

平成 29 年度

岡山大学大学院保健学研究科

博士学位申請論文

内容要旨

検査技術科学分野

柴倉 美砂子 准教授 指導

7 3 4 2 5 0 0 5

青江 伯規

平成 29 年 6 月提出

内 容 目 次

主 論 文

Lavender essential oil and its main constituents inhibit the expression of

TNF- α -induced cell adhesion molecules in endothelial cells

(ラベンダー精油およびその主成分による血管内皮細胞における

TNF- α 誘導性細胞接着分子の発現抑制作用)

青江伯規、飯尾友愛、柴倉美砂子、篠畑綾子、臼井真一、荒尾雄二郎、池田敏、宮原信明、
谷本光音、片岡幹男

Acta Medica Okayama 掲載予定

副 論 文

Lavender essential oil inhalation suppresses allergic airway inflammation and mucous

cell hyperplasia in a murine model of asthma

(ラベンダー精油吸入によるマウス喘息モデルにおけるアレルギー性炎症および

粘液細胞過形成の抑制作用)

飯尾友愛、柴倉美砂子、横田佳那代、青江伯規、兵田朋子、篠畑綾子、金廣有彦、
谷本光音、片岡幹男

Life Sciences 108(2) 109-115 2014

参 考 論 文

ABL kinase mutation and relapse in 4 pediatric Philadelphia chromosome-positive

acute lymphoblastic leukemia cases

(小児フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 4 症例における

ABL kinase 変異解析と再発)

青江伯規、嶋田 明、村岡倫子、鷺尾佳奈、中村佳弥、高橋孝英、今田昌秀、渡部俊幸、
岡田 健、西内律雄、宮村能子、茶山公祐、柴倉美砂子、小田 慈、森島恒雄

International Journal of Hematology 99(5) 609-615 2014

主 論 文

ラベンダー精油およびその主成分による血管内皮細胞における TNF- α 誘導性細胞接着分子の発現抑制作用

[緒言]

精油は植物から抽出された揮発性有機化合物であり、ラベンダー精油 (*Lavandula angustifolia* essential oil : Lvn) はよく利用される精油の 1 つである。Lvn は抗炎症効果を示すことが報告されており、我々は以前、卵白アルブミン (ovalbumin : OVA) 感作マウス喘息モデルにおいて、Lvn 処置が気管支肺胞洗浄液、気管支周囲組織および肺血管周囲組織へのマクロファージ、好酸球およびリンパ球などの炎症性細胞の浸潤を減少させ、アレルギー性炎症の症状を軽減させたことを報告した。

Lvn の主成分である酢酸リナリル (linalyl acetate : LA) およびリナロール (linalool : LO) には、抗炎症効果や転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化を抑制する効果が報告されている。NF- κ B は、E-セレクトリン、P-セレクトリン、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) のような細胞接着分子の発現を誘導する。これらの細胞接着分子は白血球の浸潤および喘息の病態に関与しており、マウス喘息モデルにおいて、NF- κ B シグナル伝達経路の阻害によって喘息症状が抑制されることが報告されている。本研究では、血管内皮細胞における TNF- α 誘導性細胞接着分子の発現に対する Lvn、LA および LO の影響をマウス脳血管内皮腫細胞株 bEnd.3 細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) を用いて調べた。

[方法]

bEnd.3 細胞および HUVECs の Lvn、LA、LO による処理および TNF- α 刺激

bEnd.3 細胞 (American Type Culture Collection : ATCC) を 0.01% または 0.005% Lvn の非存在下または存在下の培養液中で、2 時間インキュベートした。続いて、マウス tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Roche Applied Science) 250 U/mL で刺激した。全 RNA 抽出を目的とした場合は 3 時間、タンパク質抽出を目的とした場合は 5 時間インキュベートした。また Lvn と同様に LA、LO を用いて実験を行った。

HUVECs (PromoCell) を 0.01% または 0.005% Lvn の非存在下または存在下の培養液中で、2 時間インキュベートした。続いて、ヒト TNF- α (Roche Applied Science) 100 U/mL で 3 時間刺激して全 RNA を抽出した。コントロールには等容量の phosphate buffered-saline (PBS) を添加し刺激培養を行った。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction : RT-PCR) による細胞接着分子 mRNA 発現の検出

TNF- α 添加から 3 時間培養後の細胞より、全 RNA を抽出して RT-PCR を行い、画像解析にて mRNA 発現の定量を行った。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA の定量値で補正した。

ウェスタンブロッティングによる E-および P-セレクチンの検出

TNF- α 添加から 5 時間培養後の細胞より、蛋白抽出し、ウェスタンブロッティングにより E-および P-セレクチンの蛋白発現を検出し、画像解析にて定量を行った。内部標準としてアクチンの定量値で補正した。

細胞質および核の調製および NF- κ B 検出

bEnd.3 細胞を 0.01% Lvn または 125 μ M LA または 250 μ M LO で 2 時間処理後に、TNF- α 250 U/mL で刺激し 10 分、30 分、60 分後に細胞質溶解液と核蛋白溶解液に分離した。核内のリン酸化 NF- κ B p65 および細胞質中の NF- κ B p65 をウェスタンブロッティングにより検出した。細胞質抽出物の内部標準としてアクチンを検出した。

統計処理

一元配置分散分析 (one-way analysis of variance : one-way ANOVA) (Tukey 法) を用いて統計的有意性を評価した。危険率 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。
[結果]

Lvn 処理は、bEnd.3 細胞における TNF- α 誘導性 E-セレクチン、P-セレクチン、VCAM-1 および ICAM-1 発現を抑制した

bEnd.3 細胞における細胞接着分子の mRNA 発現レベルは、TNF- α 刺激後に有意な増加を示した。一方、0.01% Lvn 処理では、TNF- α 誘導性 *Sele*、*Vcam1* および *Icam1* 発現は有意に抑制された。また TNF- α 刺激細胞において増加する E-および P-セレクチンの蛋白発現レベルは、Lvn 処理によって有意に抑制された。

Lvn 処理は、bEnd.3 細胞における TNF- α 誘導性の NF- κ B 活性化を抑制した

TNF- α 刺激細胞において、核内のリン酸化 NF- κ B p65 は、10、30 および 60 分で有意に増加し、30 分で最も活性化される傾向がみられた。0.01% Lvn 処理により、TNF- α によって誘導される核内のリン酸化 NF- κ B p65 が、30 分および 60 分後で有意に抑制された。

LA および LO 処理は、bEnd.3 細胞における TNF- α 誘導性の細胞接着分子 mRNA 発現を抑制した

125 μ M および 62.5 μ M LA による処理で、TNF- α 刺激によって増加する *Sele*、*Selp* および *Vcam1* の発現レベルは有意に抑制された。また 125 μ M LA 処理で *Icam1* の発現も抑制された。LO 250 μ M による処理で、TNF- α 刺激により誘導される *Sele*、*Vcam1* および *Icam1* の発現レベルが有意に抑制された。また 125 μ M LO 処理で *Sele* および *Vcam1* の発現レベルが有意に抑制された。しかし、LO は TNF- α 誘導性 *Selp* の発現は抑制しなかった。

LA 処理は、bEnd.3 細胞における TNF- α 誘導性の NF- κ B 活性化を抑制した

核内のリン酸化 NF- κ B p65 は、TNF- α 刺激により 30 分および 60 分で有意に増加した。最も高い活性化は、TNF- α 刺激の 60 分後に認められた。LA 処理により、核内のリン酸化 NF- κ B p65 は、TNF- α 刺激後 60 分で有意に抑制された。LO 処理は、核内のリン酸化 NF- κ B p65 を有意には抑制しなかった。

Lvn 処理は、HUVECs における TNF- α 誘導性 E-セレクトイン mRNA 発現を抑制した

0.01% および 0.005% Lvn 処理は、HUVECs における TNF- α 誘導性の *SELE* の発現レベルを有意に抑制したが、*VCAM1* および *ICAM1* の発現は抑制しなかった。

[考察]

血管内皮細胞における細胞接着分子の発現は、白血球の動員および炎症の開始に重要な役割を果たす。bEnd.3 細胞において、Lvn 処理は TNF- α 誘導性の E-セレクトイン、VCAM-1、および ICAM-1 の mRNA 発現レベルを用量依存的に抑制した。TNF- α 誘導性の P-セレクトイン mRNA 発現は抑制されなかったが、E-および P-セレクトインの蛋白発現レベルは抑制されることが明らかになった。E-および P-セレクトインは顆粒球の血管内皮細胞への接着に関与するため、両セレクトインの発現を抑制することは、炎症の緩和に重要な影響を与えうる。NF- κ B p65 は、血管内皮細胞における細胞接着分子の発現において重要な役割を果たす。TNF- α などの炎症性サイトカインは、NF- κ B 経路を活性化し、細胞接着分子の発現を誘導する。本研究では、bEnd.3 細胞において Lvn 処理を行うことで、TNF- α 刺激後の E-セレクトイン、P-セレクトイン、VCAM-1 および ICAM-1 の発現を抑制し、また核内のリン酸化 NF- κ B p65 も抑制した。これらの結果より、Lvn 処理によって TNF- α 刺激後の NF- κ B 活性化が抑制されることが、細胞接着分子の発現抑制に関与すると考えられた。

bEnd.3 細胞において、LA および LO 処理によって TNF- α 誘導性の細胞接着分子 mRNA 発現が抑制された。さらに LA は、核内のリン酸化 NF- κ B p65 を抑制した。これらの結果は、Lvn の主成分である LA が、NF- κ B 活性化の抑制を介した抗炎症作用を有することを示唆している。

HUVECs においても、Lvn 処理は TNF- α 誘導性 E-セレクトイン mRNA の発現を抑制し、ヒトにおいても抗炎症作用の一端を担う可能性が示されたが、VCAM-1 および ICAM-1 mRNA の発現は抑制しなかった。これには遺伝子上の NF- κ B 結合部位の数や他の転写因子の関連も示唆されるが、マウスとヒトで発現のメカニズムが異なる可能性がある。

本研究は、Lvn の抗炎症作用の一部を提案したもので、他の効果を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

[結論]

Lvn は NF- κ B 活性化の抑制を介して、血管内皮細胞における TNF- α 誘導性細胞接着分子の発現を抑制することが示唆された。Lvn の主成分である LA が同様の効果を有し、LA を主成分とする他の精油も、抗炎症作用を発揮する可能性がある。