

Salacia reticulata による
関節リウマチの改善効果に
関する研究

関口祐介

目次

総論の部

緒言 1

第 1 章 <i>Salacia reticulata</i> が関節リウマチの関節機能に与える影響	4
第 1 節 <i>Salacia reticulata</i> が炎症反応に及ぼす影響	5
第 2 節 <i>Salacia reticulata</i> が関節炎に対し、組織学的に及ぼす影響	9
第 3 節 <i>Salacia reticulata</i> が関節の炎症・破壊部位の遺伝子発現に及ぼす影響	16
第 4 節 本章の小括および考察	18
第 2 章 <i>Salacia reticulata</i> が炎症性滑膜細胞(MTS-C H7)の増殖及び機能に与える影響	20
第 1 節 炎症性滑膜組織由来細胞株の樹立	21
第 2 節 <i>Salacia reticulata</i> 熱水抽出物による MTS-C H7 に及ぼす影響	23
第 3 節 <i>Salacia reticulata</i> 熱水抽出物由来残渣水溶性画分による MTS-C H7 に及ぼす影響	26
第 4 節 本章の小括および考察	29
第 3 章 <i>Salacia reticulata</i> に存在する抗関節リウマチ因子の探索	31
第 1 節 <i>Salacia reticulata</i> 熱水抽出物に含まれるポリフェノール化合物による MTS-C H7 に及ぼす影響	32
第 2 節 <i>Salacia reticulata</i> 熱水抽出物に含まれる活性本体の探索	35
第 3 節 <i>Salacia reticulata</i> 熱水抽出物に含まれるペプチド様物質による MTS-C H7 に及ぼす影響	

す影響	38
第4節 本章の小活および考察	43
総括	45
謝辞	47
実験の部	49
引用文献	61

本論文で使用した略語一覧

BSA; bovine serum albumin

CAIA ; Type II collagen antibody-induced arthritis

Col1A1 ; Collagen 1A1

Col2A1 ; Collagen 2A1

EC ; (-) – Epi-catechin

ECG ; Epi-catechin gallete

EDTA ; Etylenediaminetetraacetic acid

EGC ; Epi-gallo catechin

EGCG ; Epi-gallo catechin gallete

GAPDH ; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HE ; Mayer's hematoxylin and eosin

IFN ; Interferon

IL ; Interleukin

LPS ; Lipopolysaccharide

Lys; Lysozyme

MMP ; Matrix metalloproteinase

OPG ; Osteoprotegerin

PB ; Phosphate buffer

PGE₂ ; Prostaglandine E₂

RA ; Rheumatoid arthritis

RANKL ; Receptor-activated of nuclear factor κ B ligand

SDS-PAGE ; Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SR ; *Salacia reticulata*

SRL ; *Salacia reticulata* leaf

SRLE ; *Salacia reticulata* leaf hot-water extract (SRL 熱水抽出物)

SRLG ; 1 k \leq SRL \leq 10 k fraction derived from SRLE

TE ; Tris-HCl EDTA buffer

TLC ; Thin-layer chromatography

TNF- α ; Tumor necrosis factor- α •

TB ; Toluidine blue

TRAP ; Tartrate-resistant acid phosphatase

RT-PCR ; Reverse transcription-polymerase chain reaction

総論の部

総論の部

緒言

関節リウマチ(RA)は全身性で慢性の炎症性疾患である。RA の患者数は約 40 万人いると推定されており、年々増加していることが報告されている [1]。特に 30 代から 50 代が発症のピークであると言われおり、男女比で 1:4 と圧倒的に女性の罹患率が高い。

RA の発症原因は、今なお不明な点が多く、完全に解明されていないが、RA を発症すると、関節滑膜組織において、滑膜の異常増殖が起こるとともに、関節内部に微小血管が新生され、血中から免疫細胞が流入する。免疫細胞は炎症性サイトカインであるインターロイキンやプロスタグランジンをはじめとする炎症性メディエーターを分泌する。一方、関節組織内には好中球が浸潤し、RA 特有の炎症性滑膜組織であるパンプスが形成される。パンプスは炎症性サイトカインや炎症性メディエーターを過剰発現・産生・分泌し、滑膜細胞の異常増殖を促進させる。その結果、異常増殖を起こした滑膜細胞がマトリクスメタロプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素を過剰発現・産生・分泌し、関節軟骨や骨組織を破壊する [2-5]。

RA の治療方法は外科治療と薬物治療に分かれる。外科治療としては、骨切り術や炎症性滑膜組織の除去など関節全体に対する治療が行われており、薬物治療としては抗炎症薬や抗リウマチ薬による投薬治療を行っている [6-13]。しかし、どちらの治療法も対症療法であり、根治治療には至っていない。そのため、多くの患者あるいは医療関係者は RA の病巣部である炎症性滑膜組織に直接作用する薬剤の登場を望んでいる。

RA に関する *in vivo* の研究では、主にコラーゲンによって炎症を惹起させた関節炎がある [14,15]。鶏または牛の II 型コラーゲンをマウスの尾底部に注射することで、マウスの体内では、異なる種の II 型コラーゲンに対し、免疫応答が行われる。免疫応答後、成熟 B 細胞から抗体が産生され、抗原-抗体反応を引き起こす。一方、成熟 B 細胞から自己抗体も産生されるため、自らの体内に存在する II 型コラーゲンが自己抗体により攻撃を受け、関節内部の関節軟骨及び骨組織が破壊される。

Salacia reticulata (SR) はデチンムル科の蔓性多年生木本であり、スリランカ原産植物である [16]。インド・スリランカでは、SR の幹が伝承医学アーユルヴェーダにおいて、RA、淋病、皮膚病、糖尿病に効果があると伝承されている [17]。現在でもスリランカで

は、SR を配合したハーブティーなどが市販されており、臨床現場や民間療法においても利用されている。さらに伝承医学で培われた食経験などから、先進国では健康増進を目的としたサプリメントも普及している。Salacia 属の植物の中で代表的な植物には *Salacia oblonga* (SO) や *Salacia chinensis* (SC) がある。これらの植物の研究では、糖尿病に対する報告が多数を占めている。SR, SO, SC の糖尿病に対する改善効果の理由として、 α -グルコシダーゼ阻害活性が報告されている [18, 19]。そして、その活性成分はチオ糖の一種である Salacinol や kotalanol であると報告されている [20, 21]。一方、SR に含まれるポリフェノール的一种である mangiferin が糖新生を抑制させるという報告もある [22]。

SR の幹や根はスリランカ政府により輸出量が制限されているなど希少資源である [23]。一方、葉は毎年大量に生産・採取が可能であり、輸出制限もないことから、SR の葉 (SRL) の有効利用と機能性食品素材としての可能性に着目した。

本研究では、SRL による RA に対する改善効果について、*in vivo* 及び *in vitro* の両面から検討を行っている。さらに、SRL に含まれる活性成分を明らかにすることにより、RA の新たな治療方法の確立、または予防法として有効な活性本体の探索を行っている。すなわち、伝承医学でのみ伝えられている SRL が RA を改善させることを科学的に証明している。

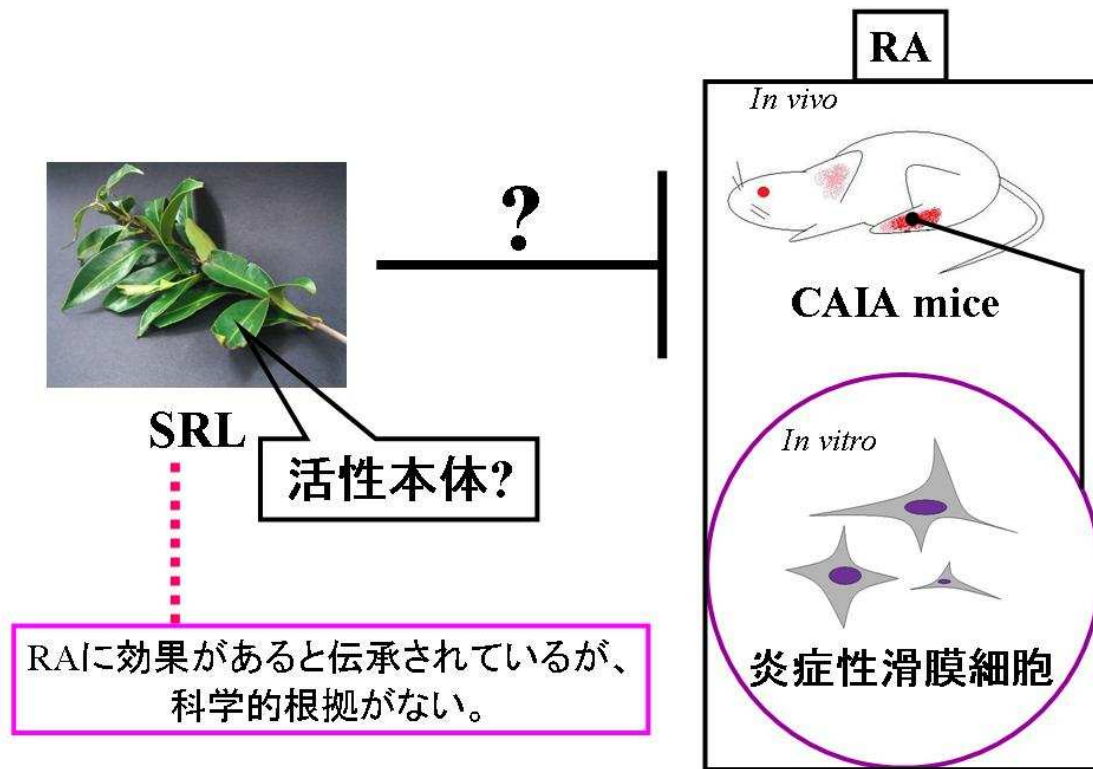


Fig.1 How does SRL improve the mechanism of rheumatoid arthritis?

第1章 *Salacia reticulata* leaf が関節リウマチモデルマウスに与える影響

関節リウマチ（RA）は全身性炎症性の自己免疫疾患である [24]。RA を発症すると、関節、特に指先や膝などに炎症や疼痛を引き起こすことが知られている。RA を発症した関節内部では炎症性滑膜組織において、滑膜細胞の異常増殖が引き起こされ、RA 特有の炎症性滑膜組織であるパンヌスを形成する [24]。一方、血中より関節内部に炎症性細胞が流入し、炎症増悪因子が過剰に産生・分泌され、炎症を増悪させる [25]。また、マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）などのタンパク質分解酵素が過剰に産生・分泌することで、軟骨組織・骨組織の破壊が促進される [26]。

炎症性疾患においては、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの増加が病態を左右することで知られている [27-29]。特に、RA の場合、炎症が起こっている関節部位において、炎症性細胞が増加していることが報告されている [30]。炎症性細胞には白血球由来やリンパ球由来のものがあり、どちらも炎症増悪因子の作用により炎症反応が促進される。炎症増悪因子によって刺激を受けた炎症性細胞が炎症増悪因子を過剰に産生・分泌することで、さらに関節内部において、炎症反応が劇症化するという悪循環が起こることが報告されている [31]。

Salacia reticulata（SR）は、インド・スリランカの伝承医学アーユルヴェーダにおいて、RA に効果があると伝えられている。SR の幹や根はスリランカ政府により輸出量が制限されているため、その代替品として、SR の葉（SRL）に着目している。SRL は毎年大量に生産・採取が可能であり、生物資源としての面から有効利用が期待できる。しかし、RA に対する改善効果が本当にあるのか、あるいは改善効果を示す活性成分は何か、など不明な点が多く、科学的根拠が一切示されていない。

そこで、本章では、RA モデル動物を用いて、SRL による RA の改善効果について検討を行った。

第 1 節 *Salacia reticulata* leaf が炎症反応に及ぼす影響

SRL による RA の関節炎に対する影響を検討した。RA の研究に利用されている RA モデル動物には、アジュバントマウス、抗 II 型コラーゲン誘導関節炎 (CIA) マウス、抗 II 型コラーゲン抗体誘導関節炎 (CAIA) マウスなどが知られている [32-34]。RA モデルマウスを作製するにあたり、免疫賦活や免疫応答の増強を引き起こすため、異なる種の II 型コラーゲンを体内に注射する。これにより、マウス体内で抗原抗体反応が起こり、抗原に対する抗体が大量に産生される。産生された抗体は異なる種の II 型コラーゲンを抗原として認識・排除する。一方、マウス体内の II 型コラーゲンも産生された抗体により、抗原として認識されてしまうため、産生された抗体は自己抗体として働き、II 型コラーゲンを構成成分とする組織、中でも、関節軟骨が攻撃されることが知られている [35]。

RA モデル動物には DBA/1 雄性マウスが広く使用されているため、これを用いた。DBA/1 マウスは CIA マウスの作製が容易であることが広く知られており、RA モデルマウスの作製において、使用頻度とともに実績も豊富である [36]。また、一般的に雌性マウスは女性ホルモンの作用により、骨代謝に関連する研究や関節部の炎症及び骨組織の破壊に対する検討を行う上で、正確な研究が行えない可能性がある。そのため、本実験では雄性マウスを用いた [37]。

本実験では、6 週齢の DBA/1 雄性マウスを用いた。CAIA マウスの作製方法は、抗 II 型コラーゲン抗体を 2 回、LPS を 1 回、それぞれ連日腹腔内注射し、関節炎を惹起させた。LPS 注射日を関節炎発症日とした。実験動物に与える基本飼料は AIN-93G に準じて作製した。AIN-93G に使用する大豆油に含まれる不飽和脂肪酸は抗炎症作用を持つことが報告されている [38, 39]。先行実験においても、CAIA マウスに対し、通常の AIN-93G 飼料を与えた結果、関節炎が重症化しないことを明らかにした (data not shown)。このことから、本実験で使用した基本飼料である AIN-93G の脂質供給源は、大豆油からコーン油及びラードに置換することとした。CAIA 処理を行わず、基本飼料を与える Normal 群、CAIA 処理を行い、基本飼料を与えた CAIA 群、CAIA 処理を行い、基本飼料に 1% SRL 粉末を添加した飼料を与えた CAIA+SRL 群の 3 群 (n = 6) に分け、関節炎発症日より、8 日前より飼育を開始した (Table 1)。飼育後、関節炎を発症させた後、関節炎発症日より 2 週間飼育した。関節炎発症日から 2 週間後まで体重を測定した結果、各群間に有意な差は認められ

なかった (Table 2)。

各群すべてのマウスの関節炎の重症度を測定するために、足の腫脹や発赤などの炎症症状から得る視覚的な情報をスコア化する arthritis score を経時的に測定した。飼育期間中の arthritis score については Fig. 2 に示した。飼育終了後、各群の arthritis score を比較した結果、Normal 群と比較して、CAIA 群では arthritis score が有意に上昇していた。特に、関節炎発症日である 0 日目から 7 日目にかけて、急激に arthritis score の上昇が確認された。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では関節炎発症日より 3 日目から 6 日目にかけて、arthritis score の急激な上昇が有意に抑制された (Fig. 2)。しかし、7 日目以降は有意な差が認められず、14 日目までほぼ同等の値となった。このことから、SRL による CAIA マウスの arthritis score 上昇抑制効果は関節炎発症日より 3 日目から 6 日目までの初期の関節炎症状に対して、改善効果があることが考えられた。すなわち、

次に、arthritis score において、CAIA+SRL 群は関節炎による足の腫脹を抑制させたことから、SRL には抗炎症効果があることが考えられた。そこで、関節炎に対する SRL の抗炎症効果を検討するため、各群より血液を採取した後、血清を調整した。ELISA 法を用いて、SRL による炎症増悪因子の血中濃度への影響を検討した。RA 患者では、様々な炎症増悪因子の血中濃度が上昇していることが知られている [27-29]。RA モデルマウスにおいても、同様の傾向を示すことが報告されている [38-40]。RA の研究では、炎症増悪因子として、TNF- α を用いる検討がある。しかし、RA モデルマウスを用いた検討では、TNF- α の血中濃度は飼育期間が長期化するにつれて、減少していくことが報告されている [41]。これでは、飼育期間によって、TNF- α の血中濃度にバラツキがあり、飼育期間が長期化した場合、炎症増悪因子の指標としては適当ではない。TNF- α と同様に炎症増悪因子ある IL-1 β は、比較的長期間血中濃度の高値を示すことが報告されている [42]。そこで、炎症増悪因子として、IL-1 β の血中濃度を測定した。また、炎症反応において、アラキドン酸カスケードより合成されるプロスタグランジン (PG) やロイコトリエンなどのエイコサノイドとの関連が指摘されている [43]。また、アラキドン酸カスケードにおいて、合成された PGE₂ は炎症増悪因子として知られている。そこで、IL-1 β と同様に PGE₂ の血中濃度を測定した。

その結果、Normal 群と比較して、CAIA 群では関節炎発症日より 7 日目と 14 日目において、血中 PGE₂ 濃度及び 7 日目の血中 IL-1 β 濃度では、有意な上昇が認められた。一方、Normal 群と比較して、CAIA+SRL 群では CAIA 群と同様に有意な上昇が見られた。さらに、

CAIA 群と CAIA+SRL 群を比較した結果、両群間に有意な差が認められなかった。これらの結果から、CAIA マウスでは、関節炎発症日より 7 日目及び 14 日目において、炎症が活発であることが明らかとなった。しかし、CAIA 群と CAIA+SRL 群間では、差が認められなかった。このことから、SRL は CAIA マウスの炎症増悪因子を減少させないことが考えられた。すなわち、SRL による抗炎症効果は弱いことが考えられた (Fig. 3)。

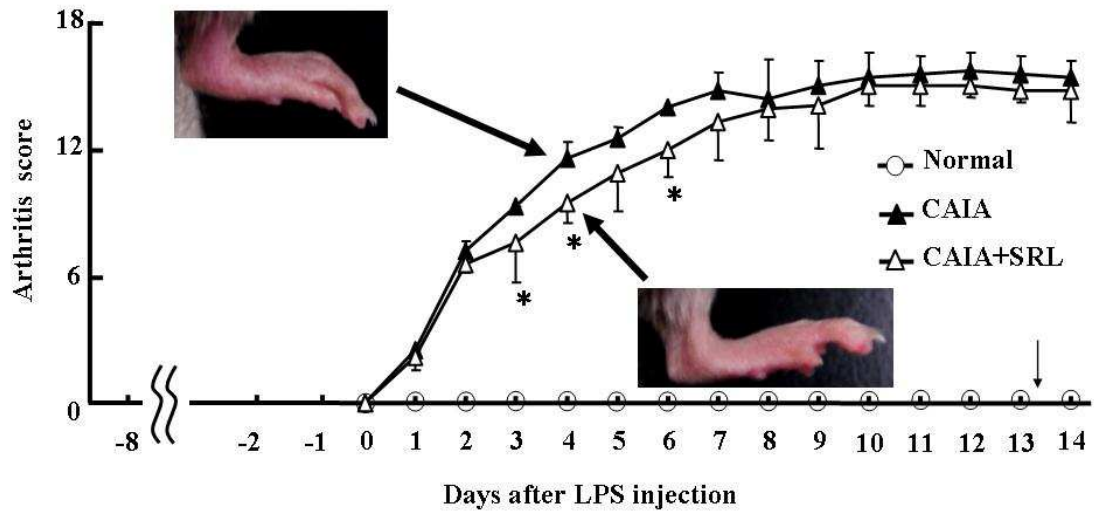


Fig.2 Arthritis score in CAIA and CAIA + SRL mice. Arthritis was induced in mice by ip injection of anti-type II collagen monoclonal antibody (mAb) and lipopolysaccharide (LPS). The day of LPS injection was defined as day 0 of arthritis. Each group of mice was started on its specified diet 8 days prior to LPS injection. Paw swelling was measured from day 0 to day 14. Arthritis score was calculated by micro caliper and visual analog scale. Values are the means \pm SD (n = 6). *, P < 0.05 versus CAIA

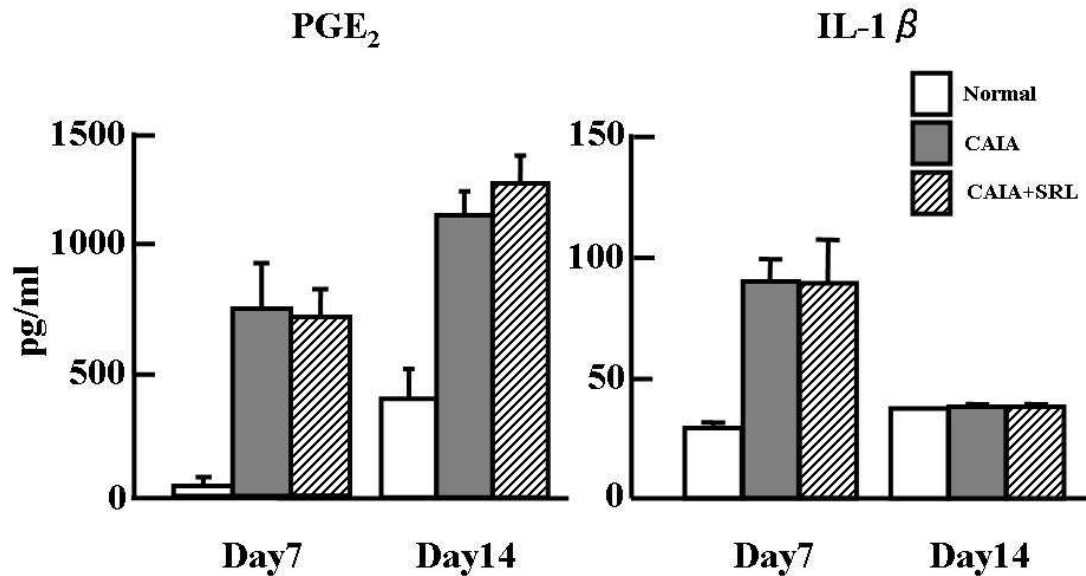


Fig.3 Levels of inflammatory mediators in the serum of normal control, CAIA and CAIA + SRL mice. Serum was obtained from mice on days 7 and 14 after LPS injection. Serum prostaglandin E₂ (PGE₂) and interleukin 1-beta (IL-1b) were measured by enzyme immunosorbent assay (ELISA). Values are the means \pm SD (n = 6)

第2節 *Salacia reticulata* が関節炎に対し、組織学的に及ぼす影響

RAの研究では、関節内部の病変が主な研究対象として挙げられる。中でも、RAの関節腔に存在する炎症性細胞に対する検討は多数報告されており、炎症性細胞を減少させることを目的とした研究報告も多い [44, 45]。しかし、大部分の研究では、炎症性細胞が過剰に産生する炎症増悪因子を抑制し、炎症性細胞の増殖及び活性化を抑制させるという報告が多い [46, 47]。そのため、炎症性細胞に直接作用し、細胞増殖及び活性化を抑制する薬剤や機能性食品素材の探索が続けられている。

第1節において、SRLはarthritis scoreの上昇を抑制させたが、炎症増悪因子の血中濃度を減少させなかった。このことから、SRLは直接組織に作用している可能性が考えられた。そこで、RAの関節組織障害に対する検討を行うため、まず、単純X線撮影法を用いて、SRLによるマウス後肢骨組織の損傷への影響について検討した。

臨床現場では、RA患者の関節組織破壊に対する治療効果を確認するため、X線撮影法による検討が行われている。本研究において、マウス後肢をX線撮影することで、SRLによるCAIAマウスの関節組織破壊への影響を検討した。その結果、Normal群と比較して、CAIA群では、マウス後肢の指の中足骨及び膝関節において、写真像が不明瞭であることが認められた。一方、CAIA群と比較して、CAIA+SRL群では、指の中足骨及び膝関節において、写真像が明瞭であることが認められた (Fig. 4)。このことから、SRLは骨組織の損傷、特に、指の中足骨や膝関節を軽減させる可能性があることが考えられた。

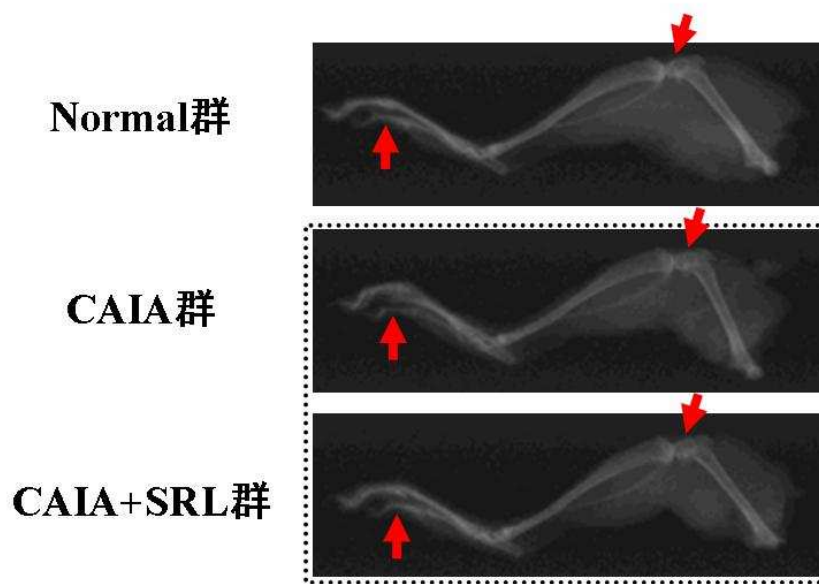


Fig. 4 Radiograph in CAIA and CAIA + SRL mice. The hind leg of mice with arthritis. CAIA +SRL mice compared with CAIA mice, the bone destruction of the joint is suppressed. In particular, the metatarsal bone of foot and the knee joint was suppressed the bone tissue destruction. Arrowheads; metatarsal bone and knee joint.

次に、マウスの後肢指関節を採取し、組織切片を作製後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、トルイジンブルー (TB) 染色及び酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を用いて、SRL による関節炎の関節組織破壊に対する影響について検討した。RA の関節腔では、炎症性細胞が増加していることが指摘されており、炎症増悪因子及び組織障害因子が過剰に産生・分泌されている。さらに、これらの因子の作用により、関節軟骨及び骨組織の破壊が進行することが知られている。

まず、SRL による関節腔における炎症性細胞の増加への影響について HE 染色を用いて検討した。その結果、Normal 群と比較して、7 日目において、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では関節腔に炎症性細胞の増加が認められた。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では関節腔に存在する炎症性細胞は減少していなかった。14 日目において、Normal 群と比較して、CAIA 群及び CAIA+SRL 群ともに関節腔に炎症性細胞が認められた。しかし、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では、関節腔の炎症性細胞が減少していた。組織切片の染色図を用いて、関節腔の炎症性細胞の増加への影響をスコア化した結果、14 日目において、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群ではバラツキが多いものの、スコアの平均値では炎症性細胞が減少していることが明らかとなった (Fig. 5)。

次に、SRL による関節の軟骨・骨組織破壊への影響について TB 染色を用いて検討した。その結果、Normal 群と比較して、7 日目において、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では軟骨・骨組織の破壊が認められた。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では軟骨・骨組織破壊の減少は認められなかった。14 日目において、Normal 群と比較して、CAIA 群及び CAIA+SRL 群には軟骨・骨組織の破壊が認められた。しかし、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では軟骨・骨組織の破壊が明らかに減少していることが認められた。組織切片の染色図を用いて、関節内部の軟骨・骨組織破壊への影響をスコア化した結果、14 日目において、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では軟骨・骨組織の破壊が有意に抑制することが明らかとなった (Fig. 6)。RA の骨組織破壊は破骨細胞の活性化に影響されることが知られている。そこで、SRL による関節組織の破骨細胞への影響について TRAP 染色を用いて検討した。その結果、Normal 群と比較して、14 日目において、CAIA 群では、関節組織における破骨細胞の数が有意に増加していた。さらに、骨組織の破壊も見られたことから、破骨細胞が活性化していることも認められた。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では、関節組織における破骨細胞の数が有意に減少していることが明らかとなった。ま

た、骨組織の破壊も少ないことから、破骨細胞の活性化を抑制していることも明らかとなった。(Fig. 7)。このことから、SRLは関節腔の炎症性細胞の増加を抑制し、軟骨・骨組織の破壊及び破骨細胞数の増加と活性化を抑制することが明らかとなった。すなわち、SRLは直接関節組織に作用することで、関節炎を改善することが示唆された。

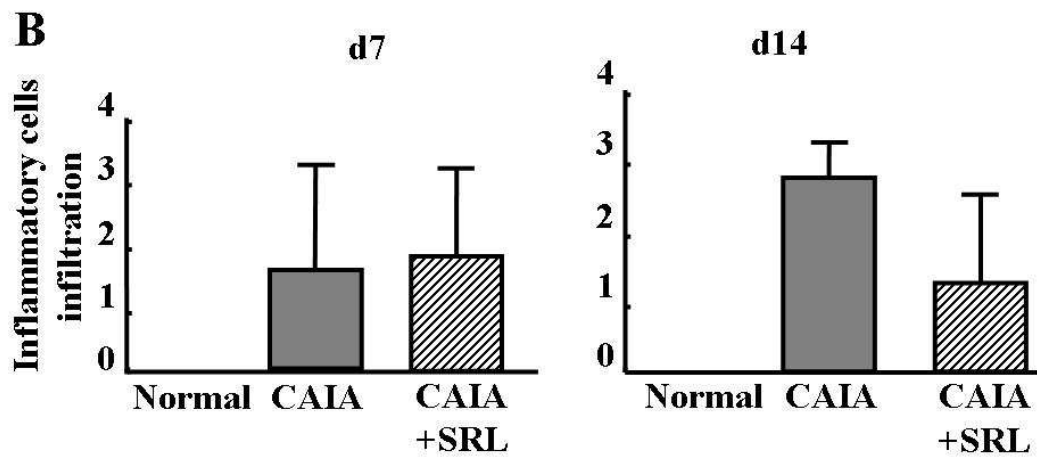
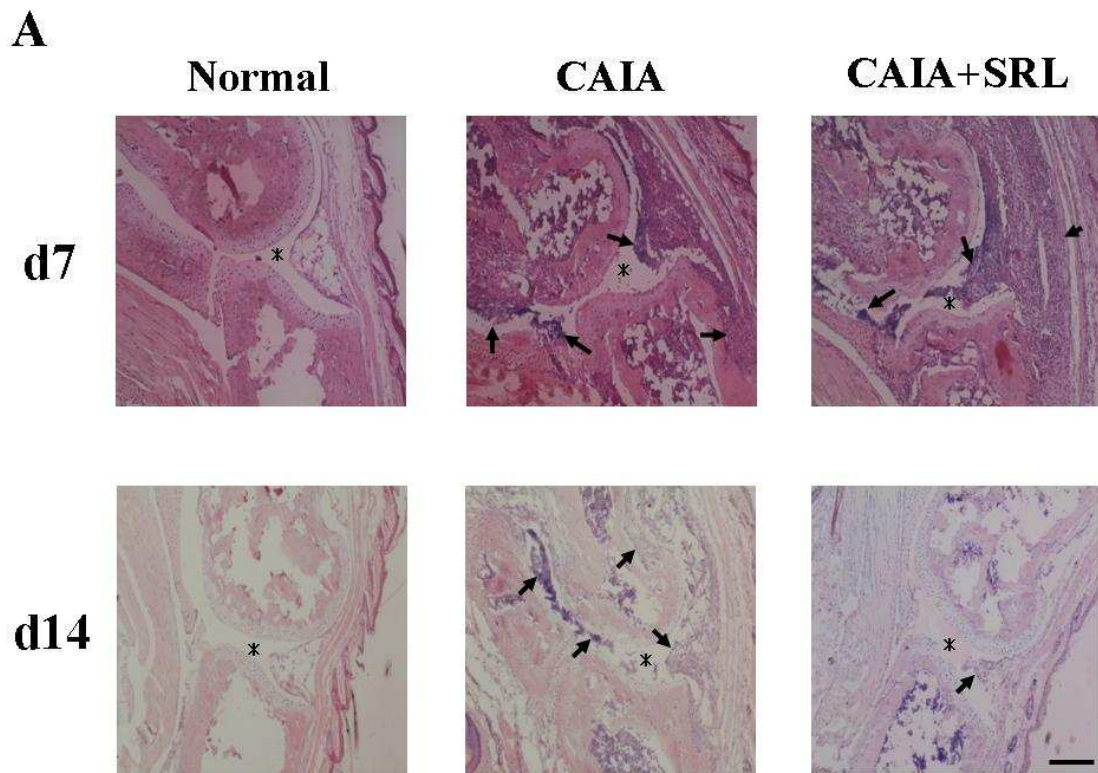


Fig. 5 Toe joints inflammatory cells in CAIA and CAIA + SRL mice. Sections were prepared from toe joints of mice on days 7 and 14 after LPS injection. The sections were stained with Mayer's hematoxylin and eosin (HE) (a). Histological scores for inflammatory cell infiltration were graded as follows: 0 = within normal limits; 1 = slight infiltration; 2 = mild infiltration; 3 = severe infiltration (b). Values are the means \pm SD (n = 6). Arrows inflammatory cell; asterisks joint space; bar 100 μ m

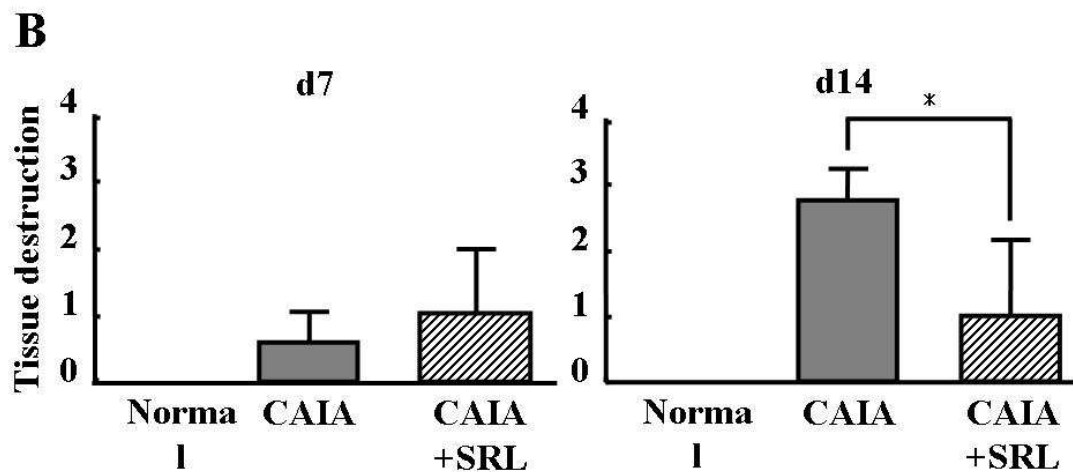
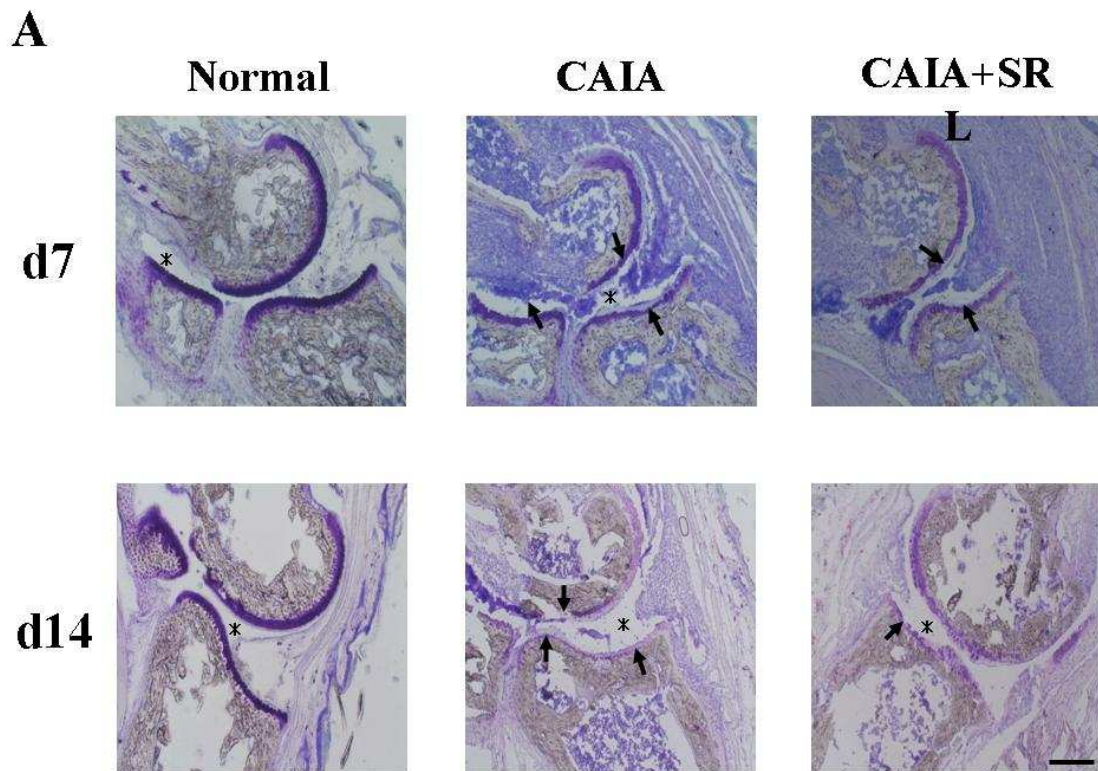
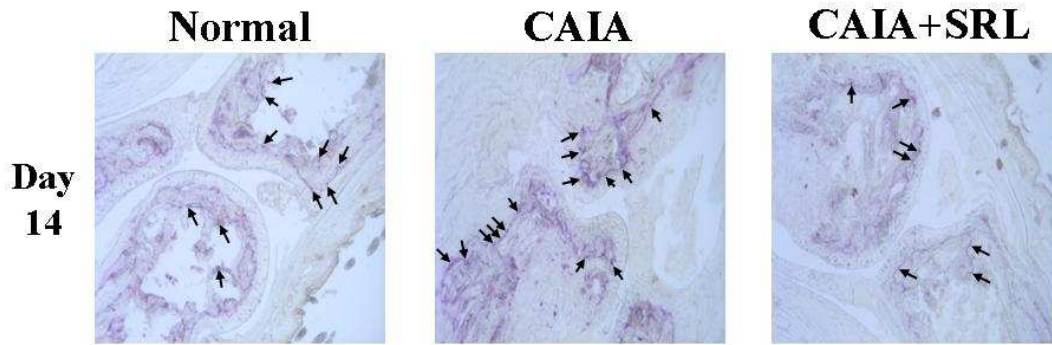


Fig. 6 Toe joints skeletal tissue in CAIA and CAIA + SRL mice. Sections were prepared from toe joints of mice on days 7 and 14 after LPS injection. The sections were stained with toluidine blue (TB) pH 7.0 (a). Histological scores for skeletal tissue damage was graded as described for Fig. 2b. Values are the means \pm SD (n = 6). *, P < 0.05 versus CAIA. Arrows tissue damage; asterisks joint space; bar 200 μ m

A



B

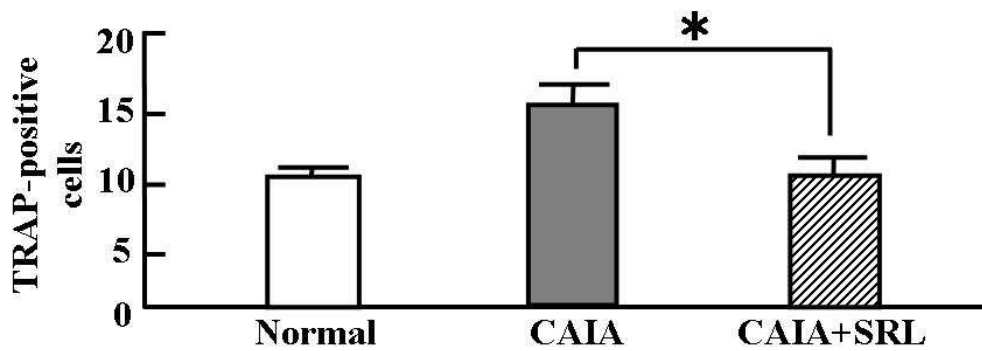


Fig.7 Number of toe joints TRAP-positive cells in normal control, CAIA and CAIA ? SRL mice. Sections were made from the toe joints of mice (n = 6/group) on day 14 after LPS injection. The sections were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (a). Number of osteoclast at bone surface in each slide (number/slide) (b). Value are the means \pm SD (n = 6). *,P < 0.05 versus CAIA. Arrows;TRAP-positive cells

第3節 *Salacia reticulata* が関節の炎症・破壊部位の遺伝子発現に及ぼす影響

第2節では、SRLが関節炎及び組織破壊を改善させることがわかった。しかし、炎症増悪因子である PGE₂ や IL-1 β の血中濃度において、有意な差が認められなかったことから、抗炎症作用は弱い可能性が考えられた。関節炎を起こした関節内部では、炎症増悪因子である TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などが過剰に発現していることが報告されている [48-50]。また、MMP などの組織障害因子の mRNA 発現量が過剰であることも報告されている [51, 52]。そこで、関節内部より炎症性滑膜組織を採取し、total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、SRL による炎症増悪因子及び組織障害因子の遺伝子発現への影響について検討した。使用したプライマーは Table 3 に示した。

まず、炎症性滑膜組織で産生される炎症増悪因子の遺伝子発現への影響について検討した。関節炎を惹起してから 14 日目に後肢指関節を採取し、total RNA を抽出後、RT-PCR 法を用いて、遺伝子発現解析を行った。その結果、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 では Normal 群と比較し、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では遺伝子発現量の増加が認められた。また、抗炎症性サイトカインや免疫修飾因子である IL-10、IFN- γ では遺伝子発現の増加が認められなかった。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では TNF- α 、IL-1 β の遺伝子発現量は若干減少させるものの有意な差は認められなかった。また、IL-6、IL-10、IFN- γ においては、遺伝子発現量に差が認められなかった。このことから、SRL による炎症性サイトカインの遺伝子発現に対する影響は弱い可能性が考えられた (Fig. 8)。

次に、炎症性滑膜組織で産生される MMP や骨破壊に関与する破骨細胞に関連する遺伝子などの組織障害因子の遺伝子発現への影響について検討した。その結果、RANKL、MMP-2、MMP-3、MMP-9、cathepsin K、c-fos において、Normal 群と比較し、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では有意に遺伝子発現量の増加が認められた。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では RANKL、MMP-2、MMP-3、cathepsin K、c-fos の遺伝子発現量が減少していた。特に、RANKL、MMP-3、cathepsin K、c-fos では遺伝子発現量が有意に減少していた。このことから、SRL は炎症滑膜組織部に作用し、組織障害因子の遺伝子発現を抑制し、破骨細胞の分化及び活性関連因子の遺伝子発現を抑制させることで、関節炎による軟骨・骨組織破壊を改善させることが示唆された (Fig. 9)。

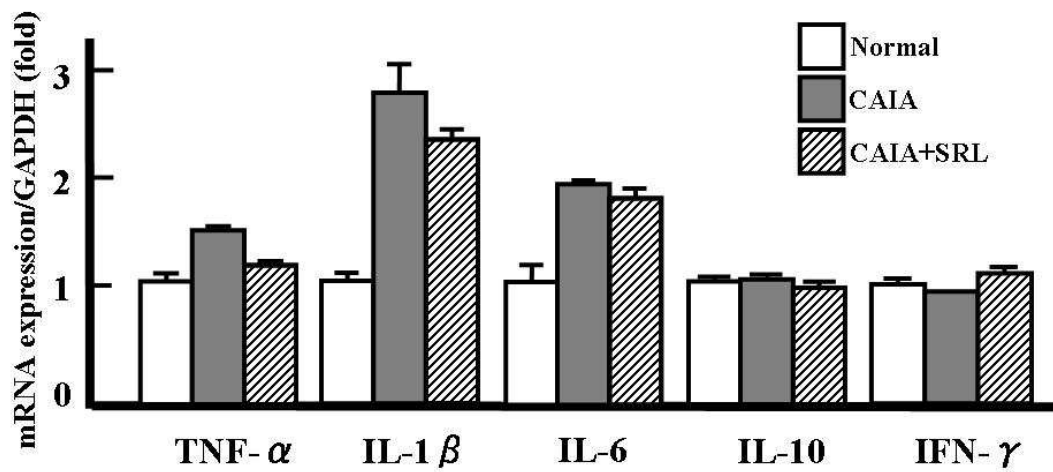


Fig. 8 mRNA levels for inflammatory mediator genes in the knee joint tissue from normal control, CAIA and CAIA ? SRL mice. Knee joints were harvested on day 7 after LPS injection. Soft tissues such as skin and muscle were removed from around each joint, and the total RNA was extracted. The mRNA levels for tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1-beta (IL-1 β), IL-6, IL-10 and interferon gamma (IFN- γ) were measured by reverse transcription (RT)-PCR. The values shown were normalized with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcript (GAPDH). Values are the means \pm SD (n = 6)

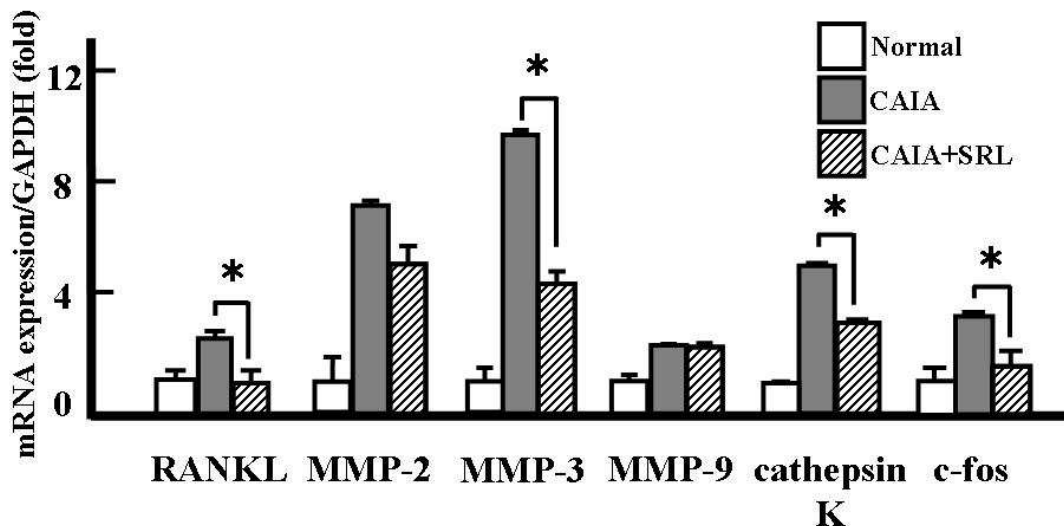


Fig. 9 mRNA levels for matrix metalloproteinase (MMP) and osteoclast-related genes in the toe joint tissue from normal control, CAIA and CAIA ? SRL mice. Toe joints were harvested on day 7 after LPS injection. Soft tissues such as skin and muscle were removed from around each joint and the total RNA was extracted. The mRNA levels for receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), MMP-2, MMP-3, MMP-9, cathepsin K and c-fos were measured by RT-PCR. The values shown were normalized with GAPDH. Value are the means \pm SD (n = 6). *, P < 0.05 versus CAIA

第4節 本章の小括および考察

RA においては、長年、炎症性滑膜組織パンプスの増殖を抑えることが第一目標として挙げられていた。そのためには、パンプスより分泌される炎症性サイトカインや MMP をいかにして、食い止めるかが大きな焦点となっている。近年、注目を浴びる生物学的製剤は、炎症性サイトカインに対する治療方法として画期的かつ有効的である [53-55]。しかし、経済的あるいは薬理的な問題点も浮き彫りになっている [56]。現在では伝承医学など古くから行われている民間療法を代替医療として利用しようという動きに大きな注目が集まっている [57-59]。本研究においては、伝承医学で用いられている植物体について、科学的に検証を行い、新しい治療法の確立に寄与することを目標としている。

本実験の結果、SRL は関節炎症状を軽減させることが明らかとなった。SRL による CAIA マウスの関節炎への影響を検討した。その結果、CAIA 群では関節炎重症度の指標である arthritis score が関節炎発症日から急激に上昇し、10 日目以降同じスコアとなった。CAIA+SRL 群では1日目から2日目にかけて、CAIA 群と比較して、差が認められなかったが、3日目から6日目にかけて、arthritis score の急激な上昇を有意に抑制させた。8日目以降 CAIA 群との差が認められなかったことから、SRL には関節炎の初期の重症化を抑制させることが明らかとなった。

SRL が炎症を抑制させる可能性を考えられたため、SRL による炎症増悪因子の血中濃度への影響を検討した。その結果、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では PGE₂ 及び IL-1 β の血中濃度は増加していた。しかし、CAIA 群と CAIA+SRL 群の間に差が見られなかったことから、SRL は PGE₂ 及び IL-1 β の血中濃度に影響を与えないことが考えられた。

さらに、SRL による炎症性滑膜組織に対する影響を組織学的に検討した。その結果、CAIA 群及び CAIA+SRL 群では関節腔において、炎症性細胞が増加し、軟骨・骨組織の破壊が認められた。一方、CAIA 群と比較して、CAIA+SRL 群では関節腔の炎症性細胞が減少し、軟骨・骨組織の破壊が有意に抑制された。さらに、破骨細胞数の増加及び活性化の抑制が認められた。従って、SRL は CAIA マウスの炎症性細胞の増加、軟骨・骨組織の破壊、破骨細胞数の増加及び活性化を抑制することを明らかにした。

SRL による CAIA マウスの炎症増悪因子及び組織障害因子の遺伝子発現に対する影響を検討した。その結果、CAIA 群では炎症増悪因子や組織障害因子の遺伝子発現量が増加し

ていた。一方、CAIA+SRL 群では炎症増悪因子の遺伝子発現量を減少させなかったが、組織障害因子の遺伝子発現量を減少させた。さらに、破骨細胞関連因子の遺伝子発現量も減少させた結果は、組織学的解析と同様な結果であることを示す。従って、SRL は組織障害因子の遺伝子発現を抑制することで、軟骨・骨組織の破壊を抑制していることが考えられた。すなわち、SRL には炎症増悪因子への影響は微弱であるが、組織障害因子への影響は強力であることが明らかとなった。

第2章 *Salacia reticulata* 熱水抽出画分の有効性の検討

RA に対する治療方法には外科的方法と内科的方法に分かれる。外科的方法としては、骨の損傷部位を切除し、骨組織を調節する骨きり術や炎症によって異常な細胞増殖を起こした滑膜細胞を含む炎症性滑膜組織の除去などがある [60]。一方、内科的方法としては、抗炎症薬であるステロイドや NSAIDs、抗リウマチ薬としては、免疫調整薬、免疫抑制剤、生物学的製剤がある [11-13]。特に、免疫抑制剤であるメトトレキサート (MTX) は RA の投薬治療において、第一選択薬として使用されている。しかし、MTX の場合、間質性肺炎などの重篤な副作用の問題が多く報告されており、他の薬剤においても、同様な問題があり、年配者や体の弱い人に使用する場合は注意深く経過観察しなければならない [61-63]。

近年、生物学的製剤の発展が目覚ましい。生物学的製剤は RA 患者体内で増加した炎症増悪因子に対する中和抗体を注射することで、炎症増悪因子を減少させている。代表的な薬剤として、インフリキシマブやエタネルセプトなどの抗 TNF- α 抗体や抗 IL-6 抗体であるトシリズマブなどがある。しかし、生物学的製剤はまだ新しく、薬価も高いため、患者の経済的な負担は大きい。さらに、最近の研究では、体内において、生物学的製剤に対する抗体が産生されることがわかり、作用の減弱が認められている。また、現在の RA 治療薬は対症療法として使用されているため、根本的に RA を治療しているわけではない。このような背景から、現在も RA の根治的治療薬の登場が期待されている。

RA 患者は主訴である関節部の腫脹や発熱、発赤などに対し、症状の緩和を目的として、いわゆる健康食品を使用する人は少なくない。そのほとんどが抗炎症作用を示すものであり、代表的なものとして、キャットクローなどのハーブ類、ハトムギ (ヨクイニン) や雷公藤などの漢方・生薬が多く報告されている [57-59]。しかし、このような漢方・生薬においても、副作用の問題が報告されている [64,65]。また、低下した関節機能を補うため、関節軟骨の構成成分であるヒアルロン酸やコラーゲンを摂取することで機能を回復させようという試みも報告されている [66,67]。しかし、低下した関節機能を回復させる根本的な方法がないのが現状である。

我々は第1章において、SRL が RA モデルマウスの関節炎に対する改善効果を明らかにした [68]。本章では SRL に含まれる活性成分による関節リウマチへの影響について検討した。

第1節 炎症性滑膜由来細胞株の樹立

関節リウマチの研究はヒトを対象として検討されている場合が多い。特に、患者から摘出した炎症組織及びその組織から培養した細胞を用いて、検討が行われている [69, 70]。人から採取した組織中には滑膜細胞の他、軟骨細胞や免疫細胞なども含まれている。しかし、人やマウスにおいて、滑膜細胞の培養細胞は未だ、樹立されていない。

RA モデルマウスとしては、RA と同様の関節炎症状を示す CIA マウスが一般的に用いられている。本研究において、使用した CAIA マウスは CIA マウスと同様の作用機序で関節炎を発症することがすでに知られている [71]。そこで、CAIA マウスを用いて、炎症性滑膜組織を採取し、滑膜細胞の樹立を試みた。

CAIA マウスを作製後、後肢膝関節を採取し、関節から炎症性滑膜組織を摘出後、IV 型コラゲナーゼによって消化し、細胞分散液を調製した。細胞分散液は限界希釈法を用いて、96 穴プレートに播種し、培養を行った。培養した細胞のうち、増殖した細胞のみを 35 mm ディッシュ、60 mm ディッシュ、100 mm ディッシュの順に継代を重ね、播種・培養を繰り返した。このとき、増殖した複数の細胞は、RT-PCR 法を用いて、遺伝子発現解析を行い、文献で報告されている遺伝子を元に、発現する遺伝子の調査を行った [72-77] (Table 3 & 4) 本実験でそれぞれ、基質関連、サイトカイン関連、タンパク質分解酵素関連、転写関連、滑膜関連、計 5 つのグループに分類し、発現解析を行った (Fig. 10)。滑膜関連遺伝子である Synoviolin は炎症性滑膜組織において、過剰発現していることがすでに報告されている [78, 79]。そこで、Synoviolin を高発現している細胞を探索した結果、今回、MTS-C H7 として樹立することができた。

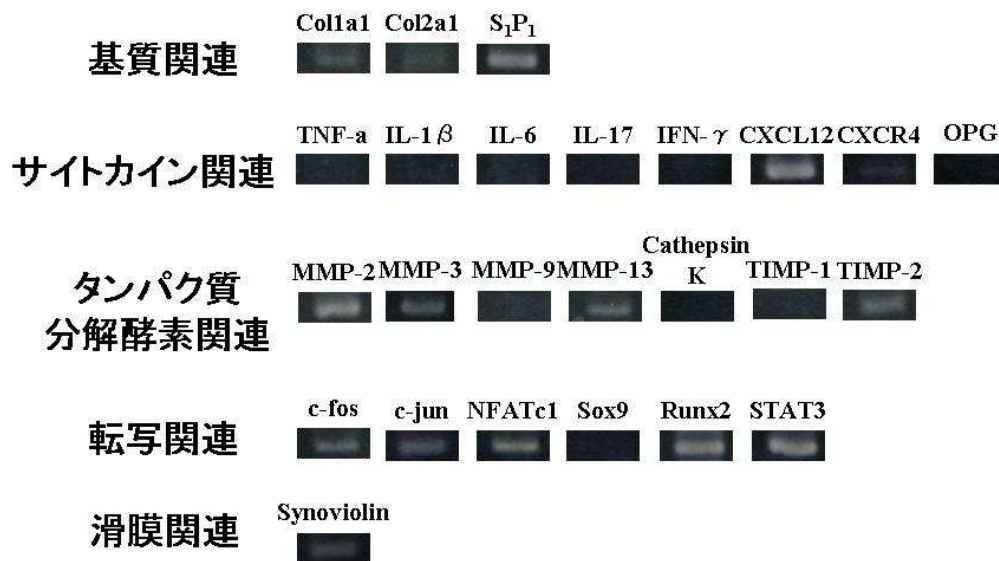


Fig.10 Genes expression pattern in MTS-C H7 cells. In inflammatory synovium of the rheumatoid arthritis, we analyzed the genes which had been already reported by RT-PCR .

第2節 *Salacia reticulata* leaf 熱水抽出物を用い、炎症性サイトカインによる細胞増殖への影響

今回樹立した滑膜細胞 MTS-C H7 は炎症性滑膜組織由来細胞である。RA において、関節内部ではパンヌスと呼ばれるリウマチ特有の肉芽組織が形成される。パンヌスの核となる組織が炎症性滑膜組織であり、炎症によって滑膜細胞が異常増殖を起こすためと考えられている [80]。そこで、*in vivo* の結果を元に、MTS-C H7 を用いて、SRL 中に含まれている成分による滑膜細胞の細胞毒性への影響について検討した。

In vitro の検討を行うため、SRL から SRL 熱水抽出物 (SRLE) の作製を行った。MTS-C H7 を 96 穴プレートに播種し、3 時間接着させた後、SRLE を 25-2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加後、24 時間培養し、WST-1 を用いて、検討を行った。その結果、50 % 阻害濃度は約 850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることがわかった (Fig. 11)。

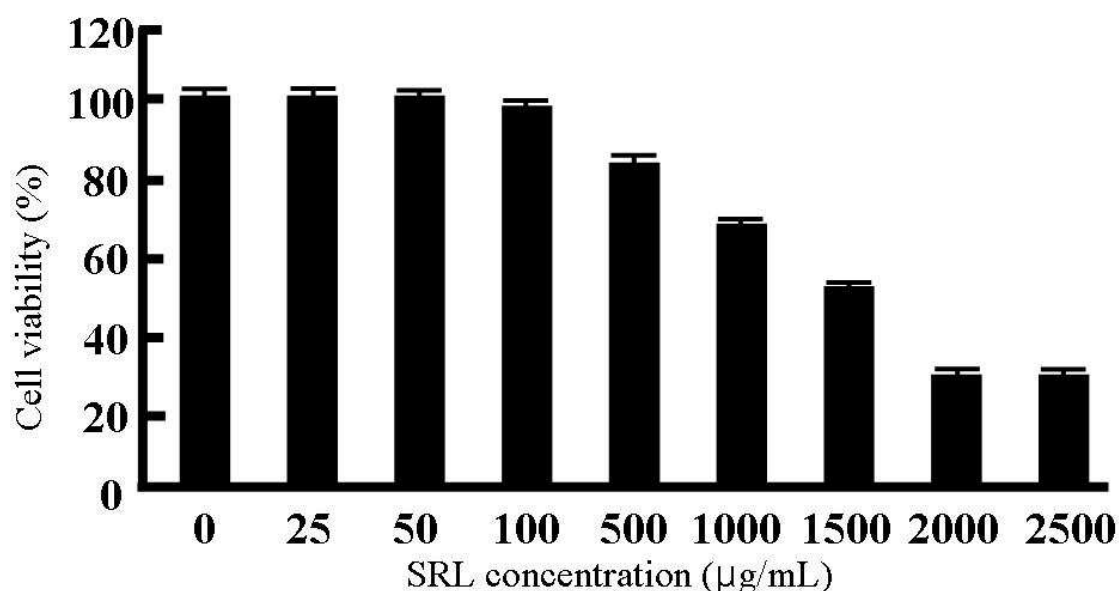


Fig.11 Cytotoxic activity of the SRL hot-water extract against MTS-C H7 cells. MTS-C H7 cells were treated with the SRL hot-water extract at concentrations of 25, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, and 25,00 μg dry matter/ mL for 24 h. The results are expressed as mean (SD), $n = 3$.

次に、SRLEがMTS-C H7のIL-1 β による異常な細胞増殖に対する影響を検討した。MTS-C H7を96穴プレートに播種し、3時間接着させた後、炎症性サイトカンであるIL-1 β 単独添加群及びIL-1 β とSRLE同時添加群に分け、24時間培養後、WST-1を用いて、細胞増殖への影響を検討した。その結果、SRLE 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から抑制効果が見られた。さらに50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上において、濃度依存的に細胞増殖を有意に減少した。このことから、SRLEはIL-1 β による異常な細胞増殖を抑制することが明らかとなった。また、この結果より細胞増殖を有意に抑制する濃度の中で一番低濃度である50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて、以降の検討を行った (Fig. 12)。

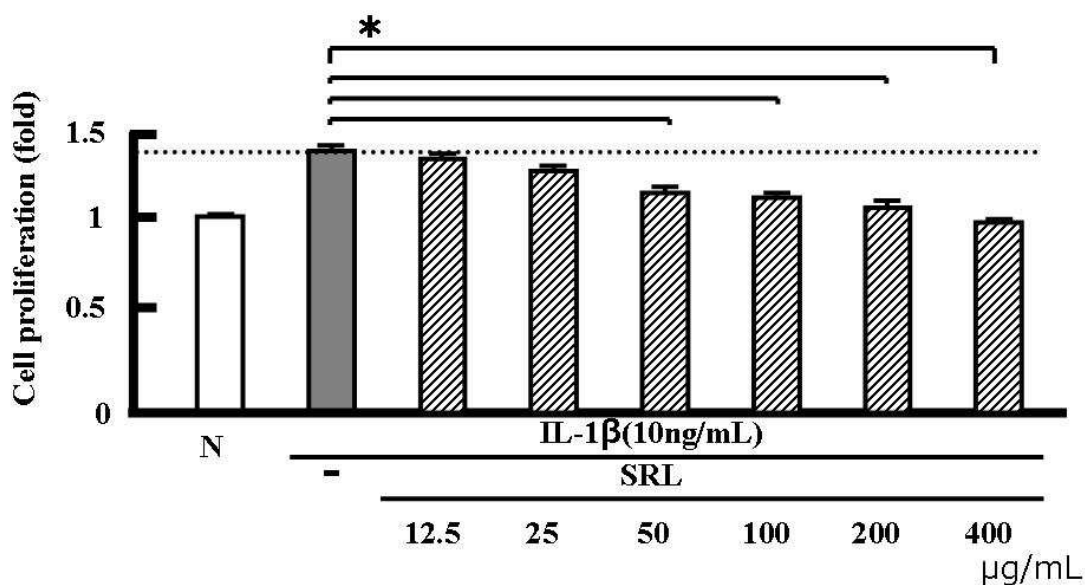


Fig.12 Anti-proliferative activity of the SRL hot-water extract against MTS-C H7 cells. MTS-C H7 cells were treated with the mouse IL-1 β (10 ng/mL) and SRL hot-water extract at concentrations of 12.5, 25, 50, 100, 200, and 400 μg dry matter/mL for 24 h. The results are expressed as mean (SD), n = 3.

次に、ウサギの滑膜細胞 HIG-82 を用いて、IL-1 β による異常な細胞増殖に対する影響を検討した。現在、ヒトやマウスにおいて、滑膜細胞は株化されていない。しかし、ウサギでは、滑膜細胞株が存在する。特に HIG-82 は炎症や植物成分の研究に用いられていることが報告されている [81-83]。そこで、MTS-C H7 と同様に IL-1 β による異常な細胞増殖に対する影響を検討した。

その結果、MTS-C H7 では、SRLE 50 μ g/mL 添加により、IL-1 β による異常な細胞増殖を減少させた。一方、HIG-82 では、IL-1 β による異常な細胞増殖が起こらなかった。また、SRLE 50 μ g/mL 添加でも、IL-1 β による異常な細胞増殖を減少させなかったことから、HIG-82 には IL-1 β 及び SRLE は影響を与えないことが考えられた。そこで、本研究において、今回樹立した炎症性滑膜細胞株 MTS-C H7 を使用し、検討を続けることとした (Fig. 13)。

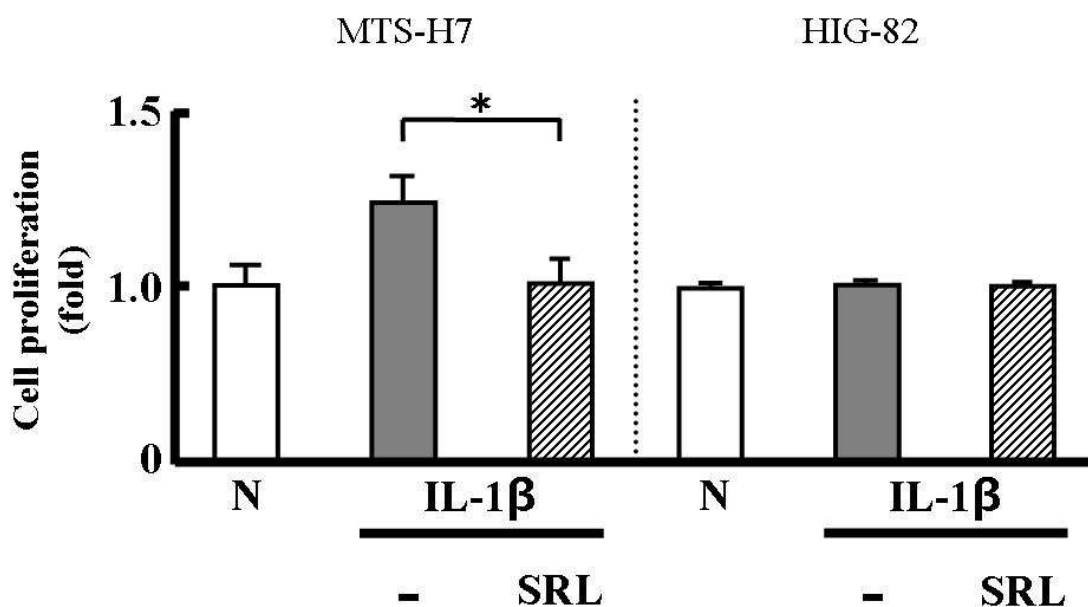


Fig. 13 Anti-proliferative effects of the SRL hot-water extract on MTS-C H7 and HIG-82. MTS-C H7 and HIG-82 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL) and SRL extract (50 μ g dry matter/mL) for 24 h. The results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : *, p < 0.05.

第3節 *Salacia reticulata* 熱水抽出物由来残渣水溶性画分による MTS-C H7 に及ぼす影響

第2節において、樹立した炎症性滑膜細胞株 MTS-C H7 に対し、SRL は IL-1 β による異常な細胞増殖を抑制させることを明らかにした。しかし、細胞増殖を抑制した SRLE に含まれている活性成分は明らかでない。そこで、SRLE を用いて、液液抽出を行い、抽出した画分サンプルを用いて、細胞増殖及び遺伝子発現に対する影響を検討した。

SRLE に含まれる細胞増殖抑制効果を示す活性成分の抽出を行った。SRLE に含まれている活性成分を単離するため、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ブタノールを用いて、極性の低いものから高いものへ順番に液液抽出を行った。液液抽出によって得られた上清画分をそれぞれ、ヘキサン抽出画分、ジエチルエーテル抽出画分、酢酸エチル抽出画分、ブタノール抽出画分とした。また、すべての液液分配を終えた後、最も下層に残った画分を残渣水溶性画分 (RW) とした。これら5種類の抽出画分を用いて、IL-1 β による異常な細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、ヘキサン抽出画分、ジエチルエーテル抽出画分、酢酸エチル抽出画分、ブタノール抽出画分において、IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖を減少させなかった。しかし、RW では IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖が有意に減少していた。このことから、液液抽出によって抽出された画分のうち、RW が細胞増殖抑制効果を示すことが考えられた。また、RW は SRLE を原料として抽出している点やもっとも水溶性の高い画分である点、さらに SRLE と同様な効果が認められた点などから細胞増殖抑制効果を示す物質は水溶性物質である可能性が考えられた (Fig. 14)。

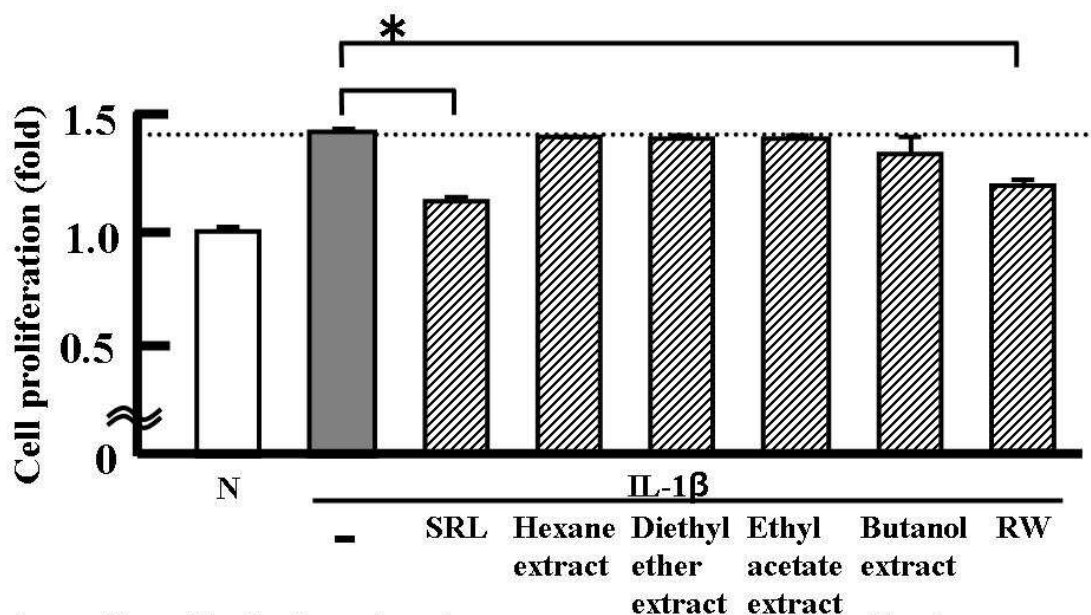


Fig.14 Effects of the fractionated SRL hot-water extract samples on cell proliferation. Anti-proliferative effects of SRL extract samples fractionated according to the polarity of constituents on the growth of MTS-C H7 cells after 24-h treatment. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL); SRL (50 μ g dry matter/mL); hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and *n*-butanol extract samples (all 50 μ g dry matter/mL); or residual water sample (50 μ g dry matter/mL). Cell proliferation was assessed by the WST-1 assay. Results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : * p < 0.05.

次に、液液抽出の結果から、RWには細胞増殖抑制効果があることがわかった。そこで、得られた画分サンプルのうち、RW及びブタノール抽出画分を用いて、滑膜細胞の遺伝子発現に対する影響を検討した。その結果、IL-1 β 単独添加によって、MMP-3及びMMP-13の遺伝子発現量は有意に増加していた。一方、IL-1 β とSRLE同時添加群ではIL-1 β 単独添加と比較して、MMP-3及びMMP-13の遺伝子発現量が有意に減少していた。さらにIL-1 β とRW同時添加群ではIL-1 β 単独添加と比較して、SRLE添加群と同様に遺伝子発現量が有意に減少していた。Synoviolinにおいては、いずれの群においても優位な差が認められなかった。このことから、SRLE及びRWにはMTS-C H7に作用し、MMP-3及びMMP-13の遺伝子発現を抑制させることが明らかになった。また、炎症性滑膜組織において、強発現しているSynoviolinにおいて、遺伝子発現が抑制されなかった。すなわち、SRLE及びRWは直接滑膜細胞作用し、MMPの遺伝子発現を抑制させることが考えられた (Fig. 15)。

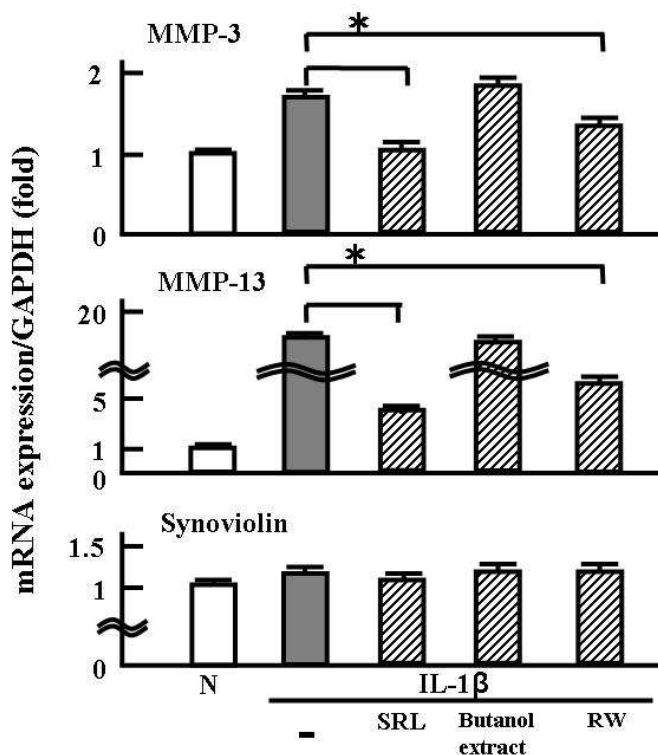


Fig.15 Effects of the fractionated SRL hot-water extract samples on mRNA expression. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL), SRL (50 μ g dry matter/mL), Butanol extract sample (50 μ g dry matter/mL), or residual water sample (50 μ g dry matter/mL). Gene expression was detected by RT-PCR. Results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : *, p < 0.05.

第4節 本章の小括および考察

本実験の結果、CAIA マウスより炎症性滑膜組織由来滑膜細胞株 MTS-C H7 を樹立した。CAIA マウスより採取した炎症性滑膜組織において、遺伝子発現が確認されている遺伝子群を用い遺伝子発現解析を行った。さらに、RA の炎症性滑膜組織にて過剰発現が報告され、細胞株の指標とする遺伝子 Synoviolin が発現している滑膜細胞 MTS-C H7 の樹立を行った。

SRL の RA に対するメカニズム及び SRL 中の活性成分の特定を行うため、SRLE を作製した。SRL を用いた他の研究において、活性成分として水溶性物質が報告されている。そこで、SRLE を作製し、滑膜細胞に対する影響を検討した。

滑膜細胞の細胞毒性に対する SRLE の影響を検討するため、SRLE を単独で乾燥重量別 25-2,500 μg にわけ、細胞毒性に対する検討を行った。その結果、50 % 細胞増殖阻害率は約 850 μg であることが示された。従って、SRLE には滑膜細胞の細胞増殖を阻害する作用を有することが考えられた。

次に、炎症性サイトカイン IL-1 β による滑膜細胞の異常な細胞増殖に対する SRLE の影響を検討した。その結果、SRL 乾燥重量 50 μg 以上において、IL-1 β による滑膜細胞の異常な細胞増殖を減少させた。従って、SRLE は IL-1 β 誘導による滑膜細胞の異常増殖を抑制する作用を有することが考えられた。

本実験において、樹立した MTS-C H7 はマウス滑膜組織由来滑膜細胞株である。人では、いまだ滑膜細胞が存在しないが、ウサギにおいて、滑膜組織由来滑膜細胞株 HIG-82 が存在する。SRLE による IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖に対する作用について、ウサギ滑膜細胞 HIG-82 を用い、同様の検討を行った。その結果、HIG-82 において、IL-1 β 単独添加では細胞増殖に影響を与えないと考えられた。さらに、IL-1 β と SRLE 同時添加し、培養を行った結果、細胞増殖に影響を与えなかった。従って、HIG-82 は IL-1 β 10 ng/mL による異常な細胞増殖が起こらないことが考えられた。また、SRLE を同時添加しても、細胞増殖に影響を与えなかったことから、本実験においては、使用せず、引き続き、MTS-C H7 において、検討を続けることとした。

SRLE は滑膜細胞の細胞増殖を抑制させたため、SRLE 中に含まれている活性成分の抽出を行った。SRLE を用いヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ブタノールによる液

液抽出を行った。コーヒー豆などの植物に含まれているカフェインは水溶性と脂溶性を併せ持つ化合物であることが知られている。そこで、SRLE を用いて、極性の少ない分子から順番に分画を行い、活性成分の抽出を行った。得られた抽出画分はそれぞれ、凍結乾燥後、培地に添加し、IL-1 β による滑膜細胞の異常な細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ブタノールの抽出画分では滑膜細胞の細胞増殖を減少させなかった。一方、RW は IL-1 β による滑膜細胞の異常な細胞増殖を減少した。従って、RW 中には滑膜細胞の細胞増殖を抑制する成分が含まれている可能性が考えられた。

さらに、SRLE 中に含まれる活性成分による滑膜細胞の遺伝子発現への影響を検討した。SRLE、液液抽出によって得られたブタノール画分及び RW を用い、IL-1 β 誘導によるタンパク質分解酵素及び Synoviolin の過剰な遺伝子発現について検討を行った。その結果、IL-1 β によって、MMP-3 及び MMP-13 の遺伝子発現量は増加した。SRLE は IL-1 β 誘導による MMP-3 及び MMP-13 の遺伝子発現量を減少させたが、Synoviolin の遺伝子発現量には影響を与えなかった。さらに、RW においても、同様な結果となった。従って、SRLE 及び RW には IL-1 β による MMP-3 及び MMP-13 の過剰な遺伝子発現を抑制させることが明らかとなった。さらに、SRLE 及び RW 中には滑膜細胞の遺伝子発現を抑制する活性成分は水溶性物質であることが示唆された。しかし、Synoviolin の遺伝子発現に影響を与えなかったことから、SRLE 及び RW 中に含まれる活性成分は炎症性滑膜組織において、過剰発現している Synoviolin に影響を与えない可能性が考えられた。また、SRLE 及び RW は直接滑膜細胞に作用し、タンパク質分解酵素の遺伝子発現を抑制させていることが考えられた。

第3章 *Salacia reticulata* に存在する抗関節リウマチ因子の探索

第2章では、CAIA マウスの膝関節より炎症性滑膜組織を採取し、炎症性滑膜由来細胞株 MTS-C H7 を樹立した。MTS-C H7 は炎症サイトカイン IL-1 β により、異常な細胞増殖を起こすことがわかった。さらに、SRLE にはこの異常な細胞増殖を抑制させる効果があることが明らかとなった。また、液液抽出によって得られた RW においても、同様の作用を示したことから、SRL に含まれる活性成分は水溶性物質であることを明らかにした。

植物にはカテキン、フラボノイド、アルカロイドなど水溶性物質が含まれていることが報告されている [86-88]。報告されている化合物の作用は多岐にわたるが、カテキン類では抗炎症作用について多く報告されている [89, 90]。そこで、我々は SR の樹皮に含まれるポリフェノール化合物に着目した。

SR に含まれ、一般試薬として購入できるポリフェノール化合物を用いて、異常な細胞増殖に対する検討を行った。また、植物には一般的に複数のカテキン類が存在している場合がある [91, 92]。そこで、HPLC を用いて、SRL に含まれているカテキン類を抽出し、異常な細胞増殖に対する影響を検討した。

植物成分の報告では、ポリフェノール等の化合物の作用に関する報告が多い。しかし、植物にはポリフェノール以外の化合物が含まれており、他の化合物に関する研究も行われている。そこで、定性反応及び TLC を用いて、SRL に含まれている活性本体の探索を行った。呈色反応及び TLC 解析の結果、活性本体がアミノ酸を含む化合物である可能性が考えられた。そこで、アミノ酸解析及び SDS-PAGE を用いて、検討を行った。その結果、活性本体が低分子タンパク質、つまりペプチド様物質である可能性が考えられたため、加水分解処理した後、異常な細胞増殖に対する影響を検討した。

第1節 *Salacia reticulata* に含まれるポリフェノール化合物による MTS-C H7 に及ぼす影響

SR の樹皮にはマンジフェリン (MGF)、トリプトトリテルペニックアシッド B (TTAB)、エピカテキン (EC) などのポリフェノール化合物が含まれていることが報告されている [93]。MGF はキサントラン配糖体の一種であり、 α -グルコシダーゼ阻害活性が報告されている [94, 95]。TTAB はトリテルペンの一種であり、免疫賦活活性が報告されている [96, 97]。EC はフラボノイドの一種であり、抗炎症作用や免疫抑制作用が報告されている [98, 99]。本実験では、MGF、TTAB、EC を用いて、MTS-C H7 による IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖に対する影響を検討した。

その結果、MGF、TTAB、EC は MTS-C H7 による IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖を抑制する効果が認められなかった。このことから、MGF、TTAB、EC は滑膜細胞の異常な細胞増殖を抑制する活性本体ではない可能性が考えられた (Fig. 16)。

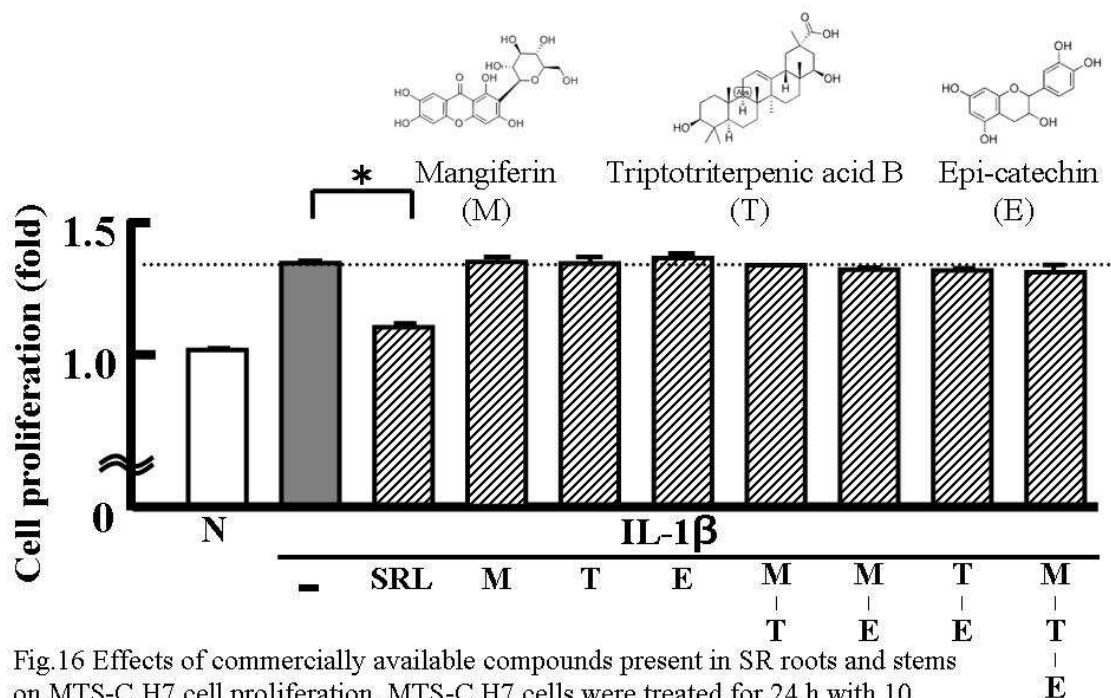


Fig.16 Effects of commercially available compounds present in SR roots and stems on MTS-C H7 cell proliferation. MTS-C H7 cells were treated for 24 h with 10 ng/mL mouse IL-1 β , SRL at 50 μ g dry matter/mL, 10⁻⁸ M mangiferin (M), 10⁻⁸ M triptotriterpenic acid B (T), or 10⁻⁸ M (-)-epicatechin (E). Cell proliferation was assessed by the WST-1 assay. The results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : * $p < 0.05$.

次に、植物体に多く含み、かつ研究が進んでいるカテキン類に着目した。カテキン類は様々の植物に含まれている。中でも緑茶中に含まれているカテキン類に関する知見は豊富である [100]。第2章の呈色反応において、SRLEにはポリフェノールが含まれていることが明らかとなっており、参考文献において、SRに複数のカテキン類が含まれていることがわかっている。そこで、緑茶をコントロールとし、HPLCを用いて、SRLに含まれているカテキン類の検出を試みた。

その結果、緑茶抽出物においては、EC、ECG、EGC、EGCGの4種類のカテキンが検出された。一方、SRLEにおいては、EC、EGCGの2種類のカテキンが検出された。このことから、緑茶とSRLでは、含まれているカテキンの種類が異なることがわかった (Fig. 17)。

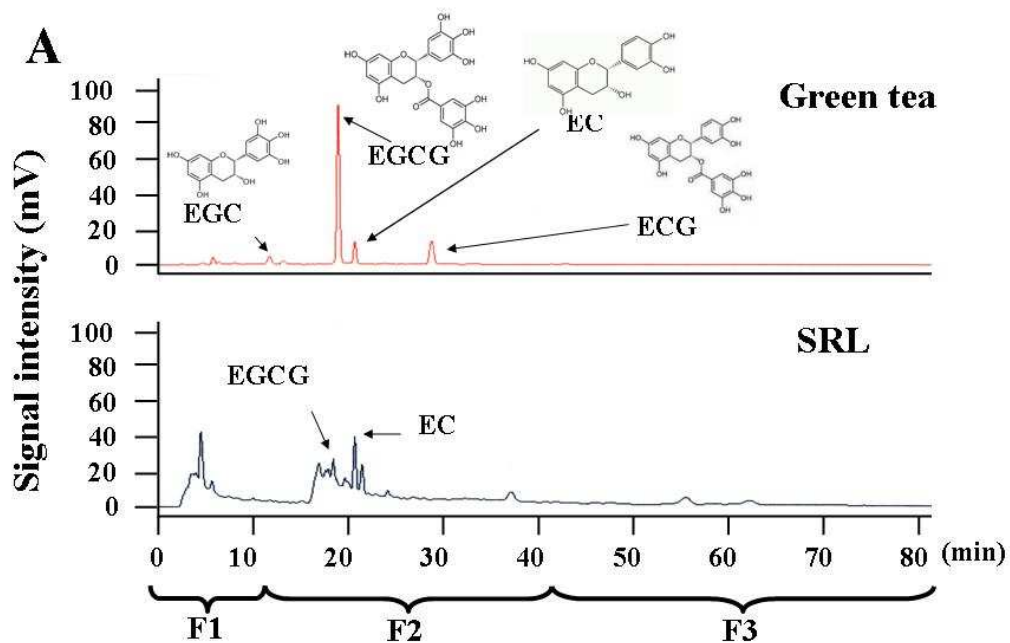


Fig.17 Major catechins, i.e., (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), in green tea extract and SRL hot-water extract. Fraction 1 (F1): 100% solvent A, 0–10.0 min; fraction 2 (F2): 90% solvent A + 10% solvent B, 10.1–40.0 min; and fraction 3 (F3): 40.1–80.0 min.

次に、HPLC 解析の結果を基に 3 つの画分に分け、各画分を回収した。得られた 3 種類の画分は凍結乾燥を行った後、超純水に再溶解し、IL-1 β による細胞の異常増殖に対する影響を検討した。その結果、今回得られた 3 種類の画分すべてにおいて、IL-1 β 単独添加と比較して、IL-1 β と抽出画分同時添加群では細胞増殖の減少が認められなかった。このことから、3 種類の画分には IL-1 β による細胞増殖促進作用を抑制する活性成分が含まれていない可能性が考えられた。しかし、SRL 熱水抽出物そのものには細胞増殖抑制効果があることから、SRL 熱水抽出物に含有する活性成分が HPLC 分析中に ODS カラム内の担体に吸着した可能性がある。また、3 画分以外に活性成分が抽出されたため、細胞増殖抑制効果が見られなかった可能性も考えられた (Fig. 18)。

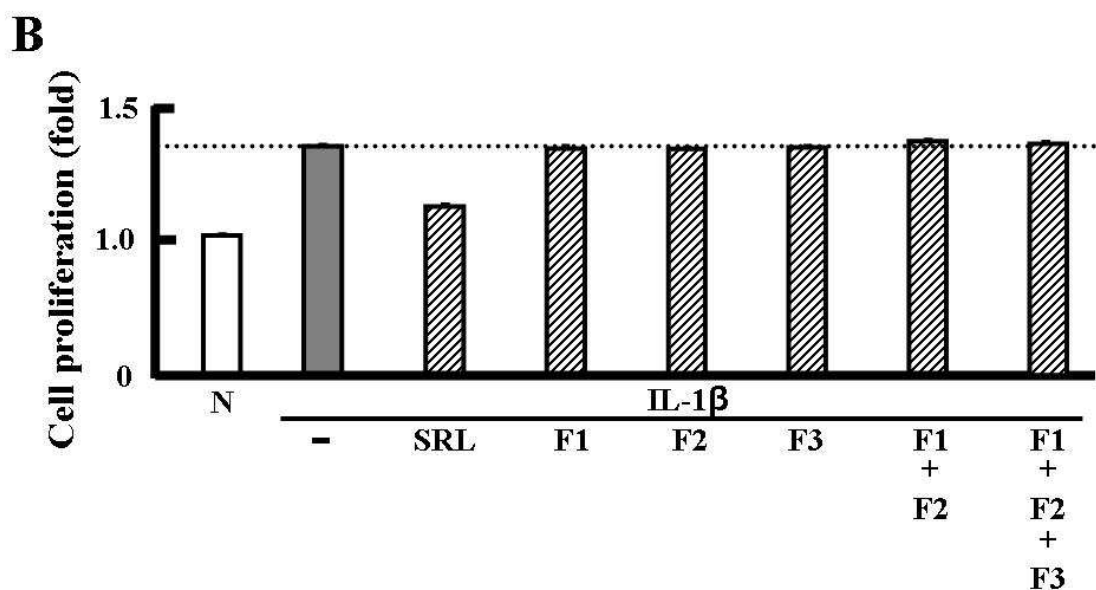


Fig.18 Anti-proliferative effects of the fractionated samples of the SRL extract on the growth of MTS-C H7 cells after 24-h treatment. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL); SRL extract (25 μ g dry matter weight/mL); or F1, F2, and F3 (25 μ g dry matter weight/mL) for 24 h .

第2節 *Salacia reticulata* 熱水抽出物に含まれる活性本体の探索

第1節の結果から、本実験において、SRの既知成分及びSRLEに含まれるカテキン類は活性本体ではないことが明らかとなった。他の植物体の報告において、抗炎症作用を示す化合物はカテキン類に関する報告が多い。しかし、本実験の結果からカテキン類以外の物質の探索の必要があると考えた。そこで、各種定性反応及びTLCを用いて、SRLEに含まれている成分について検討した。まず、SRLに含まれている成分を調べるため、成分分析を行った。そして、SRLEに含まれている活性成分を調べるため、タンパク質、糖、ポリフェノールの検出を行った。その結果、タンパク質、糖、ポリフェノールを検出した (data not shown)。第一章において、SR既知成分中のポリフェノール化合物、配糖体及びカテキン類が活性本体ではない可能性があることから、まず、タンパク質に着目した。

活性本体がタンパク質である可能性を考え、TLCを用いて、SRLE中に含まれるアミノ酸の検出を試みた。TLCにおいて、分離後、ニンヒドリン染色による検討を行った。ニンヒドリンはアミノ酸と反応することで、一般的に赤紫色や青紫色の呈色反応を示す試薬であり、広く利用されている。ニンヒドリン染色の結果、SRLEを塩酸で加水分解したものには、多数のスポットが検出された。このことから、SRLEにはアミノ酸を含む化合物の存在が考えられた (Fig. 19)。

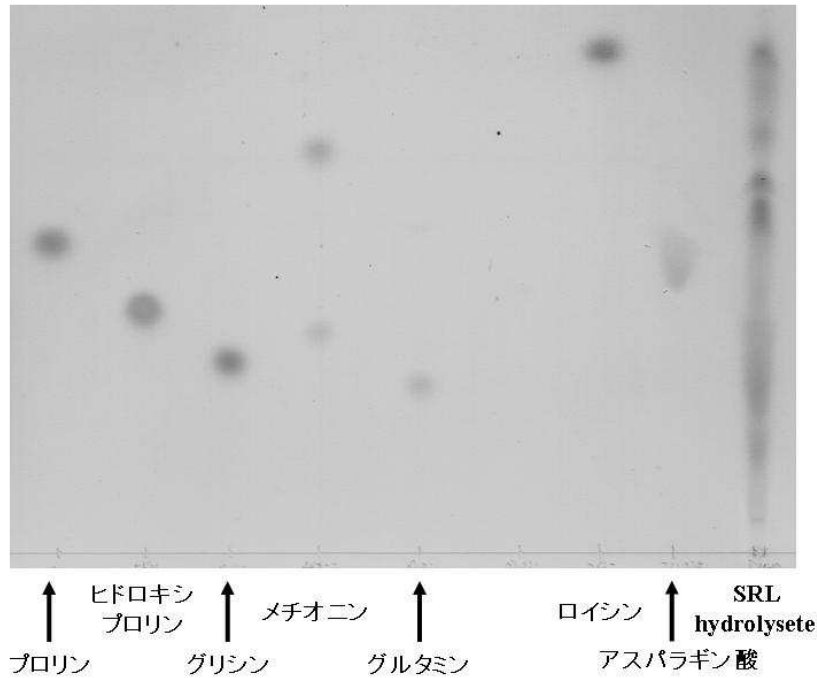


Fig.19. Thin-Layer Chromatography. SRL hot water extract was treated HCl (6 mol/L) at 90°C for 2 h. Hydrolyzed SRL hot water extract was separated by TLC Cellulose F and detected amino acids by ninhydrin stain. Mobile phase; *n*-propanol : H₂O = 7 : 3

次に、TLC 解析の結果、複数のアミノ酸の存在が明らかとなったことから、アミノ酸の特徴を調べるため、アミノ酸分析を行った。その結果、抽出物から遊離型を差し引いたアミノ酸では、グルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸の割合が多いことがわかった (Table 5)。さらに、アミノ酸分析の結果をもとに、SDS-PAGE による解析を行った。また、SRLE 及び HCl による加水分解処理を行った SRLE 加水分解物を用いて、SDS-PAGE によるタンパク質の検出を行った。その結果、SRLE には数万 Da のスメアなバンドと 3 kDa にはっきりとしたバンドが検出された。また、SRLE 加水分解物では、SRLE と同様の場所にバンドが検出されなかった。このことから、SRLE には 3 kDa の低分子量タンパク質が含まれていることが明らかとなった (Fig. 20)。

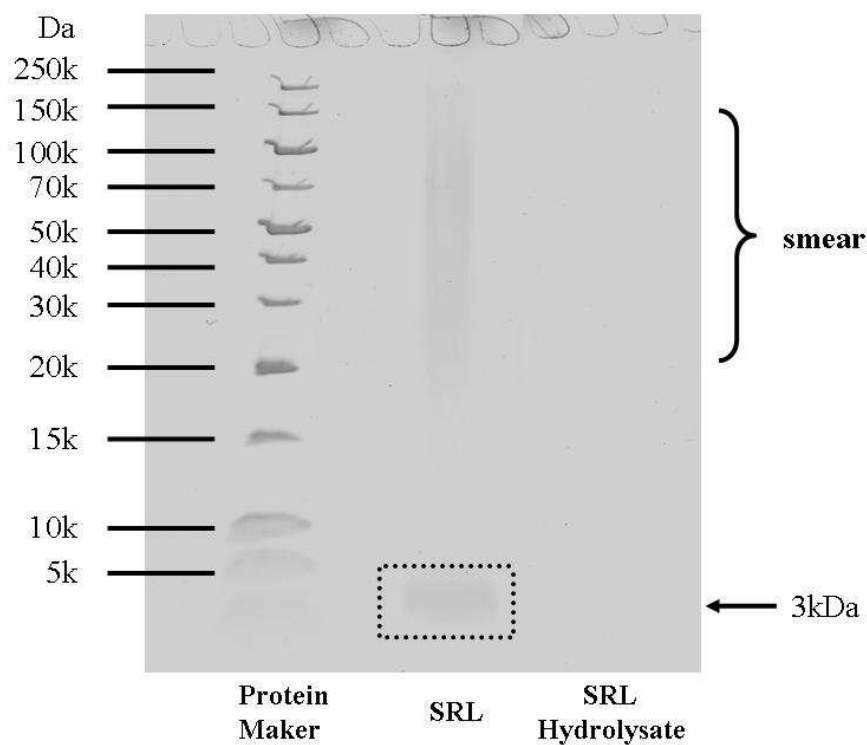


Fig.20 SDS-PAGE analysis. The SRL-only sample (0.5 mg dry matter) and SRL was treated HCl (6 mol/L) were subjected to electrophoresis. Proteins were detected by SDS-PAGE with gels stained with GelCode Blue Safe Protein Stain.

第3節 *Salacia reticulata* 熱水抽出物に含まれるペプチド様物質による MTS-C H7 に及ぼす影響

第2章第3節において、液液抽出により5種類の画分サンプルが得られた。それぞれの画分サンプルを検討した結果、RWにのみ、細胞増殖抑制効果及びRA関連因子の遺伝子発現抑制効果を明らかにした。そこで、本章ではSRLEを用いて、SRLに含まれる細胞増殖抑制効果を有する抗RA因子の探索を行った。

まず、ゲル濾過法を用いて、SRLEに含有する活性成分の分画を行った。SephadexG-75を純水にて膨潤し、カラムに充填した。充填後、ゲルろ過法を用いて、SRLEを分画した。その結果、推定分子量1 kDa以上10 kDa以下の画分において、260 nmの吸収極大が高いことがわかった。さらに、回収した各画分サンプルを用いて、IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖への影響を検討した。その結果、IL-1 β 単独添加と比較して、分子量1 kDa以上10 kDa以下の画分において、最も細胞増殖抑制効果が強いことが明らかとなった。この結果から、260 nmに吸収極大を持つ分子量1 kDa以上10 kDa以下の画分中に細胞増殖抑制効果を示す抗RA因子が含まれている可能性が考えられた (Fig. 21)。

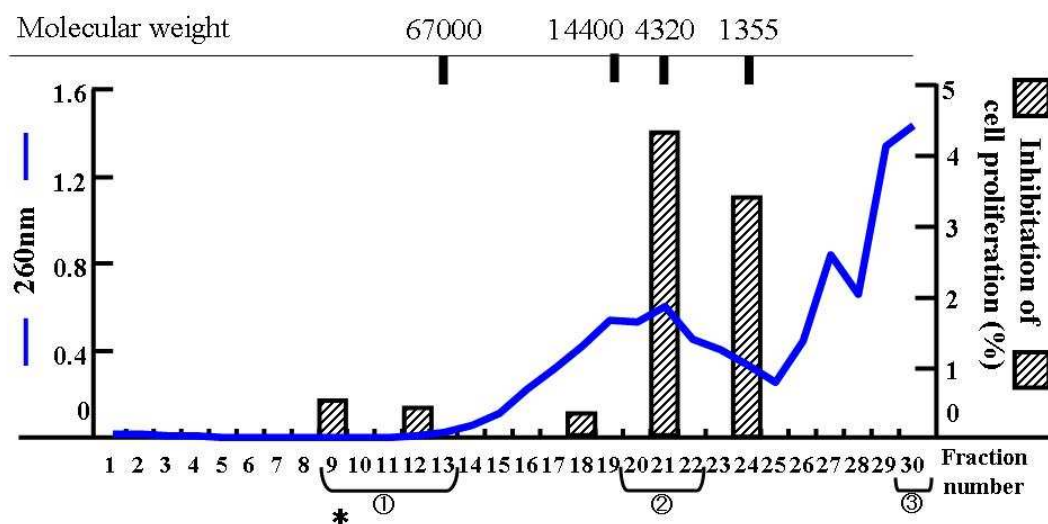
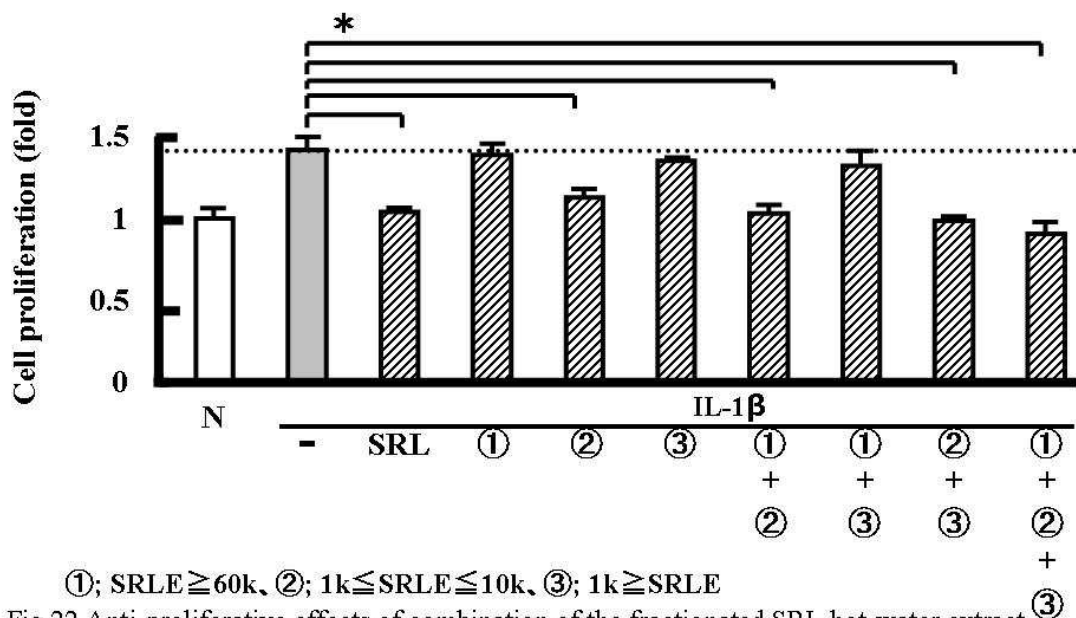


Fig.21 Effects of the fractionated SRL hot-water extract samples by gel filtration on cell proliferation. Anti-proliferative effects of SRL extract samples fractionated according to the gel filtration on the growth of MTS-C H7 cells after 24-h treatment. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL) and fractionated samples. Cell proliferation was assessed by the WST-1 assay. Results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : *, $p < 0.05$.

次に、ゲル濾過によって分取した画分サンプルを用いて、IL-1 β 異常な細胞増殖に対する影響を検討した。ゲル濾過によって得られた画分サンプルを分子量及び吸光度値を参考に、それぞれ、① (SRLE \leq 60 kDa)、② (1 kDa \leq SRLE \leq 10 kDa)、③ (1 kDa \geq SRLE) の計3グループに分けて、細胞増殖に対する検討を行った。その結果、①と③においては、IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖を減少させなかった。一方、②はIL-1 β 誘導による異常な細胞増殖を減少させた。さらに、①、②、③を組み合わせ、IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖に対する影響を検討したところ、②を含むいずれのサンプルにおいても、IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖を減少させることがわかった。このことから、分子量1k以上10k以下の画分にはIL-1 β 誘導による滑膜細胞の異常増殖を抑制させる活性本体が含まれることが示唆された (Fig. 22)。以降の検討において、②を使用する場合は、②をSRLGと表記します。



①; SRLE \geq 60k、②; 1k \leq SRLE \leq 10k、③; 1k \geq SRLE
 Fig.22 Anti-proliferative effects of combination of the fractionated SRL hot-water extract samples by gel filtration. Anti-proliferative effects of SRL extract samples fractionated according to the gel filtration on the growth of MTS-C H7 cells after 24-h treatment. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL), SRLE \geq 60k (①), 1k \leq SRLE \leq 10k (②), and 1k \geq SRLE (③). Cell proliferation was assessed by the WST-1 assay. Results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : *, $p < 0.05$.

次に、分子量 1 kDa 以上 10 kDa 以下の画分を用いて、IL-1 β 誘導による過剰な遺伝子発現に対する影響を検討した。1 kDa 以上 10 kDa 以下の画分は IL-1 β 誘導による異常な細胞増殖を最も強く抑制することがわかっている。そこで、1 kDa 以上 10 kDa 以下に含まれる抗 RA 因子の作用を調べるため、遺伝子発現による検討を行った。その結果、IL-1 β 単独添加において MMP-3、MMP-13、及び Synoviolin の遺伝子発現が増加していた。一方、IL-1 β 及び SRLG を同時添加した場合、IL-1 β 単独添加よりも遺伝子発現量が明らかに減少していた (Fig. 23)。このことから、SRLG には滑膜細胞で発現する RA 関連因子の遺伝子発現を抑制させることが明らかとなった。

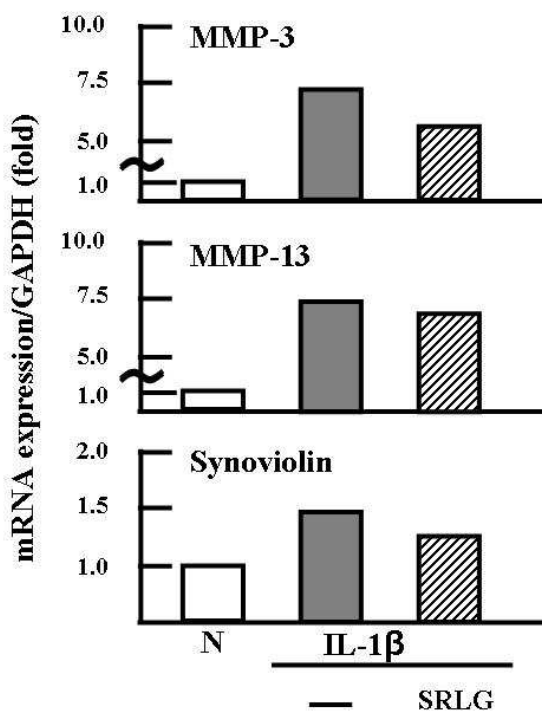


Fig.23 Effects of the fractionated SRL hot-water extract samples by gel filtration on mRNA expression. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL), SRLE (50 μ g dry matter/mL), or SRLG (50 μ g dry matter/mL). Gene expression was detected by RT-PCR.

次に、SRLGに含まれている活性本体が低分子量のタンパク質である可能性を考え、TLCを用いて、移相後、ニンヒドリン染色、イサチン染色を行い、SRLGに含まれるアミノ酸の検出を行った。ニンヒドリン染色の結果、SRLGにはアミノ酸が含有することが確認できた。しかし、分子量 60 kDa 以上あるいは 1k 以下の画分においては、アミノ酸の含有を確認することはできなかった。イサチン染色はアミノ酸の中でもプロリンやヒドロキシプロリンなどイミノ基をもつアミノ酸を呈色する試薬である。イサチン染色の結果、ニンヒドリン染色と同様に SRLG において、イミノ基をもつアミノ酸の存在が確認できた (Fig. 24)。

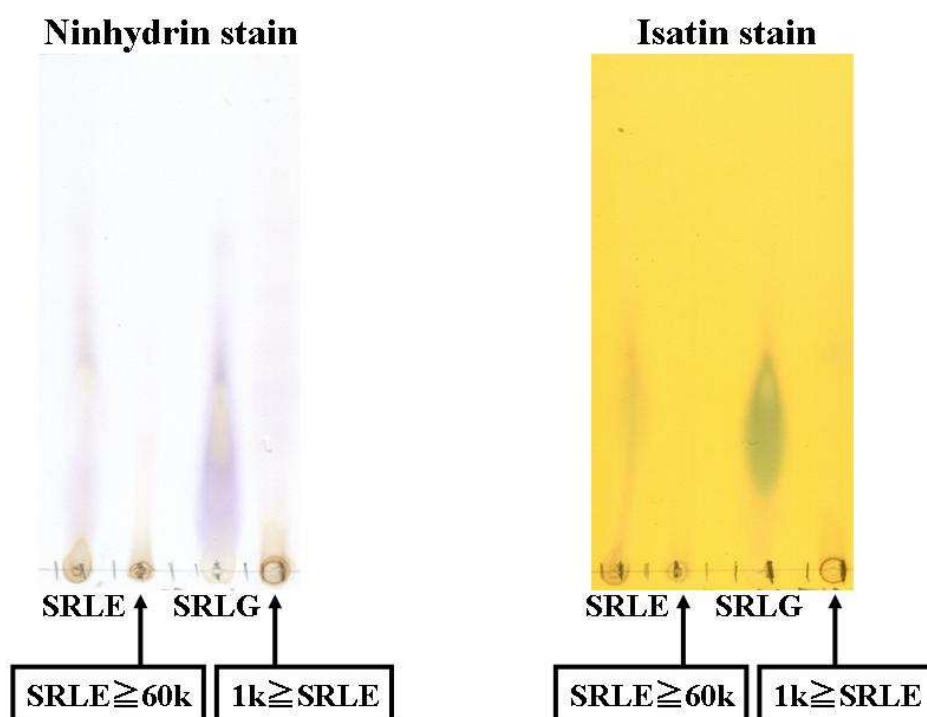


Fig.24 Thin-Layer Chromatography. TLC analysis of SRLE and SRLE fractionated samples by gel filtration. Samples was separated by TLC Cellulose F and detected amino acids by ninhydrin stain and Isatin stain. Mobile phase, *n*-propanol : H₂O = 7 : 3

次に、活性本体が 3 kDa のペプチド様物質である可能性を踏まえ、加水分解し、細胞増殖に対する影響を検討した。Carboxypeptidase Y (CPaseY)、Aminopeptidase I、及び塩酸を用いて、SRLG を加水分解した。加水分解処理を行った SRLG を用いて、IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、加水分解処理を行った SRLG すべてにおいて、細胞増殖の抑制効果が認められなかった (Fig. 25)。このことから、SRLG に含まれる 3 kDa のペプチド様物質は加水分解によって、細胞増殖抑制効果が失われることが明らかとなった。

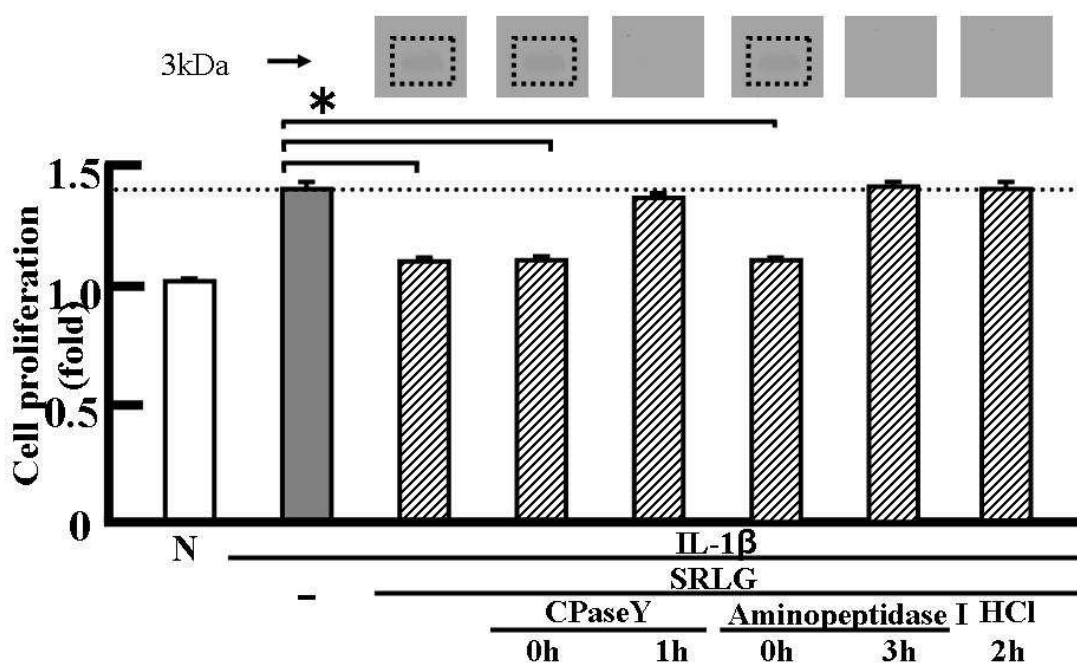


Fig.25 Anti-proliferative effects of hydrolyzed of SRLG. MTS-C H7 cells were treated with mouse IL-1 β (10 ng/mL) and SRLG or hydrolyzed SRLG samples. SRLG was hydrolyzed with carboxypeptidase Y (CPaseY) (2.38 units), Aminopeptidase I (1 unit), or HCl (6 mol/L). Cell proliferation was assessed by the WST-1 assay. The results are expressed as mean (SD), n = 3. Significantly different from IL-1 β : * $p < 0.05$.

第4節 本章の小括および考察

本実験の結果、滑膜細胞株 MTS-C H7 において、SR に含まれる既知成分である Mangiferin、Triptotriterpenic acid B、及び Epi-catechin、による IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖を減少させなかった。従って、本実験に使用した SR 既知成分は滑膜細胞の異常な細胞増殖に影響を与えないと考えられた。すなわち、これら SR 既知成分は SRLE に含有する抗 RA 因子ではない可能性が考えられた。

さらに、HPLC による SRLE に含まれるカテキン類の分画では、SRLE には Epi-catechin (EC) 及び Epi-gallocatechin gallate (EGCG) が含まれており、緑茶と比較すると、含有するカテキン類の種類が異なることが明らかとなった。この結果をもとに、F1、F2、及び F3 の計 3 つの画分にわけ、分画を行い、得られた画分サンプルを用い滑膜細胞への影響を検討した。その結果、F1、F2、F3 の画分、いずれにおいても、IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖を減少させなかった。従って、HPLC による分画画分には滑膜細胞の異常な細胞増殖に影響を与えないと考えられた。すなわち、HPLC による分画画分中のカテキン類は SRLE に含有する抗 RA 因子ではない可能性が考えられた。

SRLE に含まれる抗 RA 因子は SR 既知成分やカテキン類ではないことから、新たな抗 RA 因子の探索の必要性が考えられた。そこで、各種呈色反応及び TLC 解析を用い活性本体の探索を行った。その結果、SRLE 中にはたんぱく質、糖類及びポリフェノール類が含まれていることが明らかとなった。しかし、ポリフェノール化合物や配糖体を含む SR 既知成分及びカテキン類において、細胞増殖の抑制効果が認められなかった。そこで、たんぱく質の存在に着目した。SRLE 中に含まれるたんぱく質の検出を行うため、HCl による加水分解を行い、TLC によって移相した。その結果、TLC 解析において、SRLE 加水分解物には多数のスポットが検出された。従って、SRLE 中には多種類のアミノ酸を含む化合物が存在する可能性が考えられた。

さらに、アミノ酸を含む化合物の存在が認められたため、SDS-PAGE を用いたたんぱく質の検出を行った。その結果、数万 Da にスミアなバンド及び 3 kDa に明瞭なバンドが検出された。しかし、加水分解した SRLE には同地点にバンドが検出されなかった。従って、SRLE には 3 kDa の低分子量のたんぱく質が含まれている可能性が考えられた。すなわち、SRLE には 3 kDa のペプチド様物質が含まれている可能性が考えられた。

低分子量のたんぱく質が活性本体である可能性が考えられたため、ゲル濾過による分子量別に分画を行い、活性本体の分離を試みた。分子量 60 kDa 以上 (①)、1 kDa 以上 10 kDa 以下、1 kDa 以下 (③) の 3 グループに分け、滑膜の異常な細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、分子量 1 kDa 以上 10 kDa 以下の画分 (SRLG) において、IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖を減少させた。さらに、①、SRLG、③を組みあせて、同様の検討を行った。その結果、SRLG を含むすべてのサンプルにおいて、細胞増殖を減少させた。さらに、SRLG を用い滑膜細胞による遺伝子発現への影響を検討した。その結果、MMP-3、MMP-13、Synoviolin の遺伝子発現量を減少させた。従って、SRLG 中には滑膜細胞の細胞増殖を抑制させる活性本体が含まれていることが示唆された。

SRLG 中に活性本体が存在する可能性が考えられたため、ゲル濾過によって得られたサンプルを用い TLC 解析を行った。TLC 及び SDS-PAGE の結果から、3 kDa のペプチド様物質が活性本体である可能性を考え、ゲル濾過サンプルは TLC によって、移相した後、アミノ酸の検出を行った。その結果、SRLG にはアミノ酸を含む化合物が含まれていることが明らかとなった。また、アミノ酸の中には、プロリンやヒドロキシプロリンなどイミノ基をもつアミノ酸の存在が明らかとなった。従って、滑膜細胞の異常増殖を抑制する SRLG には 3 kDa のペプチド様物質が含まれていることが示唆された。

SRLG 中には 3 kDa のペプチド様物質が含まれていることが明らかとなった。そこで、3kDa のペプチド様物質が活性本体である可能性を考え、SRLG に加水分解処理を行い、滑膜細胞の細胞増殖への影響を検討した。CPaseY、AminopeptidaseI、及び HCl を用い SRLG を加水分解し、得られた加水分解物による IL-1 β 誘導の異常な細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、加水分解したいずれのサンプルにおいても、滑膜細胞の細胞増殖を減少させなかった。従って、加水分解した SRLG には滑膜細胞の細胞増殖を抑制する効果がないことが示唆された。さらに、SRLG に含まれる 3 kDa のペプチド様物質は活性本体の 1 つであることが示唆された。

総括

本研究は、SRLによる関節リウマチの改善効果の一部を解明した。すなわち、本研究では、SRLが関節リウマチモデル動物及びモデル動物より樹立した炎症性滑膜細胞に対して、改善効果を与えるか否かを *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。さらに、改善効果を示す活性本体の探索を行った。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. SRLは関節リウマチモデル動物であるCAIAマウスの関節炎を改善させることを明らかにした。そのメカニズムとして、SRLは、関節炎を起こした関節内部において、炎症性細胞が減少し、軟骨・骨組織の破壊を抑制することを、初めて見出した。
2. SRLは、炎症性滑膜細胞において、細胞増殖及び遺伝子発現を抑制することを明らかにした。そのメカニズムとして、SRL熱水抽出物は炎症性サイトカインIL-1 β によって、引き起こされた異常な細胞増殖を抑制することを明らかにした。さらに、SRLは、IL-1 β によって、引き起こされたタンパク質分解酵素の過剰な遺伝子発現量を抑制することを明らかにした。
3. SRLに含まれている活性成分が炎症性滑膜細胞の異常な細胞増殖を抑制することを明らかにした。SRLにはIL-1 β 誘導による滑膜細胞の異常な細胞増殖を抑制する活性成分が含まれていることを初めて見出した。さらに、SRLに含まれている活性成分のうち、3 kDaのペプチド様物質が滑膜細胞の異常な細胞増殖を抑制する活性本体の1つであることを明らかにした。

本研究により、SRLによる関節リウマチの改善効果の一部を明らかにすることができた。すなわち、SRLに含まれている活性成分は、関節内部の滑膜細胞に作用し、異常な細胞増殖を抑制する可能性を明らかにした。また、活性成分のうち、3 kDaのペプチド様物質は熱による抵抗性が高いことを示し、機能性食品素材としての可能性を示すことができた。

今後、本研究の知見に基づき、関節リウマチへの新たな治療方法の確立並びに予防法の確立などの応用も期待される。

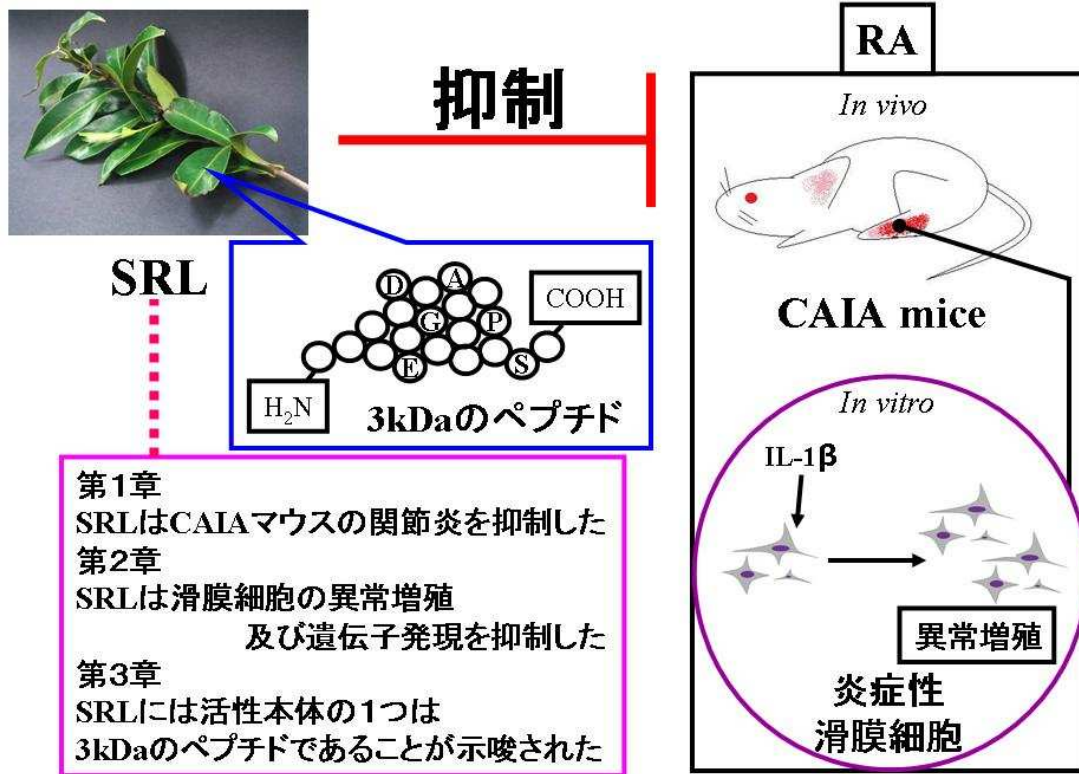


Fig.26 Conclusion

謝辞

本研究に際し、素晴らしいテーマを与えていただくとともに、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科機能性食品科学講座 和田 政裕教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科食品機能学講座 真野 博教授に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学研究科生体防御学講座 日比野 康英教授並びに城西大学薬学部薬剤作用解析学講座 小林 大介教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、有益なご助言並びにご激励を賜りました城西大学薬学部食品機能学講座 清水 純講師、城西大学薬学部機能性食品科学講座 古旗 賢二准教授並び同講座 中谷 祥恵助手に感謝申し上げます。

実験の一部にご協力をいただきました片岡 綾修士、小倉 香名学士、に感謝致します。

最後に城西大学薬学部食品機能学講座・機能性食品科学講座関連諸氏のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できましたことを心から感謝致します。

実験の部

実験の部

第 1 章

第 1 節 関節リウマチモデル動物 CAIA マウスを用いた *in vivo* 実験系

① 実験動物

実験動物には 6 週齢 DBA/1J 雄性マウス（日本チャールズリバー(株)）を用いた。抗 II 型コラーゲン抗体カクテルキット(Chondrex)を用いて、Terato らの論文を参考に関節炎モデルマウスを作製した [101]。実験に使用した基本飼料は Morishita らの論文を参考に、AIN-93G の飼料組成中の大豆油をラードとコーン油に置換し、作製した [102]。飼料組成は Table 1 に示した。予備飼育を 1 週間行った後、関節炎を惹起させず、飼料を与える群 (Normal 群)、関節炎を惹起させて、飼料を与える群 (CAIA 群)、関節炎を惹起させて、SRL 粉末を 1% 添加した飼料を与えた群 (CAIA+SRL) の 3 群 (n = 6) に無作為に分け、飼料を自由摂取させた。8 日間摂取させた後、それぞれの群で体重に大きな変化がないことを確認した後、CAIA 群と CAIA+SRL 群のマウスに関節炎惹起処理を行い、再び同様の飼料を 14 日間摂取させた。マウスは恒温恒湿度（室温 21°C±1°C、湿度 45%~50%）、12 時間明暗サイクル（明暗：8:00-20:00）の環境下で飼育を行った。また本実験は、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号）及び「城西大学実験動物規定」（平成 19 年 10 月 12 日）に基づいて行われた。

② 関節炎スコア

関節炎を惹起させた 0 日目から解剖する 14 日目まで毎日測定した。関節炎スコアは Quattrocchi らの論文を参考に足の腫れ具合、色などの測定を行った [103]。

③ 血液成分の測定

マウスをジエチルエーテル下で麻酔し、腹部静脈血採血法を用いて、血液を採取した。採取した血液は、室温で 30 分間静置後、12000×G で 20 分間遠心分離を行った。上清を血清サンプルとして、使用まで -20°C で保存した。血清中の IL-1β は、Quantikine kit（R&D systems）、血清中の PGE₂ は、Prostaglandine E2 Express EIA kit（Cayman Chemical）を

それぞれ用いて測定した。

④ 脱灰切片作製

関節部の組織切片を作製するために、マウス後肢の指関節を摘出し、速やかに 10%パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて、4°C、24 時間固定した。固定後、12.5%スクロース/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4)、25%スクロース/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 2 日間ずつ順次浸透させ、5%EDTA / 25%スクロース / 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4°C、2 日間、脱灰化を行った。脱灰した組織は、25%スクロース/0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4°C条件下で保存した。

切片作製の為に準備した組織は、4%カルボキシメチルセルロース溶液を用いて包埋後、リサーチ用高機能クリオスタット CM3050S (ライカ(株)) を用いて、-15°Cの条件下で、正中横断面方向で、5 μm の厚さに切断し、粘着フィルム上に貼付した。作製した切片はすぐに氷中に静置した後、-80°Cで保存した。

⑤ HE 染色

HE 染色に用いる切片は、-30°Cで保存してあるアセトンを用いて、5 分間固定した。固定後、マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (Wako) 中で 15 分間染色を行った。染色後、0.01M PBS で 10 分間洗浄を 3 回行った。カウンター染色として、0.5%エオシン Y 溶液 (Wako) 中で 2 分間染色を行った後、0.01M PBS で 10 分間洗浄を 3 回行った。

染色された切片は、光学顕微鏡下で観察後、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL (ピクセラコーポレーション) を用いて、組織画像を取り込み、上記システム専用ソフトウェアである In studio (ピクセラコーポレーション) を用いて、形態計測を行った。計測後、Honda らの論文を参考に組織学的スコアの算出を行った [104]。

⑥ TB 染色

TB 染色に用いる組織切片は、-30°Cで保存してあるアセトンを用いて、5 分間固定した。固定後、純水で 10 分間洗浄を 2 回行った後、0.05%TB 溶液 pH 7.0 (Wako) 中で 10 分間染色を行った。染色後、純水で 10 分間洗浄を 2 回行った。

染色された切片は、光学顕微鏡下で観察後、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin

600CL（ピクセラコーポレーション）を用いて、組織画像を取り込み、上記システム専用ソフトウェアである In studio（ピクセラコーポレーション）を用いて、形態計測を行った。計測後、Honda らの論文を参考に組織学的スコアの算出を行った [104]。

⑦ RT-PCR

RT-PCR 法を用いた組織の RNA は TRIZOL Reagent（Invitrogen）を用いて抽出した。抽出した RNA は DPC 処理水に溶解後、分光光度計を用い定量した。

1 サンプルあたりの total RNA 量を 1 μ g 含むように調整し、Superscript First-Strand Synthesis System（Invitrogen）を用いて逆転写酵素反応法（RT）を行い、cDNA を作製した。RT の条件は 50°C 90 分、99°C 5 分で行った。PCR は常法に従って、Table.3 の条件で行った。

得られた PCR 産物を 2%アガロース (TAKARA)ゲルにて 100V で 25 分間電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液で、15 分間染色を行った。次に 245 nm の紫外線照射下(3UV トランスイルミネータ)を用いて、バンドを確認した後、ポラロイドカメラの Polapan663 白黒インスタントパックフィルムを用いて、泳動画像を撮影し、1 分間待ったのち、現像した。泳動写真はフラッドヘッドスキャナーを用いてデジタル画像化し、画像分析ソフト Image-J を用いて、平均明度を数値化した。内部標準遺伝子である GAPDH の PCR 産物を示す明度に対して各遺伝子の PCR 産物の示す明度の相対値を算出し、各遺伝子の mRNA 発現レベルを比較した。

⑧ 統計処理

動物実験は各群 6 匹のマウスを用い、それぞれの平均値 \pm SD で示した。統計学的評価は Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS)を用い、対応のない t 検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ とした。組織切片の写真は各群の中から典型的な像を示した。

Table.1 composition of experimental diets **Normal,CAIA CAIA+SRL**

	Normal,CAIA	CAIA+SRL
Casein	20	20
Lard	5.83	5.83
Corn oil	1.17	1.17
Mineral mixture (AIN-93G)	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93G)	1	1
L-custin	0.3	0.3
Choline cholride	0.25	0.25
Sucrose	10	10
Cornstarch	52.95	51.95
Cellulose	5	5
SRL powder	0	1
Total(%diet)	100	100

Table.2 Weight change after the onset of arthritis

Group	0 day	14 day
Normal	22.6 ± 0.84	23.9 ± 1.01
CAIA	22.7 ± 2.57	25.2 ± 2.63
CAIA+SRL	22.5 ± 1.56	24.8 ± 1.92

Table 3. Sequences of PCR primers used

Target gene	Sequence	Target gene	Sequence
GAPDH forward	5'-TTGACCTCAACTACATGG-3'	MMP-2 forward	5'-CAGTGACACCACGTGACCAAG-3'
GAPDH reverse	5'-CAGGGTGGTGGACCTCAT-3'	MMP-2 reverse	5'-CATTCCAGGAGTCTGCCGATG-3'
TNF- α forward	5'-CGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3'	MMP-3 forward	5'-CCAGTCTACAAGTCTCTCCAC-3'
TNF- α reverse	5'-GTCCCTTGAAGAGAACCCTGG-3'	MMP-3 reverse	5'-GCAGCATCCATGTTGGATGG-3'
IL-1 β forward	5'-GCTGTCCAGATGAGAGCATC-3'	MMP-9 forward	5'-CTGCCTGCACCCTAAAG-3'
IL-1 β reverse	5'-CTGTCCATTGAGGTGGAGAG-3'	MMP-9 reverse	5'-GTACAGGAAGAGTACTGC-3'
IL-6 forward	5'-CAGTTGCCCTTCTTGGACTG-3'	c-fos forward	5'-GATACACTCCAAGCGGAGAC-3'
IL-6 reverse	5'-CGTAGTCCAGAAAGACCAGAG-3'	c-fos reverse	5'-CCAGTCTGCTGCATAGAAAGG-3'
IL-10 forward	5'-CAATAACTGCACCCACTTCC-3'	RANKL forward	5'-GAGCGCAGATGGATCCCTAAC-3'
IL-10 reverse	5'-ATTTCATGGCCTTGTAGACAC-3'	RANKL reverse	5'-GCAGCATTGATGGTGGAGGTG-3'
IFN- γ forward	5'-GATAATCTGGAGGAACTGG-3'	cathepsin K forward	5'-CCAGTGTGGTTTCCCTGTIIGG-3'
IFN- γ reverse	5'-GACTCCTTTTCCGCTTCC-3'	cathepsin K reverse	5'-TTGCCCGTGGCGTTATACAT-3'

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; IFN, interferon; MMP, matrix metallo proteinase; PCR, polymerase chain reaction; RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand; TNF, tumor necrosis factor.

第2章

第1節 CAIA マウス由来培養細胞 MTS-C H7 を用いた *in vitro* 実験系

① 細胞株樹立

第1章第1節①と同様の方法で関節炎モデルマウスを作製した。細胞株樹立のため、マウス後肢を採取し、無菌条件下で膝関節を取り出し、炎症性滑膜とその周辺組織の採取を行った。回収した組織は解剖バサミで綿密に切断後、IV型コラゲナーゼを用いて、37°C 2時間条件下で消化処理し、細胞分散液を調製した。細胞分散液は無血清培地を用いて、洗浄を行い、100 mm プレートに播種した。播種後、増殖した細胞のみ Tysin-EDTA を用いて、細胞の回収を行った。回収した細胞は限界希釈法を用いて、1 cell/well の濃度で 96 穴プレートに播種した。2 日間に 1 度、培地交換を行い、増殖した細胞のみ、35、60、100 mm プレートに順次、細胞継代を行った。増殖した細胞は使用するまで液体窒素中で保存した。増殖した細胞は文献を元に、炎症性滑膜組織において、発現している遺伝子について、RT-PCR 法を用いて、常法に従って、Table 3、Table 4 の条件で行った。遺伝子発現解析の結果、目的遺伝子を高発現している細胞を MTS-C H7 として樹立した。

② サンプル調製

実験に使用した SRL はアーユルヴェーダコタラヒムブツ協会より購入した。新鮮な葉を採取し、天日乾燥させ、綺麗な葉のみを選別し、フードミルを用いて、破碎した。破碎後、150 μm メッシュでふるいにかけて、落下した粉末のみを用いた。12 g の粉末を用いて、純水が 1.5 L から 1.0 L になるまで煮出した後、室温まで冷却した。冷却後、2190 \times G、20 分間遠心分離し、得られた上清を 0.2 μm フィルターでろ過を行った。濾過液を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を実験に使用した。

③ 液液抽出法

SRLE を用いて、*n*-ヘキサン (Wako)、ジエチルエーテル (Wako)、酢酸エチル (Wako)、*n*-ブタノール (Wako) の順に分液漏斗を用いて、液液抽出を行った。得られた抽出画分サンプルは溶媒を気化させた後、純水またはエタノールに再溶解させ、実験に使用し

た。

④ 細胞増殖

MTS-C H7 を 5×10^3 cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロプレートに播種し、24 時間培養後、IL-1 β 、SRLE 及び液液抽出によって得られた画分サンプル添加培地等に培地交換し、24 時間培養を行った。培養後、Cell Proliferation Reagents WST-1 (Roche) 試薬を培地の 1/10 量添加し、30 分 37°C 5% CO₂ 存在下で静置し、プレートリーダー Wallac 1420ARVO.SX multilabel counter (WALLAC OY)を用いて、波長 450 nm で測定した。各測定値は、通常培地で培養した MTS-C H7 の測定値で除し、相対値を算出し比較した。

⑤ RT-PCR

RT-PCR 法に用いた細胞は 1×10^5 cells/well ずつ 60mm プレートに播種し、24 時間培養を行った。培養後、IL-1 β 、SRLE、及び SRLE を液液抽出した画分サンプル添加培地等と培地交換し、24 時間培養した。培養後、第 1 章第 1 節⑦と同様の方法を用いて RT-PCR 法を行った。

⑥ 統計処理

細胞実験はサンプルごとに 3 穴を用い、独立した実験を 3 回行った。結果はそれぞれの平均値 \pm SD で示した。統計学的評価は Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS)を用い、対応のある t-検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ とした。

Table 4. Sequences of PCR primers used

Target gene	Sequence	Target gene	Sequence
collA1 forward	5'-CCTCAAAGATGTGCCACTCTG-3'	OPG forward	5'-CAAGACATTGACCTCTGTG-3'
collA1 reverse	5'-CCATGTAGGCTACGCTGTTC-3'	OPG reverse	5'-GGTCTTCTCAGACTGTGG-3'
col2A1 forward	5'-GTGGAGCAGCAAAGAGCAAGGA-3'	MMP-13 forward	5'-CTTCCAAACCATGTGGATGC-3'
col2A1 reverse	5'-CTTGCCCCACTTACCAGTGTG-3'	MMP-13 reverse	5'-GGCATGACTCTCACAAATGGG-3'
SIP1 forward	5'-GAGACTCTGCTGGCAAATTC-3'	TIMP-1 forward	5'-CGAGACCACCTTATACCAGC-3'
SIP1 reverse	5'-GGAGCTTGACAATGCTAGAC-3'	TIMP-1 reverse	5'-CACAGCCAGCACTATAGGTC-3'
IL-17 forward	5'-GACTACCTCAACCGTTCAC-3'	TIMP-2 forward	5'-GGACACGCTTAGCATCACC-3'
IL-17 reverse	5'-CTCTTCAGGACCAGGATCTC-3'	TIMP-2 reverse	5'-GCGCAAAGAACCATCACTTC-3'
CXCL12 forward	5'-CAATTCTCCGCTGACAGTC-3'	c-Jun forward	5'-GAGGAAGCGCATGAGGAACC-3'
CXCL12 reverse	5'-GATCAGGCAATGAACCAGAG-3'	c-Jun reverse	5'-GCGTTAGCATGAGTTGGCAC-3'
CXCR4 forward	5'-CTCATCTGGCCTTCATCAG-3'	NFATc1 forward	5'-CACCAAAGTCTCTGGAGATCC-3'
CXCR4 reverse	5'-GAAGGAGTCGATGCTGATCC-3'	NFATc1 reverse	5'-GAAACGCTGGTACTGGCTTC-3'
Sox9 forward	5'-TGCAGCACAAAGAAAGACCAC-3'	Synoviolin forward	5'-GCCCTCTACAGTCCCTATCTGC-3'
Sox9 reverse	5'-CCCTCTCGCTTCAGATCAAC-3'	Synoviolin reverse	5'-CTCAGAGATCCTGCCAAGTC-3'
STAT3 forward	5'-CTCCAACATCTGTTCAGATGC-3'	Runx2 forward	5'-ATGGTGGAGATCATCGCGGACCACCCGGCC-3'
STAT3 reverse	5'-GACATGTTGTTTCAGCTGCTG-3'	Runx2 reverse	5'-ACACCTACTCTCATACTGGGATGAGGAATG-3'

SIP1, Sphingosine 1-phosphate receptor 1; IL, interleukin; MMP, matrix metallo proteinase;

STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; Runx2, runt related transcription factor 2

OPG, Osteoprotegerin; TIMP, Tissue inhibitor of Metalloproteinase;

NFATc1, Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1

第3章

第1節 MTS-C H7 を用いた *in vitro* 実験系

① 細胞培養

第2章第1節①と同様の方法で細胞培養を行った。

② 細胞増殖

MTS-C H7 を 5×10^3 cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロプレートに播種し、24 時間培養後、IL-1 β 、SRLE、Mangiferin (Sigma-Aldrich)、Triptotriterpenic acid B (AApin chemical)、epi-catechin (Sigma-Aldrich) SRLE を用いたゲル濾過法による分画画分、及び加水分解した SRLG 添加培地等へ培地交換し、24 時間培養を行った。培養後、第2章第1節③と同様の方法で細胞増殖を測定した。

③ HPLC 分析

HPLC システムは LC-Organizer, L-6200 Intelligent pump, L-4200H UV-VIS Detector and ELITE LaChrom Column Oven L-2350 (HITACHI) を用いた。分別カラムとして Wakosil column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) を用いた。カラム内部を 40 $^{\circ}$ C に設定し、流速 1.0 mL/min の条件下で 10 μ l のサンプルを注入した。移動相は Zuo らの論文を参考に 100%メタノール：水：蟻酸=19.5：80.2：0.3 (A) と 100%メタノール (B) を用いた [105]。勾配流出方法は 100%A 10 分間, 90%A+10%B 70 分間, 100%B 20 分間、計 3 段階に分けた。得られたクロマトグラムは PC 処理を行い、流出パターンを比較した。

④ ゲルろ過法

ゲルろ過はカラムに sephadex G-75 (GE Healthcare) を充填し、室温・流速 0.3 mL/min 条件下で 100 μ l のサンプルを注入した。移動相は純水を用いた。1.5 mL tube を用いて、300 μ L ごとに滴下した液体を回収した。各画分は回収後、凍結乾燥し、サンプルとした。分子量マーカーとして、BSA (MW: 67000)、Lys (MW: 14400)、inulin (MW: 4320) 及び VitaminB12 (MW: 1355) を使用し、分子量の目安とした。

⑤ RT-PCR

RT-PCR 法に用いた細胞は 1×10^5 cells/well ずつ 60 mm プレートに播種し、24 時間後、各サンプル添加培地と培地交換をした。培養後、第 1 章第 1 節⑦と同様の方法を用いて RT-PCR 法を行った。

⑥ TLC 法

TLC 法は TLC Cellulose F (MERCK)を用いて、各サンプルを原点にアプライし、移相させた。展開層の移動相組成は *n*-propanol : H₂O=7 : 3 である。移相後、ニンヒドリン試薬及びイサチン試薬を用いて、染色した。

⑦ 加水分解処理

SRLE に Carboxypeptidase Y を添加後、37℃、0、1.0 時間培養を行った。培養後、遠心分離にかけ、上清をサンプルとした。SRLE に Aminopeptidase I を添加後、25℃、0、3.0 時間培養を行った。培養後、遠心分離にかけ、上清をサンプルとした。SRLE に 12N HCl を添加後、90℃、2 時間加温を行った。加水分解後、遠心分離を行い、上清をサンプルとした。

⑧ SDS-PAGE

SDS-PAGE 用サンプルは、SRLG を加水分解処理後、それぞれのサンプルを gradient gel MULTIGEL II Mini 15/25 (COSMO bio)にアプライし、電気泳動を行った。電気泳動を行ったゲルは、純水で 15 分間洗浄し、GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo Fisher) を用いて、1 時間染色した。電気泳動ゲル写真はフラッドヘッドスキャナーを用いてデジタル画像化した。

⑨ 統計処理

細胞実験はサンプルごとに 3 穴を用い、独立した実験を 3 回行った。結果はそれぞれの平均値±SD で示した。統計学的評価は Stat Mate 3 ソフトウェア(ATMS)を用い、対応のない *t*-検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ とした。

Table.5 Amino acids component of SRLE

mg/100g	抽出物	遊離型	抽出物-遊離型
アルギニン	33	20	13
リシン	17	4	13
ヒスチジン	9	2	7
フェニルアラニン	21	8	13
チロシン	22	10	12
ロイシン	31	12	19
イソロイシン	39	20	19
メチオニン	7	0	7
バリン	47	24	23
アラニン	62	29	33
グリシン	82	6	76
プロリン	111	77	34
ヒドロキシプロリン	20	0	20
グルタミン酸	159	19	140
セリン	36	6	30
スレオニン	35	11	24
アスパラギン酸	148	28	120
トリプトファン	5	1	4
シスチン	61	0	61

引用文献

- [1] 平成 20 年度患者調査 厚生労働省統計
- [2] Funk JL, Cordaro L, Wei H, Benjamin JB, Yocum DE, Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. A possible role for locally produced parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1998. 101 : 1362-1371.
- [3] Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985. 316 : 452-457.
- [4] Steinitz M, Izak G, Cohen S, Ehrenfeld M, Flechner I, Continuous production of monoclonal rheumatoid factor by EBV-transformed lymphocytes. *Nature.* 1980. 287 : 443-445.
- [5] Paulus HE, Oh M, Sharp JT, Gold RH, Wong WK, Park GS, Bulpitt KJ, Western Consortium of Practicing Rheumatologists. Correlation of single time-point damage scores with observed progression of radiographic damage during the first 6 years of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003. 30 : 705-713.
- [6] Hanyu T, Yamazaki H, Ishikawa H, Arai K, Tohyama CT, Nakazono K, Murasawa A, Flexible hinge toe implant arthroplasty for rheumatoid arthritis of the first

- metatarsophalangeal joint: long-term results. *J Orthop Sci.* 2001. 6 : 141-147.
- [7] Kubassova O, Boesen M, Cimmino MA, Bliddal H, A computer-aided detection system for rheumatoid arthritis MRI data interpretation and quantification of synovial activity. *Eur J Radiol.* 2010. 74 : 67-72.
- [8] McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, Feldmann M, Williams RO, Brennan FM, Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010. 12 : R107.
- [9] Peris F, Martínez E, Badia X, Brosa M, Iatrogenic cost factors incorporating mild and moderate adverse events in the economic comparison of aceclofenac and other NSAIDs. *Pharmacoeconomics.* 2001. 19 : 779-790.
- [10] Lavagno L, Gunella G, Bardelli C, Spina S, Fresu LG, Viano I, Brunelleschi S, Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor-alpha production from monocytes: role of transcription factor NF-kappa B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur J Pharmacol.* 2004. 501 : 199-208.
- [11] Silverman E, Mouy R, Spiegel L, Jung LK, Saurenmann RK, Lahdenne P, Horneff G, Calvo I, Szer IS, Simpson K, Stewart JA, Strand V, Leflunomide in Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA) Investigator Group. Leflunomide or methotrexate for juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2005. 352 : 1655-1666.

- [12] Palmer G, Burger D, Mezin F, Magne D, Gabay C, Dayer JM, Guerne PA, The active metabolite of leflunomide, A77 1726, increases the production of IL-1 receptor antagonist in human synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2004. 6 : 181-189.
- [13] Elkayam O, Burke M, Vardinon N, Zakut V, Yitzhak RB, Paran D, Levartovsky D, Litinsky I, Caspi D, Autoantibodies profile of rheumatoid arthritis patients during treatment with infliximab. *Autoimmunity.* 2005. 38 : 155-160.
- [14] Takahashi H, Kato K, Miyake K, Hirai Y, Yoshino S, Shimada T, Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Rheumatol.* 2005. 23 : 455-461.
- [15] Honda A, Ametani A, Matsumoto T, Kaminogawa S, Suppression of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice by preimmunization with house dust mite extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001. 65 : 1063-1070.
- [16] Yoshikawa M, Nishida N, Shimoda H, Takada M, Kawahara Y, Matsuda H, [Polyphenol constituents from *Salacia* species: quantitative analysis of mangiferin with alpha-glucosidase and aldose reductase inhibitory activities]. *Yakugaku Zasshi.* 2001. 121 : 371-8.
- [17] Ratnasooriya WD, Jayakody JR, Premakumara GA, Adverse pregnancy outcome in rats following exposure to a *Salacia reticulata* (Celastraceae) root extract. *Braz J Med Biol Res.*

2003. 36 : 931-935.
- [18] Ozaki S, Oe H, Kitamura S, Alpha-glucosidase inhibitor from Kothala-himbutu (*Salacia reticulata* WIGHT). *J Nat Prod.* 2008. 71 : 981-984.
- [19] Oe H, Ozaki S, Hypoglycemic effect of 13-membered ring thiocyclitol, a novel alpha-glucosidase inhibitor from Kothala-himbutu (*Salacia reticulata*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008. 72 : 1962-1964.
- [20] Yoshikawa M, Murakami T, Yashiro K, Matsuda H, Kotalanol, a potent alpha-glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic ayurvedic medicine *Salacia reticulata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1998. 46 : 1339-1340.
- [21] Yoshikawa M, Morikawa T, Matsuda H, Tanabe G, Muraoka O, Absolute stereostructure of potent alpha-glucosidase inhibitor, Salacinol, with unique thiosugar sulfonium sulfate inner salt structure from *Salacia reticulata*. *Bioorg Med Chem.* 2002. 10 : 1547-1554.
- [22] Im R, Mano H, Matsuura T, Nakatani S, Shimizu J, Wada M, Mechanisms of blood glucose-lowering effect of aqueous extract from stems of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) in the mouse. *J Ethnopharmacol.* 2009. 121 : 234-240.
- [23] Kumar Vijaya, Systems and National Experiences for Protecting Traditional Knowledge, Innovations and Practices – Sri Lanka. UNCTAD Expert Meeting on Systems and National Experiences for Protecting Traditional Knowledge. Innovations and Practices. 2000
- [24] Kasukawa R, Shio K, Kanno Y, Sato A, Takahashi A, Yamadera Y, Kanno T, Doppler

- ultrasonographic characteristics of superficial and deep-flow signals in the knee joint
pannus of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007. 66 : 707-708.
- [25] McInnes IB, Liew FY, Gracie JA, Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid
arthritis? *Arthritis Res Ther.* 2005. 7 : 38-41.
- [26] Takayanagi H, J. T., Miyazaki T, Iizuka H, Takahashi T, Isshiki M, Okada M, Tanaka Y,
Koshihara Y, Oda H, Kurokawa T, Nakamura K, Tanaka S, Suppression of arthritic bone
destruction by adenovirus-mediated csf gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin
Invest.* 1999. 104 : 137-146.
- [27] Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, Luszczkiewicz G, Wiland P,
Dziewczopolski W, Filipowicz-Sosnowska A, Pazdur J, Szechinski J, Kowalczewski J,
Rell-Bakalarska M, Maslinski W, High levels of osteoprotegerin and soluble receptor
activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their
normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum.* 2002. 46 :
1744-1753.
- [28] Lewandowicz J, Dabkowska B, Nowak D, Influence of gold salts treatment on the serum
concentration of IL-1 and IL-2 in patients with rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther
Exp (Warsz).* 1995. 43 : 195-198.
- [29] Furst DE, Dromgoole SH, Desiraju RK, Paulus HE, Clinical pharmacology of tolmetin :
comparisons in rheumatoid arthritis patients and normal volunteers. *J Clin Pharmacol.* 1983.

23 : 329-335.

- [30] Kim WU, Kim KJ, T cell proliferative response to type II collagen in the inflammatory process and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005. 32 : 225-230.
- [31] Szyper-Kravitz M, The hemophagocytic syndrome/macrophage activation syndrome: a final common pathway of a cytokine storm. *Isr Medr Assoc J.* 2009. 11 : 633-634.
- [32] Niikura K, Nakajima S, Takano M, Yamazaki H, FR177995, a novel vacuolar ATPase inhibitor, exerts not only an inhibitory effect on bone destruction but also anti-immunoinflammatory effects in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone.* 2007. 40 : 888-894.
- [33] Kamata K, Kamijo S, Nakajima A, Koyanagi A, Kurosawa H, Yagita H, Okumura K, Involvement of TNF-like weak inducer of apoptosis in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006. 177 : 6433-6439.
- [34] Chia WT, Chen YW, Cheng LY, Lee HS, Chang DM, Sytwu HK, MMP-9 mRNA as a therapeutic marker in acute and chronic stages of arthritis induced by type II collagen antibody. *J Formos Med Assoc.* 2008. 107 : 245-252.
- [35] Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, Mizutani N, Brand DD, Waritani T, Terato K, Yoshino S, Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. *J Immunol Methods.* 2009. 343 :

49-55.

- [36] Boissier MC, Feng XZ, Carlioz A, Roudier R, Fournier C, Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann Rheum rDis.* 1987. 46 : 691-700.
- [37] Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y, Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology.* 2004. 145 : 2384-2391.
- [38] Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Toyama Y, Matsumoto H, Fujikawa K, Tada N, Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Immunol.* 2004. 172 : 577-584.
- [39] Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K, IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2007. 179 : 7128-7136.
- [40] Waage A, Kaufmann C, Espevik T, Husby G, Interleukin-6 in synovial fluid from patients with arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989. 50 : 394-398.
- [41] Macías I, García-Pérez S, Ruiz-Tudela M, Medina F, Chozas N, Girón-González JA, Modification of pro- and antiinflammatory cytokines and vascular-related molecules by tumor necrosis factor-a blockade in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005.

32 : 2102-2108.

- [42] Chia WT, Yeh LT, Chen YW, Lee HS, Chang DM, Sytwu HK, IL-1beta in irrigation fluid and mRNA expression in synovial tissue of the knee joint as therapeutic markers of inflammation in collagen antibody-induced arthritis. *Dis Markers*. 2009. 26 : 1-7
- [43] Adam O, Beringer C, Kless T, Lemmen C, Adam A, Wiseman M, Adam P, Klimmek R, Forth W, Anti-inflammatory effects of a low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2003. 23 : 27-36.
- [44] Arai K, Yamamura S, Seki S, Hanyu T, Takahashi HE, Abo T, Increase of CD57+ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication for an anti-inflammatory role. *Clin Exp Immunol*. 1998. 111 : 345-352.
- [45] Caulfield JP, Hein A, Helfgott SM, Brahn E, Dynesius-Trentham RA, Trentham DE, Intraarticular injection of arthritogenic factor causes mast cell degranulation, inflammation, fat necrosis, and synovial hyperplasia. *Lab Invest*. 1988. 59 : 82-95.
- [46] Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, Kim GJ, Oh GT, Yoon DY, Hong JT, Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum*. 2004. 50 : 3504-3515.
- [47] Kitano M, Hla T, Sekiguchi M, Kawahito Y, Yoshimura R, Miyazawa K, Iwasaki T, Sano H, Saba JD, Tam YY, Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling

- in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis Rheum.* 2006. 54 : 742-753.
- [48] Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Chaturvedi VP, Das HR, Expression of TNF-alpha and related signaling molecules in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Mediators Inflamm.* 2006. 2006 : 12682.
- [49] Deon D, Ahmed S, Tai K, Scaletta N, Herrero C, Lee IH, Krause A, Ivashkiv LB, Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2001. 167 : 5395-5403.
- [50] Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Mascheretti-Croucher S, Croucher PJ, Schäfer H, Scheurich P, Seegert D, Schreiber S, The Met-196 Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression. *J Biol Chem.* 2005. 280 : 5994-6004.
- [51] Ahn JK, Koh EM, Cha HS, Lee YS, Kim J, Bae EK, Ahn KS, Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2008. 47 : 834-839.
- [52] Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P, Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008. 47 : 1299-1310.
- [53] Newton SM, Mackie SL, Martineau AR, Wilkinson KA, Kampmann B, Fisher C, Dutta S,

- Levin M, Wilkinson RJ, Pasvol G, Reduction of chemokine secretion in response to mycobacteria in infliximab-treated patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2008. 15 : 506-512.
- [54] Sennels H, Sørensen S, Ostergaard M, Knudsen L, Hansen M, Skjødt H, Peters N, Colic A, Grau K, Jacobsen S, Circulating levels of osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, and high-sensitivity C-reactive protein in patients with active rheumatoid arthritis randomized to etanercept alone or in combination with methotrexate. *Scand J Rheumatol.* 2008. 37 : 241-247.
- [55] Jones G, The AMBITION trial: tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010. 6 : 189-195.
- [56] Levälampi T, Korpela M, Vuolteenaho K, Moilanen E, Infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies in clinical practice: adverse events and other reasons for discontinuation of treatment. *Scand J Rheumatol.* 2008. 37 : 6-12.
- [57] Mur E, Hartiq F, Eibl G, Schirmer M, Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002. 29 : 678-681.
- [58] Tao X, Cai JJ, Lipsky PE, The identity of immunosuppressive components of the ethyl acetate extract and chloroform methanol extract (T2) of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995. 272 : 1305-1312.
- [59] Suh SJ, Yun WS, Kim KS, Jin UH, Kim JK, Kim MS, Kwon DY, Kim CH, Stimulative

- effects of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Ethnopharmacol.* 2007. 109 : 480-485
- [60] Adolfsson L, Nylander G, Arthroscopic synovectomy of the rheumatoid wrist. *J Hand Surg Br.* 1993. 18 : 92-96.
- [61] Chikura B, Sathi N, Lane S, Dawson JK, Variation of immunological response in methotrexate-induced pneumonitis. *Rheumatology (Oxford).* 2008. 47 : 1647-50.
- [62] Maeda-Hagiwara M, Watanabe K, Aggravating effect of ergometrine on pyloric antral lesions in indomethacin-treated animals and stimulating effect of this drug on gastric secretion. *Jpn J Pharmacol.* 1981. 31 : 891-896.
- [63] Thamer M, Hernán MA, Zhang Y, Cotter D, Petri M, Prednisone, lupus activity, and permanent organ damage. *J Rheumatol.* 2009. 36 : 560-564.
- [64] López Galera RM, Ribera Pascuet E, Esteban Mur JI, Montro Ronsano JB, Juárez Giménez JC, Interaction between cat's claw and protease inhibitors atazanavir, ritonavir and saquinavir. *Eur J Clin pharmacol* 2008. 64 : 1235-1236
- [65] Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Nonhormonal drugs for contraception in men: A systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2005, 60 : 746-752
- [66] Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M, Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009. 17 : 1620-1627

- [67] Seo HJ, Sung YK, Choi CB, Lee EB, Cheong C, Kim SY, Park JA, Bae SC, Prevalence and factors affecting glucosamine use in Korea: a survey-based study. *Rheumatol Int.* 2011 [Epub ahead of print]
- [68] Sekiguchi Y, Mano H, Nakatani S, Shimizu J, Wada M, Effects of the Sri Lankan medicinal plant, *Salacia reticulata*, in rheumatoid arthritis. *Genes Nutr.* 2010. 5 : 89-96.
- [69] Humbría A, Díaz-González F, Campanero MR, Arroyo AG, Laffón A, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F, Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evidence for a soluble form of L-selectin in synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 1994. 37 : 342-348.
- [70] Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T, Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* 1994. 93 : 1095-1101.
- [71] 寺戸国昭, マウスのコラーゲン関節炎 (CIA)とコラーゲン抗体関節炎 (CAIA). *分子リウマチ* 2005. 1 : 261-268.
- [72] Mori H, Kitazawa R, Mizuki S, Nose M, Maeda S, Kitazawa S, RANK ligand, RANK, and OPG expression in type II collagen-induced arthritis mouse. *Histochem Cell Biol.* 2002. 117 : 283-292.
- [73] Riquet FB, Lai WF, Birkhead JR, Suen LF, Karsenty G, Goldring MB, Suppression of type I collagen gene expression by prostaglandins in fibroblasts is mediated at the transcriptional

- level. *Mol Med.* 2000. 6 : 705-719.
- [74] Watanabe S, Imagawa T, Boivin GP, Gao G, Wilson JM, Hirsch R, Adeno-associated virus mediates long-term gene transfer and delivery of chondroprotective IL-4 to murine synovium. *Mol Ther.* 2000. 2 : 147-152.
- [75] Imada K, Lin N, Liu C, Lu A, Chen W, Yano M, Sato T, Ito A, Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008. 373 : 181-185.
- [76] Miller MC, Manning HB, Jain A, Troeberg L, Dudhia J, Essex D, Sandison A, Seiki M, Nanchahal J, Nagase H, Itoh Y, Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009. 60 : 686-697.
- [77] van der Laan WH, Quax PH, Seemayer CA, Huisman LG, Pieterman EJ, Grimbergen JM, Verheijen JH, Breedveld FC, Gay RE, Gay S, Huizinga TW, Pap T, Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther.* 2003. 10 : 234-242.
- [78] Toh ML, Marotte H, Blond JL, Jhumka U, Eljaafari A, Mouglin B, Miossec P, Overexpression of synoviolin in peripheral blood and synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and continued elevation in nonresponders to infliximab treatment. *Arthritis Rheum.* 2006. 54 : 2109-2118.

- [79] Toh ML, Gonzales G, Koenders MI, Tournadre A, Boyle D, Lubberts E, Zhou Y, Firestein GS, van den Berg WB, Miossec P, Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression. *PLoS One*. 2010. 5 : e13416.
- [80] Bischof RJ, Zafiroopoulos D, Hamilton JA, Campbell IK, Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2000. 119 : 361-367.
- [81] Yao Q, Wang S, Gambotto A, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Oligino TJ. Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium. *Gene Ther*. 2003. 10 : 1055-1060.
- [82] Grandolfo M, Calabrese A, D'Andrea P, Mechanism of mechanically induced intercellular calcium waves in rabbit articular chondrocytes and in HIG-82 synovial cells. *J Bone Miner Res*. 1998. 13 : 443-453.
- [83] Parada-Turska J, Mitura A, Brzana W, Jabłoński M, Majdan M, Rzeski W, Parthenolide inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes in vitro. *Inflammation*. 2008. 31 : 281-285.
- [84] Lizarraga D, Lozano C, Briedé JJ, van Delft JH, Touriño S, Centelles JJ, Torres JL, Cascante M, The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative

- properties of procyanidin-rich natural extracts. FEBS J. 2007. 274 : 4802-4811.
- [85] Beara IN, Lesjak MM, Jovin ED, Balog KJ, Anackov GT, Orcić DZ, Mimica-Dukić NM, Plantain (*Plantago L.*) species as novel sources of flavonoid antioxidants. J Agric Food Chem. 2009. 57 : 9268-9273.
- [86] Hanawa F, Fokialakis N, Skaltsounis AL, Photo-activated DNA binding and antimicrobial activities of furoquinoline and pyranoquinolone alkaloids from rutaceae. Planta Med. 2004. 70 : 531-535.
- [87] Stratil P, Klejdus B, Kubán V, Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables--evaluation of spectrophotometric methods. J Agric Food Chem. 2006. 54 : 607-616.
- [88] Navarro-Perán E, Cabezas-Herrera J, Sánchez-Del-Campo L, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN, The anti-inflammatory and anti-cancer properties of epigallocatechin-3-gallate are mediated by folate cycle disruption, adenosine release and NF-kappaB suppression. Inflamm Res. 2008. 57 : 472-478.
- [89] Wan SB, Chen D, Dou QP, Chan TH, Study of the green tea polyphenols catechin-3-gallate (CG) and epicatechin-3-gallate (ECG) as proteasome inhibitors. Bioorg Med Chem. 2004. 12 : 3521-3527.
- [90] Buxton ND, Kaiser RA, Buxton IL, Vascular actions of the polyphenolic catechin gallate EGCG: endothelium-dependent contraction and relaxation. Proc West Pharmacol Soc.

2003. 46 : 37-38.
- [91] Yoshikawa M, Shimoda. H., Nishida N, Takada M, Matsuda H, Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. J Nutr. 2002. 132 : 1819-1824.
- [92] Sanugul K, Akao T, Li Y, Kakiuchi N, Nakamura N, Hattori M, Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. Biol Pharm Bull. 2005. 28 : 1672-1678.
- [93] Feng J, Yang XW, Wang RF, Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of Aquilaria sinensis. Phytochemistry. 2011. 72 : 242-247.
- [94] Matsuda H, Murakami T, Yashiro K, Yamahara J, Yoshikawa M, Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from the roots of Salacia oblonga Wall. (Celastraceae): structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1999. 47 : 1725-1729.
- [95] Kuo YH, Huang HC, Chiou WF, Shi LS, Wu TS, Wu YC, A novel NO-production-inhibiting triterpene and cytotoxicity of known alkaloids from Euonymus laxiflorus. J Nat Prod. 2003. 66 : 554-557.
- [96] Zhang WY, Liu HQ, Xie KQ, Yin LL, Li Y, Kwik-Urbe CL, Zhu XZ, Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in

- endotoxin-treated monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. 345 : 508-515.
- [97] Tang LQ, Wei W, Wang XY, Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats. *Adv Ther.* 2007. 24 : 679-690.
- [98] Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F, Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2004. 173 : 5794-5800.
- [99] Boschmann M, Thielecke F, The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. *J Am Coll Nutr.* 2007. 26 : 389S-395S.
- [100] Cho KN, Sukhthankar M, Lee SH, Yoon JH, Baek SJ, Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumour suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. *Eur J Cancer.* 2007. 43 : 2404-2412.
- [101] Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM, Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol.* 1992. 148 : 2103-2108.
- [102] Morishita K, S. A., Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, Kamiya T, The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr.* 2001. 131 : 3182-3188.
- [103] Quattrocchi E, D. M., Feldmann M, Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA-4Ig fusion protein in the suppression of experimental autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000. 43 :

1688-1697.

- [104] Honda T, S.N. E., Miyachi Y, Narumiya S, Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 2006. 203 : 325-335.
- [105] Zuo Y, Chen H, Deng Y, Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta.* 2002. 57 : 307-316.