

<令和3年度助成>

## ウコン含有化合物ビスクロンの抗炎症作用機序の解析

戸田 雅子

(東北大学大学院 農学研究科)

### 1. 背景と目的

慢性炎症は生活習慣病（肥満、糖尿病、脂質異常症、慢性腎臓病、非アルコール性脂肪肝炎など）やがんを含む加齢関連疾患に共通する基盤病態である。炎症は身体の免疫反応の一部であり、感染や組織損傷に対して惹起される防御メカニズムである。しかし炎症状態が継続すると慢性化し、組織損傷が疾患惹起へとつながる。先進国の多くは高齢者社会を迎えており、加齢関連疾患の発症予防や寛解促進のための、抗炎症作用をもつ食分子の活用が求められている。

ウコン (*Curcuma longa*) は食品スパイスとして広く利用されており、抗腫瘍作用や抗炎症作用、脂質低下作用をもつ化合物の供給源として注目されている。ウコン由来の機能性分子としてクルクミンの研究が進んでいるが、ウコンからは約 250 以上の化合物が単離されており、その多くはフェノール化合物やテルペノイド化合物である。ビスクロンはウコンに含まれるビスボラン型セスキテルペノイドである。これまでにビスクロンの脂質低下作用、抗酸化作用、肝障害抑制作用についての報告例は複数ある一方<sup>1-3)</sup>、抗炎症作用についての知見は限られている。以上の背景のもと、本研究ではビスクロンの抗炎症作用やその機序について解析することを目的とした。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 *in vitro* マクロファージ株を用いた抗炎症性作用の解析

マクロファージ株 RAW264.7 を用いて、ビスクロンの炎症性サイトカイン抑制効果を解析した。RAW 264.7 細胞を刺激分子 (Lipopolysaccharide : LPS) あるいはまたビスクロンで処理し、24 時間後の培養上清中の炎症性サイトカイン IL-6 や TNF- $\alpha$ 、抗炎症性サイトカイン IL-10 の濃度を ELISA により測定した。また、細胞シグナル伝達経路に対するビスクロンの作用を解析するために、LPS やビスクロンで処理後の RAW264.7 細胞を RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer により可溶化し、NF- $\kappa$ B 経路や Map kinase 経路の構成分子のリン酸化を western blotting により検出した。

#### 2.2 マウスにおける抗炎症性作用の解析

若齢マウスにおけるビスクロンの効果は、C57BL/6 マウス (6 週齢、日本クレア株式会社) と BALB/c マウス (6 週齢から 8 週齢、日本クレア株式会社) を用いて解析した。高脂肪飼料に Quick fat diet (粗脂肪約 15.3% : 日本クレア株式会社)、コントロール食としては CE-2 (日本クレア株式会社) を用いた。高脂肪食の開始から 6 週間後に、ビスクロン (約 100 mg/kg BW/day) (長良サイエンス株式会社) の経口投与を開始した。経口投与期間は 2 週間とし、高脂肪飼料は継続した。

高齢マウスにおけるビスクロンの効果は、C57BL/6 マウス (高齢マウス、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社) を用いて解析した。高脂肪飼料

に 60 kcal% Fat の High Fat Diet (D12492、リサーチダイエツト社)、コントロール食として 10 kcal% Fat の Normal diet (Matching Sucrose to D12492 : D12450J、リサーチダイエツト社) を用いた。High Fat Diet を摂食させたマウスは、試験食開始から約 2 週間後に 3 群に分け、ビスクロン高含有エキス (120 mg/kg BW/day)、クルクミン (100 mg/kg BW/day) (Sigma-Aldrich) あるいは vehicle の経口投与を行った。経口投与期間は 4 週間とし、高脂肪飼料は継続した。経口投与期間の終了後、マウスを安楽死させ、血清トリグリセリド値や血清コレステロール値などの生化学パラメーターを解析した。マウスの脾臓細胞を調製し、炎症性分子 LPS (1  $\mu$ g/mL) や Pam3CSK4 (5  $\mu$ g/mL) で刺激することで、炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインの応答性を解析した。さらに肝臓組織の還流後にコラゲナーゼ処理することで肝細胞を調製し、肝細胞における炎症性細胞 (M1 マクロファージ) の頻度を FACS により解析した。

### 2.3 マウス糞便を用いた腸内細菌叢と脂質プロファイルの解析

前項 2.2 で記したように、高齢 C57BL/6 マウスに High Fat Diet あるいは Normal diet を摂食させた。High Fat Diet を摂食させたマウスは、試験食開始から約 2 週間後に 3 群に分け、ビスクロン高含有エキス、クルクミン、あるいは vehicle の経口投与を開始した。経口投与開始から 4 週間後に糞便サンプルを回収し、16S rRNA 遺伝子解析により腸内細菌叢を解析した。また糞便サンプル中の脂質を Folch 法により抽出し、Positive mode における LC-MS/MS (Sciex X500R QTOF) 解析により抽出物中の脂質プロファイルを解析した。

## 3. 結果

### 3.1 マクロファージ株を用いた解析

RAW264.7 細胞は LPS 刺激により NF- $\kappa$ B 経路や MAP kinase 経路の活性化を介して炎症性サイトカ

イン IL-6 や TNF- $\alpha$  の産生を誘導する。また、転写因子 Stat3 の活性化が抗炎症性サイトカイン IL-10 の賛成に関与する。ビスクロンのマクロファージに対する作用を解析するために、RAW264.7 細胞を LPS やビスクロンで処理した。その結果、ビスクロンは LPS が誘導した IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 の産生を抑制した (Fig.1)。Western blotting により、細胞における NF- $\kappa$ B 経路や MAP kinase 経路の構成分子のリン酸化レベルを解析したところ、ビスクロンは LPS が誘導する NF- $\kappa$ B の主要サブユニット p65 のリン酸化や Stat3 のリン酸化を抑制する一方で、MAP kinase 経路の ERK1/ERK2 や JNK、p38 kinase のリン酸化レベルに影響を及ぼさなかった (Fig.2)。ビスクロン単独処理によるサイトカイン産生やシグナル伝達経路の活性化は検出されなかった。以上より、ビスクロンは NF- $\kappa$ B 経路の阻害を介して炎症性サイトカイン産生を抑制することが示された。また、ビスクロンは Stat3 のリン酸化抑制を介して、抗炎症性サイトカイン IL-10 産生も抑制することが示唆された。

### 3.2 若齢マウスを用いた解析

高脂肪食はヒトやマウスに炎症性微小環境を惹起するが、その環境形成に免疫系が深く関与する。まずはビスクロンが高脂肪食を摂取させた若齢マウスの血清脂質を含む生化学パラメーターや免疫組織の炎症反応に及ぼす作用を解析した。BALB/c マウス (雌) に高脂肪飼料 Quick fat diet を摂取させたところ、コントロール食に比較して顕著な体重増加は見られず (Fig.3A)、血液中の白血球数や赤血球数、血小板に顕著な差は無かったが (データ省略)、血清トリグリセリド値や血清 LDL コレステロール値の増加が検出された (Fig.3B)。高脂肪飼料を開始して 11 週間後にビスクロンの経口投与を 2 週間ほど行ったところ、体重減少は見られなかったが (Fig.3A)、血清トリグリセリド値と血清 LDL コレステロール値が低下した (Fig.3B)。血清グルコース値、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値や血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値

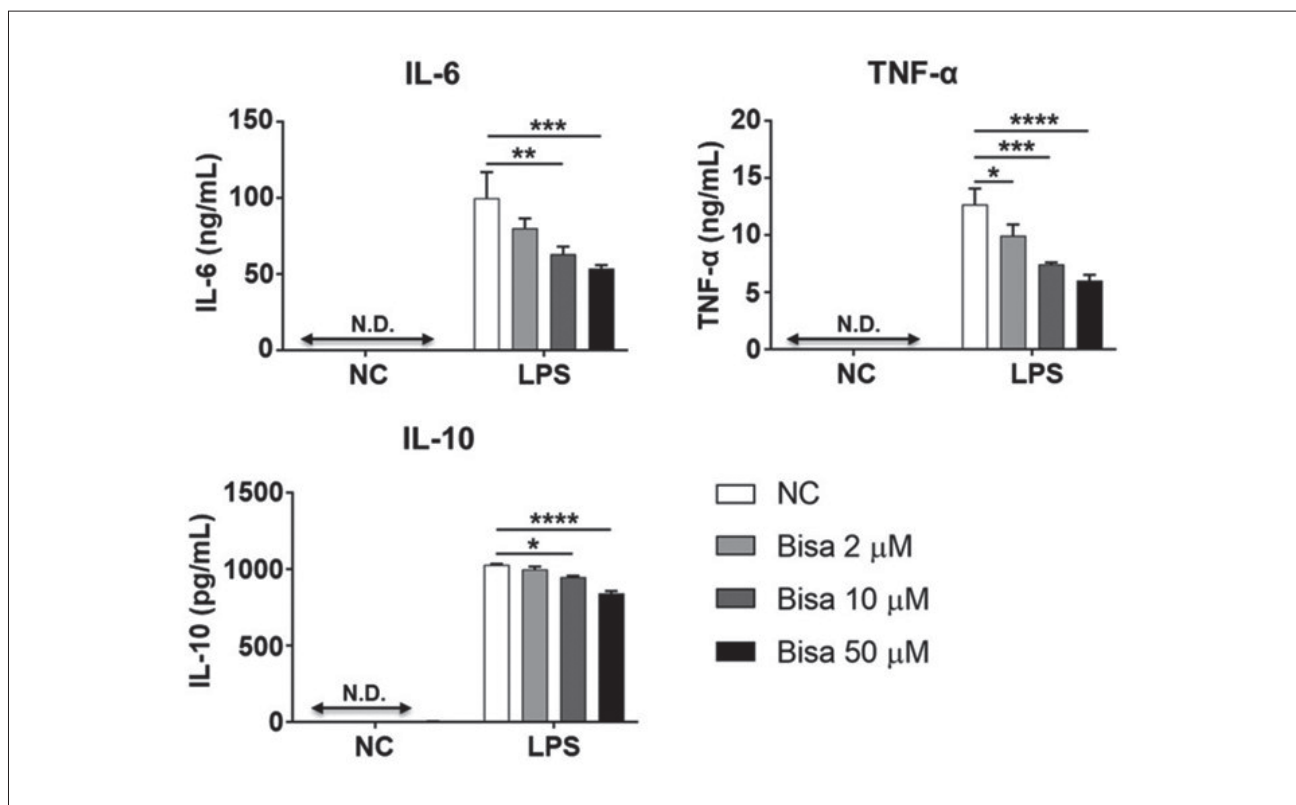


Fig.1 The influence of bisacurone on cytokine production in a murine macrophage line RAW264.7.

After the treatment of LPS and/or bisacurone, the concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 in the culture supernatants were measured by ELISA. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. Bisa: Bisacurone. N.D.: not detectable.

については、群間差は検出されなかった (Fig.3B)。ビスクロン群では肝臓の重量や脂肪沈着も減少していた (Fig.3B, Fig.4)。また、脾臓 (二次リンパ組織) 細胞のサイトカイン産生能を測定したところ、ビスクロン群では炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF- $\alpha$ ) 産生応答が低下していた (Fig.5)。上記と同様の実験を、C57BL/6 マウス (雌) を用いて行ったところ、ビスクロンの経口投与により血清トリグリセリド値や脾臓細胞の炎症応答の低下が観察された。また雌と雄を比較したところ、ウコン由来成分による脾臓細胞の炎症応答の低下は、雌の方が顕著な傾向にあった (データ省略)。

### 3.3 高齢マウスを用いた解析

生活習慣病の発症は中高年期が多い。特に肥満は体内の炎症レベルを亢進し、加齢性疾患の発症リスクを高める。そこで次にビスクロンの抗炎症性作用について、肥満を誘導しやすい高齢の C57BL/6 マウスの雄を用いて解析した。肥満と炎症誘導を確実に

にするため、60 kcal%脂肪含有量の高脂肪飼料を用いた。また、ビスクロンの価格が高いため、本実験ではビスクロン含有エキスをを用い、さらにウコン由来分子の一つであるクルクミンも解析対象として加えた。

高齢 C57BL/6 マウスに高脂肪飼料を2週間摂食させ、ビスクロン含有エキスとクルクミンの経口投与を4週間行った。ビスクロン含有エキス群とクルクミン群では、高脂肪飼料による体重増加と脂肪蓄積が抑制された (Fig.6A, 6B)。血清トリグリセリド値に関しては、高脂肪飼料群とコントロール飼料群でほとんど差がなく、ビスクロン含有エキスやクルクミン投与による影響は検出されなかった。血清コレステロール値に関しては、高脂肪飼料群で増加し、ビスクロン含有エキス群では抑制傾向にあった (Fig.6C)。

高齢マウスの免疫組織における炎症レベルを解析するため脾臓細胞のサイトカイン産生能を測定したところ、高脂肪飼料群に比較して、ビスクロン含有

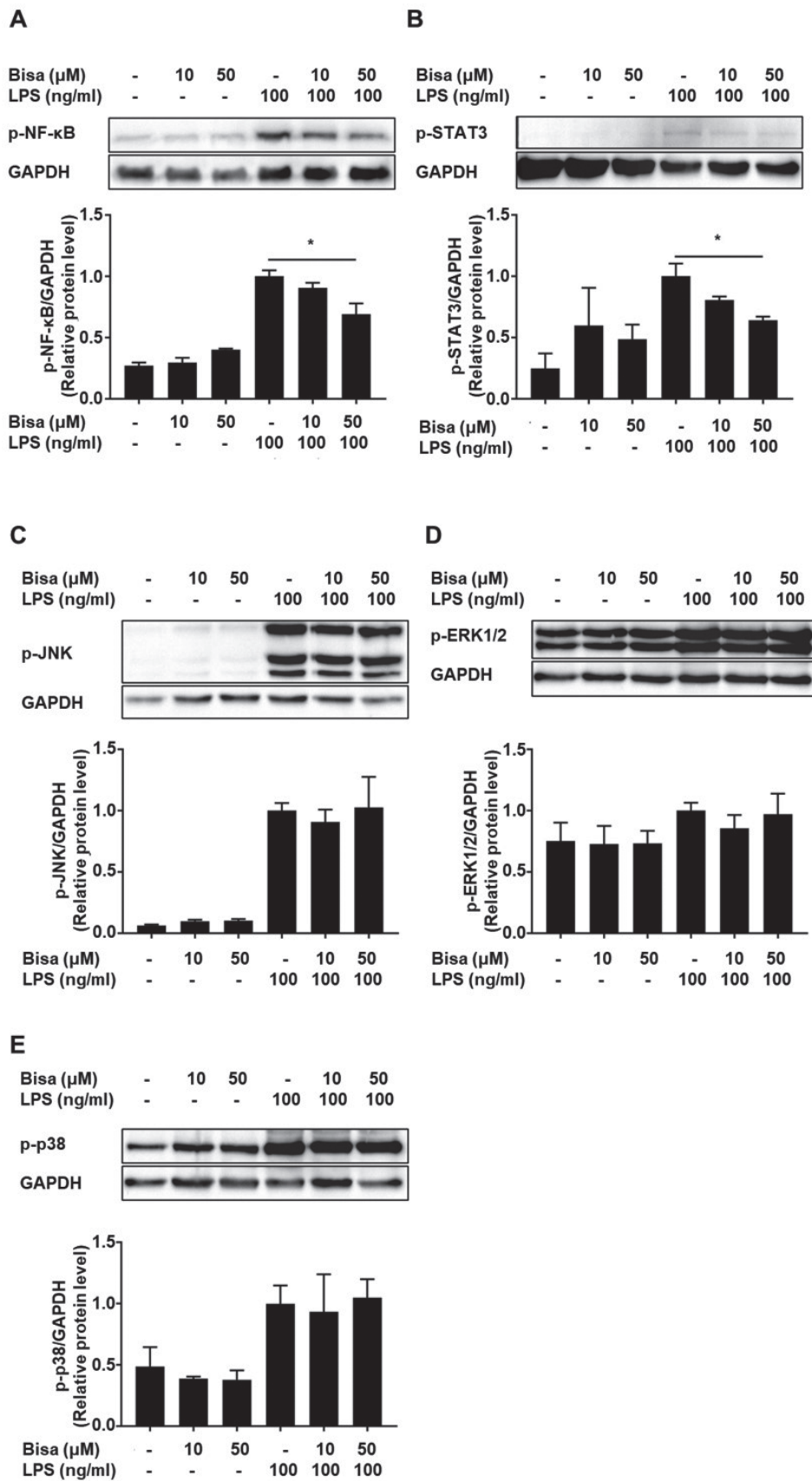


Fig.2 The influence of bisacurone on activation of signal transduction in a murine macrophage strain RAW264.7. After treatment with LPS/or bisacurone, phosphorylation of (A) NF- $\kappa$ B p65 subunit, (B) STAT3, (C) JNK, (D) ERK1/2, and (E) p38 kinase in the cells, together with GAPDH, was detected by western blotting. Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test. Bisa: Bisacurone.

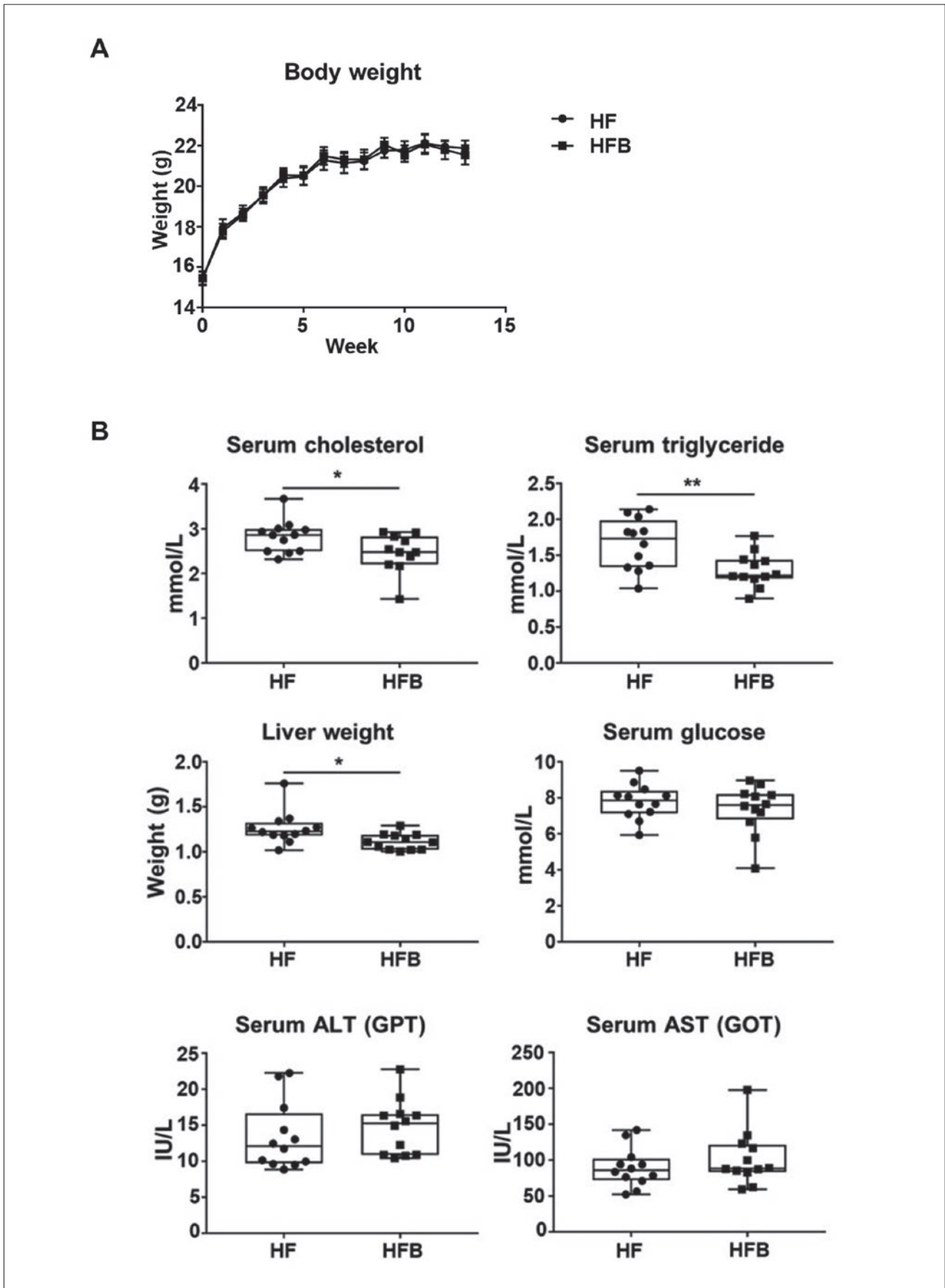


Fig.3 The influence of bisacurone on body weight and serum levels of biological parameters in high fat diet (HFD)-fed young mice. Data of (A) body weight and (B) biological parameters. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFB: HFD-fed and bisacurone-treated group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

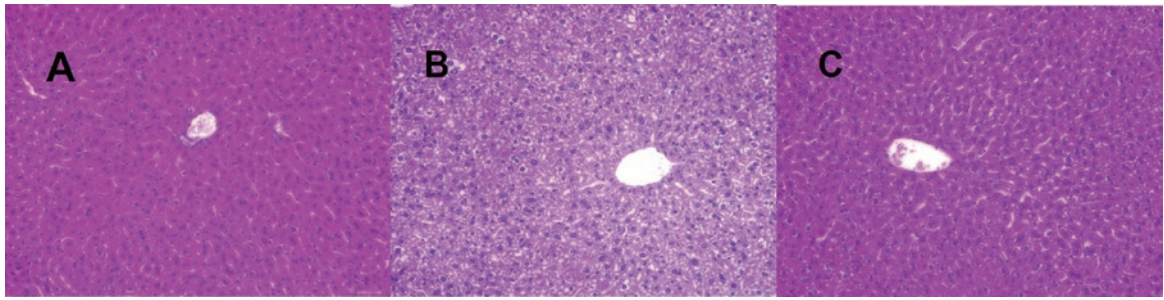


Fig.4 The influence of bisacurone on lipid deposition of liver in high fat diet (HFD)-fed young mice. (A) Control diet fed and PBS-treated group, (B) HF: HFD-fed and PBS-treated group, and (C) HFB: HFD-fed and bisacurone-treated group.

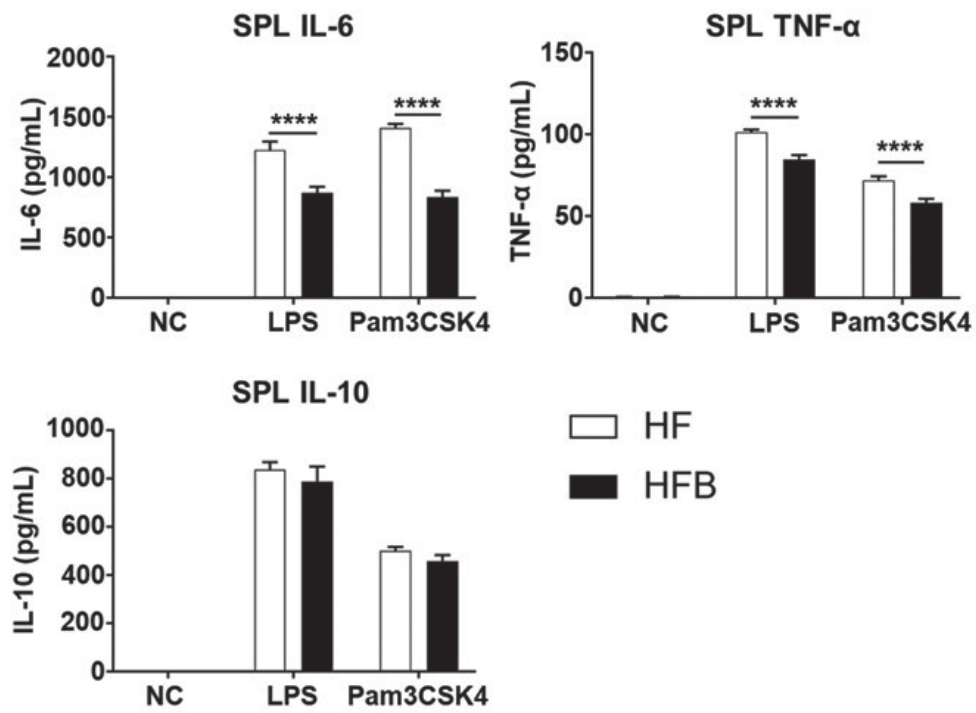


Fig.5 The influence of bisacurone on the production of cytokines in spleens of high fat diet (HFD)-fed young mice. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFB: HFD-fed and bisacurone-treated group. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , student's t-test.

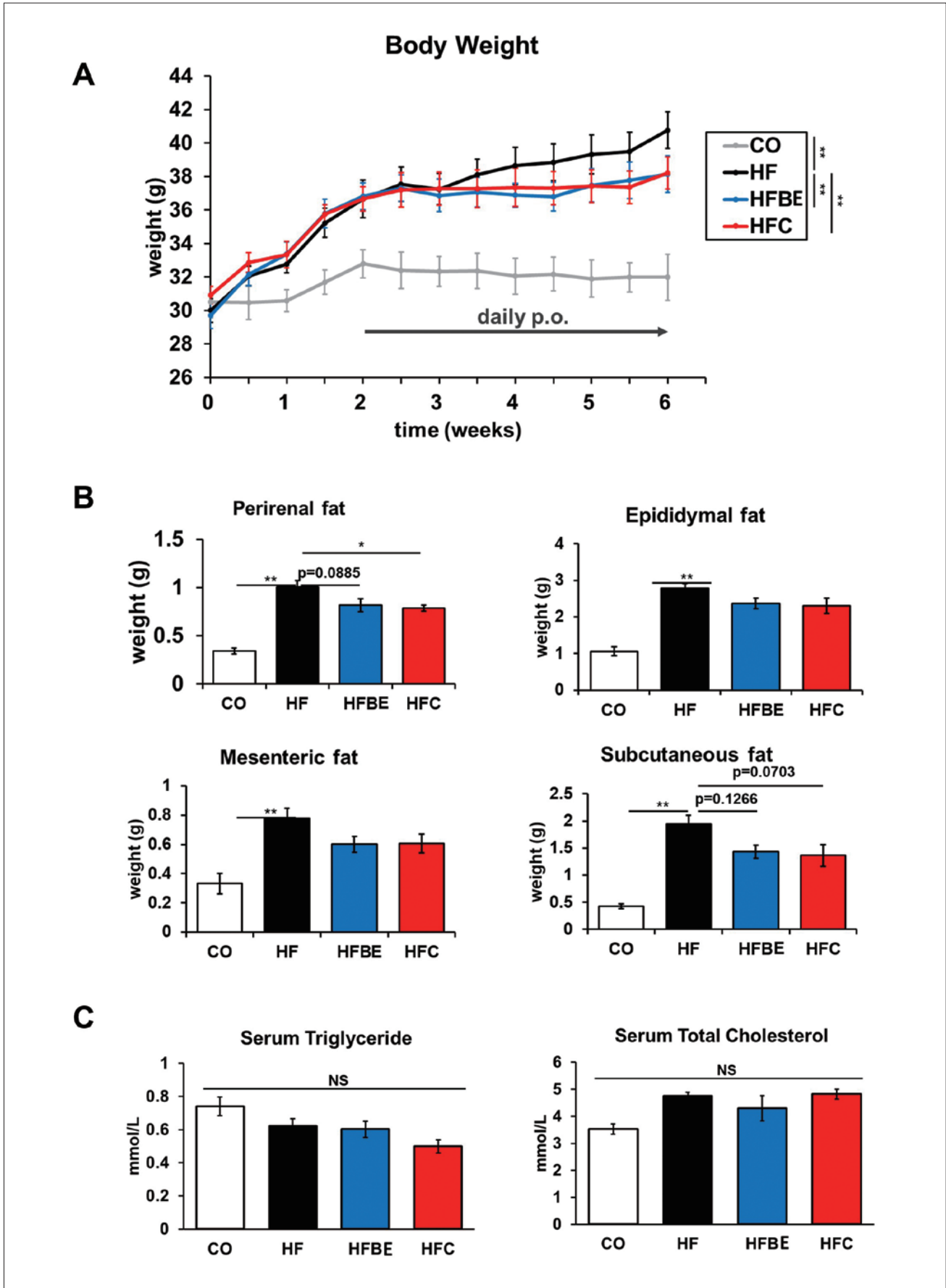


Fig.6 The influence of bisacurone extract and curcumin on body weight and lipid parameters in high fat diet (HFD)-fed aged mice. Data of (A) body weight, (B) volume of tissue lipids, and (C) serum levels of lipid parameters. CO: Control diet-fed and PBS-treated group. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFBE: HFD-fed and bisacurone extract-treated group. HFC: HFD-fed and curcumin-treated group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

エキス群とクルクミン群で炎症サイトカイン産生と抗炎症性サイトカインの産生レベルがともに低下していた (Fig.7)。次に、肝臓における炎症細胞の頻度を調べた。高脂肪食は肝炎惹起の因子となるが、炎症惹起には単球や M1 型マクロファージの組織への蓄積が関与する。そこで肝臓をコラゲナーゼ処理し、得られた細胞を FACS 解析に供したところ、単球や炎症型 M1 マクロファージの頻度は高脂肪飼料群で増加していたが、ビスアクロン含有エキス群とクルクミン群では減少していた (Fig.8)。

次に、ビスアクロン含有エキスとクルクミンがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。コントロール飼料群に比較し、高脂肪飼料群では Firmicutes 門の細菌叢が増加していた。高脂肪飼料群とビスアクロン含有エキス群、クルクミン群を比較した場合、Firmicutes 門の割合はほぼ同程度であった (Fig.9A)。しかしながら属レベルでは、高脂肪飼料群に比較して、ビスアクロン含有エキス群では *Lactococcus* 属 (Firmicutes 門 Bacilli 綱) や *Eubacterium coprostanoligenes* 属

(Firmicutes 門 Clostridia 綱)、*Anaerotruncus* 属 (Firmicutes 門 Clostridia 綱) の割合が低下しており、クルクミン群でも前者 2 つの細菌属の割合が低下していた (Fig.9B)。

最後にビスアクロン含有エキスとクルクミンがマウスの糞便の脂質プロファイルに及ぼす影響を LC-MS/MS により網羅的に解析した。Table.1 に各群で差が検出された代表的な脂質データを記す。高脂肪飼料群に比べて、ビスアクロン含有エキス群やクルクミン群では、Cholic acid sulfate (胆汁酸代謝物) や Acylcarnitine (脂肪酸β酸化経路の代謝物) の糞便含有レベルが増加する傾向にあった。また、Fatty acid amides (脂肪酸アミド) である N-acyl glycy l serine や N-acyl ornithine の糞便含有レベルもビスアクロン含有エキス群やクルクミン群で増える傾向にあった。以上より、ビスアクロン含有エキスやクルクミンは、高脂肪食条件下において、複数の脂質代謝経路の調節に関与することが示唆された。

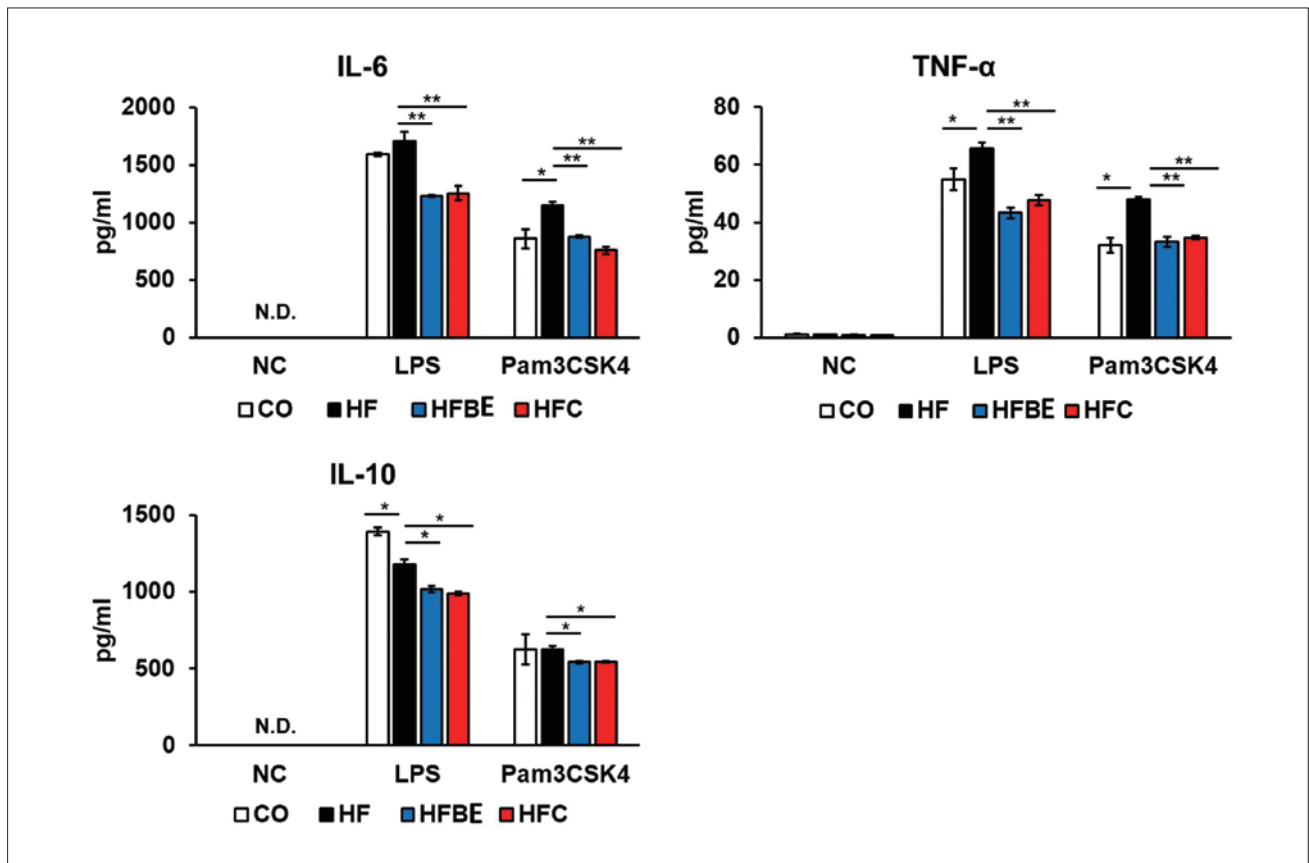


Fig.7 The influence of bisacronone extract and curcumin on the production of cytokines in spleens of high fat diet (HFD)-fed aged mice. CO: Control diet-fed and PBS-treated group mice. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFBE: HFD-fed and bisacronone extract-treated group. HFC: HFD-fed and curcumin-treated group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

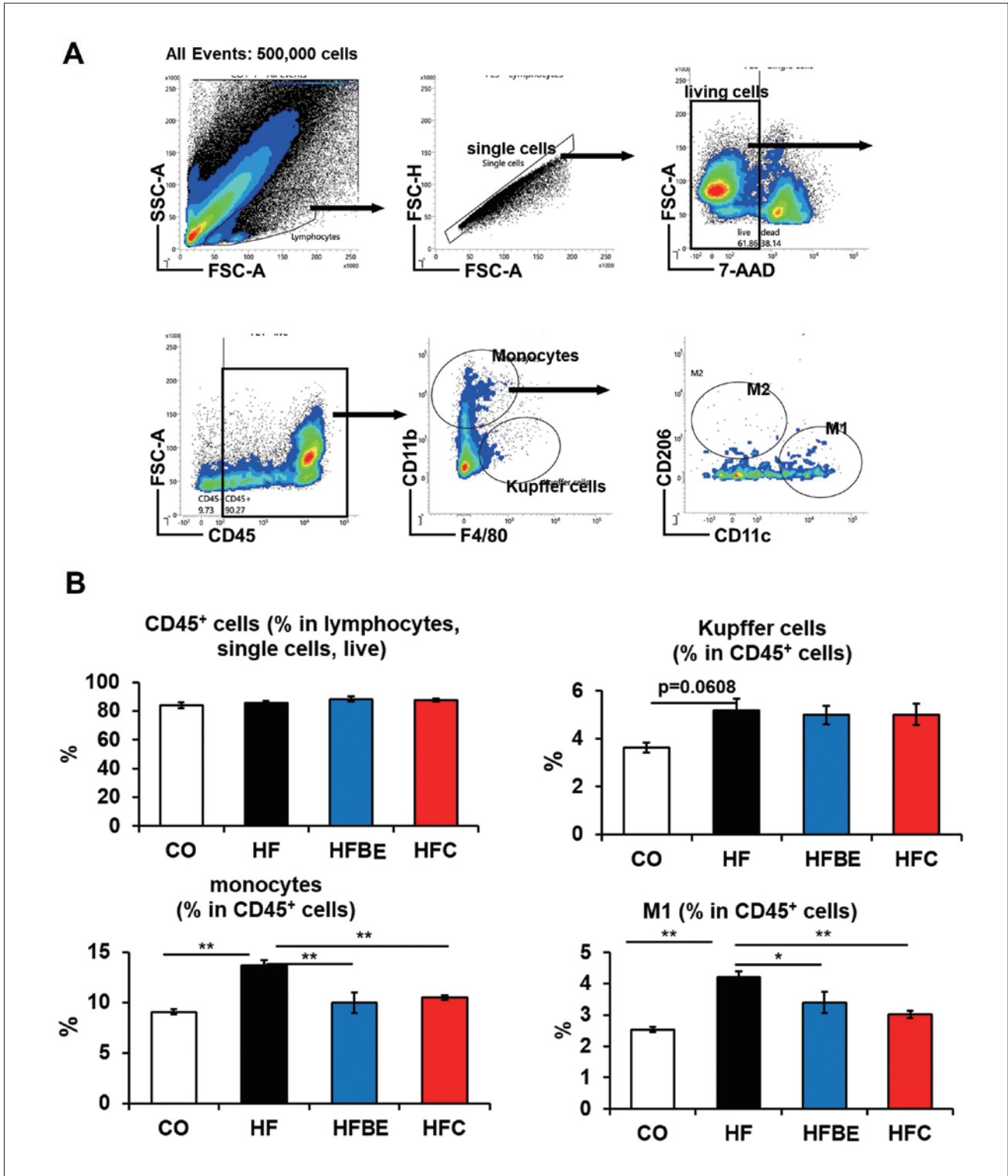


Fig.8 The influence of biscurone extract and curcumin on the M1 macrophages in livers of high fat diet (HFD)-fed aged mice.

(A) Gating strategy to analyze M1 macrophages in the livers, (B) The frequencies of target cells in single cell suspension of livers. CO: Control diet-fed and PBS-treated group mice. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFBE: HFD-fed and biscurone extract-treated group. HFC: HFD-fed and curcumin-treated group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test.

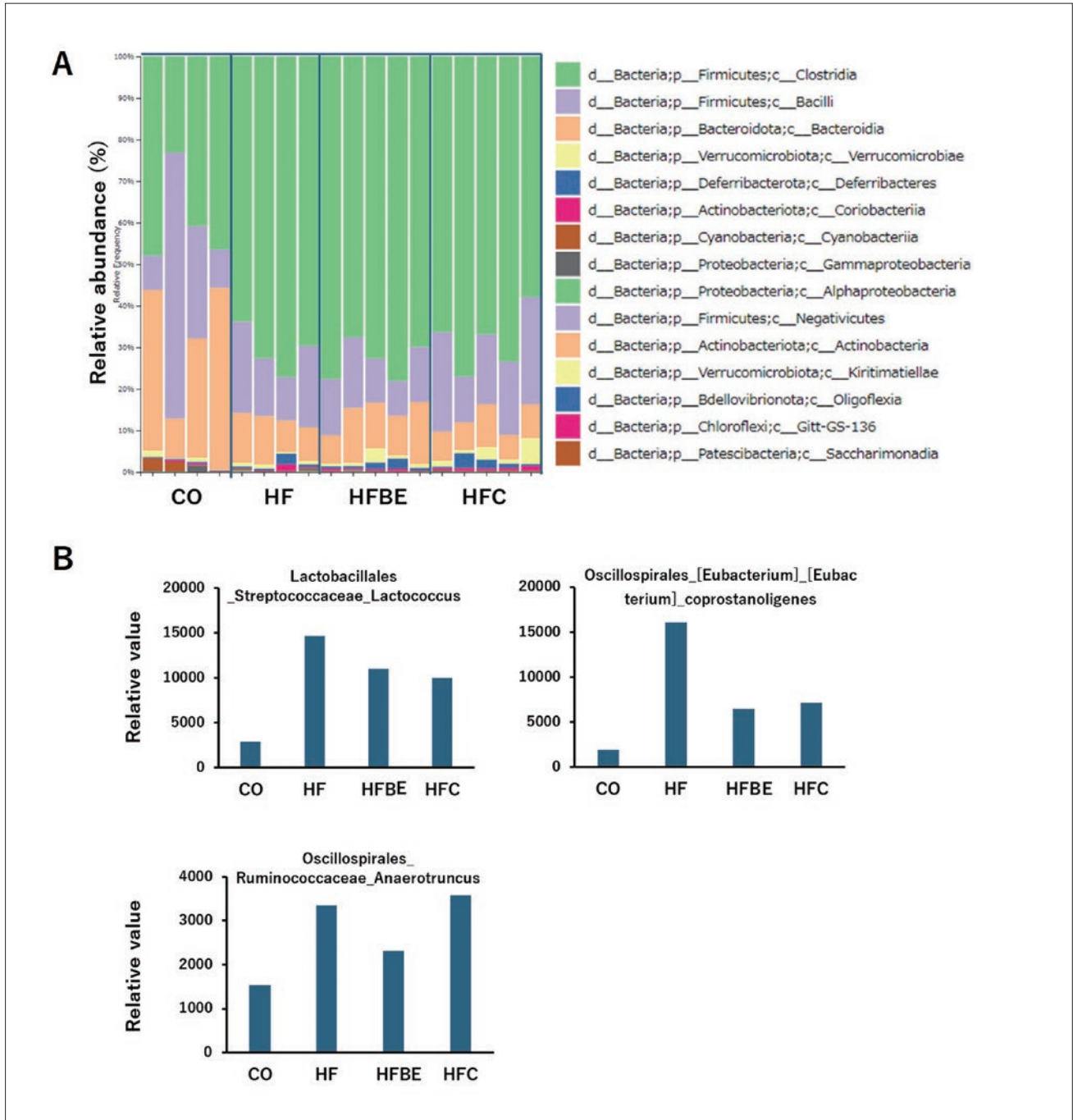


Fig.9 The influence of bisacurone extract and curcumin on gut microbiome in high fat diet (HFD)-fed aged mice. Analysis of gut microbiome at (A) class level and (B) group level in the mice using feces samples. CO: Control diet-fed and PBS-treated group mice. HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFBE: HFD-fed and bisacurone extract-treated group. HFC: HFD-fed and curcumin-treated group.

#### 4. まとめと今後の展望

ビスクロンは、若齢の高脂肪食条件下における血清 LDL コレステロールやトリグリセリド、肝臓における脂肪蓄積を抑制できると共に、免疫組織における炎症反応を抑制できることが示された。また、ビスクロン含有エキスやクルクミンは、高齢の高脂肪

食条件下における体重増加や皮下脂肪蓄積、免疫組織における炎症反応、そして肝臓における炎症性マクロファージの蓄積を抑制できることが示唆された。ビスクロンの抗炎症作用メカニズムは、マクロファージにおける NF- $\kappa$ B 経路抑制や炎症性マクロファージの組織へ遊走阻害などが考察される。炎症の抑制メカニズムの一つとして、抗炎症性サイトカ

Table.1 The influence of bisacurone extract and curcumin on lipid profile in feces of high fat diet (HFD)-fed aged mice.

Categories	Lipid main class	Lipid subclass	HF	HFBE	HFC
Sterol Lipids	Bile acids and derivatives	Cholic acid sulfate	0.91	2.24	4.60
Sterol Lipids	Bile acids and derivatives	Esterified deoxycholic acid	19.4	18.3	19.3
Fatty acyls	Fatty esters	Acylcarnitine	17.5	29.9	31.2
Glycerophospholipids	Glycerophosphocholines	Phosphatidylcholine	23.3	31.3	37.6
Glycerophospholipids [GP]	Glycerophosphoethanolamines	Phosphatidylethanolamine	13.6	13.9	25.9
Glycerolipids	Monoradylglycerols	Monoacylglycerol	20.8	34.4	36.3
Glycerolipids	Diradylglycerols	Diacylglycerol	24.1	40.9	41.9
Glycerolipids	Triradylglycerols	Ether-linked triacylglycerol	1.93	1.59	3.46
Fatty acyls	Fatty amides	N-acyl glyceryl serine	3.40	8.60	6.34
Fatty acyls	Fatty amides	N-acyl glycine	9.55	14.1	16.7
Fatty acyls	Fatty amides	N-acyl ornithine	5.60	13.69	15.9

HF: HFD-fed and PBS-treated group. HFBE: HFD-fed and bisacurone extract-treated group. HFC: HFD-fed and curcumin-treated group. The levels of lipids were analyzed by untargeted LC-MS/MS analysis in positive mode. The data was obtained by peak area of chromatogram in the LC/MS-MS analysis.

イン IL-10 を産生する制御性免疫細胞の誘導もあげられる。しかしながら、ビスクロンやクルクミンは脾臓細胞やマクロファージ株 RAW264.7 の IL-10 産生を抑制したことから、制御性免疫細胞の誘導効果は低いと考えられる。

食品分子は宿主と共に腸内細菌叢へも作用し、脂質代謝や炎症状態に影響を与える。ビスクロン含有エキスやクルクミンを投与した高脂肪食・高齢マウス群では、無処理の高脂肪食・高齢マウス群に比較して、糞便中の *Lactococcus* 属や *Eubacterium coprostanoligenes* 属の割合が減少していた。今後、ビスクロンやクルクミンの作用がこのような腸内細菌叢を介したものであるかを明らかにするために、例えば抗生物質を用いた解析などが必要である。

興味深いことに、高齢マウス由来糞便サンプルを用いた脂質プロファイルの解析により、ビスクロン含有エキスやクルクミンは、胆汁酸代謝や脂肪酸β酸化、脂肪酸アミドの調節に関与することが示唆さ

れた。今回は positive mode 条件下での網羅的 LC-MS/MS 解析により脂質プロファイルのデータを得たが、このデータの定量性に関する再現性をターゲット LC-MS/MS 解析により確認する必要がある。また、若齢マウスでも同様の脂質代謝変化が起こるのか、ビスクロンやクルクミンがどのような作用機序で脂質代謝経路に影響を及ぼすのか、この脂質代謝の調節が体重減少や体脂肪減少、抗炎症作用発現に関係するののかについての解析を行う計画である。本研究で得られた知見は、ビスクロンやクルクミンの新たな機能性発現メカニズムの解明に貢献すると期待される。

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。

## 参考文献

- 1) Sun D.-I., Nizamutdinova I.T., Kim Y.M., Cai X.F., Lee J.J., Kang S.S., Kim Y.S., Kang K.M., Chai G.Y., Chang K.C., et al. Bisacurone Inhibits Adhesion of Inflammatory Monocytes or Cancer Cells to Endothelial Cells through Down-Regulation of VCAM-1 Expression. *Int. Immunopharmacol.* 2008;8:1272-1281.
- 2) Ashida H., Tian X., Kitakaze T., Yamashita Y. Bisacurone Suppresses Hepatic Lipid Accumulation through Inhibiting Lipogenesis and Promoting Lipolysis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020;67:43-52.
- 3) Uchio R., Higashi Y., Kohama Y., Kawasaki K., Hirao T., Muroyama K., Murosaki S. A Hot Water Extract of Turmeric (*Curcuma longa*) Suppresses Acute Ethanol-Induced Liver Injury in Mice by Inhibiting Hepatic Oxidative Stress and Inflammatory Cytokine Production. *J. Nutr. Sci.* 2017;6:e3.

## **Study on the anti-inflammatory effects of bisacurone, a compound in *Curcuma longa***

**Masako TODA**

*Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University*

Turmeric (*Curcuma longa*) contains various compounds that may potentially improve health. Bisacurone is a turmeric-derived compound that has been studied less than other such compounds, such as curcumin. In this study, we aimed to evaluate the anti-inflammatory and lipid-lowering effects of bisacurone in high-fat diet (HFD)-fed mice. Young and aged mice were fed HFD to induce lipidemia and an inflammatory milieu, and orally administered bisacurone or a bisacurone-containing turmeric extract (BTE) daily for two to four weeks. Bisacurone reduced serum cholesterol and triglyceride levels in HFD-fed young mice, while BTE reduced body weight and tended to lower cholesterol in HFD-fed aged mice. In both young and aged mice, bisacurone or BTE reduced the inflammatory responses of splenocytes, the major immune cell population in systemic immunity. Moreover, BTE reduced the accumulation of monocytes and inflammatory M1 macrophages, a sign of inflammation, in the livers of HFD-fed aged mice. Western blot analysis revealed that bisacurone inhibits phosphorylation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit, but not of mitogen-activated protein kinases, p38 kinase and p42/44 kinases, or c-Jun N-terminal kinase in a macrophage strain. Collectively, these results suggest that bisacurone has the potential to reduce serum lipids and inflammatory levels in both young and aged mice, potentially via inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated pathways in immune cells and reduction of the accumulation of M1 macrophages in inflamed liver. This study provides insights on the use of bisacurone as a hypolipidemic and anti-inflammatory molecule for the development of functional foods.