

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Agus Budiawan Naro Putra
審査委員	主査 菅原 卓也 副査 西 甲介 副査 亀下 勇 副査 山内 聡 副査 柏木 丈拡

論文名

Studies on the stimulatory effects of jellyfish collagen on innate immune system
(クラゲ由来コラーゲンの自然免疫促進効果に関する研究)

審査結果の要旨

可食性のクラゲ由来のコラーゲンがヒト型ハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体産生やヒト末梢血リンパ球の IgM 産生を促進するとともに、インターフェロン(IFN)- γ や、腫瘍壊死因子(TNF)- α 産生も促進するなど、獲得免疫系に関与する B リンパ球、および T リンパ球の双方ともを活性化する効果があることが明らかになっている。また、コラーゲンの免疫促進効果はクラゲ由来ばかりでなく、ウシアキレス腱由来のコラーゲンにも認められたものの、その比活性はクラゲコラーゲンの 6 分の 1 以下であった。このことは、コラーゲンの由来によりその生理効果に大きな差があることを意味しており、獲得免疫系に対する促進効果は、クラゲ由来コラーゲンに優位性があることが示唆された。そこで本研究では、抗原非特異的な自然免疫系へのコラーゲンの効果に着目し、病原菌などを貪食して無毒化するとともに、その病原菌に対する獲得免疫の確立を誘導するマクロファージや樹状細胞に対するコラーゲンの効果を検討することを目的とした。

自然免疫系に関与するマクロファージに対するクラゲコラーゲンの作用を明らかにするため、まず、マウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞の貪食活性に及ぼす効果を検討した。その結果、クラゲコラーゲンは、J774.1 細胞の貪食活性を促進した。また、メス BALB/c マウスから調製した腹腔マクロファージ(P-Mac)に対する効果を検討したところ、P-Mac に対してもコラーゲンは貪食活性促進効果を示した。また、J774.1 細胞、および P-Mac のサイトカイン産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果を検討したところ、TNF- α 、およびインターロイキン(IL)-6 の産生を有意に促進した。サイトカイン産生促進効果について、その作用メカニズムを明らかにするため、TNF- α 、IL-6、および IL-12 の遺伝子発現に及ぼすクラゲコラーゲンの効果をリアルタイム RT-PCR で解析した。その結果、J774.1 細胞、および P-Mac の両細胞に対して、サイトカインの mRNA 発現を有意に促進したことから、遺伝子発現レベルの促進により、サイトカイン産生を促進していることが確認された。さらに、クラゲコラーゲンを経口投与したマウスから回収した P-Mac の活性を検

討したところ、コラーゲン摂取により、P-Mac のサイトカイン産生活性が促進されたことから、経口摂取によってもコラーゲンはマクロファージ活性化作用を示すことが明らかになった。クラゲコラーゲンによって遺伝子発現レベルが促進されることが明らかになったことから、その作用メカニズムについて詳細に検討した。マクロファージは、細胞表面に発現しているトール様受容体(TLR)4 を介して活性化される。そこで、TLR4 の特異的阻害剤作用下においてクラゲコラーゲンの効果を検討したところ、TLR4 の阻害によって、J774.1 細胞の TNF- α 産生に及ぼすコラーゲンの促進効果は大きく抑制された。このことから、クラゲコラーゲンは TLR4 経路でマクロファージを活性化することが明らかになった。

TLR4 はエンドトキシンとして知られるリポ多糖 (LPS) の受容体であり、マクロファージは TLR4 経路でエンドトキシンによって活性化される。そこで、クラゲコラーゲン抽出物に夾雑しているエンドトキシンの影響の可能性が考えられたため、クラゲコラーゲン抽出物中のエンドトキシン濃度を測定した。その結果、抽出物にはエンドトキシンは混入しておらず、また、コラーゲナーゼ処理することで活性が有意に低下したことから、クラゲコラーゲン抽出物のマクロファージ活性化作用はエンドトキシンによるものではなく、コラーゲンによる効果であることが確認された。

さらに詳細な作用メカニズムを解析した結果、TLR4 経路の下流において、クラゲコラーゲンは NF- κ B の核移行の促進に加え、MAP キナーゼの一種である JNK の活性化を促進することで、マクロファージを活性化することが明らかになった。また、マクロファージの活性化に抑制的に作用する PPAR γ 1 の発現を抑制することが明らかになった。

骨髄由来樹状細胞に対するクラゲコラーゲンの効果を検討した。マウス大腿骨から骨髄細胞を回収し、GM-CSF を添加した培地で培養することにより、樹状細胞へと誘導した。樹状細胞に分化したことは、形態的な変化に加え、MHC-II と CD11c の発現により確認した。得られた骨髄樹状細胞に対して、クラゲコラーゲンを作用させたところ、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、および IL-12 産生が顕著に促進された。この産生促進は、遺伝子発現の活性化によることが明らかになった。さらに、コラーゲンの処理により、樹状細胞への分化誘導、および成熟が促進されることが明らかになった。

本研究によって、クラゲコラーゲンはマクロファージ、および樹状細胞を活性化することが明らかになり、獲得免疫系だけでなく、自然免疫系も活性化することが解明された。

本論文の公開審査会は、平成 27 年 8 月 1 日に高知大学農学部において開催され、論文審査と質疑応答が行われた。引き続き、学位審査委員会を開催して論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して本論文は博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判定した。