

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590691
 研究課題名（和文） マクロファージを標的とした炎症性疾患に対する治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of anti-inflammatory therapy targeting macrophages

研究代表者
 石黒 和博 (ISHIGURO KAZUHIRO)
 名古屋大学・医学部・寄附講座准教授
 研究者番号：60432275

研究成果の概要：生薬成分の中で dehydrocorydaline と praeruptorin A は活性化マクロファージ特異的に viability (生存能力) を低下させることがわかった。Dehydrocorydaline のほうがより効果的であったため、その作用機序を検討した結果、マクロファージ活性化に伴うミトコンドリア膜電位上昇を妨げることで細胞内 ATP を枯渇させることがわかった。活性化マクロファージ特異的作用がなかった生薬成分の中から胃癌細胞の viability を低下させる 6-shogaol を見出した。マクロファージを標識する蛍光色素として NBD-PZ を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：伝統薬物、炎症

1. 研究開始当初の背景

病原体や lipopolysaccharide (LPS) など外来異物により活性化したマクロファージは T 細胞・B 細胞に抗原を提示するだけでなく interleukin-6 (IL-6) などのサイトカインを産生し潰瘍性大腸炎やクローン病など炎症性疾患の病態形成に深く関与している。これまでステロイドなど炎症性疾患の治療に有用な化合物が報告され臨床で使用されているが、炎症を誘導している活性化マクロファージに対して特異的に作用し炎症疾患の治療に有用な化合物は未だ知られていない。活性化マクロファージ特異的に作用する化合物を応用した抗炎症療法では炎症性疾患の根治を期待することができ、ステロイドで見

られるような副作用の軽減も期待できる。

一方、生薬は伝統的に様々な疾患の治療に利用される過程で有用なものが選別されてきた。またその成分の化学構造は非常に多様性が豊富であるため生薬は combinatorial chemistry などによる合成化合物とは全く異なる魅力的な library を構成している。生薬の成分を様々な指標に基づき検索することで治療に有用な化合物を同定できる。またその作用の機序を解明することで新しい治療のターゲットを見出すことができる。更に生薬成分の化学構造からその作用に重要な部位を特定することで新しい薬剤の開発に有用なリードとして生薬成分を応用することも可能である。

2. 研究の目的

(1) 活性化マクロファージ特異的に viability 低下を誘導する化合物を主に生薬の成分の中から同定する。

(2) 活性化マクロファージ特異的に細胞死を誘導する化合物の作用機序を解明する。

(3) 活性化マクロファージのサイトカイン産生に与える影響を評価する。

(4) マウスの炎症性疾患モデルを用いて治療的効果を評価する。

(5) (1) のスクリーニングに用いた化合物を異なる指標でも評価し、入手した生薬成分の有効活用を図る。

(6) 腸炎などの炎症性疾患で病変部位に浸潤してくるマクロファージを標識するために有用な蛍光色素を同定する。

3. 研究の方法

(1) LPS で活性化したマクロファージ由来 RAW 細胞の viability 低下を指標とし主に生薬成分からスクリーニングを行う。活性化した RAW 細胞の viability を低下させた化合物については活性化していない RAW 細胞に対する作用も比較検討し活性化マクロファージ特異的に viability を低下させるかどうかを調べる。更にマウスの腹腔滲出マクロファージを用いてその特異的作用を確認する。

(2) 活性化マクロファージ特異的な作用の機序を解明するため、化合物がアポトーシス経路やミトコンドリア機能に与える影響を評価する。

(3) 炎症性疾患の病態形成に重要なサイトカインである IL-6 の産生に与える影響について ELISA を利用して検討する。

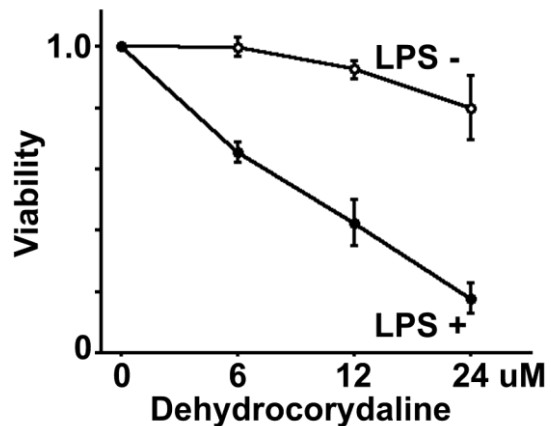
(4) マウスに LPS を投与した敗血症モデルを用いて活性化マクロファージ特異的作用を有する化合物の投与が治療的効果を発揮するかどうかを検討する。

(5) 活性化マクロファージ特異的な作用がなかった生薬成分を用いてマクロファージ以外の細胞の viability に対する影響について評価する。また viability 低下作用があればその分子機序を解明する。

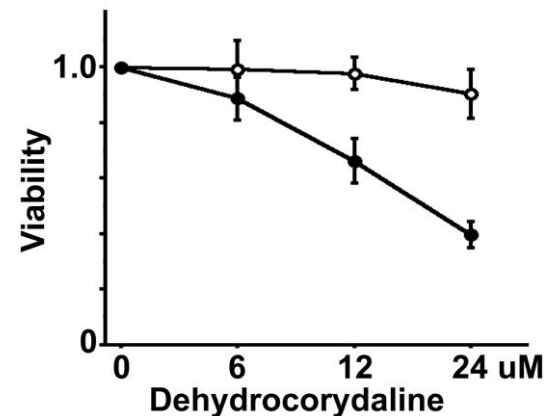
(6) これまで報告されかつ入手可能な様々な蛍光色素をマクロファージの培地に加えたうえで蛍光観察することによりマクロファージの蛍光標識に有用な蛍光色素がないかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) Dehydrocorydaline は活性化した RAW 細胞特異的に viability を著しく低下させた。

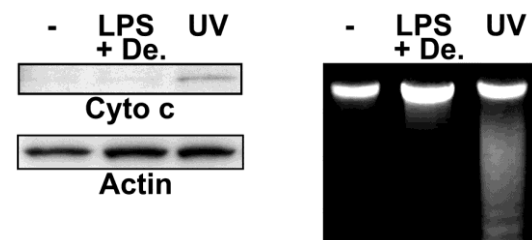


マウスの腹腔滲出マクロファージを用いても同様な結果を得た。



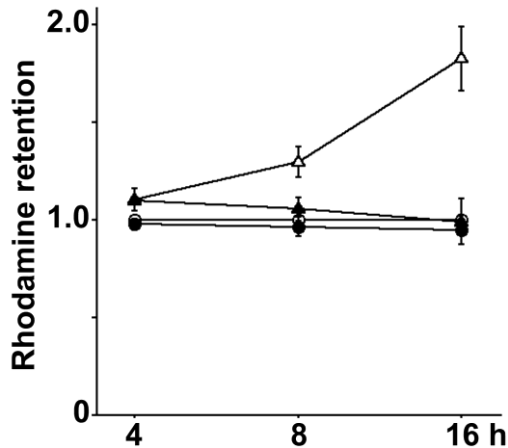
Dehydrocorydaline 以外にも生薬成分の中で praeruptorin A が活性化した RAW 細胞特異的に viability を低下させることを見出したがその効果は著明ではなかった。

(2) 細胞死を誘導する機序を検討したところアポトーシスを誘導する紫外線 (UV) とは全く異なるものであった。



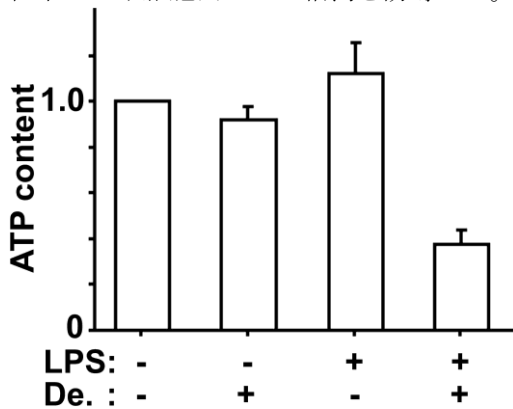
LPS+dehydrocorydaline (De.) は UV 照射と異なりミトコンドリア cytochrome c の細胞質内漏出を起こさず DNA 断片化も起こさなかった。Caspase-3 および caspase-9 の活性化も LPS+dehydrocorydaline では認めなかった。

その一方で dehydrocorydaline は活性化に伴うマクロファージのミトコンドリア膜電位上昇を阻害した。



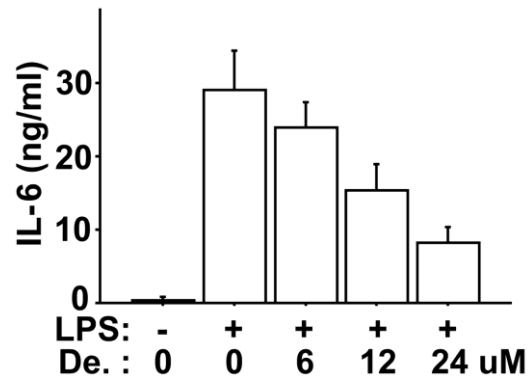
ミトコンドリア膜電位は Rhodamine 123 を用いて評価した。コントロール (○) の基底レベルのミトコンドリア膜電位に対して dehydrocorydaline 単独 (●) では影響はなかった。LPS 存在下 (△) ではミトコンドリア膜電位の上昇を観察したが LPS とともに dehydrocorydaline が存在する (▲) とこのミトコンドリア膜電位上昇が妨げられた。

ミトコンドリア膜電位は細胞内の ATP 産生に関与しているが dehydrocorydaline は LPS 存在下でのみ細胞内 ATP の枯渇を誘導した。

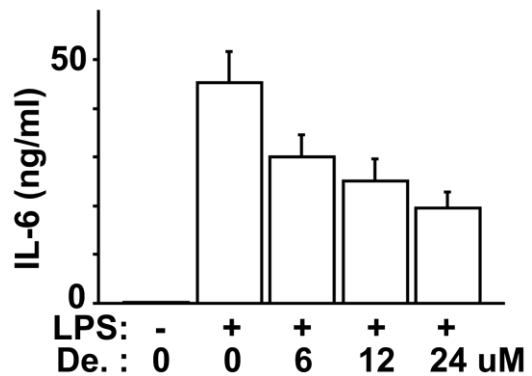


活性化マクロファージではサイトカイン産生などに ATP の需要が高まる。この需要に応じ細胞内 ATP 量を維持するためミトコンドリアでは膜電位が上昇するが dehydrocorydaline はこのミトコンドリア膜電位上昇を妨げることにより ATP の枯渇を招き、その結果、活性化したマクロファージ特異的に細胞死を誘導することが示唆された。なお活性化マクロファージのミトコンドリア膜電位上昇を妨げる詳細な分子機序については現在も検討中である。

(3) Dehydrocorydaline は濃度依存的に LPS による RAW 細胞の IL-6 産生を抑制した。

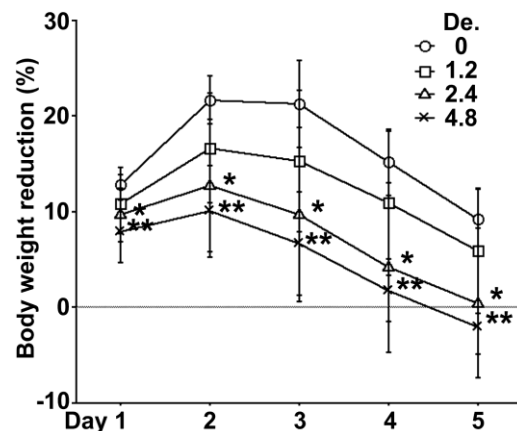


腹腔滲出マクロファージを用いても同様な結果を得た



IL-6 は様々な炎症性疾患の病態形成に関与しているため dehydrocorydaline は活性化マクロファージ特異的に viability 低下を招き活性化マクロファージの IL-6 産生を抑制することで炎症性疾患の改善に有用である可能性が示唆された。

(4) LPS 投与によりマウスでは著明な体重減少が観察されるが dehydrocorydaline の投与はこの体重減少を著明に改善した。

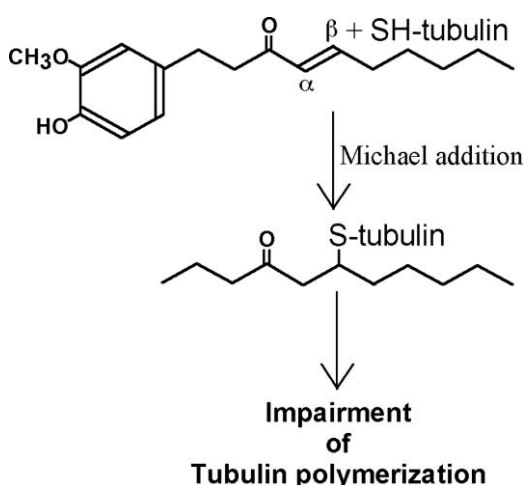


マウスに LPS 10mg/kg 投与する際に dehydrocorydaline 0, 1.2, 2.4, 4, 8 μmol/kg を同時に投与した。Dehydrocorydaline は投

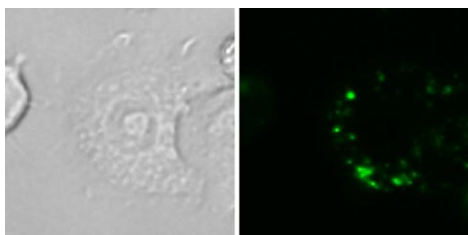
与量依存的に LPS による体重減少を改善した。
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student's *t*-test,
 $n = 6$)。

今後も様々なマウスの炎症性疾患モデルを用いて dehydrocorydaline の治療的効果を検討していく。また肝障害など副作用の有無についても検討していく。

(5) 活性化マクロファージ特異的作用がなかった生薬成分の中で 6-shogaol はその特徴的な化学構造を介して tubulin と反応しその重合を阻害する結果、微小管を破壊することで胃癌細胞の増殖を抑制した。



(6) カルボン酸の標識に使用されている蛍光色素 NBD-PZ が lysosomes を介してマクロファージの標識にも有用であることを証明した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) **Kazuhiro Ishiguro**, Takafumi Ando, Osamu Watanabe and **Hidemi Goto**. Specific reaction of α,β -unsaturated carbonyl compounds such as 6-shogaol with sulfhydryl groups in tubulin leading to microtubule damage. *FEBS Letters* 2008, 582, 3531-3536 (査読有)

(2) **Kazuhiro Ishiguro**, Takafumi Ando and **Hidemi Goto**. Novel application of 4-nitro-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole to visualize lysosomes in live cells.

BioTechniques 2008, 45, 465-468 (査読有)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

(1) 名称: 微小管破壊剤及びそれを含有する癌細胞増殖抑制剤

発明者: 石黒和博、安藤貴文、後藤秀実

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特願

番号: PCT/JP2008/058354(WO)

出願年月日: 平成 20 年 5 月 1 日

国内外の別: 国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 和博 (ISHIGURO KAZUHIRO)

名古屋大学・医学部・寄附講座准教授

研究者番号: 60432275

(2) 研究分担者

安藤 貴文 (ANDO TAKAFUMI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80378041

後藤 秀実 (GOTO HIDEMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10215501