

# 論文内容の要旨

申請者氏名    ONG GUANG HAN

細菌やウイルス等の病原体感染後に認められる炎症は感染防御に必須の役割を果たす生体反応である一方で、敗血症や急性呼吸窮迫症候群（ARDS）といった重篤な症状を引き起こす。こうした炎症はマクロファージや樹状細胞に発現している Toll-like receptor (TLR)ファミリーと呼ばれる自然免疫受容体による病原体成分の認識と下流シグナル伝達経路により発現誘導されるインターロイキン6(IL-6)や Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )といった炎症性サイトカインにより惹起される。本論文は、ショウガ科の地下茎に含まれる天然成分 1'-Acetoxychavicol acetate (ACA)が、TLR4のリガンドであり敗血症の原因となるグラム細菌の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）による炎症を抑制することを見出した。マウス骨髄由来マクロファージを ACA で前処理後、LPSで刺激し炎症性サイトカインの産生をELISAやqPCR法で測定したところ、ACA前処理によりIL-6やTNF $\alpha$ の産生が有意に抑制された。また、ヒトマクロファージ細胞株においても同様の結果が得られた。さらに、TLR4下流に位置するシグナル伝達経路の解析を行った。その結果、これらサイトカイン遺伝子の発現調節を行う転写因子NF $\kappa$ BやAP-1の活性化が減弱していた。そこで、上流因子のTRAF6に着目した。TRAF6はリングフィンガー型ユビキチンE3リガーゼであり、自身のK63型ポリユビキチン化を通して活性化型となる。その結果、下流のIKK $\beta$ やTAK1と呼ばれるリン酸化酵素がリクルートされ活性化する。活性化したこれらリン酸化酵素はそれぞれNF $\kappa$ BとAP-1の活性化に寄与することが知られている。そこで、TRAF6の活性化がACAにより抑制されるかを検討した。TRAF6を過剰発現させた時に誘導されるNF $\kappa$ Bレポーター遺伝子の発現がACAにより抑制された。また、TRAF6の過剰発現により認められるK63型自己ユビキチン化がACA処理により抑制されることがウェスタンブロットにより確認された。また、LPS刺激後に誘導されるマクロファージ内在性のTRAF6のユビキチン化もACA前処理により抑制された。これらのことから、ACAはTRAF6の活性化を抑制しうることが明らかとなった。一方、LPSによる生じるミトコンドリア由来の活性酸素種ROSがTRAF6依存的なNF $\kappa$ B活性化に寄与することが報告されている。そこでROSの産生をMitoSOXにより検出を行った。その結果、ACAによりROS産生が有意に減少した。以上のことから、ACAはマクロファージにおいてTRAF6の活性化を抑制することでLPSによる炎症性サイトカインやROSの産生を抑制することで、炎症を抑制することが強く示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名      ONG GUANG HAN

病原体感染後に認められる炎症は感染防御に重要である一方、敗血症や急性呼吸窮迫症候群（ARDS）といった重篤な症状を引き起こすため、炎症を抑制する制御技術の確立は重要である。炎症は主にマクロファージや樹状細胞が産生するインターロイキン6（IL-6）や Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ （TNF $\alpha$ ）といった炎症性サイトカインにより惹起される。申請者は、ショウガ科の地下茎に含まれる天然成分 1'-Acetoxychavicol acetate（ACA）が、敗血症の原因となる細菌リポ多糖（LPS）による炎症誘導を抑制することを見出した。まず、マウス骨髄由来マクロファージを ACA で前処理後、LPS で刺激し炎症性サイトカインの産生を ELISA や qPCR 法で測定したところ、ACA により IL-6 や TNF $\alpha$  の産生が有意に抑制された。また、ヒトマクロファージ細胞株においても同様の結果が得られた。さらに、LPS 受容体である Toll-like receptor 4（TLR4）下流に位置するシグナル伝達経路の解析を行った結果、ACA 処理を行った場合に LPS 刺激後の転写因子 NF $\kappa$ B や AP-1 の活性化が減弱していた。続いて、上流因子のリングフィンガー型ユビキチン E3 リガーゼである TRAF6 に着目した。TRAF6 の活性化が ACA により抑制されるかを検討したところ、TRAF6 の過剰発現により認められる NF $\kappa$ B 依存的レポーター遺伝子の発現や K63 型の自己ポリユビキチン化が ACA 処理により抑制され。さらに、LPS 刺激後に誘導されるマクロファージの内在性 TRAF6 の K63 型ポリユビキチン化も ACA 前処理により抑制された。一方、LPS による生じるミトコンドリア由来の活性酸素種 ROS が TRAF6 依存的な NF $\kappa$ B 活性化に寄与することが報告されていることから、ROS の産生を MitoSOX により検出を行った結果、ACA により ROS 産生が有意に減少することを見出した。これらの結果から、ACA はマクロファージにおいて TRAF6 の活性化を抑制することで LPS による炎症応答を抑制することが強く示唆された。

以上のように、本論文は、ACA の持つ炎症抑制メカニズムを明らかにしたことに加え、敗血症等の炎症性疾患の治療につながるものが期待されるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。