

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07076

研究課題名（和文）抗NLRP3インフラマソーム・抗線維化作用を併せ持つ天然物を活用した薬剤開発

研究課題名（英文）Research on drug development utilizing natural products with both anti-NLRP3 inflammasome and anti-fibrosis properties

研究代表者

本田 裕恵（Honda, Hiroe）

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・副主幹研究員

研究者番号：10463134

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）：我々は、甘草成分イソリキイリチゲニン（ILG）がNLRP3インフラマソーム活性化阻害作用を持つことを見出してきた。本研究は、1. ILGのインフラマソーム抑制効果の作用機序の解明と、2. ILGのNASHモデルマウスでの有効性の検証を目的としている。

1. ATPase活性を持つILGの標的候補タンパクについて、ILGとの結合性を示すデータを得た。また、ILGはATPとタンパクとの結合を阻害しなかった。ATPase活性への影響について継続して検討中である。
2. CDAHFD摂餌誘導型のNASHモデルマウスにおいて、ILG混餌により組織学的に肝臓の線維化が部分的に抑制され、病態の改善が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々はILGの標的候補タンパクを絞り込み、ILGとの結合性を示すデータを一部取得できた。今後さらに標的タンパクとしての妥当性を検証し、標的タンパクと同定することができれば、ILGの医薬品シーズとしての有用性にエビデンスが加わり、新たな創薬ターゲットを得ることができる可能性がある。NASHについては現在承認されている治療薬は存在しないことから、新たな創薬シーズとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have found that the licorice component isoliquiritigenin (ILG) has an inhibitory effect on NLRP3 inflammasome activation. This study aims to 1) elucidate the mechanism of inhibitory effect of ILG on NLRP3 inflammasome and 2) validate the efficacy of ILG in a mouse model of NASH.

1) Data were obtained on candidate ILG target proteins with ATPase activity, showing their binding to ILG. ILG did not inhibit binding of ATP to the protein; the effect of ILG on ATPase activity is under continued investigation.
2) In the CDAHFD feeding-induced NASH mouse model, feeding with ILG partially ameliorated liver fibrosis histologically and improved the disease state.

研究分野：免疫学

キーワード：NLRP3インフラマソーム カンゾウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病には内臓脂肪組織の慢性炎症や線維化が深く関与していることが明らかとなっている。2 型糖尿病患者の血中で増加するパルミチン酸は NLRP3 インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 の産生を引き起こし(Wen H, *Nat. Immunol.*, 2011)、これが脂肪組織慢性炎症の誘導、インスリン抵抗性に関わっていることが示されている(Stienstra R, *Cell Metab.*, 2010)。さらに、肥満・糖尿病における内臓脂肪組織の線維化は、肝臓等への異所性脂肪蓄積を誘導する(Tanaka M, *Nat. Commun.*, 2014)。

我々は、約 2,000 種類の天然物から、甘草に含まれるイソリクイリチゲニン (ILG) に強力な NLRP3 インフラマソーム阻害活性を見出し、ILG を高脂肪食摂餌 2 型糖尿病モデルマウスに混餌投与することによりインスリン抵抗性が改善されることを見出した(Honda H, *J. Leukoc. Biol.*, 2014; 特許第 6036193 号)。また、ILG は TLR4/MD-2 や Mincle のシグナルを抑制し、高脂肪食摂餌マウスの内臓脂肪組織線維化を抑制することを見出した(Watanabe Y, *Sci. Rep.*, 2016)。

NLRP3 インフラマソーム活性化は、動脈硬化、痛風、アルツハイマー病等との関連も報告されており、その阻害剤の医薬品としての応用範囲は広く、ILG の作用機序や標的分子を同定することが望まれた。

また、近年生活習慣病の関与する線維化疾患として、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が問題となっている。NASH は飲酒歴が少ないにも関わらず、脂肪肝に加えて肝臓の炎症状態や線維化を呈し、30%-50% の患者が肝硬変から肝がんへと進行する深刻な疾患であるが、有効な治療薬は存在しない。NASH の患者の多くは血清脂質濃度が高く、インスリン抵抗性を示す。NASH と NLRP3 の関連については、NLRP3 欠損マウスにおいて NASH が亢進するとする報告(Henao-mejia J, *Nature*, 2012)と、逆に NASH が改善するという報告(Wree A, *J. Mol. Med.*, 2014)があり、結論が出ていない。ILG は NLRP3 インフラマソーム阻害作用のほか、抗線維化作用を併せ持つ化合物であり、ILG が NASH の肝臓線維化に対し改善効果を示す可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

上記の ILG に関する研究成果を踏まえ、創薬研究に展開していくため、本研究では(1)ILG の NLRP3 インフラマソーム活性化阻害機序を明らかにすること、(2) NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) に対する ILG の有用性を検証することを目的とした。本研究により、ILG の標的分子を解明し、NLRP3 インフラマソームに関連があるとされている疾患の予防法や治療法の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) ILG が NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する分子機序の解明

NLRP3 インフラマソーム活性化によるカリウムイオンの細胞外流出に与える ILG の影響

J774A.1 細胞に Nigericin を添加した際に誘導される K⁺イオンの細胞外への流出に与える ILG の影響を原子吸光度法を用いて調べた。

NLRP3 インフラマソーム活性化による塩素イオン細胞外流出に与える ILG の影響

J774A.1 細胞に Nigericin を添加した際に誘導される Cl⁻イオンの細胞外流出に与える ILG の影響を MQAE 試薬を用いて検討した。

ILG の IL-1 産生抑制作用の反応性に関する検討

LPS にて 3 時間プライミングを行った J774A.1 細胞を PBS にて洗浄し、ILG を添加し 30 分反応させた。これらの細胞について、一方はそのまま ILG 存在下で ATP 若しくは Nigericin を添加し、もう一方は ILG を洗浄して取り除いた後、ATP 若しくは Nigericin を添加し、40 分後の培養上清中の IL-1 の産生量を比較した。

ILG の標的候補タンパクとの結合性に関する検討

MD シミュレーションの結果から ILG の標的タンパク候補として絞り込んだ 2 種のタンパクを入手し、分子間相互作用解析装置を用いて各々のタンパクと ILG との結合性について検討を行った。

標的候補タンパクの ATPase 活性に与える ILG の影響

ILG の標的タンパク候補として絞り込んだ 2 種のタンパクについて、各々のタンパクの ATPase 活性に与える ILG の影響を ADP-Glo(Promega)を用いて検討した。

標的候補タンパクと ATP の結合に与える ILG の効果

ATP を固定したビーズ、標的候補タンパク及び ILG を混合し、ATP に結合する標的候補タンパクの量に与える影響をウェスタンブロッティングで調べた。

(2) NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) に対する ILG の有用性の検証

超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) を用いた NASH モデルマウスを作製し、ILG 混餌による肝臓組織の線維化に与える影響を検討した。CDAHFD 摂餌期間 6 週間、12 週間、15 週間において、ILG を混餌投与し以下のとおり評価を行った。

CDAHFD 摂餌により誘導される脂肪肝形成への影響

肝臓組織を HE 染色し、血漿中 ALT, AST を測定して調べた。

肝臓組織の線維化に与える ILG の影響

肝臓組織をマッソントリクローム染色し検討した。さらに、肝臓組織の TGF- β 、1 型コラーゲン等の発現をリアルタイム PCR 法で調べ、ILG の線維化に与える影響を検討した。

肝臓の慢性炎症状態への影響

肝臓組織の炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α)や、インフラマソーム構成タンパク(NLRP3、ASC、Caspase-1)の発現をリアルタイム PCR にて比較した。

4. 研究成果

(1) ILG が NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する分子機序の解明

NLRP3 インフラマソーム活性化によるカリウムイオンの細胞外流出に与える ILG の影響

Nigericin による誘導される K⁺イオンの細胞外への流出は、ILG の添加によって抑制されなかった。

NLRP3 インフラマソーム活性化による塩素イオン細胞外流出に与える ILG の影響

Nigericin を添加した際に誘導される Cl⁻イオンの細胞外流出は ILG により抑制されなかった。

ILG の IL-1 β 産生抑制作用の反応性に関する検討

ILG を細胞に反応させて洗浄を行った後 NLRP3 インフラマソーム活性化剤を添加しても、ILG 存在下で NLRP3 インフラマソーム活性化剤を添加しても同様の IL-1 β の産生抑制効果が認められた。このことから、ILG は標的タンパクと不可逆的な共有結合をしていることが予想された。また、ILG の β -不飽和カルボニル基がマイケルアクセプターとして働いていることが推察された。

ILG の標的候補タンパクとの結合性に関する検討

ILG の標的タンパク候補として絞り込んだ 2 種のタンパクについて、両者とも ILG の濃度依存的に結合性の増加が認められた。分子間相互作用解析装置のセンサーグラムは低分子化合物に特徴的なハコ型を示した。

標的候補タンパクの ATPase 活性に与える ILG の影響

ILG の標的タンパク候補として絞り込んだ 2 種のタンパクについて、各々のタンパクの ATPase 活性に与える ILG の影響を ADP-Glo(Promega)を用いて検討したが、安定性のある結果を得ることができなかった。

標的候補タンパクと ATP の結合に与える ILG の効果

ILG は ATP と標的候補タンパクとの結合を阻害しなかった。

今後は、ILG と標的候補タンパクとの結合性を裏付ける更なるデータを得るとともに、ATPase 活性に与える影響を明らかにし、ILG の作用機序を明確にしていきたい。

(2) NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) に対する ILG の有用性の検証

CDAHFD 摂餌により誘導される脂肪肝形成への影響

ILG 混餌により、肝臓への脂肪滴の形成が部分的に抑制され、血漿中の ALT 及び AST の値の改善が認められた。ILG には脂肪肝形成抑制効果があることが示された。

肝臓組織の線維化に与える ILG の影響

肝臓組織をマッソントリクローム染色し線維化に与える影響を調べた結果、ILG により部分的に線維化が抑制されていることが示された。また、肝臓組織の TGF- β 、1 型コラーゲンといった線維化関連分子の遺伝子発現は CDAHFD 群で上昇が認められ、ILG 混餌により発現低下が認められた。

肝臓の慢性炎症状態への影響

肝臓組織での IL-1 β 、TNF- α の発現や、インフラマソーム構成タンパク (NLRP3、ASC、Caspase-1) の発現は CDAHFD 群で上昇し、ILG 混餌群で発現低下が認められた。ILG により肝臓の慢性炎症状態が緩和されていることが示された。

ILG は NASH の病態を緩和し、創薬シーズとなり得る可能性が示された。今後は詳細な作用メカニズムの解明についても取り組んでいきたい。

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 2件）

1. 著者名 Watanabe Yasuharu, Nagai Yoshinori, Honda Hiroe, Okamoto Naoki, Yanagibashi Tsutomu, Ogasawara Masaru, Yamamoto Seiji, Imamura Ryu, Takasaki Ichiro, Hara Hiromitsu, Sasahara Masakiyo, Arita Makoto, Hida Shigeaki, Taniguchi Shun'ichiro, Suda Takashi, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 11821 ~ 11835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900477RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Riko, Furusawa Yukihiro, Honda Hiroe, Watanabe Yasuharu, Fujisaka Shiho, Nishikawa Miyu, Ikushiro Shinichi, Kurihara Shin, Tabuchi Yoshiaki, Tobe Kazuyuki, Takatsu Kiyoshi, Nagai Yoshinori	4. 巻 66
2. 論文標題 Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome by Modifying Gut Bacteria Composition in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 2101119 ~ 2101119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202101119	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 Ogasawara Masaru, Yamasaki-Yashiki Shino, Hamada Masahiro, Yamaguchi-Miyamoto Tomomi, Kawasuji Toru, Honda Hiroe, Yanagibashi Tsutomu, Ikutani Masashi, Watanabe Yasuharu, Fujimoto Ryota, Matsunaga Takayuki, Nakajima Noriyuki, Nagai Yoshinori, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Betulin Attenuates TGF- β 1- and PGE $_2$ -Mediated Inhibition of NK Cell Activity to Suppress Tumor Progression and Metastasis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 339 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Riko Ishibashi, Yukihiro Furusawa, Hiroe Honda, Yoshinori Nagai
2. 発表標題 A licorice-derived ingredient ameliorates metabolic syndrome through the alteration of gut microbiota
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 璃子、古澤 之裕、本田 裕恵、渡邊 康春、藤坂 志帆、戸邊 一之、高津 聖志、栗原 新、田淵 圭章、長井 良憲
2. 発表標題 イソリクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善
3. 学会等名 日本農芸学会2022年度
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋璃子, 古澤之裕, 本田裕恵, 渡邊康春, 藤坂志帆, 戸邊一之, 高津聖志, 栗原新, 田淵圭章, 長井良憲
2. 発表標題 イソリクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善
3. 学会等名 日本薬学会第142年会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 カンゾウエキス及びその製造方法、並びに、腸内細菌調整用組成物、腸管バリア機能増強組成物、抗肥満用組成物、抗糖尿病用組成物、及びNLRP3インフラマソーム活性制御組成物	発明者 長井良憲、古澤之裕、高津聖志、本田裕恵、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-178401	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

富山県薬事総合研究開発センター
<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/index.html>

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
---------	---------