

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590317

研究課題名(和文)天然化合物を用いた特異的サイトカイン産生制御療法の開発

研究課題名(英文)Specific reduction in cytokine production with natural compounds

研究代表者

石黒 和博(Ishiguro, Kazuhiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60432275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1) IL-17産生を抑制するソウジュツ成分Atractylodinの投与は腸炎モデルで抗炎症効果を発揮した。AtractylodinはIL-17を産生するTh17細胞の分化に関与するIL-6の産生を抑制していた。更に、AtractylodinはIL-6のmRNA発現に関与する転写因子の活性化には影響を与えずgenome DNA上のIL-6 promoterと転写因子NF- κ Bの結合を阻害していた。

2) 腸内細菌代謝産物である酢酸は大腸粘膜上皮細胞においてtubulin alphaアセチル化を介しRap1活性化を阻害することによりflagellin刺激によるIL-8の産生を抑制することを解明した。

研究成果の概要(英文)：1) We demonstrated the anti-inflammatory effect of Atractylodin, a gredient of atractylodes lancea rhizome, in a mouse model of colitis. Atractylodin reduced IL-17 production through the suppression of Th17 differentiation by reducing the production of IL-6, one of important cytokines involved in Th 17 differentiation. We also found that Atractylodin inhibited the binding bewtween NF- κ B and IL-6 promoter on genomic DNA without affecting activation of NF- κ B itself.

2) Acetate, a major short-chain fatty acid produced by gut flora, suppressed IL-8 production via the acetylation of tubulin alpha in flagellin-stimulated epithelial cells of the colonic mucosa. We proved that tubulin alpha acetylation led to the inhibition of Rap1 activation downstream of flagellin stimulation, resulting in the reduced expression of c-fos, a constituent of AP-1 transcription factor, which is important for IL-8 mRNA expression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症 サイトカイン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

未だ十分な治療がなく難治性に至る炎症性疾患（潰瘍性大腸炎・クローン病、膠原病、自己免疫疾患など）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の過剰産生が重要である。したがって、難治性炎症性疾患の病態を解明し新たな治療法を開発するためには炎症性サイトカイン産生制御作用を有する化合物を同定し、その作用機序から炎症性サイトカイン産生の機序を分子レベルで解析することが必要である。

2. 研究の目的

特定のサイトカイン産生を制御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、NBD-C1 腸炎モデルで抗炎症効果を評価し、薬理作用を分子レベルで解析することにより、難治性炎症性疾患に対する新しい治療法、特異的サイトカイン産生制御療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング

培地に天然化合物を添加→細胞刺激→一定時間後に培地を回収→培地中のサイトカイン濃度を ELISA で網羅的に評価した。

(2) 抗炎症効果の評価

我々が開発した NBD-C1 腸炎では炎症を誘起する抗原であるハプテン-タンパク複合体を蛍光観察可能である。NBD-C1 を注腸後、マウスにサイトカイン産生制御作用を有する化合物を投与し、ハプテン-タンパク複合体が形成された部位で抗炎症効果を評価した。なお、NBD-C1 腸炎では注腸 2 日後に体重減少がピークに達するため、注腸 2 日後に抗炎症効果の評価を行った。

(3) 作用機序解析

サイトカインの産生は mRNA 発現レベル・転写因子活性化レベル・サイトカイン遺伝子プロモーターレベルなどで制御されている。化合物が有するサイト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解析を行った。

4. 研究成果

(1) スクリーニングの結果

T細胞の IL-17 産生を抑制する Atractylodin (ソウジュツの成分) を同定した。また、T細胞の IL-2 産生を抑制する腸内細菌代謝産物として酢酸・酢酸ナトリウムを同定している。他にも T細胞の IFN γ 産生を抑制したり線維芽細胞の IL-6 産生を抑制したりする生薬成分をそれぞれ同定したが、今回の研究期間中には詳細な解析ができなかった。

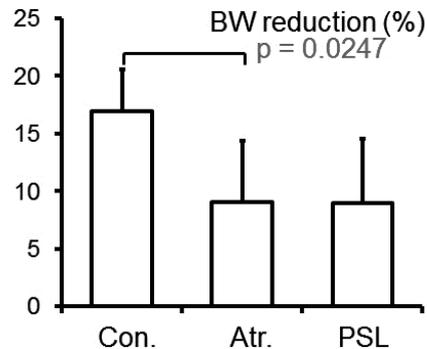
(2) 抗炎症効果の評価の結果

NBD-C1 腸炎において Atractylodin 投与は

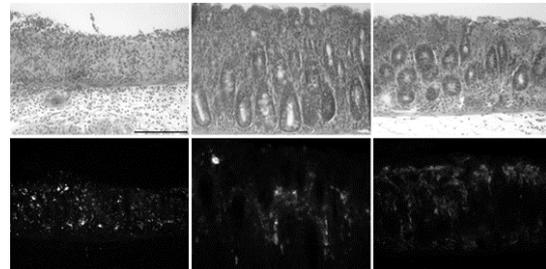
①下痢・下血を改善した。

	N	Diarrhea		Rectal bleeding
		mild	severe	
Control	5	2	3	3
Atractylodin	5	2	0	0
Prednisolone	5	2	0	0

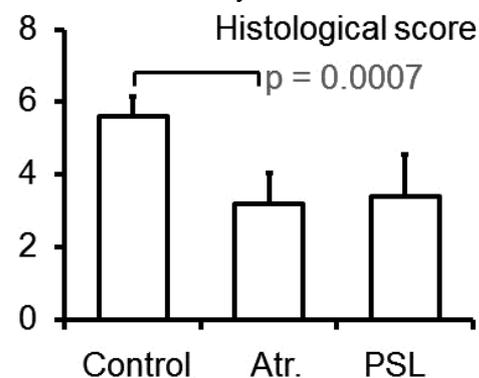
②体重減少も改善した。



③抗原である NBD-タンパクが形成された部位において腸炎の組織学的所見（炎症細胞浸潤・腸管上皮破壊）を改善したことも確認できた。上段、HE 染色；下段、蛍光観察。



Control Atractylodin Prednisolone



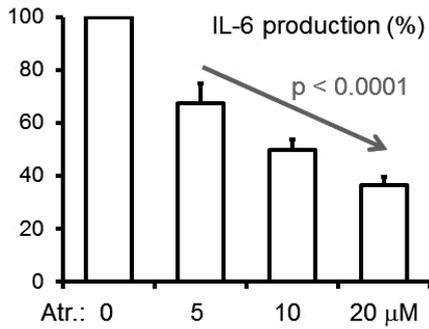
以上から Atractylodin はステロイドであるプレドニゾロンと同等な抗炎症効果を腸炎誘発に対して発揮しうることが証明された。

(3) 作用機序解析の結果

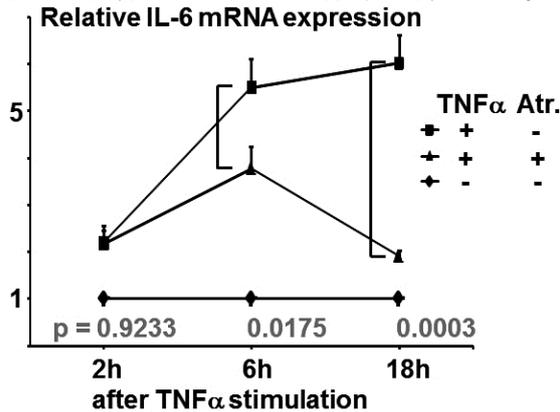
Atractylodin の作用機序について

- ①IL-17 を産生する Th17 細胞の分化に重要な転写因子 ROR γ t の発現を抑制していた。
- ②ROR γ t の発現に重要なサイトカインの産生に与える影響を調べたところ、IL-6 産生を IL-17 産生に対するより高度に抑制していた。
- ③TNF α で刺激した線維芽細胞の IL-6 産生も抑制していた。

Primary 線維芽細胞は primary T 細胞とは異なり培養維持が容易であるため、以下は TNF α で刺激した線維芽細胞を用いて行った実験での結果である。



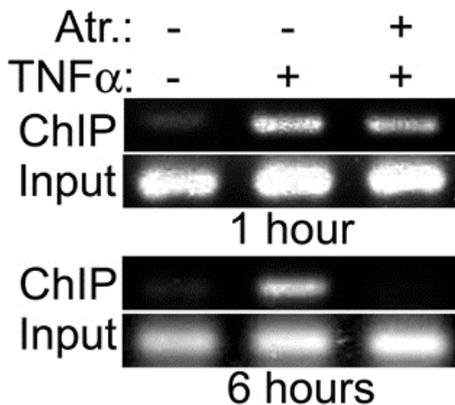
④ IL-6 mRNA 発現に対し TNF α 刺激 2 時間後までは影響を与えず 6 時間以後に抑制した。



⑤ IL-6 mRNA の安定性には影響を与えていなかった。

⑥ レポータープラスミドで評価したところ、IL-6 promoter の活性化や IL-6 promoter を活性化する転写因子 NF- κ B の転写能活性化・DNA 結合能活性化にも影響を与えなかった。

⑦ しかし、genome DNA 上の IL-6 promoter に対する NF- κ B の結合を TNF α 刺激 6 時間後に抑制していた。

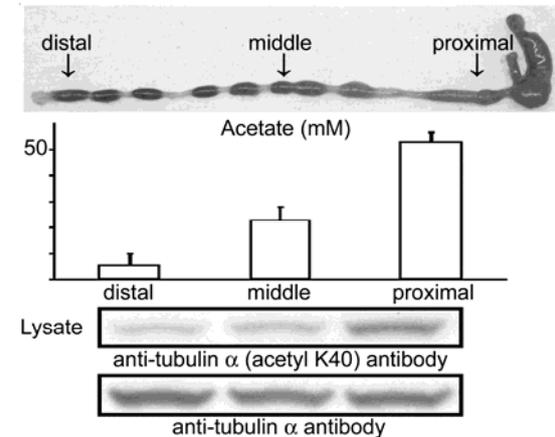


転写因子 NF- κ B の活性化を妨げない一方で genome DNA 上の IL-6 promoter への結合を妨げていることから、Atractylodin は IL-6 promoter における epigenetic regulation に対して作用を發揮していることが示唆された。Epigenetic regulation には genome DNA の構造を制御しているヒストンの修飾 (アセチル化・メチル化など) が重要である。今後、Atractylodin がどのようなヒストンの修飾に対して作用しているのかについて更なる解析が必要であると考えられた。

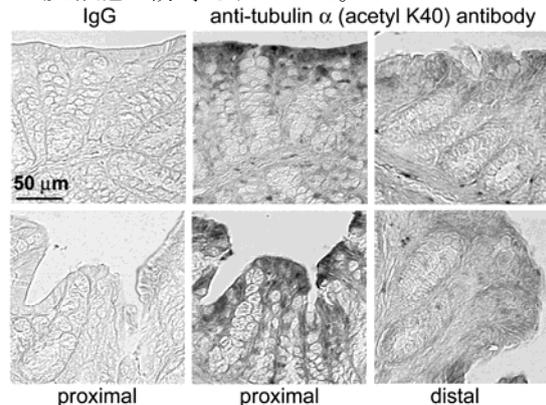
酢酸・酢酸ナトリウムの作用機序について

以前の我々の研究により酢酸・酢酸ナトリウムは T 細胞において tubulin α のアセチル化を介し転写因子 NFAT の核内移行を抑制していることを既に解明している (**Kazuhiro Ishiguro**, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Tubulin alpha functions as an adaptor for NFAT-importin beta interaction. *J. Immunol.* 2011, 186, 2710-2713)。今回の研究期間中には、この tubulin α アセチル化をバイオマーカーとして大腸における酢酸の作用を解析し、以下の結果を得た。

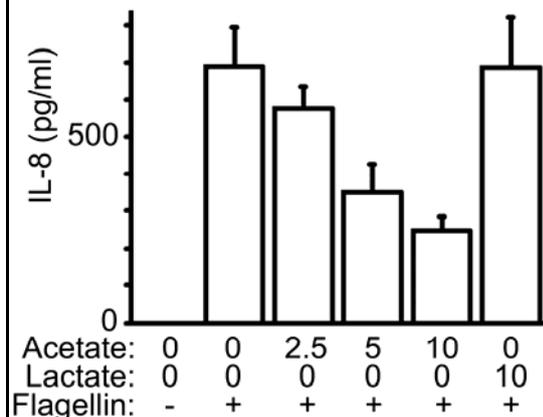
① 便中の酢酸濃度は盲腸側 (proximal side) で高く、それに応じて tubulin α のアセチル化も盲腸側で高かった。



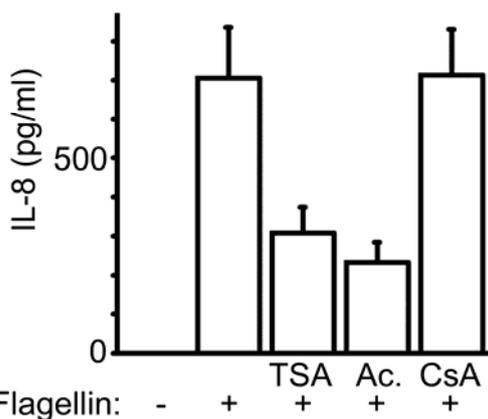
② tubulin α アセチル化は主に盲腸側の粘膜上皮細胞で誘導されていた。



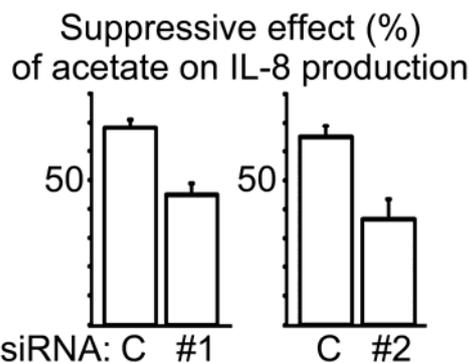
③ 粘膜上皮細胞において酢酸は flagellin 刺激による IL-8 の産生を抑制していた。



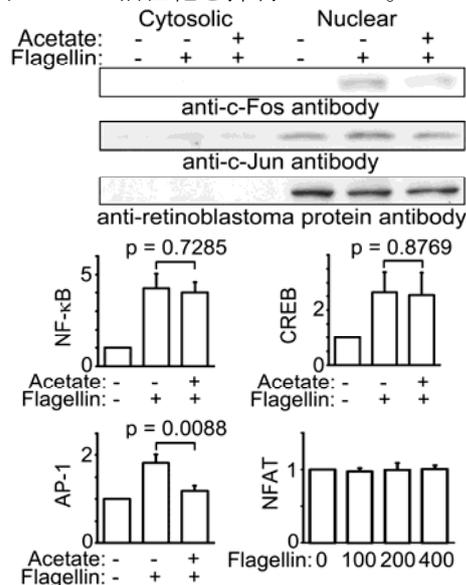
④IL-8 産生抑制は tubulin α のアセチル化を誘導する TSA でも認められた一方で、NFAT 活性化を抑制する CsA では認められなかった。



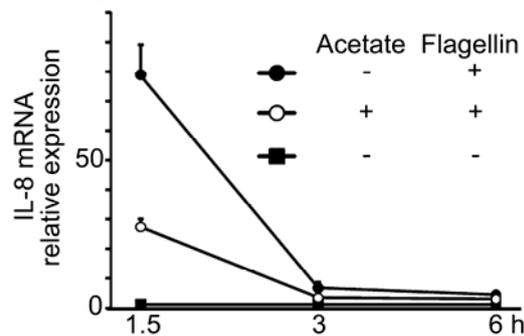
⑤siRNA # 1・# 2 で tubulin α アセチル化酵素をノックダウンし tubulin α のアセチル化が低下している細胞では酢酸による IL-8 産生抑制効果も低下した。



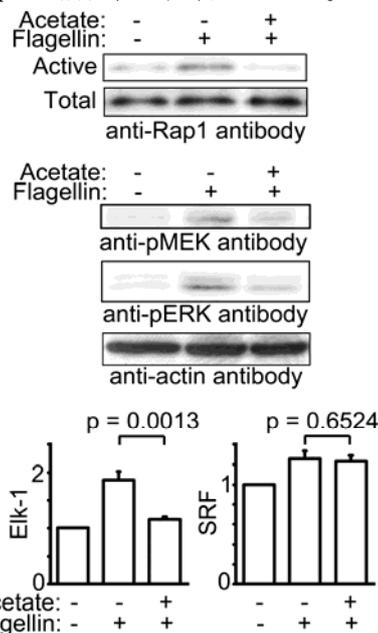
以上から粘膜上皮細胞において酢酸は tubulin α のアセチル化を介して flagellin 刺激による IL-8 産生を抑制することが分かった。しかし、NFAT の活性化を抑制する CsA で IL-8 の産生を抑制できなかったことから、tubulin α のアセチル化は NFAT 活性化制御以外の作用を発揮していることが示唆された。⑥酢酸は flagellin 刺激による c-fos の発現を抑制することにより c-fos からなる転写因子 AP-1 の活性化を抑制していた。



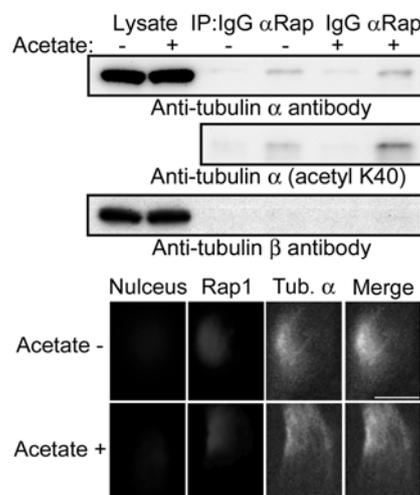
⑦酢酸により IL-8 mRNA 発現が抑制されていることも確認できた。



⑧c-Fos の発現は転写因子 Elk-1 の活性化に依存するため、Elk-1 を活性化する Rap-MEK-ERK pathway を解析したところ、酢酸は Rap1 の活性化を阻害していた。



⑨Rap1 に tubulin α が結合していた。酢酸は結合に影響を与えずアセチル化を誘導した。



以上から酢酸は Rap1 に結合している tubulin α のアセチル化を誘導することにより Rap1 の活性化を阻害し、Rap-MEK-ERK pathway を介した Elk-1 活性化に依存した c-fos の発現を妨げることにより IL-8 の産生を抑制することが分かった。

結論

ソウジュツの成分 Atractylodin や腸内細菌が産生する主要な短鎖脂肪酸である酢酸には炎症性サイトカインの産生を抑制する作用があり、これらを利用して新たな抗炎症療法を開発可能であることが示唆された。

また、それぞれの作用機序を解析することにより IL-6 および IL-8 の産生を制御する新たな機序を分子レベルで解明できた。

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1件)

Kazuhiro Ishiguro, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Suppressive action of acetate on interleukin-8 production via tubulin alpha acetylation. *Immunol. Cell Biol.* 2014, 92, 624-630
査読有

[学会発表] (計4件)

①**石黒和博、安藤貴文、後藤秀実**
腸内細菌代謝産物による大腸上皮のケモカイン産生制御
第50回日本消化器免疫学会総会
2013年8月1日 東京都、新宿区、ホテルグランドヒル

②**石黒和博、安藤貴文、後藤秀実**
腸内細菌主要代謝産物である酢酸が発揮するT細胞活性化制御の分子機序
第9回日本消化管学会総会
2013年1月25日 東京都、新宿区、京王プラザホテル

③**石黒和博、安藤貴文、後藤秀実**
Novel mouse model of colitis to visualize hapten-protein formation
International Ulcer Week 2012, 14th International Conference of Ulcer Research Symposium
2012年7月12日 東京都、新宿区、京王プラザホテル

④**石黒和博、安藤貴文、後藤秀実**
腸内細菌の主要代謝産物である酢酸の作用機序とバイオマーカー
第49回日本消化器免疫学会総会
2012年7月9日 鹿児島県、鹿児島市、城山観光ホテル

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6391/6393/shoukakinaiikagaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 和博 (ISHIGURO, Kazuhiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：60432275

(2) 研究分担者

安藤 貴文 (ANDO, Takafumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
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