

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460129

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎の治療に有用な薬剤開発のための創薬シーズの提供

研究課題名(英文) The screening of crude herbs to protect butyrate-induced death of colonic epithelial cells

研究代表者

松本 司 (Matsumoto, Tsukasa)

いわき明星大学・薬学部・教授

研究者番号：00173906

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)：酪酸で誘発されるマウス結腸上皮細胞の細胞死を潰瘍性大腸炎モデルとして用い検討を行った。生薬エキスを対象にスクリーニングを行った結果、タクシャのエキスに細胞死を抑制する活性を観察し、タクシャが潰瘍性大腸炎の治療に応用できる可能性を示唆した。タクシャ中の活性成分についても検討を行い、2種の活性成分を単離した。構造解析を行った結果、これらの活性成分はトリテルペノイドに分類されるアリソールBおよび酢酸アリソールBであると同定した。

研究成果の概要(英文)：Recent findings demonstrated that a significant number of *Fusobacterium varium* was identified in the mucosa of patients with ulcerative colitis (UC), and it has been suggested that the butyrate produced by *F. varium* involved in the pathogenesis of UC. In the screening of Sino-Japanese herbal medicines to protect butyrate-induced death of murine colonic epithelial cells MCE301 as an *in vitro* model of UC, it was found that the extract of *Alisma orientale* Juzepczuk (Alismataceae) showed potent protective activity against butyrate-induced cell death. Bioassay-guided purification of methanol extract of the rhizome of *A. orientale* led to the isolation of alisol B and alisol B acetate. These results suggest that the use of alisol B and alisol B acetate, or a crude extract of *A. orientale* containing these compounds are expected the effectiveness to relieve UC caused by the butyrate-induced death of colonic epithelial cells.

研究分野：生薬学

キーワード：潰瘍性大腸炎 酪酸 結腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は主として大腸の粘膜と粘膜下層をおかす原因不明の非特異性炎症疾患である。潰瘍性大腸炎は炎症の発症部位により全大腸炎型、左側大腸炎型、直腸炎型および右側あるいは区域性大腸炎型に分類されるが、いずれも初期の症状としては、腹痛とともに排便時に粘液が多くなり下痢の症状を呈し、しだいに粘液の量が増え、血液が混じった粘血便ができるようになる。重篤な症状となると1日に10回以上もの粘血便や血便に加え、発熱や体重減少、まれに便秘がおこることもある。これらの症状は緩解および再燃を繰り返すため長期間にわたる治療が必要となる難治性の疾患である。

潰瘍性大腸炎に対する積極的な病態研究にもかかわらず、その病因や遷延化因子などに根本的なところは明らかになっていない。潰瘍性大腸炎は精神的なストレス下で悪化することや、絶食療法や高タンパク・低脂肪食により病態の軽減が観察される場合があることに加え、HLA-DRB1、TNF 遺伝子、Nod2 遺伝子などの遺伝子多型との相関や、季節変動が臨床的に観察されることなどから、心理的素因、食習慣、遺伝的素因、環境因子、腸内細菌などの要因が複雑に重なり合い病態が形成されるものと考えられている。その中でも、腸内細菌の関与が示唆されていた。

(1). 潰瘍性大腸炎の患者血清中には、*Fusobacterium varium* に対する抗体が高頻度に検出される(図1)。

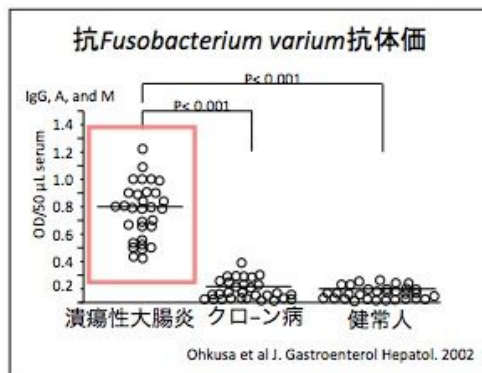


図1 潰瘍性大腸炎患者の抗体価 (Ohkusa et al.)

(2). 炎症粘膜における *F. varium* の局在を調べると比較的陰窩近傍にその存在が観察されている。

(3). *F. varium* は、酪酸産生能が極めて高い菌である。

これらの知見から *F. varium* によって多量に産生された酪酸が、陰窩の結腸上皮細胞に作用して炎症を惹起し、病態形成に関与する

可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎の患者血清中には、嫌気性菌 *Fusobacterium varium* に対する抗体が高頻度に検出され、本疾患の発症原因の一つとして *F. varium* の関与が示唆されている。*F. varium* は、極めて高い酪酸産生能を有することを特徴とする。そこで培養結腸上皮細胞に対する酪酸の作用について検討を行った結果、低濃度の酪酸が結腸上皮細胞に対して細胞死を誘導することを見いだした。潰瘍性大腸炎の発症に酪酸の関与が示唆されたことから、酪酸によって誘発される結腸上皮細胞死を抑制することにより潰瘍性大腸炎の病態の改善が期待される。

潰瘍性大腸炎に対して、漢方薬には一定の治療効果が認められていることから、漢方薬をはじめとする和漢薬中には、本疾患に対して有効な活性成分が含まれる可能性が考えられる。そこで本研究では、潰瘍性大腸炎治療薬のシード化合物の探索を目的として、酪酸による結腸上皮細胞死に対する和漢薬エキス作用について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) メタノールで抽出した生薬エキスを実験に供した。すなわち、生薬をおよそ10倍量(W/V)のメタノールにて室温下2週間浸漬抽出し、得られたエキスを減圧濃縮後、ジメチルスルホキシドに溶解後、実験に用いた。

(2) 結腸上皮細胞株としてSV40大型T抗原を導入したトランスジェニックマウスより樹立されたMCE301細胞を用いた。マウス結腸上皮細胞株MCE301細胞は、5% FBS、10 ng/mL マウス EGF、1% SITE、1% ペニシリン・ストレプトマイシン混合液を含むDMEM/Ham's F-12培地を用いて、5% CO2存在下37°Cで培養した。コンフルエントになった後、常法に従いトリプシン-EDTAにより細胞を回収し、継代した。実験に供する細胞は、コンフルエントになった後に培地を無血清のDMEM/F-12培地に交換し、培養温度を39°Cとし3日間培養した後、各種実験に使用した。

(3) 生薬エキス存在下にMCE301細胞を酪酸で刺激し、結腸上皮細胞死の抑制効果を評価した。細胞の生存率はMTT法を用いて測定した。すなわち、200 μLの培養液と共に96穴培養プレート上で培養したMCE301細胞に被検薬剤を添加し、一定時間培養後、Hanks' 塩類緩衝溶液に溶解したMTT溶液(5 mg/mL)50 μLを96穴培養プレートの各穴に添加し、5% CO2存在下37°Cで3時間インキュベートした。インキュベート後、培養上清をアスピレーターを用いて吸引除去後、生成したMTTホルマザンを40 mMの塩酸を含むイソプロピルアルコール溶液100 μLで溶解した。100 μLの蒸留水を加えた後、分光光度計を用い570 nm

の吸光度を測定した。

4. 研究成果

生薬由来の化合物を対象にスクリーニングを行った結果、ベルベリン型アルカロイドに分類される Coptisine が酪酸による細胞死を抑制する作用を有することを見出した。Coptisine の構造を図 2 に示す。

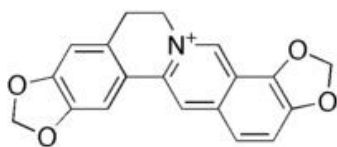


図 2 Coptisine

我々は既に Berberine が同様の活性を有することを見出しているが、Coptisine は Berberine と同じ母核構造を有していることから、構造活性相関の観点から興味深い結果であった。

次に、生薬エキスについて検討を行った。和漢生薬 180 種のメタノールエキスを対象に探索を行った結果、沢瀉をはじめとする数種の生薬エキスに細胞死を抑制する活性が観察された。そこで、沢瀉のメタノールエキスを調製し各種クロマトグラフィーを用いて分画し、2 種の活性成分を単離した。構造解析を行った結果、これらの活性成分はトリテルペノイドに分類されるアリソール B および酢酸アリソール B であると同一化した (図 3)。

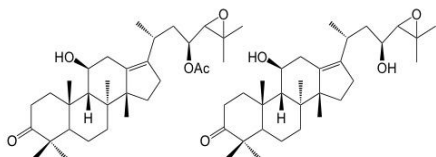


図 3 酢酸アリソールおよびアリソール

得られた化合物は酪酸によって誘発される結腸上皮細胞死を低濃度で抑制した (図 4)。酢酸アリソールの IC₅₀ は、1.0 μM であった。顕微鏡で観察した細胞死抑制作用を図 5 に示す。

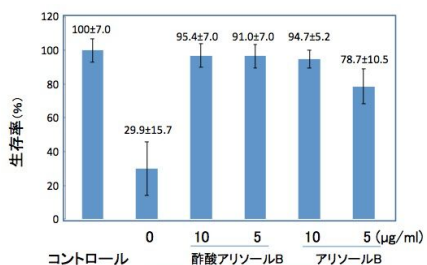


図 4 結腸上皮細胞死の抑制作用

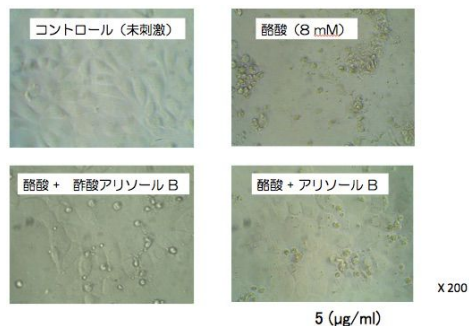


図 5 顕微鏡下で観察したアリソール B および酢酸アリソール B の細胞死抑制作用

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

松本 司、田淵圭章、山田陽城、川口基一郎、酪酸による結腸上皮細胞死の誘導と和漢薬の抑制効果、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 司 (MATSUMOTO Tsukasa)

いわき明星大学薬学部・教授

研究者番号： 00173906

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

田淵圭章 (TABUCHI Yoshiaki)

富山大学研究推進機構・教授

研究者番号： 20322109

山田陽城 (YAMADA Haruki)

東京薬科大学薬学部・教授

研究者番号： 60096691

川口基一郎 (KAWAGUTI Kiichirou)

いわき明星大学薬学部・教授

研究者番号： 10146334