

氏 名	金 河 元
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1411 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Suppression of Inflammatory Leukocytes-induced Mutagenesis by Dietary Antioxidants (炎症性白血球が誘起する変異原性と抗酸化性食品因子によるその抑制)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 東 肇 教 授 吉 川 正 明 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

細菌やウイルスの感染などによる炎症において、活性化された好中球やマクロファージなどの炎症性白血球は種々のフリーラジカルを産生する。このフリーラジカルや活性酸素はDNA損傷などを引き起こし、発がんにつながることを示唆されている。これまでの研究で、化学的に発生させたフリーラジカルが試験管内のDNAに変異を引き起こすことは実証されているが、炎症性白血球から生まれるフリーラジカルが実際に細胞中のDNAに変異を与えるか否かについての報告は限られている。本論文では、まずは、生体により近い環境でフリーラジカルの変異原性が評価できる細胞レベルでの新規実験系を構築し、炎症性白血球から産生されるフリーラジカルの変異原性を評価した。次いで、和産食用植物89種類について、炎症性白血球由来のsuperoxide (O_2^-) 産生に対する抑制活性スクリーニングを行い、数種の抑制性食用植物を見いだすとともに、特に強い活性を示したミョウガよりその抑制成分としてafrodisiacalを同定した。さらにまたafrodisiacalの作用性を炎症関連遺伝子の動態により解析している。その主な内容は以下の通りである。

1. 炎症性白血球と動物細胞を共培養する実験を行い、炎症性白血球から産生されるフリーラジカルが実際に動物細胞に対し変異を起こすのか、そしてフリーラジカル産生抑制条件下ではその変異原性が抑制されるのかについて次の手法で検討した。TPAで刺激した分化HL-60細胞（ヒト白血病細胞由来 O_2^- 産生系）、あるいはLPS/IFN- γ で刺激したRAW264.7細胞（マウスマクロファージ由来 O_2^- /NO/ONOO $^-$ 産生系）を各々AS52細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来）と共培養し、HL-60細胞及びRAW264.7細胞由来のフリーラジカルがAS52細胞の*gpt*遺伝子に対し変異原性を示すか否かを6-thioguanine選抜法によって調べた。その結果、両フリーラジカル産生系において、無刺激単独培養時に比べ、AS52細胞の*gpt*遺伝子変異率が顕著に増え、他方、フリーラジカル産生抑制条件下ではその変異率が有意に減少した。この結果から、HL-60とRAW264.7細胞から産生された O_2^- 、NOまたはその下流で生成されたフリーラジカルや活性酸素がAS52細胞に対し変異原性を持つことを示した。

2. 各種発がん抑制性食品因子の両炎症細胞系におけるフリーラジカル産生抑制作用及び共培養系における変異原性抑制作用を調べた。その結果、HL-60細胞及びRAW264.7細胞から産生されるフリーラジカルを強く抑制した食品因子は共培養における変異原性をも抑制し、特に強い発がん抑制因子として注目されている1'-acetoxychavicol acetate, zerumbone, nobiletin, aurapteneなどの抑制活性は強かった。この結果から、炎症性白血球から過剰に産生されるフリーラジカルを抑制することが発がん抑制にもつながる可能性を示唆した。

3. Xanthine oxidase は NADPH oxidase とともに生体内の主要な O_2^- 産生源であるが、これまで細胞系でその活性を簡易に測定できる方法はなかった。そこで、そのアッセイ系の確立を試み、TPAで刺激したAS52細胞では有意な O_2^- が産生されることを見だし、それが xanthine oxidase によるものであることを確認した。前述した分化HL60細胞系はNADPH oxidase による O_2^- 産生系である。今回確立した新規評価系（AS52細胞系）と分化HL60細胞系を用いて、日本産植物性食素材89種類のクロロホルム抽出物について O_2^- 産生抑制活性スクリーニングを行った。その結果、ミョウガ、シメ

ジ、カブ、アボカドなどに高い抑制活性があることを見いだした。特にミョウガは双方の評価系において最も高活性であった。

4. ミョウガ中の O_2^- 産生抑制成分としてafraframodialを同定するとともに、本成分が炎症性白血球が誘起する変異原性を強く抑制することを示した。さらに、afraframodialは炎症に関連する誘導型NO合成酵素の遺伝子*iNOS*や*cyclooxygenase (COX)-2*, *interleukin (IL)-1 β* , *IL-6*などの炎症関連遺伝子の発現に対して強い抑制活性を示し、その作用メカニズムにはI κ Bの分解抑制による転写因子NF- κ Bの活性低下が関与することを示唆した。

以上の結果から、炎症性白血球から過剰に産生されるフリーラジカルは動物細胞に対し変異原性を持ち、フリーラジカル産生を抑制する食品因子はがん予防に有効であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

フリーラジカルは生体防御機構としての免疫反応や細胞内情報伝達などにおいて重要な役割を果たしている反面、一部の慢性炎症疾患では持続的かつ過剰に産生されるため、DNAやタンパク質などに不可逆的な損傷を与え、発がんに至ることが示唆されている。本研究は、炎症性白血球由来のフリーラジカルが変異原性を持ち、その変異原性がフリーラジカル産生抑制性食品因子によって抑制されることを細胞レベルで実証したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 炎症性白血球から産生されるフリーラジカルの変異原性を評価できる新規実験系として、炎症性白血球と動物細胞を共培養する手法を考案した。この共培養実験系において、分化HL-60細胞やRAW264.7細胞から産生されたフリーラジカルが標的細胞であるAS52に対し変異原性を示し、フリーラジカル産生阻害剤によって有意に抑制された。この実験系により、炎症性白血球由来のフリーラジカルが動物細胞に対し変異原性を持つことを細胞レベルで実証したことは高く評価できる。

2. 炎症細胞におけるフリーラジカル産生活性と共培養系における変異原性抑制活性の間には正の相関が認められ、フリーラジカル産生抑制性食品因子は生体内酸化ストレスで誘起される変異原性に抑制的に働く可能性を示した。

3. Xanthine oxidase 及び NADPH oxidase を介する O_2^- 産生系を用いて、日本産植物性食素材89種類のクロロホルム抽出物の O_2^- 産生抑制活性スクリーニングを行い、ミョウガ、シメジ、カブ、アボカドなどに高い抑制活性を認めた。特にミョウガが双方の評価系で強い活性を示した事実は、わが国の伝統的食生活を評価する点で興味深い。

4. ミョウガ中のフリーラジカル産生抑制物質としてafraframodialを同定した。また本成分の特性として、誘導型NO合成酵素の遺伝子*iNOS*や*cyclooxygenase (COX)-2*, *interleukin (IL)-1 β* , *IL-6*などの炎症関連遺伝子の発現を強く抑制することを見いだした。この結果は、炎症や発がんの科学分野に新たな学術的示唆を与えるものと高く評価できる。

以上のように、本論文は、炎症性白血球から過剰に産生されるフリーラジカルの変異原性を評価する細胞レベルでの新規実験系を確立するとともに、フリーラジカル産生抑制性食品成分ががんの予防につながることを示唆したもので、生命有機化学、食品生理機能学などの学術分野のみならず、がんの化学予防や機能性食品の創製に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。