

学 位 論 文 題 名

Suppressive effects of natural antioxidants on
endotoxin-induced uveitis by
inhibiting the NF- κ B signaling pathway

(NF- κ B シグナル経路阻害による
エンドトキシン誘発ぶどう膜炎に対する天然抗酸化物質の抑制効果)

学位論文内容の要旨

Background and purpose. Blue honeysuckle extract (BHE) contains high level of phenolic compounds, which have been reported to have multiple biological properties, including antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. Lutein is one of the most widely found carotenoids distributed in fruits and vegetables frequently consumed. Lutein present in the macula and lens, and is known to many as “the eye-protective nutrient”. The aim of the present study was to investigate the effects of two kinds of natural antioxidants, BHE and lutein on endotoxin-induced uveitis (EIU).

Materials and Methods. EIU was induced in male Lewis rats by a footpad injection of 200 μ g lipopolysaccharide (LPS). In BHE experiment, 1, 10, or 100 mg of BHE was injected intravenously immediately after LPS injection. In lutein experiment, 1, 10, 100 mg/kg of lutein or 1mg/kg of dexamethasone was administered intravenously at 30 minutes before, at the same time as, and at 30 minutes after LPS treatment. The aqueous humor was collected at 24 hours after LPS injection, the number of infiltrating cells, protein concentration, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- α , and prostaglandin (PG)E2 levels in the aqueous humor were determined. Some eyes were enucleated for histologic examination and immunohistochemical analysis. Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against activated NF- κ B was performed to evaluate the effect of BHE and lutein on NF- κ B activation in the iris-ciliary body (ICB) of rats. To further clarify the anti-inflammatory effect, RAW264.7 cells (a mouse macrophage cell line) were stimulated with LPS in the presence or absence of BHE and its major phenolics, cyanidin 3-glucoside (C3G), cyanidin 3-rutinoside (C3R), chlorogenic acid (CA) and lutein. Expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were analyzed by Western blot method.

Results. Both BHE treatment and lutein treatment significantly reduced the inflammatory cell infiltration, the protein concentration, the levels of NO, TNF- α and PGE2 in the aqueous humor and improved histologic status of the ocular tissue. The anti-inflammatory effect of 100 mg/kg lutein was as strong as that of 1 mg/kg dexamethasone. The number of activated NF- κ B-positive cells was lower in the ICB treated with BHE or lutein at 3 hours after LPS injection. BHE significantly suppressed the production of NO, PGE2 and TNF- α in the culture medium as well as the expression of iNOS and COX-2 by LPS-stimulated RAW264.7 cells in a dose-dependent fashion. C3G, C3R and CA showed no or weak inhibitory effects on the level of inflammatory mediators and the expression of iNOS and COX-2. Lutein also suppressed iNOS and COX-2 expressions in RAW cells.

Discussion. Treatment with BHE or lutein significantly reduced LPS induced cellular infiltration and protein concentration in the aqueous humor as well as histopathologic manifestation of EIU. The results showed that BHE and lutein significantly suppressed ocular inflammation in EIU in a dose-dependent manner. In the present study, like TNF- α , level of NO and PGE2 in aqueous humor was also reduced by BHE or lutein administration. These data indicated that the suppression of inflammatory manifestation by BHE and lutein treatment may mainly be attributed to the inhibition of these inflammatory mediators production. We have found BHE and lutein can inhibit the expression of iNOS and COX-2 as well as their products, NO and PGE2, in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Thus, it appears that BHE and lutein suppresses the production of NO and PGE2 by blocking the expression of iNOS and COX-2 protein, respectively. The expressions of TNF- α , iNOS and COX-2 are all regulated by NF- κ B. Thus, the inhibition of NF- κ B activation can help to explain the beneficial effect of BHE and lutein in EIU treatment.

Conclusions. These results suggest that BHE and lutein attenuate the degree of inflammation in eyes with EIU by inhibiting the NF- κ B dependent signaling pathway and the subsequent production of proinflammatory mediators.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Suppressive effects of natural antioxidants on endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway

(NF- κ B シグナル経路阻害による

エンドトキシン誘発ぶどう膜炎に対する天然抗酸化物質の抑制効果)

活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスが、ガン、炎症などの多くの病気の原因あるいは増悪要因となることは良く知られている。このような疾患の治療や予防に対して、抗酸化やラジカルスカベンジャー作用を有する天然の物質を用いることが最近盛んに試みられ、有用性を示すデータが蓄積している。本研究では急性前部ぶどう膜炎の動物モデル (endotoxin-induced uveitis: EIU) を用いて、2種類の天然抗酸化物質 (ハスカップ抽出物とルテイン) のぶどう膜炎に対する治療効果及び作用機序について調べた。グラム陰性菌の外膜のリポ多糖構成成分であるLPSをラットの足蹠に注射して前部ぶどう膜炎を惹起し、ハスカップ抽出物あるいはルテインを投与した。その結果、両物質ともに前房水中の炎症細胞数、タンパク濃度、炎症メディエーターのNO, プロスタグランジンE2、TNF- α 濃度を有意に抑制し、抗炎症作用を示した。また免疫組織化学検査により、虹彩、毛様体においてNF- κ B経路を抑制することも明らかにされた。In vitroの実験でも、ハスカップ抽出物はLPSで誘導した炎症メディエーターの濃度を抑制した。ハスカップ抽出物とルテインはともにLPSで誘導したiNOSおよびCOX-2蛋白の発現を抑制した。ハスカップ抽出物とルテインはNF- κ B依存シグナル経路の抑制により濃度依存的に抗炎症作用を示した。以上より、この二種類の天然抗酸化物質はぶどう膜炎の予防と治療に使用できる可能性が示唆された。

公開発表にあたってはまず副査の上出利光教授から、EIUにおいて炎症細胞浸潤の経過の質問があり、EIUの前房内の炎症細胞の浸潤はLPS注射後6時間から見られ、24時間でピークに達して、48時間で炎症が収まると回答した。次に、房水中の蛋白、サイトカインの濃度は抑制されたが、細胞浸潤への効果は相

対的に弱くみえる原因についての質問があり、この現象の原因は明らかではないと回答した。次に、NF- κ B シグナル経路と臨床疾患の関係についての質問があり、NF- κ B シグナル経路は主に細胞実験と動物実験を中心に研究されていて、臨床のデータが少ないと回答した。

次いで副査の小野江和則教授から、房水中の細胞浸潤にはケモカインが関与しているのではないかととの質問に対して、確かに関与しているはずなので、調べる意義があると回答した。次に、NF- κ B を発現している細胞の性質についての質問があり、NF- κ B を発現している細胞は多核白血球、マクロファージである可能性が高いと回答した。この回答に対して、多核白血球、マクロファージの浸潤は6時間から起こったと回答したのに、なぜ3時間で NF- κ B 陽性細胞は多核白血球、マクロファージであるのかという質問があり、6時間でみられる細胞は前房内にあり、3時間での NF- κ B 陽性細胞は虹彩、毛様体にあると回答した。

最後に主査の大野重昭教授から、抗酸化物質投与により NF- κ B シグナル経路上流への影響についての質問があり、抗酸化物質により、NF- κ B 不活性化を維持する蛋白である I κ B の分解を抑制できる結果があると回答した。次に、植物性食物により疾患予防についての質問があり、植物性食物の中に抗酸化物質が含まれるので、野菜を十分に摂取することによって、疾患予防が期待できると回答した。

この論文は、副作用がほとんどない抗酸化物質が、EIU に対する著明な治療効果を有することを明らかにした点で高く評価され、今後ハスカップ抽出物やルテインがぶどう膜炎の予防治療に臨床応用されることが強く期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。