

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15790

研究課題名（和文）河内晩柑果皮に含まれるシネフリンの抗炎症効果と作用機構の解明

研究課題名（英文）Anti-inflammatory effect and mechanisms of action of synephrine contained in kawachi-bankan peel

研究代表者

石田 萌子（Ishida, Momoko）

愛媛大学・農学研究科・助教

研究者番号：20800634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：培養細胞を用いた検討により、河内晩柑果皮水溶性抽出物およびp-シネフリンのマクロファージに対する抗炎症効果とその作用機構を明らかにした。特に、p-シネフリンは アドレナリン受容体を介して、マクロファージからのLPS誘導性炎症性サイトカイン産生を阻害することが示唆された。また、全身性炎症反応症候群モデルマウスやデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎モデルマウスでの検討により、河内晩柑果皮水溶性抽出物およびp-シネフリンは生体においても抗炎症効果を発揮することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

柑橘果皮に含まれる機能性成分の機能性食品への応用は、ノビレチンやオーラプテンなどの脂溶性成分に偏っており、水溶性成分の機能性についての研究報告や活用例は極めて少ない。本研究により、河内晩柑果皮水溶性抽出物および果皮成分p-シネフリンの新規機能として、マクロファージに対する抗炎症効果が明らかになったことで、河内晩柑を含め、柑橘果皮の保健機能を基にした機能性食品の開発が飛躍的に活発化すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In vitro experiments, we elucidated the anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of aqueous extract from kawachi-bankan peel and p-synephrine on macrophages. In particular, the anti-inflammatory effect of p-synephrine on macrophages is mediated by α -adrenergic receptors. In vivo experiments using systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model mice indicate that the aqueous extract from kawachi-bankan peel and p-synephrine exert anti-inflammatory effect in vivo.

研究分野：食品機能学

キーワード：河内晩柑 シネフリン マクロファージ 抗炎症効果 RAW264.7細胞 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

河内晩柑は、夏に収穫される晩柑の一種で、愛媛県が全国一の生産量を誇る柑橘の一つである。その果皮には、オーラプテンをはじめとして、ノビレチンや -クリプトキサンチンを代表とするフラボノイドやカロテノイドなどが含まれている。これら脂溶性成分の機能性に関しては多くの研究者が注目し、機能性食品への応用が活発化している。一方で、柑橘果皮に含まれる水溶性成分の機能性についての研究報告は極めて少ない。そこで、河内晩柑の付加価値をさらに高めるだけでなく、ジュース製造などの加工工程において廃棄されている果皮の機能性食品への展開を目標として、河内晩柑果皮水溶性成分の保健機能の解明に取り組むことを着想した。

炎症は、生体内で恒常性を維持するために必要不可欠な生体防御反応である。一方で、過剰な、あるいは慢性的な炎症状態は、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患を誘引する。そこで、炎症を誘導する炎症性サイトカインの主要な産生を担うマクロファージに対する河内晩柑果皮水溶性抽出物の抗炎症効果を検討した。その結果、河内晩柑果皮水溶性抽出物はマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。さらに、活性物質として柑橘類の果皮に多く含まれるアルカロイドの一種である *p*-シネフリン(図1)が同定された。

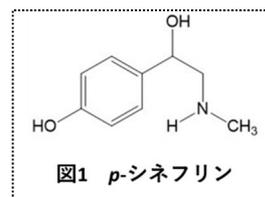


図1 *p*-シネフリン

p-シネフリンは、脂肪蓄積抑制効果があることが知られており、サプリメント素材としても広く用いられている。しかし、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンのマクロファージに対する抗炎症効果やその作用機構に関する研究報告はない。そこで、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンの生体内外における抗炎症効果とその作用機構を明らかにし、ヒトに対する効果の実証試験に必要な基礎的データを蓄積することに強い意義を感じた。

2. 研究の目的

本研究課題では、河内晩柑果皮水溶性抽出物、およびその活性物質の一つである *p*-シネフリンの生体内外における抗炎症効果とその作用機構に関する基礎的データを蓄積することを目的として、下記の2つの検討を行った。

- (1) 培養細胞に対する河内晩柑果皮水溶性抽出物、および *p*-シネフリンの抗炎症効果とその作用機構
- (2) 炎症性疾患モデルマウスに対する河内晩柑果皮水溶性抽出物、および *p*-シネフリンの抗炎症効果

3. 研究の方法

グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)をマクロファージに作用させることで炎症状態を誘導することができる。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、あるいはマウス腹腔内から回収した初代マクロファージに、LPS 刺激と同時に抽出物、あるいは標品の *p*-シネフリンを作用させ、インターロイキン(IL)-6 や腫瘍壊死因子(TNF)- α などの炎症性サイトカイン産生抑制を指標とした抗炎症効果を評価した。細胞上清中のサイトカイン量は酵素抗体法(ELISA)、遺伝子発現量はリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

作用機構の解明については、マクロファージ活性化に關与する MAP キナーゼ経路や NF- κ B 経路に及ぼす影響をウェスタンブロッティング法により検討した。また、*p*-シネフリンは水溶性のため、細胞膜を透過して細胞内シグナル分子に直接作用するとは考え難いことから、細胞表面上の受容体、特に *p*-シネフリンと親和性のあるアドレナリン受容体に着目し、各種アンタゴニストによる活性への影響を検討した。

また、生体内における抗炎症効果を検討するため、炎症性疾患モデルマウスとして、LPS の腹腔内投与により誘導される全身性炎症反応症候群(SIRS)モデルマウス、およびデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎モデルマウスを用いた。各モデルマウスに、河内晩柑果皮水溶性抽出物、あるいは *p*-シネフリンを経口投与し、各種疾患の代表的な症状(体重の変動や血中サイトカイン量、臓器での局所的な炎症、致死率など)を評価した。

4. 研究成果

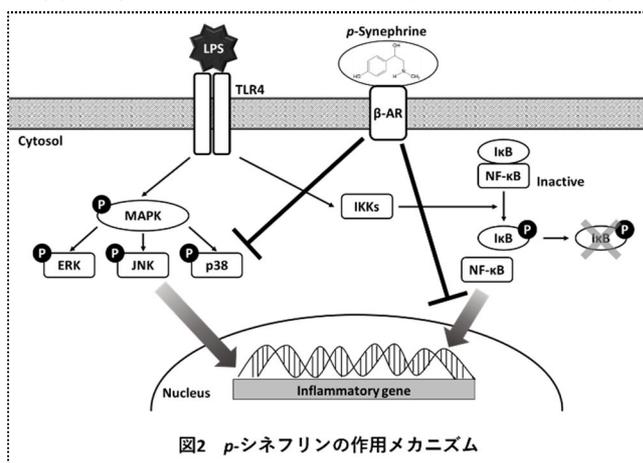
- (1) 培養細胞に対する抗炎症効果とその作用機構

これまでに、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンは、RAW264.7 細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を有意に抑制することが明らかになっている。そこで、炎症性サイトカ

インの遺伝子発現量に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンによって、TNF- α の mRNA 発現には影響は認められなかったものの、IL-6 の mRNA 発現は有意に抑制された。これらのことから、IL-6 に関しては遺伝子の転写活性を下方制御することでその産生を抑制することが示唆された。作用機構については、マクロファージ活性化に關与する MAPK 経路および NF- κ B 経路に及ぼす影響をウェスタンブロッティング法により評価した。その結果、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンは、MAPK ファミリーである p38 のリン酸化および NF- κ B の核内移行を下方制御することで、過剰炎症状態マクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

p-シネフリンは化学的および生物学的性状がエフェドリンに類似しており、アドレナリン受容体アゴニストとして作用することが示唆されている。そこで、フェントラミン（非選択的 アドレナリン受容体拮抗薬）あるいはプロプラノロール（非選択的 アドレナリン受容体拮抗薬）で RAW264.7 細胞を処理した 30 分後に、*p*-シネフリンあるいはエピネフリン（アドレナリン受容体作動薬）を添加し、24 時間培養した後の IL-6 および TNF- α の産生量を酵素抗体法により検討した。アドレナリン受容体作動薬であるエピネフリンは、*p*-シネフリン同様に LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生を有意に抑制し、その抑制効果はプロプラノロールの前処理により低下した。一方、フェントラミンでは影響は見られなかった。エピネフリンは および

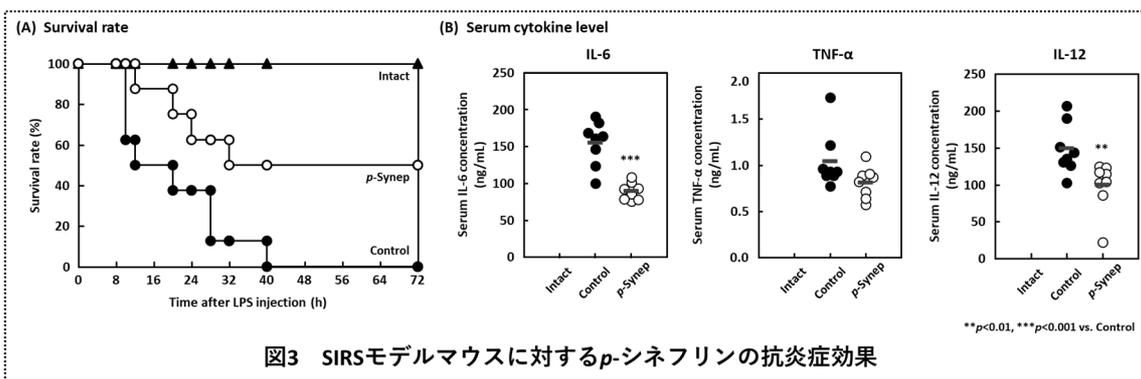
受容体共通の作動薬のため、アドレナリン受容体への結合は活性に關与していないことが示唆された。また、*p*-シネフリンの炎症性サイトカイン産生抑制効果は、プロプラノロールの前処理により有意に低下したが、フェントラミンの前処理による活性への影響は認められなかった。これらのことから、*p*-シネフリンは アドレナリン受容体を介して、マクロファージの LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を阻害することが明らかになった（図 2）。



(2) 炎症性疾患モデルマウスに対する抗炎症効果

SIRS モデルマウス

9 週齢の BALB/c マウスに対して河内晩柑果皮水溶性抽出物 (100 mg/kg 体重) を 7 日間経口投与し、最後の経口投与から 1 時間後に LPS を腹腔内投与することで SIRS を誘導した。LPS 投与から 2 時間後に採血し、血中サイトカイン量を測定した結果、河内晩柑果皮水溶性抽出物を投与したマウスでは、コントロール群と比較して血中炎症性サイトカイン量の低下が認められた。また、40 時間に渡ってマウスの生存状況を観察したところ、コントロール群では LPS 投与後 40 時間にマウスの生存率が 0% であるのに対して、河内晩柑果皮水溶性抽出物投与群では 75% に上昇した。また、*p*-シネフリン (15 mg/kg 体重) を 7 日間経口投与した SIRS モデルマウスにおいても、血中炎症性サイトカイン量の低下およびマウス生存率の上昇が認められた（図 3）。これらのことから、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンの経口投与は、全身性炎症によって誘導される炎症性サイトカインの過剰産生を抑制し、SIRS モデルマウスの生存率を向上させることが示唆された。



DSS 誘発性大腸炎モデルマウスに対する抗炎症効果

8 週齢の C57BL/6J 系雌マウスに 2% DSS 水溶液を 5 日間自由飲水させ、大腸炎を誘発した。*p*-シネフリンは、DSS 飲水開始の 7 日前から経口投与を開始し、DSS 水溶液投与期間中も含めて計 12 日間にわたり 1 日 1 回経口投与した。実験開始から 7 日目～12 日目までの DSS 水溶液投与期間中、体重及び便の状態（下痢と血便）を毎日観察したところ、DSS 水溶液の飲水によって体重

の増加抑制および下痢や血便といった潰瘍性大腸炎の特徴的な症状が認められた。体重減少および下痢、血便スコアを合計した Disease Activity Index score (DAI スコア) は、対照群では高値を示したのに対し、*p*-シネフリン投与群で有意な低下が認められた。一方、DSS 飲水による大腸長の短縮においては、*p*-シネフリンの経口投与による影響は見られなかったものの、血中 IL-6 量、大腸遠位での IL-6 遺伝子および TNF- α 遺伝子の発現において対照群と比較して *p*-シネフリン投与群において減少が認められた。これらのことから、*p*-シネフリンの経口投与は DSS 誘導性大腸炎に対しても抑制効果を発揮することが示唆された。

本研究において、培養細胞に対する河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンの抗炎症

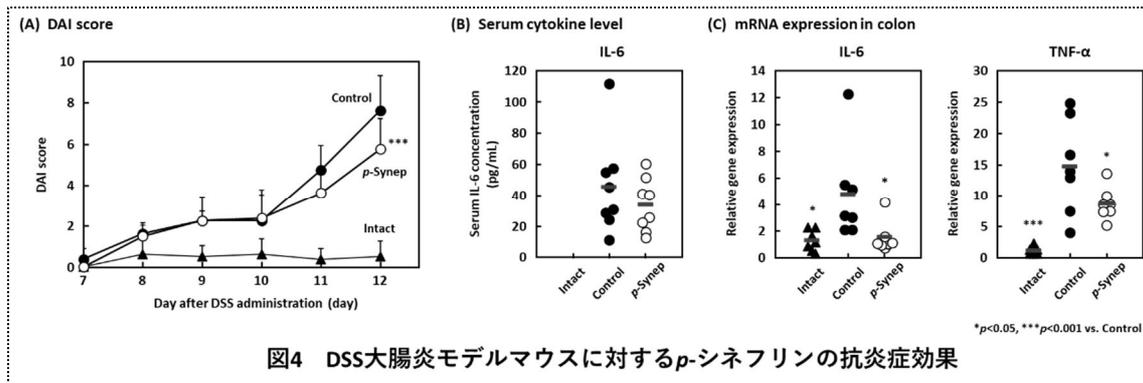


図4 DSS大腸炎モデルマウスに対する*p*-シネフリンの抗炎症効果

効果とその作用機構が明らかになった。特に、*p*-シネフリンは アドレナリン受容体を介して、マクロファージの LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を阻害することが明らかになった。また、SIRS モデルマウスや DSS 誘導性大腸炎モデルマウスでの検討により、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンは生体における炎症症状を緩和することが示唆された。これまでに、炎症状態のマクロファージに対する河内晩柑果皮水溶性抽出物あるいは *p*-シネフリンの抗炎症効果とその作用機構に関する研究についての報告例はなく、本研究により初めて明らかにすることができた。一方で、炎症疾患モデルマウスに対しても抗炎症効果を発揮することが示唆されたが、生体内においても *in vitro* で明らかになった作用メカニズムを介して過剰炎症状態のマクロファージに作用しているのかを明らかにすることはできなかった。この研究成果をさらに発展させ、河内晩柑果皮水溶性抽出物および *p*-シネフリンの抗炎症効果の全容を解明することで、河内晩柑を含め柑橘果皮の保険機能をもとにした機能性食品の開発に繋がるのではないかと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石田萌子, 竹國千尋, 西甲介, 菅原卓也	4. 巻 739
2. 論文標題 LPS誘発性の過剰炎症反応における河内晩柑果皮水溶性抽出物の抗炎症効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 果汁協会報	6. 最初と最後の頁 12-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida M., Takekuni C., Nishi K., Sugahara T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Anti-inflammatory effect of aqueous extract from Kawachi-bankan (<i>Citrus maxima</i>) peel in vitro and in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 797 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-019-00323-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida M., Takekuni C., Nishi K., Sugahara T.	4. 巻 13
2. 論文標題 p-Syneprine suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and alleviates systemic inflammatory response syndrome in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 5229 ~ 5239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2fo00299j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田萌子, 竹國千尋, 西甲介, 菅原卓也
2. 発表標題 河内晩柑果皮成分のマクロファージに対する抗炎症効果
3. 学会等名 第8回あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishida M., Takekuni C., Nishi K., Sugahara T.
2. 発表標題 Anti-inflammatory effect of p-synephrine in vitro and in vivo
3. 学会等名 International Conference of Food Safety and Health 2019 (FSAH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田萌子, 竹國千尋, 西甲介, 菅原卓也
2. 発表標題 柑橘成分の抗炎症効果に関する研究
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田萌子, 菅原卓也
2. 発表標題 柑橘成分の抗炎症効果とその分子メカニズム
3. 学会等名 第62回(令和元年度)果汁技術研究発表会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田萌子, 竹國千尋, 西甲介, 菅原卓也
2. 発表標題 p-シネフリンの抗炎症効果とその作用機構に関する研究
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------