

氏名(国籍)	EL-MAHMOUDY Abu-Bakr Mohammad Farag (エジプト・アラブ共和国)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第142号		
学位授与年月日	平成15年9月17日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Immunological and Pharmacological Studies on Modulation of Macrophage System by Thymoquinone (マクロファージ系に対する Thymoquinone 修飾作用に関する免疫学および薬理学的研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	武脇 義
	副査	帯広畜産大学 教授	西村 昌数
	副査	岩手大学 教授	小林 晴男
	副査	東京農工大学 教授	小久江 栄一
	副査	岐阜大学 教授	小森 成一

## 論文の内容の要旨

マクロファージには3つの主要な機能がある。抗原提示、貪食作用、分泌である。マクロファージの分泌物には、サイトカイン(インターロイキン、成長因子、腫瘍壊死因子)やフリーラジカル(一酸化窒素や過酸化水素)、タキキニン(サブスタンスP)がある。これらの産物は、周囲の細胞やマクロファージ局在組織の機能を制御する。例えば糖尿病の場合、膵島の未知の変化が免疫系による自己攻撃を引き起こし、膵臓・細胞から細胞内タンパク質(自己抗原)が放出するという病因論が最近では言及されている。この自己免疫反応は、マクロファージによる一酸化窒素(NO)や、インターロイキン(IL)-1や腫瘍壊死因子(TNF)のような炎症性サイトカインの大量産生を介して起こることが明らかにされている。一方、腸管平滑筋層の周囲や間に局在するマクロファージは、これらの平滑筋の機能を調節し、炎症下での腸管運動の変化に関係するという例もある。そのため、化学物質によるマクロファージの分泌機能の調節は、健常または病態時の体内での細胞機能を制御しているのかも知れない。Thymoquinoneは、*Nigelle sativa*という地中海沿岸の国々に生育する植物の種の油脂から分離された活性物質である。その油脂、Thymoquinoneともに血糖値低下効果や抗炎症作用があることが明らかにされてきた。

しかし、マクロファージに代表される免疫系への Thymoquinone の効果については研究されていない。そこで、本研究では、マクロファージの分泌機能に対する Thymoquinone の免疫調節機能と、この調節機能の糖尿病や腸閉塞の改善への応用について調べた。

(1) Thymoquinone の免疫修飾作用を明らかにするために、腹腔内マクロファージによる NO の産生に対する効果を調べた。Thymoquinone は、リポ多糖体 (LPS) で刺激したマクロファージの NO の産生を用量および時間依存的に減少させることがわかった。腹腔内マクロファージでの誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) のタンパク質および mRNA のレベルもまた、Thymoquinone によって濃度依存的に減少した。これらの結果は、Thymoquinone はマクロファージによる NO 産生を抑制することを示唆している。

(2) 前章の実験にもかかわらず、Thymoquinone の正確な作用部位については研究がなされなかった。本章の実験では、Thymoquinone は用量依存的に p38 および p44/42 マイトジェン活性化キナーゼ (MAPK) を減少させることが明らかになった。その効果は iNOS の転写経路を抑制するのかもしれない。

(3、4) 本章では、1型、2型糖尿病の発症抑制や改善に Thymoquinone の抗炎症効果を利用することを試みた。Thymoquinone を前処置したラットではストレプトゾトシンに対する高血糖作用と低インシュリン作用がともになくなった。急性の STZ 誘導性糖尿病では NO やや IL-1 $\cdot$ 、TNF- $\cdot$  といった炎症性サイトカインが上昇する傾向があり、慢性糖尿病ではその逆が起こる。Thymoquinone は LPS 処理条件下での血清やマクロファージ培養上清中の NO やサイトカインの上昇を正常化した。これらのデータは、NO やサイトカインの産生抑制や正常化を介して糖尿病発症を抑える効果が Thymoquinone にあることを強く示唆している。しかし、両型の慢性糖尿病では NO やサイトカインの減少は見られなかった。この防御メカニズムは抗炎症、抗酸化作用と関係しているかも知れない。

(5) Thymoquinone によるマクロファージ由来炎症性メディエーターの抑制は、正常またはエンドトキシン血症時 (腸閉塞) の腸管平滑筋機能の制御にも効果を発揮した。この研究にはハムスターが使われたが、それは比較的柔軟な腸管組織構造をもつからである。本章では、興奮性接合部電位や収縮反応が NK1 レセプターアンタゴニストによって大きく阻害されたことによって、サブスタンス P がハムスター回腸の主要な伝達物質であることが明らかにされた。LPS を動物に投与すると、腸管マクロファージでの iNOS 発現と NO の大量産生によって、興奮性接合部電位や収縮反応はマスクされ、サブスタンス P が LPS によって発現したにもかかわらず、腸閉塞となった。平滑筋の活動減少は、オルガンバス内で、L-NIL (iNOS 阻害剤) と同様に、Thymoquinone によって改善した。この改善は、腸管平滑筋層間にあるマクロファージによる iNOS とプレプロタキキニンの発現の抑制と関係していた。

本研究の知見は、Thymoquinone にはマクロファージ由来の炎症メディエーターのレベルを正常化することに代表される新規免疫修飾機能があり、その効果は糖尿病のような自己免疫疾患や腸閉塞のような炎症性疾患を改善するのに役立つかも知れない。

## 審 査 結 果 の 要 旨

近年、マクロファージから分泌される一酸化窒素 (NO) や炎症性サイトカインが糖尿病の誘発あるいは腸管運動障害に関係することが報告されている。一方、植物油脂 *Nigella sativa* には、血糖低下作用や抗炎症作用があり、地中海沿岸の国々で経験的に利用されてきた。現在、この油脂から Thymoquinone が分離され、その作用機序が注目されている。本研究は、マクロファージ機能に対する Thymoquinone の作用を明らかにすることを目的とし、併せて糖尿病や腸管運動障害の予防、治療薬としての有用性を検討したものである。

まず、Thymoquinone の免疫修飾作用を明らかにするために、リポ多糖体(LPS)刺激によるマクロファージの NO 産生を調べた。Thymoquinone は、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現抑制を介して NO 産生を抑え、この発現抑制効果は p38 および p44/42 マイトジェン活性化キナーゼの阻害であることを明らかにした。

次に、糖尿病の発症抑制や改善にこの薬物が有効であるかを検討したところ、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病動物における NO や炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) の過剰産生は、Thymoquinone の前処置動物で抑制され、糖尿病の発症が顕著に軽減されることを明らかにした。

更に、エンドトキシン血症時に併発する腸管運動障害に対する Thymoquinone の改善作用を調べた。摘出腸管から導出される興奮接合部電位や収縮反応の解析からサブスタンス P が主要な運動調節因子であることを明らかにした。予め LPS 投与した動物の摘出した腸管運動は抑制されるが、この時、腸管マクロファージでの iNOS 発現と大量の NO 産生が惹起されることから、この NO がサブスタンス P による腸管運動調節を阻害したものと示唆した。興味深いことに、Thymoquinone の前処置により、LPS の投与による腸管運動の抑制は改善されたが、この効果は腸管マクロファージにおける iNOS 発現をこの薬物が抑制したことを強く示唆している。

本研究から、Thymoquinone には、マクロファージによる NO や炎症メディエーターの過剰発現を抑制する新規免疫修飾機能があることを明らかにした。これらの成果は、これまで経験的に自己免疫疾患や炎症性疾患の改善に活用されてきた Thymoquinone の作用に対して、科学的な論拠を与えるものである。

審査委員会において、本論文の構成や内容について慎重に審議した結果、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あるものと判定した。

### 学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 Thymoquinone Suppresses Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Macrophages
- 著 者 名 EL-MAHMOUDY, AbuBakr MATSUYAMA, Hayato BORGAN, Mohamed Ali SHIMIZU, Yasutake EL-SAYED, Mossad MINAMOTO, Nobuyuki and TAKEWAKI, Tadashi
- 学術雑誌名 International Immunopharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 2 (11) : 1603~1611, 2002

2) 題 目 Tachykinins Mediate Non-adrenergic, Non-cholinergic Excitatory Neurotransmission to the Hamster Ileum via NK1 and NK2 Receptors

著 者 名 EL-MAHMOUDY, AbuBakr MATSUYAMA, Hayato KHALIFA, Maisa SHIMIZU, Yasutake and TAKEWAKI, Tadashi

学術雑誌名 Life Sciences

巻・号・頁・発行年：73 (15) : 1939~1951, 2003

既発表学術論文

1) 題 目 Peptidergic and Nitrergic Inhibitory Neurotransmissions in the Hamster Jejunum: Regulation of Vasoactive Intestinal Peptide Release by Nitric Oxide

著 者 名 MATSUYAMA, Hayato UNNO, Toshihiro EL-MAHMOUDY, AbuBakr KOMORI, Seiichi KOBAYASHI, Haruo THAPALIYA, Sharada and TAKEWAKI, Tadashi

学術雑誌名 Neuroscience

巻・号・頁・発行年：110 (4) : 779~788, 2002

2) 題 目 An Endothelium-Derived Factor Modulates Purinergic Neurotransmission to Mesenteric Arterial Smooth Muscle of Hamster

著 者 名 THAPALIYA, Sharada MATSUYAMA, Hayato EL-MAHMOUDY, AbuBakr SHIMIZU, Yasutake and TAKEWAKI, Tadashi

学術雑誌名 European Journal of Pharmacology.

巻・号・頁・発行年：461 (2-3) : 129~137, 2003

3) 題 目 Nitrergic Prejunctional Inhibition of Purinergic Neuromuscular Transmission in the Hamster Proximal Colon

著 者 名 MATSUYAMA, Hayato EL-MAHMOUDY, AbuBakr SHIMIZU, Yasutake and TAKEWAKI, Tadashi

学術雑誌名 Journal of Neurophysiology

巻・号・頁・発行年：89 (5) : 2346~2353, 2003