

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンの生理機能に関する研究

氏 名 三 宅 正 樹

高齢化社会の到来により近年医療費が巨大化する中で、わが国では予防を重視する観点から生活習慣病という概念を導入して国民の生活習慣の改善を進めている。この背景をもとにキノコが有する生理活性の活用にも大きな期待が寄せられている。食品・医薬品・健康食品等で利用されてきたキノコには、抗腫瘍作用、血圧降下作用、抗糖尿病作用、抗高脂血症作用、認知症改善作用、抗菌作用、抗血栓作用などの多くの生理作用が知られてきた。

本研究では、抗炎症作用に着目し、食用ブラウンマッシュルームから 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンを単離し、その多彩な生理機能を見出した。

第 2 章 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンの抗炎症作用及び免疫調節作用

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 産生抑制作用を指標にして、食用ブラウンマッシュルーム *Agaricus bisporus* IMBACH より単離した化合物は、¹³C-NMR 分析、¹H-NMR 分析、質量分析の結果、2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オン (2-amino-3H-phenoxazin-3-one, APO) であると結論した。

LPS/IFN- γ で刺激したマウス腹腔マクロファージからの炎症性因子の産生に対する影響を検証した結果、APO は細胞傷害性を有することなく、NO 及びプロスタグランジン E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) の産生を抑制した。また IFN- γ で刺激したマウスマクロファージ様細胞株 Raw264.7 からの炎症性因子の産生に対する影響を検証した結果、APO は NO 産生及び IL-6 産生を抑制した。

NO 産生抑制作用の機序解析のために、ウェスタンブロッティング分析を実施した結果、APO は NO 合成酵素である iNOS のタンパク質量を用量依存的に減少した。この結果から、APO は NO 合成酵素である iNOS タンパク質の発現を抑制することを介して、NO 産生を抑制していることが示唆された。続いて、PGE₂ 産生抑制作用の機序解析のために、ヒツジ COX の酵素活性に対する影響を検証した結果、APO は COX-1 及び COX-2 の両者の酵素活性を阻害した。COX-1 及び COX-2 に対する APO の IC₅₀ 値の比率は 1.33 であり、APO は COX のアイソフォームに対して大きな選択性は有さないことが示唆された。

次に、抗原刺激した T 細胞のサイトカイン産生に対する影響を検証するために、免疫した BALB/c マウスから CD4 陽性 T 細胞を精製し、APO 存在下において、抗原及び抗原提示細胞で刺激した結果、APO は用量依存的に IL-4 産生を増強した。IFN- γ 産生を誘導する IL-12 は Th1 細胞分化に重要であり、IL-12 産生が抑制されると免疫応答は Th2 サイトカインプロファイルに偏向する。そこで、LPS/IFN- γ で刺激したマクロファージからの IL-12 産生に対する影響を検証した結果、APO は用量依存的に IL-12 産生を抑制した。以上の結果から、APO は IL-12 の産生抑制を介して Th2 細胞分化を促進することが示唆された。

本章の結果から、APO は感染炎症性疾患に加えて、T 細胞介在性の炎症性自己免疫疾患に対しても有効な治療薬となる可能性が示唆された。

第 3 章 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンのメラニン生成抑制作用

マウスメラノーマ B16 細胞を APO 存在下で培養した結果、APO は細胞傷害性を有することなく、用量依存的にメラニン生成を抑制した。この作用強度は、医薬部外品の美白有効成分であるコウジ酸と比較して、約 1,000 倍強いものであった。

メラニン生成抑制作用の機序解析のために、マッシュルーム由来のチロシナーゼ及び B16 細胞抽出粗酵素液を用いて酵素活性に対する影響を検証した結果、コウジ酸がチロシナーゼ活性を阻害したと対照的に、APO はいずれの由来のチロシナーゼに対しても酵素活性阻害作用を有していなかった。次に、APO 存在下で培養した B16 細胞抽出液を用いて、チロシナーゼザイモグラフィ分析を実施した結果、B16 細胞中のチロシナーゼ活性は APO 用量依存的に低減した。ザイモグラフィ分析の結果から、チロシナーゼタンパク質の発現抑制作用が推測された。そこで APO 存在下で培養した B16 細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロッティング分析を実施した結果、APO はチロシナーゼタンパク質及びチロシナーゼの発現を制御する転写因子 *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) タンパク質の発現を用量依存的に抑制した。しかしながら、メラニン生成酵素である TRP-2 と TRP-1 のタンパク質発現には関与していなかった。以上の結果から、APO のメラニン生成抑制作用メカニズムは、チロシナーゼ及びその制御因子である MITF のタンパク質発現を抑制することによるものであることが示唆された。

また、メラニン生成抑制作用に関する APO の活性部位を検証するため、構造類似化合物である PHX を用いて構造活性相関解析を行った結果、APO のメラニン生成抑制作用は、2 位のアミノ基、もしくは 3 位のカルボニル基に起因していることが推察された。

本章の結果は、APO がメラニン生成に対して有用な抑制剤であることを示しており、さらに皮膚組織における色素沈着などの色素異常症の治療及び予防に有益な効果をもたらす可能性があると考えられた。

第 4 章 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンの抗骨粗鬆症作用

骨芽細胞の分化に対する影響を検証するために、APO 存在下で培養した MC3T3-E1 細胞を用いて、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した結果、APO は用量依存的に ALP 活性を増強した。続いて MC3T3-E1 細胞上の石灰化層中のカルシウム量を測定した結果、APO は用量依存的に沈着カルシウム量を著しく増強した。また破骨細胞分化に関与する因子の産生に対する影響を検証するために、APO 存在下で培養した MC3T3-E1 細胞培養上清中の因子量を測定した結果、APO は破骨細胞誘導性因子である NO 及び IL-6 産生を用量依存的に抑制し、破骨細胞形成抑制因子である OPG 産生を用量依存的に増強した。

次に、破骨細胞分化に対する影響を検証するために、脾臓マクロファージ、または骨髄細胞と MC3T3-E1 の共培養系を用いて、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性の多核破骨細胞数を計測した結果、APO は破骨細胞分化を用量依存的に抑制した。

さらに *in vivo* における APO の作用を検証するために、骨粗鬆症モデルマウスとして、卵巣摘出 (OVX) マウスの骨吸収に対する影響を検討した結果、大腿骨灰化重量は、4 週間の APO 投与により OVX による減少を用量依存的に抑制する傾向が認められた。また大腿骨中のカルシウム量、リン量、マグネシウム量は APO 投与により、OVX による減少を有意に抑制した。加えて骨粗鬆症のマーカーである血清中オステオカルシン量も APO 投与により有意に減少した。

本章の結果から、APO は骨粗鬆症のみならず、慢性関節リウマチや歯周病などの慢性炎症性疾患による骨破壊に伴う骨量減少に対する治療薬として有益な効果をもたらす可能性があると考えられた。

本研究では、食用ブラウンマッシュルーム *Agaricus bisporus* IMBACH から 2-アミノ-3H-フェノキサジン-3-オンを単離し、その生理機能について検証を行った。その結果、APO は炎症反応と密接に関わり、種々のサイトカインや酵素の産生量を調節することで、多彩な生理活性を発揮することが明らかとなった。これまでに未報告の抗炎症作用及び免疫調節作用、メラニン生成抑制作用、抗骨粗鬆症作用を見出し、その機能と作用機序の一部を明らかにした。今後、本論文により得られた知見を基にして、APO は医薬品や医薬部外品、または健康食品としての有効成分またはそのリード化合物として幅広い領域で利用されることが期待される。