

氏 名	グォン 権 起 ハン 漢
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1504 号
学位授与の日付	平 成 17 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	Molecular Mechanisms Underlying Dextran Sulfate Sodium-induced Experimental Colitis in Mice and Its Suppression by Dietary Factors (デキストラン硫酸塩によるマウス大腸炎誘発の分子メカニズムと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 河 田 照 雄

論 文 内 容 の 要 旨

潰瘍性大腸炎やクローン病などの inflammatory bowel disease (IBD) は、大腸粘膜の損傷に伴う激しい腹痛・下痢などを主たる症状とすることが特徴的な難治性の慢性疾患である。近年、世界的に患者数が増加しており、長期経過した IBD はやがては大腸がんに行進するリスクが高い。本疾患の病因として遺伝的・免疫学的な要因や食事の影響、さらには腸内細菌の関与などが示唆されているが、治療や予防に直接結びつく原因は未だ完全には解明されていない。このような背景下、これまで、デキストラン硫酸塩 (DSS) を用いた試験系が潰瘍性大腸炎誘発動物実験モデルとして広く用いられ、合成薬剤についての抑制効果を検討した例はいくつか報告されてきているが、作用メカニズムに関する知見はさほど多くない。そこで、本研究では、DSS による大腸炎発生の分子メカニズムを解析するとともに、食品因子によるその抑制について検討した。

第1章では、DSS 誘導大腸炎における IL-1 β の関与、およびその標的サイトカイン類の同定について論じている。5% DSS (分子量40,000) を飲水投与したマウスの大腸粘膜と腹腔マクロファージ (pM ϕ) における様々な炎症関連マーカータンパク質および mRNA 発現をそれぞれ EISA 法と RT-PCR 法によって検討した。その結果、IL-1 β が最も早期に発現し、しかも時間依存的であったことから、IL-1 β が DSS 誘導大腸炎における重要な炎症メディエーターであることを示した。また、無処理のマウスに1日あるいは3日間 rIL-1 β (10 μ g/kg/day) を腹腔内投与する群と、5% DSS 投与3日後から5日間 anti-IL-1 β 抗体 (50 μ g/kg/day, i. p.) を投与する実験群を設け、様々な炎症関連遺伝子の発現変化を解析した。その結果、rIL-1 β 投与による炎症誘起と anti-IL-1 β 抗体によるその緩和が認められた。さらにまた、rIL-1 β 投与によって IL-1 β と IL-6 mRNA の発現が増強し、中和抗体によってそれらが抑制された。これらの結果は、IL-1 β がポジティブフィードバック機構により自らを活性化するとともに、少なくとも IL-6 を標的として炎症を増悪化することを強く示唆するものである。

第2章では、DSS 刺激した pM ϕ における IL-1 β 産生メカニズムについて論じている。まず、DSS 刺激した pM ϕ においては、IL-1 β 産生に先立って caspase-1 (IL-1 β converting enzyme) 活性の上昇が認められた。また、細胞内活性酸素生成および MAPKs の活性化をそれぞれ DCFH-DA プローブと Western blot 法で解析した結果、ペルオキシ種の生成や ERK1/2 および p38 MAPK 経路の活性化が重要である一方で、JNK1/2 経路は関与していないことが示唆された。これらの結果は各種特異的阻害剤を用いた実験結果ともよく一致した。さらに、膜結合型ケモカイン型スカベンジャー受容体である CXCL16 の中和抗体を加えることによって、DSS による IL-1 β の産生が有意に抑制される一方、抗 SR-A、抗 CD36、並びに抗 CD68 抗体にはそのような作用がなかった。これらのことから、CXCL16 が pM ϕ における DSS の主要な受容体の1つである可能性を提示している。

第3章では、天然および合成化合物の IL-1 β 産生抑制活性スクリーニングの結果について記述している。総計39種類の天然および合成化合物について pM ϕ における IL-1 β 産生抑制活性スクリーニングを行った。その結果、 α -tocopherol,

glutathione, (-)-catechin やフラボノイド配糖体である rutin などの抗酸化性化合物が高い抑制効果を示した。また、興味深いことに、rutin のアグリコンである quercetin が、逆に、IL-1 β 産生を95%増強するとの新しい事実を見いだしている。

第4章では、DSS 誘導大腸炎における rutin および quercetin の作用について論じている。0.1%の rutin および quercetin をマウスに2週間混餌投与し、後半の一週間のみ5% DSS を飲水投与した。大腸粘膜中の IL-1 β や各種炎症関連遺伝子とともに組織学的な炎症像を解析したところ、*in vitro* の結果と同様に、rutin は IL-1 β の産生や IL-1 β /IL-6 mRNA の発現を顕著に抑制したが、quercetin は全く抑制しなかった。また、0.1% rutin は DSS 投与後3日目から投与を開始する治療プロトコルでも有効な炎症抑制作用を示すことを見いだしている。

以上のように本研究では、DSS による大腸炎の誘発における IL-1 β の重要性とその産生メカニズムの一部を初めて明らかにするとともに、食品因子である rutin の予防や治療剤としての有効性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

激しい腹痛・下痢などを主たる症状とする潰瘍性大腸炎やクローン病などの IBD は、近年世界的に患者数が増加し、その治療や予防法の確立が求められている。本疾病の病因として、遺伝的・免疫学的要因や食事の影響、さらには腸内細菌の関与などが示唆されているが、治療・予防に直接結びつく原因は未だ解明されていない。一方、現在、DSS により誘起される潰瘍性大腸炎が動物実験モデルとして汎用されている。このような背景下、本論文では、これまで未解明であった DSS による大腸炎発生の分子メカニズムを解析するとともに、その抑制に寄与する食品因子を究明したもので、評価できる点は以下の通りである。

1. 5% DSS を飲水投与したマウスの大腸粘膜および pM ϕ における様々な炎症関連マーカーのタンパク質および mRNA の発現を詳細に検討した結果、IL-1 β が DSS 誘導大腸炎における重要な炎症メディエーターであることを突きとめた。また、rIL-1 β やその中和抗体を用いた実験から、IL-1 β はポジティブフィードバック機構により自らを活性化するとともに、少なくとも IL-6 を標的として炎症を増悪化することをはじめて示した。
2. DSS 刺激による pM ϕ において IL-1 β の産生挙動を詳細に解析し、その産生メカニズムとして、CXCL16 との結合から始まり、細胞内での活性酸素の産生とそれに続く ERK1/2 および p38 MAPK 経路の活性化を介した caspase-1 の活性化が関与するとの基本経路を提示した。特に、CXCL16 が DSS の受容体となることをはじめて示した点は今後の本分野の発展に大きく寄与するものと評価される。
3. 39種類の天然および合成化合物について、DSS による IL-1 β 産生抑制活性スクリーニングを行った。その結果、 α -tocopherol や rutin などの抗酸化性化合物が高い抑制効果をもつことを見いだした。特に食品成分である rutin が、DSS 誘導大腸炎モデル系における予防プロトコルにおいて、IL-1 β および IL-6 mRNA の発現をはじめとする種々の炎症マーカーを顕著に抑制した。さらに、治療プロトコルにおいても大腸炎に抑制的であったことがら、rutin は広く IBD に対して有望な予防・治療剤になる可能性を示した。

以上のように本論文は、DSS 誘導大腸炎モデル実験系において、炎症メディエーターとしての IL-1 β の重要性を明確にするとともに、その標的サイトカイン類の同定や pM ϕ における IL-1 β 産生の分子メカニズムをはじめて明らかにした。さらにまた、食品成分である rutin が IBD に対する治療・予防剤として有望であることを示唆しており、生物有機化学、食品生理機能学、さらには食品分子機能学などの学術分野に寄与することはもちろん、機能性食品創製などの実際面においても貢献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17年2月15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。