

# ヒト肥満細胞に対する食品由来成分の影響

久留戸 涼子, 鈴木 亜美<sup>1)</sup>, 大浦 健<sup>2)</sup>

The Effects of Food-derived Components on Human Mast Cells

KURUTO Ryoko, SUZUKI Ami<sup>1)</sup>, OHURA Takeshi<sup>2)</sup>

2023年11月2日受理

## 抄 録

近年、花粉症の患者が増加し、「花粉症に効く」とされる食品も様々な研究されている。本研究では、花粉症のアレルギー症状への関与が大きいとされる肥満細胞に注目し、食品由来成分や植物性食品が細胞増殖や遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか調べることにした。ヒト肥満細胞 Mce27 において、カフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me では、濃度依存的に細胞増殖を抑制する傾向が認められ、100  $\mu$ M で比較すると、ケルセチンが最も増殖を抑制した。EGCG と EGCG3Me の比較では、EGCG の方がどの濃度においても増殖抑制効果が強い傾向にあった。また、パクチー、松葉、ブロッコリースプラウト、レッドキャベツスプラウト抽出物にも、増殖抑制効果が認められた。アレルギーと喘息に関与する遺伝子群の PCR アレイでは、いくつかの遺伝子で発現が上昇あるいは低下し、肥満細胞に遺伝子発現レベルで影響を与えたことが分かった。今回はカフェインで、一番多く発現レベルに変化が認められた。

キーワード：ヒト肥満細胞、カフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me

## 1. 研究の背景

近年、花粉症の患者は増加傾向にあり、社会問題化しており、その対策も様々な行われている。花粉症は、体内に入った花粉に対して人間の体が起こす抗原抗体反応であり、体内に侵入した花粉を異物と認識し、この異物（抗原）に対する抗体 IgE を作り、再度侵入した花粉を排除しようとする反応である。IgE 抗体が肥満細胞に結合し、抗原と反応すると、肥満細胞からヒスタミン、ロイコトリエンなどの様々な物質が産生される（1-3）。これらが細胞外に放出され、くしゃみ、目鼻のかゆみ、鼻水

<sup>1)</sup> 菊川市職員 <sup>2)</sup> 名城大学農学部

などのアレルギー症状を起こすことになる(1)。したがって、花粉症のアレルギー症状には、肥満細胞の関与が大きいと考えられている。

花粉症の患者の増加や重篤化の要因の一つには、環境汚染物質の関与も考えられており、その影響の一端を調べるため、これまで多環芳香族炭化水素(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)について、ヒト肥満細胞の増殖に及ぼす影響を調べてきた(4)。その中には、低濃度で細胞増殖を促進する物質もあった。

花粉症の対策としては、薬による治療、マスクや眼鏡による防御などがあげられるが、「花粉症に効く」と言われる食品もある。本研究では、どのような食品由来成分や植物性食品が花粉症の症状を抑えることに寄与するのかを、ヒト肥満細胞に注目して調べることにした。肥満細胞の増殖を抑制する作用が認められた場合には、アレルギーの原因となるヒスタミンなどの産生も減少する可能性が考えられた。そこで、これまでヒト乳がん細胞 MCF-7 及び MDA-MB-231 において、細胞増殖抑制効果が認められた食品成分や植物性食品も検討することにした(5, 6)。今回、食品由来成分として、カフェイン、ケルセチン、エピガロカテキンガレート(EGCG)、メチル化エピガロカテキンガレート(EGCG3Me)、植物性食品として、パクチー(*Coriandrum sativum*)、松葉、ブロッコリースプラウト(*Brassica oleracea* var. *italica*)、レッドキャベツスプラウト(*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)を用いて、肥満細胞の増殖能に及ぼす影響について調べることにした。また、遺伝子発現レベルにおいて、どのような影響を及ぼすのかも、PCR アレイにより網羅的に調べ、基礎データを得ることにした。

カフェインは、コーヒーなど様々な飲料に含まれ、一般に神経興奮作用があることで知られている(7)。ケルセチンは、様々な野菜に含まれ、抗酸化作用がよく知られている(8, 9)。EGCG は、抗がん、抗菌、抗酸化などの作用があるとされ、緑茶に含まれ、EGCG3Me は、花粉症の軽減に効果があるとされ、べにふうきに含まれる(10)。植物性食品のパクチーは、アジア料理によく使われ、その効果も注目されている(5)。松葉は、静岡市の世界文化遺産三保松原で、景観維持のために伐採され廃棄され、その有効活用が模索されている。松葉にはケルセチンが多く含まれるとされる(10)。また、アブラナ科野菜は、他の野菜よりも辛子油配糖体のグルコシノレートの含有量が多いという特徴があり、抗がん作用があることが報告されている(6, 11, 12)。特にブロッコリースプラウトには、がん予防の可能性のあるスルフォラファンのグルコシノレートが高濃度に含まれるとされる(12-14)。

## 2. 研究の目的

本研究では、花粉症のアレルギー症状への関与が大きいとされる肥満細胞を用いて、様々な食品由来成分、植物性食品が肥満細胞の細胞増殖や遺伝子発現においてどのような影響を及ぼすのか調べることにした。肥満細胞としては、ヒト肥満細胞 Mce27 を用いることとし、食品由来成分としては、カフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me、また植物性食品としては、パクチー、松葉、ブロッコリースプラウト、レッ

ドキャベツプラウト、環境汚染物質として、PAHsの1つであるベンズアントラセン (benz[a]anthracene, BaA) についても調べた。遺伝子発現については、アレルギーと喘息に関与する遺伝子群と抗がん剤耐性に関与する遺伝子群を標的としたPCRアレイを行い、遺伝子発現レベルの変化を網羅的に解析することにした。

### 3. 方法

#### 3-1. 植物性食品の抽出物の調製

食料品店で購入したパクチー、ブロッコリースプラウト、レッドキャベツプラウトを根から切り離し、計測し、滅菌水で洗い、水気を取った後、5gにつき、リン酸緩衝生理食塩水 PBS(-) 15 mL を加えて乳棒で粉砕した。3000回転で10分間、10000回転で5分間の遠心分離をして非溶解画分を除き、ろ過滅菌を行い原液とした(5, 6)。

松葉は、三保松原の松葉を採集し、粉砕、粉末とした。粉末1g当たり50mLのPBS(-)に溶解し、室温で3時間、時々攪拌した。3000回転で10分間遠心分離して、非溶解画分を除き、上清をろ過滅菌し、松葉原液とした(4, 10)。

#### 3-2. 細胞培養

ヒト肥満細胞 Mce27 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所より分与) を、10%牛血清 (ICN Biomedicals)、10  $\mu$ M MTG (Monothioglycerol Solution) (Wako) を含む Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco) で、5%CO<sub>2</sub>、37°C下で培養した (Fig. 1)。細胞は3~4日ごとに培地交換を行い、継代を繰り返して培養を続けた。

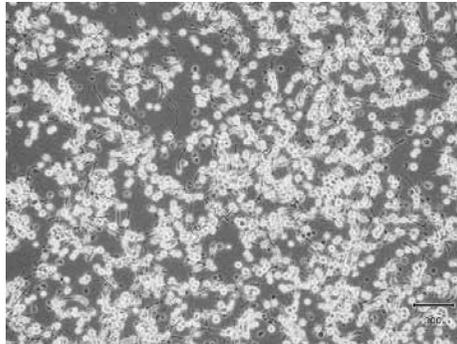


Fig. 1 Light microscopy showing human mast cell Mce27.

#### 3-3. 細胞増殖試験

① シャーレに張り付いている細胞をはがし、血球計算盤を使って細胞数を算出した。細胞数を算出後、細胞を  $5 \times 10^4$  個/mL となるように IMDM に懸濁し、96穴プレートに、 $5 \times 10^3$  個/well となるように 100  $\mu$ L ずつ播種した。

② 4時間後に、目的の濃度となるように検査試料を培地の1/10量の10  $\mu$ L ずつ加え、さらに3日間培養した。3-1.の抽出物は、調製した原液、これをPBS(-)で10倍希

積した希釈液等を、10  $\mu$ L ずつ加えた。Control には、試料の溶媒である dimethylsulfoxide (DMSO) を加えた。

③ 3 日後、細胞増殖試験用試薬である Cell Counting Kit-8 (Dojin) を各ウェルに加えミキシングし、2 時間呈色反応を行った (15, 16)。

④ マイクロプレートリーダー EL808 (BioTek) を用い、450 nm (参照波長 630 nm) の吸光度を測定した。

### 3-4. PCR アレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析

ヒト肥満細胞 Mce27 において、上記試料による遺伝子発現レベルの変化を RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (Qiagen) を用いて調べた。

① 3-3. の①と同様に細胞を IMDM に懸濁し、10 cm シャーレに、 $7.4 \times 10^5$  個/dish となるように播種した。

② 48 時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加えた。Control には、試料の溶媒である DMSO を加えた。

③ RNA の抽出：試料添加 24 時間後に、RNeasy Mini Kit 及び RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、RNA 抽出を行った。

④ cDNA への変換：RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) により、RNA を cDNA に変換した。

⑤ PCR Array：RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen) を用いて、④で作製した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR システム Mx3000P (ストラタジーン社) を使用して、real-time PCR を行った。今回は、アレルギーと喘息に関連する遺伝子群を標的にした Human Allergy and Asthma、及び、抗がん剤耐性に関連する遺伝子群を標的にした Human Cancer Drug Resistance の PCR アレイを用いて、網羅的に解析した。それにより、特異的な発現レベルの変化を示す遺伝子を探索した。

## 4. 結果

### 4-1. 細胞増殖試験

ヒト肥満細胞 Mce27 を用いて、食品由来成分としてカフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me、植物性食品としてパクチー、松葉、ブロッコリースプラウト、レッドキャベツプラウト、また、環境汚染物質の BaA について、細胞増殖試験を行い、代表的な結果を図に示した。

カフェインは、10  $\mu$ M ~ 5 mM の範囲で細胞増殖試験を行ったが、10 ~ 100  $\mu$ M では、細胞増殖をほとんど抑制しなかった (Fig. 2, 3, 6B - D)。一方、500  $\mu$ M 以上の高濃度では細胞増殖能が低下し、5 mM では細胞死が認められた (Fig. 3, 6E)。

ケルセチンは、0.1  $\mu$ M ~ 100  $\mu$ M の範囲で曝露したが、濃度依存的に細胞増殖を抑制した (Fig. 2, 6F - J)。50  $\mu$ M ~ 100  $\mu$ M では、顕著に抑制が認められ、細胞死も起こっていた (Fig. 6I, J)。

BaA は、 $10^{-8}$  M ~  $10^{-5}$  M の範囲で細胞増殖試験を行ったが、どの濃度においても、

増殖能に影響を与えなかった(Fig. 2, 6K)。このことは以前の報告と同様であった(4)。また、10  $\mu\text{M}$  及び 100  $\mu\text{M}$  のケルセチンと複合曝露させたが、加えたケルセチンの濃度が高濃度になるほど、細胞増殖を抑制し、BaA の濃度の影響は認められなかった(データ示さず)。

また、EGCG 及び EGCG3Me は、0.1  $\mu\text{M}$  ~ 100  $\mu\text{M}$  の範囲で細胞増殖試験を行った(Fig. 3, 4)。いずれも、0.1  $\mu\text{M}$  ~ 10  $\mu\text{M}$  の低濃度では、細胞増殖をほとんど抑制しなかった(Fig. 7B-D, G-I)。一方、50  $\mu\text{M}$  ~ 100  $\mu\text{M}$  で増殖抑制が認められた(Fig. 7E, F, J, K)。EGCG3Me は、花粉症に効くとされるべにふうきに含まれるが、今回用いた肥満細胞への増殖抑制効果は、EGCG の方がどの濃度においても強い傾向にあった。

パクチーは、本実験用に新たに抽出した C1、以前抽出し冷蔵保存していた C2、以前抽出し冷蔵保存した後に冷凍していた C3 について、細胞増殖試験を行った。いずれも 10 倍希釈では、ほとんど抑制効果が認められなかったが、C1、C2 の原液では細胞増殖を抑制した(Fig. 4, 8B, C)。C3 は、冷凍していた抽出液を解凍したが、成分に変化が起こり、原液での細胞増殖の抑制の程度が低くなった可能性が考えられた。

松葉も、10 倍希釈液では、ほとんど抑制効果が認められなかったが、原液では細胞増殖を抑制した(Fig. 4, 8D, E)。

ブロッコリースプラウト及びレッドキャベツスプラウトは、以前抽出し冷蔵保存していた BS1、BS2、RS1、RS2 について、細胞増殖試験を行った結果を示した(Fig. 5)。原液、2 倍、5 倍、10 倍希釈液を用いたが、いずれも濃度依存的に細胞増殖を抑制し、原液では細胞死が認められた(Fig. 5, 8F-N)。なお、ブロッコリースプラウトでは、冷蔵保存していた抽出物についても行ったが、細胞増殖抑制効果が低下していた(データ示さず)。

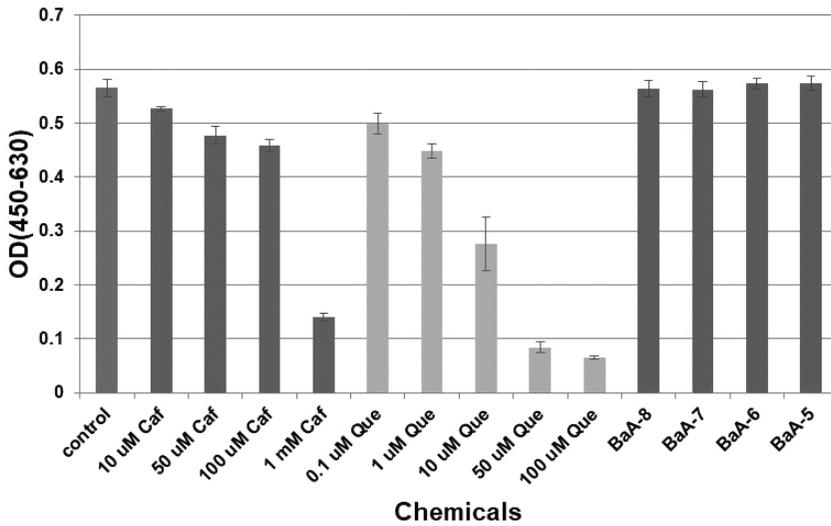


Fig. 2 Effects of caffeine, quercetin, and BaA on the growth of Mce27 cells. Caf: caffeine, Que: quercetin, BaA-8, -7, -6, -5:  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M BaA.

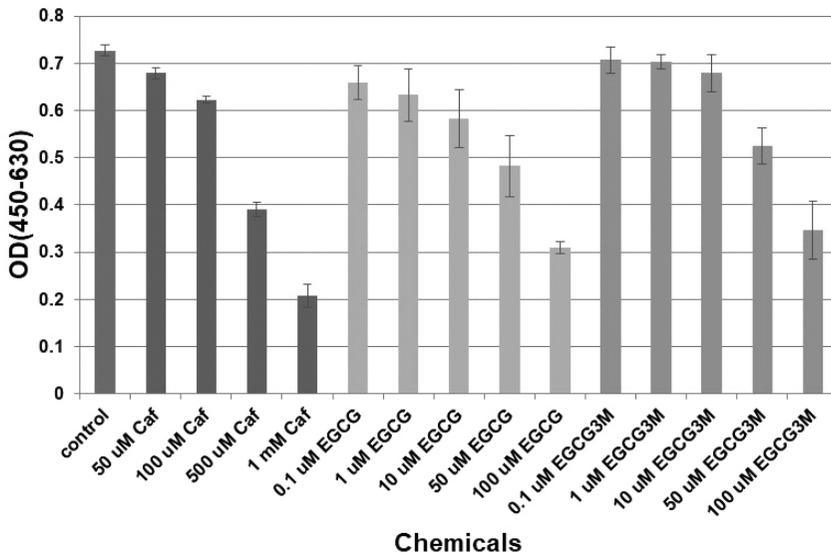


Fig. 3 Effects of caffeine, EGCG, and EGCG3Me on the growth of Mce27 cells. Caf: caffeine, EGCG3M: EGCG3Me.

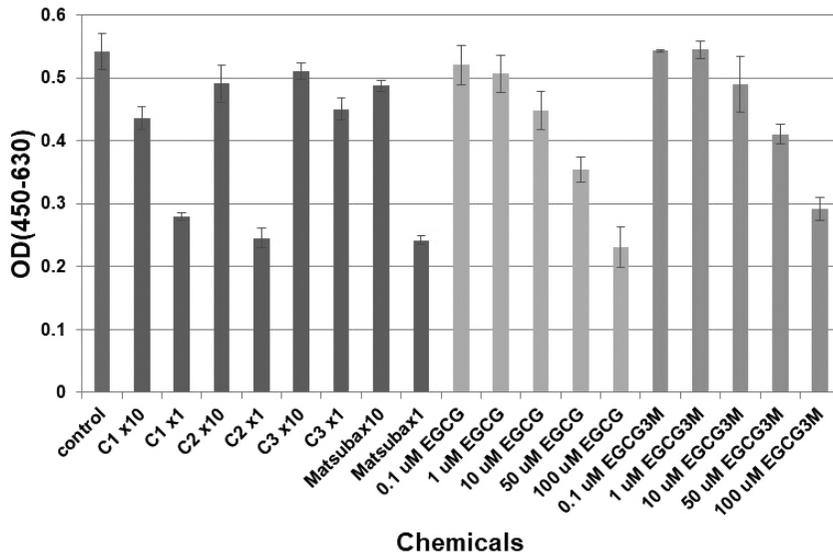


Fig. 4 Effects of *C. sativum* and Matsuba extracts, EGCG, and EGCG3Me on the growth of Mce27 cells.  
C1 – C3: *C. sativum* extracts, x10: 10-fold dilution, x1: undiluted, EGCG3M: EGCG3Me.

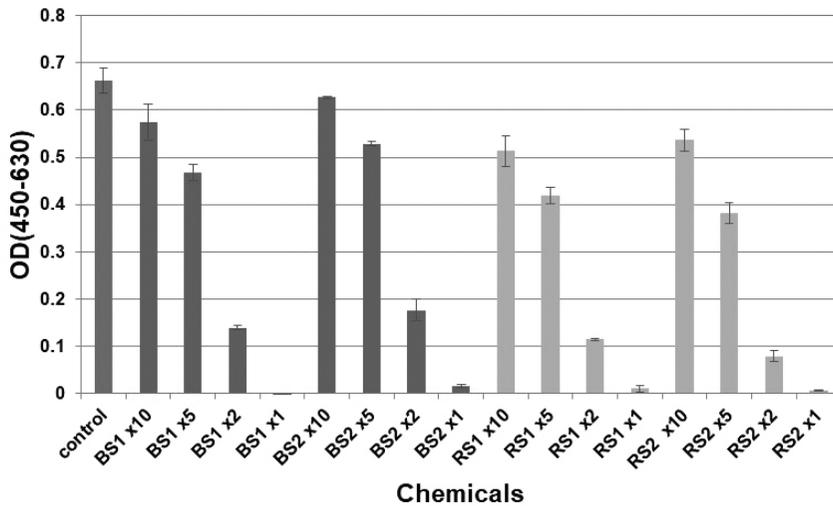


Fig. 5 Effects of broccoli sprout and red cabbage sprout extracts on the growth of Mce27 cells.  
BS1, 2: broccoli sprout extracts, RS1, 2: red cabbage sprout extracts, x10, 5, 2: 10-, 5-, 2-fold dilution, x1: undiluted.

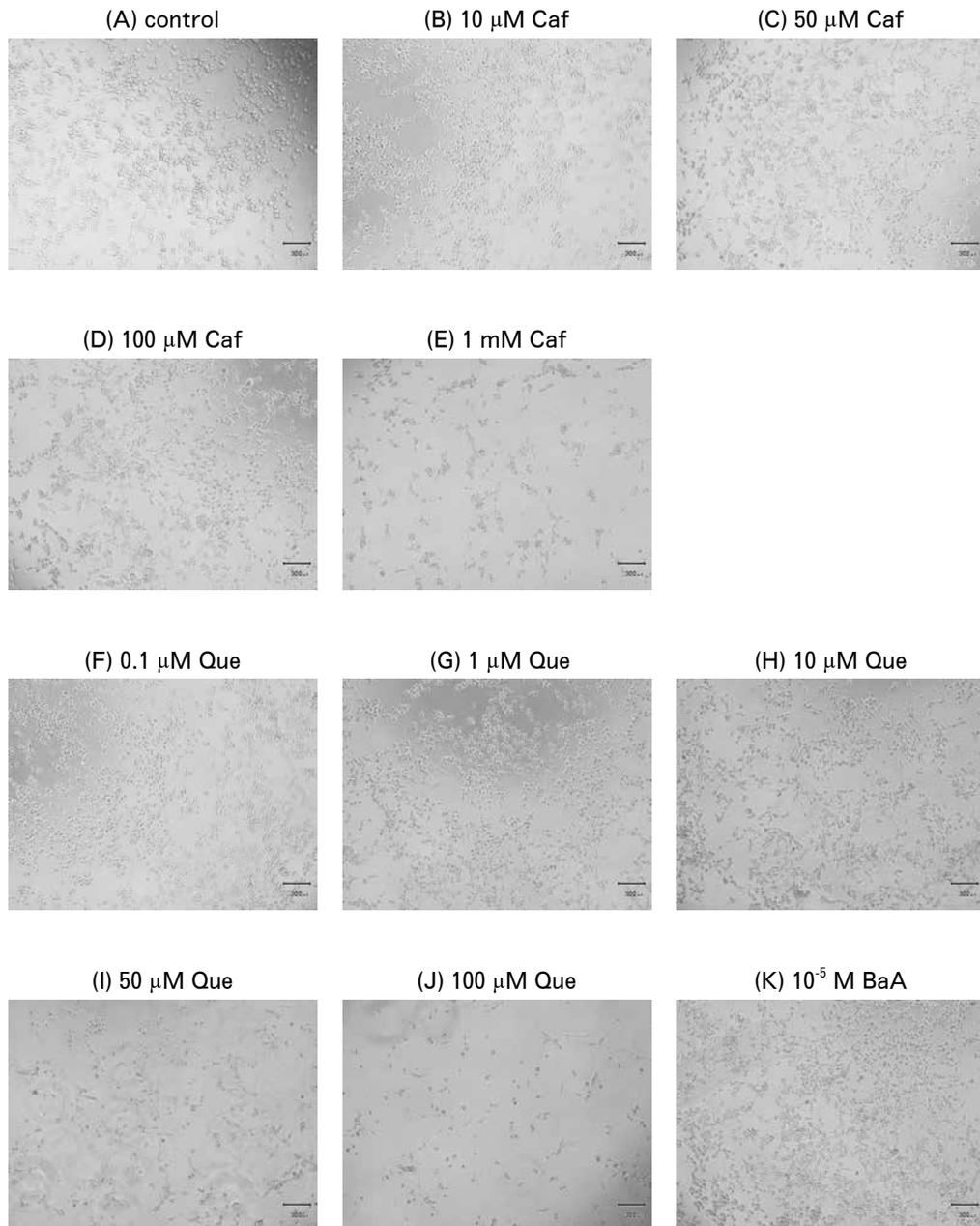


Fig. 6 Representative images showing Mce27 cells after 3 day exposure to the indicated amounts of caffeine, quercetin, and BaA. Caf: caffeine, Que: quercetin.

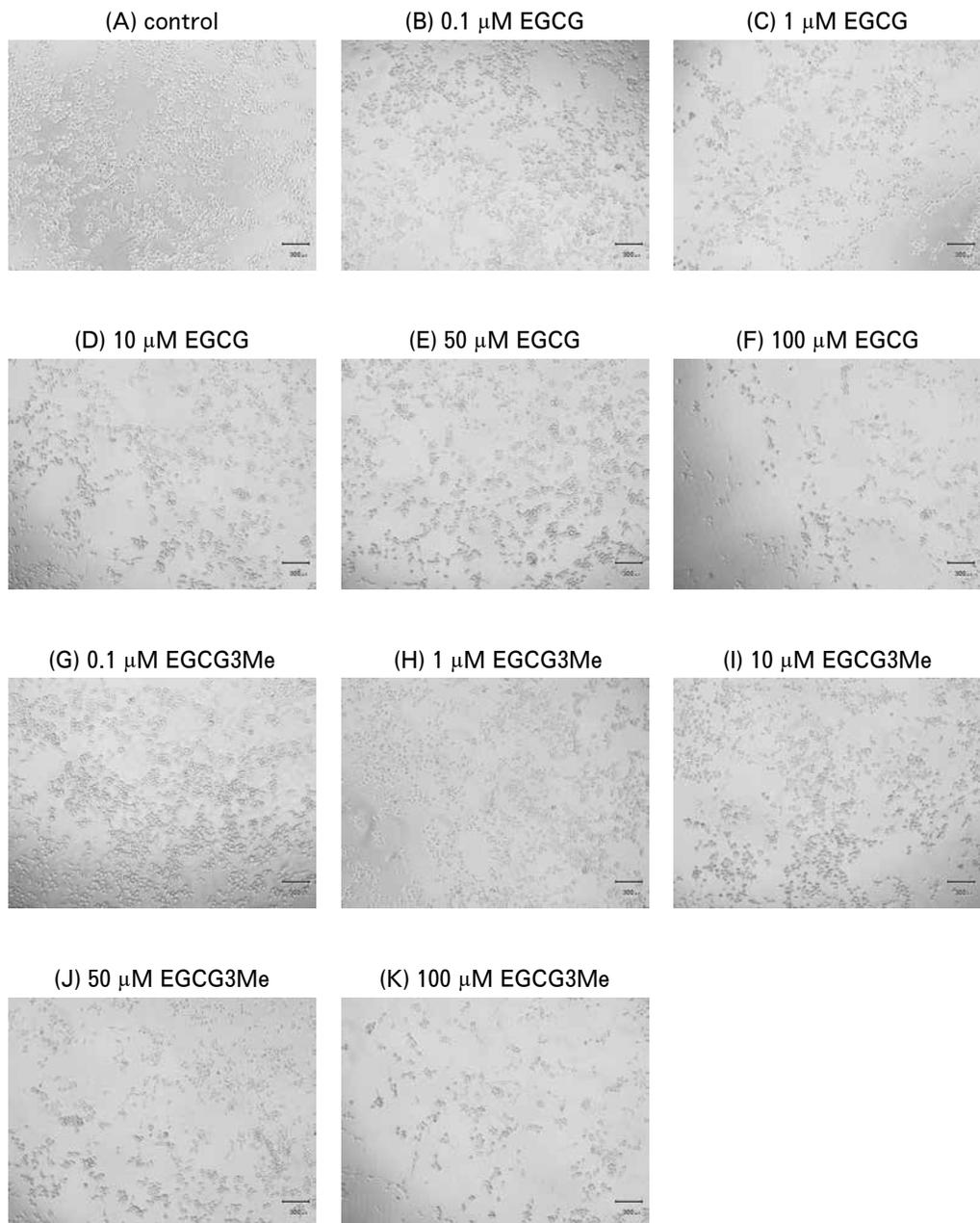


Fig. 7 Representative images showing Mce27 cells after 3 day exposure to the indicated amounts of EGCG and EGCG3Me.

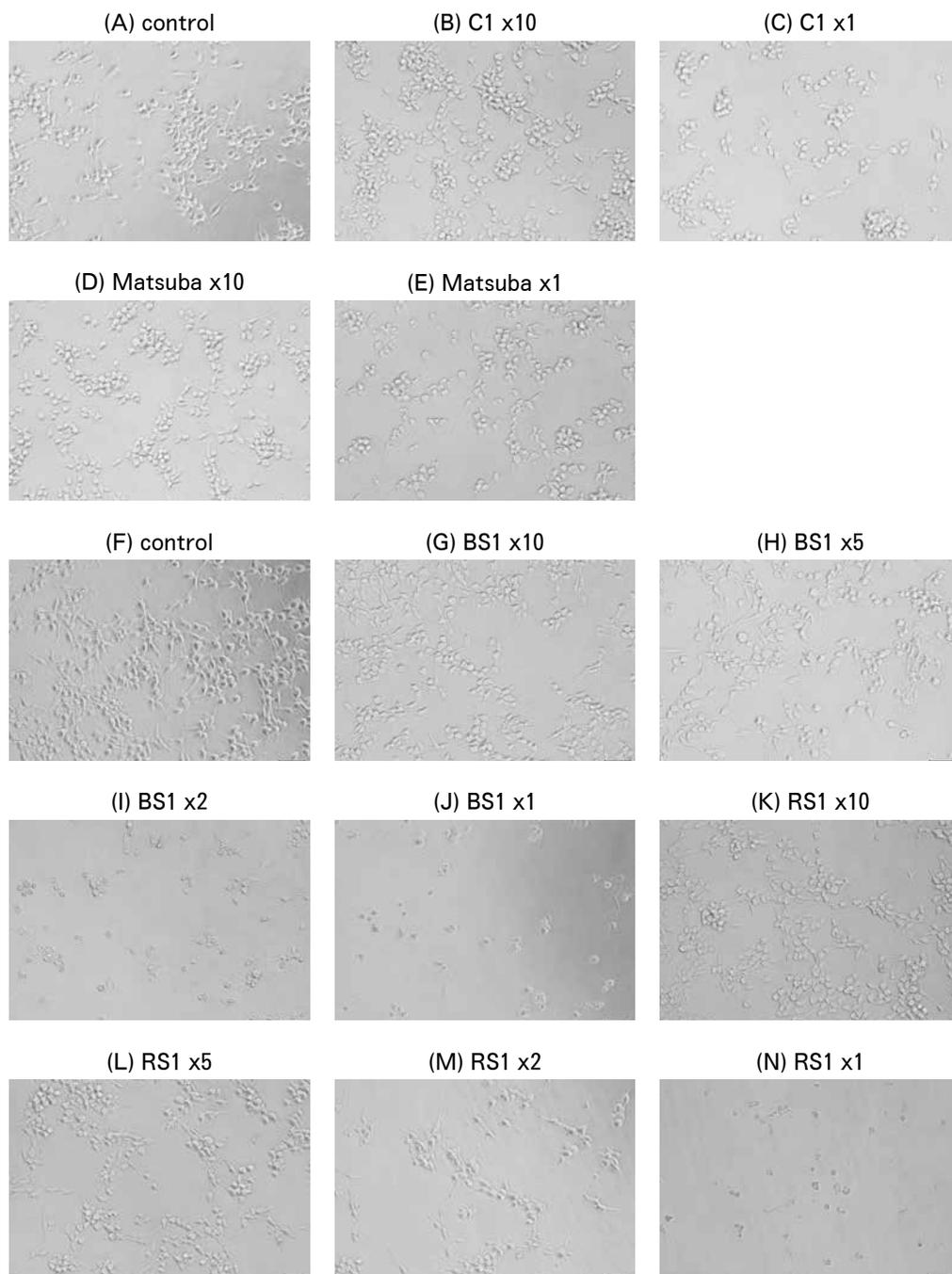


Fig. 8 Representative images showing Mcc27 cells after 3 day exposure to the indicated amounts of *C. sativum*, Matsuba, broccoli sprout, and red cabbage sprout extracts. C1: *C. sativum* extracts, BS1: broccoli sprout extracts, RS1: red cabbage sprout extracts, x10, 5, 2: 10<sup>-5</sup>, 5<sup>-2</sup>, 2-fold dilution, x1: undiluted.

#### 4-2. PCR アレイによる遺伝子発現レベルの網羅的解析

遺伝子発現解析では、4-1. の細胞増殖試験の結果を踏まえて、カフェイン、ケルセチン、BaA、EGCG、EGCG3Me、パクチー、松葉について、細胞増殖が著しく低下し、細胞からの RNA 抽出が困難とならないような濃度を設定した。1 mM カフェイン、10  $\mu$ M ケルセチン、10<sup>-5</sup> M BaA、100  $\mu$ M EGCG、100  $\mu$ M EGCG3Me、パクチーと松葉はいずれも原液を培地の 1/10 量加えることとした。

PCR アレイとして、Human Allergy and Asthma のアレルギーと喘息に関与する遺伝子群(Th2 サイトカイン及び関連遺伝子、サイトカイン & ケモカイン受容体、転写因子、肥満細胞 & IgE、好酸球、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ、喘息)と Human Cancer Drug Resistance の抗がん剤耐性に関与する遺伝子群(薬剤耐性、薬物代謝、DNA 損傷と修復、細胞周期、成長因子受容体、ホルモン受容体、転写因子)を用いた際に、発現レベルに変化の見られた遺伝子の一覧を Table 1 に示した。Control に対しての Fold Change を数値化し、発現レベルが 2 倍以上と高かった遺伝子の数値を赤字で、0.5 倍以下と低かった遺伝子の数値を青字で示した。Fold Change については、一部 Ct 値が 30 以上 (Copy 数が少ない) の低い発現レベル同士で比較した場合も含めた。

アレルギーと喘息に関与する遺伝子群では、カフェインで曝露した場合に、発現レベルに変化のあった遺伝子が一番多かった。IL-3、IL-3RA、IL-4、IL-5RA、IL-9、IL-10 など、サイトカインのインターロイキン、インターロイキン受容体、CPA3、CSF2、EPX をはじめとした遺伝子で発現が高まり、CCR3、CCR4 のケモカイン受容体で、発現が低下した。CCR3 は、EGCG3Me、松葉でも低下した。ケルセチンでは、カフェインでは上昇しなかった CCL26、MRC-1、MS4A2、PDCD1、RNASE3 などで発現が高まった。また、KITLG の発現量が低下したが、EGCG3Me、松葉でも低下していた。一方、BaA では、KITLG や IL-12A、IL-12B、MS4A2 の発現が高まっていた。パクチーでも、IL-12A、IL-12B の発現が高まっていた。EGCG と EGCG3Me では、IL-10、IL-12B、MRC1、PDCD1 が共通して発現が高まっていた。この前者 3 遺伝子は、松葉でも発現が高まっていた。パクチーでは、発現上昇が認められた 11 遺伝子のうち 8 遺伝子が、ケルセチンと共通していた。

抗がん剤耐性に関与する遺伝子群では、ほとんどの遺伝子で発現レベルに変化が認められなかった。カフェインでは、CDKN1A、CYP1A1、RXRA で、発現レベルの低下が認められた。CYP1A1 は、ケルセチンでも低下したが、BaA では高まった。また、CCND1 はケルセチンで上昇した。EGCG3Me、松葉、パクチーでは、変動が認められた遺伝子はなかった。EGCG については、今回は行わなかった。

Table 1 A partial list of genes in PCR arrays.

## Human Allergy and Asthma PCR array

Gene	Description	Caf	Que	BaA	EGCG	EGCG3M	Coriander	Matsuba
		Fold Change						
ADAM33	ADAM metallopeptidase domain 33	1.11	3.50	2.19	1.17	1.75	4.43	1.05
ADRB2	Adrenergic, beta-2-, receptor, surface	0.85	0.85	0.94	0.35	0.59	0.77	0.98
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	0.79	0.85	1.52	0.69	0.91	2.17	1.52
CCL26	Chemokine (C-C motif) ligand 26	1.22	4.68	1.72	1.44	1.29	3.40	0.24
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2.50	0.74	0.80	1.17	1.25	0.78	1.34
CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	0.20	1.35	1.47	0.74	0.28	0.85	0.50
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	0.30	0.61	1.26	4.83	1.27	0.92	0.85
CPA3	Carboxypeptidase A3 (mast cell)	3.87	2.08	0.83	0.55	0.66	1.03	1.12
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	2.06	1.03	0.37	2.13	0.65	1.05	1.11
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0.88	1.88	1.77	0.87	0.44	1.11	1.15
EPX	Eosinophil peroxidase	2.57	1.40	1.16	1.73	0.90	0.91	0.98
IL10	Interleukin 10	4.09	4.31	0.97	2.89	2.94	3.83	3.04
IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	1.17	0.92	2.08	1.28	0.87	2.34	1.80
IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	0.93	7.66	2.59	2.24	2.90	4.61	2.17
IL13	Interleukin 13	1.13	3.36	1.66	2.61	1.88	2.34	1.39
IL3	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	2.54	1.29	1.08	0.82	1.09	1.14	1.12
IL3RA	Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	2.38	1.06	1.10	1.44	0.98	1.13	1.18
IL4	Interleukin 4	2.03	1.16	1.58	1.31	1.06	1.22	1.08
IL5RA	Interleukin 5 receptor, alpha	2.09	1.50	0.81	0.72	0.79	0.79	0.78
IL9	Interleukin 9	2.83	1.03	1.15	1.11	0.96	1.25	1.28
KITLG	KIT ligand	0.98	0.33	2.19	0.66	0.29	0.52	0.46
MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	0.74	1.36	1.21	1.39	0.98	2.40	1.63
MMP9	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	2.28	1.07	1.00	1.23	1.00	0.81	0.84
MRC1	Mannose receptor, C type 1	1.62	5.85	0.86	2.50	3.20	5.05	2.04
MS4A2	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)	0.73	2.71	3.00	1.48	1.26	1.98	1.02
PDCD1	Programmed cell death 1	1.63	5.61	1.45	2.59	2.22	2.94	1.47
RNASE3	Ribonuclease, RNase A family, 3	1.52	3.60	2.21	1.52	1.22	2.51	1.03
SIGLEC8	Sialic acid binding Ig-like lectin 8	1.87	1.29	1.02	0.45	0.55	1.24	1.15
TNFRSF4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	2.62	1.84	1.00	2.13	1.44	1.72	1.93

## Human Cancer Drug Resistance PCR array

Gene	Description	Caf	Que	BaA	EGCG	EGCG3M	Coriander	Matsuba
		Fold Change						
CCND1	Cyclin D1	0.99	2.03	0.82	—	0.80	0.89	1.05
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	0.44	0.59	1.42	—	1.18	1.42	1.12
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfam	0.32	0.44	3.79	—	0.95	1.76	1.30
RXRA	Retinoid X receptor, alpha	0.47	1.53	0.90	—	0.87	0.96	0.64

The levels of up- and down-regulation are shown in red and blue, respectively.

## 5. 考察

Mce27 細胞における細胞増殖試験では、カフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me、パクチー、松葉、ブロッコリースプラウト、レッドキャベツスプラウトには、濃度依存的に細胞増殖を抑制する傾向が認められた。カフェイン、ケルセチン、EGCG、EGCG3Me では、同濃度の 100  $\mu$ M で比較すると、ケルセチンが最も細胞増殖を抑制することが分かった。また、EGCG と EGCG3Me を比較すると、EGCGの方がどの濃度においても細胞増殖抑制効果が強い傾向にあった。また、BaA は、細胞増殖にほとんど影響を与えなかった。

また、パクチーにおいては、抽出後、冷蔵保存された後に冷凍された抽出物は、冷蔵保存されていたものと比較し、細胞増殖を抑制しなかった。これは、冷凍することにより、パクチー内の成分に変化が起り、抑制効果が低下した可能性が考えられた。一方、ブロッコリースプラウトとレッドキャベツスプラウトは、冷蔵保存されていた抽出物を用いたが、細胞増殖抑制効果を呈していた。ブロッコリースプラウトでは、冷蔵保存していた抽出物についても行ったが、細胞増殖抑制効果が低下した。これは、冷蔵保存の段階で、ブロッコリースプラウト抽出物の成分に変化が起り、細胞増殖抑制効果が低下した可能性が考えられた。試料の保存方法によって、抑制効果に関与する成分に影響が出たことが考えられた。

肥満細胞の増殖を抑制する効果は、細胞数が減少することでヒスタミン放出量等が減る可能性が考えられ、花粉症の症状の改善に寄与することも考えられた。実際に、肥満細胞のヒスタミン放出量に影響を与えるのかどうかなども調べていく必要があると考えられた。

アレルギーと喘息に関与する遺伝子群の PCR アレイでは、いくつかの遺伝子で発現が上昇あるいは低下し、肥満細胞に遺伝子発現レベルで影響を及ぼすことが分かった。今回はカフェインで、一番多く発現レベルに変化が認められ、インターロイキン、インターロイキン受容体をはじめとした遺伝子で発現が高まっていた。また、カフェイン、EGCG3Me、松葉でケモカイン受容体の発現が低下していた。カフェインとケルセチンでは、カルボキシペプチダーゼ A3 の発現が高まっていた。これらの遺伝子発現の変化が、肥満細胞にどのような影響を及ぼすのか、そして、アレルギー反応にどのように影響するのかは、今後さらに調べていく必要があると考えられた。

今回用いた食品由来成分については、肥満細胞に及ぼす影響についての様々な報告があった。

カフェインは、ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン分泌を阻害し、ラットのアナフィラキシーショックのアレルギー反応を抑制する効果があることが報告された (17, 18)。また、カフェインは、ラット腹腔肥満細胞の脱顆粒において、用量依存的に脱顆粒細胞数を減少させ、カテキンとの相乗効果も認められた (19)。最近、マウスの喘息モデルにおいては、カフェインを噴霧すると、気道過敏性を緩和するという報告もあった (20)。一方、ヒトのルームランナーでの試験において、カフェインを補給すると、運動に反応して、IL-6 及び IL-10 の血漿レベルが上昇したという報告があっ

たが、そのメカニズムについてはまだ未解明とのことだった (21)。本研究で、カフェインにより、IL-3、IL-3RA、IL-4、IL-5RA、IL-9、IL-10 など、インターロイキン、インターロイキン受容体をはじめとした遺伝子の発現が高まったことと関係する可能性が考えられた。

ケルセチンは、免疫系の刺激、抗ウイルス活性、ヒスタミン放出の阻害、炎症誘発性サイトカインの減少、IL-4 産生の抑制といった抗アレルギー作用や抗炎症作用を示すことが報告された (22)。ケルセチンは、ヒト肥満細胞 HMC-1 において、トリプターゼと IL-6 の放出、ヒスチジンデカルボキシラーゼ mRNA の転写を劇的に阻害することが明らかにされた (23)。また、抗アレルギー薬であるクロモリンよりも、ヒト肥満細胞のサイトカイン放出を阻止するのに効果的だという報告もあった (24)。今回用いた Mce27 細胞での PCR アレイでは、インターロイキン、インターロイキン受容体の遺伝子群で、10  $\mu$ M のケルセチン曝露では転写阻害は認められなかった。また、ケルセチンは、AhR の天然のリガンドで、アゴニスト活性やアンタゴニスト活性があるという報告があり、MCF-7 細胞、Caco-2 細胞、HepG2 細胞においては、ケルセチンにより、CYP1A1 の発現が上昇したと報告された (25, 26, 27)。また、ラットの動物実験では、肝臓から抽出した RNA による遺伝子発現解析により、ケルセチン自体は CYP1A1 の発現レベルに影響を与えないが、benzo[a]pyrene (BaP) によって高められた CYP1A1 の発現レベルを抑制する効果が報告された (28)。今回、抗がん剤耐性に関与する遺伝子群の PCR アレイでは、Mce27 細胞で AhR の発現を確認できたが、ケルセチンによる CYP1A1 の発現上昇は認められず、低下していた。

前田らは、マウスの肥満細胞を用いて、EGCG3Me により、ヒスタミン放出、ロイコトリエン放出、サイトカイン産生及び分泌が抑制されたと報告した (29, 30)。また、スギ花粉症の被験者に対する二重盲検臨床試験により、「ベニフウキ」緑茶を飲むことでスギの花粉症の症状の一部を軽減するのに役立ち、ショウガ抽出物により「ベニフウキ」緑茶の効果を高めたことも報告した (31, 32)。EGCG でも、ヒト肥満細胞 HMC-1 において、細胞毒性なしに IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 の産生及び mRNA 発現を阻止し、さらに脱顆粒を妨げたことが示された (33)。Zeng らも最近、EGCG やクルクミンでの脱顆粒抑制効果を報告した (34)。

松の関連では、松の樹皮から抽出したピクノジェノールやプロアントシアニジンが、肥満細胞におけるヒスタミン放出や IL-6 の分泌を阻害したという報告があった (35, 36)。ブロッコリースプラウト抽出物では、最近、花粉症患者への投与実験で、花粉症アレルギー性鼻炎の治療に役立つ可能性が示唆され、スルフォラファンの効果であると報告された (37)。マウスの動物実験では、スルフォラファンにより、肥満細胞の浸潤及び血清 IgE レベルが低下したという報告もあった (38)。また、ヒト肥満細胞 HMC-1 においては、スルフォラファンがシグナル伝達経路を遮断することも報告された (39)。

最近、プロテインジスルフィドイソメラーゼが、肥満細胞の活性化に不可欠であり、その阻害剤であるクルクミンやルチンで、肥満細胞のサイトカインの分泌が抑制され、

増殖能や脱顆粒も減少したことが報告された(40)。また、*Centipeda minima* (トキンソウ)の揮発性オイルは、アレルギー性鼻炎の治療に効果があったという報告もあった(41)。このように、現在様々な成分について、肥満細胞に対する効果が検証されている。今後さらに様々な要素について評価され、花粉症などのアレルギー症状の改善に寄与する研究成果が期待される。

## 謝辞

本研究にあたり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所の物部真奈美先生には、M $\epsilon$ 27細胞を、静岡県立田方農業高等学校櫻井正剛先生には、松葉を、それぞれ分与していただきました。また、今回使用したパクチー、松葉、ブロッコリースプラウト、レッドキャベツスプラウトの抽出物については、これまでの常葉大学の卒業生が調製したのも、使用させていただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Galli S.J., Tsai M. : IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.*, 18, 693-704, 2012.
2. Gould H.J., Sutton B.J. : IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 205-217, 2008.
3. Burton O.T., Oettgen H.C. : Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol. Rev.*, 242, 128-143, 2011.
4. Kuruto R., Yamamoto R., Sakurai, S., Ohura, T. : The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and plant leaves on human mast cells. *Tokoha University Faculty Of Education Research Review*, 38, 351-360, 2017.
5. Kuruto R., Ueda K., Suzuki R., Kawai M., Ohura T. : The effects of *Coriandrum sativum* on breast cancer cells. *Tokoha University Faculty Of Education Research Review*, 42, 155-170, 2022.
6. Kuruto R., Yasui A., Ohura T. : The effects of broccoli sprouts on human breast cancer cells. *Tokoha University Faculty Of Education Research Review*, 43, 241-257, 2023.
7. Nehlig A., Daval J.L., Debry G. : Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17, 139-170, 1992.
8. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. : The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, 22, 375-383, 1995.
9. Kelly G.S. : Quercetin. *Altern. Med. Rev.*, 16, 172-194, 2011.

10. Kuruto R., Aburame M., Sakurai S., Ohura T. : The effects of plant leaves on the action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tokoha University Faculty Of Education Research Review*, 37, 239-253, 2017.
11. Murillo G., Mehta R.G. : Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr. Cancer*, 41, 17-28, 2001.
12. Kaiser A.E., Baniyadi M., Giansiracusa D., Giansiracusa M., Garcia M., Fryda Z., Wong T.L., Bishayee A. : Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytocompound with Cancer Preventive Potential. *Cancers*, 13, 4796, 2021.
13. Fahey J.W., Zhang Y., Talalay P. : Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 10367-10372, 1997.
14. Yagishita Y., Fahey J.W., Dinkova-Kostova A.T., Kensler T.W. : Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules*, 24, 3593, 2019.
15. Ishiyama M., Miyazono Y., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K. : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299-1305, 1997.
16. Tominaga H., Ishiyama M., Ohseto F., Sasamoto K., Hamamoto T., Suzuki K., Watanabe M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47, 1999.
17. Teraoka H., Akiba H., Takai R., Taneike T., Hiraga T., Ohga A. : Inhibitory effects of caffeine on  $Ca^{2+}$  influx and histamine secretion independent of cAMP in rat peritoneal mast cells. *Gen. Pharmacol.*, 28, 237-243, 1997.
18. Shin H.Y., Lee C.S., Chae H.J., Kim H.R., Baek S.H., An N.H., Kim M.H. : Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int. J. Immunopharmacol.*, 22, 411-418, 2000.
19. Yashima M., Sato Y., Kazama I. : Catechin synergistically potentiates mast cell-stabilizing property of caffeine. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 17, 1, 2021.
20. Loube J.M., Gidner S., Venezia J., Ryan H., Neptune E.R., Mitzner W., Dalesio N.M. : Nebulized caffeine alleviates airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 325, L500-L507, 2023.
21. Rodas L., Martinez S., Aguilo A., Tauler P. : Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 17, 47, 2020.
22. Mlcek J., Jurikova T., Skrovankova S., Sochor J. : Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*, 21, 623, 2016.
23. Kempuraj D., Castellani M.L., Petrarca C., Frydas S., Conti P., Theoharides T.C., Vecchiet J. : Inhibitory effect of quercetin on tryptase and interleukin-6 release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line. *Clin. Exp. Med.*, 6,

- 150-156, 2006.
24. Weng Z., Zhang B., Asadi S., Sismanopoulos N., Butcher A., Fu X., Katsarou-Katsari A., Antoniou C., Theoharides T.C. : Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS ONE*, 7:e33805, 2012.
  25. 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, 715-722, 1999.
  26. Jin U.H., Park H., Li X., Davidson L.A., Allred C., Patil B., Jayaprakasha G., Orr A.A., Mao L., Chapkin R.S., Jayaraman A., Tamamis P., Safe S. : Structure-Dependent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activities by Flavonoids. *Toxicol. Sci.*, 164, 205-217, 2018.
  27. Vrba J., Kren V., Vacek J., Papouskova B., Ulrichova J. : Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytother. Res.*, 26, 1746-1752, 2012.
  28. Perepechaeva M.L., Seredina T.A., Sidorova Y.A., Pivovarova E.N., Markel A.L., Lyakhovich V.V., Grishanova A.Y. : Quercetin Attenuates Benzo( $\alpha$ )pyrene-induced CYP1A Expression. *Biomed. Environ. Sci.*, 30, 308-313, 2017.
  29. Maeda-Yamamoto M., Inagaki N., Kitaura J., Chikumoto T., Kawahara H., Kawakami Y., Sano M., Miyase T., Tachibana H., Nagai H., Kawakami T. : O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunol.*, 172, 4486-4492, 2004.
  30. Maeda-Yamamoto M. : Human clinical studies of tea polyphenols in allergy or life style-related diseases. *Curr. Pharm.*, 19, 6148-6155, 2013.
  31. Masuda, S., Maeda-Yamamoto, M., Usui, S., Fujisawa, T. : 'Benifuuki' green tea containing o-methylated catechin reduces symptoms of Japanese cedar pollinosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Allergol. Int.*, 63, 211-217, 2014.
  32. Maeda-Yamamoto M., Ema K., Shibuichi I. : In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement. *Cytotechnology*, 55, 135-142, 2007.
  33. Kim H.Y., Kang H.G., Nam S.Y., Kim H.M., Jeong H.J. : Blockade of RANKL/RANK signaling pathway by epigallocatechin gallate alleviates mast cell-mediated inflammatory reactions. *Int. Immunopharmacol.*, 88, 106872, 2020.
  34. Zeng J., Hao J., Yang Z., Ma C., Gao L., Chen Y., Li G., Li J. : Anti-Allergic Effect of Dietary Polyphenols Curcumin and Epigallocatechin Gallate via Anti-Degranulation in IgE/Antigen-Stimulated Mast Cell Model: A Lipidomics Perspective. *Metabolites*, 13, 628, 2023.
  35. Choi Y.H., Yan G.H. : Pycnogenol inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response

- in mast cells. *Phytother. Res.*, 23, 1691-1695, 2009.
36. Choi Y.H., Song C.H., Mun S.P. : Proanthocyanidin-rich *Pinus radiata* bark extract inhibits mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions. *Phytother. Res.*, 32, 290-297, 2018.
  37. Yusin J., Wang V., Henning S.M., Yang J., Tseng C.H., Thames G., Arnold I., Heber D., Lee R.P., Sanavio L., Pan Y., Qin T., Li Z. : The Effect of Broccoli Sprout Extract on Seasonal Grass Pollen-Induced Allergic Rhinitis. *Nutrients*, 13, 1337, 2021.
  38. Wu W., Peng G., Yang F., Zhang Y., Mu Z., Han X. : Sulforaphane has a therapeutic effect in an atopic dermatitis murine model and activates the Nrf2/HO 1 axis. *Mol. Med. Rep.*, 20, 1761-1771, 2019.
  39. Jeon M., Lee J., Lee H.K., Cho S., Lim J.H., Choi Y., Pak S., Jeong H.J. : Sulforaphane mitigates mast cell-mediated allergic inflammatory reactions in *in silico* simulation and *in vitro* models. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 42, 74-83, 2020.
  40. Krajewski D., Polukort S.H., Gelzinis J., Rovatti J., Kaczinski E., Galinski C., Pantos M., Shah N.N., Schneider S.S., Kennedy D.R., Mathias C.B. : Protein Disulfide Isomerases Regulate IgE-Mediated Mast Cell Responses and Their Inhibition Confers Protective Effects During Food Allergy. *Front. Immunol.*, 11, 606837, 2020.
  41. Jia Y., Zou J., Wang Y., Zhang X., Shi Y., Liang Y., Guo D., Yang M. : Mechanism of allergic rhinitis treated by *Centipeda minima* from different geographic areas. *Pharm. Biol.*, 59, 606-618, 2021.