

マウスマイクログリアにおける 白朮の抗炎症作用について

森永 明倫¹⁾、河村 菜実子²⁾、勝浦 五郎²⁾、浅川 明弘²⁾、乾 明夫³⁾

1) 東京女子医科大学 東洋医学研究所

2) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学講座 心身内科学分野

3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 漢方薬理学講座

要旨

マウスマイクログリア細胞株であるMG6細胞を用いて、リポポリサッカライド(LPS)による炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF- α) およびinterleukin-1 β (IL-1 β) mRNAの発現上昇に対する白朮およびその主要成分であるアトラクチレノリドⅢの作用を検討した。その結果、白朮およびアトラクチレノリドⅢによってLPSによるTNF- α およびIL-1 β mRNAの発現の増加が有意に減少した。これらの結果から、白朮には脳内炎症を抑制する作用があることが明らかになった。

はじめに

脳内の炎症反応は主にマイクログリアによって調節され、様々な中枢神経系の機能の調節に関連している。特に、脳内炎症は、アルツハイマー病などの神経変性疾患、統合失調症およびうつ病などの病態と深く関わっていることが明らかになりつつある¹⁻⁴⁾。さらに、視床下部での微小炎症は肥満症などの代謝性疾患の発症と関連していることが明らかになっている⁵⁾。

生薬は多様な薬理作用を持ち、様々な疾患の治療薬として使用されている。しかし、生薬の有効成分の同定ならびに薬効・薬理作用のメカニズムに関する報告は少ない。そこで、本研究では、マウスのマイクログリア細胞株であるMG6細胞を用いて、白朮の抗炎症作用について検討し、その主要成分であるアトラクチレノリドⅢの効果についても検討した。

実験方法

1. MG6細胞

理化学研究所から分与されたマウスマイクログリアの cell lineであるMG6細胞の培養は、過去の報告に従って行った^{6, 7)}。MG6細胞を10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc.)、1% antibiotic-antimycotic solution (Thermo Fisher Scientific Inc.)、100 μ M β -mercaptoethanol (ナカライテスク株式会社)

および10 μ g/mL insulin (Thermo Fisher Scientific Inc.)を含んだDulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific Inc.)で 1×10^5 cells/mLに調整し、poly-D-lysine-coated 10-cm dish (Thermo Fisher Scientific Inc.)にまき、37 $^{\circ}$ C 5%炭酸ガスインキュベーターで5~7日間培養した。さらに、MG6細胞をpoly-D-lysine-coated 6-well plates (Thermo Fisher Scientific Inc.)に 1×10^5 cells/mLでまきなおし、3~4日間培養し、実験に使用した。

2. 白朮、蒼朮およびアトラクチレノリドⅢの適用

MG6細胞に白朮 (50, 500ng/mL, クラシエ製薬株式会社) または蒼朮 (50, 500ng/mL, クラシエ製薬株式会社) を16時間適用した後に、LPS (5ng/mL, シグマ) を3時間適用し、細胞を回収した。次に、MG6細胞にアトラクチレノリドⅢ (10, 30, 100 μ M, クラシエ製薬株式会社) を16時間適用した後に、LPS (5ng/mL) を3時間適用し、細胞を回収した。

3. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

過去の報告⁸⁾に従ってRT-PCR法を用いて、tumor necrosis factor- α (TNF- α) およびinterleukin-1 β (IL-1 β) 発現を検討した。MG6細胞のtotal RNAはRNeasy mini kit (QIAGEN N.V.)を用いて抽出し、cDNAはVerso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてtotal RNAサンプル(1 μ g)から合成した。リアルタイムRT-PCRは、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.)で、FastStart SYBR Green Master (Roche Molecular Systems, Inc.)を用いて行った。それぞれのmRNA発現はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)で補正した。使用したprimerは、GAPDH: Forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', Reverse 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCTG-3', TNF- α : Forward 5'-CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3', Reverse 5'-GGTCACTGTCCCAGCATCTT-3', IL-1 β : Forward 5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG-3', Reverse 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGGG-3',である。

4. データ解析

データはmean \pm SEMで表した。データの統計解析はStudent's *t*-testを用いた。

結果

1. LPSによるIL-1 β およびTNF- α mRNA発現増加に対する白朮および蒼朮の作用(図1-2)

LPSの適用によってIL-1 β およびTNF- α mRNA発現の著明な増加が認められた。そのLPSによるIL-1 β mRNA発現の増加は、白朮 50および500ng/mLの適用によって、それぞれLPS反応の48%および28%にまで、有意に抑制された。また、蒼朮では、IL-1 β mRNA発現の増加に対して、50ng/mLの適用では効果がなく、500ng/mLの適用でLPS反応の26%にまで有意な抑制が認められた。さらに、LPSによるTNF- α mRNA発現の増加は、白朮、50および500ng/mLの適用によって、それぞれLPS反応の69%および66%にまで、有意に抑制された。また、蒼朮では、TNF- α mRNA発現の増加に対して、50ng/mLの適用では効果がなく、500ng/mLの適用でLPS反応の52%にまで有意な抑制が認められた。

2. LPSによるIL-1 β mRNA発現増加に対するアトラクチレノリドⅢの作用(図3)

LPSの適用によるIL-1 β mRNA発現の著明な増加に対するアトラクチレノリドⅢの作用について検討した。アトラクチレノリドⅢ、10 μ Mでは効果は認められなかった

図1 MG6細胞でのLPSによるIL-1 β mRNA発現増加に対する白朮と蒼朮の抑制作用

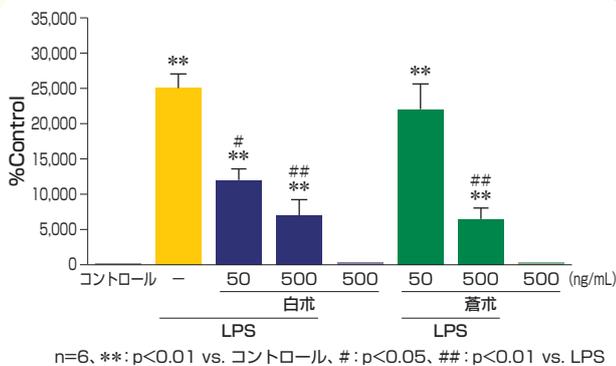


図2 MG6細胞でのLPSによるTNF- α mRNA発現増加に対する白朮と蒼朮の抑制作用

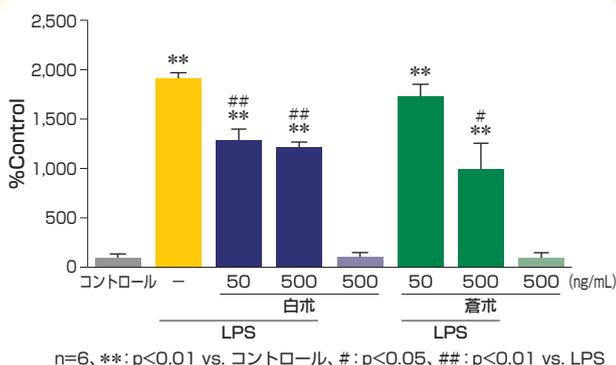
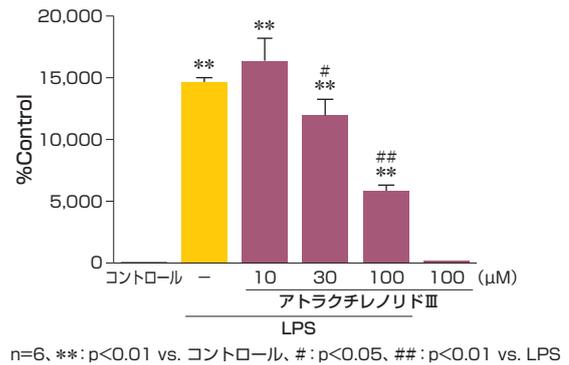


図3 MG6細胞でのLPSによるIL-1 β mRNA発現増加に対するアトラクチレノリドⅢの抑制作用



が、30および100 μ Mの適用によって、LPSの反応がそれぞれ82%および40%にまで有意に抑制された。

考察

今回の実験で、マウスマイクログリアのLPSによる炎症性サイトカインであるIL-1 β およびTNF- α mRNA発現増加が白朮によって有意に抑制されることが明らかになった。また、白朮による抗炎症作用は蒼朮よりも強力である可能性が考えられるが、有効成分の含有率の違いがこの結果に影響している可能性もある。さらに、白朮の主要成分であるアトラクチレノリドⅢによってもLPSによるIL-1 β mRNA発現の増加が有意に抑制された。今回の検討で、白朮には脳内炎症を抑制する作用があることが明らかになった。これまでの報告で、白朮および蒼朮はマクロファージでのLPSによる炎症反応を抑制することが報告されている⁹⁾。これらの結果から、両生薬は末梢および中枢神経系で抗炎症作用を発現することが明らかになった。今後は、生薬の適正な対象疾患の選定ならびに用法・用量の決定のためには、この作用の細胞内メカニズムを明らかにし、さらに、病態モデル動物での有効性を検討することが重要になるとと思われる。

【参考文献】

- Selles MC, et al.: Brain inflammation connects cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 64: S313-S327, 2018
- Khandaker GM, et al.: Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. Lancet Psychiatry 2: 258-270, 2015
- Dantzer R, et al.: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci 9: 46-57, 2008
- Hennnessy EJ, et al.: Targeting toll-like receptors: emerging therapeutics? Nat Rev Drug Discov 9: 293-307, 2010
- Tang Y, et al.: Hypothalamic microinflammation: a common basis of metabolic syndrome and aging. Trends Neurosci 38: 36-44, 2015
- Takenouchi T, et al.: Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. Biochim Biophys Acta 1726: 177-186, 2005
- Nakamichi K, et al.: Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. Neurosci Lett 407: 205-210, 2006
- Yamada N, et al.: Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures. Neurosci Lett 450: 132-135, 2009
- Shimato Y, et al.: Comparison of byakujutsu (Atractylodes rhizome) and sojutsu (Atractylodes lancea rhizome) on anti-inflammatory and immunostimulative effects in vitro. J Nat Med 72: 192-201, 2018