

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論文提出者	高橋 萌
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 村松 泰徳 (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 中国産プロポリス主成分のカフェイン酸フェネチルエステルによる 活性化脾細胞の interferon- $\gamma$ 産生の抑制と interleukin-4 および interleukin-10 産生の促進	
<p>著者らはこれまでに、ブラジル産グリーンプロポリス (Brazilian green propolis, BGP) が活性化脾細胞の炎症性サイトカインの産生を抑制するが抑制性サイトカインの産生を抑制しないこと、さらには interleukin (IL) -2 産生を顕著に促進し、これら作用にはその主要成分であるアルテピリン C が関与することや、IL-2 産生の促進には特異的な transient receptor potential cation channel subfamily A member1 (TRPA1) の働きが関与することを突き止めている。</p> <p>BGP と中国産プロポリス (Chinese propolis, CP) は、その組成は大きく異なるが、抗酸化作用や免疫制御作用は大変類似していることが報告されている。そこで、本研究では、Tリンパ球を中心とする脾細胞のサイトカイン産生を介するCPの免疫制御機構を解析するために、CPおよびその主要成分であるカフェイン酸フェネチルエステル (CAPE) 存在下における活性化脾細胞の、抑制性サイトカインである IL-4 と IL-10 産生と、炎症性サイトカインである interferon (IFN)-<math>\gamma</math> 産生を比較検討した。</p> <p>CP (秋田屋本店), CAPE (東京化成工業), TRPA1 に対する特異的阻害剤 HC030031 (Sigma-Aldrich) を使用した。High Performance Liquid Chromatography (HPLC) により CP 中の CAPE を Shima-pack HRC-ODS カラム (島津製作所) を用いて比較定量した。24 週齢の雄 C3H/HeN マウス (日本エスエルシー) から脾臓を摘出し、脾細胞を単離した。本研究は、朝日大学歯学部動物実験専門委員会によって承認されている (承認番号: 22-027)。脾細胞を抗 cluster of differentiation (CD) 3<math>\epsilon</math> 抗体 (mAb) (145-2C11, BD Biosciences) を固相化した 96 ウェルプレートに播種し、実験に応じて 48 時間または 96 時間刺激培養し、活性化した。アクリジンオレンジとヨウ化プロピジウム (AO/PI, Aligned Genetics) 染色法で細胞生存率を測定した。</p> <p>細胞培養上清中のサイトカイン濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (BD OptEIA; BD Bioscience) により測定した。刺激脾細胞から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を抽出し、定量的 reverse transcription (RT) -PCR (SYBR premix EX Taq; Takara) により mRNA 発現を測定した。得られたデータの統計解析は、SPSS 28.0, 17.0 統計ソフト (IBM) を用いて行った。</p>	

その結果, HPLCにて, CP エタノール抽出原液中に 1.66 mg/ml ; 0.17%の CAPE 含有量を認めた. さまざまな希釈倍率の CP 存在下でサイトカイン産生量を測定すると, IFN- $\gamma$  産生は濃度に依存して顕著に抑制され, IL-4 産生は 1/16000 希釈以下の濃度域でコントロールよりも有意に高い値を示し, IL-10 産生も 1/32000 希釈以下の濃度域で有意に高い産生を示した.

さらに, さまざまな濃度の CAPE 存在下では, IFN- $\gamma$  産生は濃度上昇に伴い顕著に抑制された. 一方, IL-4 産生は低濃度の CAPE 存在下で有意に促進された. IL-10 産生は, 5.5  $\mu$ M をピークに促進され, それ以上の濃度では抑制され, CAPE は CP とよく似た制御を行っていた.

11  $\mu$ M の CAPE 存在下における IFN- $\gamma$  mRNA 発現および産生は顕著に抑制された. 同条件下で, IL-4 mRNA 発現は, 培養時間の延長に伴い上昇し 96 時間後には最高値に達した. この促進作用は HC030031 を共培養すると消失した. さらに IL-10 mRNA 発現はコントロールに比べほぼ有意に高いレベルが維持された. CAPE 単独培養群の IL-10 産生は徐々に上昇し 96 時間後には最高値に達したが, HC030031 共培養群では抑制されていた.

その結果,

1. 低濃度の CAPE は IFN- $\gamma$  の産生を抑制し, IL-4 と IL-10 の産生は促進する.
2. CAPE は IFN- $\gamma$  の産生を mRNA 発現の段階で顕著に抑制する.
3. CAPE は IL-4 と IL-10 の産生を培養時間の経過に依存して顕著に促進する.
4. IL-4 の産生促進には TRPA1 を介した機構が関与することが示され, また IL-10 の産生促進にも Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介して部分的に関与していることが示された.

今後さらに本研究を進めていくことで, プロポリスの主成分である CAPE による免疫系制御の実態が明らかになることが示唆されるとともに, とくに口腔内における炎症性病変に対して薬理的効果の高い, 安全な薬剤の開発が期待される. よって本研究で得られた知見は, 免疫系制御のメカニズム解明にも繋がる可能性の内容と価値のある研究であるとともに, 臨床への応用の可能性も高く, 医療への貢献期待されるものと考えられる. よって審査委員は, 本論文を博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した.