



Title	低分子化リグニンの新規機能開発に関する基礎的研究
Author(s)	松久, 幸司
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34389
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松久 幸司)	
論文題名	低分子化リグニンの新規機能開発に関する基礎的研究
論文内容の要旨 古来よりシイタケは「薬茸」として珍重されており、その薬理活性について詳細な活性分子の同定などが進展している。近年、シイタケの菌糸体について、子実体に含まれるものとは異なる有効成分が豊富に含まれていることが明らかとなった。そこで開発されたものが、シイタケ菌糸体抽出物 (<i>Lentinus Edodes</i> Mycelia : LEM) である。LEMは、シイタケ菌糸体抽出物を固体培地により培養後、温水により抽出した成分である。LEMは、構成成分として糖質(約50%)、蛋白質(約25%)、抗酸化活性を有するフェノール性化合物(約3%)、リグニン分解物などを含んでいることが示されている。現在までにLEMは、ヒト単純ヘルペスウイルスなどに対する抗ウイルス活性、および抗腫瘍活性を有することが報告されている。 本研究ではLEM、および近年有効成分の一つであることが明らかとなった低分子化リグニンについて、さらなる有効性の開発をめざし、フェノール性化合物において効果が報告されているC型肝炎ウイルス、および潰瘍性大腸炎に着目した。 C型肝炎は慢性肝炎から肝硬変、最終的には肝癌へと進行する重篤な疾患である。C型肝炎に対して行われているインターフェロン療法は一定の効果を収めているものの、その著効率は70%と未だ十分とは言えず、副作用により治療を中断する例も少なからず存在する。2008年、東口らはLEMによるC型肝炎の病態改善例を報告しており、LEMのC型肝炎に対する有効性が提示された。そこで、LEMのC型肝炎に対する有効性について、肝保護作用および抗ウイルス作用の評価、解析を行った。 LEMの肝保護作用について、まずコンカナバリンA (ConA) 誘導性急性肝障害モデルマウスを用いて評価を行った。その結果、LEMを同時投与することでConA単独投与群に比べて有意なALTおよびASTの低下、および肝細胞壊死が抑制されていた。さらに血清中の炎症性サイトカイン量 (TNF-α, IFN-γ, IL-6) 濃度の上昇がLEMにより抑制されていた。以上より、LEMは肝保護作用を有することが明らかとなった。 次に、LEMの抗HCV活性について評価および解析を行った。まず、LEMのHCV侵入阻害活性を、HCVシュードウイルス (HCV pseudo virus : HCVpv) を用いて評価した。その結果、LEMがHCVpvの細胞内への侵入を阻害する様子が観察された。次に、LEMのHCV複製阻害活性を、HCVサブゲノムレプリコン細胞を用いて評価したところ、LEMの処理により細胞内でのHCVサブゲノムの複製が阻害された。従って、LEMはHCVに対して侵入阻害活性および複製阻害活性を有することが明らかとなった。本複製阻害活性の作用機序の解析のため、サブゲノムレプリコン細胞およびnaïve細胞にLEMを処理した際の脂質代謝関連遺伝子の発現変動を解析した結果、HMG-CoA合成を触媒するHMGCSの有意な発現低下が観察された。HMGCSはHCVの複製過程に関与することが既に報告されており、LEMがこの遺伝子を制御することで脂質合成を抑制し、その結果、HCVゲノムの複製が抑制されたのではないかと考えられる。以上、シイタケ菌糸体より抽出された成分であるLEMが、肝保護作用を有すること、HCVに対して侵入阻害活性および複製阻害活性を有することが明らかとなった。 近年当研究グループにおいて、LEMの有する肝保護作用の本体分子が低分子化リグニンであることを明らかとした。リグニンは、高分子フェノール性化合物の一つであるが、LEMに含まれているリグニンはシイタケ菌の持つ加水分解酵素により低分子化されており、水溶性および抗酸化活性が向上した状態で存在していると考えられている。そこで、低分子化リグニンのHCVに対する抗ウイルス活性の評価を行った。 その結果、LEMと同様に低分子化リグニンについてもHCVpvに対する侵入阻害活性が観察された。さらに、低分子化リグニンはVSVに対しては侵入阻害活性を示さなかった。次に、近年開発された細胞培養系により作成されたHCV粒子 (HCV cell culture : HCVcc) を用いて、低分子化リグニンの侵入阻害活性を評価した。その結果、低分子化リグニンが用量依存的にHCVccの細胞への侵入を阻害する様子が観察された。以上より、LEMの有するHCV侵入阻害活性の活性本体が低分子化リグニンである可能性が示唆されるとともに、低分子化リグニンの持つHCV侵入阻害活性はHCV特異的であると推察された。	

潰瘍性大腸炎は、大腸粘膜に潰瘍やびらんが形成される炎症性疾患であるが、発症に至る明確な原因は未だ判明していない。近年、潰瘍性大腸炎において、物質透過バリアであるTight Junction (TJ) バリアの機能低下が重要な要素の一つであると言われている。近年、ポリフェノール類に、腸管における物質透過バリア破たんを抑制する作用があることが明らかとなっている。そこで、低分子化リグニンのTJバリアに対する影響を検討し、潰瘍性大腸炎治療への応用の可能性を調べた。

腸管粘膜上皮モデルとして大腸癌由来細胞株caco-2細胞の単層膜を用い、低分子化リグニンのTJバリア機能に対する作用を検討した。その結果、低分子化リグニンの添加によりcaco-2細胞単層膜の経上皮膜電気抵抗値

(Transepithelial electric resistance : TEER) が上昇しており、TJバリア機能の亢進が観察された。潰瘍性大腸炎にて発現の変動が報告されているTJ関連遺伝子 (Claudin-1, 2, 4) の発現変動を解析したところ、低分子化リグニンの添加によりclaudin-2の発現が減少していた。Claudin-2は、TJでは主にボアを形成し、発現上昇によりTJバリア機能の低下が生じることが既に報告されている。従って、LEMおよび低分子化リグニンはclaudin-2の発現を低下させることでTJバリア機能を上昇させていることが推察された。

潰瘍性大腸炎において、TNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカインにより大腸粘膜の上皮細胞におけるTJバリア機能が低下していることが知られている。そこで、caco-2単層膜に対してTNF- α およびIFN- γ を添加し、低分子化リグニンの潰瘍性大腸炎に対する治療への可能性を検討した。その結果、低分子化リグニンをサイトカインと同時に添加した群においてTEER値の低下が観察されず、炎症性サイトカインによる上皮TJバリア機能の低下を抑制した。

以上、LEMおよび低分子化リグニンはcaco-2細胞単層膜に対するTJバリア機能亢進作用を有することが明らかとなり、そのTJバリア機能亢進作用はclaudin-2の発現低下によるものと推察された。また、低分子化リグニンは炎症性サイトカインによるcaco-2単層膜TJバリア機能の低下を抑制することが明らかとなった。

本研究において見出された新たな生理活性は、いずれもC型肝炎および潰瘍性大腸炎という、未だ患者にとって満足のできる治療法が十分でない疾患に対して有効性が期待できるものであり、本研究結果がそれら疾患に対する有効な治療薬開発の一助となることを願う。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 久 幸 司)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 八木 清仁
	副 査	教 授 橋本 均
	副 査	教 授 松田 敏夫
	副 査	教 授 平田 収正

論文審査の結果の要旨

培養シイタケ菌糸体 (*Lentinula edodes* Mycelia : LEM) 抽出物は構成成分として糖質、蛋白質、抗酸化活性を有するフェノール性化合物、リグニン分解物を含んでおり、これまで様々な薬理活性を有していることが報告されてきた。四塩化炭素で障害を与えた肝臓に対してLEM抽出物は保護効果を示すがその活性本体が低分子リグニンであることが示されたことから、学位申請者の松久幸司はこの低分子リグニンに着目し、新たな機能探索を行い学位論文としてまとめるに至った。

リグニンは植物由来の難溶性高分子でその薬理作用の報告はほとんどない。近年、植物由来化合物が抗C型肝炎ウイルス(HCV)効果、炎症性腸疾患に対する治癒効果を有するという報告がなされていることから、松久は加水分解によって得られる水溶性低分子化リグニンを用いて両効果について検討を行った。

まずLEM抽出物の抗HCV活性をHCVの細胞への侵入、および細胞内でのゲノムRNAの複製に焦点を当て評価を行った。LEM抽出物はHCVの細胞内への侵入解析において汎用されているHCVシュードウイルス (HCV pseudo virus : HCVpv) の侵入活性を阻害し、HCVサブゲノムレプリコン細胞のHCV複製を有意に阻害することが示された。次に低分子化リグニンについて抗HCV活性を評価したところ、HCV複製に対する阻害活性は観察されなかったが、非常に強いHCV侵入阻害効果を有することが明らかとなった。作用濃度の10倍以上の濃度でも細胞毒性が観察されなかったことから安全性は高く、実際のHCV粒子を用いた検討においても同様の侵入阻害効果を示した。

次に炎症性腸疾患治療への応用の可能性を検討するため低分子化リグニンのタイトジャンクション (TJ) バリア機能に対する作用を検討した。腸管粘膜上皮モデルとして汎用されている大腸癌由来細胞株であるcaco-2細胞により形成される単層膜の膜電気抵抗値 (Transsepithelial electric resistance : TEER) を指標としてTJバリア機能を評価した。低分子化リグニンは有意にTEERを上昇させバリア機能を強化する機能を有することが示された。炎症性腸疾患において発現の上昇が報告されているTJ関連遺伝子claudin-2の低下も観察された。さらにTNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカインを添加するin vitro潰瘍性大腸炎モデルにおいて、低分子化リグニンはTJバリア機能の低下を有意に抑制することを示した。したがって低分子化リグニンは腸管において物質透過バリア破綻を抑制し潰瘍性大腸炎を鎮める薬物として可能性を提示できるものと思われる。

以上、天然に豊富に存在するリグニン由来物質の新たな機能としてHCV侵入阻害およびTJバリア機能強化について初めて実証し、安全な新規薬物の開発を必要とするウイルス性肝炎、炎症性腸疾患の治療薬としての可能性を提示した研究として博士論文にふさわしい内容と判断した。