

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09306

研究課題名(和文) 生薬成分・腸内細菌代謝産物によるサイトカイン・ケモカイン産生制御と抗炎症療法

研究課題名(英文) Regulation of Cytokine/Chemokine Production and Anti-inflammatory therapy by Natural Products

研究代表者

石黒 和博 (Ishiguro, Kazuhiro)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60432275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカインIL-6の産生を抑制する生薬成分Atractylodinと炎症性ケモカインCCL2の産生を抑制する生薬成分Wuweizisu Cを同定した。いずれも腸炎モデルで抗炎症効果を証明できた。更に、AtractylodinとWuweizisu Cが有する作用の機序を、それぞれ分子レベルで解明した。急性腸炎の発症を抑制する新たな抗炎症分子としてS100Gを特定し、その発現と機能を解明した。また、初代線維芽細胞を研究に利用する上で短所であった低い遺伝子導入効率を劇的に高める簡便な手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AtractylodinやWuweizisu Cには抗炎症効果があるため抗炎症薬として、あるいは、そのseedsとして応用可能である。また、それらの作用機序から脱メチル化酵素KDM4AによるヒストンH3リシン9残基の脱メチル化やRIP1ユビキチン化によるTAK1活性化は新たな抗炎症療法の分子ターゲットとして有用であると考えられる。S100Gは急性腸炎で発現が誘導されるため腸炎発症のマーカーとして有用である。更にS100Gは抗炎症作用を有するため、その発現を介して腸炎の発症を制御できる可能性がある。遺伝子導入効率を高めることで初代線維芽細胞は様々な研究で利用できるようになる。

研究成果の概要(英文)：Herbal components Atractylodin and Wuweizisu C were identified as agents suppressing pro-inflammatory cytokine IL-6 and chemokine CCL2, respectively. In a colitis model, the anti-inflammatory efficacy of Atractylodin and Wuweizisu C was proved. The molecular mechanisms of their actions were also demonstrated. S100G was identified as a novel anti-inflammatory molecule to suppress colitis induction. Its expression and function were analyzed. In primary fibroblasts, the efficiency of gene transfer was dramatically improved by our novel easy method.

研究分野：消化器内科学および免疫学

キーワード：炎症 腸炎 サイトカイン ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（主に潰瘍性大腸炎とクローン病）は未だ根本的な原因が不明であり、治癒に至るような十分な治療法がないため、しばしば難治性に至る。この炎症性腸疾患の病態には免疫系の異常な活性化が関与し、特に炎症性サイトカイン・ケモカインの過剰産生が重要である。したがって、炎症性腸疾患の新たな治療法を開発するためには下記が有用である。

(1) 炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制する化合物を同定する。

(2) その作用機序の解析から炎症性サイトカイン・ケモカイン産生制御の機序を解明し治療の標的を特定する。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患に対する新しい治療法として期待できるサイトカイン・ケモカイン産生制御療法の開発に貢献する。そのため、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制する化合物を主に生薬成分など天然化合物からスクリーニングにより同定し、腸炎モデルで抗炎症効果を評価する。更に、その作用機序を分子レベルで解析する。

また、炎症制御に有用であれば天然化合物以外も研究対象とする。

3. 研究の方法

我々の研究 (*Clin. Immunol.* 2017, 180, 120-127) により線維芽細胞は腸炎発症に伴い、その局所において活性化し炎症性サイトカイン IL-6 を産生することが分かっている。また、初代線維芽細胞はマウスの胎児から容易に入手でき、継代・保存することもできる。そのため、本研究では主に初代線維芽細胞を用いて実験を行った。

(1) スクリーニング

細胞刺激によりサイトカイン・ケモカインが産生されれば培地中濃度は上昇し、天然化合物に産生抑制作用があれば、その濃度上昇が抑制される。そのため、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制する天然化合物を同定するため下記の手法を用いた。

培地に天然化合物を添加 TNF-alpha や MIF により細胞を刺激 一定時間後に培地を回収 培地中のサイトカイン・ケモカイン濃度を ELISA で測定

なお、サイトカイン・ケモカイン産生抑制作用を認めた天然化合物については、その細胞毒性も評価し、細胞毒性がないもののみを用いて更なる研究を行った。

(2) 抗炎症効果評価

ハプテンを大腸に注入して腸炎を誘発するモデルを利用した。このハプテン誘発腸炎モデルでは下痢が生じるとともに、ハプテン注腸 2 日後に体重減少がピークに達する。そのため、注腸 2 日後に下痢と体重減少を評価した後大腸を摘出し、大腸の長さを測定してから組織学的解析のためパラホルムアルデヒド固定を行った (*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 217, 35-42)。

(3) 作用機序解析

サイトカイン・ケモカインの産生は mRNA 発現レベル・転写因子活性化レベル・遺伝子プロモーターレベルなど様々な段階で制御されている。化合物が有するサイトカイン・ケモカイン産生制御作用がどのレベルでどのように働いているのかについて分子生物学的手法を用いて解析を行った。

(4) 天然化合物以外を対象とした炎症制御

腸炎発症を制御する新たな抗炎症分子を特定する研究を行うため、IL-10 欠損マウスを用いた。初代線維芽細胞の遺伝子導入効率を改善する簡便な手法を開発するため、既に市販されている

脂質をベースとした遺伝子導入試薬を用いた。遺伝子導入効率は導入したルシフェラーゼ発現プラスミドにより発現したルシフェラーゼの活性を測定することにより評価した。

4．研究成果

(1) スクリーニングの結果

腸炎発症に関与する TNF- α で初代線維芽細胞を刺激すると炎症性サイトカイン IL-6 が産生される。IL-6 産生抑制を指標にスクリーニングを行った結果、Atractylodin (生薬ソウジツの成分) が同定された。

また、炎症性サイトカイン MIF で刺激した初代線維芽細胞の遺伝子発現を microarray で網羅的に解析したところ、炎症性ケモカイン CCL2 (MCP-1 としても知られている) の発現が最も高まることが分かった。この CCL2 はタンパクレベルでも産生されることが確認されたため、CCL2 産生抑制を指標にスクリーニングを行った。その結果、Wuweizisu C (生薬ゴミシの成分) が同定された。

(2) 抗炎症効果評価の結果

Atractylodin, Wuweizisu C いずれもハプテン誘発腸炎モデルにおいて下記の通り抗炎症効果を認めた。

下痢を改善した。

体重減少と大腸短縮を改善した。

腸炎の組織学的所見 (炎症細胞浸潤・大腸粘膜上皮破壊) を改善した。

これらの抗炎症効果は既に臨床で使用されているステロイドと同等であった。

以上から Atractylodin や Wuweizisu C はステロイドと同等な抗炎症薬として腸炎誘発の抑制に利用できる可能性が示唆された。あるいは Atractylodin や Wuweizisu C は新たな抗炎症薬の seeds として有用であると考えられる。

(3) 作用機序解析の結果

Atractylodin の作用機序について

以前までの研究で Atractylodin は IL-6 発現に必須である転写因子 NF- κ B の転写能活性化・DNA 結合能活性化に影響を与えない一方で、genome DNA 上の IL-6 promoter に対する結合を妨げることが分かっていた。すなわち、Atractylodin は IL-6 promoter における epigenetic regulation に対して作用を発揮する可能性が示唆されていた。

Epigenetic regulation には genome DNA 構造を制御するヒストン修飾 (アセチル化・メチル化など) が重要であるため、Atractylodin がどのようなヒストン修飾に対して作用しているかについて更なる解析を行った。その結果、Atractylodin は脱メチル化酵素 KDM4A の活性を阻害し、ヒストン H3 リシン 9 残基のメチル化を TNF- α 刺激下で誘導することが分かった。また、KDM4A 阻害剤 ML324 でも Atractylodin と同様な IL-6 産生抑制作用と抗炎症効果を認めた。

以上、Atractylodin の作用機序を分子レベルで解析することによりヒストン H3 脱メチル化酵素 KDM4A が新たな抗炎症療法のターゲットとして有望であることが示唆された。なお、Atractylodin の研究成果に関する論文は査読を有する国際雑誌に受理された (5. 主な発表論文)

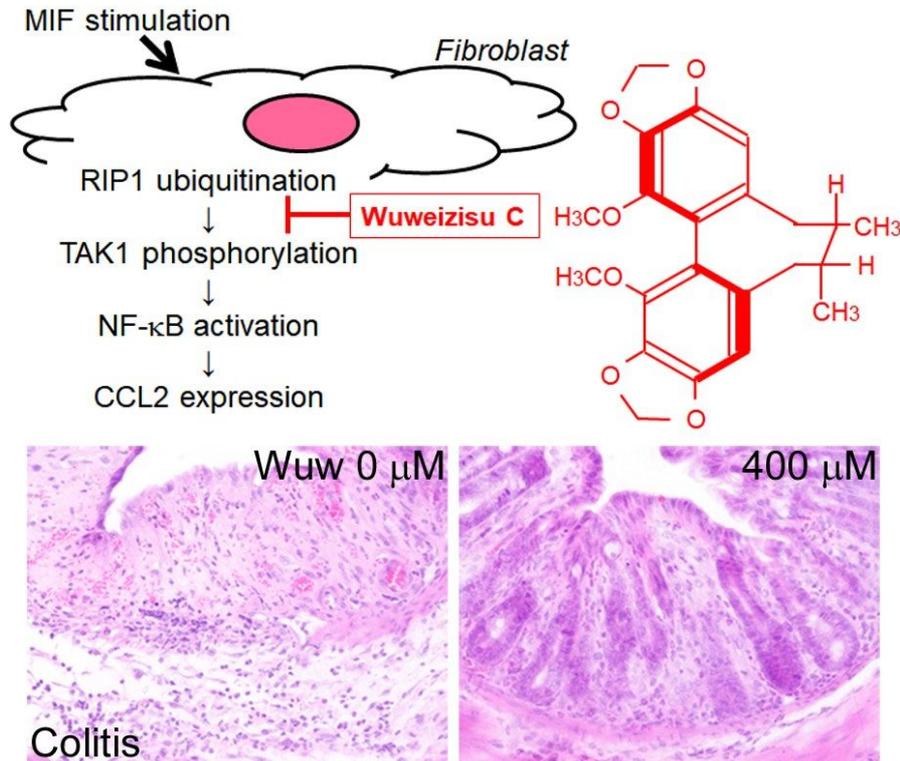
Wuweizisu C の作用機序について

Wuweizisu C は CCL2 発現に重要な転写因子 NF- κ B の活性化を MIF 刺激下でも TNF- α 刺激下でも阻害することが分かった。TNF- α 刺激による NF- κ B の活性化について下記の経路が既に知られている。

TNF-alpha 刺激 RIP1 ユビキチン化 TAK1 活性化/自己リン酸化 NF-kappaB 活性化

一方、MIF 刺激による NF-kappaB の活性化の経路はこれまで詳細不明であったが、MIF 刺激でも TNF-alpha 同様な経路を介することがわかった。Wuweizisu C は RIP1 ユビキチン化を阻害せず TAK1 リン酸化を阻害した。しかし、Wuweizisu C は in vitro で活性型 TAK1 が有するリン酸化活性を阻害する作用はなかったため、RIP1 ユビキチン化による TAK1 活性化が Wuweizisu C により阻害されると考えられる。

Wuweizisu C の研究成果に関する論文は現在作成中であるが、概要は下図の通りである。



上段:線維芽細胞を MIF で刺激すると炎症性ケモカイン CCL2 が産生される。Wuweizisu C は RIP1 ユビキチン化による TAK1 活性化/自己リン酸化を阻害し CCL2 産生を抑制する。

下段: Wuweizisu C 投与により腸炎での炎症細胞浸潤・腺管上皮破壊は改善される。

(4) 天然化合物以外を対象とした炎症制御の結果

新たな抗炎症分子 S100G の発現と機能の特定

IL-10 は抗炎症サイトカインとして知られているが、IL-10 投与により炎症性腸疾患の改善は認められなかった (*World J Gastroenterol* 2013, 19, 3931-3941)。そこで我々は” IL-10 が腸管において他の抗炎症分子の発現を抑制するため IL-10 投与のみでは腸炎の抑制を得ることができない” という仮説を立てた。この仮説を検証するため IL-10 欠損マウスと野生型マウスで腸炎を誘発し、大腸で発現される遺伝子を microarray により網羅的に解析した。その結果、S100G の発現は腸炎の発症により誘導されるが IL-10 欠損マウスにおいて、その発現が劇的に高まっていることが分かった。S100G の発現を更に解析したところ、S100G は大腸の線維芽細胞において発現され、その細胞質に局在していることが分かった。更に、S100G の機能を解析したところ、TNF-alpha 刺激による NF-kappaB 活性化を抑制し CCL2 発現を抑制することが分かった。

以上、S100G は腸炎の発症により誘導されるため、腸炎発症のマーカーとして有用であることが示唆された。また、S100G の発現を誘導することで腸炎の発症を抑制できる可能性が示唆された。

S100G の研究成果に関する論文は査読を有する国際雑誌に受理された (5 . 主な発表論文)。

線維芽細胞の遺伝子導入効率を高める簡便な手法の開発

我々の研究などから線維芽細胞も腸炎の発症に関与することが示唆されている。初代線維芽細胞はマウスの胎児などから容易に入手でき、継代・保存が可能であるという長所がある一方で、遺伝子導入効率が極めて低いという短所があった。

我々は、まず、既に市販され広く使用されている脂質をベースとした遺伝子導入試薬 4 種類をそれぞれ用いて初代線維芽細胞の遺伝子導入効率を評価した。その結果、これまでの報告通り、どの遺伝子導入試薬を用いても低い遺伝子導入効率しか認められなかった。これら遺伝子導入試薬は異なる脂質をベースとしていたため、次に、2 つの異なる遺伝子導入試薬を様々に組み合わせ使用して遺伝子導入効率を評価した。その結果、Lipofectamine LTX と FuGENE HD の組み合わせでのみ遺伝子導入効率がそれぞれ単独で用いた場合と比較して 5 倍以上に高まることが分かった。すなわち、新たな試薬を開発することなく、既存の試薬の組み合わせを工夫するだけで初代線維芽細胞の遺伝子導入効率を劇的に改善することができた。

この研究成果に関する論文は査読を有する国際雑誌に受理された (5 . 主な発表論文) 。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kazuhiro Ishiguro, Osamu Watanabe, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Masanobu Matsuhita, Hidemi Goto, Yoshiki Hirooka. Combinational use of lipid-based reagents for efficient transfection of primary fibroblasts and hepatoblasts. *Biotechniques* 2017, 63, 37-39

Kazuhiro Ishiguro, Osamu Watanabe, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Masanobu Matsuhita, Hidemi Goto, Yoshiki Hirooka. Inhibition of KDM4A activity as a strategy to suppress interleukin-6 production and attenuate colitis induction. *Clin. Immunol.* 2017, 180, 120-127

Kazuhiro Ishiguro, Osamu Watanabe, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Takafumi Ando, Hidemi Goto, Yoshiki Hirooka. S100G expression and function in fibroblasts on colitis induction. *Int. Immunopharmacol.* 2016, 39, 92-96

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：後藤 秀実

ローマ字氏名：Goto Hidemi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 10215501

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。