

氏名(本(国)籍)	鄭 逢 吉 (中華民国)
推 薦 教 員	東京農工大学 教授 下 田 実
学 位 の 種 類	博士(獣医)
学 位 記 番 号	獣医博乙第96号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Discovery of New Pharmacological Activities of Chlorella (クロレラの新しい薬理作用の探索)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 下 田 実 副査 帯広畜産大学 教授 石 井 利 明 副査 岩 手 大 学 教 授 津 田 修 治 副査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘

論 文 の 内 容 の 要 旨

現在までにクロレラについて多くの研究がなされているが、治療標的としての酵素や受容体への作用のような生化学的作用については殆ど研究されていない。このため、本研究では、治療の標的としての免疫、酵素、受容体に対するクロレラの生化学的作用を免疫学的スクリーニングや組織的なプロファイリング手法を用いて検討した。

1. 免疫系に対する作用: マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs), カスパーゼ, 蛋白質セリン/トレオニンキナーゼ, 蛋白質チロシンホスファターゼ (PTPase) を含む 25 種の酵素について免疫関連の試験パネルを用いて検討した。また, ケモカイン受容体, インターロイキン受容体, ホルボールエステル受容体などの 12 種の受容体, 細胞接着, サイトカインメディエーター遊離, T細胞/B細胞増殖などの 17 種の免疫関連因子に対する作用についても検討した。その結果, クロレラは, PTPase CD45, PTP1B, PTP1C と TC-PTP の抑制作用を示し, クロレラががんや糖尿病, 自己免疫疾患に高い治療的有用性を有することが示唆された。また, クロレラは広範囲の各種のサイトカイン, MMPs, B細胞, T細胞の増殖やホルボールエステル受容体結合に対しても抑制作用を示したことから, 炎症性疾患, 心血管系疾患やリウマチ様関節炎などの治療への応用の可能性が示唆された。

2. 酵素に対する作用: コリンエステラーゼ, アシル Co-A コレステロールアシルトランスフェラーゼ, アルドースレダクターゼ, カルパイン, チマーゼ, キモトリプシン, HIV プロテアーゼ, COX, CYP, 脂肪酸アミドヒドロラーゼ (FAAH), ヒスタミン N-メチルトランスフェラーゼ, ロイコトリエンシンターゼ, ホスホリパーゼ A2 (PLA2), リポキシゲナーゼ, ホスホジエステラーゼ, エンドセリン変換酵素, β セクレターゼ, 好中球エラスターゼ, 腫瘍壊死因子 α 変換酵素 (TACE), キノム酵素-蛋白質セリン/トレオニンキナーゼ, 蛋白質チロシンキナーゼ, PTPase, フリーラジカルスカベンジャー (SOD), トロンボキサンシンターゼ, チロシンヒドロキシラーゼ, キサンチンオキシダーゼなど, 計 118 種の酵素に対する作用について検討した。その結果, クロレラはカテプシン S や PLA2, COX-2, トロンボキサンシンターゼなどの炎症に関連する酵素や TACE, PTPase の SHP-2, カルパインや蛋白質キ

ナーゼに対しても有意な抑制作用を示したことから、クロレラが解熱や鎮痛、動脈硬化症、リウマチ様関節炎、免疫抑制療法、血糖改善や腫瘍の治療に対する有用性が示唆された。

3. 受容体に対する作用： アデノシン、 α 、 β アドレナリン、アドレノメデュリン、アルドステロン、アンジオテンシン、APJ、心房性ナトリウム利尿因子、ボンベシン、ブラジキニン、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP₁)、カンナビノイド、コレシストキニン、コルヒチン、コルチコトロピン遊離因子(CRF₁)、ドーパミン、エンドセリン、表皮増殖因子、エリスロポエチン、エストロジェン、N-フォルミルペプチドに対する受容体、G蛋白質結合受容体 GPR8、GABA、ガバペンチン、グルタメート、成長ホルモン分泌促進物質(GHS、グレリン)、ヒスタミン、イノシトール三リン酸 IP₃、レプチン、システイニルロイコトリエン、メラトニン、モチリンムスカリン、タチキニン、ニューロメジン、神経ペプチド Y、ニューロテンシン、オピエート、血小板活性化因子、血小板由来増殖因子、プロスタノイド、プリン性 P2、レチノイド X 受容体 RXR α 、セロトニン、ソマトスタチン、サイトロトロピン遊離ホルモン、トランスフォーミング成長因子 β 、ウロテンシン、バニロイド、血管内皮増殖因子、血管作用性小腸ペプチド、バゾプレシン、ビタミン D₃ に対する受容体など、計 129 種の受容体に対するクロレラの作用を放射線リガンド結合法によって検討した。クロレラは、プリン P_{2Y} 受容体、アデノシントランスポーター、タチキニン受容体、セロトニン 5-HT_{2B} 受容体、トロンボキサン A₂ (TP) 受容体と共に、ロイコトリエン受容体、グルタメート AMPA 受容体、カルシウム動員関連受容体との結合性を有した。このため、喘息、てんかん、アルツハイマー病、心臓発作、高血圧、高血糖症、胃腸管やがんなどと関連する生化学的変化に対してクロレラが作用する可能性が予想されるので、クロレラは炎症、心血管系疾患、免疫不全、糖尿病、細胞増殖不全、中枢神経系の疾患に対して調節または治療効果を有する可能性あるものと考えられた。

以上のように、本研究においてクロレラの多くの生物活性が明らかにされ、これらの所見から、その成分が多く疾患の治療に有効である可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

現在までにクロレラについて多くの研究がなされているが、治療標的としての酵素や受容体への作用に関する研究は殆どない。このため、学位申請者は治療的としての免疫、酵素、受容体に対するクロレラの生化学的作用を明らかにする目的で本研究を実施した。

1. 免疫系に対する作用： マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)、カスパーゼ、蛋白質チロシンホスファターゼ(PTPase)など、25 種の酵素について免疫関連の試験パネルを用いて検討した。また、ケモカイン受容体やインターロイキン受容体などの 12 種の受容体、サイトカインメディエーター遊離、T細胞/B細胞増殖などの 17 種の免疫関連因子に対する作用についても検討した。その結果、CD45、PTP1B、PTP1C や TC-PTP などの PTPase に対して抑制作用を示したことから、クロレラががんや糖尿病、自己免疫疾患に対して有効である可能性を示唆した。また、クロレラは広範囲の各種のサイトカイン、MMPs、B 細胞や T 細胞の増殖やホルボールエステル受容体結合に対しても抑制作用を示したことから、炎症性疾患、心血管系疾患やリウマチ様関節炎に対する有用性も示唆した。

2. 酵素に対する作用： COX やリポキシゲナーゼなど、計 118 種の酵素に対するクロレラの作用について検討した。その結果、クロレラはカテプシン S や PLA2、COX-2、トロンボキサンシターゼなどの炎症に関連する酵素や TACE、SHP-2、カルパインや蛋白質キナーゼなどを有意な抑制作用したことから、クロレラが炎症、血管疾患、糖尿病、免疫不全、細胞増殖不全などの調節や治療に有効である可能性を示唆した。

3. 受容体に対する作用： トランスポーターやイオンチャンネルを含む計 129 種の各種受容体に対するクロレラの作用について、放射線リガンド結合法を用いて研究した。その結果、クロレラは、

プリン P_{2Y}受容体, アデノシントランスポーター, タチキニン受容体, セロトニン 5-HT_{2B}受容体, トロンボキサン A₂ 受容体と共に, ロイコトリエン受容体, グルタメート AMPA 受容体, カルシウム動員関連受容体と結合することを示した。これらの結果は, クロレラが炎症, 心血管系疾患, 免疫不全, 糖尿病, 細胞増殖不全, 中枢神経系の疾患に対して調節または治療効果を有する可能性を示唆した。

以上のように, 学位申請者はクロレラの多くの生物活性を明らかにし, その成分が多くの疾患の治療に有効である可能性を示唆した。

以上の論文内容について, 審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effects of *chlorella* on activities of protein tyrosine phosphatases, matrix metalloproteinases, caspases, cytokine release, B and T Cell proliferations, and phorbol ester receptor binding
著 者 名 : Cheng, F.C., Lin, A., Feng, J. J., Mizoguchi, T., Takekoshi, H., Kubota, H., Kato, Y. and Naoki, Y.
学術雑誌名 : Journal of Medicinal Food
巻・号・頁・発行年 : 7(2) : 146-152, 2004
- 2) 題 目 : Receptor binding activities of *chlorella* on cysteinyl leukotriene CysLT, glutamate AMPA, ion channels, purinergic P_{2Y}, tachykinin NK₂ receptors and adenosine transporter
著 者 名 : Cheng, F.C., Feng, J. J., Chen, K. H., Imanishi, H., Fujishima, M., Takekoshi, H., Naoki, Y. and Shimoda, M.
学術雑誌名 : Phytotherapy Research
巻・号・頁・発行年 : DOI:10.1002/ptr.2864 published online, 2009
- 3) 題 目 : *Chlorella* powder inhibits the activities of peptidase cathepsin S, PLA₂, cyclooxygenase-2, thromboxane synthase, tyrosine phosphatases, tumor necrosis factor- α converting enzyme, calpain and kinases
著 者 名 : Cheng, F.C., Feng, J. J., Chen, K. H., Imanishi, H., Fujishima, M., Takekoshi, H., Naoki, Y. and Shimoda, M.
学術雑誌名 : International Journal of Food Sciences and Nutrition
巻・号・頁・発行年 : 60(S1) : 89-98, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Studies on 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide IX. Synthesis and pharmacological evaluation of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide biphenyl tetrazoles as angiotensin II antagonists
著 者 名 : Chem, J. W., Lin, H. M., Cheng, F.C., Lo, J. C., Lai, N. Y., Kao, C. L. and Usifoh, C. O.
学術雑誌名 : Journal of the Chinese Chemical Society
巻・号・頁・発行年 : 45: 805-810, 1998

- 2) 題 目 : General pharmacological properties of *Daio-kanzo-to*
 著 者 名 : Takeda, S., Kase, Y., Hayakawa, T., Satoh, K., Ishige, A., Wei, J. W., Ruo, T. I., Cheng, F.C. and Aburada, M.
 學術雜誌名 : Oyo Yakuri / Pharmacometrics
 卷・号・頁・発行年 : 63(5/6): 79-91, 2002
- 3) 題 目 : General pharmacological properties of *Dai-Kenchu-to* extract
 著 者 名 : Takeda, S., Hayakawa, T., Kase, Y., Ishige, A., Wei, J. W., Ruo, T. I., Cheng, F.C. and Aburada, M.
 學術雜誌名 : Oyo Yakuri / Pharmacometrics
 卷・号・頁・発行年 : 63(5/6): 93-104, 2002
- 4) 題 目 : General pharmacological properties of *Hochu-ekki-to*
 著 者 名 : Takeda, S., Kido, T., Kase, Y., Yamamoto, M., Ishige, A., Wei, J. W., Ruo, T. I., Cheng, F.C. and Aburada, M.
 學術雜誌名 : Oyo Yakuri / Pharmacometrics
 卷・号・頁・発行年 : 65(1/2): 23-33, 2003
- 5) 題 目 : Validation of a [³H]astemizole binding assay in HEK293 cells expressing HERG K⁺ channels
 著 者 名 : Chiu, P. J., Marcoe, K. F., Bounds, S. E., Lin, C. H., Feng, J. J., Lin, A., Cheng, F.C., Crumb, W. J. and Mitchell, R.
 學術雜誌名 : Journal of Pharmacological Sciences
 卷・号・頁・発行年 : 95(3): 311-319, 2004
- 6) 題 目 : YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole] inhibits endothelial cell functions induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models
 著 者 名 : Pan, S. L., Guh, J. H., Peng, C. Y., Wang, S. W., Chang, Y. L., Cheng, F.C., Chang, J. H., Kuo, S. C., Lee, F. Y. and Teng, C. M.
 學術雜誌名 : The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
 卷・号・頁・発行年 : 314(1): 35-42, 2005
- 7) 題 目 : The neuroprotective effects of BNG-1: a new formulation of traditional Chinese medicines for stroke
 著 者 名 : Cheng, F.C., Chen, W. L., Wei, J. W., Huang, K. S. and Yarbrough, G. G.
 學術雜誌名 : The American Journal of Chinese Medicine
 卷・号・頁・発行年 : 33(1): 61-71, 2005
- 8) 題 目 : A potential role of YC-1 on the inhibition of cytokine release in peripheral blood mononuclear leukocytes and endotoxemic mouse models
 著 者 名 : Pan, S. L., Guh, J. H., Peng, C. Y., Chang, Y. L., Cheng, F.C., Chang, J. H., Kuo, S. C., Lee, F. Y. and Teng, C. M.
 學術雜誌名 : Journal of Thrombosis and Haemostasis
 卷・号・頁・発行年 : 93(5): 940-948, 2005

- 9) 題 目 : Design and synthesis of potent cystine-free cyclic hexapeptide agonists at the human urotension receptor
著 者 名 : Foister, S., Taylor, L. L., Feng, J. J., Chen, W. L., Lin, A., Cheng, F.C., Smith, A. B. 3rd and Hirschmann, R.
学術雑誌名 : Organic Letters
卷・号・頁・発行年 : 8(9): 1799-1802, 2006
- 10) 題 目 : Identification of a novel competitive inhibitor of p38alpha MAPK by a human PBMC screen
著 者 名 : Liu, Y. C., Ko, C. C., Cheng, F.C., Huang, P. T., Lou, K. L. and Chow, L. P.
学術雑誌名 : Biochemical and Biophysical Research Communications
卷・号・頁・発行年 : 352(3): 656-661, 2007
- 11) 題 目 : Cell cycle phenotype-based optimization of G2-abrogating peptides yields CBP501 with a unique mechanism of action at the G2 checkpoint
著 者 名 : Sha, S.K., Sato, T., Kobayashi, H., Ishigaki, M., Yamamoto, S., Sato, H., Takada, A., Nakajyo, S., Mochizuki, Y., Friedman, J.M., Cheng, F.C., Okura, T., Kimura, R., Kufe, D. W., Von Hoff, D. D. and Kawabe, T.
学術雑誌名 : Molecular Cancer Therapeutics
卷・号・頁・発行年 : 6(1): 147-153, 2007