

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 申 喜淳
指導教員名 清水 誠

論文題目 Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid in intestinal epithelial cells
(腸管上皮細胞におけるクロロゲン酸の抗炎症効果)

近年、従来の栄養素の供給源としての機能だけではなく、病気の予防などに関わる生体調節機能を持つ食品が注目を集めている。このような機能性食品は、癌、糖尿病、高血圧といった生活習慣病を予防するための重要なアイテムとなることが期待されており、社会的に大きな注目を集めている。一方、近年、食生活の変化に伴って消化管に関する疾患が急激に増加している。中でも潰瘍性大腸炎及びクローン病に代表される炎症性腸疾患は、爆発的な増加が見られ今後もその増加が懸念される疾患である。また炎症性腸疾患は、やはり近年増加の一途を辿り近い将来死因の第一位を占めることが予想される大腸癌のリスクファクターでもあり、炎症性腸疾患の予防・改善は大腸癌の予防・改善にもつながる。このような背景のもと、食品による炎症性腸疾患の予防・改善は、21 世紀に人々が健康な暮らしをおくる上で必要不可欠であると思われる。炎症性腸疾患では、酸化ストレスや炎症性サイトカインなど様々な刺激が腸管上皮細胞に作用し、それらの刺激によって炎症性サイトカインである interleukin 8 (IL-8) が過剰に分泌される。IL-8 は好中球などの免疫細胞を誘引し、誘引された免疫細胞から分泌される活性酸素

種や炎症性サイトカインは再び腸管上皮細胞に作用する、といった炎症ループが腸炎症の病態を悪化させていると考えられる。

そこで本研究では、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどによって腸管上皮細胞から分泌が誘導される IL-8 に注目し、コーヒーなどに多く含まれるポリフェノール的一种であるクロロゲン酸とその代謝物が IL-8 産生に及ぼす影響について検討するとともに、その機構を解析することとした。

第一章. 腸管におけるクロロゲン酸及びコーヒー酸の抗炎症作用

実際の炎症性腸疾患の発症時には、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどが同時に腸管上皮細胞を刺激することから、本研究では酸化ストレスとして過酸化水素 (H_2O_2)、炎症性サイトカインとして tumor necrosis factor alpha (TNF- α) を用い、ヒト結腸癌由来の腸管上皮モデル細胞である Caco-2 細胞に同時刺激することで実際の炎症性腸疾患と近い実験系を構築した。刺激の条件としては 2 mM の H_2O_2 で 30 分間、10 ng/ml の TNF- α で細胞を 24 時間同時刺激し、これによって誘導される IL-8 分泌量を ELISA 法で測定した。その結果、 H_2O_2 と TNF- α の同時刺激によって誘導された IL-8 分泌は、単独刺激によって誘導された IL-8 分泌に比べ、非常に高い IL-8 分泌量を示した。この相乗効果は IL-8 のタンパクレベルだけではなく、mRNA 及び転写レベルでも確認された。また H_2O_2 と TNF- α の同時刺激によって誘導された IL-8 産生亢進は mitogen-activated protein kinases (MAPKs) のシグナル経路ではなく、nuclear factor kappa B (NF- κ B) のシグナル経路を介していることが NF- κ B の転写活性、NF- κ B のサブユニットである p65 の核内移行を確認することで明らかとなった。このことから IL-8 が産生される炎症性腸疾患の機構には NF- κ B のシグナル経路が深く関与し、重要であることが示唆された。

そこでこの実験系を用いて、クロロゲン酸とその代謝物が IL-8 産生に及ぼす影響について検討することとした。その結果、クロロゲン酸は H_2O_2 と TNF- α の同時刺激によって誘導された IL-8 産生を抑制した。またクロロゲン酸の代謝物であるコーヒー酸とキナ酸を調べた結果、コーヒー酸は強い抑制効果を示した反面、キナ酸には IL-8 産生を抑制する効果は認められなかった。さらに dextran sulfate sodium (DSS) によって誘導される大腸炎マウスモデルを用いて、クロロゲン酸とコーヒー酸の影響を調べた。C57BL/6 マウスをコントロール群、DSS 群、クロロゲン酸-DSS 群、コーヒー酸-DSS 群の四群に分け、クロロゲン酸-DSS 群にはクロロゲン酸、またコーヒー酸-DSS 群にはコーヒー酸を、DSS を投与する一週間前から胃内強制投与した。その後、大腸炎を誘発するために、DSS 群に 3% の DSS を 8 日間自由摂取させ、クロロゲン酸-DSS 群とコーヒー酸-DSS 群には引き続き

クロロゲン酸とコーヒー酸の投与を行った。実験開始 15 日間後にマウスを解剖に供し、大腸炎の指標として体重変化、下痢、血便、結腸の長さ、組織学的変化、炎症性サイトカインを測定した。その結果、DSS によって誘導された体重減少、下痢、血便、結腸の収縮といった大腸炎の症状が、クロロゲン酸及びコーヒー酸投与群では有意に軽減された。さらにクロロゲン酸とコーヒー酸投与群では、DSS によって誘導された粘膜及びクリプトの損傷やリンパ球の浸潤などが改善され、特にクロロゲン酸投与群では炎症性サイトカインである MIP-2、IL-1 β などの mRNA 発現が強く抑制されることが認められた。

以上より、クロロゲン酸とその代謝物であるコーヒー酸は *in vitro* で H₂O₂ と TNF- α によって誘導された IL-8 産生を抑制するとともに、*in vivo* で DSS によって誘導された腸炎症を予防する効果を示し、腸管におけるクロロゲン酸及びコーヒー酸の抗炎症作用が認められた。

第二章. 腸管上皮細胞におけるクロロゲン酸及びコーヒー酸の抗炎症機構の解析

第一章で見出された腸管におけるクロロゲン酸とコーヒー酸の抗炎症作用に対し、その作用機構を解析することとした。第 1 章では H₂O₂ と TNF- α の同時刺激を用いたが、H₂O₂ と TNF- α の相乗作用があることからその機構の解析がより複雑になると判断し、まずそれぞれ単独で刺激した際の IL-8 産生亢進に対するクロロゲン酸とコーヒー酸の作用を検討した。その結果、TNF- α によって誘導された IL-8 産生においてクロロゲン酸とコーヒー酸は抑制する効果はみられなかったが、H₂O₂によって誘導された IL-8 産生においてクロロゲン酸とコーヒー酸は抑制する効果が認められた。さらに IL-8 の mRNA 発現量、転写活性までクロロゲン酸とコーヒー酸が抑制することを見出した。次に IL-8 発現の上流に位置する転写因子である NF- κ B に注目し、その転写活性と p65 の核内移行への影響を調べた。その結果、クロロゲン酸とコーヒー酸は H₂O₂によって誘導された NF- κ B の転写活性及び p65 の核内移行を抑制し、さらにいずれも I kappa B kinase (IKK) のリン酸化を抑制した。しかしながら NF- κ B を活性化することが知られている TNF- α に対してはクロロゲン酸とコーヒー酸は抑制する効果を示していなかったことから、次に H₂O₂によって特異的に誘導される protein kinase D (PKD) の活性に対する作用を調べた。その結果、クロロゲン酸とコーヒー酸は H₂O₂によって誘導される PKD のリン酸化を抑制した。PKD の活性化には細胞内の reactive oxygen species (ROS) が関与していることから細胞内の ROS を調べた結果、クロロゲン酸とコーヒー酸は H₂O₂によって誘導された細胞内の ROS を除去することが見出された。つまり、クロロゲン酸とコーヒー酸は腸管上皮細胞において酸化ストレスによ

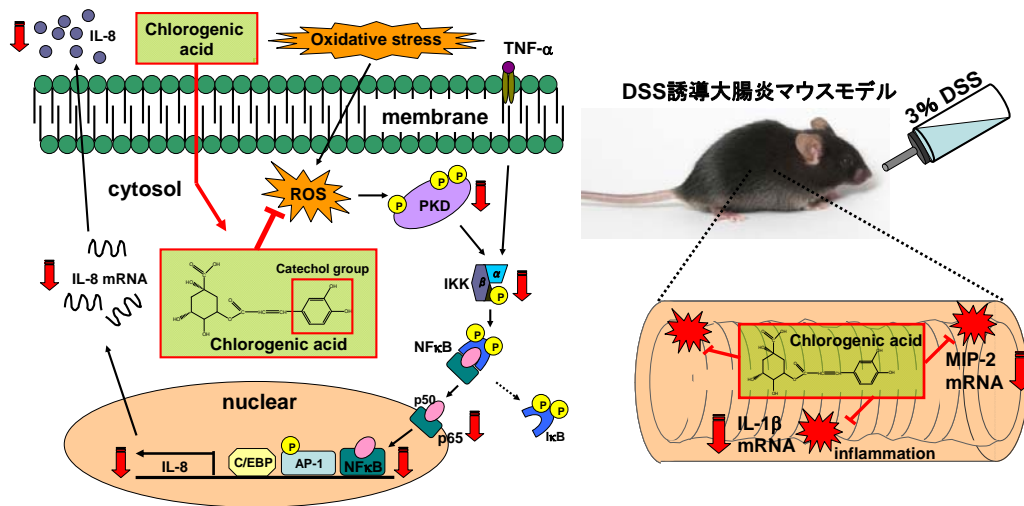
て産生された細胞内の活性酸素を除去することでIL-8産生亢進を抑制することが明らかとなった。

またクロロゲン酸とコーヒー酸の抗炎症効果をもたらす化学構造の活性部位を調べるため、構造類似体を用いて構造活性相関の解析をおこなった。その結果、クロロゲン酸とコーヒー酸がIL-8を抑制する抗炎症作用を示すにはカテコール基が必須であることが明らかとなった。さらにカテコール基を含む構造類似体であるプロトカテキ酸とジヒドロキシカフェ酸はH₂O₂によって誘導されたIL-8を抑制する効果を示し、その抑制効果の強さはジヒドロキシカフェ酸≦クロロゲン酸<コーヒー酸<プロトカテキ酸であることが示された。これらの抗炎症能は完全に抗酸化能とは一致しないが、抗炎症、抗酸化能にはカテコール基が重要であることが明らかとなった。

クロロゲン酸とその代謝物であるコーヒー酸は、コーヒーをはじめ多くの日常的な食品に含まれているので、本研究で見出されたクロロゲン酸とコーヒー酸の抗炎症作用は、これらの食品に新しい付加価値を与えるとともに、新規な抗炎症食品の開発などにも役立つものと期待される。

< *in vitro* study >

< *in vivo* study >



< 腸管におけるクロロゲン酸の抗炎症作用 >