

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 MD シャフィクル イスラム

論文題目 **Studies on antioxidant and anti-inflammatory effects of rice bran phytosterol ferulates** (米糠由来植物性ステロールフェルラ酸エステルの抗酸化および抗炎症作用の研究)

米を主食とする我が国では年間に約 100 万トンもの米糠が自然界に廃棄され、その環境への影響が懸念され廃棄バイオマスとしての再利用法の開発が期待されている。米糠には古くから生理活性を持つ有効成分が多数含まれることが知られている。 $\gamma$ -oryzanol は米糠に含まれる脂溶性成分で植物性 sterol と ferulic acid が結合した成分の総称であり、抗酸化作用を持つことが知られているが、その他の生理活性作用の詳細は不明である。

本研究では、米糠由来  $\gamma$ -oryzanol の生理活性作用について、特に抗酸化作用と抗炎症作用について In vitro と In vivo の病態モデルを用いて解明することを目的としている。

### 1. $\gamma$ -oryzanol ならびにその誘導体の抗酸化作用ならびに NF $\kappa$ B 阻害作用

新潟産コシヒカリより単離した  $\gamma$ -oryzanol は cycloartenyl ferulate (CAF) を主成分とし、次いで 24-Methylenecycloartenyl ferulate (24-Met CAF)、campesteryl ferulate (CSF)、 $\beta$ -sitosteryl ferulate ( $\beta$ -SSF) が含まれていた。また、ferulic acid (FA) は米糠脂溶性成分にはほとんど含まれていなかった。我々は、FA、ferulic acid ester (eFA)、cycloartenol (CA)、CAF、24-Met CAF、 $\beta$ -SSF を用いて、抗酸化作用と NF $\kappa$ B 活性阻害作用について解析した。抗酸化作用はラジカル捕集機能を DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) で、抗酸化作用を TBARS assay (thiobarbituric acid reactive substances assay) で評価し、NIH3T3 細胞への H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による reactive oxygen species (ROS) の産生能を DCFH-DA assay (dichlorodihydrofluorescein diacetate assay) にて評価した。また、NF $\kappa$ B 活性への影響は NF $\kappa$ B p65 タンパク質の LPS 刺激した RAW264.7 マクロファージにおける核内移行を免疫染色することで評価した。 $\gamma$ -oryzanol、CAF、 $\beta$ -SSF、FA はいずれも濃度依存性にラジカル捕集作用を示し、抗酸化作用を持つことが示唆された。一方、CA はラジカル捕集作用、抗酸化作用を示さなかった。NIH3T3 細胞を用いた ROS 産生能に対する作用において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激により約 4 倍の ROS 産生が認められ、CAF、eFA ならびに CA はいずれも 10  $\mu$  M で顕著に ROS 産生を抑制する成績を得た。LPS 刺激は ROS の産生を引き起こすことが知られており、ROS 産生は NF $\kappa$ B 転写因子を活性化する。そこで、LPS 刺激による NF $\kappa$ B p65 タンパク質の核内移行について解析した。結果、CA を含む全ての化合物が LPS 刺激による NF $\kappa$ B p65 タンパク質核内移行を顕著に抑制することがわかった。以上の成績から、CAF を主成分とする  $\gamma$ -oryzanol には強い抗酸化作用を示すこと、その作用はラジカル捕集作用と ROS 産生抑制作用によることが明らかになった。また、CAF の化学構造の CA はラジカル捕集作用を持たないが、ROS 産生抑制

作用を持つことを明らかにした。これらの  $\gamma$ -oryzanol 類縁化合物はいずれも強い NF $\kappa$ B 活性阻害作用を持つことが明らかになった。

## 2. Dextran sulfate sodium (DSS)誘発潰瘍性大腸炎モデルにおける $\gamma$ -oryzanol の抗炎症作用

第2章では病態モデルにおける  $\gamma$ -oryzanol の有効性について、DSS 誘発大腸炎モデルを用いて解析した。C57BL/6J マウスに 1% DSS を含む水を自由飲水させることでマウスに大腸炎を惹起させた。大腸炎の評価は、体重変化、糞便形状ならびに血便をスコア化した Disease activity index (DAI)、HE 染色、好中球浸潤の指標となる myeloperoxidase (MPO) activity、各種サイトカイン mRNA 発現などを指標に解析した。 $\gamma$ -oryzanol は 0.01% Tween-20、0.5% CMC (carboxymethyl cellulose sodium)を含む生理食塩水に懸濁させ、50 mg/kg/day で DSS 投与開始二日前から経口投与した。DSS 投与 2 日目から DAI の増加、HE 染色による顕著な炎症性細胞の浸潤が認められ、粘膜層と筋層の肥厚、MPO 活性の増加など顕著な腸炎症状を示し、この症状は DSS 投与 16 日まで継続していた。 $\gamma$ -oryzanol 投与群ではこれらの腸炎症状の症状を顕著に軽減させた。また、DSS 投与 8 日目までは炎症性サイトカインの発現増加が顕著に認められ、 $\gamma$ -oryzanol 投与群ではこれらは有意に抑制された。 $\gamma$ -oryzanol 処置群では腸炎病変部の NF $\kappa$ B p65 タンパク質の核内移行の抑制と、I $\kappa$ B タンパク質の分解抑制が認められたことから、 $\gamma$ -oryzanol による腸炎抑制機序は NF $\kappa$ B 活性の抑制によると考えられた。また、 $\gamma$ -oryzanol の主成分である CAF (50 mg/kg/day)ならびに CAF の代謝産物と考えられる FA (50 mg/kg/day)においても、DSS 誘発腸炎症の顕著な抑制が認められた。さらに、3% DSS を 5 日間自由飲水させた後に同量の  $\gamma$ -oryzanol の経口投与を開始する  $\gamma$ -oryzanol 後処置群においても腸炎症の有意な抑制が認められ、 $\gamma$ -oryzanol が腸炎の治療薬としても有効である可能性が示唆された。

以上のように本研究は、米糠由来の  $\gamma$ -oryzanol に抗酸化作用とは別にあらたに NF $\kappa$ B 活性阻害作用があることをみいだした。さらに、 $\gamma$ -oryzanol が DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルにおいても NF $\kappa$ B 活性を抑制することで腸炎症を有意に緩和させることを明らかにした。これらの知見は、今後  $\gamma$ -oryzanol が機能性食品や医薬品のリード化合物として期待されることを科学的に実証したものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位に値するものと判断した。