

# 沖縄産柑橘シークワーサーの生活習慣病予防作用に関する研究

伊 東 晃 (東京薬科大学薬学部教授)

## 1. 緒 言

柑橘類の果実には多くのフラボノイド類が含まれており、脂肪細胞の増殖抑制、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA レダクターゼ阻害、ガン細胞の増殖阻害など多彩な薬理作用が報告されている<sup>1, 2)</sup>。シークワーサー [*Citrus depressa* Hayata (Rutaceae): ヒラミレモン] は沖縄に自生する柑橘であり、その果皮および果汁中に6種のポリメトシフラボノイドが多量に含まれ、かつその主成分はノビレチン (5, 6, 7, 8, 3', 4'-hex amethoxy flavone) (Fig. 1) であることが報告されている。このノビレチンは抗炎症作用、発ガン防止作用やガン浸潤・転移作用を示すことが報告されている<sup>3-5)</sup>。このような事実は、ノビレチンが関節リウマチ、変形性関節症や骨粗鬆症などいわゆる生活習慣病の治療および予防薬として有用であることを強く示唆する。しかしこれまでに、ノビレチンのこれら疾患に対する作用は、ほとんど検討されていない。

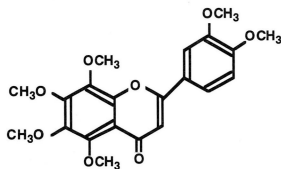


Fig. 1 ノビレチンの構造

このような背景から本研究では、ヒト関節滑膜細胞においてインターロイキン-1 (IL-1) により誘導したプロスタグランジン (PG)  $E_2$  やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生などのいわゆる炎症反応に対するノビレチンの作用および卵巣摘出マウス骨粗鬆症モデルにおけるノビレチンの作用を詳細に検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 ヒト関節滑膜細胞の培養と処理

ヒト関節滑膜細胞 (Cell Systems, Co.) は 10% FBS/DMEM/penicillin G (100units/ml)/streptomycin (100 $\mu$ g/ml) の培養液中、5% CO<sub>2</sub>/95% air の気流下に培養した。マルチプレート (24 穴) あるいは 100 mm ディッシュに播種後コンフルエントまで培養し、その後培養液を DMEM/0.02% lactalbumin 水解物に交換した。同培養液中でヒト組換え IL-1 $\alpha$  (rhIL-1 $\alpha$ , 1 ng/ml) により細胞を刺激し、炎症反応を惹起した。ノビレチンは IL-1 $\alpha$  添加と同時にジメチルスルオキシド (DMSO) 溶液として培養系に加えた。このときの DMSO の終濃度は最大 0.05% とした。未処理群にも DMSO を同様に加えた。細胞処理後に回収した培養液は、使用まで -20℃ で保存した。

### 2.2 Western blot 法による proMMPs および cyclooxygenase (COX) の解析

培養液中の MMP-1/collagenase-1, MMP-3/stromelysin-1 および MMP の内因性インヒビタ

一 (TIMP-1) は、既述のように Western blot 法により検出し、それらの濃度をデンスitomーターにて測定し相対産生量を比較した<sup>6)</sup>。一方、COX-1 および -2 産生は、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5/2% SDS/10% glycerol/5% 2-mercaptoethanol) で細胞を溶解しタンパク質濃度を揃えて Enhanced chemiluminescence-Western blot 法 (Amersham Pharmacia Biotech) を実施した。抗体はヒト COX-1 および -2 に対するものをそれぞれ使用した。相対産生量は上述のごとくに測定した。

### 2.3 PGE<sub>2</sub> の定量

培養液中の PGE<sub>2</sub> は、市販の酵素標識抗体キット (Amersham Pharmacia Biotech) により定量した。

### 2.4 RT-PCR による mRNA の定量

培養ディッシュ (直径 100 mm) を使用して培養した細胞からの総 RNA の抽出は、Isogen (Nippon Gene Co.) を用いて行った。総 RNA 3  $\mu$ g を RT-PCR により関節滑膜細胞の COX-1, COX-2, proMMP-1 および GAPDH mRNA の変動を検討した。使用したプライマーおよび実験方法の詳細は、前報に記載のとおりである<sup>6)</sup>。

### 2.5 マウス卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるノビレチンの骨粗鬆症予防作用

雄性マウス (8 週齢) に卵巣摘出術 (OVX) を行った。また、5 倍濃縮したシークワーサー果汁 100  $\mu$ l (3.6ml/kg 体重) あるいは水を OVX 当日より 1 日 1 回経口投与した。術後 4 週にて体重および子宮重量を計測すると共に、大腿骨を摘出し 70% ethanol により固定した後に 4℃ で保存した。大腿骨の軟 X 線写真は Soft X-ray (Model CMB-1; SOFTEX 社製) を用いて撮影した。大腿骨の骨密度 (BMD; bone mineral density) は DEXA 法 (Dual energy X-ray absorptionmetry/Model DSS-600R; Aloka 社製) によ

り測定した。骨塩量は灰分重量に相関することが報告されており、骨密度は測定領域の骨塩量を面積で除することによって算出した。

### 2.6 有意差検定

有意差検定には ANOVA 法を行った。また、多母集団の比較の場合 Dunnett 検定を併用した。

## 3. 実験結果

### 3.1 ヒト関節滑膜細胞における PGE<sub>2</sub> および COX-2 産生に及ぼすノビレチンの影響

ヒト関節滑膜細胞を rhIL-1 $\alpha$  (1 ng/ml) にて処理すると PGE<sub>2</sub> 産生は約 10 倍増加した。ノビレチンはこの産生を濃度 (4-64  $\mu$ M) 依存的に抑制した (Fig. 2)。Fig. 3A の Western blot の結果に示すように、このノビレチンの PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用は、rhIL-1 $\alpha$  により誘導される COX-2 酵素産生の選択的かつ濃度依存的抑制に起因することが判明した。さらに、この産生抑制は、RT-PCR の結果 COX-2 mRNA の発現抑制に依存することも判明した (Fig. 3B)。

一方、ノビレチンは上記処理条件下では、細胞数に全く影響を与えないことも判明 (結果未収

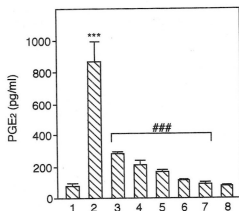
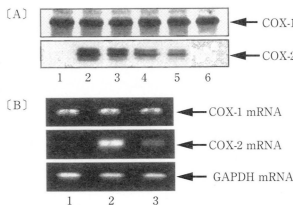


Fig. 2 ノビレチンによるヒト関節滑膜細胞での PGE<sub>2</sub> 産生の抑制  
ヒト関節滑膜細胞を rhIL-1 $\alpha$  (1 ng/ml) および各濃度のノビレチンの共存下に 24 時間処理し、培養液中に産生された PGE<sub>2</sub> を酵素-抗体法で定量した。数値は実験 4 回の平均値  $\pm$  SD。\*\*\* および ### は対照群 (P<0.001) および rhIL-1 $\alpha$  処理群 (P<0.001) に対する有意差。1, 対照; 2, rhIL-1 $\alpha$  処理; 3-7, rhIL-1 $\alpha$  + ノビレチン (6, 8, 16, 32 および 64  $\mu$ M); 8, ノビレチン (64  $\mu$ M)。



**Fig. 3** ノビレチンによるヒト COX-2 発現および産生の選択的抑制  
(A) : ヒト関節滑膜細胞を rhIL-1 $\alpha$  (1 ng/ml) および各濃度のノビレチンの共存下に 24 時間処理し、細胞を PBS(-) にて洗浄し溶解後 Western blot を実施した。1, 対照; 2, rhIL-1 $\alpha$  処理; 3-5, rhIL-1 $\alpha$  + ノビレチン (16, 32 および 64  $\mu$ M); 6, ノビレチン (64  $\mu$ M)。

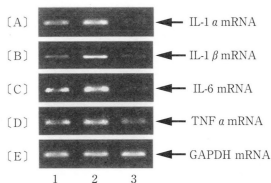
(B) : ヒト関節滑膜細胞を rhIL-1 $\alpha$  (1 ng/ml) およびノビレチン (64  $\mu$ M) の共存下に 2 時間処理した後、総 RNA を Isogen を用いて抽出した。その 3  $\mu$ g について RT-PCR にて COX-1, COX-2 および GAPDH mRNA を定量した。1, 対照; 2, rhIL-1 $\alpha$  処理; 3, rhIL-1 $\alpha$  + ノビレチン (64  $\mu$ M)。

載) しており、上述したノビレチンの作用が細胞毒性に基づくものでないことを確認している。これらの結果は、ノビレチンによるヒト関節滑膜の PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用は COX-2 mRNA の選択的な発現抑制に伴う COX-2 の産生阻害に起因することを示唆する。

### 3.2 マウスマクロファージにおける PGE<sub>2</sub> 産生および各種サイトカイン mRNA 発現に対するノビレチンの抑制作用

ノビレチンはヒト関節滑膜細胞と同様に、LPS (5  $\mu$ g/ml) により誘導したマウスマクロファージにおける PGE<sub>2</sub> 産生を濃度依存的 (1-16  $\mu$ M) に抑制することも判明した (結果未掲載)。

一方、同細胞を LPS で 12 時間処理すると IL-1 $\alpha$  mRNA (未処理群の 1.8 倍,  $P < 0.001$ ) IL-1 $\beta$ , mRNA (同 2.9 倍,  $P < 0.001$ ), IL-6 および TNF $\alpha$  mRNA (各 1.1 倍,  $P < 0.01$ ) の発現が各々増加する。この誘導に対しノビレチン (32  $\mu$ M) は、IL-1 $\alpha$  mRNA (抑制率  $> 50\%$ ,  $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$  mRNA (同  $> 48\%$ ,  $P < 0.05$ ), IL-6 mRNA (同  $> 47\%$ ,  $P < 0.01$ ) および TNF $\alpha$  mRNA (同  $> 30\%$ ,  $P < 0.05$ )



**Fig. 4** マウスマクロファージにおける各種サイトカイン発現のノビレチンによる抑制

マウス J774.A マクロファージを LPS (5  $\mu$ g/ml) および 32  $\mu$ M ノビレチンの共存下に 2 時間処理し、Fig. 3 と同様に総 RNA を抽出後、さらに RT-PCR にて IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 および TNF $\alpha$  mRNA を定量した。1, 対照; 2, rhIL-1 $\alpha$  処理; 3, LPS + ノビレチン。

をそれぞれ抑制することが判明した (Fig. 4)。さらにマクロファージの IL-1 $\beta$  産生は、ノビレチン処理により 2 倍 (19.6  $\pm$  7.4 pg/ml vs. 37.2  $\pm$  9.9 pg/ml,  $p < 0.05$ ) に増加するが、ノビレチン (32  $\mu$ M) は、この増加分をほぼ対照群レベル (20.3  $\pm$  8.6 pg/ml) まで抑制した。

### 3.3 ノビレチンはヒト関節滑膜細胞の proMMP-1 および proMMP-3 産生の抑制とその阻害物質 TIMP-1 産生の促進

MMPs は関節リウマチや変形性関節症等において軟骨マトリックスの破壊に密接に関わることから、ヒト関節滑膜細胞における MMPs 産生およびこの内因性インヒビターである TIMP-1 産生に対するノビレチンの作用を検討した。ヒト関節滑膜細胞を rhIL-1 $\alpha$  にて処理すると proMMP-1 および proMMP-3 の産生が促進した。これらの産生をノビレチンは濃度依存的 (16-64  $\mu$ M) に抑制した (Fig. 5A および B)。また、この proMMP-1 産生の増加は rhIL-1 $\alpha$  刺激 2 時間ですでに観察される proMMP-1 mRNA の増加によるものであること、さらにノビレチンによる proMMP-1 産生の抑制は、その mRNA 発現の抑制に起因することも判明した (結果未掲載)。

一方、ノビレチンは、TIMP-1 の産生を濃度依

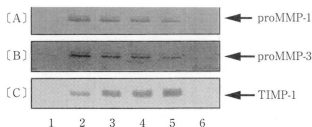


Fig. 5 ヒト関節滑膜細胞におけるコラゲナーゼおよびストロムライシン産生に対するノビレチンの抑制作用  
ヒト関節滑膜細胞を Fig. 2 と同様処理し、培養液中のプロコラゲナーゼ/proMMP-1, プロストロムライシン/proMMP-3 および MMP のインヒビターである TIMP-1 を Western blot 法により同定および定量した。1, 対照; 2, rhIL-1 $\alpha$  処理; 3-5, rhIL-1 $\alpha$  + ノビレチン (16, 32 および 64  $\mu$ M); 6, ノビレチン (64  $\mu$ M)。

存的に促進することも判明した (Fig. 5C)。すなわち、ノビレチンは関節リウマチなどの炎症部位において細胞外マトリックスの分解を MMPs の産生抑制およびそのインヒビターである TIMP-1 の産生を促進するといった2方向から阻害することが判明した。

### 3.4 骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少に対するシークワーサー果汁の経口投与の影響

骨粗鬆症の骨吸収において PGE<sub>2</sub> が促進的に作用することは周知の事実である。そこでノビレチンがヒト関節滑膜細胞において COX-2 の選択的産生阻害を伴い PGE<sub>2</sub> 産生を抑制したことから、ノビレチンを多量に含むシークワーサー果汁が骨粗鬆症の予防作用を示すか否かについて検討した。濃縮果汁 (100  $\mu$ l) を連日4週間にわたり経口投与したところ OVX マウスの大腿骨遠位部において減少した海綿骨が正常化する傾向が認められた。そこで DEXA 法により大腿骨密度を測定したところ OVX により低下した骨密度は 10  $\mu$ l 投与では認められないが 100  $\mu$ l の果汁投与により有意な回復を認めた。一方、果汁投与はマウスの体重や子宮重量には全く影響しなかった (結果未収載) ことから、骨吸収抑制作用はノビレチンのエストロゲン作用によるものでないことも示唆された。シークワーサー果汁の上記抑制の作用機構については、ノビレチンの OVX マウスへの投与

が予備的ながら、海綿骨量減少および破骨細胞増加の抑制に起因することを確認している (結果未収載)。

## 4. 考 察

PGE<sub>2</sub> は関節リウマチや変形性関節症において血管透過性亢進作用などの示す炎症メディエーターとして、また骨吸収促進因子として骨粗鬆症等において重要な役割をすることが報告されている<sup>7)</sup>。COX は PGE<sub>2</sub> を含むプロスタグランジン産生の律速酵素として知られ、なかでも誘導酵素である COX-2 は、炎症部位における PGE<sub>2</sub> 産生において中心的役割を担っている<sup>8)</sup>。これとは対照的に常在性酵素である COX-1 は、胃粘膜などの組織において生理的 PGs 産生に関与することが知られている<sup>9)</sup>。したがって抗炎症薬開発において COX-2 の選択的な活性あるいは産生阻害剤が切望されている。本報告において、ノビレチンがヒト関節滑膜細胞の PGE<sub>2</sub> 産生を COX-2 の選択的阻害を伴って抑制することを示した。同様の報告が interferon- $\gamma$ /LPS-処理マウス RAW 264.7 マクロファージにおいて報告されている<sup>3)</sup>。したがって本報告において示したマウスマクロファージにおける PGE<sub>2</sub> 産生のノビレチンによる抑制も、上記ヒト関節滑膜細胞と同様に COX-2 の選択的阻害に基づくことが強く示唆される。

関節リウマチなどの炎症局所では、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 や TNF $\alpha$  などが炎症反応の進行に多様な作用を示すことが報告されている<sup>10, 11)</sup>。関節滑膜細胞、軟骨細胞、マクロファージや骨芽細胞のような間葉系細胞において、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および TNF $\alpha$  などは PGE<sub>2</sub> と共にマトリックス分解に密接に関与する proMMP-1, -3, -9 および -13 などの産生促進や産生誘導をもたらすことが報告されている<sup>12~16)</sup>。さらに IL-6 もヒト関節滑膜細胞では IL-1 の関与する種々の炎症反応を増強すること

が報告されている<sup>17)</sup>。ノビレチンがマクロファージにおいてこれらサイトカイン産生を抑制することは大変興味深い。すなわちノビレチンはIL-1やTNF $\alpha$ が関与するPGE<sub>2</sub>産生の抑制と免疫系の抑制とを同時に行うといえる。このような性状はデキサメタゾンなどのステロイド性抗炎症薬と類似している。しかし、デキサメタゾンはヒト関節滑膜細胞においてproMMPsに加えてTIMP-1の産生を抑制することが知られている。一方、ノビレチンのproMMPsに対する作用は同様であったが、TIMP-1に対しては促進した。TIMP-1に対する作用を見るかぎりノビレチンとデキサメタゾンとは、その作用が全く異なるといえる。

骨代謝において、PGE<sub>2</sub>は骨芽細胞に作用し破骨細胞分化誘導因子(RANKL; receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand)の発現を誘導し、単球・マクロファージ系細胞からの破骨細胞分化を誘導する<sup>18)</sup>。このような事実と、我々の新発見すなわち関節滑膜細胞やマクロファージにおいてCOX-2の選択的阻害に起因したノビレチンによるPGE<sub>2</sub>産生の抑制とを考慮すると大変興味深い。そこでノビレチンを含むシークワサー果汁の経口投与が、OVX骨粗鬆症モデルマウスにおける骨代謝に及ぼす影響を検討した。マウス大腿骨部の骨密度減少を指標に評価したところ1日あたり果汁(5倍濃縮)100  $\mu$ lの投与では骨量減少の有意な防止効果が確認された。当該果汁の上記抑制の作用機構については、現在不明な点が多いが、その一部はノビレチンのPGE<sub>2</sub>産生阻害に起因する破骨細胞増加の抑制で説明できることをin vitroにおいて確認している。

以上、関節リウマチ、変形性関節症や骨粗鬆症などの生活習慣病の治療・予防と関連して、ノビレチンの多彩かつ有用な生物活性を明らかにした。しかし、細胞内情報シグナル系に対する作用を含むノビレチンの作用発現機序については、不明な

点が多い。これらの解明は情報伝達系に作用点を示す生活習慣病の新規治療・予防薬の開発とも関連し大変興味深い課題である。

## 謝 辞

本研究に対し多大なご助成を賜りました財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にご協力頂きました佐藤隆、林 娜、原田 卓、宮浦千里、三巻祥浩、指田 豊、矢野昌充の各氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S., and Choi, M.S. (1999) J. Nutr. 129, 1182-1185.
- 2) Buening, M.K., Chang, R.L., Huang, M.T., Fortner, J.G., Wood, A.W., and Conney, A.H. (1981) Cancer Res. 41, 67-72.
- 3) Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitataka, S., and Ohigashi, H. (2000) Cancer Res. 60, 5059-5066.
- 4) Sato, T., Koike, L., Miyata, Y., Hirata, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M., and Ito, A. (2002) Cancer Res. 62, 1025-1029.
- 5) Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A., and Kitajima, M. (2001) Jpn. J. Cancer Res. 92, 1322-1328.
- 6) Lin, N., Sato, T., and Ito, A. (2001) Arthritis Rheum. 44, 2193-2200.
- 7) Goodwin, J.S. (1991) J. Rheumatol. (Suppl.) 28, 29-29.
- 8) Geng, Y., Blanco, F.J., Cornelissen, M., and Lotz, M. (1995) J. Immunol. 155, 796-801.
- 9) Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., and Seibert, K. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3228-3232.
- 10) Feldmann, M., Brennan, F.M., Chantry, D., Haworth, C., Turner, M., Abney, E., Buchan, G., Barrett, K., Barkley, D., Chu, A., Field, M., and Maini, R.N. (1990) Ann. Rheum. Dis. 49, 480-486.
- 11) Hirano, T., Mat, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan,

- G., Tang, B., Sato, K., Maini, R., Feldmann, M., and Kishimoto, T. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 1797-1801.
- 12) Nagase, H., and Okada, Y. In: Kelley, WN., Ruddy, S., Harris, ED.Jr., and Sledge, CB., editors. (1996) *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: W.S. Saunders Company: p. 323-341.
- 13) Chang, J., Gilman, SC., and Lewis, AJ. (1986) *J. Immunol.* 136, 1283-1287.
- 14) Dayer, JM., Goldring, SR., Robinson, DR., and Krane, SM. (1979) *Bull. Schweiz. Acad. Med. Wiss.* 35, 329-343.
- 15) Case, JP., Lafyatis, R., Kumkumian, GK., Remmars, EF., and Wilder, RL. (1990) *J. Immunol.* 145, 3755-3761.
- 16) Ito, A., Nose, T., Takahashi, S., and Mori, Y. (1995) *FEBS Lett.* 360, 75-79.
- 17) Ito, A., Itoh, Y., Sasaguri, Y., Morimatsu, M., and Mori, Y. (1992) *Arthritis Rheum.* 35, 1197-1201.
- 18) Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., Nakagawa, N., Yasuda, H., Goto, M., Tsuda, E., Higashino, K., Gillespie, MT., Martin, TJ., and Suda, T. (1999) *Bone* 25, 517-523.

## Preventive effects of a Japanese orange, *Citrus depressa* Hayata from Okinawa island on the lifestyle-related diseases

Akira Ito

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science)

Flavonoids such as nobiletin from *Citrus depressa* Hayata have been reported to exert anti-inflammatory and anti-cancer cell metastatic activities. Therefore, we examined the preventive effects of nobiletin on lifestyle-related diseases such as rheumatoid arthritis and osteoporosis.

Nobiletin suppressed the interleukin (IL)-1-induced production of prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> in human synovial fibroblasts in a dose-dependent manner (<64 μM), accompanying selective downregulation of cyclooxygenase (COX)-2, but not COX-1 mRNA expression. Nobiletin also interfered with the lipopolysaccharide-induced production of PGE<sub>2</sub> and the gene expression of pro-inflammatory cytokines including IL-1α, IL-1β, tumor necrosis factor α and IL-6 in mouse macrophages. In addition, the down-regulation by nobiletin of IL-1-mediated gene expression and production of promatrix metalloproteinase (proMMP)-1/procollagenase-1 and proMMP-3/prostromelysin-1 was observed in human synovial fibroblasts. In contrast, the production of endogenous MMP inhibitor, TIMP-1, was augmented by nobiletin, indicating that nobiletin is very likely to effectively interfere with the degradation of extracellular matrices at inflammatory sites in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Alternatively, effects of nobiletin on osteoporosis in ovariectomized (OVX) mice were examined. When five-times condensed juice (100 μl) of *Citrus depressa* Hayata was orally administered on a daily basis to the OVX mice for four weeks, bone mineral density in the region of distal metaphysis of excised femurs was significantly higher than that of non-treated control mice. The juice, however, did not modulate the body and uterine weights of the OVX mice, indicating that the preventive action by the juice is due to its non-estrogenic effect. These results suggest that the juice of *Citrus depressa* Hayata which mainly contains nobiletin exerts the preventive effects against osteoporosis.

In conclusion, nobiletin as well as the juice of *Citrus depressa* Hayata are novel candidates for the prevention and/or treatment of lifestyle-related diseases such as rheumatoid arthritis and osteoporosis.