

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 申 喜淳

近年、食生活の変化に伴って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が急激に増加している。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、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、さらに活性酸素種や炎症性サイトカインを産生誘導し、腸炎症の病態を悪化させていると考えられる。本研究は、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フェノールカルボン酸であるクロロゲン酸が細胞の IL-8 産生に及ぼす影響について検討するとともに、その機構を解析したもので、2章からなる。

第1章第1節では、酸化ストレスとして過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、炎症性サイトカインとして tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ を用い、ヒト結腸癌由来の腸管上皮細胞株である Caco-2 を同時に刺激することで実際の炎症性腸疾患時の細胞と類似した実験系を構築した。

第2節では、この実験系を用いてクロロゲン酸が IL-8 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、クロロゲン酸は  $\text{H}_2\text{O}_2$  と TNF- $\alpha$  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 IL-8 産生抑制効果を示した反面、キナ酸には効果は認められなかった。一方、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。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 $\beta$  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、クロロゲン酸及びコーヒー酸は *in vitro* で  $\text{H}_2\text{O}_2$  と TNF- $\alpha$  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2章第1節では、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。その結果、TNF- $\alpha$  によって誘導される IL-8 産生についてはクロロゲン酸とコーヒー酸は抑制効果を示さなかったが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導された IL-8 産生についてはクロロゲン酸とコーヒー酸で抑制される効果が認められた。さらに IL-8 の mRNA 発現量、転写活性もクロロゲン酸とコーヒー酸で抑制されることを見出した。次に IL-8 発現の上流に位置する転写因子である NF- $\kappa$ 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導される NF- $\kappa$ B の転写活性及び p65 の核内移行をいずれも抑制し、さらに I kappa B kinase (IKK)

のリン酸化も抑制した。次に  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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、酸化ストレス刺激を受けた腸管上皮細胞内で産生された活性酸素を除去することで上皮細胞における IL-8 産生亢進を抑制することが明らかとなった。

第 2 節では、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、各種の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細胞の IL-8 産生を抑制する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。

本研究は、食品成分であるクロロゲン酸及びコーヒー酸が腸管上皮細胞における炎症性サイトカイン IL-8 の分泌亢進を抑制することを見出し、DSS マウスモデルにおいてこれらの大腸炎予防・改善効果を検証するとともに、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。