

論 文 要 旨

***Bidens Pilosa* Suppresses Interleukin-1 β -induced Cyclooxygenase-2 Expression Through the Inhibition of MAPK Phosphorylation in Normal Human Dermal Fibroblasts**

Bidens Pilosa は正常ヒト線維芽細胞において
MAPK を介して IL-1 β 誘発の COX-2 発現を抑制する

吉田 延代

【序論および目的】

Bidens pilosa (BP) Linn. var. *radiata* (和名タチアワユキセンダングサ) は熱帯、亜熱帯地方にみられるキク科の植物で、古来、民間療法に広く使用されてきた。近年、BP の抽出物質の効果について臨床研究がなされ、夏季潰瘍を伴う網状皮斑の潰瘍の予防、血液レオロジー (流動性) の改善、血小板凝集抑制、血糖値の降下、動脈硬化の改善、肝細胞の保護、腎の利尿作用の改善などの多くの臨床効果が報告されている。これらの多彩な効果に関与する共通の因子の同定を目的に本研究を計画した。

炎症反応において最も重要な役割を果たす酵素の一つにシクロオキシゲナーゼ (COX) がある。COX は細胞外からの炎症刺激に反応して、細胞膜リン脂質であるアラキドン酸を基質としてプロスタグランジンやトロンボキサンなどエイコサノイドと呼ばれる炎症のメディエーターを産生する酵素である。エイコサノイドは発熱や血漿滲出などの炎症反応、血管や気管支などの平滑筋の収縮の調節、血小板凝集の調節、腎尿細管における水やナトリウムの排泄の調節など多岐にわたる生理活性を有する。COX には COX-1 と COX-2 二つのアイソザイムがある。COX-1 はほとんどの体細胞で常に発現し生体の恒常性の維持に関わっており、COX-2 は正常時には発現はみられず、炎症刺激などに反応して発現が誘導される。従って疾患と関連するのは主に COX-2 であり実際に、血栓、肝炎、肝硬変、慢性膵炎、糖尿病、腎利尿など多くの病態と COX-2 との関連が報告されている。これらの病態やエイコサノイドの生理活性は BP の臨床効果と COX-2 の関連を強く示唆している。そこで、BP の COX-2 及びその主たる代謝産物であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) に対する効果を *in vitro* で解析し、併せて COX-2 発現調節の機序についても検討した。

【材料および方法】

BP は、沖縄県宮古島で栽培されたタチアワユキセンダングサの葉を細断し熱湯抽出後、乾燥させて粉末化したものを生理食塩水に溶解して使用した。

細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞をイーグル培地 (EMEM) 中で培養、継代して用いた。実験的炎症の起炎症物質としてインターロイキン-1 β (IL-1 β) を用いた。COX-2 の発現と MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化はウエスタンブロッティング法で解析し、PGE₂ の生成量は EIA 法で測定した。

【結果】

- 1) 無刺激状態では COX-1 のみ発現しており、COX-2 は全く発現がなかった。IL-1 β (1 ng/ml) で 18 時間刺激後 COX-1 の発現量はほとんど変化しなかったが、COX-2 の発現が著明に誘導された。
- 2) IL-1 β (1 ng/ml) 刺激後 30 分で MAPK (ERK1/2、p38、JNK) がリン酸化された。特に p38、JNK が著明にリン酸化された。
- 3) ERK1/2、p38、JNK それぞれの選択的抑制剤で IL-1 β による COX-2 の発現は濃度依存性に抑制された。特に p38 の抑制剤 (SB203580) で著明に抑制された。
- 4) *BP* は IL-1 β による MAPK のリン酸化を抑制した。p38、JNK のリン酸化が明らかに抑制された。ERK1/2 のリン酸化の抑制は軽度であった。
- 5) *BP* は IL-1 β 刺激による COX-2 の発現を濃度依存性に抑制した。
- 6) *BP* は IL-1 β 刺激による PGE₂ の産生を濃度依存性に抑制した。

【結論及び考察】

以上の結果は、IL-1 β による COX-2 の発現は MAPK、特に p38 を介しており、*BP* は炎症時の MAPK のリン酸化の抑制を介して、COX-2 発現および PGE₂ 産生を抑制することを示している。COX-2 は PGE₂ 以外にも多様な生理活性を有するエイコサノイドを産生することから、*BP* の COX-2 抑制作用は多彩な臨床効果、薬理作用の機序の一つであると考えられた。

BP 抽出物の成分は構造上、カフェタンニン酸、フラボノイド、ポリアセチレンなどに分類され、これらの中でカフェタンニン酸とフラボノイドには強力な抗酸化作用がある。一方 COX (cyclooxygenase) はペルオキシダーゼ活性も有しており活性酸素を産生する。活性酸素は細胞内の酸化還元状態を乱し種々の疾患の原因となる。また、細胞内の酸化還元状態は COX-2 自体の発現にも影響を及ぼし、抗酸化剤が COX-2 の発現を抑制するとの多くの報告がなされている。以上のことから、*BP* はその抗酸化作用を介して COX-2 の発現を抑制していると考えられた。

本研究の結果は *BP* の薬理効果を裏付けるもので、今後は成分ごとの薬理効果の解析を行なう予定である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第	9号	学位申請者	吉田 延代
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	嶽崎 俊郎	副査	愛甲 孝
	副査	竹内 亨	副査	山田 勝平

***Bidens Pilosa* Suppresses Interleukin-1 β -induced Cyclooxygenase-2 Expression Through the Inhibition of MAPK Phosphorylation in Normal Human Dermal Fibroblasts**

(*Bidens Pilosa* は正常ヒト線維芽細胞において MAPK を介して IL-1 β 誘発の
COX-2 発現を抑制する)

Bidens pilosa (BP)は和名をタチアワユキセンダングサといい、民間療法として使用されてきた。近年、BP の抽出物の効果について臨床研究がなされ、夏季潰瘍を伴う網状皮斑の予防、抗炎症、血小板凝集抑制、血糖値の降下、肝細胞の保護、利尿作用の改善などの多くの臨床効果が報告されている。炎症反応において重要な役割を果たす酵素の一つにシクロオキシゲナーゼ (COX)がある。COX はアラキドン酸を基質としてプロスタグランジンやトロンボキサンなど多岐にわたる生理活性を有するエイコサノイドを産生する酵素である。COX には二つのアイソザイムがあり、COX-1はほとんどの体細胞で常に発現し生体の恒常性の維持に関わっている。対して COX-2 は正常時には発現はみられず、炎症刺激などに反応して発現が誘導される。従って疾患と関連するのは主に COX-2 であり実際に、肝炎、肝硬変、慢性膵炎、糖尿病など多くの病態と COX-2 との関連が報告されている。これらは BP の臨床効果と COX-2 の関連を強く示唆している。そこで、著者らは、BP の COX-2 及びその主たる生成物であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) に対する効果を *in vitro* で解析し、COX-2 発現調節の機序についても検討した。

BP は、沖縄県宮古島で栽培されたものを熱湯抽出後、乾燥させて粉末化したものを生理食塩水に溶解して使用した。細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞を培養、継代して用いた。インターロイキン-1 β (IL-1 β)を用いて実験的炎症を惹起した。COX-2 発現と MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化はウエスタンブロッティング法で解析し、PGE₂ の生成量は EIA 法で測定した。結果を以下に示す。

- 1) COX-1 は恒常的に発現しており IL-1 β で誘導されなかった。COX-2 は無刺激状態では発現はみられず、IL-1 β 刺激で発現が誘導された。
- 2) IL-1 β (1 ng/ml) 刺激後 30 分で MAPK (ERK1/2、p38、JNK) がリン酸化された。特に p38、JNK が著明にリン酸化された。
- 3) ERK1/2、p38、JNK それぞれの選択的抑制剤で IL-1 β による COX-2 の発現は濃度依存的に抑制された。特に p38 の抑制剤 (SB203580) で著明に抑制された。
- 4) BP は IL-1 β による MAPK のリン酸化を抑制した。p38、JNK のリン酸化が明らかに抑制された。ERK1/2 のリン酸化の抑制は軽度であった。
- 5) BP は IL-1 β 刺激による COX-2 の発現を濃度依存的に抑制した。
- 6) BP は IL-1 β 刺激による PGE₂ の産生を濃度依存的に抑制した。

著者らは、IL-1 β による COX-2 の発現は MAPK を介しており、BP は炎症時の MAPK のリン酸化の抑制を介して、COX-2 発現および PGE₂ 産生を抑制することを示した。COX-2 は様々なエイコサノイド生合成の律速段階を担うことから、BP による COX-2 抑制作用は BP の示す多彩な臨床効果、薬理作用に密接に関連すると考えられた。

本研究は、BP が炎症時の MAPK のリン酸化の抑制を介して、COX-2 発現および PGE₂ 産生を抑制することを明らかにして、BP の薬理効果を裏付けたものである。また、本研究は種々の物質の抗炎症効果のアッセイに利用できる点でも意義がある。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 9 号	学位申請者	吉田 延代
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学)
	副査	嶽崎 俊郎	副査 愛甲 孝
	副査	竹内 亨	副査 山田 勝士

主査および副査の5名は、平成18年12月26日、学位申請者 吉田延代 に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *Bidens Pilosa* (BP) は道端や畑に自然に生えている植物だが、動物が食べるのか？

(回答) BPの臨床効果が明らかになってから、牛に与えている農家も存在する。

質問2) 他にはどのような疾患に効果があるのか？

(回答) アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー疾患に対して臨床研究が行われており、効果がある。

質問3) 癌細胞ではCOX-2が発現していることが知られているが、BPと皮膚癌との関係はないのか？

(回答) 我々はCOX-2が癌細胞の増殖を促進することを明らかにしている。BPがCOX-2の発現を抑制することから、癌の増殖を抑制する可能性を考え、皮膚扁平上皮癌の細胞株であるHSC-5を用いて実験を行ったが、この細胞ではCOX-2の発現は抑制されなかった。

質問4) IL-1 β の刺激によるMAPKのリン酸化は30分後に観察しているが、COX-2発現の測定は18時間後に行っている。この時間設定は？

(回答) 一般にキナーゼは30分前後でリン酸化されるので、リン酸化は30分後と1時間後に観察し、30分後で反応がみられた。蛋白は7~8時間後に発現してくると考え、オーバーナイトの18時間後にCOX-2の蛋白を測定した。

質問5) Fig. 4でIL-1 β の刺激より前にBPで処理を行っているが、前後で差があるのか？

(回答) 今回はIL-1 β 刺激の15分前にBPで処理を行った場合のみ検討しており、その他の設定では検討していない。

質問6) 臨床的に考えてCOX-2を抑制することによる弊害はないのか？

(回答) COX-2阻害剤の副作用は胃潰瘍などが知られており、近年はCOX-2選択的阻害剤による心筋障害が問題となっている。BPは様々な臨床研究がおこなわれているが、そのような弊害はない。

質問7) 臨床に応用したときの量と*in vitro*の量とでは差があるのでは？

(回答) *in vitro*で使用した濃度は実際臨床研究で使用されている濃度と近い濃度設定である。

質問8) 炎症を惹起するにあたってIL-1 β を使用した理由は？

(回答) 我々はIL-1 β 刺激によるCOX-2発現の解析のシステムを確立しており、IL-1 β によるCOX-2の発現はMAPKを介しているという報告もあるため、この系をもとに使用した。

質問9) Fig. 6でIL-1 β の刺激なしにPGE₂が産生しているがその理由は？

(回答) 恒常的に発現しているCOX-1によると考えている。

質問 10) 漢方では生産地によって成分の違いがあり、生産地は重要であるが、この実験で使用された BP も宮古島で栽培されていることが重要であるのか？

(回答) 今回は宮古島で栽培された BP を使用して実験しており、他の地域のもは使用していないが、BP でも産地によって成分に違いがあるという報告があり、生産地は重要であると考えます。

質問 11) 実験で使用した BP は市販品であるのか、または自ら抽出したのか？

(回答) BP の抽出物を使用したカンボウ茶という名の健康茶が市販されている。その製造過程で得られる抽出物を譲ってもらった。

質問 12) COX-1 と COX-2 に基質の特異性とか生成物、局在に違いはあるのか？

(回答) COX-1 ではアラキドン酸以外は基質となりにくいが、COX-2 は arachidonylglycerol も基質となる。生成物に違いはないが、炎症の初期には常在している COX-1 が働き、時間が経過すると COX-2 が働く。局在の違いでは、COX-1 が小胞体に局在しているのに対し、COX-2 は核周囲にも局在している。

質問 13) 実験に使用した線維芽細胞の由来は？インフォームドコンセント等含めて倫理的に問題はないか？

(回答) 手術で皮膚を切除した患者の正常皮膚の余りの部分を培養して使用した。今回の実験では、以前培養し、保存していたものを使用した。患者には同意を得ている。

質問 14) 培養液中にアスコルビン酸が含まれているが抗酸化作用を期待するのであれば、入れない方がよいのでは？

(回答) 普段使用している組成の培養液を使用した。アスコルビン酸についてはご指摘のとおりである。

質問 15) MAPK の阻害剤を 3 種類使用しているが、それぞれの阻害剤は特異性があるのか？また、それを確認する追加実験は行っているのか？

(回答) 特異性があるものを選び使用しているが、確認実験は行っていない。

質問 16) BP の原産地は？北限は？

(回答) 中南米が原産である。熱帯、亜熱帯地方に存在する植物であり、本邦では喜界島より南で存在する。

質問 17) 古来より民間療法として使用されているが、実際はどのように使用されていたのか？

(回答) 発熱や疼痛時に煎じて服用されていた。

質問 18) 抗潰瘍効果が期待できるということだが、たとえば褥瘡に対する効果はどうか？

(回答) 網状皮斑 (リベドー) という血管病変を伴う病態における潰瘍に有効である。褥瘡の発生機序は圧迫によるため、BP での予防効果は期待できないと考える。

質問 19) Fig. 2 で ERK のリン酸化を確認する場合 FCS を加えずに無血清の状態で行うべきではないか？

(回答) 10%FCS で培養し、ウェスタンブロットや EIA の前に 1%FCS とした。御指摘の点は重要であるが、細胞周期、細胞増殖の測定ではないので 1% で良いと考えた。

質問 20) Fig. 4 が今回の鍵となる実験であるが、P38、JNK のリン酸化自体が弱いため、論文の説得力が低くなっているのでは？

(回答) 御指摘のとおりである。3 つの MAPK のリン酸化を同条件で検討したところ、ERK1/2 が強く発現されすぎるために結果的に P38、JNK は ERK1/2 と比較して弱いリン酸化の結果しか得られなかった。今後の課題として、無血清の状態で行う等考慮したい。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。