



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Prophylactic and therapeutic effects of <i>Acanthopanax senticosus</i> HARMS extract on murine collagen-induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎マウスにおけるエゾウコギ抽出液の予防および治療効果)
Author(s) 著者	高橋, 祐輔
Degree number 学位記番号	甲第 2754 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 2754 号	氏名	高橋 祐輔
<p>Prophylactic and therapeutic effects of <i>Acanthopanax senticosus</i> HARMS extract on murine collagen-induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎マウスにおけるエゾウコギ抽出液の予防および治療効果)</p> <p>研究目的</p> <p>エゾウコギはウコギ科の植物で、その根皮や茎皮は滋養強壮および精神安定効果をはじめ、多彩な作用を発揮する。また、これまで我々は、エゾウコギエキスが抗酸化能を有することを見い出してきた。そこで今回、関節リウマチモデルとして知られているコラーゲン誘発関節炎マウス(CIAマウス)を用い、エゾウコギエキスの抗炎症作用および抗TNFα抗体との併用効果を検討した。</p> <p>研究方法</p> <ol style="list-style-type: none">1) CIA マウスの作製法 6週齢の DBA/1J 系雄性マウスに、ウシII型コラーゲン(100μl)とフロイント完全アジュバントの混合液を、3週間の間隔で2回感作しCIAを誘導した。2) エゾウコギエキスの投与方法 「エゾウコギ 100%エキス粉末」を用い、500mg/kg 体重/日を、初回感作1週間前あるいは関節炎発症日から、毎日強制経口投与した。対照群には、アスコルビン酸(10g/kg 体重/日)または蒸留水を同様に与えた。3) 抗 TNFα 抗体の投与方法 関節炎発症日より、50μgのヤギ抗マウスTNFα抗体を3日毎に計4回、腹腔内投与した。ヤギ抗マウス TNFα抗体の比較対照には、生理食塩水またはヤギIgGを用いた。4) 関節炎症状の評価法			

踵部の厚さおよび、四肢の腫脹、紅斑、関節の変形や硬直の度合いを指標とするクリニカルスコアで行った。

5) 抗酸化能の解析法

ヒト好中球を PMA で刺激し、培養上清中のスーパーオキシド量をシトクロム C 法で測定した。また、スーパーオキシドとヒドロキシラジカルに対する直接的消去能は、電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法で解析した。

6) 炎症性サイトカイン産生量の測定法

LPS 刺激したヒト末梢血単核球(PBMC)を用い、TNF α および IL-6 の mRNA 発現量は RT-PCR 法で、培養上清中の蛋白発現量は ELISA 法で、それぞれ調べた。

研究成績

- 1) CIAマウスに初回感作1週間前よりエゾウコギエキスを投与すると、蒸留水投与群と比べ発症が遅延し、踵部の厚さとクリニカルスコアの最大値も軽減した。一方、比較対照としたアスコルビン酸投与群では、発症遅延や症状の軽減はみられなかった。
- 2) PMA刺激したヒト好中球が産生するスーパーオキシド量は、エゾウコギエキスや対照としたアスコルビン酸存在下で、濃度依存性に減少した。また、エゾウコギエキスやアスコルビン酸は、スーパーオキシドおよびヒドロキシラジカルに対し、濃度依存性に直接的消去能を発揮した。
- 3) エゾウコギエキスを添加すると、LPS刺激PBMCにおけるTNF α および IL-6のmRNA量と培養上清中の蛋白量が、いずれも著明に減少した。アスコルビン酸についても両者の減少傾向はみられたが、エゾウコギエキスに比べ、その程度は極めて小さかった。
- 4) CIAマウスに関節炎発症後からエゾウコギエキスとアスコルビン酸を単独投与しても、明らかな治療効果はなかった。
- 5) 抗TNF α 抗体とエゾウコギエキスを併用投与したところ、抗TNF α 抗体単独投与時に比べ、踵部の厚さとクリニカルスコアが有意に改善した。一方、アスコルビン酸を併用しても、抗TNF α 抗体による治療効果の明らかな増強はみられなかった。

考察

本研究では、関節リウマチ (RA) モデルとして知られるCIAマウスを用い、エゾウコギエキスの抗炎症作用および抗TNF α 抗体との併用効果を検討した。

RAの病変局所において、病態形成に活性酸素種 (ROS) の関与が報告されている。これまで我々は、エゾウコギエキスが抗酸化能を有することを見出ししてきた。そこで、まずはじめに、CIAマウスにおいてエゾウコギエキスが抗炎症作用を発揮し得るか否か調べた。初回感作1週間前よりエゾウコギエキスを連日投与すると、蒸留水投与群と比べ、関節炎の発症が遅延し症状も軽減した。しかし、抗酸化物質の比較対照として用いたアスコルビン酸投与群では、発症遅延や症状の軽減はみられなかった。この結果から、エゾウコギエキスの抗酸化能がアスコルビン酸のそれよりも強い可能性が考えられた。

そこで、エゾウコギエキスとアスコルビン酸の抗酸化能について、比較検討を行った。その結果、エゾウコギエキスとアスコルビン酸はともに濃度依存性に、PMA刺激したヒト好中球のスーパーオキシド産生を抑制し、さらにスーパーオキシドとヒドロキシラジカルに対して直接消去能を発揮した。エゾウコギエキスの体内クリアランスについて報告がないため、アスコルビン酸と直接比較は出来ないが、*in Vitro*の結果から著しい差異はないと考えられた。すなわち、前投与実験におけるエゾウコギエキスとアスコルビン酸との効果の違いは、抗酸化能のみで説明は出来なかった。

これまで、関節リウマチの病態形成にTNF α やIL-6などの炎症性サイトカインが重要な役割を担っていることが、報告されている。そこで、エゾウコギエキスとアスコルビン酸とで、炎症性サイトカインの産生抑制能に差があるか否か検討した。すなわち、LPS刺激PBMCにおけるTNF α とIL-6産生に及ぼすエゾウコギエキスとアスコルビン酸の影響を調べた。その結果、エゾウコギエキス存在下では、LPS刺激PBMCにおけるTNF α とIL-6のmRNAおよびタンパク量がともに減少しており、転写レベルで両サイトカインの産生を抑制することが明らかになった。同様に検討したアスコルビン酸についても、濃度依存性に両サイトカインのmRNAおよびタンパク量は減少したが、エゾウコギエキスに比べその程度は極めて小さかった。すなわち、アスコルビン酸に比べ、エゾウコギエキスでは炎症性サイトカイン産生抑制能が強いため、

エゾウコギエキス投与したCIAマウスでのみ、発症遅延と症状の軽減が起こったと考えられた。

さらに、CIAの発症後よりエゾウコギエキスを投与する治療実験も試みたが、明らかな効果は確認出来なかった。

現在、関節リウマチの治療には、抗リウマチ薬に加え、サイトカインを標的とした抗TNF α 抗体などの生物学的製剤が用いられている。そこで、抗TNF α 抗体の治療効果をエゾウコギエキスが増強し得るか否か、解析した。その結果、エゾウコギエキスと抗TNF α 抗体の併用投与時には、腫部の厚さとクリニカルスコアが有意に減少しており、エゾウコギエキスが抗TNF α 抗体の治療効果を増強することが確認された。一方、アスコルビン酸の併用投与では、抗TNF α 抗体単独投与時と比べクリニカルスコアにほとんど差はみられなかった。抗TNF α 抗体の主な作用機序は、遊離したTNF α の補足である。今回の併用効果の検討から、エゾウコギエキスは抗酸化作用に加え、TNF α の産生を抑制することで遊離TNF α 量を減少させ、抗TNF α 抗体の治療効果を増強したと考えられた。

結論

エゾウコギエキスは、抗酸化作用に加え炎症性サイトカインの産生阻害を介し、抗TNF α 抗体の関節リウマチ治療効果を増強することが示唆された。

論文審査の要旨及び担当者

平成 25 年 12 月 20 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2754 号	氏名	高橋 祐輔
論文審査 担当者	主査 渡邊 直樹	副査 堀尾 嘉幸	
	委員 小海 康夫	委員 小船 雅義	

論文題名	Prophylactic and therapeutic effects of <i>Acanthopanax senticosus</i> HARMS extract on murine collagen-induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎マウスにおけるエゾウコギ抽出液の予防および治療効果)
------	--

結果の要旨

本研究では、関節リウマチモデルの CIA マウスを用い、エゾウコギエキスの抗炎症作用および抗 TNF- α 抗体との併用治療効果を検討した。その結果、エゾウコギエキスをあらかじめ CIA マウスに強制経口投与すると、関節炎の発症遅延および症状軽減効果を発揮した。また、関節炎発症後の治療実験では、エゾウコギエキス単独での治療効果は弱いものの、抗 TNF- α 抗体との併用投与で効果増強が可能なことを見出した。さらに、エゾウコギエキスの作用機序として、抗酸化能に加え、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 の産生阻害を明らかにした。

本研究の成果は、エゾウコギエキスの関節リウマチモデルマウスに対する予防および治療効果に関する新知見であり、博士論文に値すると審査委員全員から評価を頂いた。