

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 森

コンドロイチン硫酸 (CS) は、動物の結合組織に広く存在する直鎖状多糖類グリコサミノグリカンの一種である。 β -D-グルクロン酸 (B1 \rightarrow 3) N-アセチル- β -D-ガラクトサミンの2糖単位が1 \rightarrow 4結合により繰り返し配列した構造を持つ。もっとも一般的な2つのisomerはCS-AとCS-Cで、それぞれガラクトサミン残基のC-4 あるいはC-6の位置が硫酸化されている。CSは抗炎症作用を持つと言われており、関節炎治療のための経口サプリメントの原料としても用いられているが、その抗炎症作用の分子メカニズムはまだ明確にされていない。本研究は、微生物成分がマクロファージのToll様受容体 (TLR) を刺激することによって誘導される炎症性サイトカインの分泌が関節炎などの炎症の一反応であることに着目し、TLR刺激によって誘導されるマクロファージ様細胞のIL-6分泌に対するCSの抑制効果について解析を進めたもので、3章からなる。

経口的に摂取されたCSの構造や分子サイズがその吸収性に大きく影響することは報告されている。しかし、CSや低分子化したCSの腸管吸収機構の詳細については明らかにされていない。第1章では、CSを酵素分解して2糖 (Di-CS)を調製し、その腸管透過性をヒト腸管Caco-2細胞の単層培養系により解析した結果が述べられている。未分解CSはほとんど細胞層を透過しないが、Di-CSは透過することが示された。その透過性はエネルギー代謝阻害剤で細胞層を処理しても変化がなかったことから、Di-CSsの透過には能動輸送系は寄与していないことが示唆された。細胞間受動拡散の速度を高めることが知られているサイトカインなどで処理して上皮細胞層の電気抵抗を顕著に低下させた細胞層では、Di-CSの透過量が顕著に増加した。これらの結果から、Di-CSの透過経路として最も可能性が高いのは細胞間拡散であると考えられた。透過性に硫酸基がどのように関わるかを、3種の異なるタイプのDi-CS、すなわちDi-4S、Di-6S および Di-0Sの標品を用いて解析した結果、透過性に関して、CSの硫酸基の有無やその結合部位は重要な要因ではないことが示唆された。

第2章では、TLRのリガンドによって誘導される、マクロファージ様細胞からの炎症性サイトカインIL-6分泌亢進に及ぼすCSやそのオリゴ糖の影響を調べている。マクロファージ様細胞J774.1を各種のTLRリガンドで刺激した時、TLR1/TLR2, TLR3, TLR4 およびTLRに対する刺激は、細胞からのIL-6分泌を亢進した。一方、CSやそのオリゴ糖は、このIL-6分泌亢進を抑制する作用を示した。CpGによって誘導されるIL-6分泌に対し、未分解のCSではCS-Cが強い抑制活性を持つこと、低分子CSではCS-A由来のものが強い抑制作用を持つこと、2糖類ではDi-6SやDi-0Sに比べてDi-4Sが顕著に高いIL-6分泌抑制作用を示すことなど、明確な構造依存性が認められた。なお、硫酸基の有無は活性に必須ではないことも示唆された。

第3章では、CpGで誘導されるIL-6分泌に及ぼすCSの抑制効果を、主にDi-CSに注目してその作用機構の面から解析している。Di-CSはIL-6の分泌だけでなく、IL-6mRNA発現も抑制し、その抑制作用点がIL-6遺伝子の転写段階よりも上流に存在することが示唆された。IL-6転写の上流にあるMyD88-依存的な炎症反応のシグナル伝達経路にDi-CSが影響を及ぼすかどうかを、その初期段階に関わる分子IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)の分解への影響という視点から検討したところ、IRAK1の分解はDi-CSによって顕著に抑制され、これがCSによるIL-6分泌抑制の分子機構の一つと考えられた。一方、TLR9リガンドであるCpGにDi-CSが直接結合してしまう可能性、CpGが誘導するJ774.1細胞の食細胞活性にDi-CSが影響を及ぼす可能性、Di-CSsがCpGの細胞内移行に影響を与える可能性はいずれも否定されたが、Di-4Sを用いた免疫沈降試験によって、Di-4Sが細胞内でのCpGとTLR9の相互作用を妨害していることが示され、これが作用点の一つとなっていることが示唆された。マクロファージなどの表面に存在するマンノース受容体に存在するCS結合ドメインがTLR9分子にも存在することから、Di-CSは、これを介してTLR9と直接結合し、CpGのTLR9への結合を競合的に抑制するという仮説が最後に述べられている。

以上要するに、本研究は、炎症抑制作用が期待されている食品成分コンドロイチン硫酸がマクロファージの炎症性サイトカイン分泌亢進を抑制する現象を見出し、その作用機構の一端を分子レベルで解析したもので、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。