

食品成分による抗アレルギー作用におけるカリウムチャネルの関与と治療への応用

風間 逸郎

宮城大学看護学群

概要 コーヒーや緑茶に含まれるカフェインやカテキンは、アレルギー性鼻炎や気管支喘息患者の症状を緩和し、抗アレルギー作用を発揮することが経験的に知られている。ラットの腹膜より単離した肥満細胞に対し、カフェイン(1~100 mM)やカテキン(1~25 mM)を単独投与、または併用投与したうえでエクソサイトーシスを誘発し、顕微鏡下で脱顆粒現象を観察した。その結果、カフェインやカテキンともに、比較的低濃度(1~10 mM)では肥満細胞からの脱顆粒現象を十分には抑制しなかった。しかし、いずれも、25 mM 以上の高濃度では脱顆粒現象を大きく抑制し、用量依存性の抑制効果を発揮した。そこで、単独では十分な抑制効果がみられなかった 10 mM カフェインに、比較的低濃度のカテキンを併用投与したところ、カフェインによる脱顆粒抑制効果を大きく増強した。とくにカテキン 1 および 2.5 mM では、相加効果以上に相乗効果を発揮した。文献上、カフェインやカテキンはアレルギー疾患の症状を緩和することが知られるが、本研究の結果より、これらはいずれも、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエクソサイトーシスの過程そのものを直接的に抑えることによって、抗アレルギー作用を発揮すると考えられた。とくにカフェインは脂溶性が高いため、肥満細胞膜の脂質二重層の間に入り込み、膜の曲率を変化させることで直接的に、またはイオンチャネルや受容体を介して間接的に、エクソサイトーシスの過程を阻害するメカニズムも考えられた。さらに本研究の結果、カフェインとカテキンを併用投与することによって、相乗的な抗アレルギー効果が得られた。カフェインやカテキンは適量であれば、コーヒーや緑茶など、日々の嗜好品の中から簡単に摂取することが可能である。本研究の結果より、カフェインやカテキンを単独でなく、同時に摂取した方が、より強力な抗アレルギー効果が見込めると考えられた。

1. 研究目的

近年の健康ブームにより、コーヒーや緑茶による健康作用が注目されるようになってきている。例えば、1日3~4杯のコーヒーには、抗酸化作用、抗癌作用、老化を遅らせるはたらき、美肌作用、脂肪燃焼作用、疲労抑制作用、などの効果があることが分かってきている。また、緑茶についても、最近では、抗酸化作用、乳癌に対する予防効果、腸内環境改善効果、糖や脂肪の吸収を穏やかにするダイエット効果、血糖・血圧の上昇を抑制する効果、抗菌・抗ウイルス効果などの効果があることが分かってきた。特に最近では、コーヒーに含まれるカフェインや緑茶に含まれるカテキンが、抗アレルギー作用をも有することが明らかになっている。例えば、ラットにカフェインを投与することでアナ

フィラキシーショックを抑制したという報告がある。また、鼻炎モデルのラットに対してカフェインを投与することで、アレルギー症状で見られるくしゃみや鼻掻き回数が減少したという効果もみられている。さらに、気管支喘息の患者を2つのグループに分け、それぞれにカフェインとプラセボ、又はカフェインレスコーヒーを飲用してもらい、肺機能の変化を調べる介入研究も行われた。その結果、プラセボと比較して、カフェインは低用量でも、摂取後最大2時間は肺機能が改善したという報告がなされた。一方でカテキンに関しても、カテキンを含む緑茶抽出成分が、実際にアレルギー性鼻炎の症状改善に対して効果があったことが報告されている。

これまで、カフェインやカテキンが有する抗アレルギー作用については、ヒトや実験動物モデルにおけるアレルギー症状の改善のほか、アレルギー反応の結果としてのヒスタミン遊離を抑制する効果についてのみ実証されてきた。しかしカフェインやカテキンが、アレルギー反応の担い手である肥満細胞そのものに対してどのように作用するのかについては、細胞レベルで詳細に調べた報告はない。そこで今回、肥満細胞にカフェインやカテキンを直接的に投与することで、肥満細胞からの開口分泌現象(エクソサイトーシス)にどのように作用するのかを明らかにしたいと考え、本研究を行うことにした。

2. 研究方法

2. 1. 肥満細胞の単離と脱顆粒現象の観察

25 週齢以上の雄性 Wister rat の腹膜を、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で洗浄し、洗浄液から肥満細胞を単離した。単離した後、薬剤(アドレナリン)や食品成分(カフェインやカテキン)を含む細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。これらの肥満細胞に対し、顕微鏡下でエクソサイトーシスを誘発し、脱顆粒現象を観察した。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温 (22~24°C) 条件下で行った。

2. 2. 電気的細胞膜容量の測定

EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクランプ法によって電気的細胞膜容量(membrane capacitance: Cm) を測定した。パッチパイペット内に電極内液 (K-glutamate, 145; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; pH 7.2) を満たした時の電気抵抗は 4~6 MΩ であった。細胞外液中に浮遊させた肥満細胞に対してギガシールを作成した後、電極内に陰圧を加えて細胞膜の一部を破壊し、ホールセル・モードとした。内因性にエクソサイトーシスを誘発するために、電極内液中に GTP-γ-S 100 μM を加え、細胞膜の破壊と同時に、細胞内への灌流を開始した。測定には、Lock-in amplifier を用いて、800 Hz の正弦曲線の矩形波パルスで -80 mV の保持電位で補正した。電気的細胞膜容量 (Cm) , シリーズコンダクタンス (series conductance : G_s) , 膜コンダクタンス (membrane conductance: G_m) を 120 秒間連続して記録した。なお測定中、アクセス抵抗(series resistance: R_s) は 10 MΩ 以下

に保った。

2. 3. 統計学的解析方法

得られたデータは、PulseFit software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) 及び Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。また、Student の t test による両方向の分散分析を用いて統計学的有意差を検証した。p 値 0.05 以下で統計学的に有意であると判断した。

3. 研究結果

3. 1. アドレナリンが有する肥満細胞安定化作用についての電気生理学的検討

アドレナリンは、アレルギーの重症型であるアナフィラキシーの第一選択薬として用いられているが、肥満細胞の“エクソサイトーシス”の過程そのものに対し、どのように作用するかについては、明らかになっていない。肥満細胞におけるエクソサイトーシスの過程では、分泌顆粒の細胞膜への融合に伴って、細胞膜の表面積が増加する。それによりこの過程は、電気生理学的にも、細胞膜容量; membrane capacitance (C_m) の継時的な増加として捉えられる。そこで本研究では、まず、肥満細胞のエクソサイトーシスの過程そのものに対する、アドレナリンの効果を明らかにするために、本薬剤の存在下で肥満細胞のエクソサイトーシスを誘発し、電気的細胞膜容量の変化を、パッチクランプ法を用いて測定した(図 1)^①。その結果、比較的低濃度アドレナリンの存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、およびエクソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加ともに、ほとんど抑制されなかった。しかし、高濃度アドレナリンの存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、および細胞膜容量の増加ともに、ほぼ完全に抑制された(図 1)。このことから、アドレナリンは、濃度依存性にエクソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を有意に抑制し、肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになった。

3. 2. カフェインやカテキンが有する肥満細胞安定化作用についての検討

次に、1~100 mM のカフェイン、または 1~25 mM のカテキンを用いて、肥満細胞からの脱顆粒現象に対する影響を調べた^②。その結果、カフェイン、カテキンともに、低用量では肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制しなかったが、高用量では有意に抑制し、用量依存性の効果を示した(図 2, 3)。これまで、カフェインやカテキンは、気管支喘息

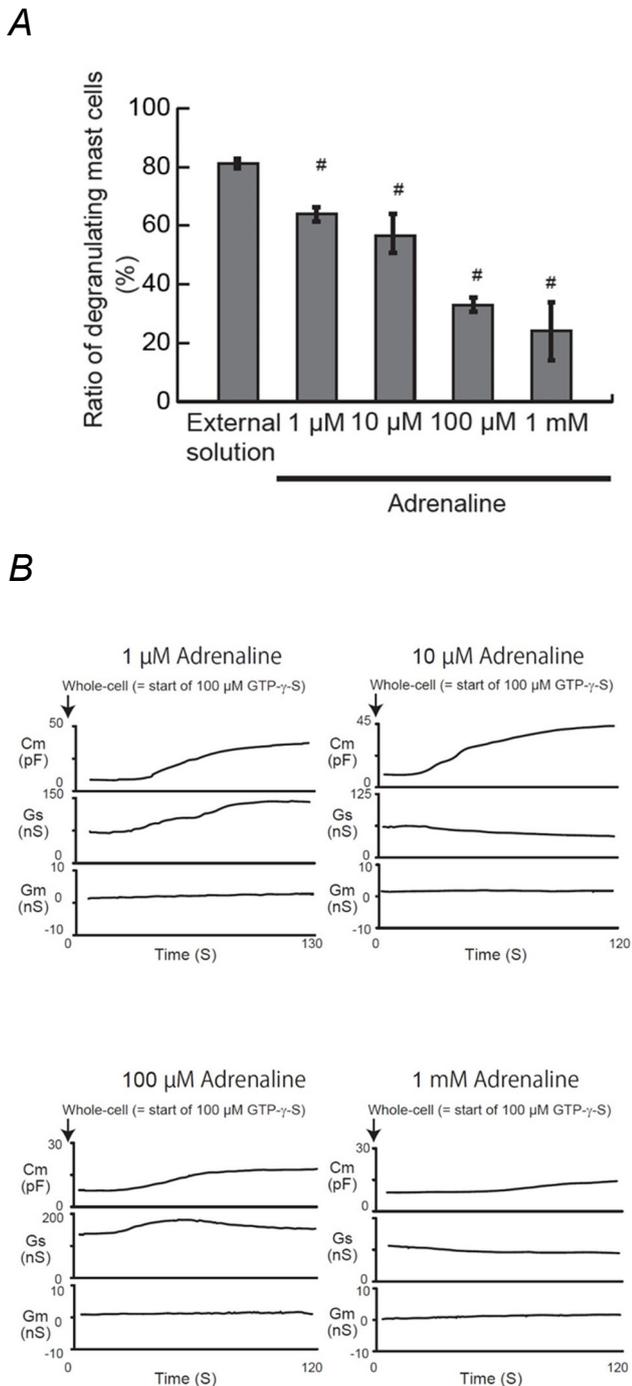


Figure 1. Effects of adrenaline on mast cell-stabilization. (A) Adrenaline dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) High dose adrenaline suppressed the GTP- γ -S-induced increase in the membrane capacitance.

やアナフィラキシーなどのアレルギー疾患の症状を緩和することが知られてはいたが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究の結果より、カフェインやカテキンは、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエクソサイトーシスの過程

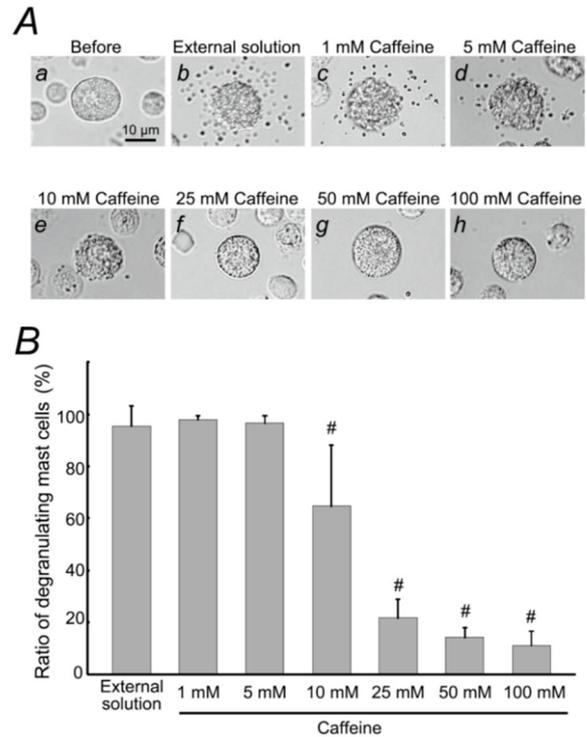


Figure 2. Effects of caffeine on mast cell degranulation. (A) High dose caffeine suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) Caffeine dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

そのものを直接的に抑えることによって、抗アレルギー効果を発揮することが明らかになった。従って、いわゆる抗ヒスタミン薬のように、ヒスタミンの刺激によって各臓器で出現した症状を対症的に抑えるだけでなく、肥満細胞のレベルからアレルギー反応を根本的に抑えることができると考えられた。

3. 3. カフェインやカテキンの併用効果についての検討

本研究の結果、比較的低濃度(1~10 mM)のカテキンを単独で投与しても、肥満細胞の脱顆粒現象に対する抑制効果は十分には認められなかった(図 3)。そこで、10 mM カフェインに低濃度のカテキン(1または2.5 mM)を併用投与したところ、肥満細胞の脱顆粒現象を大きく抑制し、相加効果にとどまらず、相乗効果が認められた(図 4)。

カフェインは抗酸化作用を有することが知られる。そのメカニズムとして活性酸素種(Reactive Oxygen Species:

ROS)を除去する働きがあることが分かっているが、Nishikawa らの報告によれば、肥満細胞に対するカテキンの働きは、細胞内の活性酸素種の濃度に依存する。例えば、細胞内の活性酸素種の濃度が高ければ、肥満細胞

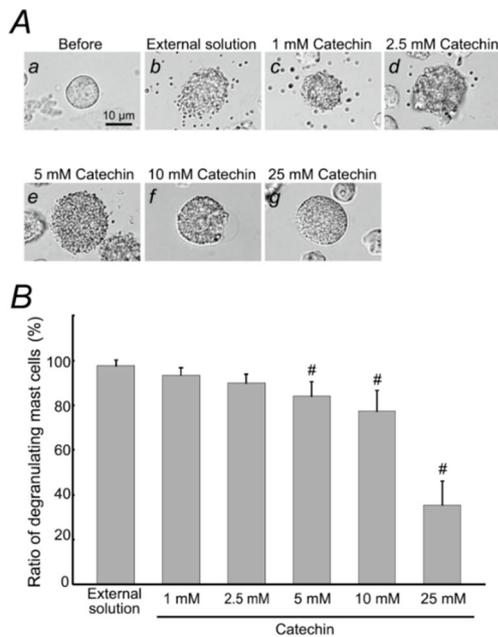


Figure 3. Effects of catechin on mast cell degranulation. (A) High dose catechin suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) Catechin dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

からの脱顆粒現象が刺激され、逆に濃度が低ければ、脱顆粒現象が抑制されるという。本研究では、10 mM カフェインによって予め活性酸素種が除去されていた状態に、低濃度カテキンが加わったため、カテキンによる脱顆粒抑制効果が強く出たと考えられた。カフェインやカテキンは、大量に摂取すれば中毒を起こしてしまうが、適量であれば、コーヒーやお茶など、日々の嗜好品の中から簡単に摂取することが可能である。本研究の結果より、カフェインやカテキンを単独でなく、同時に摂取した方が、より強力な抗アレルギー効果が見込めると考えられた。

4. 結論および今後の課題

カフェインやカテキンは、肥満細胞におけるエクソサイトーシスの過程そのものを阻害することによって、用量依存性に抗アレルギー効果を発揮した。さらに、低用量のカテキンは、カフェインによる抗アレルギー作用を増強させる効果があることが明らかになった。カフェインは脂溶性が高いため、肥満細胞膜の脂質二重層の間に入り込み、膜の曲率を変化させることで直接的に、または $K_{Ca}3.1$ をはじめとするイオンチャネルや受容体を介して間接的に、エクソサイトーシスの過程を阻害するメカニズムも考えられる²⁾。また、本実験により用量依存性に肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになったアドレナリンの受容体も、

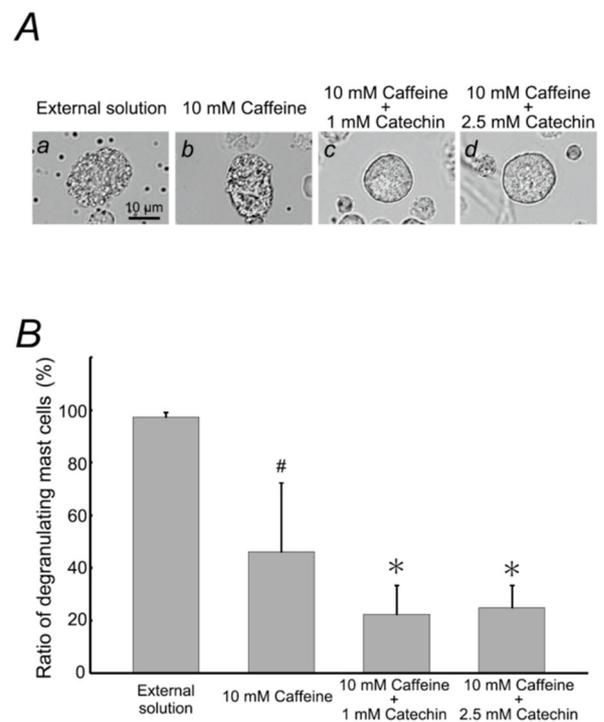


Figure 4. Synergistic effects of caffeine and catechin on mast cell degranulation. (A) 10 mM caffeine with 1 or 2.5 mM catechin markedly suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) Low dose catechin synergistically potentiated the effect of 10 mM caffeine on mast cell degranulation.

$K_{Ca}3.1$ などのカリウムチャネルやカルシウムチャネル、 NaK -ATPase などの輸送体との相互作用が知られている。今後は、これらのイオンチャネルや輸送体の関与など、詳細なメカニズムについても明らかにしていきたい。

5. 文献

- 1 Abe N, Toyama H, Ejima Y, Saito K, Tamada T, Yamauchi M et al. alpha 1-Adrenergic Receptor Blockade by Prazosin Synergistically Stabilizes Rat Peritoneal Mast Cells. *Biomed Res Int* 2020;2020:3214186.
- 2 Yashima M, Sato Y, Kazama I. Catechin synergistically potentiates mast cell-stabilizing property of caffeine. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2021;17:1.
- 3 Baba A, Tachi M, Maruyama Y, Kazama I. Olopatadine inhibits exocytosis in rat peritoneal mast cells by counteracting membrane surface deformation. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:386-396.

Anti-Allergic Effects of Food Constituents

Itsuro Kazama

Miyagi University, School of Nursing

Summary

Caffeine and catechin, contained in coffee and tea, are commonly consumed substances worldwide. Studies revealed their health promoting functions, such as anti-oxidant, anti-cancer and anti-bacterial properties. Additionally, studies also revealed their roles in ameliorating the symptoms of allergic disorders, indicating their anti-allergic properties. In the present study, using the differential-interference contrast (DIC) microscopy, we examined the effects of caffeine and catechin on the degranulation from rat peritoneal mast cells. Both caffeine and catechin dose-dependently decreased the numbers of degranulating mast cells. At concentrations equal to or higher than 25 mM, caffeine and catechin markedly suppressed the numbers of degranulating mast cells. In contrast, at relatively lower concentrations, both substances did not significantly affect the numbers of degranulating mast cells. However, surprisingly enough, low concentrations of catechin (1, 2.5 mM) synergistically enhanced the suppressive effect of 10 mM caffeine on mast cell degranulation. These results provided direct evidence for the first time that caffeine and catechin dose-dependently inhibited the process of exocytosis. At relatively lower concentrations, caffeine or catechin alone did not stabilize mast cells. However, low concentrations of catechin synergistically potentiated the mast cell-stabilizing property of caffeine.