



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

イザヨイバラ由来エラジタンニンによるpoly(I:C)刺激ヒト表皮細胞からのIL-8産生抑制作用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-05-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高山, 悟 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/87499">http://hdl.handle.net/20.500.12099/87499</a>

氏名（本籍）	高山 悟（岐阜県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位授与番号	甲第 62 号
学位授与日付	令和 3 年 12 月 25 日
専攻	医療情報学専攻
学位論文題目	イザヨイバラ由来エラジタンニンによるpoly(I:C)刺激ヒト表皮細胞からのIL-8産生抑制作用に関する研究 (Investigation of the suppression of IL-8 production by Ellagitannins from <i>Rosa roxburghii</i> in poly(I:C)-stimulated human keratinocytes)
学位論文審査委員	(主査) 教授 檜井 栄一 (副査) 教授 上田 浩 (副査) 教授 寺田 知新 (副査) 教授 田中 宏幸

### 論文内容の要旨

接触皮膚炎は、細菌、化学物質、花粉、黄砂やPM2.5を含む大気粉塵等の刺激物質が皮膚に触れた部位に痛みや強い痒みを伴う湿疹や赤み、水ぶくれや腫れなどを症状とする疾患である。また、接触皮膚炎の発症には皮膚バリア機能が大きく関わっており、バリア機能が低下した部位から刺激物質が表皮層へ侵入することで炎症が惹起され、それに伴いバリア機能が更に低下し炎症が持続するという悪循環が生じる。刺激物質が炎症を惹起する機序として、直接的な刺激や傷害により細胞から放出されるダメージ関連分子パターン（DAMPs）が、近傍の細胞にパターン認識受容体（PRRs）と結合して炎症が惹起されると考えられている。近年、皮膚バリア機能を低下させるだけでなく、皮膚に強い炎症を起こす紫外線B波（UVB）の場合、主にUVB照射によりダメージを受けた表皮細胞が放出するnon-coding RNAの1種、U1-RNAがtol1様受容体（TLR）-3と結合することで炎症が惹起されることが明らかになっている。炎症反応自体は、生体防御において極めて重要な生理機能であるが、患者のquality of lifeを著しく低下させる過度の炎症反応や持続的・慢性的な炎症反応に対してはDAMPs-PRRs間のシグナル反応系を干渉し炎症反応を緩和できる安全で常用可能な外用剤の開発が求められている。

そこで本研究では、紫外線照射により傷害を受けた細胞から放出されるU1-RNAの代用にTLR-3アゴニスト、poly(I:C)を用いて正常ヒト表皮細胞（NHEKs）を刺激する紫外線誘導皮膚炎モデルを使用し、予防的処理により炎症マーカーであるサイトカインIL-8の発現および産生を抑制しうる植物抽出物の探索およびその有効成分の同定を目的とした。その際、肌荒れ防止の目的で従来から外用剤に配合されてきたグリチルリチン酸2カリウム（GK2）やアラントインとの効力の比較を行った。

植物抽出液のスクリーニングを行った結果、イザヨイバラ果実抽出液（RRFE）にpoly(I:C)刺激NHEKsによるIL-8遺伝子発現を抑制する作用を見いだした。一方、GK2およびアラントインにはIL-8遺伝子発現抑制作用が認められなかった。以上の結果から、紫外線照射により傷害を受けた細胞から放出されるDAMPsのうち、従来から使用されてきたGK2やアラントインでは制御できないDAMPs、自己由来RNAを起炎物質とする炎症を緩和する点でRRFEは新しい機能を有する外用剤であると考えられた。

更にRRFEに含まれる活性成分単離のためRRFEを分画・精製を行った結果、加水分解型タンニン（エラジタンニン）、strictininおよびcasuarictinを単離した。いずれの化合物もpoly(I:C)刺激NHEKsの

IL-8遺伝子発現抑制作用およびIL-8タンパク産生抑制作用を示すことから、RRFEの活性成分の1つであると考えられた。一方、有意なIL-8遺伝子発現抑制活性を示すRRFEに含まれるstrictininとcasuarictinの含有比で炎症抑制試験を行った結果、RRFEと同程度のIL-8遺伝子発現抑制活性およびIL-8タンパク産生抑制活性は認められなかった。このことから、RRFEにstrictininとcasuarictinの作用を増強する因子が含まれる可能性が示唆された。

以上、本研究ではTLR-3アゴニストでNHEKsを刺激する紫外線誘導皮膚炎モデルを使用し、RRFEおよびその活性成分であるstrictininとcasuarictinが新規抗炎症外用剤として有用であることが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

本論文は、紫外線照射により傷害を受けた細胞から放出されるU1-RNAの代用として、TLR-3アゴニストであるpoly(I:C)を用いて、正常ヒト表皮細胞(NHEKs)を刺激した際に産生されるIL-8の発現および産生に及ぼすイザヨイバラエキスの影響を検討し、さらに有効成分の同定を行った成果をまとめたものである。

接触皮膚炎は、細菌、化学物質、花粉、黄砂やPM2.5を含む大気粉塵等の刺激物質が皮膚に触れた部位に痛みや強い痒みを伴う湿疹や赤み、水ぶくれや腫れなどを症状とする疾患である。刺激物質が炎症を惹起する機序として、直接的な刺激や傷害により細胞から放出されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)が、近傍の細胞にパターン認識受容体(PRRs)と結合して炎症が惹起されることが考えられている。近年、皮膚バリア機能を低下させるだけでなく、皮膚に強い炎症を起こす紫外線B波(UVB)の場合、主にUVB照射によりダメージを受けた表皮細胞が放出するnon-coding RNAの1種、U1-RNAがtoll様受容体(TLR)-3と結合することで炎症が惹起されることが明らかになっている。炎症反応自体は、生体防御において極めて重要な生理機能であるが、患者のquality of lifeを著しく低下させる過度の炎症反応や持続的・慢性的な炎症反応に対してはDAMPs-PRRs間のシグナル反応系を干渉し炎症反応を緩和できる安全で常用可能な外用剤の開発が求められている。

そこで申請者らは、U1-RNAの代用にTLR-3アゴニスト、poly(I:C)を用いて、正常ヒト表皮細胞(NHEKs)を刺激した際に産生されるIL-8の発現および産生に及ぼすイザヨイバラエキスの影響を検討した。その結果、イザヨイバラ果実抽出液(RRFE)にpoly(I:C)刺激NHEKsによるIL-8遺伝子発現を抑制する作用を見いだした。一方、肌荒れ防止の目的で従来、外用剤に配合されてきたグリチルリチン酸2カリウム(GK2)やアラントイン GK2にはIL-8遺伝子発現抑制作用が認められなかった。以上の結果から、RRFEは紫外線照射により傷害を受けた細胞から放出されるDAMPsのうち、自己由来RNAを起炎物質とする炎症を緩和する点において新しい機能を有する外用剤の成分として有用性が示唆された。

更にRRFEに含まれる活性成分の検索を行った結果、加水分解型タンニン(エラジタンニン)、strictininおよびcasuarictinを単離・同定した。いずれの化合物もpoly(I:C)刺激NHEKsのIL-8遺伝子発現抑制作用およびIL-8タンパク産生抑制作用を示すことから、RRFEの活性成分の1つであると考えられた。さらに、その後の含有成分比を考慮した検討結果から、RRFE中にはstrictininとcasuarictinの作用を増強する因子が含まれる可能性も示唆された。

以上のように、本論文ではRRFEおよびその活性成分であるstrictininとcasuarictinがTLR-3刺激によるNHEKsからのIL-8産生を有意に抑制することを明らかにしている。これらの知見は、紫外線照

射による皮膚炎の治療薬開発に対し有用な示唆を与えるものであり、博士論文として価値あるものと判定した。

### 最終試験結果の要旨

高山氏の学位論文の主要な部分は審査付き論文として公表済みの一編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として完成された内容であることを確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、紫外線照射による皮膚炎発症機序と治療の現状、紫外線照射時に表皮細胞が放出する non-coding RNA の 1 種、U1-RNA、toll 様受容体 (TLR)-3 の刺激物質である poly(I:C) を用いた正常ヒト表皮細胞 (NHEKs) を刺激した際に産生される IL-8 の発現および産生、NHEKs 細胞からの poly(I:C) 刺激による IL-8 産生に及ぼすイザヨイバラ果実抽出液の影響、抽出液中に含まれる加水分解型タンニン (エラジタンニン)、strictinin および casuarictin の単離・同定およびそれらの IL-8 産生に及ぼす影響などに関して諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士 (薬科学) の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

### 論文リスト

1. Satoru Takayama, Miho Kawanishi, Kosei Yamauchi, Daiki Tokumitsu, Hiroyuki Kojima, Teruaki Masutani, Arunasiri Iddamalgoda, Tohru Mitsunaga, Hiroyuki Tanaka. Ellagitannins from *Rosa roxburghii* suppress poly(I:C)-induced IL-8 production in human keratinocytes. *Journal of Natural Medicines* 75: 623-632, 2021. 【Impact Factor: 2.343】