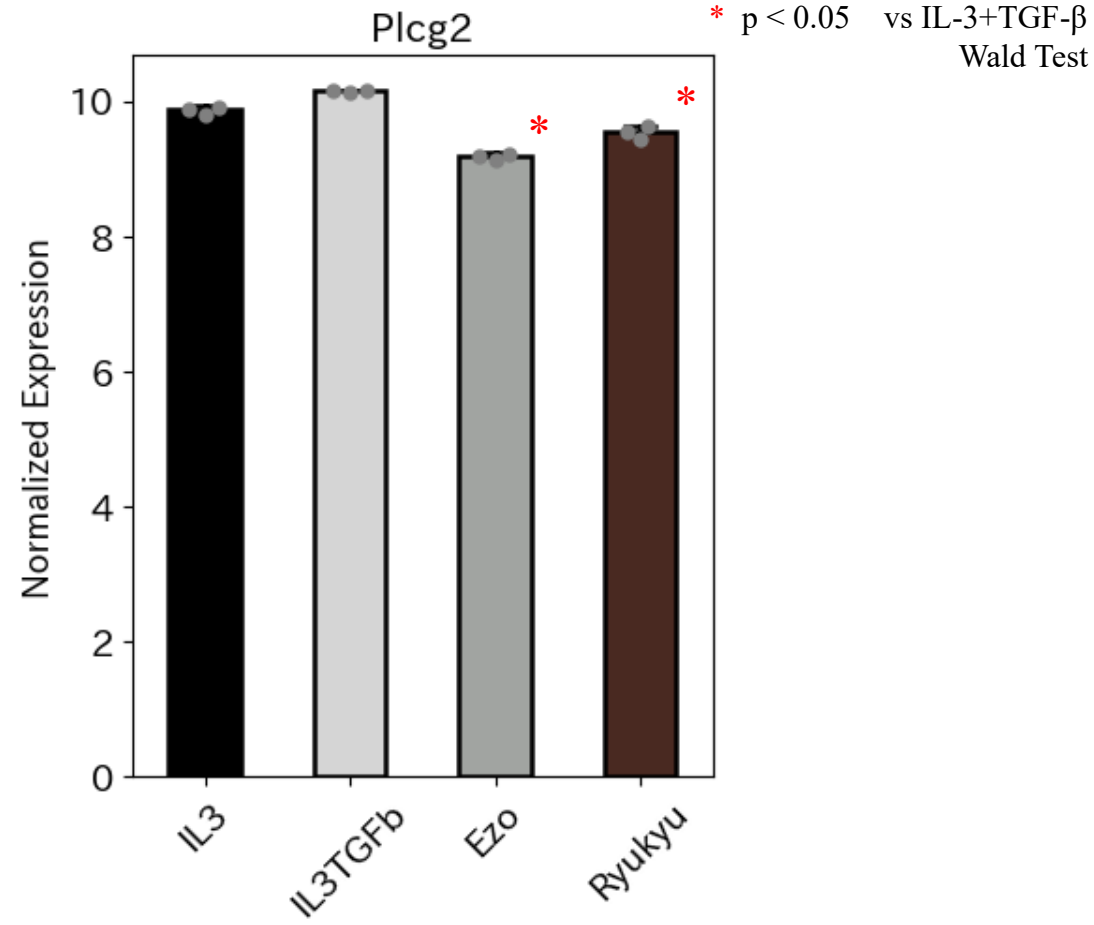
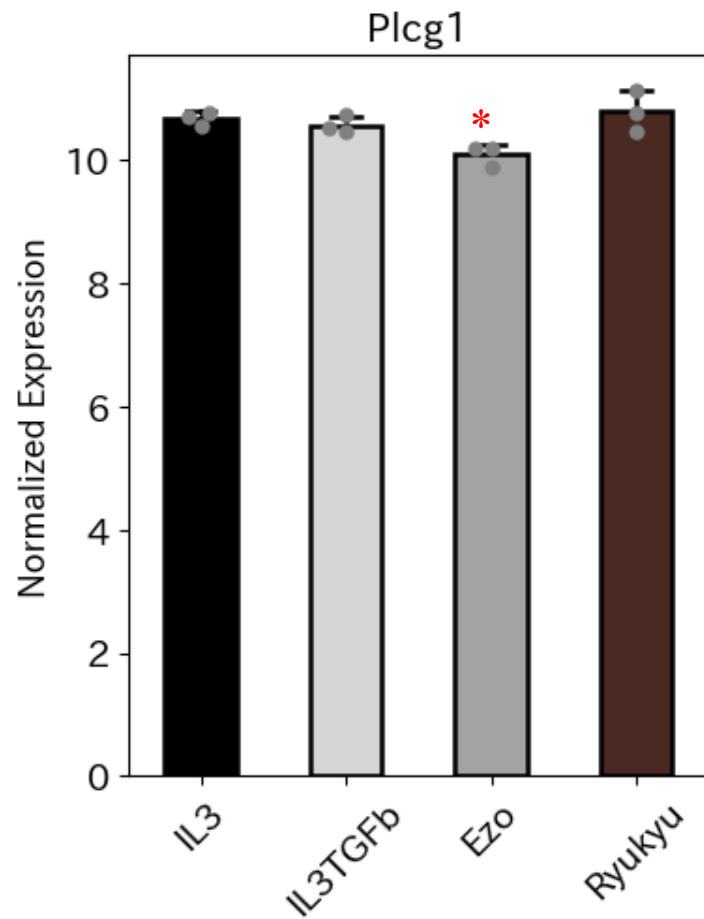
チロシンキナーゼ

* $p < 0.05$ vs IL-3+TGF- β
Wald Test



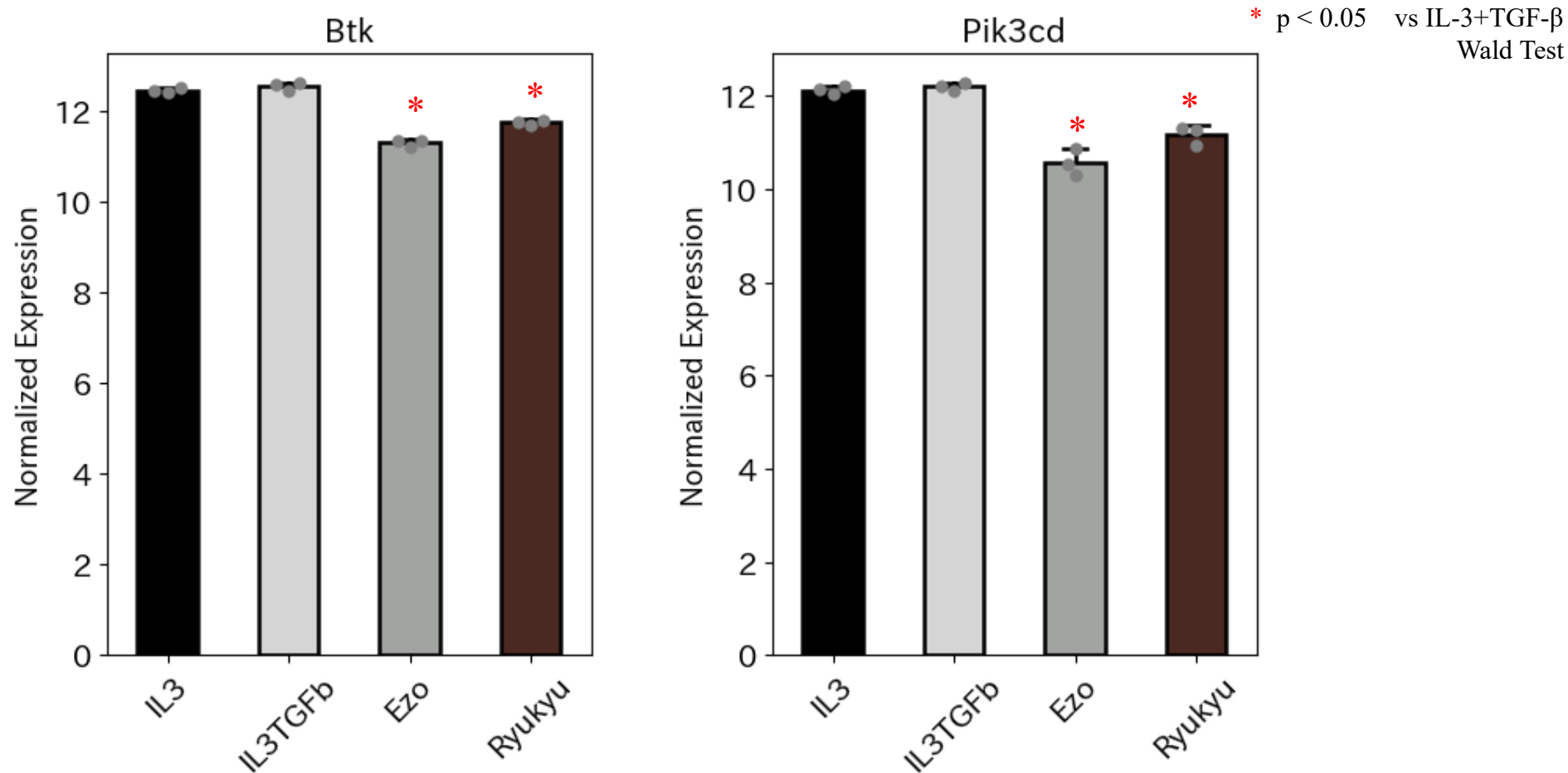
結果 RNA-Seqによる発現量解析 FcεRI Signaling Pathway

ホスホリパーゼ PLCγ



結果 RNA-Seqによる発現量解析 FcεRI Signaling Pathway

ホスホリパーゼ PLC γ の活性化に寄与する遺伝子 Btk, PI3K



結果 RNA-Seqによる発現量解析

MMC誘導系におけるマツ熱水抽出物添加群でのFcεRI シグナル伝達抑制

アカエゾマツ熱水抽出物添加群

高親和性 IgE レセプター-FcεRI	減少
チロシンキナーゼ Syk	減少
ホスホリパーゼ PLCγ (PLCγ1, PLCγ2)	減少

リュウキュウマツ熱水抽出物添加群

高親和性 IgE レセプター-FcεRI	減少
チロシンキナーゼ Syk	減少
ホスホリパーゼ PLCγ (PLCγ2)	減少

結論 MMC誘導系におけるマツ熱水抽出物添加群でのMMC分化抑制 アカエゾマツ及びリュウキュウマツ熱水抽出物の MMC分化抑制が示唆された

アカエゾマツ

TGF- β I型レセプター TGF- β RIの発現抑制によるR-Smadの不活性化

Smad 分解酵素 Smurf1, Smurf 2 の発現増加によるSmad の分解促進

SCFレセプター c-kitの発現減少による SCFの結合阻害

リュウキュウマツ

R-Smad (Smad 3)の発現減少によるシグナル伝達抑制

転写コリプレッサー TRIM 33の発現減少によるR-Smadの発現調節
阻害

SCFレセプター c-kitの発現減少による SCFの結合阻害

結論 MMC誘導系におけるマツ熱水抽出物添加群でのFcεRI シグナル伝達抑制

アカエゾマツ及びリュウキュウマツ熱水抽出物のマスト細胞活性化およびエフェクター物質産生の抑制が示唆された

・高親和性 IgE レセプターFcεRIの発現が抑制され、FcεRI シグナル伝達が阻害された。

・その結果、下流のチロシンキナーゼ Syk の発現が減少した。

・チロシンキナーゼ Syk の減少により、ホスホリパーゼ PLCγ の活性化が抑制され

セカンドメッセンジャー (IP3)の産生抑制

→ **マスト細胞のエフェクター物質の脱顆粒抑制**

実用化に向けた課題

有効成分の絞込み

- アカエゾマツおよびリュウキュウマツの成分解析を行い、抗アレルギー活性に関与する成分の絞込みを行い、発症予防に寄与する商品開発に繋げる

マスト細胞の脱顆粒抑制の検討

- ヒスタミン定量試験などを実施し、脱顆粒抑制の検討を定量的に行う

企業への期待

- 琉球松については、食経験があり、有効成分の绞り込みを行わずともクルードな状態でも商品化できると考えている。
- 製薬素材としての実用化の課題として糖や糖脂質などの単離・精製技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、未開な分野への参入として商品剤型として気化、粉末化の開発を得意とする企業への本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 粘膜型マスト細胞への分化抑制用組成物
- 出願番号 : 特願2024-141690
- 出願人 : 独立行政法人
国立高等専門学校機構
- 発明者 : 池松真也

産学連携の経歴

- 2007年-2023年 沖縄ハム総合食品会社と共同研究実施
- 2016年-2018年 アサヒグループホールディングス株式会社と共同研究実施
- 2016年-2022年 伊藤忠製糖株式会社と共同研究実施
- 2024年- 高専発ベンチャーiWellness設立

お問い合わせ先

独立行政法人国立高等専門学校機構
本部事務局 研究推進課

e-mail KRA-contact@kosen-k.go.jp