

氏名(本籍)	坂田佳子(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 563 号
学位授与日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line
審査委員	(主査) 教授 森 秀 樹 (副査) 教授 森 脇 久 隆      教授 小 澤 修

## 論文内容の要旨

### はじめに

ヘスペリジンは、主にかんきつ類に含まれるフラボノイドである。ヘスペリジンはラットを用いた動物実験で単独もしくはジオスミンと共に飼料投与することにより、舌、大腸、食道および膀胱において発がん抑制作用があることが示されてきた。そのがん予防のメカニズムを追求することは、本物質を化学予防物質としてヒトへの応用をはかる際に重要となる。ヨーロッパで発売されたDaflon®は、ヘスペリジンとジオスミンを1:9の割合で配合したものであるが、抗炎症作用があることがわかっている。がん発生の危険性と慢性炎症の相関性についての報告や、発がん過程において炎症に寄与する酵素cyclooxygenase-2(COX-2)やinducible nitric oxide synthase(iNOS)が関与しているとの報告が多数ある。COX-2はアラキドン酸カスケードを通してプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)を産生し、また、iNOSは一酸化窒素(NO)を産生する。

今回、ヘスペリジンのがん予防メカニズムを探るため、マウスのマクロファージ細胞株にlipopolysaccharide (LPS)を投与してCOX-2の代謝産物であるPGE<sub>2</sub>、iNOSの代謝産物NOから派生する安定した化合物であるNO<sub>2</sub>の濃度がヘスペリジンによって抑制されるかどうかを検討した。さらに、COX-2とiNOSの蛋白量がヘスペリジン投与によって抑制されるかをウェスタンブロット法にて検討した。

### 対象および方法

- 1) マウスマクロファージ細胞株RAW264.7に150 μMまでヘスペリジンを投与し、MTSアッセイ法にてヘスペリジンの細胞毒性を検討した。
- 2) RAW264.7にLPSを投与してPGE<sub>2</sub>とNO<sub>2</sub>の濃度が上昇することを確認した(positive control)。
- 3) ヘスペリジンをDMSOで溶解して10, 20, 30 μMとし、LPS投与の30分前に培地内に混合してLPSによるPGE<sub>2</sub>とNO<sub>2</sub>の濃度抑制効果を検討した。PGE<sub>2</sub>の濃度は酵素抗体法を用いて測定し、また、NO<sub>2</sub>の濃度はGriess reagentを用いて測定した。
- 4) ヘスペリジンおよびLPSを投与したRAW264.7から蛋白を抽出し、COX-2およびiNOS蛋白発現抑制の程度を、positive controlに対して相対評価した。

### 結果

- 1) 検討した濃度範囲内では、ヘスペリジンの細胞毒性は認められなかった。
- 2) RAW264.7にLPSを0.2 μg/mlを投与することにより(陽性コントロール群) PGE<sub>2</sub>は8.8±1.0 ng/ml(陰性

コントロール群では $3.5 \pm 0.3$  ng/ml),  $\text{NO}_2$ は $6.03 \pm 0.08$   $\mu\text{M}$  (陰性コントロール群では $0.82 \pm 0.13$   $\mu\text{M}$ ) と有意な濃度上昇が認められた。

- 3) ヘスペリジン<sub>2</sub>を10から30  $\mu\text{M}$ の範囲内で投与することによりLPSによって誘導される $\text{PGE}_2$ はヘスペリジン10  $\mu\text{M}$ では $7.0 \pm 1.4$  ng/ml, 20  $\mu\text{M}$ では $4.3 \pm 0.9$  ng/ml, 30  $\mu\text{M}$ では $3.9 \pm 0.8$  ng/mlと濃度依存性に抑制した。
- 4) また、ヘスペリジン投与によりLPSによって誘導される $\text{NO}_2$ はヘスペリジン10  $\mu\text{M}$ で $4.48 \pm 0.07$   $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ で $3.21 \pm 0.07$   $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ で $3.21 \pm 0.07$   $\mu\text{M}$ , と抑制した。
- 5) ヘスペリジンはLPSによって誘導されるCOX-2蛋白の発現を抑制しなかったが、iNOS蛋白の発現は濃度依存性に抑制した。

## 考察

本研究では、植物由来のフラボノイド、ヘスペリジンについてその抗炎症作用機序について検討しCOX-2蛋白およびiNOS蛋白、またそれら蛋白が生成する $\text{PGE}_2$ と $\text{NO}_2$ が抑制されることを確認した。ヘスペリジンはこれまで抗炎症作用のほかラットを用いた動物実験において、種々の発がんを抑制することが確認されている。本研究によりそのがん予防作用機序のひとつとして、ヘスペリジンによるiNOS発現、 $\text{PGE}_2$ とNO産生の抑制が関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 坂田 佳子は、植物由来のフラボノイドであるヘスペリジンを用いてその抗炎症作用のメカニズムの一部を明らかにし、がんの化学予防メカニズムの一部である可能性を示唆した。本研究は、植物由来フラボノイドによるがん化学予防研究の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line

Cancer Letters 199, 139-145 (2003).