

氏 名 酒井 滋企

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲博士第 832 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 平成 3 1 年 3 月 8 日

学 位 論 文 題 目 Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, prevents development of dextran sulphate sodium - induced murine colitis.

(デキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎に対するアスタキサンチンの効果についての検討)

審 査 委 員 主査 教授 寺田 智祐

副査 教授 丸尾 良浩

副査 教授 村田 喜代史

論文内容要旨

※整理番号	839	(ふりがな) 氏名	さかい しげき 酒井 滋企
学位論文題目	Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, prevents development of dextran sulphate sodium-induced murine colitis (デキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎に対するアスタキサンチンの効果についての検討)		
<p>【目的】炎症性腸疾患 (IBD) は、消化管の慢性炎症を特徴とし潰瘍性大腸炎 (UC) やクローン病 (CD) に代表される疾患群である。IBD の病態生理は依然として不明であるが、これまでの研究では、食物因子と腸内細菌叢に対する過剰な粘膜免疫反応が関与していることが示されている。</p> <p>活性酸素種 (ROS) は酸素代謝により産生される好気性代謝産物であるが、過剰な ROS 生成によって誘導される酸化ストレスは、腸管の炎症応答においても関わっていることが広く知られている。アスタキサンチン (AX) はキサントフィルカロテノイドであり、さまざまな海藻や微生物によって生産される。AX はその分子構造によって、ルテイン、β-カロチンを含む他のカロテノイドよりも高い抗酸化活性を発揮するとされ、IBD に対しても効果が期待される。IBD モデルや IBD 患者における AX の効果は十分に研究されておらず、本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発腸炎に対する AX の効果を検討した</p> <p>【方法】6~8 週齢の雌性 C57BL/6J マウスに 4%DSS を自由飲水させ腸炎モデルマウスを製作した。DSS 投与 7 日前より通常粉末飼料または AX を混合した粉末飼料を自由摂取させた。4 日間 DSS 投与後、6 日後にマウスを解剖し検討を行った。HE 染色を用いて腸炎の活動性を組織学的に評価した。AX の大腸組織における細胞内シグナルに対する効果を Western blot 法と免疫組織化学染色法で検討した。in vitro の検討は大腸上皮細胞株 (HT-29 細胞) を用いて行った。AX の抗酸化作用について、血漿および大腸上皮細胞における酸化物質 (Malondialdehyde (MDA) および 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)) の定量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて検討した。また腸管上皮細胞におけるサイトカイン発現を real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて検討した。</p> <p>【結果】DSS 群と比較して DSS+AX 群では、AX の濃度依存的に体重減少の抑制を認めた。腸管における disease activity index と組織学的スコアは、DSS 群と比較して DSS+AX 群で有意な改善を認めた。また血漿中の MDA および 8-OHdG は、DSS 群と比較して DSS+AX 群では、AX の濃度依存的に抑制され、MDA は大腸上皮細胞においても抑制を認めた。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

大腸組織における免疫組織化学染色では、DSS 群と比較して DSS+AX 群では細胞内への nuclear factor- κ B (NF- κ B) や activator protein (AP)-1 の核内移行が抑制された。また大腸上皮組織から抽出した核蛋白を用いた Western blot 法による検討では、DSS 群と比較して DSS+AX 群で NF- κ B および AP-1 の核内移行が抑制されることが示された。さらに、大腸上皮細胞株 (HT-29 細胞) を用いた *in vitro* の検討においても、AX 投与によって TNF- α 刺激による mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化および NF- κ B および AP-1 の核内移行が抑制され、腸管上皮細胞に作用していることが確認された。大腸組織のサイトカイン発現の検討では、NF- κ B および AP-1 と関連している炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-36 α 、IL-36 γ) の発現が、DSS 群と比較して DSS+AX 群で有意な減少を認めた。

【考察】本研究では IBD に対する AX の効果を検討するために、DSS 腸炎を用いて検討した。酸化ストレスマーカーである MDA および 8-OHdG は、DSS 群と比較して DSS+AX 群において優位に減少していた。AX の抗酸化作用により DSS 腸炎における転写因子 NF- κ B、AP-1、および MAPK リン酸化を含む炎症シグナルの経路が抑制され、炎症性サイトカインの mRNA 発現が低下し、腸炎が改善している可能性が示唆された。

NF- κ B および AP-1 は炎症関連遺伝子の主要な転写因子である。IBD において、酸化ストレスが NF- κ B のシグナル伝達を刺激し、腸管の炎症反応を促進することが報告されている。NF- κ B および AP-1 は細胞質に局在し、炎症刺激により NF- κ B および AP-1 の核内移行が亢進し、炎症関連遺伝子の転写を活性化する。本研究では、免疫組織化学的分析や immunoblot 法による分析により、AX 投与によって転写因子 NF- κ B および AP-1 の核内移行が抑制されることによって DSS 腸炎が抑制されることが示された。さらに、HT-29 細胞を用いた *in vitro* の検討によって、AX が腸管上皮細胞における NF- κ B および AP-1 の核内移行を直接的に抑制していることが示唆された。以上より AX は、NF- κ B および AP-1 の核内移行抑制を介して炎症を改善することが明らかとなった。MAPK (ERK、p38MAPK および JNK) 経路は、これまでの研究により、ROS 刺激の重要な下流シグナル経路であり、その活性化は IBD の病因に関与していることが報告されている。本研究では、DSS 腸炎マウスから単離した腸管上皮細胞を用いて immunoblot 法を行い、AX が MAPK のリン酸化を用量依存的に抑制することを確認した。次に、AX が、腸管上皮細胞における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-36 α 、IL-36 γ) の mRNA の発現を抑制することを示した。またこれらの発現の亢進により NF- κ B 経路を含む細胞内シグナル伝達および MAPK の活性化し、ヒト IBD や腸炎マウスの発症と関連しているという報告もある。以上の結果により AX は、NF- κ B、MAPK シグナル伝達経路の阻害による炎症誘発性サイトカインの発現抑制を介して抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。【結論】AX は、DSS 腸炎を抑制することが示唆された。抑制機序としては、腸管上皮細胞での MAPK 活性化およびその下流の NF- κ B および AP-1 の核内移行抑制を介していることが示され、今後 IBD に対する治療選択肢として考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	839	氏名	酒井 滋企
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>炎症性腸疾患は、発症機序や病態生理に不明な点があるものの、活性酸素種によって誘導される酸化ストレスが病態悪化に関与することが方向されている。そして、高い抗酸化活性を有するアスタキサンチンの経口投与が、炎症性腸疾患の病態に及ぼす影響は未知であった。申請者は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与によって作製した腸炎モデルマウスを用いて、アスタキサンチン経口投与による病態改善作用を検討するとともに、培養細胞を用いて炎症性サイトカインの発現に及ぼすアスタキサンチンの効果について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) アスタキサンチンは、DSS 投与による体重の変化や腸管などの組織学的変化を抑制した。2) アスタキサンチンは、DSS 投与による酸化ストレスマーカーの上昇を抑制した。3) アスタキサンチンは、DSS 投与による炎症性サイトカインの mRNA 発現量上昇を抑制した。4) 培養細胞を用いた検討によって、アスタキサンチンが NF-κB および AP-1 の核移行を抑制することを明らかにした。 <p>本論文は、アスタキサンチンの炎症性腸疾患に関する新規治療薬の可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 543 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 31 年 1 月 28 日)</p>			