

学位論文内容の要旨

論文提出者	安藤 恵
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 川木 晴美 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 引頭 毅 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 齊藤 一誠
論文題目	中国産プロポリスの主要成分カフェイン酸フェネチルエステルによる 抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞のインターロイキン-2 産生の促進
【目的】	<p>プロポリスはミツバチが植物から採取した樹脂成分と蜜蝋とを混ぜて作られた巣材天然産物で、さまざまな薬理作用を示すことが報告されている。プロポリスはミツバチが集めてくる植物を原料として作られるため、起源となる植物により、含まれる成分が様々に異なることが知られている。先行研究により、ブラジル産グリーンプロポリスが抗 CD3 抗体刺激脾細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制するが抑制性サイトカイン産生は抑制しないこと、さらには IL-2 産生を顕著に促進し、これら作用にはブラジル産グリーンプロポリスの特徴的な成分であるアルテピリン C (Art-C) が関与することや、IL-2 産生の促進には特異的な Ca^{2+} チャンネルである TRPA1 の働きが関与することを報告されている (Tsuruta et. Al., 2019) .</p> <p>本研究では、産地の異なるプロポリスの免疫制御機構を解析するために、中国産プロポリス (Chinese propolis; CP) とその成分の1つであるカフェイン酸フェネチルエステル (CAPE) 存在下において抗 CD3 抗体刺激脾細胞の炎症抑制性サイトカインである IL-4 と IL-10 と、炎症を促進するサイトカインである IFN-γ, IL-6, IL-17, および細胞性免疫に関与しリンパ球の増殖促進作用をもつ IL-2 の産生状況を比較検討した。</p>
【材料と方法】	<p>CP は、秋田屋本店 (岐阜) より提供された。CAPE (東京化成工業) を標準物質として、High Performance Liquid Chromatography (HPLC) により CP 中の CAPE の濃度を定量した。C3H/HeN マウス (24 週齢の雄; 日本エスエルシー) から脾細胞を単離した。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: 20-025)。回収後の脾細胞を抗 CD3ϵモノクローナル抗体 (BD Biosciences) で刺激し、48 時間または 96 時間刺激培養した。アクリジンオレンジとヨウ化プロピジウム染色法 (Acridine Orange/Propidium Iodide Stain Kit; Aligned Genetics) で細胞生存率を測定した。細胞培養上清中の IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-4, IL-10 および IL-2 の濃度を酵素結合免疫吸着法による定量キット (BD OptE1A; BD Bioscience) を用いて測定した。刺激脾細胞から全 RNA を抽出し、IL-2 mRNA 発現を定量的 PCR 法 (Takara) で測定した。データの統計解析は、SPSS ver. 28.0 統計ソフト (IBM) を用いて行い、データセット解析には Dunnet' s test または Tukey の HSD 検定を実施した。</p>

【結果】

1. HPLCの結果、CP抽出液原液中にCAPEの含有(1.66 mg/ml ; 0.17%)を認めた。
2. CP存在下でサイトカイン産生を測定すると、IFN- γ 、IL-6、IL-17産生はCPの濃度に依存して顕著に抑制された。一方、IL-4産生は1/16000希釈以下のCP濃度でコントロールよりやや高い値を示し、IL-10産生も1/32000希釈以下の濃度で同様のやや高い産生を示した。これに対して、IL-2産生はCP存在下で顕著に促進し、1/16000希釈で9倍に上昇してピークを描いた。
3. CAPE単独でも上記サイトカイン群の産生をCPと同様に制御することが示された。
4. コントロールの刺激脾細胞のIL-2 mRNA発現は6から24時間後に緩やかな上昇を示したが、その後顕著に低下した。一方、IL-2産生のピーク時と同濃度のCAPE存在下では、IL-2 mRNAが36時間後より顕著に上昇し72時間後までは高いレベルを維持した。
5. IL-2タンパク質産生は、CAPE非存在下では36時間後をピークに上昇し72時間後には、ほぼ基底レベルに戻ったが、CAPE(11 μ M)存在下では36時間後より顕著に上昇をはじめ、72時間から96時間後までコントロールのピークよりも高いレベルを維持していた。

【結論】

本研究で、CPがIFN- γ 、IL-6、IL-17の産生を抑制し、Th2サイトカインであるIL-10とIL-4の産生には影響を与えないか、あるいはわずかに増強する一方で、IL-2の産生を有意に増強することが明らかとなった。そして、mRNAおよびタンパク質レベルで、IL-2産生はCAPEによって著しく増強され、増強のパターンも類似していたが、CAPE単独で効果を発揮する濃度と、効果を発揮する濃度のCP中に含まれるCAPEの濃度には2倍以上の隔たりがあるため、IL-2産生を有意に増強したCPの効果がCAPEに起因すると考えられるがCP中の他の成分も関与していると推察された。加えて、CAPE存在下におけるIL-2産生のピークはコントロールとした刺激脾細胞よりも遅れて出現すること、脾臓細胞のIL-2 mRNA発現上昇およびタンパク質産生には抗CD3抗体による刺激が必要であったことから、CP中にCAPE活性を高める他のエンハンサーまたは相乗的な補因子が存在する可能性も示唆された。

【結論】

1. CAPE存在下におけるIL-2産生のピークは、コントロールの刺激脾細胞に比べ遅れて出現し、72時間以降で最大に達した。
2. CAPEは刺激脾細胞のIL-2産生をmRNA発現レベルで顕著に促進し、この作用には抗CD3抗体の刺激が必要であったことから、活性化したT細胞による経路が存在する可能性が示唆された。
3. CPは刺激脾細胞のIFN- γ 、IL-6、IL-17産生を抑制したが、IL-4とIL-10産生をわずかに促進し、IL-2産生を顕著に促進した。この作用の発現パターンはCAPE単独によるものと類似していたためCAPEが一連の作用に関わっていることが示唆された。

以上より、CAPEは、抗CD3抗体刺激マウス脾臓細胞からのサイトカインに対する可変的な制御を制御するCPの代表的な成分と考えられ、本研究で得られた知見は、CPの免疫調節メカニズムに関する今後の研究に貴重な示唆を与える可能性があるとして示唆された。