

氏 名	まつ 松 おか 岡 かつ 勝 なり 成
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2537 号
学位授与の日付	平 成 15 年 1 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	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Green tea polyphenol blocks H_2O_2 -induced interleukin-8 production from human alveolar epithelial cells (H_2O_2 刺激によって肺胞上皮細胞から産生される IL-8 は緑茶ポリフェノールによって抑制される)
論文調査委員	(主 査) 教 授 淀 井 淳 司 教 授 三 嶋 理 晃 教 授 和 田 洋 巳

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】虚血再灌流 (IR) 傷害は臓器移植のみならず、様々な臨床場面で発生し、その克服は重要な課題である。IR 傷害の発生には活性酸素と interleukin-8 (IL-8) が重要である。再灌流時に発生する活性酸素は、それ自体が組織を傷害するとともに、肺胞上皮細胞からの IL-8 産生を誘導する。好中球活性化・遊走因子である IL-8 は、肺胞領域への活性化好中球の集積を促進し、さらなる組織傷害を引き起こす。抗 IL-8 抗体によるウサギ肺での IR 傷害の軽減が報告されており、肺胞上皮細胞から産生される IL-8 を抑制することは、IR 傷害の軽減に繋がると考えられる。緑茶ポリフェノールは、その抗酸化作用が広く知られているが、TNF alpha 等のサイトカイン産生抑制作用をも有する。また、ワインに含まれるポリフェノールである resveratrol によるラット心臓における IR 傷害の軽減や、緑茶ポリフェノールの主成分である Epigallocatechin gallate によるネズミ脳における IR 傷害の軽減が報告されている。我々は緑茶ポリフェノールは抗酸化作用とサイトカイン産生抑制作用を併せ持ち、肺における IR 傷害に有効ではないかと考え、ヒト肺胞上皮細胞株である A549 細胞を用いて、酸化ストレス刺激による IL-8 産生や IL-8 mRNA 発現に対する緑茶ポリフェノールの効果を検討した。さらに、細胞内シグナル伝達カスケードの重要な要素である 3 つの mitogen activated protein kinase (Jun N-terminal kinase (JNK), p38, p44/42) に及ぼす影響を検討した。【方法】緑茶ポリフェノールは 0-0.2mg/ml, H_2O_2 は 400 μ M の濃度でを使用した。1) A549 細胞を緑茶ポリフェノール含有培地で 2 時間培養。その後、 H_2O_2 を培地に添加し、1, 3, 6 時間後に培地上清を採取するとともに、細胞溶解液を作成。ELISA 及び RT-PCR を行い、培地中 IL-8 濃度、細胞内 IL-8 mRNA を測定した。また、緑茶ポリフェノールと H_2O_2 を同時に投与し、2 時間前処置群との比較を行った。2) 緑茶ポリフェノールの H_2O_2 scavenge 作用を検討するために、緑茶ポリフェノールと H_2O_2 を添加した後の培地中 H_2O_2 濃度を検討した。3) 緑茶ポリフェノールの細胞毒性を検討するために、緑茶ポリフェノール及び H_2O_2 添加 8 時間後の細胞生存率をトリパンブルー染色法を用いて計測した。4) A549 細胞を緑茶ポリフェノール含有培地で 2 時間培養。その後、 H_2O_2 を培地に添加し、15, 30, 60, 120 分後に細胞溶解液を作成。Western blotting を行い、JNK, p38, p44/42 の活性を測定した。【結果】1) 緑茶ポリフェノールは H_2O_2 添加 1, 3, 6 時間後において、培地中 IL-8 濃度上昇を濃度依存的に抑制した。また、緑茶ポリフェノール・ H_2O_2 同時投与群よりも、2 時間前処置群のほうが IL-8 産生を強く抑制した。緑茶ポリフェノールは細胞内 IL-8 mRNA の発現を抑制した。2) 緑茶ポリフェノールを加えることにより培地中 H_2O_2 濃度は低下した。3) 緑茶ポリフェノールは 0-0.2mg/ml の濃度では細胞生存率に影響を与えなかった。4) 緑茶ポリフェノールは、 H_2O_2 による JNK, p38 の活性化を抑制したが、p44/42 の活性化には影響を及ぼさなかった。【総括】緑茶ポリフェノールは、酸化ストレスによる肺胞上皮細胞からの IL-8 産生を抑制した。前処置群で抑制効果がより強く現れること、また、培地内で scavenge される H_2O_2 は最大 40% 程度であるが、IL-8 産生抑制効果は最大 70% 以上であることから、緑茶ポリフェノールは細胞内の蛋白産生メカニズムに何らかの作用を及ぼしていると考えられた。そのメカニズムとしては、細胞内刺激伝達経路の一員である JNK および p38 の活性化抑制が考えられた。緑茶ポリフェノールは酸化ストレスによって産生さ

れる IL-8 を抑制することによって、IR 傷害の軽減に寄与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

虚血再灌流傷害は臓器移植のみならず、様々な臨床場面で発生し、その克服は重要な課題である。緑茶ポリフェノールは 8 種類のカテキンを含んだ緑茶抽出物であるが、近年、緑茶ポリフェノールの主成分である Epigallocatechin gallate によるネズミ脳における虚血再灌流傷害の軽減が報告されている。しかし、肺における虚血再灌流傷害に対する作用は検討されておらず、また、虚血再灌流傷害の発生に重要なサイトカインであるインターロイキン 8 (IL-8) の産生や細胞内刺激伝達系に対する緑茶ポリフェノールの影響は検討されていない。

本申請者は緑茶ポリフェノールの肺虚血再灌流傷害に対する抑制効果を検討するために、in vitro の系を用いて、酸化ストレス刺激後に産生される IL-8 および細胞内刺激伝達系の重要な一員である mitogen activated protein kinase (MAPK) に対する作用を検討した。その結果、1) 緑茶ポリフェノールは酸化ストレスによる IL-8 産生を濃度依存的に抑制すること、2) ヒトにおいて IL-8 産生に関与すると考えられている 3 種類の MAPK のうち、Jun N-terminal kinase, p38 に対して活性化を特異的に抑制することが示された。

以上の研究は、これまで不明であった酸化ストレスによる IL-8 産生や MAPK 活性化に対する緑茶ポリフェノールの抑制効果の解明に貢献し、肺虚血再灌流傷害予防の研究発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年11月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。