

温泉科学

第 68 卷 第 3 号

日本温泉科学会第 71 回大会号

平成 30 年 12 月

巻 頭 言

温泉科学における数学の役割.....	鏡 裕行	127
日本温泉科学会第 71 回大会概要.....	由佐悠紀	128

日本温泉科学会第 71 回大会

公開講演

I 別府温泉地球博物館・フィールド博物館と大分のジオパーク.....	竹村恵二	136
II 温泉の日本史と別府.....	石川理夫	141

特別賞受賞講演

近畿地方の高温・高塩分の温泉の研究の進め方.....	西村 進	149
----------------------------	------	-----

特別講演

I 青色片岩は有馬型熱水の起源.....	平島崇男	159
II スラブ脱水流体由来の温泉—地球流体化学的手法による研究—.....	大沢信二	168
III 表層電気伝導度分布から見る中部九州の温泉と火山.....	鍵山恒臣	176
IV 「おおいた温泉基本計画」について.....	徳丸聖久	187

報 告

温泉浴槽水の消毒における電解次亜塩素酸水の利用.....	古畑勝則, 安齋博文, 李 新一, 石崎直人	193
------------------------------	------------------------	-----

解 説

別府温泉由来微細藻類 <i>Mucidosphaerium</i> sp. RG92 株の抗炎症作用.....	宮田光義, 岩田俊祐, 御筆千絵, 加世田国与士	204
炎症性関節炎におけるミトコンドリアの調節と微細藻類 <i>Mucidosphaerium</i> sp. RG92 抽出物の抑制効果.....	宮田光義, 御筆千絵, 加世田国与士	216

学 会 記 事

会 告.....		224
2019 (平成 31 年) 年度日本温泉科学会第 72 回大会案内.....		226
		227



一般社団法人
日本温泉科学会



解 説

別府温泉由来微細藻類 *Mucidosphaerium* sp.
RG92 株の抗炎症作用

宮田光義¹⁾, 岩田俊祐¹⁾, 御筆千絵¹⁾, 加世田国与士^{1)*}

(平成 30 年 7 月 17 日受付, 平成 30 年 10 月 30 日受理)

Anti-inflammatory Effect of a Microalga *Mucidosphaerium* sp.
(Strain RG92 Derived from Beppu Hot Spring

Mitsuyoshi MIYATA¹⁾, Shunsuke IWATA¹⁾, Chie K. MIFUDE¹⁾
and Kuniyoshi KASEDA^{1)*}

Abstract

Hot spring therapy is occasionally utilized for the treatment of inflammatory diseases, including atopic dermatitis, psoriasis, rheumatoid arthritis, and so on. Microorganisms could contribute to the anti-inflammatory functions, as seen in thermal mud therapies. In search of useful microorganisms for the beauty and health care, we have explored hot springs in Beppu, Oita, Japan and discovered a green alga *Mucidosphaerium* sp. strain RG92. Here we explain anti-inflammatory activities of strain RG92 in both cutaneous and articular cells.

The extract of the microalgal strain down-regulated the gene expression level of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α in primary dermal fibroblasts (DF), dermal papilla cells and fibroblast-like synoviocytes (FLS) pre-exposed to IL-1 β . The protein levels of the risk factors were concomitantly reduced. In addition, the algal extract suppressed the IL-1 β -induced up-regulation of cyclooxygenase-2, nerve growth factor, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and MMP-3 in DF, whereas inhibited MMP-1, -3 and -9 and proliferation activity in FLS. Moreover, the microalgal extract attenuated MMP activities in IL-1 β -stimulated DF and FLS. Finally, the strain RG92 extract decreased the level of reactive oxygen species in DF and FLS with an antioxidant activity of $178.3 \pm 0.9 \mu\text{mol trolox equivalent/g}$.

In conclusion, the present study showed that the extract of *Mucidosphaerium* sp. strain RG92, derived from Beppu hot spring, suppresses inflammatory reactions in both cutaneous and articular cells, partly due to its antioxidative properties. The algal strain shall be a useful tool as the treatment for skin and joint inflammatory disorders.

Key words : hot spring therapy, *Mucidosphaerium* sp. strain RG92, anti-inflammatory effect, reactive oxygen species, dermatitis, arthritis

¹⁾株式会社サラヴィオ化粧品 サラヴィオ中央研究所 〒874-0842 大分県別府市大字鶴見 1356-6. ¹⁾Saravio Central Institute, Saravio Cosmetics Ltd., 1356-6 Oaza Tsurumi, Beppu, Oita, 874-0842, Japan.

*Corresponding author : E-mail kaseda@saravio.jp, TEL : 0977-75-8575, FAX : 0977-75-8112.

要 旨

温泉療法は関節炎や皮膚疾患などの炎症性疾患の治療に有用であるという報告がある。温泉には多様な微生物が生息しており、炎症を抑える成分を産生する微生物も見出されている。我々は、別府温泉において有用微生物の単離・探索を繰り返し、緑藻 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株を含むいくつかの温泉微生物を発見した。今回は、RG92 株抽出物の皮膚および関節細胞における抗炎症作用について解説する。

RG92 株抽出物はインターロイキン 1 β (IL-1 β) で刺激した真皮線維芽細胞 (DF)、毛乳頭細胞、滑膜線維芽細胞 (FLS) のいずれにおいても IL-1 β や IL-6、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) といった様々な炎症疾患に関わる炎症性サイトカインの遺伝子およびタンパク質の発現を抑制した。DF においては、皮膚の掻痒やシワに関わるシクロオキシゲナーゼ-2、神経成長因子、マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP-1)、MMP-3 の発現や MMP 酵素活性の抑制も認められた。また、FLS では、RG92 株抽出物は関節炎に関与する MMP-1、MMP-3、MMP-9 の発現やこれらの酵素活性、細胞増殖活性を減少させた。さらに、同抽出物の活性酸素種 (ROS) 消去活性は $178.3 \pm 0.9 \mu\text{mol trolox equivalent/g}$ であり、実際に細胞内の ROS 量を低下させた。

以上のことから、緑藻 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株の抽出物は ROS と種々の炎症メディエーターを介して皮膚や関節細胞の炎症反応を抑えることが考えられ、炎症性疾患の予防・改善に有用であることが示唆された。

キーワード：温泉療法、緑藻 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株、抗炎症作用、活性酸素種、皮膚炎、関節炎

1. はじめに

温泉療法によりアトピー性皮膚炎、乾癬、関節リウマチなどの炎症性疾患の症状が緩和されることが知られている (Nasermoaddeli and Kagamimori, 2005 ; Matz *et al.*, 2003)。これらの効果には、温泉の化学的作用や物理的作用が関与するという報告もあるが、温泉には多種多様な微生物が生息することが確認されており、それらが温泉の効果効能の一部を担う抗炎症作用を有する可能性も示唆されている (Matz *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2013)。

イタリアのアバノ市の温泉泥 (ファンゴ) からは、ラン藻 (シアノバクテリア) の一種である *Phormidium* sp. ETS-05 株が単離されており、それが産生する成分はファンゴの主な薬理効果である抗炎症作用を有することが報告されている (Bruno *et al.*, 2005 ; Ulivi *et al.*, 2011)。ETS-05 株から得られるモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) やジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) 等の糖脂質は、マウスの炎症性浮腫を抑制する (Bruno *et al.*, 2005)。この MGDG は、軟骨細胞において、15-デオキシ- Δ 12,14-プロスタグランジン J₂ (15-デオキシ- Δ 12,14-PGJ₂) の産生を介した抗炎症機構により、発痛増強物質である PGE₂ の産生および炎症関連因子のインターロイキン 6 (IL-6)、IL-8 の発現を抑制すると報告されている (Ulivi *et al.*, 2011)。台湾の陽明山温泉地帯からは、*Aspergillus terreus* が発見された。この真菌から同定された新規メロテルペノイド yaminterritrem B は、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 において PGE₂ の合成に関与するシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を抑制することが報告されているが、作用機序は明確になっていない (Liaw *et al.*, 2015)。

活性酸素種 (ROS) は、セカンドメッセンジャーとして炎症性疾患における炎症反応を悪化させる (Filippin *et al.*, 2008)。カロテノイドや糖脂質等の抗酸化成分は細胞内 ROS 量を減少させることにより、核内因子 κ B (NF- κ B) を介して炎症関連因子の発現を抑制することが知られている (Kim *et al.*, 2008 ; Ishii *et al.*, 2017)。いくつかの温泉由来の微生物はこのような抗酸化成分を含有することが知られているが (Hirayama and Kishida, 1991 ; Sato and Moriyama, 2007)、これらの抽出物や単離成分の抗炎症作用は検証されていない。以上のことから、温泉由来微生物の抗炎症作用や有

効成分, 作用メカニズムに関する包括的な研究は緒に就いたばかりであると言える。

我々の研究拠点である大分県別府市は, 源泉数で世界一を誇り, 療養泉の種類も豊富である (Tsukamoto, 2014). この恵まれた温泉資源を美容と健康の増進に活用するため, 別府市内の温泉に生息する微生物に着目し, 単離・探索した結果, 微細藻類 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株を発見した (Miyata *et al.*, in press). 本稿では, 皮膚や関節の細胞における RG92 株抽出物の薬理作用について解説し, これまでに報告されている温泉微生物との違いや今後の課題を検討した. なお以下の本文中, 当該藻類を単に RG92 と呼ぶ.

2. *Mucidosphaerium* sp. RG92 株の同定

別府市内の温泉 (泉質: ナトリウム-塩化物泉) から, Closterium 寒天培地でコロニーの形成・採取を繰り返し行うことにより RG92 を単離した. 18S リボソーム RNA 遺伝子の DNA シークエンスと BLAST 解析から, RG92 は緑藻 *Dictyosphaerium pulchellum* (相同率 99.39%, アセッション番号 GQ487248) と最も相同性が高いことが判明した. *Dictyosphaerium* 属の一部は, Bock ら (2011) によってクロレラ目クロレラ科 *Mucidosphaerium* 属に再編成された. RG92 は緑色で丸型をした単細胞の緑藻類であり, 直径は $5.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ で (図 1), 前報の *Mucidosphaerium* 属の特徴と一致していた (Bock *et al.*, 2011). 以上, 遺伝子解析と形態学的観察の結果から, RG92 は緑藻 *Mucidosphaerium* sp. と結論づけた (Miyata *et al.*, in press).

3. 皮膚細胞における抗炎症作用

IL-1 β , IL-6, TNF- α 等の炎症性サイトカインは炎症を引き起こし, アトピー性皮膚炎や円形脱毛症といった炎症性疾患の発症や悪化に関与している (Kasraie and Werfel, 2013; Gregoriou *et al.*, 2010). 皮膚や毛髪における RG92 抽出物の抗炎症作用を検証するために, IL-1 β で刺激したヒト真皮線維芽細胞 (DF) あるいはヒト頭髪毛乳頭細胞 (DPC) を用いて, 炎症性サイトカインの mRNA レベルをリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) で定量した. DF を IL-1 β で処理すると, IL-1 β , IL-6, TNF- α の mRNA レベルは顕著に増加した. RG92 のエタノール抽出物は, この過剰な遺伝子発現をそれぞれ 66.8%, 26.1%, 88.3% 抑制した (図 2A). 酵素結合免疫測定法 (ELISA) を用いて細胞から培養液中に分泌されるサイトカインのタンパク質量を測定したところ, 同抽出物はタンパク質レベルにおいても過剰発現した IL-6 と TNF- α の量を減少させることがわかった (図 2B). DPC においても, 同様の結果が得られた (図 3A, 3B). これらの結果から, RG92 抽出物は炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑えることで, 皮膚に関する様々な炎症性疾患を予防・改善することが期待される.

上記に示した炎症性サイトカインは, COX-2, 神経成長因子 (NGF), マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 等の炎症関連因子を誘導し, 皮膚に異常をきたすことが知られている (Tominaga and Takamori, 2013; Bakry *et al.*, 2015; Pillai *et al.*, 2005). RG92 抽出物がこれらの炎症関連因子に及ぼす影響を確認するために, DF においてこれらの因子の

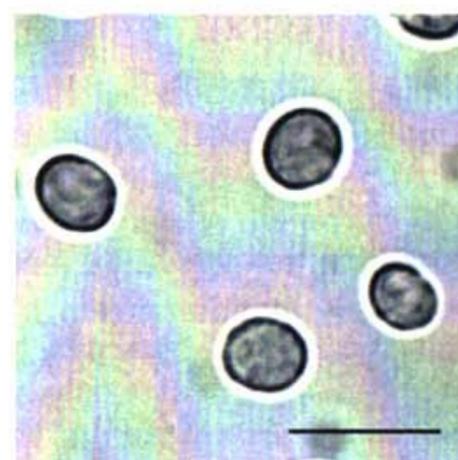


図 1 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株の光学顕微鏡像
RG92 株は直径が $5.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ の丸型で, 緑色の微細藻類である. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. (Miyata ら (in press) の文献より一部改変して引用)

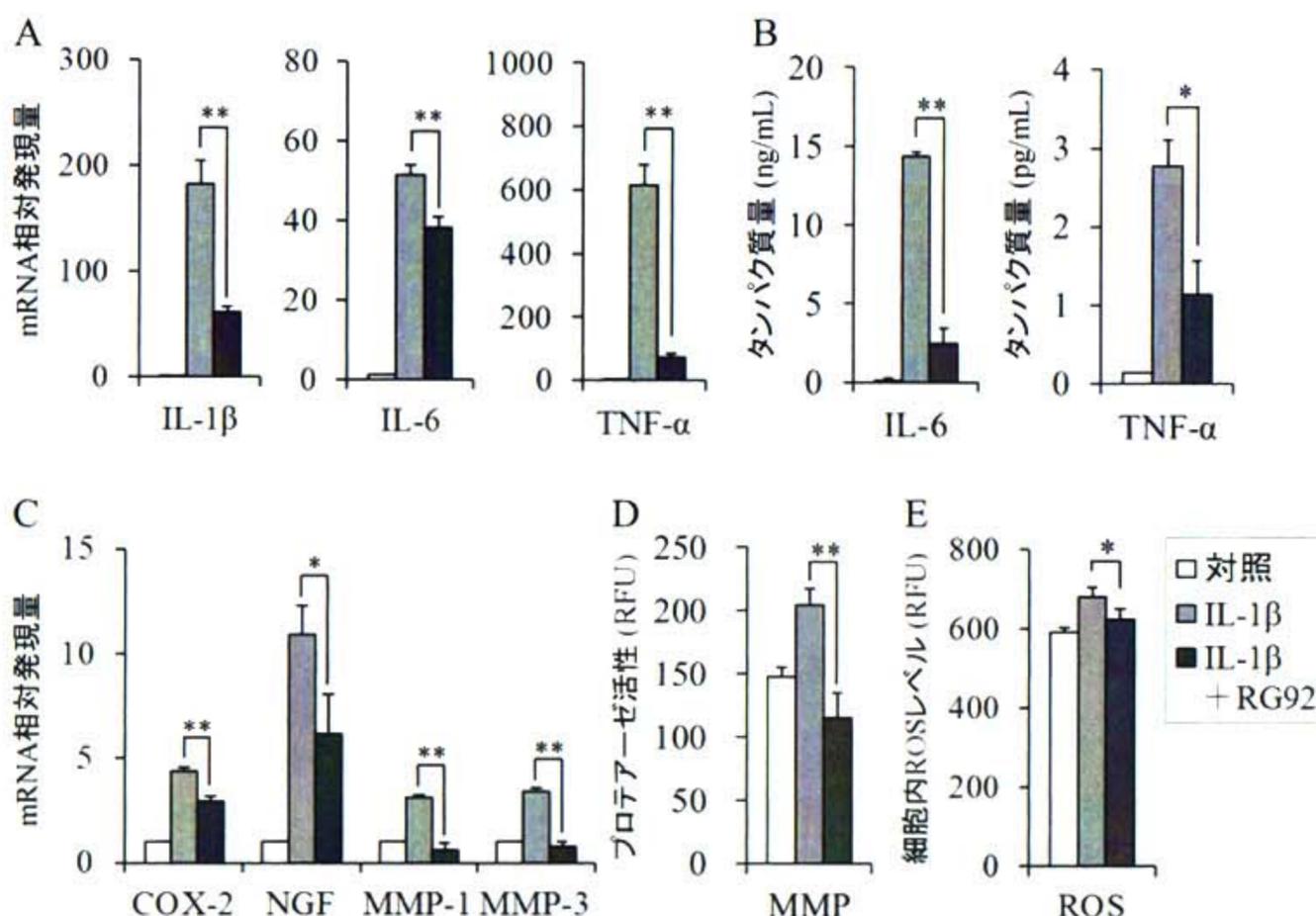


図 2 真皮線維芽細胞における *Mucidosphaerium* sp. RG92 株抽出物の抗炎症・抗酸化作用

(A) 炎症性サイトカイン mRNA の発現抑制 IL-1 β で細胞を刺激すると、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の mRNA が過剰に誘導される。この条件下における各 mRNA の発現に対する RG92 抽出物の効果を示す。縦軸は対照群の発現量を 1 とするときの mRNA 相対発現量を表す。(B) 炎症性サイトカインタンパク質の発現抑制 IL-1 β 刺激により、培養上清中に分泌される炎症性サイトカインのタンパク質量が増加する。この過剰なタンパク質の発現に及ぼす本抽出物の影響を示す。(C) 炎症関連因子 mRNA の発現抑制 IL-1 β の刺激で増加する炎症関連因子 (COX-2, NGF, MMP-1, MMP-3) の mRNA 発現に対する同抽出物の効果を示す。縦軸は対照群の発現量を 1 とするときの mRNA 相対発現量を表す。(D) MMP 酵素活性の抑制 IL-1 β 処理で培養上清中に過剰分泌される MMP のプロテアーゼ活性に対する本抽出物の効果を示す。(E) 細胞内 ROS 量の抑制 IL-1 β 処理で過剰に発生する細胞内 ROS に対する RG92 抽出物の効果を示す。白、灰、黒色の棒グラフはそれぞれ対照、IL-1 β 、IL-1 β +RG92 抽出物を示し、各値は平均値 \pm 標準偏差で表す (n=3)。*, p<0.05; **, p<0.005。(Miyata ら (in press) の文献より一部改変して引用)

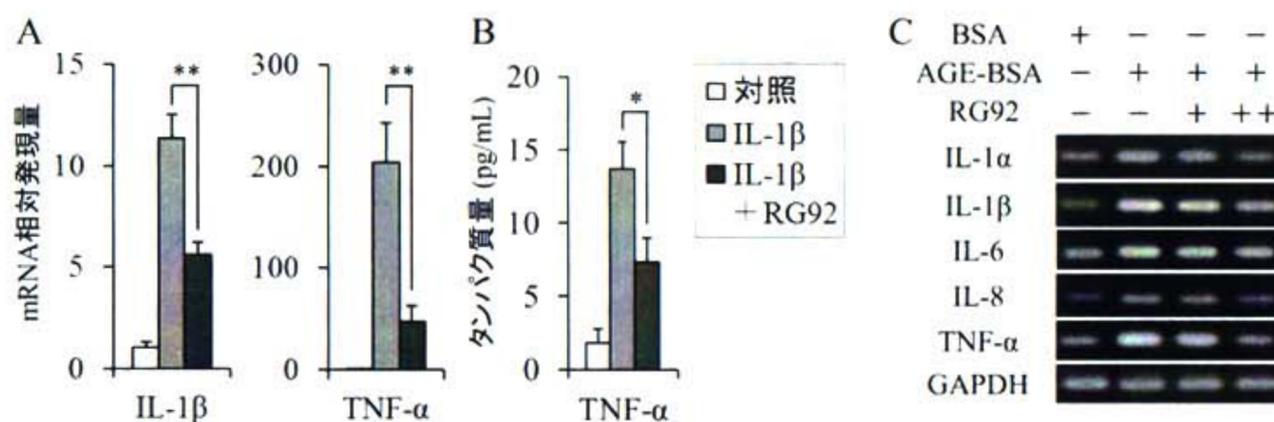


図 3 毛乳頭細胞における *Mucidosphaerium* sp. RG92 株抽出物の抗炎症作用

(A) 炎症性サイトカインの mRNA 発現抑制 IL-1 β で細胞を刺激すると、脱毛に関連する炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) の mRNA が過剰に誘導される。この条件下におけるこれらの mRNA の発現に対する RG92 抽出物の効果を示す。縦軸は対照群の発現量を 1 とするときの mRNA 相対発現量を表す。(B) 炎症性サイトカインタンパク質の発現抑制 IL-1 β の刺激により、培養上清中に分泌される TNF- α のタンパク質量が増加する。この過剰なタンパク質の発現に及ぼす本抽出物の影響を示す。白、灰、黒色の棒グラフはそれぞれ対照、IL-1 β 、IL-1 β +RG92 抽出物を示し、各値は平均値 \pm 標準偏差で表す (n=3)。*, p<0.05; **, p<0.005。(C) 終末糖化産物 AGEs によって誘導される炎症性サイトカインの mRNA 発現抑制 半定量的 PCR 法で得られた目的遺伝子産物の増幅パターン。AGE-BSA の処理で増加する炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) の mRNA 発現に対する同抽出物の効果を示す。(Miyata ら (in press) の文献より一部改変して引用)

mRNA レベルを測定した。本抽出物は、IL-1 β で過剰に誘導された COX-2 の mRNA の発現を 41.2% 減少させた (図 2C)。DNA マイクロアレイ解析では、PGE2 を合成する PGE 合成酵素の発現が 23.3% 抑制されることも確認した (Miyata *et al.*, in press)。これらのことから、RG92 抽出物はアラキドン酸カスケードにおいて COX-2 や PGE 合成酵素の発現を抑制することにより、PGE2 の産生を抑え、掻痒や疼痛を軽減することが推察される。また、同抽出物はアトピー性皮膚炎の掻痒増強因子として知られている NGF の mRNA レベルを 47.9% 低下させた (図 2C)。さらに、皮膚の弾力成分であるコラーゲン等を分解する MMP-1 および MMP-3 の mRNA の過剰発現をほぼ完全に抑制し、MMP 酵素活性も顕著に阻害した (図 2C, 2D)。以上の結果から、RG92 抽出物は、炎症性サイトカインとともに COX-2, NGF, MMP のような炎症関連因子の遺伝子発現を抑制することで、掻痒、疼痛、シワ・タルミ等の皮膚症状の予防や改善に効果的であることが示唆された。

4. 関節細胞における抗炎症作用

関節リウマチは、①滑膜の炎症、②パンヌス形成 (滑膜の肥大化)、③軟骨の分解という 3 段階を経て関節の破壊や機能異常を引き起こす炎症性自己免疫疾患である (Karmakar *et al.*, 2010)。RG92 抽出物の抗炎症作用を検証するために、IL-1 β で刺激した滑膜線維芽細胞 (FLS) における炎症性サイトカインの mRNA レベルを測定した。RG92 抽出物は過剰に増加した IL-1 β , IL-6, TNF- α の mRNA 発現をそれぞれ 93.1%, 64.0%, 85.9% 抑制し、タンパク質レベルにおいても顕著な抑制が確認された (図 4A, 4B)。加えて、同抽出物は IL-1 β 刺激による過剰な FLS の増殖をほぼ完全に抑制した (図 4C)。さらに、II 型コラーゲンやプロテオグリカン等の細胞外マトリックスを分解して軟骨を破壊する酵素 (MMP-1, MMP-3, MMP-9) についても検証した (Rose and Kooyman, 2016)。本抽出物は IL-1 β によって誘導されたこれら分解酵素の mRNA 発現と酵素活性をほぼ完全に抑制した (図 4D, 4E)。以上より、RG92 抽出物は、1) 炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑えることで滑膜の炎症を緩和する、2) FLS の異常増殖を抑えることでパンヌス形成を抑える、3) MMP の遺伝子発現や酵素活性を抑えることで軟骨や骨の分解を阻害する、つまり、関節リウマチの各ステップの進行を防ぐことが期待される。

5. 抗酸化作用

以前、我々は DPC において終末糖化産物 (AGEs) が ROS-NF- κ B 経路を介して炎症性サイトカインの発現を亢進すること、および、抗酸化成分である *N*-アセチルシステインがこの経路を阻害することを見出した (Miyata *et al.*, 2015)。この実験系において、RG92 抽出物に同様の効果が確認されたので (図 3C)、RG92 抽出物は抗酸化作用を介して、抗炎症作用を発揮する可能性が考えられた。

RG92 抽出物の抗酸化活性を確認するために、Cao ら (1993) の方法に従って酸素ラジカル吸収能 (ORAC) の測定を行った結果、本抽出物の ORAC 値は $178.3 \pm 0.9 \mu\text{mol trolox equivalent/g}$ であった (Miyata *et al.*, in press)。現在、美容と健康の分野で広く利用されている微細藻類として緑藻クロレラ属 (*Chlorella*) とラン藻スピルリナ属 (*Spirulina*) がある。*Chlorella vulgaris* と *Spirulina platensis* の抽出物における抗酸化活性はそれぞれ ~ 30 , $\sim 12 \mu\text{mol trolox equivalent/g}$ と報告されており (Agregán *et al.*, 2018)、RG92 抽出物はこれらの微細藻類よりも抗酸化作用が高いと言える。実際に、同抽出物は IL-1 β 刺激により過剰に発生した細胞内 ROS を減少させることが確認された (図 2E, 4F)。従って、RG92 抽出物の抗酸化成分が細胞内に取り込まれて過剰な細胞内 ROS を除

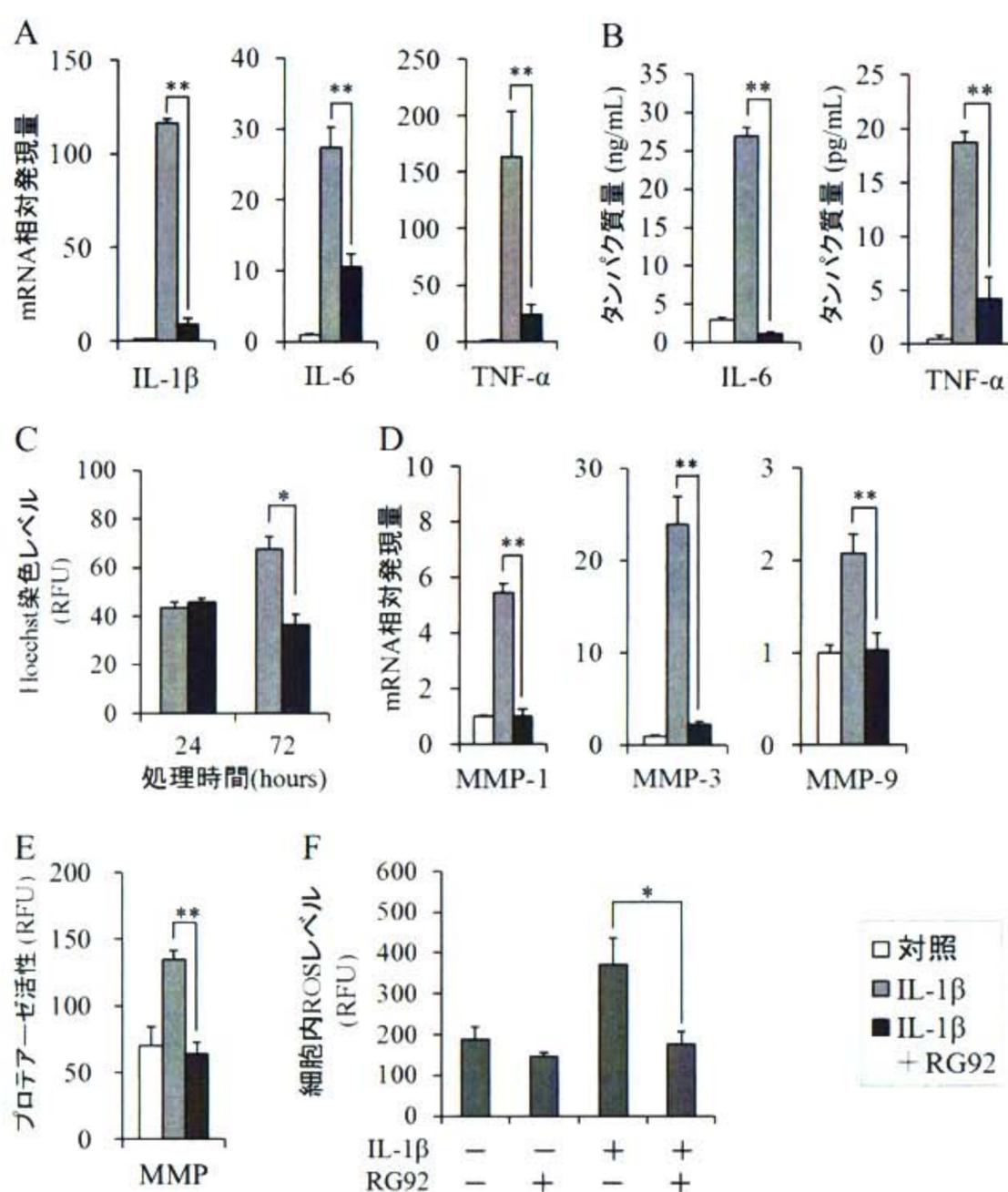


図 4 滑膜線維芽細胞における *Mucidosphaerium* sp. RG92 株抽出物の抗炎症・抗酸化作用
 (A) 炎症性サイトカイン mRNA の発現抑制 IL-1 β で細胞を刺激すると、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の mRNA が過剰に誘導される。この条件下におけるこれらの mRNA 発現に対する RG92 抽出物の効果を示す。縦軸は対照群の発現量を 1 とするときの mRNA 相対発現量を表す。(B) 炎症性サイトカインタンパク質の発現抑制 IL-1 β 刺激で培養上清中に過剰分泌される炎症性サイトカインのタンパク質発現に及ぼす本抽出物の影響を示す。(C) 細胞増殖抑制 IL-1 β 存在下・非存在下において滑膜線維芽細胞数に対する同抽出物の効果を示す。細胞数は Hoechst 試薬で核を染色することにより評価した。(D) MMP mRNA の発現抑制 IL-1 β の刺激で増加する MMP-1, -3, -9 の mRNA 発現に対する同抽出物の効果を示す。縦軸は対照群の発現量を 1 とするときの mRNA 相対発現量で表す。(E) MMP 酵素活性の抑制 IL-1 β 処理で培養上清中に過剰分泌される MMP のプロテアーゼ活性に対する本抽出物の効果を示す。白、灰、黒色の棒グラフはそれぞれ対照, IL-1 β , IL-1 β +RG92 抽出物を表す。(F) 細胞内 ROS 量の抑制 IL-1 β 処理で過剰に発生する細胞内 ROS に対する RG92 抽出物の効果を示す。各値は平均値 \pm 標準偏差で表す (n=3)。*, p<0.05; **, p<0.005. (Miyata ら (in press) の文献より一部改変して引用)

去することが抗炎症作用につながる可能性が示唆された。

6. 考 察

これまでに、薬理作用を示すいくつかの温泉微生物が各地で発見されている (表 1, 2)。抗炎症作用については、上述した *Phormidium* sp. ETS-05 株や *Aspergillus terreus* 以外にも、*Aquaphilus*

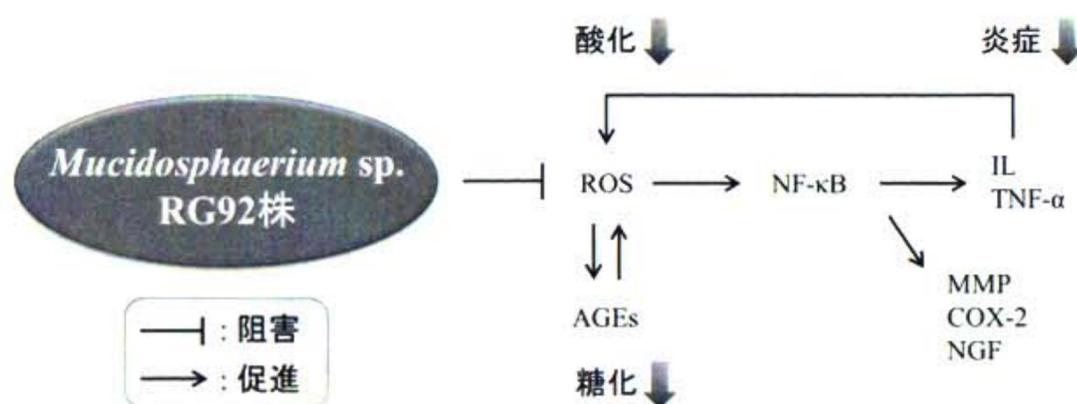


図 5 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株抽出物の作用機序

微細藻類 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株抽出物は炎症・酸化・糖化ストレスにより過剰に発生する細胞内の ROS を除去し, NF-κB の転写活性を阻害する. これにより炎症性サイトカイン (IL-1β, IL-6, TNF-α) や炎症関連因子 (MMP, COX-2, NGF) の遺伝子発現や酵素活性が抑制される.

表 1 抗炎症成分を含有する温泉微生物

温泉微生物名	成分	研究対象	薬理作用	参考文献
<i>Mucidosphaerium</i> sp. RG92株	抽出物 (糖脂質)	DF	IL-1β, -6, TNF-α, NGF, COX-2の発現抑制 MMPの発現・活性抑制 細胞内ROSの減少	Mitaya <i>et al.</i> , in press
		DPC	IL-1, -6, -8, TNF-α の発現抑制	
		FLS	IL-1β, -6, TNF-αの 発現抑制 異常増殖の抑制 MMPの発現・活性抑制 細胞内ROSの減少	
<i>Phormidium</i> sp. ETS-05株	MGDG DGDG SQDG	マウス	炎症性浮腫の抑制	Bruno <i>et al.</i> , 2005
		CC	PGE2の産生抑制 IL-6, -8の発現抑制	Uliivi <i>et al.</i> , 2011
		<i>Aspergillus terreus</i>	yaminterritrem B	RAW264.7
<i>Aquaphilus dolomiae</i>	抽出物	EK	TSLP, IL-4受容体の 発現抑制	Aries <i>et al.</i> , 2016

DF, 真皮線維芽細胞; DPC, 毛乳頭細胞; FLS, 滑膜線維芽細胞; IL, インターロイキン; TNF, 腫瘍壊死因子; NGF, 神経成長因子; COX, シクロオキシゲナーゼ; MMP, マトリックスメタロプロテアーゼ; ROS, 活性酸素種; MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール; DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール; SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール; CC, 軟骨細胞; PG, プロスタグランジン; RAW264.7, マウスマクロファージ様細胞; EK, 表皮ケラチノサイト; TSLP, 胸腺間質性リンパ球新生因子.

表 2 抗酸化成分を含有する温泉微生物

温泉微生物名	成分	薬理作用	参考文献
<i>Thermus filiformis</i>	抽出物	一重項酸素消去	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
	サーモゼアキサンチン	ND	
<i>Rhodothermus marinus</i>	抽出物	ラジカル消去	Ron <i>et al.</i> , 2018
	サリニキサンチン	ND	
<i>Leptolyngbya</i> sp.	抽出物	ラジカル消去	Trabelsi <i>et al.</i> , 2016
	没食子酸		
	フェルラ酸		
	バニリン酸	ND	
	ナリンゲニン カテキン		
<i>Mastigocladus laminosus</i>	MGDG		Hirayama and Kishida, 1991
	DGDG	ND	
	SQDG		
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	MGDG		Sato and Moriyama, 2007
	DGDG	ND	
	SQDG		
<i>Porphyrobacter tepidarius</i> OT3株	ノストキサンチン		Hanada <i>et al.</i> , 1997
	バクテリオルビキサンチン	ND	
	ナール		
<i>Chloracidobacterium</i> <i>thermophilum</i>	エキネノン		Tank and Bryant, 2015
	カンタキサンチン	ND	

MGDG, モノガラクトシルジアシルグリセロール; DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール; SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール; ND, Not determined.

dolomiae の抽出物がアレルギー性炎症に関与する胸腺間質性リンパ球新生因子や IL-4 受容体の発現を抑えることが示されたが、有効成分は特定されていない (Aries *et al.*, 2016)。抗酸化作用に関しては、*Thermus filiformis* のカロテノイド粗抽出物、*Rhodothermus marinus* や *Leptolyngbya* sp. のアルコール抽出物に一重項酸素やラジカルの消去作用が報告されている。抗酸化成分の候補として、サーモゼアキサンチン、サリニキサンチン等のカロテノイド、没食子酸、フェルラ酸、バニリン酸等の有機酸、ナリンゲニン、カテキン等のフラボノイドが同定されている (Mandelli *et al.*, 2012; Ron *et al.*, 2018; Trabelsi *et al.*, 2016)。この他、様々な温泉微生物で糖脂質 (MGDG, DGDG, SQDG) やカロテノイド (ノストキサンチン、バクテリオルビキサンチンナール、エキネノン、カンタキサンチン) などの抗酸化成分として知られる物質が確認されているが、それらの薬理作用は検証されていない (表 2)。

炎症は、さまざまな外部刺激によって引き起こされ、セカンドメッセンジャーとして ROS が深く関与していることが知られている (Filippin *et al.*, 2008)。IL-1 β や TNF- α 等の炎症性サイトカインは、ミトコンドリアの電子伝達系やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼを介して細胞内の ROS 量を増加させることが知られている (Kamata *et al.*, 2005 ;

Rousset *et al.*, 2013). 我々は, FLSにおいて, IL-1 β がミトコンドリアの形態を変調させ, 細胞内 ROS を増加させることを見出し, RG92 抽出物がこのミトコンドリアの形態変調と ROS の過剰な発生を抑制することを確認した (Mifude *et al.*, 2017: 次項参照). 加えて, RG92 抽出物は脂肪細胞において NADPH オキシダーゼの活性を抑えることも確認している (data not shown). したがって, RG92 抽出物は, NADPH オキシダーゼとミトコンドリアの電子伝達系の両方に由来する ROS を抑制すると考えられる. また, 外因性の ROS によって炎症性サイトカインが過剰に分泌されることが知られており (Chen *et al.*, 2010), それらの炎症因子がさらに細胞内 ROS を増加させ, 炎症が悪化する. このような炎症と酸化の悪循環を食い止めることは重要である. 抗炎症作用と抗酸化作用を併せ持つ RG92 抽出物は, 炎症性疾患の効率的な予防・改善に効果的であることが示唆される.

既に, RG92 の糖脂質画分に細胞内 ROS 消去活性や炎症性サイトカインの遺伝子抑制活性があることを見出している (data not shown). 更に, RG92 に含まれる DGDG の量は MGDG よりも多いことを薄層クロマトグラフィー分析で確認した. 一方, 温泉由来のラン藻 *Phormidium* sp. ETS-05 株に含まれる DGDG 量は MGDG よりも少ないことが知られている (Marcolongo *et al.*, 2006). 単細胞の緑藻類である *Clamydomonas* 属や *Chlorella* 属においても同様の報告がされており (da Costa *et al.*, 2016), DGDG を MGDG よりも多く含むことは RG92 の特徴と言えるかもしれない. これらの糖脂質組成の違いにより, RG92 抽出物は ETS-05 株と異なる抗炎症作用のメカニズムを示す可能性がある. 実際, ETS-05 株の MGDG は炎症の resolution phase (回復期) において, COX-2 の発現亢進を介して 15-デオキシ- Δ 12,14-PGJ₂ を増加させることで抗炎症作用を発揮するとされている (Ulivi *et al.*, 2011). 一方, RG92 抽出物は, 炎症の initiation phase (初期段階) において, 細胞内 ROS の減少を介して COX-2 をはじめとする一連の炎症関連因子の遺伝子発現を抑えて抗炎症作用を示すことが示唆された (図 2-4). RG92 にはルテイン, α -カロテン, β -カロテン等のカロテノイドも含まれている (data not shown). 今後, RG92 抽出物の抗炎症作用に寄与する成分の構造解析および同定を進め, 作用機序の比較検討を行うことで, 炎症性疾患の治療薬の開発に向けた有益な知見が得られるであろう.

今回, 我々は DF, DPC, FLS といった 3 種の異なる皮膚や関節由来のヒト初代培養細胞を用いて RG92 抽出物の抗炎症作用を示したが, 以前の温泉微生物の薬理研究には軟骨細胞や表皮ケラチノサイト等の異なる細胞が用いられている (表 1). 温泉由来微生物の薬理作用や有効成分, 作用メカニズムを包括的に解析する研究は着手されたばかりであり, 今後はこれらを網羅的に踏まえた検討が必要である. 温泉微生物の生態系との関係に着目した研究も興味深い.

7. ま と め

別府市内の温泉で発見した緑藻 *Mucidosphaerium* sp. RG92 株の抽出物は, 皮膚や関節由来の細胞において, 一連の炎症関連因子の発現や活性を抑制した. この抗炎症作用には, RG92 抽出物の抗酸化活性が関与しているものと考えられる (図 5). *Mucidosphaerium* sp. RG92 株は, アトピー性皮膚炎, 円形脱毛症, 関節リウマチに代表されるような炎症性疾患の予防や改善に有用であることが示唆された. 今回の報告は, 温泉から発見された単細胞性の緑藻類において初めて抗炎症作用に関する知見を得たものであり, 温泉に生息する微生物の薬理学的研究に拍車を掛けるものと期待する.

謝 辞

温泉水より単離培養された RG92 に関し、培養をお手伝いいただいた当研究所の青龍若菜氏、山下尚輝氏に感謝致します。RG92 の同定にご協力いただいた信州大学大学院総合理工学研究科の亀山真悠氏、伊原正喜准教授に感謝申し上げます。関節細胞研究に関してご助言を賜りました京都産業大学現代社会学部の石飛博之助教、広島大学病院未来医療センターの味八木茂講師に感謝致します。

引用文献

- Agregán, R., Munekata, P.E.S., Franco, D., Carballo, J., Barba, F.J. and Lorenzo, J.M. (2018) : Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) Assisted by Ultrasound, *Medicines (Basel)*, **5** (2), 33.
- Aries, M.F., Hernandez-Pigeon, H., Vaissière, C., Delga, H., Caruana, A., Lévêque, M., Bourrain, M., Ravard Helffer, K., Chol, B., Nguyen, T., Bessou-Touya, S. and Castex-Rizzi, N. (2016) : Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Aquaphilus dolomiae* extract on in vitro models, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **9**, 421-434.
- Bakry, O.A., Samaka, R.M., Shoeib, M.A. and Abdel Aal, S.M. (2015) : Nuclear factor kappa B and cyclo-oxygenase-2 : two concordant players in psoriasis pathogenesis, *Ultrastruct. Pathol.*, **39** (1), 49-61.
- Bock, C., Pröschold, T. and Krienitz, L. (2011) : UPDATING THE GENUS *DICTYOSPHAERIUM* AND DESCRIPTION OF *MUCIDOSPHAERIUM* GEN. NOV. (TREBOUXIOPHYCEAE) BASED ON MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DATA1, *J. Phycol.*, **47** (3), 638-652.
- Bruno, A., Rossi, C., Marcolongo, G., Di Lena, A., Venzo, A., Berrie, C.P. and Corda, D. (2005) : Selective in vivo anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol, *Eur. J. Pharmacol.*, **524** (1-3), 159-168.
- Cao, G., Alessio, H.M. and Cutler, R.G. (1993) : Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, **14** (3), 303-311.
- Chen, M.P., Yang, S.H., Chou, C.H., Yang, K.C., Wu, C.C., Cheng, Y.H. and Lin, F.H. (2010) : The chondroprotective effects of ferulic acid on hydrogen peroxide-stimulated chondrocytes : inhibition of hydrogen peroxide-induced pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase gene expression at the mRNA level, *Inflamm. Res.*, **59** (8), 587-595.
- da Costa, E., Silva, J., Mendonça, S.H., Abreu, M.H. and Domingues, M.R. (2016) : Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids, *Mar. Drugs*, **14** (5), 101.
- Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P. and Xavier, R.M. (2008) : Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Immunol.*, **152** (3), 415-422.
- Gregoriou, S., Papafragkaki, D. and Kontochristopoulos, G. (2010) : Cytokines and other mediators in alopecia areata, *Mediators Inflamm.*, **2010**, 928030.
- Hanada, S., Kawase, Y., Hiraishi, A., Takaichi, S., Matsuura, K., Shimada, K. and Nagashima, K.V. (1997) : *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47** (2), 408-413.
- Hirayama, O. and Kishida, T. (1991) : Temperature-Induced Changes in the Lipid Molecular Species

- of a Thermophilic Cyanobacterium, *Mastigocladus laminosus*, *Agric. Biol. Chem.*, **55** (3), 781-785.
- Hou, W., Wang, S., Dong, H., Jiang, H., Briggs, B.R., Peacock, J.P., Huang, Q., Huang, L., Wu, G., Zhi, X., Li, W., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Zhang, C., Hartnett, H.E., Dijkstra, P. and Hungate, B.A. (2013) : A Comprehensive Census of Microbial Diversity in Hot Springs of Tengchong, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing, *PLoS One*, **8** (1), e53350.
- Ishii, M., Nakahara, T., Araho, D., Murakami, J. and Nishimura, M. (2017) : Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NK- κ B signaling, *Biomed. Pharmacother.*, **91**, 111-120.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. and Karin, M. (2005) : Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases, *Cell*, **120** (5), 649-661.
- Karmakar, S., Kay, J. and Gravallesse, E.M. (2010) : Bone damage in rheumatoid arthritis : mechanistic insights and approaches to prevention, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **36** (2), 385-404.
- Kasraie, S. and Werfel, T. (2013) : Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 942375.
- Kim, J.H., Na, H.J., Kim, C.K., Kim, J.Y., Ha, K.S., Lee, H., Chung, H.T., Kwon, H.J., Kwon, Y.G. and Kim, Y.M. (2008) : The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways : role of H₂O₂ in NF-kappaB activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **45** (6), 885-896.
- Liaw, C.C., Yang, Y.L., Lin, C.K., Lee, J.C., Liao, W.Y., Shen, C.N., Sheu, J.H. and Wu, S.H. (2015) : New Meroterpenoids from *Aspergillus terreus* with Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression, *Org. Lett.*, **17** (10), 2330-2333.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. and Mercadante, A.Z. (2012) : Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* Using fractional factorial design, *Braz. J. Microbiol.*, **43** (1), 126-134.
- Marcolongo, G., de Appolonia, F., Venzo, A., Berrie, C.P., Carofiglio, T. and Ceschi Berrini, C. (2006) : Diacylglycerolipids isolated from a thermophile cyanobacterium from the Euganean hot springs, *Nat. Prod. Res.*, **20** (8), 766-774.
- Matz, H., Orion, E. and Wolf, R. (2003) : Balneotherapy in dermatology, *Dermatol. Ther.*, **16** (2), 132-140.
- Mifude, C.K., Ishitobi, H., Miyaki, S. and Kaseda, K. (2017) : Mitochondrial regulation in the pathogenic process of inflammatory arthritis by microalgal *Mucidosphaerium* species, *Mol. Med. Curr. Aspects*, **1** (1), 003.
- Miyata, M., Iwata, S., Mifude, C.K., Tajima, M., Kameyama, M., Ihara, M., Matsui, T., Yamagishi, S., Ishitobi, H., Miyaki, S. and Kaseda, K. A novel *Mucidosphaerium* sp. from Beppu hot spring down-regulates inflammatory gene expression in skin and articular cells, *Altern. Ther. Health Med.*, (in press).
- Miyata, M., Mifude, C., Matsui, T., Kitamura, H., Yoshioka, H., Yamagishi, S. and Kaseda, K. (2015) : Advanced glycation end-products inhibit mesenchymal-epidermal interaction by up-

- regulating proinflammatory cytokines in hair follicles, *Eur. J. Dermatol.*, **25** (4), 359-361.
- Nasermoaddeh, A. and Kagamimori, S. (2005) : Balneotherapy in medicine : A review, *Environ. Health Prev. Med.*, **10** (4), 171-179.
- Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. (2005) : Ultraviolet radiation and skin aging : roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27** (1), 17-34.
- Ron, E.Y.C., Plaza, M., Kristjansdottir, T., Sardari, R.R.R., Bjornsdottir, S.H., Gudmundsson, S., Hreggvidsson, G.O., Turner, C., van Niel, E.W.J. and Nordberg-Karlsson E. (2018) : Characterization of carotenoids in *Rhodothermus marinus*, *Microbiologyopen*, **7** (1), e536.
- Rose, B.J. and Kooyman, D.L. (2016) : A Tale of Two Joints : The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology, *Dis. Markers*, **2016**, 4895050.
- Rousset, F., Nguyen, M.V., Grange, L., Morel, F. and Lardy, B. (2013) : Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes, *PLoS One*, **8** (6), e66478.
- Sato, N. and Moriyama, T. (2007) : Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* : lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis, *Eukaryot. Cell*, **6** (6), 1006-1017.
- Tank, M. and Bryant, D.A. (2015) : *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65** (Pt 5), 1426-1230.
- Tominaga, M. and Takamori, K. (2013) : An update on peripheral mechanisms and treatments of itch, *Biol. Pharm. Bull.*, **36** (8), 1241-1247.
- Trabelsi, L., Mnari, A., Abdel-Daim, M.M., Abid-Essafi, S. and Aleya, L. (2016) : Therapeutic properties in Tunisian hot springs : first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides, *BMC Complement. Altern. Med.*, **16** (1), 515.
- Tsukamoto, M. (2014) : Physical and Mental Treatment of Tōji and Local Touristic Strategy in Beppu, *Int. J. Soc. Behav. Educ. Econ. Bus. Ind. Eng.*, **8** (12), 4041-4044.
- Ulivi, V., Lenti, M., Gentili, C., Marcolongo, G., Cancedda, R. and Descalzi Cancedda, F. (2011) : Anti-inflammatory activity of monogalactosyldiacylglycerol in human articular cartilage in vitro: activation of an anti-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway, *Arthritis Res. Ther.*, **13** (3), R92.