

# レチノイン酸合成酵素を指標とした 経口免疫寛容誘導機能を持つ食品成分の探索

東京理科大学 基礎工学部生物工学科  
八代 拓也

## 1. 研究の目的と背景

現在、国民の2人に1人は何らかのアレルギー症状を抱えていると言われており、社会問題となっている。中でも食物アレルギーは、幼少期の子供が発症する為、対応の難しさが指摘されている。対応策としては、アレルゲン食品の除去が一般的であるが、周囲の理解不足や本人の判断力の乏しさ故の事故が起こりやすく、重度のアナフィラキシーショックによる死亡例も報告されている。昨今、アレルゲン食品を少量ずつ食べ続けることで耐性獲得を目指す経口免疫寛容法に注目が集まっているが、寛容成立までに長期間を要するため患者の精神的および経済的負担が大きい。最近、腸管に存在する樹状細胞がRALDH2 (Retinaldehyde dehydrogenase 2) という酵素を発現しており、この働きでレチノイン酸を合成することが経口免疫寛容成立に重要であることが報告された<sup>1)</sup>。本研究では、RALDH2を発現亢進する食品成分を探索し、経口免疫寛容成立に対して補助的な機能を有するかについて明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の方法

### 試料

Kaempferolは東京化成工業より購入した。Tannic acidはSigma-Aldrichより購入した。その他の食品成分も東京化成工業及びSigma-Aldrich、和光純薬工業より購入した。

全ての食品成分は100 mMとなるようにDMSOに溶解した。

### 細胞培養

6～10週齢のBALB/cマウスから骨髄細胞を採取してGM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Peprotech) 存在下で8日間培養し、得られた細胞を骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell; BMDC) とした。

BMDCを $5 \times 10^6$  cells/wellで播種し、食品成分を終濃度50  $\mu$ Mとなるように添加してCO<sub>2</sub>インキュベーター内で48時間培養した。

### 定量的PCR

回収した細胞からReliaprep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いてtotal RNAを抽出し、ReverTra Ace

qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いてcDNAを合成した。cDNAを鋳型とし、下記のプライマーあるいはプローブを用いてTHUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO) にてPCR反応を行った。

Raldh2-F

5'-GACTTGTAGCAGCTGTCTTCACT-3'

Raldh2-R

5'-TCACCCATTTCTCTCCCATTTCC-3'

Ahr-F

5'-AATCCCACATCCGCATGATT-3'

Ahr-R

5'-TTTGCAAGAAGCCGGAAAAC-3'

$\beta$ -actin 4352341E (Thermo Fisher Scientific)

### レチノイン酸合成酵素活性測定

ALDEFLUOR (VERITAS) を用いて商品に添付の説明書に沿って行った。

### BMDCへのsiRNA導入

Ahr siRNA (MSS201158) とそのネガティブコントロールであるStealth RNAi siRNA Negative Control Med GCはThermo Fisher Scientificより購入した。

200 pmolのsiRNAをNucleofector Kits for Mouse Dendritic Cells (Lonza) を用いてBMDCに導入した。

## 3. 研究内容

BMDCの培養液中に52種類の食品成分を添加し、Raldh2発現を亢進する食品成分を探索した。また、その発現誘導メカニズムについての解析も行った。

## 4. 研究の実施経過

### 4-1. Raldh2の発現を亢進する食品成分の探索

BMDCの培養液中に52種類の食品成分を終濃度50  $\mu$ Mとなるように添加して48時間培養した後、Raldh2 mRNA量を測定した。発現の上昇率が上位の食品成分をTable 1に示すが、Tannic acidによって最も高く、次いでKaempferolによってRaldh2 mRNA量が増加することが明らかになった。興味深いことに、Kaempferolが属するフラボノール類やフラボン類に属する他のポリフェノール

でも Raldh2 mRNA 量の増加効果が見出された (Table 1, Fig. 1).

Tannic acid と Kaempferol の濃度依存性を解析したところ, Tannic acid では 10  $\mu$ M で, Kaempferol では 50  $\mu$ M において最も Raldh2 mRNA 量が増加することが示された (Fig. 2). さらに, 両者の時間依存性を解析し

た結果, 添加から 24 時間程度で Raldh2 mRNA 量が有意に上昇し始めることが明らかとなった (Fig. 3).

10  $\mu$ M Tannic acid および 50  $\mu$ M Kaempferol で処理した BMDC において Raldh の酵素活性を測定した. その結果, Tannic acid と Kaempferol の両方共, Raldh 活性を有することを示す緑色蛍光を発する細胞の割合が上昇することを確認した (Fig. 4).

	食品成分名	Raldh2 発現上昇倍率
1	Tannic acid	3.7708 $\pm$ 1.8528
2	Kaempferol	3.0435 $\pm$ 1.3333
3	Apigenin	2.2791 $\pm$ 1.0996
4	Luteolin	2.1993 $\pm$ 0.65926
5	Fisetin	2.1422 $\pm$ 0.65571
6	Galangin	2.0442 $\pm$ 0.34158
7	<i>trans</i> -Ferulic acid	1.9190 $\pm$ 0.37799
8	Limonin	1.8620 $\pm$ 0.55996
9	Caffeine	1.8154 $\pm$ 0.42796
10	Quercetin	1.7601 $\pm$ 1.0928

Table 1 Raldh2 の発現増加量の上位 10 種類の食品成分

Raldh2 mRNA 量を  $\beta$ -actin mRNA 量で補正し, DMSO 処理時の Raldh2 発現量を 1 とし,  $\pm$  標準偏差で表した.

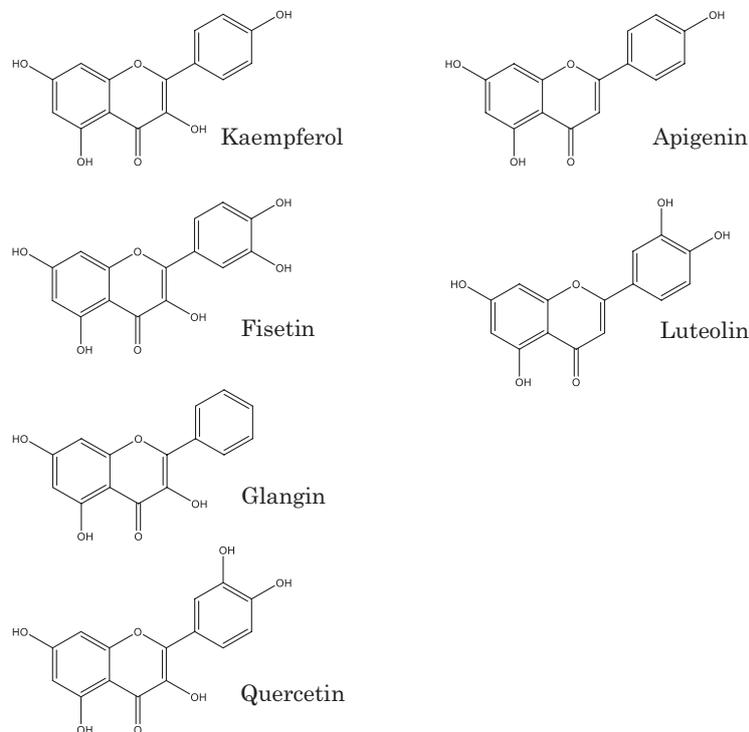


Fig. 1 フラボノール (左) とフラボン (右) の構造式

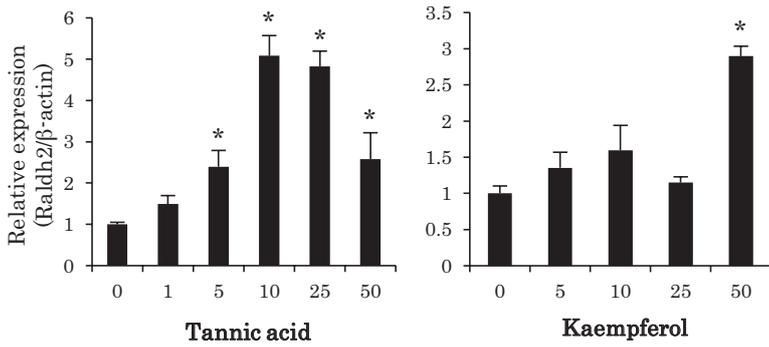


Fig. 2 Tannic acid (左) と Kaempferol (右) の濃度検討

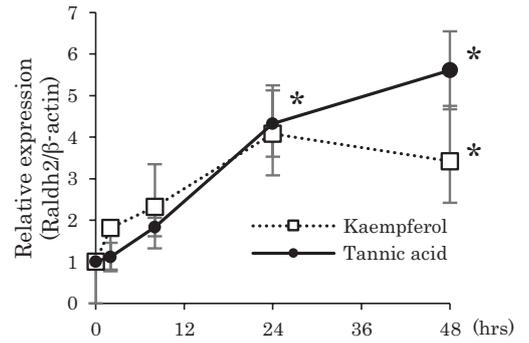


Fig. 3 処理時間検討

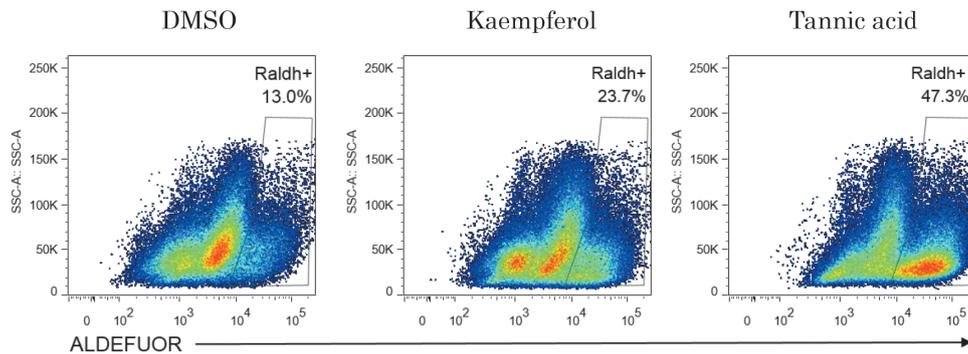


Fig. 4 Kaempferol および Tannic acid で処理した BMDC における Raldh 活性

#### 4-2. Kaempferol による Raldh2 発現亢進への Ahr の関与

上述の様に, Kaempferol と類似した構造をもつ化合物で軒並み Raldh2 mRNA 量の増加が確認されたことから, これらに共通する構造を認識する受容体が Raldh2 遺伝子の転写制御機構に関与するかについて解析することにした. いくつかのフラボノールは Ahr (Aryl hydrocarbon

receptor) のリガンドとなり得ることが報告されていることから<sup>2)</sup>, BMDC において Ahr に対する siRNA を導入した後に Kaempferol で処理して Raldh2 mRNA 量の変化を解析した. その結果, Ahr をノックダウンしただけで Raldh2 mRNA 量は増加し, そこに Kaempferol を加えても Raldh2 mRNA の増加は認められなかった (Fig. 5).

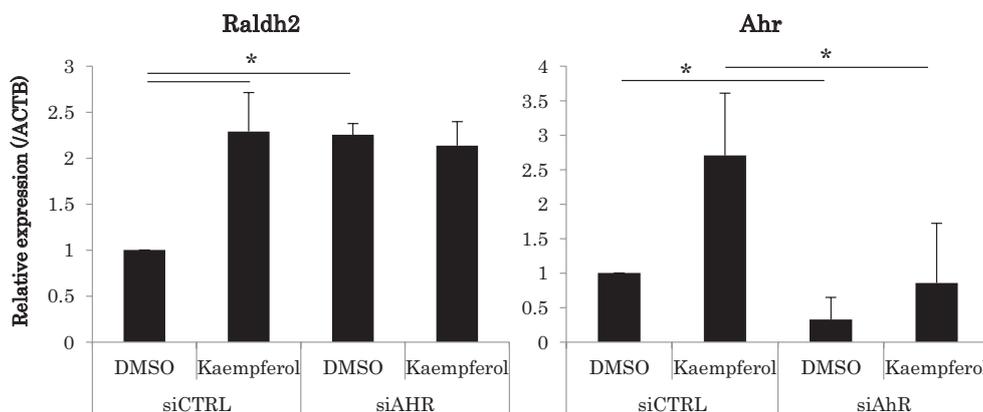


Fig. 5 Kaempferol による Raldh2 発現誘導への Ahr ノックダウンの影響

Raldh2 mRNA 量をβ-actin mRNA 量で補正し, siCTRL DMSO 処理時の Raldh2 発現量を 1 とし, ±標準偏差で表した.

## 5. 研究から得た結論・考察

BMDCを用いた *in vitro* の実験系において, Raldh2 mRNA 量を増加させる食品成分を複数見出した. 特に, ブドウに含まれる Tannic acid や玉ねぎなどに含まれる Kaempferol で最も効果が高く, これらは Raldh の活性も上昇させることを確認した.

Kaempferol が属するフラボノール類の他の化合物や, 構造が類似するフラボン類の一部の化合物でも Raldh2 mRNA 量の増加が確認されたことから, 構造活性相関が示唆された. Kaempferol をアンタゴニストとする Ahr をノックダウンすると, Raldh2 mRNA 量の増加が打ち消されることが明らかとなり, Kaempferol が Ahr による Raldh2 発現抑制を阻害する可能性が示された.

## 6. 残された問題, 今後の課題

BMDCを用いた結果から, Tannic acid や Kaempferol が Raldh2 発現を亢進する食品成分として同定された. これまでに, マウスに Tannic acid 及び Kaempferol を経口摂取させ, 腸管膜リンパ節に存在する CD103<sup>+</sup>DC における Raldh 活性の変化を解析する実験を行っているが (Data not shown), 活性の上昇を示す結果は得られていない. 今後, 投与方法や投与期間などを検討することで動物実験における有用性を示したい.

本研究を継続することで, 経口免疫寛容成立に対して補助的な機能を有する食品成分を発見することができれば, 寛容成立までに要する時間の短縮に繋がる可能性が高い. 食物アレルギーの患者が治療法として経口免疫寛容法を選択するハードルを下げる事が出来れば, 食物アレルギーにより命の危険に晒される子供の数は大きく減らすことができると思われる.

## 7. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり, 多大なるご支援を賜りました東洋食品研究所に深く御礼申し上げます.

## 8. 参考文献

- 1) Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**, 1757-1764, doi:10.1084/jem.20070590 (2007).
- 2) Ciolino, H. P., Daschner, P. J. & Yeh, G. C. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* **340** (Pt 3), 715-722 (1999).