



Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉本, 健 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1239

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 386号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	杉 本 健		
論文題目	Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid - induced colitis in mice (マウス trinitrobenzene sulfonic acid 大腸炎に対するクルクミンの 予防効果および治療効果)		

博士(医学) 杉 本 健

論文題目

Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice

(マウス trinitrobenzene sulfonic acid 大腸炎に対するクルクミンの予防効果および治療効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

炎症性腸疾患に対する治療のターゲットとして、最近注目されているのが、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6等の炎症性サイトカインの誘導に関わる転写因子 NF- κ B である。マウス trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 大腸炎モデルにおいて、NF- κ B のオリゴヌクレオチドを注腸することにより直接 NF- κ B を抑制して腸炎を改善できたという報告があり (Nat Med 1996, 2:998-1004)、また、従来炎症性腸疾患の治療薬として使用されているサラゾピリン、5-ASA、ステロイドも NF- κ B を抑制することで治療に関与しているということも報告されている (Gastroenterology 2000, 119:1209-1218、Am J Gastroenterol 2000, 95:3452-3457、Science 1995, 270:286-290)。しかし、それらの薬剤は重大なさまざまな副作用を有していること、また長期投与しなければならない現状を考えると、より安全で副作用の少ない治療薬を開発する必要があると思われる。

クルクミン (Cur) は *Curcuma longa* Linn (turmeric) より得られる物質で、カレー色素等に広く使用されており、また抗腫瘍効果、抗炎症効果等の様々な薬理学的作用を有することが知られている (Cancer Lett 1995, 94:79-83、Exp Hematol 1997, 25:413-422)。Cur の抗炎症効果には NF- κ B や c-Jun/AP-1 等の転写因子の抑制効果に関与していることがわかっているが (J Immunol 1999, 163:3474-3483)、Cur の大腸炎に対する効果についてはいまだ不明である。今回我々は、炎症性腸疾患のマウス動物実験モデルである TNBS 大腸炎に対する Cur の効果について検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1) 7-8週齢のオスの C57BL/6 マウスに 2.5mg の TNBS を注腸して大腸炎を作成した。(2) この大腸炎に対する Cur の用量依存効果を検討するために、0.5% (w/w)、2.0%、5.0% の割合で餌に Cur を混合し、TNBS 注腸直後より経口投与した。(3) Cur の大腸炎予防効果および治療効果を検討するため、2.0% Cur 含有餌を TNBS 注腸 3 日前 (予防投与群)、注腸直後 (早期治療群)、注腸 2 日後 (後期治療群) より経口投与した。Cur 投与は注腸 7 日後まで継続した。(4) TNBS 大腸炎は wasting disease のため、効果判定として生存率、体重変化、組織スコアを評価した。(5) 免疫組織化学染色を施行し、大腸組織における CD4 陽性 T 細胞の浸潤を評価した。(6) 大腸粘膜上皮および大腸組織におけるマクロファージの NF- κ B の発現を免疫組織化学染色・免疫蛍光組織染色で検討した。(7) 大腸組織における NF- κ B 活性を electrophoretic mobility shift assay にて、定性的に評価した。(8) 大腸組織におけるサイトカイン mRNA の発現を RT-PCR で評価した。

〔結果〕

(1) Cur は用量依存性に TNBS 腸炎による死亡率を改善させ (0.5% Cur で 25.9%、2.0% Cur で 23.1%、5.0

- % Cur で16.7%)、さらに、予防投与として注腸2日前より2.0% Cur を投与した群では死亡例は見られなかった。 $(P<0.02)$ 。
- (2) Cur の投与により体重変化および大腸炎組織組織スコアの改善を認め、組織スコアに関しては用量依存性の効果がみられた。Cur の濃度を2.0%に固定した場合は、治療するタイミングが早いほど組織像は良くなる傾向を示した。
 - (3) CD4 陽性 T 細胞の免疫組織化学染色を行うと TNBS 腸炎の大腸粘膜では、著明な CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認めるが、Cur の投与により CD4 陽性 T 細胞の浸潤は抑制された。
 - (4) 大腸粘膜における NF- κ B p65 および I κ B の免疫組織化学染色を施行したところ、TNBS 腸炎の大腸粘膜上皮では、p65 の染色にて、核が鮮明に染色されるが、I κ B の染色では、明瞭な染色は認められなかった。一方、Cur を投与したマウスの大腸粘膜では、p65 の染色は不明瞭で、逆に I κ B は細胞質にリング状に明瞭に染色された。
 - (5) 大腸組織より核を抽出し NF- κ B 活性を gel shift assay にて定性的に評価したところ、Cur の治療により大腸粘膜の NF- κ B の活性が抑えられていることが確認できた。
 - (6) 大腸粘膜のマクロファージに対する Cur の NF- κ B 抑制効果を確認するために、Mac1 と I κ B の蛍光2重染色を施行した。TNBS 腸炎の大腸粘膜には多数の Mac1 陽性細胞が存在していたが、これらのほとんどの細胞では I κ B は negative であった。一方、Cur で治療したマウスの大腸粘膜では Mac1 陽性細胞は少数認められるにすぎなかったが、これらの細胞では I κ B は陽性であった。
 - (7) 大腸粘膜におけるサイトカイン mRNA の発現について検討したところ、TNBS 腸炎では IL-6、IL-12、IFN- γ および TNF- α の発現が上昇していたが、Cur による治療によりこれらの発現は抑えられた。

[考察]

今回の研究より、Cur は大腸粘膜上皮および大腸粘膜のマクロファージに作用し、I κ B の degradation を抑制し、p65 の核内への移行を阻害することにより、NF- κ B 活性を抑制していることが確認できた。これに伴い IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 等の炎症性サイトカイン産生が抑制され、その結果 Cur は TNBS 大腸炎を改善させると推察された。

[結論]

Cur の予防投与により TNBS 大腸炎の死亡率は有意に改善した。Cur の投与はマウス TNBS 大腸炎を用量依存性・時間依存性に改善させた。この結果は、Cur の大腸粘膜における NF- κ B の抑制によるものと考えられた。以上より、Cur はヒトの炎症性腸疾患の治療薬として有効である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

潰瘍性大腸炎、Crohn 病などがヒトにおける代表的な炎症性腸疾患である。実験的には、遺伝子操作マウスで自然発生的にみられたり、薬剤投与により誘発できる。その病態に関与する因子として、CD4 陽性 T 細胞の機能異常とそれとともなう IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの過剰産生とその転写因子である NF- κ B の制御異常が注目されている。とくに、NF- κ B の転写機能を抑制するような治療法が実験的アプローチや臨床の場で効果をあげている。ただ、現状では、このような薬剤は様々な副作用を持っており、より安全性の高い治療薬の開発が期待されている。

クルクミンはターメリックから抽出された物質で、抗腫瘍効果、抗炎症効果を持つことが古くから知られている。遺伝子レベルでの解析で、これら効果の一部はNF- κ Bなどの転写因子の抑制に基づくことが明らかになっている。

本論文申請者は、クルクミンの持つこのような薬理作用が炎症性腸疾患の治療薬として有効かどうかを、マウス trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎で検討した。用いたマウスは C57BL/6 と BALB/c で、TNBS を注腸投与により腸炎を作成後、生存率、体重の変化、病理組織的検討による炎症の程度、NF- κ B の腸での発現を調べた。同時に、クルクミンを腸炎作成前後に経口投与し、抗炎症効果を検討した。

本論文で明らかになった点は、以下のとおりである。

クルクミン非投与群とくらべて、クルクミン投与群では

- (1) あきらかに生存率が高かった。とくに、クルクミンを前投与した群では死亡したマウスは見られなかった。
- (2) 腸炎により減少した体重の回復が強く見られた。
- (3) HE 染色標本での、炎症スコアは低く、炎症が抑制されていた。
- (4) CD4 陽性 T 細胞の浸潤が弱かった。
- (5) NF- κ B の発現は gel shift assay および免疫染色法で見ると、抑制されていた。
- (6) 炎症性サイトカイン mRNA の発現は抑えられていた。

これらの所見から、クルクミンが実験的腸炎において用量依存性・時間依存性に抗炎症作用を示したことが明らかになった。作用の一部として、転写因子である NF- κ B の転写抑制が考えられた。さらに、すでに腸炎を発症したマウスに投与しても、一定程度の抗炎症作用がみられたことより、論文申請者は、クルクミンがヒトにおける炎症性腸疾患の治療薬として用いられる可能性を示した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) TNBS 腸炎の手技と実際に起きる腸での炎症の範囲
- 2) マウスの系、年齢による腸炎発症率の違い
- 3) クルクミンの腸からの吸収率
- 4) クルクミン投与による食事性向の変化
- 5) 腸炎マウスにおける死亡の原因
- 6) 腸炎発症における CD8 陽性細胞の関与
- 7) 潰瘍性大腸炎、Crohn 病と TNBS 腸炎の臨床的、病態的比較

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 瀧 川 雅 浩

副査 梶 村 春 彦 副査 大 橋 弘 幸