

氏 名	いけ だ やす たか 池 田 泰 隆
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1636 号
学位授与の日付	平 成 19 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	Potential Proinflammatory Effects of Ursolic Acid and Underlying Molecular Mechanisms (ウルソール酸の潜在的炎症惹起効果とその分子機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 東 肇 教 授 井 上 國 世 教 授 河 田 照 雄

論 文 内 容 の 要 旨

生薬やハーブに含まれるトリテルペン ursolic acid (UA) は炎症刺激を加えた細胞やモデル動物系において抗炎症効果を示すことが知られている。一方、最近、無刺激のマクロファージに UA を添加すると、逆に、炎症メディエーターの産生を誘導することも報告され、マクロファージの生理状態によってその効果が逆転する可能性が示されている。しかしながら、この炎症惹起作用は特定の株化細胞でのみ明らかにされた現象であり、その普遍性についてはさらなる検討が要されていた。本論文は、UA の潜在的炎症惹起作用を多様な実験系で確証するとともに、その詳細な作用機構をも解析したものである。主たる内容は次のように要約することができる。

第 1 章と第 2 章では、それぞれ株化細胞である RAW264.7 マウスマクロファージおよび ICR マウス由来腹腔マクロファージ (pM ϕ) におけるサイトカイン類の産生に対する UA の効果について論じている。RAW264.7 細胞において、UA は、interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α の産生には全く影響を与えなかったが、macrophage migration inhibitory factor (MIF) の産生を濃度および時間依存的に増加させた。本作用について RNAi を利用するなど様々な手法で解析した結果、UA は、主要な細胞内シグナル伝達経路の一つである mitogen activated-protein kinase (MAPK) 経路において、介在する鍵分子の一つ、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2 を活性化し、細胞内にプールされている MIF タンパク質を細胞外へ分泌するという新規な機構を明らかにした。一方、pM ϕ では、UA は、MIF に加え、IL-1 β と IL-6 の産生をもたらし、pM ϕ における IL-1 β の産生はマウス大腸炎の誘発と深く関わっていることから、この産生・分泌に関してさらに検討を加えた。その結果、UA は IL-1 β mRNA および proIL-1 β タンパク質の発現を増加させ、さらに proIL-1 β タンパク質を成熟型に変換する酵素 caspase-1 を活性化することを突き止めた。これらの事実、UA が転写、翻訳および翻訳後の 3 段階で IL-1 β の産生制御に関っていることを示唆するものである。また、UA の IL-1 β mRNA の発現には NADPH oxidase (NOX) の活性化を介した細胞内活性酸素 (ROS) の産生が関っており、それによる MAPK 経路の ERK1/2 と p38 MAPK の活性化が関与していることがわかった。また、IL-1 β は ABC transporter を介して分泌されていることも明らかにした。

興味あることに、NOX の活性化は培地内で凝集する UA が関与しており、本凝集体が pM ϕ に発現しているスカベンジャー受容体の一種 CD36 に認識された結果引き起こされる現象と説明している。また、UA の類縁トリテルペン 6 種類を用いて検討したところ、いずれも IL-1 β の産生を誘導せず、pM ϕ における IL-1 β の産生は UA の特異的作用であると結論づけている。

第 3 章では、4 系統 (C57BL/6J, C3H/He, DDY, ICR) のマウス pM ϕ , および RAW264.7 細胞を用いて、系統差による IL-1 β 産生増強作用について検討している。C3H/He マウス pM ϕ では、UA 受容体である CD36, さらに NOX の活性化に必須の p47^{phox} やその触媒部位である gp91^{phox} の発現レベルが極めて低いことを確認した。一方、RAW264.7 細胞においては CD36 を発現するが、gp91^{phox} の発現は弱く、さらに IL-1 β をほとんど産生しない。さらに、各種細胞にお

いて UA が誘導する O_2^- の産生量を調べたところ、これら 2 種の細胞においてそのレベルは他の 3 種の細胞に比べて有意に低かった。以上のことから、UA の IL-1 β 産生作用はマウスの系統によって著しく異なり、その産生は CD36 の発現と NOX を介した O_2^- およびそれに由来する種々の ROS の産生能に依存していることを強く示唆した。

第 4 章では、動物実験における UA の炎症メディエーター産生増強作用に関する研究成果が述べられている。マウス皮膚組織において、UA は cyclooxygenase-2 (COX-2) や TNF- α の発現を誘導した。また、UA を腹腔内投与したマウス大腸粘膜において、IL-1 β 産生量と myeloperoxidase 活性の増加が認められた。これらの結果は、UA が生体レベルで炎症を引き起こす可能性を強く示唆するものである。

以上のように、本研究は機能性食成分 UA の炎症作用における特性をまとめたもので、著者は、最後に、機能性食品成分の実用にあたってはその逆作用をも十分検討すべきとの警告を発している。

論文審査の結果の要旨

ウルソール酸 (UA) は生薬やハーブなどに広く含まれるトリテルペン的一种であり、古くより抗炎症作用のあることが知られている。しかしながら、最近、ある状況下では、UA は炎症惹起成分になる可能性も報告されつつある。本論文は、UA の炎症メディエーター産生増強作用について詳細に検討するとともに、その作用機構を解明したもので、成果として評価できる点は次のようである。

1. 株化細胞 RAW264.7 マウスマクロファージにおいて、UA が、炎症刺激を与えない条件下、炎症メディエーターの一つ MIF の産生を増強させることを見だし、その分泌機構をはじめて明らかにした。

2. ICR マウス腹腔マクロファージ (pM ϕ) を用いた試験で、UA は IL-1 β の産生・分泌を促すことを確認し、その作用には、培地中で生成した UA 凝集体が pM ϕ に発現している CD36 に認識されることが初期過程であるとする重要な発見をした。さらに、この認識が細胞内での ROS 産生を誘導し、その後の転写、翻訳、および翻訳後の 3 段階で IL-1 β の産生・分泌を調節するという全体の分子機構を明確にした。この結果は、炎症—抗炎症作用の全般を理解するための新たな学術的成果として、高く評価できる。

3. 炎症惹起作用に関して、UA 刺激の感受性がマウスの系統によって異なることを立証した。本成果は、食品の機能解析分野のみならず、動物実験を含む関連学術分野に重要な知見を与えたものと考えられる。

4. マウス皮膚組織や大腸粘膜における実験系において、UA は COX-2, TNF- α , IL-1 β などの炎症メディエーターを産生増強することを確認した。本成果は、UA の炎症性を動物実験レベルではじめて実証したものとして高く評価できる。

以上のように、本論文は錯綜していた機能性食品成分 UA の炎症—抗炎症作用につき学術的な整理をもたらしたものであり、生命有機化学や食品機能科学、さらには医科学分野に寄与するところが多い。

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19年2月8日、論文なら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。