

学 位 論 文 要 旨

氏 名	陳 繼華
題 目	DNA マイクロアレイによる抗炎症食品成分の遺伝子発現制御に関する研究 (Gene expression profiling of anti-inflammatory food components in macrophage cells)
<p>抗炎症または免疫能増強の食品・食品成分の探求は近年盛んに行われ、数多く報告されている。これまでに、果物フィセチン、ワサビ 6-MSITC、ウーロン茶テアシネンシン A およびビルベリーアントシアニンが炎症酵素シクロオキシゲナーゼ-2 の発現に対する抑制作用を有することが報告されている。また、これらの成分は、細胞の多くの遺伝子の発現に影響を及ぼすことにより、生体調節機能を発揮すると考えられる。本研究では、これらの 4 種の食品成分のマウスマクロファージ様細胞における抗炎症作用およびそれらの標的遺伝子を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析手法を用いてゲノムワイドで網羅的に遺伝子発現を解析した。その結果、炎症誘導因子である細菌リポ多糖(LPS)で処理した細胞において発現量が 3 倍以上に上昇した遺伝子数の割合は全遺伝子数の 1.8%であり、これらのうち、各種食品成分の添加でその発現量が半分以下に減少した遺伝子数の割合はフィセチンで 70.2%、6-MSITC で 58.6%、テアシネンシン A で 63.8%、そしてアントシアニンで 30.3%であった。一方、LPS 処理で発現が 3 分の 1 以下に抑制された遺伝子数の割合は全遺伝子数の 3.3%であり、このうち、食品成分の添加でその発現量が 50%まで回復した遺伝子数の割合はフィセチンでは 58.2%、6-MSITC で 46.9%、テアシネンシン A で 65.7%、そしてアントシアニンで 51.5%であった。従って、これらの食品成分は、LPS による炎症・アレルギー関連遺伝子の発現上昇を抑制するだけでなく、LPS による生体防御などに関する遺伝子の発現抑制を解除する効果もあることが示唆された。</p> <p>また、遺伝子発現量に 2 倍以上の変化のあった遺伝子を、グループ解析により生物学プロセス、分子機能、細胞内シグナル伝達経路などの 35 種類に分類し、さらに、その中から「生体防御、炎症反応、サイトカイン活性、および受容体活性」に関する遺伝子を同定した。ケモカイン、インターロイキン、およびインタフェロンなどの炎症・アレルギー関連遺伝子の発現量はこれらの食品成分が制御したことが明らかになった。また、一部のサイトカインについては遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認し、さらにそれらの産物タンパク質をアレイシステムで確認した。</p> <p>これらのサイトカイン遺伝子発現の制御に関する分子機序を明らかにするため、シグナル伝達分析システム IPA を用いて、4 種の食品成分による遺伝子発現の制御に関するシグナル伝達経路を解析した。その結果、LPS が細胞膜受容体 TLR4 を介した細胞内シグナル伝達経路を制御することが認められたが、4 種の食品成分がこれらの経路の構成分子である p38、ERK、JNK、NF-κB、および IRF3 のリン酸化を抑制し、サイトカインの産生を阻害することが明らかになった。</p> <p>以上の結果は、果物フィセチン、ワサビ 6-MSITC、ウーロン茶テアシネンシン A、およびビルベリーアントシアニンが TLR4 を介する LPS 誘発性の炎症経路の活性化を抑制することによりケモカイン、インターロイキン、およびインタフェロンなどの炎症・アレルギー関連遺伝子の発現量を制御し、抗炎症作用を発揮することを明らかにした。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名 陳 繼 華

題 目 Gene expression profiling of anti-inflammatory food components in macrophage cells
(DNA マイクロアレイによる抗炎症食品成分の遺伝子発現制御に関する研究)

Recent studies have showed that food or food components can enhance immune function including anti-inflammation. However, the molecular mechanisms are still unclear. In the present study, vegetable fisetin, wasabi 6-MSITC, oolong tea theasinesin A and blue berry anthocyanins, which have been reported to possess anti-inflammatory potency through inhibiting the expression of inflammatory enzyme cyclooxygenase 2, were chose to evaluate the anti-inflammatory function and underlying mechanisms by DNA microarray in mouse RAW264 macrophage cells. The results revealed that, the expressions of 1.8% genes in total 22,050 genes are increased more than 3-fold by inflammatory inducer lipopolysaccharide (LPS) treatment, in which, the ratio that gene expression was to less 50% attenuated by fisetin, 6-MSITC, theasinesin A and anthocyanins was 70.2%, 58.6%, 63.8%, 30.3%, respectively. On the other hand, the expression of 3.3% genes are one-third decreased by LPS-treatment, in which, the ratio that genes expression was restored to 50% by fisetin, 6-MSITC, theasinesin A and anthocyanins was 58.2%, 46.9%, 65.7%, 51.5%, respectively. Therefore, these food components not only inhibited the expression of inflammatory and allergic genes, but also restored the expression of biological defense related genes which decreased by LPS.

Utilizing group analysis, genes that showed more than 2-fold expression changes by food components were classified into 35 categories relating to biological processes, molecular functions, and signaling pathways. The genes were further categorized as “defense, inflammatory response, cytokines activities, and receptor activities”, and most of them were allergic and inflammatory factors including chemokines, interleukins and interferon. Some of them were confirmed at mRNA levels by real-time polymerase chain reaction, and at protein level by suspension array system.

To clarify the signal regulation network of these cytokines, the DNA microarray data were uploaded to the Ingenuity pathway analysis system. The results revealed that three canonical pathways (NF- κ B, MAPK and IRF3 pathway) were activated by LPS, and these food components suppressed the expressions of cytokines through inhibiting the phosphorylation of kinases, such as p38, ERK, JNK, NF- κ B, IRF3 in NF- κ B, MAPK and IRF signaling pathway.

In summary, fisetin, 6-MSITC, theasinensin A and anthocyanins targeted LPS-activated TLR4 inflammatory signaling system and then suppressed the production of inflammatory mediator including chemokines, interleukins and interferon. These data provide the molecular basis for the anti-inflammatory properties of these food components.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	陳 継 華
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 教授 イブラヒムビツヤム
	副査 佐賀大学 教授 渡邊啓一
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 准教授 小松正治
審査協力者	
題 目	Gene expression profiling of anti-inflammatory food components in macrophage cells (DNAマイクロアレイによる抗炎症食品成分の遺伝子発現制御に関する研究)
<p>抗炎症または免疫能増強作用を有する食品成分の探求は近年盛んに行われ、数多く報告されている。これまでに、果物フィセチン、ワサビ6-MSITC、ウーロン茶テアシネンシンAおよびビルベリーアントシアニンが炎症酵素シクロオキシゲナーゼ-2の発現に対する抑制作用を有することが報告されている。また、これらの成分は、細胞の多くの遺伝子の発現に影響を及ぼすことにより、生体調節機能を発揮すると考えられる。本論文では、これらの4種の食品成分のマウスマクロファージ細胞における抗炎症作用およびそれらの標的遺伝子を明らかにするため、DNAマイクロアレイ解析手法を用いてゲノムワイドで網羅的に遺伝子発現を解析した。その結果、炎症誘導因子である細菌リポ多糖(LPS)で処理した細胞において発現量が3倍以上に上昇した遺伝子数の割合は全遺伝子数の1.8%であり、これらのうち、各種食品成分の添加でその発現量が半分以下に減少した遺伝子数の割合はフィセチンで70.2%、6-MSITCで58.6%、テアシネンシンAで63.8%、そしてアントシアニンで30.3%であった。</p>	

一方、LPS 処理で発現が 3 分の 1 以下に抑制された遺伝子数の割合は全遺伝子数の 3.3%であり、このうち、食品成分の添加でその発現量が 50%まで回復した遺伝子数の割合はフィセチンでは 58.2%、6-MSITC で 46.7%、テアシネンシン A で 65.7%、そしてアントシアニンで 51.5%であった。従って、これらの食品成分は、LPS による炎症・アレルギー関連遺伝子の発現上昇を抑制するだけでなく、LPS による生体防御などに関する遺伝子の発現抑制を解除する効果もあることが示唆された。

また、遺伝子発現量に 2 倍以上の変化のあった遺伝子を、グループ解析により生物学プロセス、分子機能、細胞内シグナル伝達経路などの 35 種類に分類し、さらに、その中から「生体防御、炎症反応、サイトカイン活性、および受容体活性」に関する遺伝子を同定した。ケモカイン、インターロイキン、およびインタフェロンなどの炎症・アレルギー関連遺伝子の発現量をこれらの食品成分が制御したことが明らかになった。また、一部のサイトカインについては遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認し、さらにそれらの産物タンパク質をアレイシステムで確認した。

これらのサイトカイン遺伝子発現の制御に関する分子機序を明らかにするため、シグナル伝達分析システム IPA を用いて、4 種の食品成分による遺伝子発現の制御に関する細胞シグナル伝達経路を解析した。その結果、LPS が細胞膜受容体 TLR4 を介した細胞内シグナル伝達経路を制御することが認められたが、4 種の食品成分がこれらの経路の構成分子である p38、ERK、JNK、NF- κ B、および IRF3 のリン酸化を抑制し、サイトカインの産生を阻害することが明らかになった。従って、これらの食品成分は TLR4 を介する LPS 誘発性の炎症経路の活性化を抑制することによりケモカイン、インターロイキン、およびインタフェロンなどの炎症・アレルギー関連遺伝子の発現量を制御し、抗炎症作用を発揮することを明らかにした。

以上の研究は、4 種の食品成分のマクロファージ細胞における遺伝子の発現制御をゲノムレベルで明らかにし、食品成分の抗炎症作用などの分子機構に新たな知見を提供するものである。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	陳 継 華
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 教 授 イブラヒムヒッサム
	副査 佐 賀 大学 教 授 渡邊啓一
	副査 琉 球 大学 教 授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 准教授 小松正治
審査協力者	
実施年月日	平成23年8月1日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答) 筆答	
<p>主査および副査は、平成23年8月1日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

陳 繼 華

[質問 1] 機能性成分により抑制に違いがあるのはターゲットに違いがあるからのか?

[回答 1] 機能性成分により抑制に差がある。フィセチンと 6-MSITC が MAPK と IRF3 シグナル経路の活性化を抑制したが、テアシネンシン A が MAPK と NF- κ B シグナル経路の活性化を抑制した。一方、アントシアニンは 3 つの経路の活性化をすべて抑制した。従って、食品の機能性成分により抑制に違いがあるのはターゲットに違いがあると思う。

[質問 2] ホスファターゼについての検討は行ったのか?

[回答 2] 本論文は主に食品成分のプロテインキナーゼの活性化に対する影響を検討したので、ホスファターゼについては検討していない。

[質問 3] マイクロアレイと qPCR のデータはほとんど一致するのか?

[回答 3] 遺伝子発現の変動傾向は qPCR と DNA マイクロアレイの結果が一致しているが、検出感度は qPCR が DNA マイクロアレイより高いという傾向がある。

[質問 4] DNA マイクロアレイとタンパク質のデータを同時に掲載する必要があるのではないのか?

[回答 4] 生体内に機能しているのはタンパクであるため、同時掲載の必要がある。mRNA の発現とタンパクの産生が一般的に一致するが、mRNA からタンパク質に実際に翻訳されたかどうか、mRNA の安定性の問題をはじめ、多くのことに関わっているので、可能なら同時掲載した方が良いと思う。

[質問 5] RAW264 細胞株はマウスのマクロファージ細胞であるが、ヒトのマクロファージ細胞株がないのか?

[回答 5] ヒトのマクロファージの細胞株はないが、ヒトの単球細胞 (U937, THP-1) を TPA で誘導しマクロファージ細胞に分化させることができる。再現性が難しいという問題があるので、今回の DNA マイクロアレイはマウスマクロファージ RAW264 細胞株を使用した。

[質問 6] IPA 解析にある有意差判定について。

[回答 6] IPA 解析とは遺伝子の発現と生理機能の関連性を解析するものである。用いた統計分析はフィッシャーの正確確率検定という統計法である。フィッシャーの正確確率検定はノンパラメトリックな統計手法で、2つのカテゴリー(実験に発現が変化した遺伝子とデータベースにカテゴリーされた機能)のデータ間にランダムではない相関があるかを統計的に検定するための方法である。本研究は、

サンプルによる発現の変化した遺伝子が生理機能に関わるかどうかについて、この統計法を用いて調べた。

[質問 7] サンプル処理後に LPS 刺激の理由は？

[回答 7] 今回使用したサンプルは食品成分であるため、予防の観点からサンプル処理後に LPS 刺激を行った。

[質問 8] サンプルの水酸基は修飾を受けるか、修飾されたらどのような機能性があるか？

[回答 8] 本研究で用いたポリフェノールサンプルには水酸基がある。一般的にポリフェノールの結合糖が加水分解され、アグリコンが細胞内に入るが、アントシアニンは結合糖が付いたまま吸収されると報告されている。したがって、本研究で用いたフィセチン、テアシネンシン A とアントシアニンはそのまま吸収されると考えられる。機能性については、ポリフェノールの OH 基はフリーラジカルに水素原子を供与し、その生成を抑制することにより抗酸化作用を示す。生体内で過剰に生じたフリーラジカルなどの活性酸素は、細胞膜のリン脂質や血中の脂質を酸化し、さらにタンパク質や核酸に障害を与え、最終的にガンを始めさまざまな病気を引き起こす。ポリフェノールの B 環における OH と galloyl 基が細胞膜のリン脂質分子に結合し、活性酸素による細胞膜のリン脂質の酸化を抑制する。さらに、一部のポリフェノールの OH 基がプロテインキナーゼの ATP サイトに結合し、リン酸化を阻害することによって抗ガンや抗炎症などの生理活性を発揮することも報告されている。

[質問 9] ポリフェノールの吸収率はどのくらいのか？

[回答 9] ポリフェノールは野菜や果物に広く存在しており、ヒトが 1 日に摂取する量は、数 10 mg から約 1 g と推定されている。その吸収率は数パーセントしかないと報告されている。ポリフェノール配糖体は消化管内で腸内細菌により加水分解され、アグリコンとして吸収されるとも報告されている。

[質問 10] 免疫反応を抑えることは本当に良いことか？

[回答 10] 微生物や毒性物質が生体内に侵入すると、それらが生体細胞を刺激させ、自然免疫を引き起こす。短発的な炎症や免疫反応は体に必要な反応であるが、慢性的な炎症や免疫応答がアレルギーや発ガンとつながる。したがって、慢性的な炎症や免疫応答を抑制する必要がある。本研究はこれらの食品成分がこのような慢性炎症に抑制効果があるかどうかを細胞モデルで明らかにするために行った。

[質問 11] サンプルは受容体 TLR4 に直接に結合するか？

[回答 11] 本研究に用いた食品成分は TLR4 と直接結合しないことを確認した。