

ポリフェノールの抗炎症作用について ～カカオ抽出物の大腸炎抑制作用～

村上 明

(京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻 助教)

1. はじめに

潰瘍性大腸炎やクローン病などのinflammatory bowel disease (IBD) は、大腸粘膜の損傷に伴う激しい腹痛・下痢などを主たる症状とする難治性の慢性疾患である。長期経過したIBDは大腸がんに進行するリスクも高く、そのメカニズムの解明と予防法の確立が求められている。近年、世界的に患者数は急激に増加しており、その病因として遺伝的・免疫学的要因や食事の影響、さらには腸内細菌の影響などが示唆されているが、治療に直接結びつくそれは未だ解明されていない。また、これまでの研究で、合成薬剤についての抑制効果を検討した例はいくつか報告されているが、作用メカニズムに関する知見は限定されている。そこで、本研究では、デキストラン硫酸塩 (DSS) による大腸炎発生の分子メカニズムを解析するとともに、その抑制食品因子を究明することを目的とした。

2. DSSによるIL-1 β 産生機構

5%DSSを飲水投与したマウスの大腸粘膜及び腹腔マクロファージ (pM Φ) における様々な炎症関連マーカーのタンパク質及びmRNA発現をそれぞれELISA法とRT-PCR法によって検討した結果、IL-1 β が最も早期にかつ時間依存的に発現した。また、リコンビナントのIL-1 β は大腸炎を誘導する一方で、その中和抗体はDSSによる炎症を緩和できたことから、本サイトカインがDSS誘導大腸炎における重要な炎症イニシエーターであることが示唆された。さらに、IL-1 β が誘導するサイトカインについて、IL-1 β 自身とIL-6が同定できた。従って、これらのサイトカイン産生はDSS炎症の発症において必須であると考えられる¹⁾。

次にDSS刺激したpM Φ におけるIL-1 β 産生機構について検討した。カスパーゼ-1 (プロ型のIL-1 β を活性化型へ変換する酵素) 活性及びMAPキナーゼの活性化を測定した。その結果、DSS刺激したpM Φ では、IL-1 β の産生に先立ってカスパーゼ-1活性の上昇が認められ、活性酸素の生成、ERK1/2及びp38 MAPK経路の活性化が重要である一方で、JNK1/2経路は関与しないと推察された。さらに、スカベンジャー受容体 (SR) であるCXCL16がDSSの受容体の1つである可能性が示唆された (図1)²⁾。

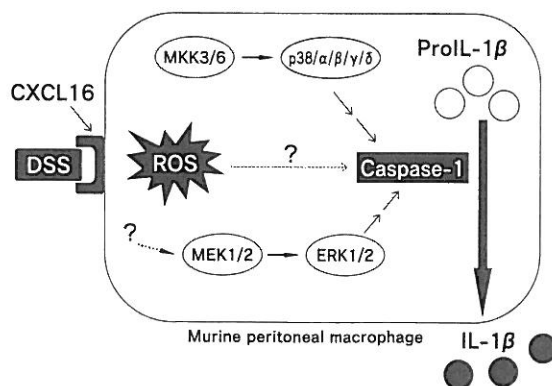


図1 推定されるIL-1 β 産生分子機構

活性酸素の生成源は特定できていないが、CXCL16などのSRの下流にはNADPHオキシダーゼ (NOX) が存在していることからNOXを介した経路と考えるのが妥当であろう。

3. IL-1 β 産生抑制成分のスクリーニング

次に39種類の天然及び合成化合物に関して、IL-1 β 産生抑制スクリーニングを行った結果、 α -トコフェロールやフラボノイド配糖体のルチンなどが高い抑制効果を示した。しかし興味深いことに、ルチンのアグリコンであるケルセチンは逆にIL-1 β 産生を増強した (図2)³⁾。

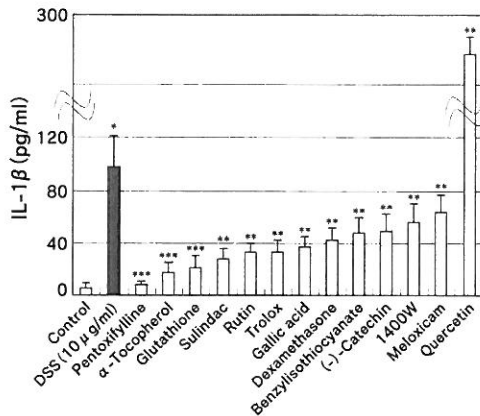


図2 pM Φ におけるIL-1 β 産生抑制活性スクリーニング (* $P < 0.01$ vs Control, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs DSS)

そこで、濃度依存性を検討したところ、ルチンは濃度依存的 (0.01–100 μ M) で顕著な抑制効果を示した。しかし、ケルセチンは0.01–0.1 μ Mでは抑制傾向が見られたが、100 μ Mでは逆にIL-1 β 産生を2倍以上増強し、濃度によって作用性が逆転するという重要な結果を得た。

4. マウスDSS大腸炎に対するルチンとケルセチンの効果

DSS誘発マウス大腸炎モデルにおいて、0.1%のルチン及びケルセチンをマウスに二週間混餌投与し、後半の一週間のみ5%DSSを飲水投与した。大腸粘膜中のIL-1 β タンパク質や各種炎症関連遺伝子を解析した結果、ルチンはIL-1 β /IL-6 mRNAの発現を顕著に抑制したが、ケルセチンは全く抑制しなかった (図3)。また、ルチンは0.01%でも有効であり、さらに0.1%ルチンはDSS投与後3日目から投与を開始する治療プロトコールでも有効な炎症抑制作用を示した⁴⁾。

5. マウスDSS大腸炎に対するカカオエキスの効果

50%エタノールで抽出した脱脂カカオ抽出物 (CEt) 配合飼料をマウスに投与して、DSS誘発大腸炎に対する抑制効果を検討した。CEt混合餌をICRマウス (雌、7週齢) に自由摂取させた。2週間後、飲料水を3% DSS水に変更し、さらに1週間

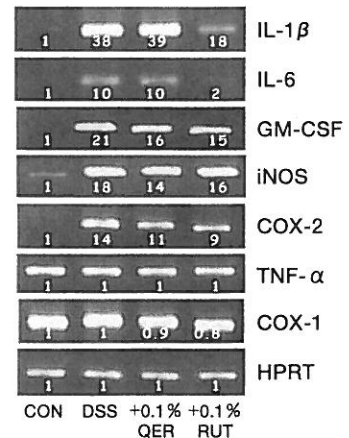


図3 炎症関連遺伝子発現に対するケルセチン (QER) とルチン (RUT) の効果

継続飼育した。DSS投与期間中、便性状、肛門周囲の出血について観察を行った。試験最終日に解剖し、大腸長、大腸粘膜中の炎症性物質 (IL-1 β) を測定した。

大腸炎を発症すると、下痢、血便、体重減少などが観察され、個体によっては衰弱死する。大腸が炎症を起こした結果、大腸に萎縮が生じ、大腸長が短くなるのが観察される。今回の試験では、下痢・血便の様子 (便性スコア)、体重減少、大腸長短縮を指標にし、カカオ抽出物が大腸炎症状を緩和するかどうかを検証した。その結果、各群で摂餌量と飲料摂取量を記録したが、群間で大きな差は見られなかった (図4)。

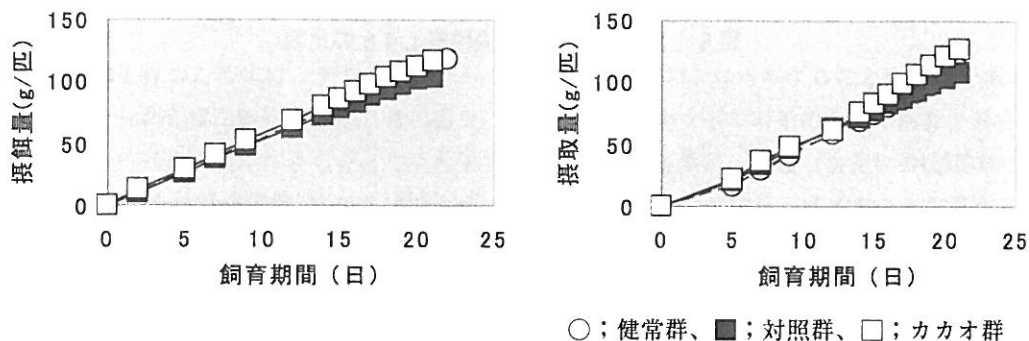


図4 摂餌量累積 (左) および飲料摂取量累積 (右)

また、CEt摂取群は、非摂取群に比べ、DSS投与による体重減少が抑制された (図5左)。また、便の状態を数値化するために、便の硬さと出血の様子をスコア化し、合計を便性スコアとして記録したところ、CEt摂取群 (カカオ群) は、非摂取群 (対照群) に比べ便性スコアも改善されることが明らかとなった (図5右)。

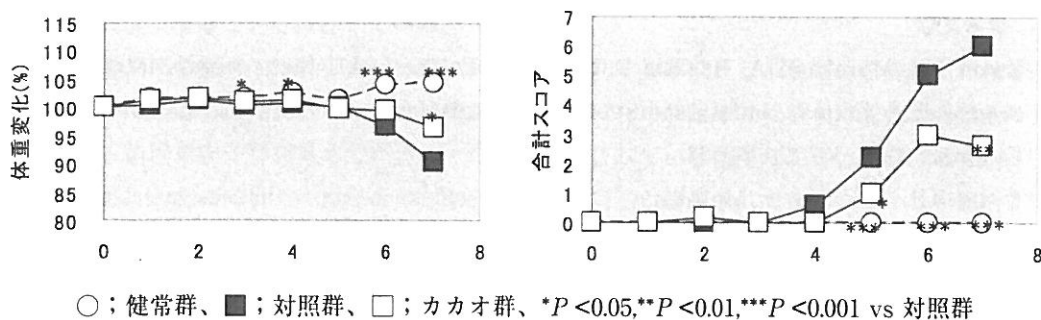


図5 大腸炎誘発後の体重変化 (左) および大腸炎誘発後の便性スコア (右)

次に各群におけるマウスの大腸長を比較した。CEt摂取群 (カカオ群) と非摂取群 (対照群) とともに健常群に比べて大腸が短縮していたが、カカオ群は対照群に比べて大腸の長さが有意に長く、DSS炎症に起因する大腸長の短縮が抑制されていた (図6左)。また、大腸粘膜の炎症性物質を測定したところ、カカオ群の大腸ではIL-1 β 量が少ない傾向が確認された (図6右)。

以上の結果より、脱脂カカオ抽出物に大腸炎予防効果があり、その炎症抑制メカニズムの一端は、大腸の炎症性物質であるIL-1 β を抑制することによることが示唆された。

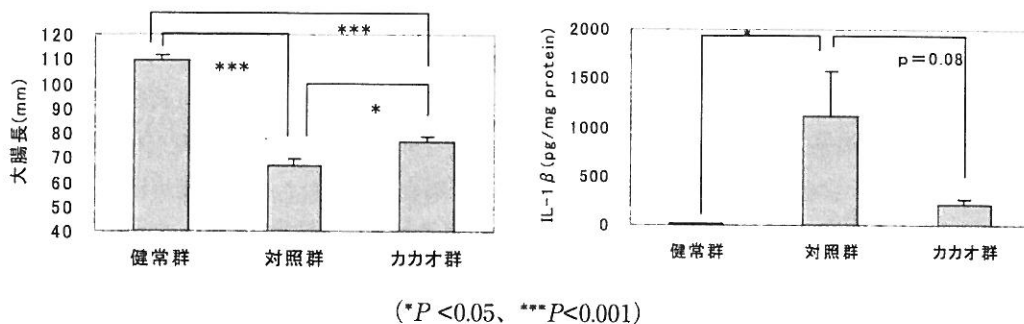


図6 大腸長および大腸粘膜IL-1 β の比較

6. おわりに

本研究では、マウスモデルを用いたDSS大腸炎の発症機構について重要な知見をいくつか得ることができた。しかし、臨床におけるIBDの発症過程にDSSが関与することはなく、本研究での結果を直接的に適用することはできない。

それでもなお、IBD発症機構においては酸化ストレスが関与することが多くの研究例で強く示唆されており、天然抗酸化物質の果たす役割は小さくないと言えよう。事実、ポリフェノールが豊富な脱脂カカオ抽出物がマウス大腸炎を著名に抑制したことは示唆に富む。

その一方で、近年の研究結果において、抗酸化成分は実験条件によっては酸化促進作用を示す場合も知られており、私たちが最近、緑茶カテキンを使ったマウス大腸炎試験でこの現象を確認している⁵⁾。従って今後、抗酸化成分を用いた大腸炎抑制試験では、詳細な用量依存性や副作用の有無の評価などを含めた多角的な解析を行うことが必要であろう。

7. 参考文献

- 1) Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H., Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ; 337 (2) : 647-54.
- 2) Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci.* 2007 ; 81 (5) : 362-71.
- 3) Kwon KH, Murakami A, Ohigashi H, Suppressive effects of natural and synthetic agents on dextran sulfate sodium-induced interleukin-1beta release from murine peritoneal macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 ; 68 (2) : 436-9.
- 4) Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H., Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2005 ; 69 (3) : 395-406.
- 5) Kim M, Miyamoto S, Ohigashi H, Tanaka T, Murakami A. The modifying effects of green tea polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis in male ICR mice., *Biofactors*, in press, 2009.