

<令和元年度助成>

慢性炎症抑制効果に着目したクルクミンの 生活習慣病予防効果の実証研究

好田 正

(東京農工大学大学院 農学研究院)

背景と目的

近年、我が国だけでなく世界中の多くの国々でヒトの寿命は延び続けている。一方で、それに伴って癌、糖尿病、脳・心血管障害などのいわゆる生活習慣病の患者も世界規模で増え続けており、健康寿命は必ずしも延びていない。すなわち、多くのヒトは人生の最後のかかりの期間を様々な疾患を抱えた状態で過ごしているのが現実である。そのため、このような疾患を予防し、健康寿命を延ばしていくことが一人一人の人生を豊かにするだけでなく、増大する医療費を抑制するという社会的側面からも強く望まれている。

これまでの研究により、生活習慣病をはじめとする多くの疾患の発症や増悪化に、生体局所で起こる慢性炎症が関与していることが明らかとなってきた。すなわち、この慢性的な炎症を日頃から持続的に抑制し続けることさえできれば種々の疾患を予防することが可能であると期待される。

薬剤や食品による抗炎症効果のメカニズムを考えた場合に、炎症性細胞に直接働きかけてその機能を抑制する作用は、感染防御に必要な免疫応答も抑制してしまうデメリットが危惧される。一方、不要な免疫応答のみを抑制し免疫系の恒常性を維持する働きを持つ制御性T細胞を誘導する作用であれば有効性、安全性の面から大きな優位性が期待できる。しかしながら、制御性T細胞を誘導する薬剤はなく、食品の制御性T細胞誘導能に関する研究、およびそれを介した疾病予防効果を実証する試みも現在までにほとんど行われていない。本研究では多様な生理機能が報告されているクルクミンに着目し、生活習

慣病の予防効果と他の香辛料との相乗効果を実証することで、香辛料に新たな付加価値を付与することを目的とする。本研究の結果は、生活習慣病の新たな予防策を提案できるだけでなく、クルクミンやその他の香辛料の機能性素材としての消費拡大へも貢献できると考えている。

材料と方法

マウス

卵白アルブミン特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス(DO11.10マウス)はJackson Laboratoryより購入し、繁殖させた。実験には6~10週齢のオスを用いた。動脈硬化モデルマウスであるアポリポプロテインE欠損マウス(ApoEKOマウス)もJackson Laboratoryより購入し、繁殖させた。10週齢のオスを実験に用いた。全てのマウスは東京農工大学実験動物飼育管理ガイドラインに従って取り扱った。

サンプル

市販のチューブ入り香辛料(生しょうが、生わさび、生にんにく;全てハウス食品)を1gはかり取り、1mLのミリQ水に懸濁した。よく攪拌した後、遠心分離して上清を回収した。得られた上清はフィルター滅菌した後に細胞培養に添加した。しょうがに関してはフィルター後の溶液を乾燥させて固形分の重量を測定して、溶液の濃度を求めた。また、マウスに投与する場合は同様に抽出して遠心分離した後、得られた上清は滅菌せずに飲み水に添加して与えた。クルクミン(東京化成工業)は10mg/mLに

なるようにエタノールに懸濁してから遠心分離して上清を回収した。得られた上清はフィルター滅菌した後に細胞培養に添加した。フィルター後の溶液を乾燥させて固形分の重量を測定して、溶液の濃度を求めた。マウスに投与する場合は遠心分離後の上清を滅菌せずに飲み水に添加して与えた。ギンゲロール（富士フィルム和光純薬）、カプサイシン（富士フィルム和光純薬）は 2.5 mg/mL となるようにエタノールに溶解してからフィルター滅菌して細胞培養に添加した。ウコンの力、ウコンの力 SUPER（ともにハウスウェルネスフーズ）は市販品を購入し、フィルター滅菌して細胞培養に添加した。

細胞培養

DO11.10 から腸間膜リンパ節細胞を調製し、抗原 (OVA、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の存在下で培養した (5×10^6 個 /mL)。ここに上記で調製したサンプルを Fig. 1 ~ Fig. 3 に示す濃度となるように添加した。3 日間の培養後、細胞を回収してフローサイトメトリーにより制御性 T 細胞の割合を測定した。

マウスへの経口投与

調製したしょうが抽出液を 3% となるように飲み水に懸濁してマウスに自由に飲水させた。また、クルクミンを 10 mg/mL でエタノールに懸濁し、遠心して得た上清を 1% となるように飲み水に添加してマウスに与えた。制御性 T 細胞の誘導実験では、DO11.10 マウスを用い、しょうが抽出物およびクルクミンを 6 日間与えた。この際、これらのサンプルを与え始めた翌日から OVA を 20% 含有する飼料を与えて T 細胞を刺激した。OVA 含有飼料を与えて 5 日後に脾臓細胞を調製して、フローサイトメトリーにより制御性 T 細胞の割合を測定した。動脈硬化に対する抑制実験では、ApoEKO マウスを用い、しょうが抽出物およびクルクミンを約 12 週間与えた。この際、しょうが抽出物を与え始めて 3 日後から高コレステロール含有食 (F2HFD1、日本クレア) を与えて動脈硬化を惹起した。実験期間中はマウスの体重を毎週測定した。

組織観察

高コレステロール含有食を与えて 12 週後に胸部大動脈を摘出し組織切片を作成して、HE 染色の後に観察してプラークの面積を測定した（札幌総合病理研究所）。また、血管を開いて Oil red O 染色し、染色された領域の割合を解析した（札幌総合病理研究所）。

フローサイトメトリー

細胞はビオチン標識抗 CD25 抗体、FITC 標識抗 CD4 抗体、ストレプトアビジン標識 PE-Cy5、および Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set PE（いずれも eBioscience）を用いて染色し、CytoFLEX（ベックマンコールター）にて解析した。結果は、CD4⁺ 細胞に対する CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 細胞（制御性 T 細胞）の割合で示した。

統計処理

単独因子による制御性 T 細胞の誘導実験では、Dunnett 法を用いて統計処理を実施した。サンプル無添加群との P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断し、Fig. 1 の図中に * で示した。複数因子による実験の場合は Tukey 法を用い、各群間の P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断して Fig. 3 および 5 の図中に異なったアルファベットで示した。

結果と考察

香辛料抽出物の制御性 T 細胞誘導能の解析 (*in vitro*)

クルクミン、しょうが抽出物、わさび抽出物、ウコンの力、ウコンの力 SUPER の添加により、制御性 T 細胞の割合が増加することが明らかとなった (Fig. 1a, 1b, 1c, 1d)。しかしながら、しょうがに含まれる主な生物活性物質であるギンゲロール、唐辛子に含まれる生物活性物質であるカプサイシンには、制御性 T 細胞の誘導活性は認められなかった (Fig. 2)。制御性 T 細胞は TGF- β やレチノイン酸などの液性因子、aryl hydrocarbon 受容体 (AhR) か

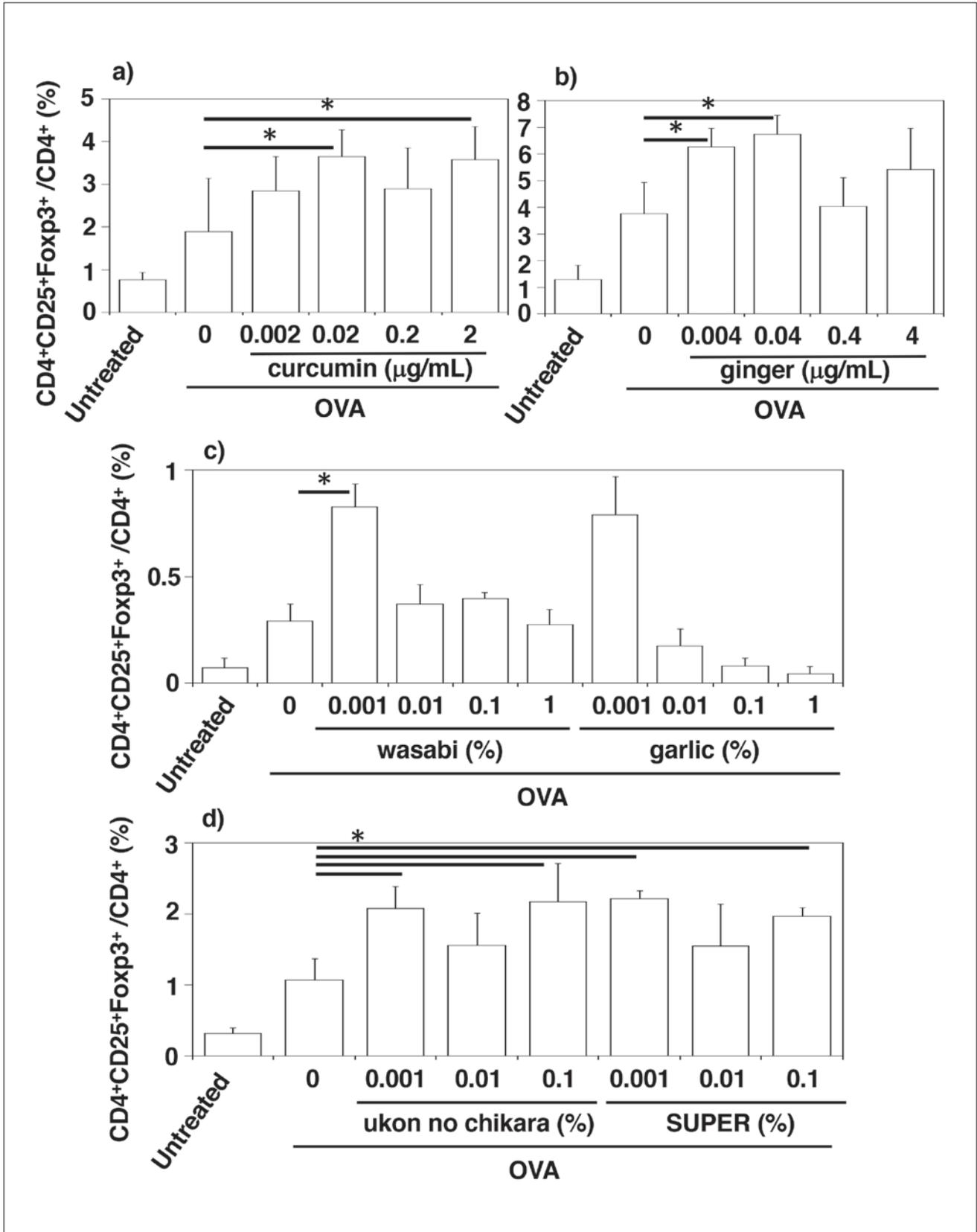


Fig. 1 Induction of Treg cells by various food ingredients. (n=4 or 5)

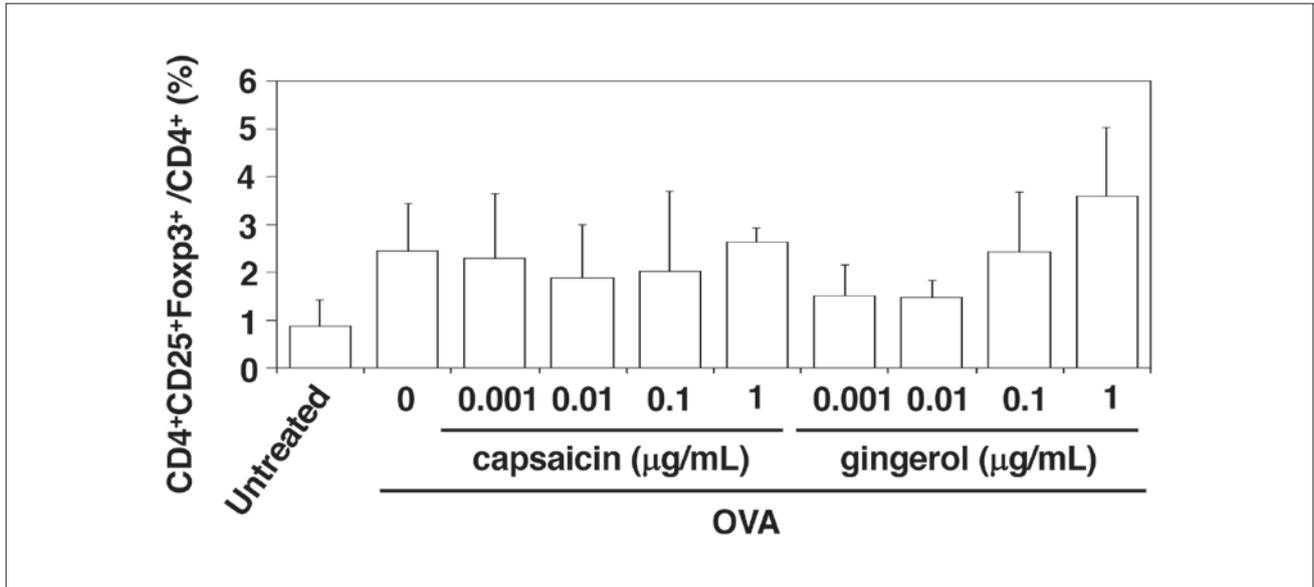


Fig. 2 Induction of Treg cells by some substances. (n=4)

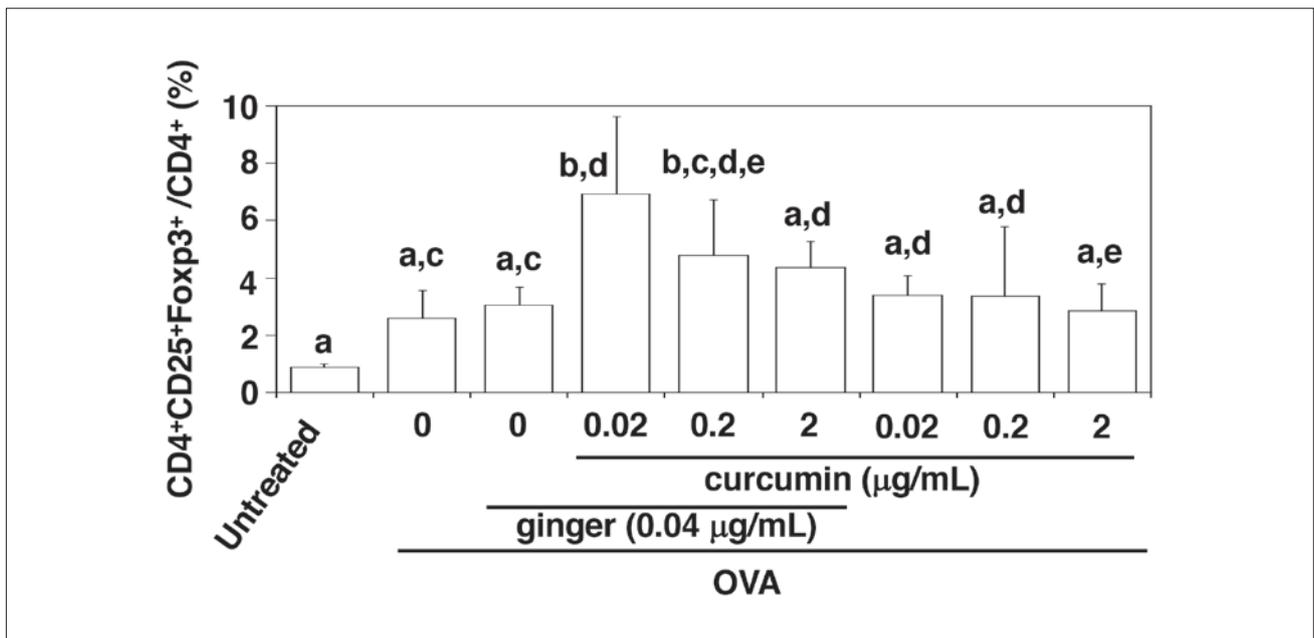


Fig. 3 Synergistic effect of curcumin and ginger on Treg induction. (n=4)

らのシグナルによって分化誘導されることが知られている。植物由来食品に多く含まれるポリフェノールの中には AhR を刺激する活性を有するものが存在していることが報告されており、クルクミンおよびしょうがやわさびに含まれる何らかの物質が AhR に認識され制御性 T 細胞の誘導を促している可能性が考えられる。一方で、ギンゲロールやカプサイシンには同様な活性は認められず、これらの物質は AhR を刺激できないことを示唆している。

制御性 T 細胞の誘導に対するクルクミンとしょうが抽出物の相乗効果の解析 (*in vitro*)

前述の通り、クルクミンとしょうが抽出物に制御性 T 細胞誘導活性が認められたので、これらを共存させることで相乗的に働くかどうかを検討した。その結果、両者が共存することで相乗的に活性が亢進することが示された (Fig. 3)。上述のようにポリフェノールの中には AhR を刺激するものが存在しているが、今回用いたクルクミンとしょうが抽出物中の活

性物質が AhR もしくはその他の同じ受容体を刺激しているのか、異なる受容体を刺激しているのかは今後の検討課題である。また、本研究で用いた実験系には T 細胞以外の細胞も混在しているため、それらの細胞を刺激して TGF- β やレチノイン酸の産生を促進させている可能性も考えられる。

クルクミンとしょうが抽出物の制御性 T 細胞誘導能の解析 (*in vivo*)

次に、クルクミンおよびしょうが抽出物をマウスに経口的に与えて実際に生体内でも制御性 T 細胞を誘導することができることを確認した。その結果、有意差は認められなかったものの、クルクミンとしょうが抽出物を摂取したマウスにおいて脾臓における制御性 T 細胞の割合が増加する傾向が見られた (Fig. 4)。また、両者を同時に与えた群ではそれぞれを単独で与えた群よりも割合が高かった。この結果より、クルクミンとしょうが抽出物は実際に生体内で制御性 T 細胞の誘導を相乗的に促進することが示唆された。ただし、今回はそれぞれ単一の摂取量でしか検討しておらず、摂取量を変化させた場合の影響については今後の課題である。また、本研究では OVA 含有飼料を与えてから 5 日目に効果が見られたことから腸内細菌叢の変化を介した間接的な影響ではなく、活性成分が腸管から体内に取り込まれ

て効果を発揮したと考えられる。これらの知見は *in vitro* での結果と矛盾しない。

クルクミンとしょうが抽出物による動脈硬化の予防効果の解析 (*in vivo*)

最後にしょうが抽出物の経口摂取が動脈硬化モデルマウスの発症を抑制できるかどうかを検討した。動脈硬化モデルマウスである ApoEKO マウスにクルクミンまたはしょうが抽出物の飲水を 12 週間与え続けても体重の増加には影響を与えないことが確認された (Fig. 5a)。また、本実験では標準食を与えた Untreated 群と高コレステロール食を与えたその他の群間にも体重の差異は認められなかった。クルクミンを 12 週間摂取した群において、高コレステロール食のみを摂取した Control 群よりもプラーク面積が抑制される傾向が認められた (Fig. 5b, 5d)。一方で、しょうが抽出物を摂取した群は Control 群よりもプラーク面積が増加する傾向が認められた。しかしながら、両者を同時に与えた群ではクルクミン単独群よりもさらにプラーク面積が抑制された。これにより、クルクミンとしょうが抽出物の摂取により動脈硬化の発症を予防できる可能性が示唆された。また、血管壁を Oil red O 染色した結果から、高コレステロール食を摂取した群では Untreated 群よりも血管壁における脂肪の蓄積が見られたもの

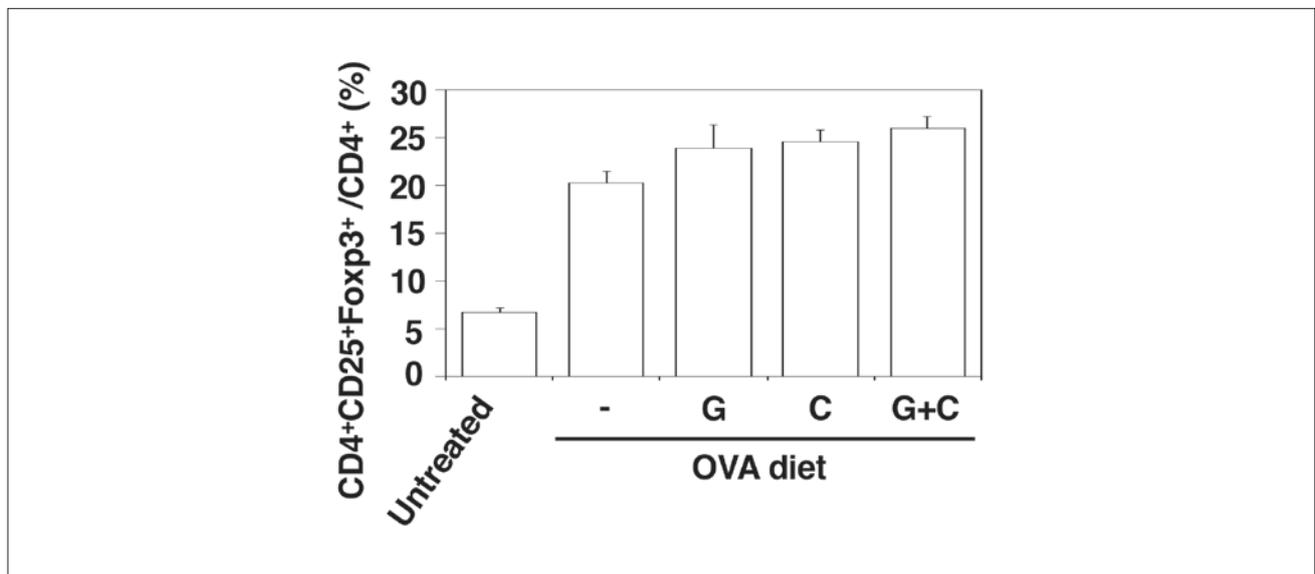


Fig. 4 Induction of Treg cells by oral administration of ginger (G) and curcumin (C). (n=4)

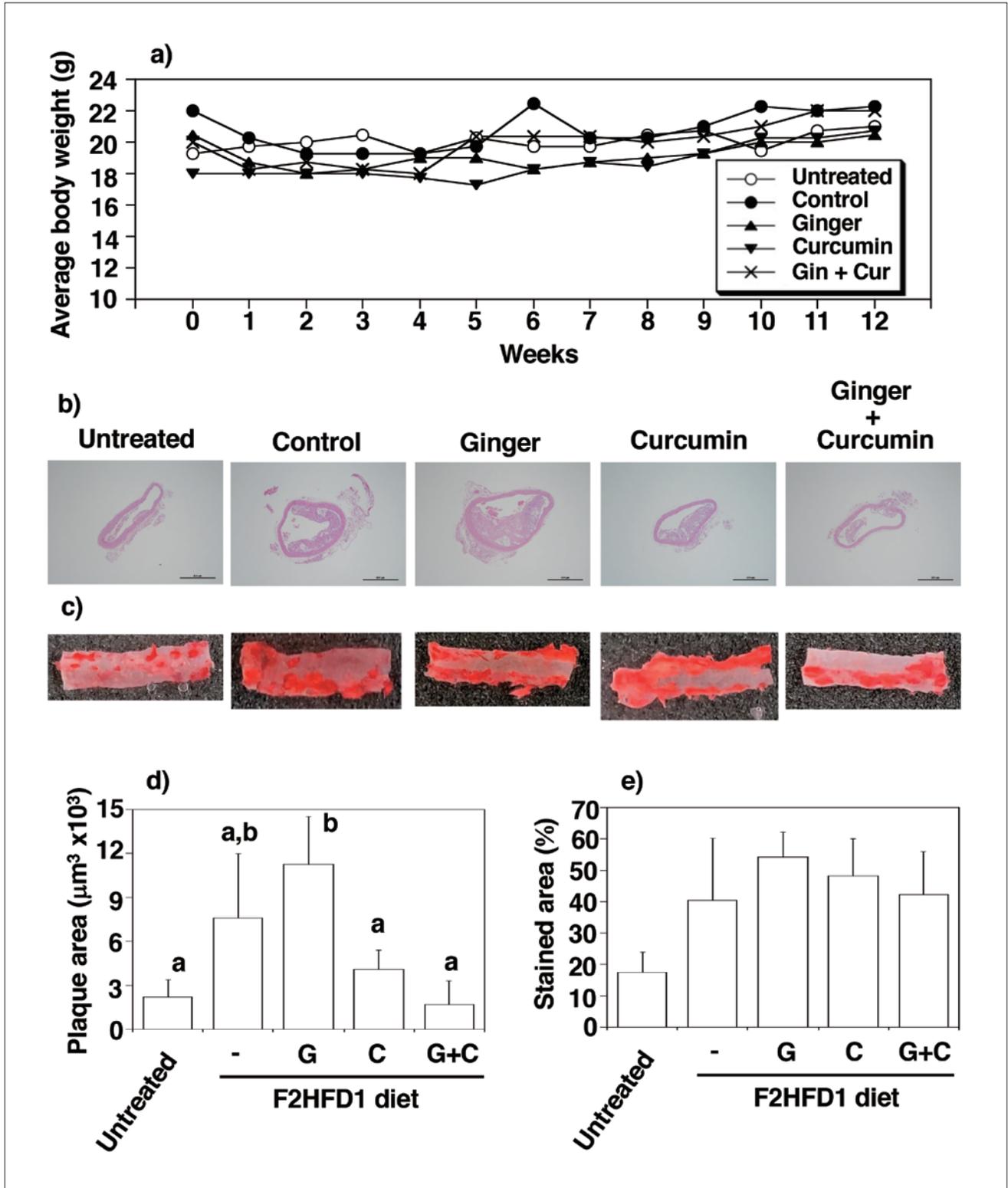


Fig. 5 Prevention of arteriosclerosis by oral administration of ginger (G) and curcumin (C). (n=3 or 4)

の、クルクミンとしょうが抽出物の摂取による影響は認められなかった (Fig. 5c, 5e)。この結果は、クルクミンとしょうが抽出物によるプラーク形成の抑制は脂肪蓄積量とは相関していないことを示してお

り、クルクミンとしょうが抽出物による慢性炎症の抑制が関与している可能性が考えられた。ここで見られたプラーク形成の抑制における制御性 T 細胞の寄与度については今後の検討課題であるが、Fig. 3

で示した通り、クルクミンとしょうが抽出物は全身免疫系における制御性 T 細胞の割合を増加させたことから、クルクミンとしょうが抽出物で誘導された制御性 T 細胞が血管における慢性炎症を抑制している可能性は十分に考えられる。

結 論

クルクミンは制御性 T 細胞を誘導することで体内局所の慢性炎症を抑制し、動脈硬化などの生活習慣病を予防できることが示唆された。また、しょうが抽出物と同時に摂取することで相乗的な効果が期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Suppression of life-style related diseases by curcumin, with a focus on its anti-chronic inflammatory activity

Tadashi YOSHIDA

Tokyo University of Agriculture and Technology

Recent studies have revealed that life-style related diseases are caused by chronic inflammation, suggesting that the inhibition of such inflammation could be a promising method of reducing the number of patients with such diseases. In this study, we examined the anti-chronic inflammatory activity of curcumin, as well as its synergistic effects with other ingredients. We then investigated whether curcumin could suppress the onset of arteriosclerosis using a murine model. The results showed that curcumin induced regulatory T cells (Treg cells), both *in vitro* and *in vivo*. In addition, the effect of curcumin was enhanced by co-administration with ginger extract. These findings suggested that curcumin might inhibit chronic inflammation, with induced Treg cells acting as a mediator, and ginger should enhance this effect. Finally, we demonstrated that curcumin suppressed the development of arteriosclerosis without inhibiting fat accumulation, suggesting that this protective effect was provided by the anti-inflammatory activity of curcumin. We also found that the suppressive effect of curcumin was enhanced by co-administration of ginger extract. While these findings support the results obtained from *in vitro* experiments, it will still be necessary to confirm the role of Treg cells in this model. In conclusion, the results of this study demonstrate that the daily consumption of curcumin can contribute to a reduction in the number of patients suffering from life-style related diseases.