OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Perilla frutescens extract ameliorates DSS-induced colitis by suppressing proinflammatory cytokines and inducing anti-inflammatory cytokines
Author(s)	宇留島, 隼人
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51979
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

Synopsis of Thesis

氏　名 Name	宇留島　隼人
論文題名 Title	*Perilla frutescens* extract ameliorates DSS-induced colitis by suppressing proinflammatory cytokines and inducing anti-inflammatory cytokines （シソエキスは炎症性サイトカイン産生抑制ならびに抗炎症性サイトカイン分泌促進作用をもってDSS誘導腸炎を軽減する）

【背景】

シソは東南アジア原産の一年草であり、シソの葉は防腐効果を有し古来より刺身のツマとして利用されてきた。また、漢方においても健胃、鎮咳、鎮静、発汗、利尿などを目的として、シソの葉を成分の一つとして含む柴朴湯、半夏厚朴湯、香蘇散などの処方がなされている。シソ葉熱水抽出物であるシソエキス(PE)はこれまでにマクロファージからのTNF-α産生を抑制することや抗アレルギー作用など様々な抗炎症作用が報告されている。炎症性腸疾患（IBD）では腸管粘膜免疫の破綻により、TNF-α、IL-6やIL-17Aなどの炎症性サイトカインが過剰に分泌されていることが病態の一つであると考えられている。今回、我々はPEの抗炎症作用に着目し、IBDマウスモデルであるDSS誘導腸炎モデルに対するPEの安全性、有効性、およびPE成分の免疫細胞におけるサイトカイン産生に対する影響について検討を行った。

【方法と成績】

実験① 安全性の検討：5週齢♀C57BL/6マウスに蒸留水(コントロール群、C群）あるいはPE(0.54%)(シソエキス群、PE群)を7週間投与しPEの安全性を確認した(n=6)。C群に比しPE群において体重の増減、下痢、生化学的データ（肝毒性、脂質代謝）の異常などは認められず、PEを安全に投与できた。

実験② 腸炎予防モデルでの検討：8週齢♀C57BL/6マウスを2群(n=6)にわけ、C群は蒸留水を、PE群はPEを溶媒としてDSSの濃度が1.5％となるよう投与し腸炎を惹起させ、1週間後に犠牲死させ解析した。PE群は有意な体重減少の抑制、組織学的所見の改善が見られた。また、血清TNF-αやIL-17A値がPE群で有意に低かった。

実験③ 腸炎治療モデルでの検討：8週齢♀C57BL/6マウスに1.5％DSSを5日間投与して炎症を惹起させ、体重が等しくなるように2群(n=6)に分けた。6日目から蒸留水あるいはPEを10日間内服させ、10日目、15日目で解析を行った。15日目においてPE群で有意な体重の回復、組織学的所見の改善が見られた。10日目の腸管におけるTNF-αやIL-17AのmRNAの発現がPE群で有意に抑制された。また、PE群の腸管粘膜固有層でのTh17細胞数は有意に減少し、抑制性T細胞（Treg）は有意な増加が見られた。そうした変化は脾リンパ球では観察されなかった。15日目の血清TGF-β値はPE群で有意な上昇が見られた。

実験④ PE各成分のサイトカイン産生に対する影響：8週齢♀C57BL/6マウス脾臓から単核球を分離し、LPSの刺激下でシソエキスの代表的な成分であるルテオリン、アピゲニン、ロスマリン酸をそれぞれ添加し48時間培養後の上清中サイトカイン産生量（ELISA）、Th17あるいは抑制性T細胞（Treg）への分化（Flow cytometry）、Tregの特異的マーカーである*Foxp3*の発現（qPCR）を検討した。ルテオリンは単核球からのTNF-α産生を濃度依存的に抑制した。しかし、アピゲニンやロスマリン酸の添加ではこのような作用は見られなかった。ルテオリンはIL-1β、IL-6やIL-17Aなどの炎症性サイトカインの分泌も抑制し、強い抗炎症作用を示した。アピゲニンもIL-17Aの産生を抑制し、ルテオリン、アピゲニンそれぞれの添加によってTh17細胞の分化の有意な抑制が観察された。ロスマリン酸は高濃度においてIL-1βの産生を抑制したが、それ以外の炎症性サイトカインには影響しなかった。興味深いことにアピゲニンまたはロスマリン酸の添加により抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生が有意に増加し、またロスマリン酸は創傷治癒に関わるTGF-βの産生も促進した。ロスマリン酸の添加によりCD4陽性TGF-β陽性細胞の数が有意に増加し、*Foxp3*の発現も上昇した。また、CD4陽性Foxp3陽性細胞の有意な増加が確認され、ロスマリン酸はTregの分化を促進することが示唆された。アピゲニンの添加では*Foxp3*発現の上昇やCD4陽性Foxp3陽性細胞の増加は見られず、抑制性マクロファージなどTreg以外の細胞を介したIL-10産生促進効果である可能性が示唆された。

【総括】

PEはその各成分が複合的に働き、炎症性サイトカイン産生を抑制し、抑制性サイトカイン産生を促進することによって、DSS誘導腸炎の軽減ならびに回復促進に有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　宇留島　隼人

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	伊藤善記
副　査	大阪大学教授	竹田潔
副　査	大阪大学教授	森正樹

論文審査の結果の要旨

本研究では、炎症性腸疾患動物モデルである dextran sulfate sodium (DSS)腸炎に対するシソエキスの安全性及び有効性について検討を行った。

1. 正常マウスに対してシソエキスを 7 週間内服させたところ、血液生化学上の異常は観察されず、シソエキスの安全性が確認された。

2. シソエキスは DSS 腸炎の予防ならびに治療実験において、有害事象を認めず、体重の減少抑制ならびに腸炎回復促進効果が確認された。血清サイトカインや腸管 mRNA 発現解析によって、シソエキス投与により炎症性サイトカインである TNF-αや IL-17A の産生抑制が観察された。また腸管粘膜固有層において、抑制性 T 細胞（Treg）がシソエキスの内服により有意に増加していた。

3. シソエキスの主要成分であるルテオリン、アピゲニン、ロスマリン酸と脾臓単核球との共培養によって、単核球からの上清中サイトカイン産生に対する影響を検討した。ルテオリンは TNF-αや IL-17A、IL-1β、IL-6 などの産生を抑制し強い抗炎症作用を発揮した。また、ルテオリンとアピゲニンによってナイーブ T 細胞から IL-17A を産生する Th17 の分化が抑制されることを明らかにした。ロスマリン酸の添加によって抗炎症性サイトカインである IL-10 や TGF-β の産生が促進され、Treg の特異的マーカーである *Foxp3* の発現も上昇した。このことによりロスマリン酸は炎症時にナイーブ T 細胞から Treg への分化を促進することが示唆された。

以上、本論文は DSS 腸炎に対する、シソエキスの腸炎抑制および改善効果を示し、その機序の一部を解明した。また、シソエキス主要成分の炎症下での単核球からのサイトカイン産生への影響を初めて明らかにした。様々な生理活性物質を含むシソエキスが複合的に働き抗炎症効果を発揮することを解明し、今後、食品としてのシソエキスが炎症性腸疾患に対する治療において使用できる可能性を示した。この貢献により学位の授与に値するものと考えられる。