

# 学位論文内容の要旨

論文提出者	鶴田 はねみ
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 二階堂 徹 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典
論文題目	ブラジル産グリーンプロポリスおよびその主要成分が 活性化Tリンパ球のサイトカイン産生に及ぼす作用
【目的】	<p>プロポリスは、ミツバチが生産する天然の樹脂性滲出液として多数の植物抽出物を含み、抗炎症、抗寄生虫、抗真菌、抗腫瘍などの生物学的大および薬理学的作用を發揮することから、各地で民間治療薬として使用されてきた。歯科領域でも、プロポリスと水酸化カルシウムの組み合わせが覆髄や根尖性歯周炎に有効である可能性が示されている。また、プロポリスは複雑な免疫調節作用を有し、細胞系や疾患の種類に応じた様々な生理活性を發揮しうることが知られている。実際にワクチンのアジュバントとして免疫増強作用を示す一方、自己免疫疾患の治療にも効果が期待されている。ブラジル産グリーンプロポリス(BGP)とその主要成分であるアルテピリンC(Art-C)は、移植抗原で活性化されたTリンパ球を阻害し、炎症性サイトカインの発現を抑制することが報告されているが、実際にどのような機構を介して免疫制御するかの詳細については十分に検討されていない。そこで本研究では、活性化Tリンパ球のサイトカイン産生に対するBGPとArt-Cの免疫調節作用を比較し、その調節メカニズムの解明を試みた。</p>
【材料および方法】	<p>BGPは秋田屋本店より供与された。Art-C(富士フイルム和光)、ストア依存性カルシウムチャネルTRPA1に対する特異的阻害剤HC030031(Sigma-Aldrich)、およびカルシウムの細胞内への流入を促進するカルシウムイオノフォアA23187(富士フイルム和光)を用いた。24週齢の雄C3H/HeNマウス(中部科学資材)より、脾細胞を摘出し、400万個の脾細胞を懸濁した10%牛胎児血清含有RPMI培地(Sigma-Aldrich)に様々な希釈倍率または濃度に調製したBGPまたはArt-Cを混合し、抗CD3モノクローナル抗体を固相化した96ウェルプレートに播種した。5%CO<sub>2</sub>存在下37℃で48時間Tリンパ球を特異的に刺激培養した後に上清を回収し、IFN-<math>\gamma</math>、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17の濃度を酵素結合免疫吸着法(ELISA, R&amp;D SystemsまたはBD Bioscience)にて測定した。Art-CによるIL-2産生促進機構を解明するために、脾細胞を、抗CD3モノクローナル抗体を固相化した12ウェルプレートに播種し、Art-C希釈液またはA23187、およびHC030031と共培養し、上清中のIL-2産物をELISAによって測定するとともに、脾細胞のRNAを抽出してIL-2 mRNAレベルを定量的PCRで測定した。IL-2 mRNA発現レベルは、内部コントロールのRPS5発現によって補正した。</p> <p>本実験は朝日大学動物実験専門委員会の審査、承認を得て行った。(承認番号:21-018)</p>

## 【結 果】

1. 刺激脾細胞の生存が十分維持される低濃度域で、BGP および Art-C は共に INF- $\gamma$ 、IL-6、IL-17 産生を抑制したが、IL-4 や IL-10 産生は抑制しなかった。一方、それらは IL-2 産生を顕著に促進した。
2. IL-2 mRNA 発現を経時的に観察すると、コントロール群、Art-C 添加群、A23187 添加群において、3 時間から 12 時間後にかけて上昇したが、これら 3 群間でその発現量に有意な差は認められなかった。
3. IL-2 産生量の変化を経時的に観察すると、コントロール群では、24 時間後にピークとなり、48 時間後には顕著に低下したのに対して、Art-C 添加群では、36 時間後にコントロールよりも有意に高いピークに達し、48 時間後にも 1/2 程度が維持され、A23187 添加群では、12 時間から上昇し 36 時間で Art-C 添加群と同様のレベルに達し、48 時間後でも高いレベルを維持していた。一方、HC030031 存在下では、Art-C 群の産生が最大 74%減少してピークが消失した。

## 【考 察】

Art-C は単独で BGP と同様に活性化 T リンパ球のサイトカイン制御を行うことが示され、免疫制御に係る BGP 成分の中で、Art-C が中心的役割を担うことが示唆された。

さらに Art-C は IL-2 産生を、mRNA 発現レベルでは促進しないが、翻訳または分泌制御レベルで顕著に促進することが示された。この効果は HC030031 存在下で阻害され、また Art-C と同様の促進効果は A23187 の存在下でも引き起こされたことから、Art-C による IL-2 産生促進機構には、TRPA1 チャネルを介した Ca<sup>2+</sup>流入が関与することが示唆された。

## 【結 論】

1. BGP による脾細胞の免疫反応制御において Art-C が中心的役割を担っていることが示された。
2. Art-C は刺激脾細胞の TRPA1 チャネルからの Ca<sup>2+</sup>流入を介して IL-2 産生を促進することが示唆された。
3. Art-C による刺激脾細胞の IL-2 産生促進には、mRNA レベルよりも、タンパク産生又は分泌レベルでの特異的機構が関与することが示された。