

2010. 7

特集号



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

## 高知大学学位授与記録第四十二号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 118 号	大野 清二	Enhanced expression of toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus (口腔扁平苔癬患者の病変部組織および末梢血単球において Toll-like receptor 2 の発現は増強している)	1
甲医博第 119 号	高橋 由人	Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb (ムスカリン受容体 1 型 (M1) 刺激は、おそらく KCNQ/Kv7 チャンネルを閉じる作用によって、GABA の自発的放出をマウス副嗅球樹状突起間シナプスで増加させる)	7

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第11号	何 文斐	<p>Inhibitory Effects of Ginsenosides from the Root of <i>Panax ginseng</i> on Stimulus-Induced Superoxide Generation, Tyrosyl or Serine/Threonine Phosphorylation, and Translocation of Cytosolic Compounds to Plasma Membrane in Human Neutrophils  (刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生, タンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化と細胞質因子の細胞膜への移行に対する <i>Panax ginseng</i> の根から分離した ginsenosides の阻害効果)</p>	12

氏名(本籍)	大野 清二 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第118号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年4月30日
学位論文題目	Enhanced expression of toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus (口腔扁平苔癬患者の病変部組織および末梢血単球において Toll-like receptor 2 の発現は増強している)
発表誌名	The Journal of Dermatology (in press)

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	福島	敦樹

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏 名 大野清二

## 論文題目

Enhanced expression of toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus (口腔扁平苔癬患者の病変部組織および末梢血単球において Toll-like receptor 2 の発現は増強している)

(論文要旨)

【目的】口腔扁平苔癬 (OLP) は中高年の女性を中心に比較的高頻度に認められる慢性炎症性疾患で、時に悪性化を来すことがあるものの、その病因は未だに明らかにされていない。近年、病原体認識に必須の受容体である Toll-like receptor (TLR) が自然免疫のみならず獲得免疫にも影響を及ぼし、種々の炎症性疾患を中心とした病態の発症・進展に関与していることが明らかになってきている。そこで、OLP の発症および病態形成に TLR を介するシグナルが関与しているか否かについて検討した。




【材料および方法】OLP 病変部組織 (10 例) および正常口腔粘膜組織 (5 例) を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行うとともに、TLR2 および TLR4 の mRNA 発現を半定量 RT-PCR 法にて確認した。さらに、OLP 病変部組織 (計 32 例、網状型: 22 例、びらん・潰瘍型: 10 例) および正常口腔粘膜組織 (5 例) における TLR2 蛋白および TLR4 蛋白の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。これらとともに、OLP 患者 (計 10 例、網状型: 5 例、びらん・潰瘍型: 5 例) および健常人 (5 例) より分離した末梢血単球における TLR2 および TLR4 の発現をフローサイトメトリー法にて検討するとともに、分離した単球をリポポリサッカライド (LPS) あるいはペプチドグリカン (PGN) の存在下で 24 時間培養した後、培養上清中に産生された IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4 および IL-10 量を ELISA 法にて測定した。

【結果】cDNA マイクロアレイ解析の結果、OLP 病変部組織において正常口腔粘膜組織の 1.0 倍以上のシグナル強度を示した TLR 遺伝子は TLR1、TLR2、TLR3、TLR5、TLR6 および TLR10 で、逆に 1.0 倍未満のシグナル強度を示した TLR 遺伝子は TLR4、TLR7、TLR8 および TLR9 であった。さらに、半定量 RT-PCR 法による解析においても、OLP 病変部組織における TLR2 mRNA の発現はほとんどの症例で正常口腔粘膜組織に比べ有意に増強していた。OLP 病変部上皮の有棘層における TLR2 蛋白の発現は正常口腔粘膜上皮に比べて有意に増強しており、OLP 病変部に浸潤した単球は TLR4 蛋白よりも TLR2 蛋白を有意に強く発現していた。しかし、OLP 病変部上皮および浸潤単球における TLR2 の発現強度と OLP の臨床病型との間には関連は認められなかった。OLP 患者の末梢血単球は健常人のものと同様に TLR2 および TLR4 を強く発現していたが、OLP 患者の臨床病型と TLR2 および TLR4 の発現強度との間には関連は認められなかった。LPS あるいは PGN 処理した OLP 患者の末梢

血単球は、健常人の単球に比べ IL-12 産生が亢進し、逆に、IL-10 産生は減弱していたが、IFN- $\gamma$  および IL-4 産生に差は認められなかった。

【考察】 OLP 患者では病変部の上皮細胞および浸潤単球、さらには末梢血単球における TLR2 の発現が増強するとともに、LPS あるいは PGN で処理した末梢血単球からの Th1 サイトカイン産生の増強および Th2 サイトカイン産生の低下が認められた。これらのことより、OLP 患者においては TLR2 の発現亢進を介して Th1/Th2 バランスが Th1 優位にシフトしており、これが OLP 発症および病態形成に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	大 野 清 二
審 査 委 員	主 査 氏 名	宇 高 恵 子 
	副 査 氏 名	佐 野 栄 紀 
	副 査 氏 名	福 島 敦 樹 

題 目    Enhanced expression of toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus  
 (口腔扁平苔癬患者の病変部組織および末梢血単球において Toll-like receptor 2 の発現は増強している)

著 者    Seiji Ohno, Yoshihisa Tateishi, Yukihiro Tatemoto, Keiko Morishita, Eri Sasabe, Tetsuya Yamamoto

発表誌名、巻 (号)、ページ (    ~    ),    年 月  
 The Journal of Dermatology,    (in press)

### 要 旨

大野清二さんの学位審査は、平成 22 年 4 月 7 日 17 時より、約 1 時間にわたって行いました。まず、公開で研究内容の発表と審査を行いました。

#### [目的]

口腔粘膜の扁平苔癬(OLP)の発症には自己免疫機序が疑われているが、その発症機序はわかっていない。大野さんは、扁平苔癬患者のマクロファージ・単球系の細胞の活性に注目した。まず、頬粘膜を採り、DNA アレイを使った網羅的な遺伝子発現解析を行って、OLP と健常人の比較をした。その結果、やや差がありそうな異物認識レセプターである TLR の TLR2、TLR4 に注目して研究を進め、抗原提示細胞である単球が誘導するサイトカイン環境の違いを OLP と健常人とで比較、推測した。

#### [材料と方法]

OLP の口腔粘膜組織を採取して total RNA を抽出し、cDNA を作製して、DNA マイクロアレイに hybridize させ、網羅的な遺伝子発現パターンを半定量解析した。蛋白質としての発現

は、TLR2、TLR4に注目して頬粘膜の免疫組織染色を行った。末梢血単球における発現は、蛍光染色をして flow cytometer により調べた。最後に、末梢血単球を単離して、TLR のリガンドを加えて刺激培養し、分泌されたサイトカインの定量をサンドイッチ ELISA 法にて行った。

#### [結果と考察]

まず、DNA マイクロアレイを使って、OLP 患者と健常人の頬粘膜組織の網羅的な遺伝子発現パターンの定量解析を行い、健常人と比較した。調べた遺伝子の中で、今回はマクロファージ・単球系の細胞の異物認識レセプターである TLR1-TLR10 の発現に注目した。OLP では、TLR1、2、3、5、6、10 の発現がやや高い傾向がみられた。TLR7、8、9 はやや低い傾向がみられた。一方、TLR4 の発現には差がなかった。

そこで、口腔粘膜の常在細菌を認識する TLR2、TLR4 に絞って以降の研究を進めた。健常人の頬粘膜と病変部頬粘膜の total RNA をもとに、TLR2、TLR4 特異的 primer pair を使って、RT-PCR 法により 35 サイクル後の増幅産物の半定量をしたところ、マイクロアレイ解析の結果に一致して、OLP では TLR2 の発現がやや高い症例が半数強、観察された。TLR4 の発現には一定した差がなかった。

そこで次に、病変部における TLR2、4 の蛋白質としての発現をみるため、免疫組織染色を行った。健常粘膜、OLP 粘膜のいずれにおいても、TLR2、TLR4 を発現する細胞は、重層扁平上皮の基底細胞、および、上皮内に侵入した CD68 陽性のマクロファージが主体であった。健常頬粘膜に比べて OLP では、TLR2 の発現がやや高い傾向があり、特に上皮内に侵入したマクロファージでの TLR2 の発現が強かった。扁平上皮での TLR2 発現は、OLP では、基底層のみならず、有棘細胞層にも及んでいる症例が多く(健常人の 20%に比べ、78%で陽性)観察された。TLR4 の発現の差ははっきりしなかった。OLP の病型による TLR2 の発現の違いは、この症例数では、はっきりとはみられなかった。

さらに、OLP 症例と健常人でマクロファージ・単球系細胞の反応性に差があるかどうか、末梢血から単球を取り出し、flow cytometry により、TLR2、TLR4 の発現を比較した。その結果、OLP 患者では、健常人より、TLR2、TLR4 が高発現されている症例の割合が大きかった。そこで、末梢血単球の反応性に違いがないかどうか、in vitro の刺激培養系で、peptidoglycan あるいは LPS によるサイトカイン産生量の比較を行った。その結果、OLP の単球では、IL-12 が高めに産生される傾向がうかがわれたものの、Student の t テストで有意差が出るほどの差は観察されなかった。一方、IL-10 の産生については、OLP では、健常者の単球に比べ、有意に分泌量が少なかった。このことから、OLP 患者の末梢血では、Th1 が Th2 に比べて優位なサイトカイン環境にあることが示唆された。末梢血単球の蛍光染色により確認された OLP 患者での TLR2、TLR4 の高発現は、これらのサイトカイン分泌を反映したものであるかもしれない。

#### [審査員からの批評と議論]

以上の発表に対し、審査員からは、まず、OLP の疾患としての位置づけについて、自己-非自己の識別に問題のある疾患群としてとらえた研究であるのか、抗原の識別には問題が



ないが、反応性が過剰になることが問題となる慢性炎症性疾患群としてとらえた研究であるのか、確認があった。OLP は GVHD の際にもみられることから、両者の性質がいくらか交錯した疾患群であることが予想されるが、実験をデザインする上での姿勢が問われた。

テクニカルな議論としては、それぞれの実験について、データの解釈について用心が必要であることがコメントされた。特に、微量な mRNA を増幅して半定量を行う DNA マイクロアレイ解析では、数倍以上の差がなければ、有意と解釈できないことが一般的であり、2倍以内での変化の詳細を追う危険性について意見が寄せられた。また、局所で抗原にさらされる以前の、末梢血単球の活性を調べることの意義や、病勢との関連について質問があった。解析方法については、T細胞、NK細胞からしか分泌されない IFN- $\gamma$  の測定をすることの意味、測定をしたサイトカインを選んだ根拠などについて質問が出た。これらの質問に、申請者である大野先生はおおむね適切な応答をし、研究の詳細について説明をすることができた。

OLP は、自己反応性の疾患の中では、比較的多い疾患であるにもかかわらず、その病因や病理学的機序が明らかになっておらず、具体的に切り込んだ研究にも前例が乏しい。このように研究方法にも、疾患の理解についても十分な手がかりがない現状で、入手できる試料を用いて半定量的な分子レベルでの解析を行い、サイトカインバランスの偏りに手がかりを見つけたことは、高知大学博士(医学)の学位を授与するに値する研究であると、審査員一同、判断いたしました。

氏名(本籍)	高橋 由人(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第119号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成22年6月30日
学位論文題目	Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb (ムスカリン受容体1型(M1)刺激は、おそらくKCNQ/Kv7チャンネルを閉じる作用によって、GABAの自発的放出をマウス副嗅球樹状突起間シナプスで増加させる)
発表誌名	Brain Research 1339 (2010), 26-40

審査委員	主査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	井上	新平

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 高橋 由人

## 論文題目

Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb  
(ムスカリン受容体 1 型 (M1) 刺激は、おそらく KCNQ/Kv7 チャンネルを閉じる作用によって、GABA の自発的放出をマウス副嗅球樹状突起間シナプスで増加させる)

(論文要旨)

本研究では、アセチルコリンがマウス副嗅球 GABA 作動性シナプスの自発活動に及ぼす影響とその機構について、電気生理的手法 (パッチクランプ法) を用いて検討した。

副嗅球はフェロモン感覚神経から入力を受け、中枢神経系に属する。副嗅球は単なる中継点ではなく、フェロモン情報の統合や貯蔵といった高次の機能を有することが示唆されている。副嗅球は 3 層の構造にそれぞれ 1 種類の細胞という単純な解剖が特徴的で、大脳皮質などのより複雑な中枢神経系の機能を解明するきっかけとなる場所としても期待される。アセチルコリン作動性神経は前脳基底部核群や視床下部から大脳皮質へ投射され、注意や記憶などを促す働きが示唆されている。副嗅球へも同様にアセチルコリン作動性神経が投射され、受容体の発現も確認されているが、その機能はまだ明らかにされていない。




副嗅球の僧帽細胞は樹状突起の先端でフェロモン感覚神経から入力を受けるが、樹状突起において顆粒細胞の樹状突起と多数の樹状突起間シナプスを作っている。顆粒細胞からの入力は GABA 作動性シナプスで、その自発活動が僧帽細胞からパッチクランプ法により自発性抑制性シナプス後電流 (mIPSC: miniature inhibitory post synaptic current) として観察することができる。すでに副嗅球の mIPSC の頻度がノルアドレナリン $\alpha_1$  受容体や代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の刺激で増加することが知られている。いずれも細胞内伝達がフォスホオリパーゼ C (PLC) を介すると想定され、一方アセチルコリン受容体でも細胞内伝達が PLC を介するもの (M1, M3, M5) があるため、アセチルコリン受容体刺激でも mIPSC の頻度が増加すると仮説をたてた。

副嗅球のスライスを作製し、パッチクランプ法により僧帽細胞から mIPSC を観察した。アセチルコリンの作用を持つカルバコールを投与すると、予想どおり mIPSC の頻度が増加した。カルバコールは僧帽細胞の GABA に対する感受性には影響なかった。グルタミン酸受容体の拮抗薬の存在下でもカルバコールにより mIPSC の頻度は増加した。ムスカリン受容体 M1 と M4 の拮抗薬 pirenzepine はカルバコールの作用を抑制した。一方 M2 と M4 の拮抗薬 himbacine あるいは M3 の拮抗薬 himbacine の存在下ではカルバコールにより mIPSC の頻度が増加した。KCNQ カリウムチャンネルを開く作用を持つ

retigabine あるいは diclofenac はカルバコールの作用を抑制した。一方 KCNQ カリウムチャンネルを閉じる作用を持つ XE-911 を投与すると、mIPSC の頻度が増加した。カルバコールで頻度が増加した mIPSC に Ni (200  $\mu$ M) を投与したところ mIPSC は消退し、mIPSC の産生に T 型または R 型のカルシウムチャンネルの関与が疑われた。一方、L 型または T 型の拮抗薬 nimodipine は mIPSC に影響しなかったため、mIPSC の産生に R 型のカルシウムチャンネルの関与が示唆された。これらの結果から、カルバコールは顆粒細胞の樹状突起にあるムスカリン M1 受容体を刺激し、KCNQ カリウムチャンネルを閉じ、GABA 放出部の細胞膜を脱分極させるとともに不安定にしてカルシウムの流入を増やし、GABA 放出を促進したと考えられる。

カルバコールで mIPSC の頻度が KCNQ チャンネルを閉じる作用によって増加することを示唆する報告はすでにあるが、副嗅球のように情報の統合や貯蔵など高次の機能を有することが示唆されている部位では本研究が初めての報告である。アセチルコリンがアルツハイマー型認知症との関係が広く知られている一方、KCNQ チャンネルは良性家族性新生児痙攣 (BFNC: benign familial neonatal convulsions) との関係が報告されている。本研究や我々の用いた実験系は、これらの疾患の理解や治療を大いに進歩させるきっかけとなる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	高 橋 由 人
審 査 委 員	主 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	佐 藤 隆 幸 
	副 査 氏 名	井 上 新 平 

題 目 Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb (ムスカリン受容体1型 (M1) 刺激は、おそらく KCNQ/Kv7 チャンネルを閉じる作用によって、GABA の自発的放出をマウス副嗅球樹状突起間シナプスで増加させる)

著 者 Yoshito Takahashi, and hideto Kaba

発表誌名、巻 (号)、ページ ( ~ ), 年 月  
Brain Research, (in press)

### 要 旨

解剖学的に単純な3層構造を有する副嗅球はマウス等のゲッ歯類において鋤鼻器からのフェロモン情報を上位中枢(扁桃体→視索前野→視床下部→下垂体前葉)に伝達するのみならずその情報を統合・貯蔵することから、ヒトの記憶などのより高次な大脳皮質機能を解明する単純なモデルとして古くから研究されてきた。副嗅球の主細胞である僧帽細胞は樹状突起の先端でフェロモン感覚神経からの入力を受け扁桃体に投射するが、その樹状突起は顆粒細胞(GABA含有神経)の樹状突起と多数の樹状突起間シナプスを形成している(僧帽細胞からの興奮性グルタメート遊離、顆粒細胞からの抑制性GABA遊離)。さらに副嗅球へはアセチルコリン含有神経が投射しているが、その機能はいまだ明らかではない。近年、前脳基底部核群や視床下部から大脳皮質へ投射するアセチルコリン含有神経系が記憶などとの関連で注目されているが、副嗅球にもアセチルコリンにより賦活化されるムスカリン受容体が存在する。そこで今回、副嗅球におけるコリン作動性神経系のフェロモン情報処理における役割を解析した。

実験にはマウス脳から作製した副嗅球スライスを用い、僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間シナプスへのムスカリン受容体刺激薬 charbachol (CCh) の影響を、僧帽細胞からの抑制性シナプス後電流 (mIPSC: miniature inhibitory post synaptic current) を、パッチクランプ法を用いて解析した。

#### 【実験成績】

- ① CCh は mIPSC の頻度を増加し、この反応は GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬 bicucullin により消失した。しかし、CCh は外来性投与 GABA による mIPSC 増加には影響しなかった。また、グルタメート受容体遮断薬の存在下においても CCh は mIPSC を増加した。
- ② ムスカリン受容体 M1/M4 サブタイプの拮抗薬 pirenzepine は CCh の mIPSC 増加作用を抑制した。一方 M2/M4 サブタイプ拮抗薬 himbacine および M3 サブタイプ拮抗薬 4-DAMP は CCh の反応を抑制しなかった。
- ③ KCNQ カリウムチャンネル開口薬である retigabine と diclofenac は CCh の mIPSC 増加反応を抑制した。一方、KCNQ カリウムチャンネル遮断薬 XE-911 は CCh の反応を増強した。
- ④ CCh による mIPSC 増加反応は、電位依存性 T/R 型カルシウムチャンネル遮断作用を有する Ni により抑制された。一方、CCh の反応は L/T 型カルシウムチャンネル遮断薬 nimodipine では影響されなかった。

これらの成績から以下のことが推測される。

副嗅球のコリン作動性神経は、①ムスカリン受容体 M1 サブタイプを介して顆粒細胞樹状突起の KCNQ カリウムチャンネルを閉鎖し、さらに、②膜電位上昇による電位依存性 R 型カルシウムチャンネル開口による GABA 遊離を引き起こす。③顆粒細胞（樹状突起）から遊離した GABA は、僧帽細胞（樹状突起）の GABA<sub>A</sub> 受容体を介して僧帽細胞を抑制する。

本論文は、副嗅球における情報の統合や貯蔵などの機能にコリン作動性神経系が関与することを世界で初めて明らかにしたものであり、今後コリン作動性神経系のアルツハイマー型認知症における役割解明の糸口にもなる貴重な論文である。そこで審査委員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しいものであると認める。

氏名(国籍)	何文斐(中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第11号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成22年4月6日
学位論文題目	Inhibitory Effects of Ginsenosides from the Root of <i>Panax ginseng</i> on Stimulus-Induced Superoxide Generation, Tyrosyl or Serine/Threonine Phosphorylation, and Translocation of Cytosolic Compounds to Plasma Membrane in Human Neutrophils (刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生, タンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化と細胞質因子の細胞膜への移行に対する <i>Panax ginseng</i> の根から分離した ginsenosides の阻害効果)
発表誌名	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(6): 1921-1927, 2008年2月26日

審査委員	主査	教授	宮村	充彦
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	横谷	邦彦

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 何文斐

## 論文題目

Inhibitory Effects of Ginsenosides from the Root of *Panax ginseng* on Stimulus-Induced Superoxide Generation, Tyrosyl or Serine/Threonine Phosphorylation, and Translocation of Cytosolic Compounds to Plasma Membrane in Human Neutrophils.

(刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生, タンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化と細胞質因子の細胞膜への移行に対する *Panax ginseng* の根から分離した ginsenosides の阻害効果)

(論文要旨)

### [目的]

Ginseng の根は古くから色々な病気に対して漢方薬として使用されてきた。その後、Ginseng の根から分離した ginsenosides が抗増殖、抗アレルギー、抗炎症作用等があることが報告された。我々はこれまでに *Diospyros kaki* の葉から分離した triterpenoid 化合物が刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生と同時にタンパク質のリン酸化を抑制することについて報告してきたが、ginsenosides の人好中球の活性酸素産生に対する作用についてはこれまで報告していなかった。そこで、申請者は人好中球の刺激剤で誘導された活性酸素産生、タンパク質のリン酸化、細胞質因子、p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and rac の細胞膜への移行及び抗酸化作用に対する ginsenosides の効果について詳細に研究した。

### [方法]

#### 1) Ginsenosides の抽出と分離

Ginsenosides ; G-Rh<sub>2</sub>, G-Rd, G-Rb<sub>1</sub>, G-Rb<sub>2</sub>, と G-Rh<sub>1</sub> は Dou et al.の方法を用いて *P. ginseng* C. A. Meyer の根茎から分離精製した。これらの化合物の構造式の決定はスタンダードサンプルと FAB-MS 及び <sup>13</sup>CNMR のデータを比較することにより同定した。その純度は 98%以上であった。

#### 2) 好中球の分離

人好中球は健常人の末梢血を Ficoll-Hypaque 液を用いて密度勾配法により遠心分離し、その好中球を Krebs-Ringer リン酸溶液 (KRP) で二度洗浄後、KRP で  $1 \times 10^8$ /ml になるように懸濁し種々の実験に用いた。

#### 3) 活性酸素の測定

Assay mixture は 2ml KRP に  $10^6$  cells/ml, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 20 $\mu$ M cyt. c, 10 mM glucose と 0-200  $\mu$ M の ginsenoside を加えて 3 分間プレインキュベーションした後、刺激剤を加えて 2 波長分光光度計を用いて活性酸素の測定を行った。

#### 4) p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, and rac の好中球膜への移行



分離した好中球と ginsenoside (0-400  $\mu$ M) を 4 mM グルコース、1.2 mM  $MgCl_2$ 、2 mM  $NaN_3$  を含むリン酸 Buffer (1ml) に加えて 37°C で 6 分間プレインキュベートした後、刺激剤 (12.5 nM fMLP、1 nM PMA、10  $\mu$ M AA) を加えて 37°C で 3 分間インキュベートした。その好中球を 4°C、1,500 $\times$ g で 5 分間遠心し、Buffer A (100 mM KCl、3.5 mM NaCl、3.5 mM  $MgCl_2$ 、10 mM Pipes) に懸濁し、0°C で 20 分間放置した。好中球はまず超音波で粉碎し、細胞膜を分離するために 4°C で 20 分間、200,000 $\times$ g で遠心した。そのペレットは 109 mM Tris-HCl (50  $\mu$ l) に懸濁し膜断片を得るために 1 時間超音波処理した。

膜断片は 10%ゲルの SDS - PAGE で泳動し、泳動された蛋白質を Immobilon-P 膜上に移動し、p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> と rac1 のモノクローナル抗体と 2 次抗体で反応し、Western Blotting Detection System で検出した。

#### 5) 好中球タンパク質のチロシンとセリン/スレオニン残基のリン酸化の検出

1 mM  $CaCl_2$ 、10 mM グルコースを含む KRP (1 ml) に好中球と ginsenosides を加えて 37°C で 3 分間インキュベートした。その後、刺激剤を加えて 37°C で 3 分間インキュベートし、その反応液に 45% 三塩化酢酸 0.5 ml を加えて反応を止め、4°C、20 分間、10,000 $\times$ g で遠心分離した。

沈殿物はジエチルエーテルで 2 回洗浄し、2% SDS、0.7M  $\beta$ -メルカトエタノール及び 10%グリセロールを含む 62.5 mM Tris-HCl (50  $\mu$ l) に溶解した。検体は 12%ゲルの SDS-PAGE を行ない、泳動されたタンパク質を Immobilon-P 膜上に移動した。リン酸化された蛋白質はチロシン又はセリン/スレオニンリン酸化特異的モノクローナル抗体と 2 次抗体で反応した後に Western Blotting Detection System で検出した。

#### 6) ヒドロキシラジカルによる赤血球膜ゴーストの脂質過酸化, radical scavenging 及び溶血に対する ginsenosides の作用についても研究した

##### [結果と考察]

*P. ginseng* C. A. Meyer の根茎から 5 個の ginsenosides、G-Rh<sub>2</sub>、G-Rd、G-Rb<sub>1</sub>、G-Rb<sub>2</sub>、と G-Rh<sub>1</sub> が分離同定され、刺激剤で誘導された人好中球における活性酸素産生、タンパク質のチロシンまたはセリン/スレオニン残基のリン酸化と p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> and rac の細胞膜への移行及び抗酸化作用などに対する ginsenosides の効果について研究した。

好中球を ginsenosides とインキュベートすると AA で誘導された活性酸素産生は濃度依存的に抑制された。

G-Rh<sub>2</sub> は fMLP、PMA と AA によって誘導された活性酸素産生を、G-Rh<sub>1</sub> は fMLP で誘導された活性酸素産生を濃度依存的に抑制した。G-Rb<sub>2</sub> は fMLP と PMA で誘導された活性酸素産生をわずかに抑制した。G-Rd と G-Rb<sub>1</sub> は fMLP

と PMA で誘導された活性酸素産生の抑制効果を認めなかった。

Ginsenosides の化学構造と活性酸素産生に対する効果との関係は明らかでないが、ginsenosides の C-3, C-6 又は C-20 に結合している糖の種類と数が刺激剤で誘導された好中球の活性酸素産生の抑制に関与していることが考えられた。

本研究では AA, fMLP と PMA で誘導したタンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化及び p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and rac の細胞膜への移行に対する ginsenosides の効果についても検討した。その結果それらに対する ginsenosides の効果は活性酸素産生に対する効果とよく一致していた。




これらの結果は刺激剤で誘導された好中球の活性酸素酸性に対する ginsenosides の抑制効果はタンパク質のチロシンまたはセリン/スレオニン残基のリン酸化を介して p 47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と rac の膜への移行を抑制することを示していた。次に脂質過酸化を誘導するヒドロキシラジカルに対する ginsenosides の効果について赤血球膜ゴーストを用いて検討した。

G-Rb<sub>1</sub>, G-Rb<sub>2</sub> と G-Rd はゴーストの脂質過酸化レベルを濃度依存的に減少する傾向を示した。DPPH radical scavenging に対する ginsenosides の効果は認められなかった。

これらの研究から ginsenosides は活性酸素イオンをスカベンジングするのではなく、刺激剤で誘導された好中球のタンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化を介して細胞膜への p 47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と rac の移行を抑制することにより、活性酸素の産生を抑制していることが示された。

今後、好中球の活性酸素産生に対する ginsenosides の作用と薬理作用との関係について更に研究することにより臨床応用への発展が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	何 文 斐
審 査 委 員	主 査 氏 名      宮 村 充 彦	
	副 査 氏 名      梶      秀 人	
	副 査 氏 名      横 谷 邦 彦	

題 目      Inhibitory Effects of Ginsenosides from the Root of *Panax ginseng* on Stimulus-Induced Superoxide Generation, Tyrosyl or Serine/Threonine Phosphorylation, and Translocation of Cytosolic Compounds to Plasma Membrane in Human Neutrophils  
 (刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生, タンパク質のチロシン又はセリン/スレオニン残基のリン酸化と細胞質因子の細胞膜への移行に対する *Panax ginseng* の根から分離した ginsenosides の阻害効果)

著 者      WENFEI HE, GANG LIU, XIN CHEN, JINCAI LU, HIDEHIRO ABE, KEXIN HUANG, MASANOBU MANABE, AND HIROYUKI KODAMA

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(6): 1921-1927,  
 2008年2月26日

要 旨

人参(ウコギ科 オタネニンジン *Panax Ginseng* C.A.Meyer の根を乾燥したもの)は、古来より漢方薬の構成生薬として繁用され、強壮薬や免疫調整薬など、様々な疾病に対して使用されている。人参中の薬理活性成分は、現在までに、数多くの化合物が単離・構造決定されている。中でも ginsenosides と総称されるトリテルペンサポニンは、がん細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導作用、抗老化作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用等、様々な薬理作用が報告されている。本論文は、これら ginsenosides の好中球からの活性酸素産生に対する効果及びそのメカニズムについて探究したものである。

好中球が異物などで刺激されると、膜蛋白質であるシトクローム *b-558* と細胞質蛋白質 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac) の膜移行により生成された複合体 (NADPH オキシダーゼ) が活性化され、活性酸素が生成される。申請者等は、これまでに、各種生薬中の有効成分が人好中球における活性酸素産生に対して、どの様に作用するかについて検討しており、既に、*Diospyous kaki*(柿)の葉や *Aralia elata*(タラノキ)の根から分離したトリテルペノイド化合物が好中球の活性酸素産生及びタンパク質のリン酸化を抑制することを報告している。本論文では、繁用生薬でありながら、人好中球の活性酸素産生に対する作用については報告が認められない人参中の ginsenosides について、人好中球よりの活性酸素産生、タンパク質のリン酸化、細胞質蛋白質 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac) の細胞膜への移行及び抗酸化作用等について検討した。

本研究において、人参からの ginsenosides の抽出・単離は、既報の Dou 等の方法にて行った。単離精製した化合物は、標準品との FAB-MS 及び <sup>13</sup>CNMR の機器分析データとの比較により、98%以上の純度で ginsenoside(G)-Rh<sub>1</sub>、G-Rh<sub>2</sub>、G-Rb<sub>1</sub>、G-Rb<sub>2</sub>、G-Rd と同定した。

人好中球の単離は、健常人の末梢血から密度勾配法によって行った。人好中球活性酸素産生に対する ginsenosides の影響は、人好中球含有 assay mixture に 0-200µM の各種 ginsenoside を添加し preincubate 後、各種刺激薬 (fMLP、PMA、アラキドン酸) を加え incubate した反応液について、2波長分光光度計を用いて活性酸素量を測定し、検討した。その結果、アラキドン酸刺激による活性酸素産生は、いずれの ginsenoside を添加した場合も、濃度依存的に抑制された。さらに、G-Rh<sub>2</sub> は、fMLP、PMA 刺激による活性酸素産生を、G-Rh<sub>1</sub> は、fMLP 刺激による活性酸素産生を濃度依存的に抑制した。G-Rb<sub>2</sub> は、fMLP、PMA 刺激による活性酸素産生を僅かに抑制した。一方、G-Rd、G-Rb<sub>1</sub> は、fMLP、PMA 刺激による活性酸素産生の抑制効果を認めなかった。

また、好中球の細胞質蛋白質 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac) の細胞膜への移行に対する ginsenosides の影響は、好中球に各種 ginsenoside を添加し preincubate 後、各種刺激薬を加え incubate した反応液より得た好中球の膜断片を用いて検討した。膜断片の電気泳動による分離とそれぞれの蛋白質の一次モノクローナル抗体及びペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて解析した。さらに、好中球タンパク質のチロシンとセリン/スレオニン残基のリン酸化に対する ginsenosides の影響は、好中球に各種 ginsenoside を添加し preincubate 後、各種刺激薬を加え incubate した反応液を遠心分離して得た沈殿物を用いて検討した。沈殿物を電気泳動し、チロシン又はセリン/スレオニンリン酸化特異的モノクローナル抗体を用いてリン酸化された蛋白質を検出した。その結果、各種刺激薬によって誘導された p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac の細胞膜への移行タンパク質のチロシンとセリン/スレオニン残基のリン酸化とに対する ginsenosides の効果は、好中球活性酸素産生に対する抑制効

果とよく一致していた。

さらに、赤血球ゴーストの脂質過酸化を誘導するヒドロキシラジカルに対する ginsenosides の効果について、人静脈血から作成した赤血球膜ホワイトゴーストを用いて検討したところ、G-Rb<sub>1</sub>、G-Rb<sub>2</sub>と G-Rd は、ゴーストの脂質過酸化レベルを濃度依存的に減少させる傾向を示した。また、radical scavenging に対する ginsenosides の作用について、DPPH ラジカル消去活性及び PMS-NADP system を用いた O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去活性を指標に検討したところ、いずれの ginsenosides も、消去活性は認められなかった。

本研究により、ginsenosides は、radical を scavenging するのではなく、刺激剤で誘導されたタンパク質のチロシンとセリン/スレオニン残基のリン酸化を介して細胞質蛋白質 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, rac) の細胞膜への移行を抑制することにより、活性酸素の産生を抑制していることが示された。また、ginsenosides の化学構造と好中球活性酸素産生に対する効果との関係は、ginsenosides の C-3, C-6 又は C-20 に結合している糖の種類及び数が、刺激剤で誘導された人好中球の活性酸素産生の抑制に関与していると推察される。

人参の有効成分 ginsenosides の臨床応用を視野に入れ、各種 ginsenosides の溶血性について検討したところ、今回、検討した濃度範囲において ginsenosides による溶血への影響は認められなかった。今回の研究結果を基に、好中球の活性酸素産生に対する ginsenosides の作用と人参の多様な薬理作用との関係について、更に詳細に研究することにより、臨床応用への発展が期待される。よって、審査員一同は、本論文が高知大学 (医学) の学位授与に値するものと判断する。