

<平成 20 年度助成>

ウコン継続摂取による免疫疾患予防方法の開発

岡本能弘

(千葉科学大学薬学部)

1. はじめに

ウコン(鬱金、宇金、郁金、玉金)は、香辛料、着色料、生薬として用いられるショウガ科ウコン属の多年草であり、健康食品としても市販されている。ウコン成分が免疫機能を制御する活性を有することが近年報告されている^{1,2)}。しかし、これらは *in vitro* の研究成果であり、*in vivo* 経口摂取での効果についての報告は少なく、その効用は明確でない。ウコンの含有成分やこれまでの研究報告から、経口投与によっても免疫機能修飾効果が得られることが想定される。本研究の目的はウコンの経口摂取による免疫機能制御方法を開発することである。

関節リウマチは、我が国で最も患者数の多い自己免疫疾患であり、患者数が増加傾向にあるため社会問題となっている。また、現在用いられている生物学的製剤を含む抗リウマチ薬は副作用など重篤なものが多いため、より患者に負担にならない治療方法や発症予防方法が望まれている。その点でウコンのようにこれまでも健康食品としても利用されているものは予防や治療薬として有力な候補となり得る。

今回著者は、関節リウマチに対するウコン成分の予防効果について、その病態モデル動物であるコラーゲン誘導関節炎マウスを用いた動物実験にてその有効性について検討した。

2. 実験方法

2-1 マウスコラーゲン誘導関節炎(Collagen Induced Arthritis, CIA)の作製

DBA/1J Jms Slc マウス(日本エスエルシー株式会社)にウシⅡ型コラーゲン(Chondrex 社) 200 μ g/匹をフロイントの完全アジュバントとともに皮内投与(一次感作)し、さらに3週間後Ⅱ型コラーゲン 200 μ g/匹をフロイント不完全アジュバントとともに皮内に投与(二次感作)することにより関節炎を誘導した³⁾。関節炎の発症・重症度はコラーゲン二次感作以降、経時的に足関節の炎症症状を Wood らの評価法⁴⁾に従って重症度を4段階でスコア化した。

2-2 ウコン、クルクミンの投与

100 mg/kg に相当するクルクミンを5%アラビアゴム溶液に懸濁させ、マウスへ1日1回経口ゾンデにて経口投与した。ウコン自由摂取の実験においては、標準飼料として AIN-93G (standard diet, 日本農産工業株式会社)の粉末飼料に、ウコン粉末(秋ウコン、株式会社沖縄ウコン堂)、クルクミン(1,7-bis (4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione, 和光純薬株式会社)を所定の含量となるよう標準飼料に添加し、混和した。有効成分の分解を防ぐため、飼料は給餌前に調製し、実験期間中毎日交換した。

2-3 サイトカイン産生の評価

インターロイキン 17A (IL-17) の産生量の変動について、①脾臓細胞培養上清中のサイトカイン産生量を Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA 法)にて、②サイトカイン産生細胞数は Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法により測定した^{5,6)}。細胞内サイトカイン解析は細胞表面抗原を蛍光標識抗体にて染色後、細胞内透過処理を行い、FITC 標識抗マウス IL-17 モノクローナル抗体 (Biolegend 株式会社)にて細胞内サイトカインを染色後、フローサイトメーター (EPICS ALTRA, ベックマン・コールター株式会社)にて分析した。

2.4 リアルタイム RT-PCR による IL-17 mRNA 発現量の定量

脾臓細胞から RNAsiso plus キット (タカラバイオ株式会社)にて全 RNA を抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace - α - (東洋紡ライフサイエンス株式会社) を使用し、全 RNA (100 ng) を鋳型として oligo dT primer (50 pmol/ μ l) にて 1st strand cDNA 合成を行った。つづいて IL-17 の遺伝子発現量をマウス IL-17 特異的プライマー、SYBR Green Real time PCR Master Mix (東洋紡ライフサイエンス株式会社)を用いて定量した。リアルタイム PCR 装置には、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。各群のサイトカイン mRNA 量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量で補正した。

2.5 統計学的解析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意差は Kruskal-Wallis の多重比較検定法により行い、危険率 5% で差のある場合に Tukey あるいは Scheffé の多重比較法による有意差検定を行い、それぞれ危険率 5% で評価した。

3. 結果および考察

3.1 クルクミンの抗関節炎作用

ウコンは抗炎症作用を有することがこれまでに報告されている。その活性を担う中心成分はクルクミンと考えられている (図 1)。

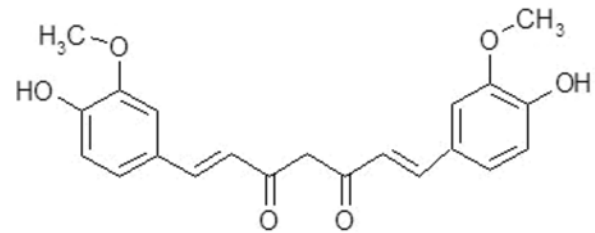


図 1 クルクミンの化学構造

化学名 1,7-bis (4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 分子式では $C_{21}H_{20}O_6$, 分子量は 368.39

ウコンあるいは、その含有成分の継続摂取による関節リウマチの予防・治療の可能性を検討するため、コラーゲン関節炎モデルマウスに対する効果、機序について基礎的検討を行った。

これまでウコンの活性の中核成分と考えられているクルクミンをコラーゲン 2 次感作時 (Day 21) より 1 日 1 回強制経口投与 (12 日間) した場合の関節炎発症に及ぼす効果を比較した。クルクミン強制経口投与群では有意に関節炎の発症を抑制した (図 2)。

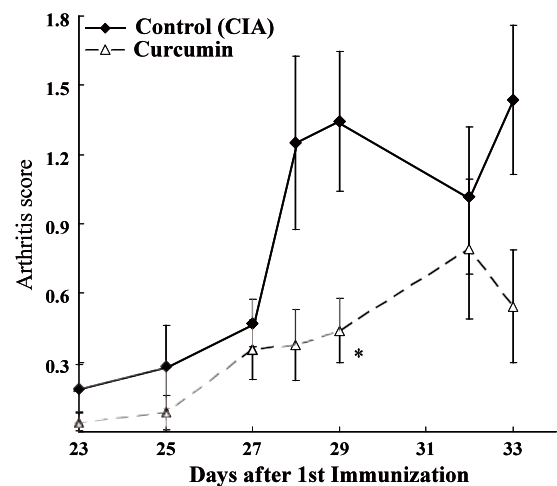


図 2 マウスコラーゲン誘導関節炎に対するクルクミンの効果
クルクミン (100 mg/kg) あるいは溶媒 (4% アラビアゴム) をコラーゲン 2 次感作後 (Day 21) より 1 日 1 回経口投与して強制経口投与した (12 日間)。クルクミンの強制経口投与により関節炎発症が有意に (* $p < 0.05$, $n = 6$) 抑制された。

クルクミンは、経口摂取であっても関節炎の発症抑制効果があることが確認された。

近年、関節リウマチの発症にはサイトカイン類の産生異常がその病態形成に大きく関わることを報告されている^{3,7)}。サイトカイン産生の変動を

解析した。今回は特に炎症反応を強力に惹起し、関節リウマチの発症、病態形成に大きく関わる事が報告されているサイトカインである IL-17 について解析した⁸⁾。IL-17 産生細胞数は関節リウマチの発症に伴って上昇したが、クルクミンの投与で有意に抑制された(図 3a)。この結果は細胞内サイトカイン解析によるフローサイトメトリーによる解析によってもクルクミン投与で IL-17 産生細胞が減少するという同様の結果が確認された(図 3b)。さらに産生量に及ぼす効果について脾細胞培養上清を用いて検討したところ、産生量も抑制されていた(図 3c)。また、脾細胞の IL-17 遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法で定量したところ、関節炎の発症に伴って上昇した IL-17

遺伝子発現がクルクミン投与によって抑制されていた(図 3d)。

クルクミンの IL-17 産生抑制作用を確認するため *in vitro* で脾細胞の IL-17 産生に対する効果を検討した(図 4)。クルクミンは濃度依存的に IL-17 産生抑制作用を示した。なお、実験に使用した濃度範囲では脾細胞に対する細胞傷害は示さなかった。

以上の結果より、ウコン成分中のクルクミンは IL-17 産生抑制作用を有しており、その摂取により、実際に関節炎の発症抑制効果を発揮した。クルクミンの IL-17 産生抑制作用は、*in vivo*、*in vitro* 含め、これまでに報告されていない新規な知見である。

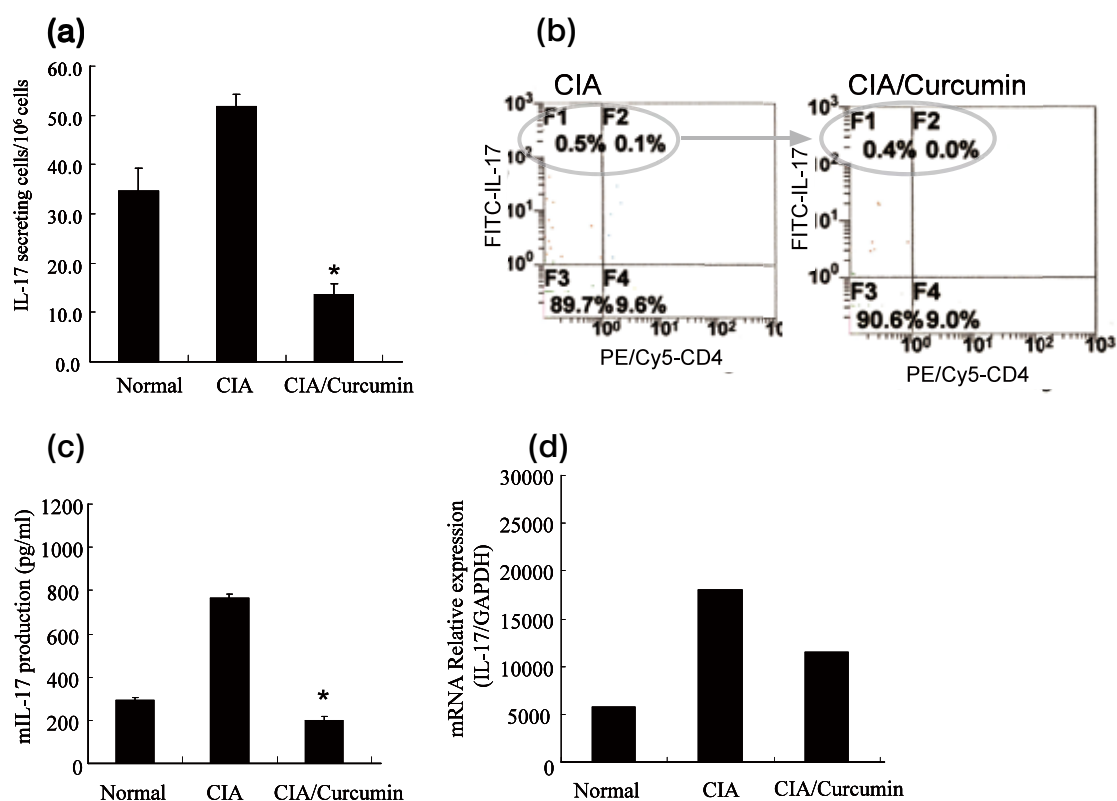


図 3 クルクミンの IL-17 産生抑制作用 (*in vivo*)

- (a) ELISPOT 法による解析：正常マウス、CIA マウス、クルクミン投与 CIA マウスの脾細胞中の IL-17 産生細胞を ELISPOT 法にて解析した。クルクミン投与マウスの IL-17 産生細胞は CIA マウスと比較し、有意に低下した (* $p < 0.05$, $n = 4$)。
- (b) 細胞内 IL-17 の解析 (フローサイトメトリー)：クルクミン投与 CIA マウスの IL-17 産生細胞 (0.4% + 0.0%) は、CIA マウス (0.5% + 0.1%) に比較し、低下した。
- (c) ELISA：クルクミン投与マウスの脾細胞の IL-17 産生量は CIA マウスと比較し、有意に低下した (* $p < 0.01$, $n = 4$)。
- (d) IL-17 mRNA 発現量の解析 (リアルタイム RT-PCR 法)：クルクミン投与 CIA マウスの IL-17 mRNA 発現量は、CIA マウスと比較し、低下した。

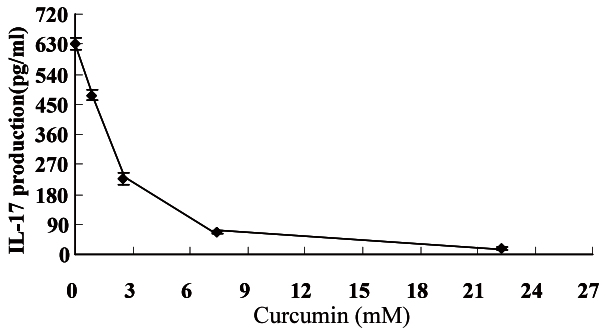


図4 クルクミンのIL-17産生抑制作用 (*in vitro*)

正常マウス脾細胞にクルクミンを添加し、PMA (0.05 μ g/ml) and ionomycin (1 μ g/ml) にて48時間刺激後の培養上清中に分泌されたIL-17量をELISA法にて定量した (n=4)。

3-2 クルクミン、ウコンの長期自由摂取の関節炎発症に及ぼす効果

ヒトが日常生活においてクルクミンを摂取する条件に近づけるため、ウコン粉末、クルクミンをマウス飼料に混和し、実験期間中自由摂取させた。この実験では、予防医療としての摂取を想定し、関節炎を惹起する1ヶ月前からの長期継続経口摂取の作用を検討した(図5)。

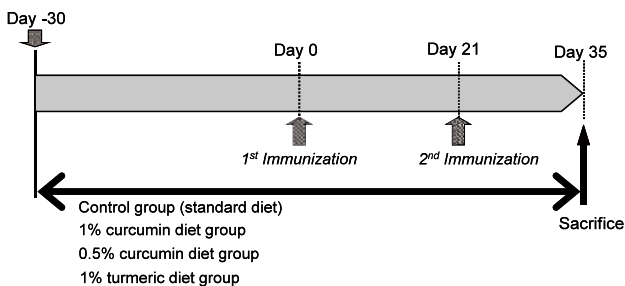


図5 ウコン/クルクミン長期自由摂取の関節炎発症に及ぼす効果の検討(プロトコール)

その結果、1%クルクミン含有餌摂取群で関節炎抑制傾向がみられたものの、いずれの群においてもコントロール群と統計学的に有意な関節炎発症抑制効果がみられなかった(図6)。一方ウコン粉末混合飼料では逆に増悪している傾向さえみられた。

強制経口投与に比較して飼料に含有させ自由摂取による方法では統計学的に有意な関節炎抑制効果が見られなかったが、1%クルクミン含有飼料摂取群では関節炎発症抑制作用がみられた。また、

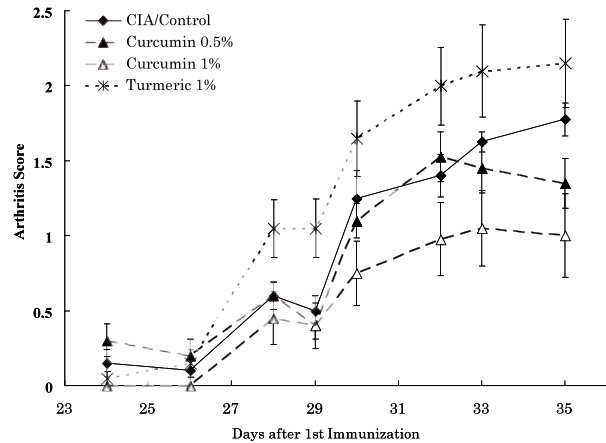


図6 コラーゲン関節炎マウスに対するウコン/クルクミン長期自由摂取の効果

ウコン粉末(1%)、あるいはクルクミン(0.5%、1%)を飼料に混ぜ、実験開始1ヶ月前より自由摂取させた。(n=6)。

短期の自由摂取投与では関節炎発症抑制効果は見られなかった(Data not shown)。ウコン粉末を混入させた飼料摂取によっても同様に関節炎発症抑制効果は得られなかった。秋ウコンのクルクミン含量は3-4%とされている。0.5%クルクミン含有飼料でも抑制効果がなかったことからクルクミン含量が関節炎発症抑制に直接関与していることが考えられた。

IL-17産生能を評価したところ、1%クルクミン摂取群で産生細胞数、産生量が抑制されていた(図7)。また、関節炎抑制の臨床効果はみとめられなかったものの、ウコン摂取群でもそのIL-17産生は抑制されていた。ウコン中には多様な成分が含まれており、その中にIL-17を介さない、別のメカニズムによる炎症を悪化促進させるような成分が含まれる可能性も考えられる。今後詳細な検討が必要である。

4. まとめ

ウコンに含まれるクルクミンは関節炎病態モデルマウスの発症抑制作用を有している。またその作用の機序としてIL-17抑制作用が関節炎発症に関与していることが初めて判明した。そしてその抑制効果は摂取量に依存しているようである。関節炎抑制作用だけを目標にするならば、よりクル

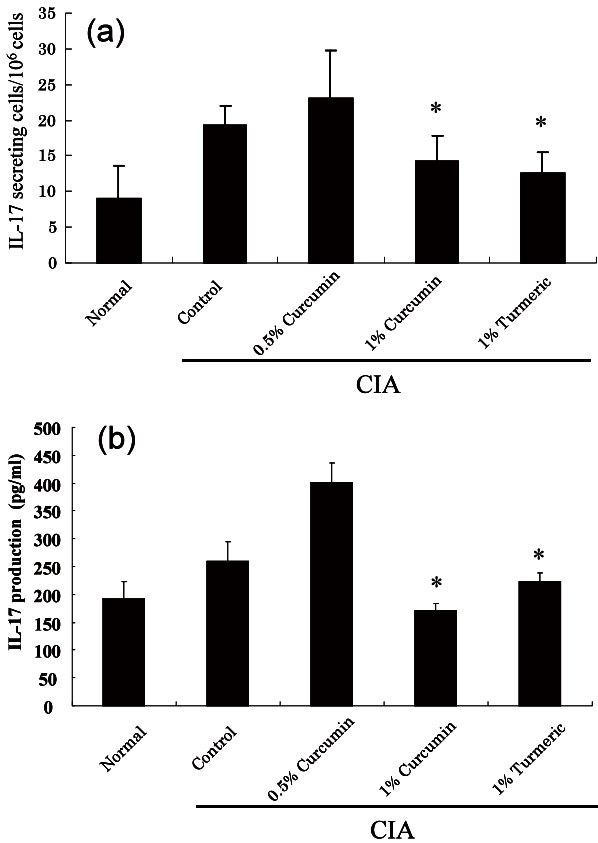


図7 ウコン/クルクミン自由摂取マウスのIL-17産生抑制作用 (*in vivo*)

- (a) ELISPOT法による解析：正常マウス、CIAマウス、クルクミン投与CIAマウスの脾細胞中のIL-17産生細胞をELISPOT法にて解析した。クルクミン投与マウスのIL-17産生細胞はCIAマウスに比較し、有意に低下した(* $p < 0.05$, $n = 4$)。
- (b) ELISA：クルクミン投与マウスの脾細胞のIL-17産生量はCIAマウスに比較し、有意に低下した(* $p < 0.01$, $n = 4$)。

クミン含量の多いウコンのほうが、より関節炎の発症を抑制できる可能性がある。しかしながら、今回の検討ではウコンそのものの摂取では効果が見られなかった。品種、クルクミン含量など、より詳細な検討が必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝いたします。

文献

- Gautam SC, Gao X, Dulchavsky S. Immunomodulation by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:321-41.
- Shirley SA, Montpetit AJ, Lockey RF, Mohapatra SS. Curcumin prevents human dendritic cell response to immune stimulants. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374 (3):431-6.
- Okamoto Y, Gotoh Y, Tokui H, Mizuno A, Kobayashi Y, Nishida M. Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20 (1):55-61.
- Wood FD, Pearson CM, Tanaka A. Capacity of mycobacterial wax D and its subfractions to induce adjuvant arthritis in rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1969;35 (5):456-67.
- Okamoto Y, Nishida M. Dual-color ELISPOT assay for analyzing cytokine balance. *Methods Mol Biol* 2005;302:263-72.
- Okamoto Y, Abe T, Niwa T, Mizuhashi S, Nishida M. Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells. *Immunopharmacology* 1998;39 (2):107-16.
- Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996;26 (7):1511-8.
- Sarkar S, Cooney LA, White P, Dunlop DB, Endres J, Jorns JM, Wasco MJ, Fox DA. Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. *Arthritis Res Ther* 2009;11 (5):R158.

Suppression of immunological diseases by daily intake of turmeric

Yoshihiro Okamoto

Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

There are few scientific evidences on anti-arthritic efficacy of turmeric dietary supplements that are being promoted for immunological diseases prevention. Therefore, we undertook studies to determine the antiarthritic efficacy and mechanism of action of a well-characterized turmeric extract using an animal model of rheumatoid arthritis (RA). Curcumin, a major bioactive component of turmeric was administered per os by a catheter to mice (DBA/1J) at the 21-33th day after the induction of collagen induced arthritis. The mice administered with curcumin (100mg/kg) exhibited significant lower clinical arthritis scores than non-treatment CIA mice. *In vivo* curcumin treatment prevented interleukin 17 production which plays an important role in the pathogenesis of RA. On the other, in the dietary administration study a high dose of curcumin mixed into the diet (1%, equating to approximately 1.2 g/kg) showed a weak inhibitory effect on the joint inflammation of CIA mice, but turmeric (1%, *C. domestica*) powder mixed into diet did not inhibit joint inflammation. However, the IL-17 production was inhibited in the all groups. The active components which aggravate joints inflammatory in mice via different pathway might contain in turmeric powder.

These results demonstrate *in vivo* efficacy and identify a novel mechanism of action for a curcumin that supports further clinical evaluation of turmeric dietary in the prevention of immunological diseases such RA.