

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19380057  
研究課題名(和文) サイトカインレセプターによる情報伝達の分子メカニズムの解明とバイオプローブの創製  
研究課題名(英文) Molecular mechanism and bioprobes of cytokine receptor signaling

研究代表者  
片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授  
研究者番号：20242307

## 研究成果の概要(和文)：

サイトカインは、主に免疫細胞等から分泌される可溶性タンパク質であり、標的細胞上に発現した特異的な受容体との結合を介して細胞内の複雑なシグナル伝達経路を活性化する。炎症性サイトカインは、炎症、免疫、細胞生存、細胞死などの多くの生体反応を制御し、自己免疫疾患や発がん等に関与していることが明らかになってきている。本研究では、炎症性サイトカインによって誘導されるシグナル伝達経路やその遺伝子発現を抑制する低分子生理活性物質(バイオプローブ)を同定し、その作用メカニズムを解明した。

## 研究成果の概要(英文)：

Cytokines are soluble proteins secreted primarily by immunological cells and able to induce complex intracellular signaling pathways through binding to their specific receptors expressed on target cells. Pro-inflammatory cytokines regulate many biological processes such as inflammation, immunity, cell survival, and cell death, and thus involved in autoimmune diseases and carcinogenesis. In this study we identified small bioactive compounds (termed as bioprobes) that prevent signal transduction and gene expression in response to pro-inflammatory cytokines and further elucidated their mechanisms of actions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：(1) シグナル伝達 (2) 生理活性 (3) 炎症性サイトカイン (4) NF- $\kappa$ B  
(5) ICAM-1 (6) オドロシドA (7) ペペロミン (8) ウアバイン

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、主として免疫細胞等から分泌される細胞間情報伝達物質であり、免疫系や造血系等の高次生体システムを制御している可溶性タンパク質である。サイトカインは、きわめて微量で標的細胞に発現した特異的なレセプターとの結合を介して、細胞内の複雑なシグナル伝達経路を活性化し、多彩な細胞機能を制御する。

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) や IL-1 (interleukin-1) をはじめとする炎症性サイトカインは、炎症惹起作用を有する重要なサイトカインである。これらのサイトカインは、サイトカインカスケードの初発に関与し、炎症局所において、炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導するだけでなく、血管内皮細胞を刺激し、その表面に細胞接着因子を誘導することによって白血球の集積を促進する。これらの炎症反応は、本来、生体防御機構の一部であるが、過剰な反応は炎症性疾患やアレルギーの原因となっている。事実、TNF- $\alpha$  や IL-1 は、関節リウマチや炎症性腸疾患クローン病等の自己免疫疾患の発症に関与している。

TNF-R1 (tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1) と IL-1R (interleukin-1 receptor) は、それぞれの細胞内領域として、デスドメイン (death domain) と TIR1D (Toll/IL-1 receptor homology domain) を有し、アダプタータンパク質が会合することによって、転写因子 NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) のシグナル伝達経路を活性化する。最近、NF- $\kappa$ B の活性化が、発がんにも関与していることが明らかになってきた。したがって、炎症性サイトカインのシグナル伝達の仕組みを分子レベルで解明することは、がんや自己免疫疾患の発症機構の理解だけでなく、それらの疾患の予防法・治療法の開発にも貢献することが期待される。

## 2. 研究の目的

我々は、サイトカインレセプターのシグナル伝達の分子メカニズムを解明することを目的として、主としてケミカルバイオロジーを基盤とした研究を展開してきた。すなわち、微生物代謝産物や植物などの天然物、もしくは合成化合物のライブラリーから、サイトカインレセプターによるシグナル伝達経路に作用する低分子化合物をスクリーニングし、その標的分子や作用機序の解析を行ってきた。これまでに、その研究成果として、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1) によって誘導される細胞接着因子 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) の発現を抑制する化合物として、アセトキシシクロヘキシミド (acetoxycycloheximide)、オドロシド A (odoroside A)、ペペロミン (peperomin) 誘導体、ウルソール酸 (ursolic acid) 等を見出した。本研究では、我々の独自のバイオアッセイ系で単離した低分子生理活性物質 (バイオプローブ) の

標的分子や作用機序を分子レベルで明らかにし、炎症性サイトカインのシグナル伝達の分子メカニズムを解明することを目的とした。

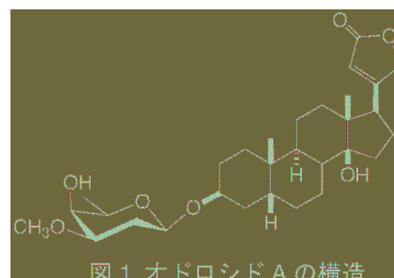
## 3. 研究の方法

ヒト肺がん腫 A549 細胞は炎症性サイトカインレセプターである TNF-R1 と IL-1R を発現している。A549 細胞では、TNF- $\alpha$  や IL-1 の刺激によって、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路の活性化とそれに続く NF- $\kappa$ B 応答性遺伝子 (ICAM-1、c-FLIP、Cox-2 等) の発現が誘導される。本研究では、A549 細胞を血管内皮細胞のモデル細胞として用い、炎症性サイトカインで誘導される NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路の活性化、並びに NF- $\kappa$ B 応答遺伝子の発現誘導に対する低分子生理活性物質 (バイオプローブ) の作用機序を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) オドロシド A の作用メカニズム

夾竹桃 (*Nerium oleander*) より、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1) による ICAM-1 の細胞表面の発現誘導を阻害するカルデノリド配糖体として、オドロシド A を同定した (図 1)。オドロシド A は、TNF- $\alpha$  によって誘導される I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibitor of NF- $\kappa$ B) タンパク質のリン酸化と分解、NF- $\kappa$ B サブユニット p65 の核移行、ICAM-1 mRNA の発現誘導を阻害しなかったが、ICAM-1 タンパク質の発現誘導を強力に阻害した。オドロシド A は *de novo* タンパク質合成を阻害したが、翻訳装置を直接的に阻害するのではなく、細胞膜上の Na<sup>+</sup>依存性アミノ酸輸送を選択的に阻害することを見出した (図 2)。これらの結果と一致して、オドロシド A は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の酵素活性を直接的に阻害することが認められた。さらに、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 特異的阻害剤 ウアバイン (ouabain) は、オドロシド A と同じ作用メカニズムによって、炎症性サイトカインによる ICAM-1 の発現誘導を阻害した。以上の結果より、オドロシド A をはじめとするカルデノリド配糖体は、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase に作用することによって、Na<sup>+</sup>依存性アミノ酸輸送を阻害し、ICAM-1 をはじめとする NF- $\kappa$ B 応答性遺伝子の発現誘導を翻訳レベルで阻害することが明らかになった。本研究は、心臓疾患の治療薬、もしくは抗がん剤として臨床開発が行われ





に抑制しなかった。以上の結果から、ペペロミン誘導体は I $\kappa$ B キナーゼの活性化の上流を阻害し、その阻害活性には $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ラクトン構造が必要であることが明らかになった。現在、I $\kappa$ B キナーゼに対する阻害剤は数多く報告されているが、サイトカインレセプターから I $\kappa$ B キナーゼの活性化に至るまでのシグナル伝達経路を標的とする阻害剤は数少なく、ペペロミン誘導体はそのユニークな構造から新しいタイプの

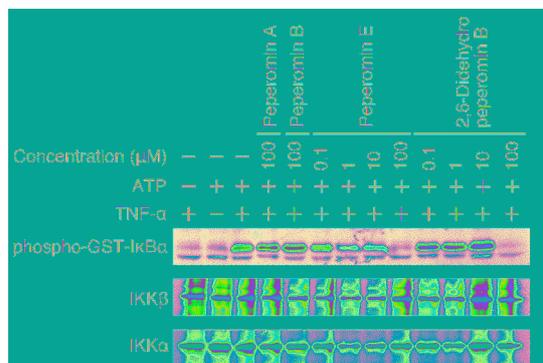


図6 I $\kappa$ B キナーゼの活性化に対するペペロミン誘導体の影響

A549 細胞をペペロミン誘導体で 1 時間前処理した後、TNF- $\alpha$ 存在下で 15 分間インキュベートした。I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) を免疫沈降法により回収し、GST-I $\kappa$ B $\alpha$ (1-54) を基質として ATP 存在下、もしくは非存在下でリン酸化反応を行った。

阻害剤であることが期待される。

#### (4) ウルソール酸の作用メカニズム

炎症性サイトカインによる ICAM-1 の発現誘導を抑制する物質として、植物代謝産物の一つであるウルソール酸(ursolic acid)を同定した(図7)。ウルソール酸は、TNF- $\alpha$ によって誘導される I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化と分解、並びに ICAM-1 mRNA の発現を抑制しなかったが、ICAM-1 タンパク質の発現を強く抑制した。さらに、ウルソール酸は $[^3\text{H}]$ アミノ酸の酸不溶性画分への取り込みを阻害したが、無細胞タンパク質合成を部分的にしか阻害しなかった。以上の結果より、ウルソール酸は主として生細胞における *de novo* タンパク質合成を阻害することによって、炎症性サイトカインによる遺伝子発現を翻訳レベルで阻害することが示唆された。ウルソール酸は、多くの化粧品の成分として工業的に利用されている。本研究により、ウルソール酸が生物活性の一つとして抗炎症作用をもっていることが明らかになった。

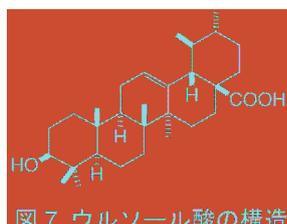


図7 ウルソール酸の構造

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Takao Kataoka, Chemical biology of inflammatory cytokine signaling of Journal of Antibiotics、査読有、Vol. 62、No. 12、2009、655-667
- ② Susumu Inaba、Takao Kataoka(他 5 名、最後)、The cytotoxic macrolide FD-891 induces caspase-8-dependent mitochondrial release of cytochrome c and subsequent apoptosis in human leukemia Jurkat cells、Journal of Antibiotics、査読有、Vol. 62、No. 9、2009、507-512
- ③ Yohei Takada、Takao Kataoka (他 6 名、最後)、Odoricide A and ouabain inhibit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and prevent NF- $\kappa$ B-inducible protein expression by blocking Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport、Biochemical Pharmacology、査読有、Vol. 78、No. 9、2009、1157-1166
- ④ Chieko Tsutsui、Takao Kataoka (他 6 名、最後)、Peperomins as anti-inflammatory agents that inhibit the NF- $\kappa$ B signaling pathway、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、査読有、Vol. 19、No. 15、2009、4084-4087
- ⑤ Masayoshi Sakaino、Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Post-transcriptional regulation of the expression of ferrochelatase by its variant、Journal of Biochemistry、査読有、Vol. 145、No. 6、2009、733-738
- ⑥ Kimiko Kadohara、Takao Kataoka (他 6 名、最後)、Caspase-8 mediates mitochondrial release of pro-apoptotic proteins in a manner independent of its proteolytic activity in apoptosis induced by the protein synthesis inhibitor acetoxycycloheximide in human leukemia Jurkat cells、Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol. 284、No. 9、2009、5478-5487
- ⑦ Hirotugu Ogura、Takao Kataoka (他 4 名、最後)、ERK and p38 MAP kinase are involved in downregulation of cell surface TNF receptor 1 induced by acetoxycycloheximide、International Immunopharmacology、査読有、Vol. 8、No. 6、2008、922-926
- ⑧ Yohei Takada、Kentaro Matsuo、Takao Kataoka、Gramicidin A directly inhibits mammalian Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、Molecular and Cellular Biochemistry、査読有、Vol. 319、No. 1-2、2008、99-103

- ⑨ Hirotsugu Ogura, Takao Kataoka (他4名、最後)、Ectodomain shedding of TNF receptor 1 induced by protein synthesis inhibitors regulates TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B and caspase-8、Experimental Cell Research、査読有、Vol. 314, No. 6, 2008、1406-1414
- ⑩ Liyan Wang, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他10名、8番目)、Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca americana*, Journal of Natural Products、査読有、Vol. 71, No. 1, 2008、35-40
- ⑪ Ming Zhao, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他17名、13番目)、Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*, Journal of Natural Products、査読有、Vol. 70, No. 7, 2007、1098-1103
- ⑫ Na Li, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他10名、10番目)、Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*, Journal of Natural Products、査読有、Vol. 70, No. 6, 2007、998-1001
- ⑬ Na Li, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他10名、10番目)、Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*, Journal of Natural Products、査読有、Vol. 70, No. 4, 2007、544-588
- ⑭ Ming Zhao, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他7名、8番目)、The ursane-, leane-, dammerane-, lupane-, and taraxasterane-type triterpenes isolated from *Nerium oleander* and their biological activities, Recent Progress in Medicinal Plants、査読無、Vol. 16, 2007、83-107
- [学会発表] (計24件)
- ① 山田有理子 (片岡孝夫) 他、ペペロミン誘導体は転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路において I $\kappa$ B キナーゼの活性化を阻害する、日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス (東京都目黒区)
- ② 横道公伸 (片岡孝夫) 他、炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現誘導に対するウルソール酸の作用メカニズムの解析、日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス (東京都目黒区)
- ③ 松尾健太郎 (片岡孝夫) 他、強心配糖体ウアバインは炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現を翻訳レベルで阻害する、日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス (東京都目黒区)
- ④ 松尾健太郎 (片岡孝夫) 他、The removal of C-terminal domain of c-FLIP(L) by caspase-8 modulates Fas ligand-dependent NF- $\kappa$ B activation、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ 片岡孝夫 他、Caspase-8 mediates mitochondrial release of pro-apoptotic proteins in a manner independent of its proteolytic activity in apoptosis induced by the protein synthesis inhibitor acetoxycycloheximide、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑥ Takao Kataoka 他、The novel apoptosis signaling pathway that links caspase-8 to the mitochondrial release of pro-apoptotic proteins in ribotoxic stress response induced by the protein synthesis inhibitor acetoxycycloheximide、The 25nd Naito Conference on Chemical Biology [II]、平成 21 年 9 月 10 日、シャトレーゼガトーキングダム (北海道札幌市)
- ⑦ 片岡孝夫 他、アセトキシシクロヘキシミドによるカスパーゼ 8 依存性アポトーシスの分子機構の解析、日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑧ 山田有理子 (片岡孝夫) 他、マイコトリエン II は炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現誘導を阻害する、日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑨ 松尾健太郎 (片岡孝夫) 他、グラミシジン A は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase を直接的に阻害する、日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑩ 横道公伸 (片岡孝夫) 他、ウルソール酸は炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現誘導を阻害する、日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑪ Takao Kataoka、Small molecules that target the NF- $\kappa$ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines、The 22nd Naito Conference on Chemical Biology [I]、平成 20 年 9 月 10 日、シャトレーゼガトーキングダム (北海道札幌市)
- ⑫ 松尾健太郎 (片岡孝夫) 他、カスパーゼ 8 とその調節因子 c-FLIP による転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達機構の制御、日本農芸化学会 2008 年度 (平成 20 年度) 大会、平成 20 年 3 月 28 日、名城大学天白キャン

ンパス（愛知県名古屋市）

- ⑬ 南雲美智子（片岡孝夫）他、リボトキシックストレス応答によるカスパーゼ 8 に依存したアポトーシス誘導機構の解析、日本農芸化学会 2008 年度（平成 20 年度）大会、平成 20 年 3 月 28 日、名城大学天白キャンパス（愛知県名古屋市）
- ⑭ 高田洋平（片岡孝夫）他、夾竹桃由来オドロシド A の作用メカニズムの解析、日本農芸化学会 2008 年度（平成 20 年度）大会、平成 20 年 3 月 28 日、名城大学天白キャンパス（愛知県名古屋市）
- ⑮ 筒井智恵子（片岡孝夫）他、炎症性サイトカインによる転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に対するペペロミン誘導体の作用機序の解析、日本農芸化学会 2008 年度（平成 20 年度）大会、平成 20 年 3 月 28 日、名城大学天白キャンパス（愛知県名古屋市）
- ⑯ 松尾健太郎（片岡孝夫）他、カスパーゼ 8 と c-FLIP による転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達の制御機構の解明、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会、平成 19 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑰ 片岡孝夫、NF- $\kappa$ B シグナル伝達制御分子とその作用メカニズム、第 28 回日本炎症・再生医学会、平成 19 年 8 月 2 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
准教授  
研究者番号：20242307

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：