

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

孫 動玉

近年、食生活の欧米化に伴って増加している潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患の発症には炎症性サイトカインが深く関わっており、その主な治療法としては免疫抑制剤や抗体などが使われている。しかし、漢方薬や機能性食品などによる症状の緩和・予防も最近注目されるようになってきた。申請者は、抗酸化能などの生理機能を持つことが知られている食品由来ペプチド、カルノシンの抗炎症機能を見出し、その作用機構の解明を試みた。カルノシンは β -Ala-His の構造を持つジペプチドで、肉類等に多く含まれているほか、サプリメントの成分としても利用されている。これらの食品を介して摂取されたカルノシンは高濃度で腸管に達すると考えられるが、腸管におけるその動態、機能については報告がない。本論文は、ヒト腸管上皮細胞モデル系として Caco-2 を用い、カルノシンによる炎症性サイトカイン分泌抑制効果とその作用機構について詳細に検討しているもので、序論を含む 4 章および総合討論から構成されている。

序論では研究の背景になる炎症性腸疾患とカルノシンを紹介するとともに、本研究の意義と目的について述べている。

第一章では炎症性サイトカインであるインターロイキン-8 (IL-8) の分泌亢進に与えるカルノシンの影響を検討している。まず、カルノシンの取込み活性が H⁺ 依存性であり、ジペプチドによってその活性が抑制されたことから、カルノシンはペプチドトランスポーター PepT1 を介して腸管細胞内に輸送されることが示唆された。Caco-2 細胞では、過酸化水素、TNF- α (tumor necrosis factor- α)、カドミウム、 α -フムレンなどの種々の刺激により IL-8 の分泌が亢進されるが、カルノシンはいずれの刺激による IL-8 分泌亢進も濃度依存的に抑制した。しかし、PepT1 の基質である Gly-Sar を共存させカルノシンの細胞内輸送を阻害すると、カルノシンの IL-8 分泌抑制効果は軽減されたことから、カルノシンは細胞内に輸送されて IL-8 分泌亢進を抑制すると考えられた。各種刺激による IL-8 mRNA 発現誘導に及ぼすカルノシンの影響を調べた結果、mRNA 発現の亢進はカルノシンによって全く抑制されなかった。このようなことから、カルノシンの IL-8 分泌抑制効果は、従来報告されてきたような IL-8 の転写段階を抑制する抗炎症性物質とは異なり、転写以降の段階を抑制によるものであることが示唆された。

第二章ではカルノシンの構造と抑制効果との関係について述べている。カルノシンの構成アミノ酸が IL-8 分泌亢進に与える影響を調べた結果、 β -アラニンには IL-8 分泌亢進抑制効果が見られなかったが、ヒスチジンでは強い抑制効果が見られた。また、ヒスチジンを含むカルノシン、アンセリン (β -Ala-Methyl His)、Gly-His、Ala-His も過酸化水素による IL-8 分泌亢進を強く抑制したことから、これらのジペプチドの IL-8 分泌抑制効果にはヒスチジンが重要な役割を果たしていることが示唆された。そこでヒスチジンの IL-8 分泌抑制作用について解析した結果、ヒスチジンは「I κ B 分解の抑制→NF- κ B の核内移行阻害→IL-8 の転写活性抑制」というプロセスを介して転写段階で IL-8 分泌を抑制することが示唆された。これは転写以降の段階を抑制するカルノ

シンとは異なる機構であり、カルノシンの効果は構成アミノ酸であるヒスチジンの作用では説明できないことが明らかになった。さらに、Gly-His、Ala-His、アンセリンも転写レベルで IL-8 分泌を抑制することが確認された。Gly-His と Ala-His は細胞内でそれぞれの構成アミノ酸に分解されるため、その効果はヒスチジンによるものと考えられた。以上の結果から、カルノシン特有の構造的要因がその IL-8 分泌抑制効果にとって重要であることが示された。

第三章ではカルノシンの IL-8 分泌抑制の機構について詳細に調べている。第一章の結果から、カルノシンは IL-8 の転写以降の段階を抑制することが示唆されたため、IL-8mRNA の安定性、IL-8 の翻訳、細胞外への分泌、合成された IL-8 の分解といった各段階へのカルノシンの作用を一つずつ検討した。まず mRNA 合成抑制剤アクチノマイシ D を用いた実験の結果、カルノシンは IL-8mRNA の安定性には影響を与えないことが分かった。またレーザ共焦点顕微鏡と ELISA 法を用いて細胞内の IL-8 量を測定した結果、カルノシン処理は IL-8 のタンパク質産生自体を顕著に抑制していることが認められた。翻訳に着目して実験を進めた結果、カルノシンは翻訳開始因子の一つである eIF4E のリン酸化を抑制することによって IL-8 産生を抑制すること、eIF4E のリン酸化に関わる ERK1/2 と p38 MAPK のリン酸化を抑制することを見出し、カルノシンによるユニークな IL-8 産生制御機構の一端が明らかになった。

以上要するに、本研究はユニークな食品由来ペプチドであるカルノシンが抗炎症作用を持つことを明らかにするとともに、炎症性サイトカインの分泌抑制におけるその新規な機構を解明したもので、学術的にも応用的にも寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本研究が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。