

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860072

研究課題名(和文)天然物からの活性化マクロファージ特異的に作用する制御物質の探索と作用機構の解明

研究課題名(英文)A search of compounds with regulating activated macrophages

研究代表者

小池 敦資(Koike, Atsushi)

大阪薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：00625725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、活性化マクロファージ特異的に作用する制御物質の探索とその作用機構の解明を目的とし、進めてきた。その結果、紫根に含まれる成分、シコニンやその誘導体を候補物質として同定した。つまり、マクロファージの活性化剤であるリポポリサッカライド(LPS)やシコニン単独では、マクロファージの生存に影響を及ぼさない濃度において、これら両者を併用することで、細胞障害が誘導された。さらに、本障害機構を解析した結果、アポトーシスを介した細胞障害であることが示唆された。本結果は、シコニンやその類縁体には、活性化マクロファージを標的とした、新規の抗炎症作用を有していることを示している。

研究成果の概要(英文)：Macrophages play pivotal roles in inflammatory responses. Shikonin (SHK) and its derivatives (-hydroxyisovalerylshikonin, acetylshikonin, and isobutylshikonin) are 1,4-naphthoquinone pigments extracted from the roots of *Lithospermum erythrochizon*. We investigated the effects of SHK derivatives on lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophages. Low doses of SHK derivatives significantly induced macrophage cytotoxicity (mouse macrophage-like J774.1/JA-4 cells and mouse peritoneal macrophages) in the presence of LPS. SHK activated caspases-3 and -7, which led to DNA fragmentation, but this cytotoxicity was prevented through a pan-caspase inhibitor in LPS-treated JA-4 cells. Maximal cytotoxic effects were achieved when SHK was added immediately before LPS addition. These results indicate that SHK derivatives induced caspase-dependent apoptotic cell death of the LPS-treated macrophages and suggest that SHK acts during an early stage of LPS signaling.

研究分野：環境・衛生系薬学

キーワード：マクロファージ 抗炎症 天然物 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は、がん、自己免疫疾患、動脈硬化症など様々な疾患の基盤となる病態で、その制御が強く望まれている。しかし、慢性炎症には、種々の免疫系の細胞や各臓器の実質細胞などが関与しており、その病態の系統的な解明や制御は困難と考えられてきた。一方、近年この複雑な慢性炎症の誘導、増悪、減弱、終結などの過程にマクロファージが一貫して関与することが示され、マクロファージが新たな治療のターゲットとして、注目されている。しかし、今日までマクロファージを標的とした治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

我々の研究室では、強力なマクロファージの活性化作用をもつリポリサッカライド (LPS) が、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミド (CHX) と同時に作用すると、マクロファージの細胞死が誘導されることを発見した。この細胞死は、LPSあるいはCHX単独では誘導されないことから、マクロファージの活性化シグナルに特異的な経路を介して、細胞死が誘導されると考えられる。さらに、本現象は慢性炎症の場に共通した作用、すなわち、タンパク合成阻害によるLPSシグナル伝達経路の異常が関係することが示唆された。これを応用すると、炎症の増悪に関与する活性化マクロファージだけを排除することが可能になる。すなわち、活性化マクロファージ特異的な細胞死を誘導する化合物として、CHX以外の、より安全な化合物の同定を行ない、慢性炎症における新たな候補化合物や標的分子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

候補化合物の探索の為の評価系の構築

マウスマクロファージ系細胞株、J774.1/JA-4 細胞を用いて、候補化合物の効率的な探索を目的に、新たな評価系の構築を行った。

候補化合物の探索

化合物の探索を行うにあたり、生薬成分に注目した。その理由は、おおよその効能が分かっていること、古くから用いられており、強毒性の化合物が少ないこと、構造多様性を有しており、薬剤の候補として有用であること、があげられる。探索は上記の評価系を用いることにより、行なった。

候補化合物の作用機構の解析

候補化合物が示す、活性化マクロファージ特異的な細胞障害性の解析を行うために、核の断片化の有無やアポトーシス関連因子の動向を解析した。

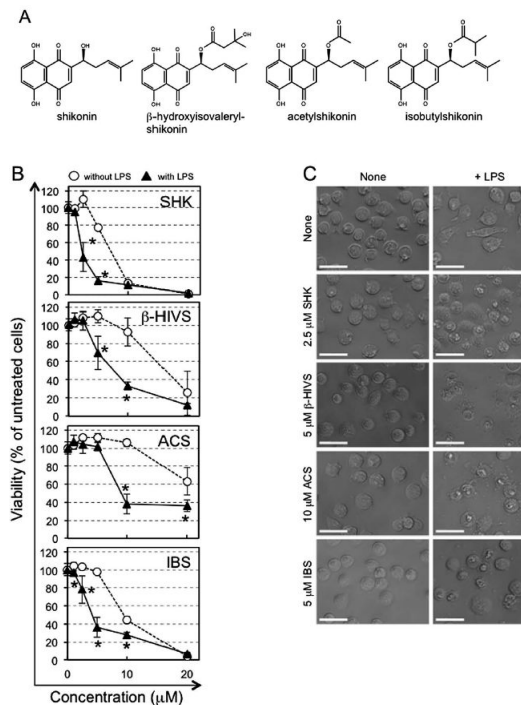
4. 研究成果

マウスマクロファージ系細胞株、J774.1/JA-4 細胞を 96 穴プレートで培養し、次に LPS 処理群、未処理群の 2 群に分け、両群に様々な濃度の天然物を添加する。4 時間

培養後、細胞障害性を WST-1 アッセイによって評価するという評価系を構築した。本スクリーニング法の構築により、短時間 (5 時間以内) かつ多検体評価が可能となった。

次に、構築した評価系を用いて、抗炎症作用を有するという生薬を中心に、スクリーニングを行った。その結果、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) の根を乾燥させた生薬、紫根の主成分と知られているシコニンが候補化合物として同定された。さらに、シコニンにはその側鎖の違いにより、複数のシコニン誘導体の存在が知られているが (Fig. 1A) 誘導体も同様の作用があることを明らかとした (Fig. 1A and B)。

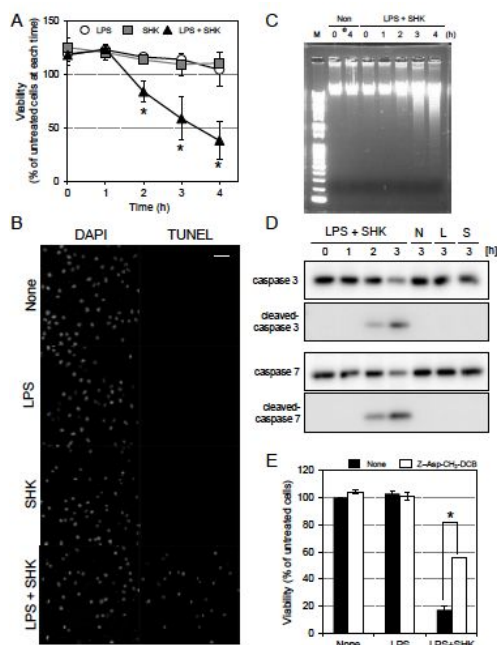
Fig. 1 シコニンとその誘導体のマクロファージに対する細胞障害性



次に、シコニンやその誘導体と LPS が誘導する細胞障害性について解析を行った。その結果、細胞障害性は、シコニンと LPS 刺激後、2 時間以降から見られた (Fig. 2A)。また、その時間と一致して、実行型カスパーゼであるカスパーゼ 3/7 の活性化が確認でき (Fig. 2D)、さらに、両物質で刺激した細胞のみに、TUNEL 染色陽性細胞の検出 (Fig. 2B)、DNA の断片化が確認された (Fig. 2C)。また、本細胞障害はカスパーゼ阻害剤、Z-Asp-Ch₂-DCB によって阻害された (Fig. 2E)。以上の結果より、シコニンと LPS によるマクロファージの細胞障害はアポトーシスを介して誘導されていることが示唆された。

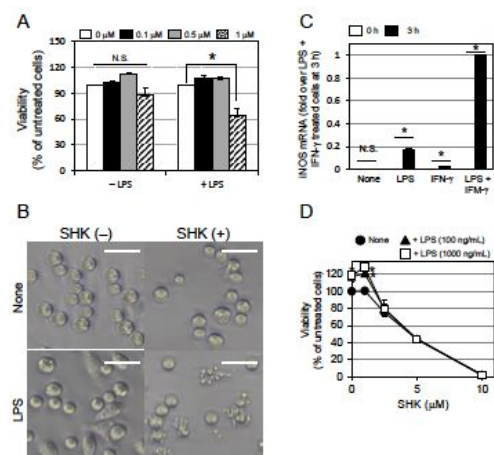
本研究によって明らかになったシコニンの持つ、LPS シグナルを介した細胞障害性が、細胞株特有の現象であるか、あるいはマクロファージ特異的な現象であるかどうかを調べる目的で、マウスより単離した腹腔マクロファージと、マウス線維芽細胞株である 3T3

Fig. 2 シコニンとLPSによる細胞障害性の解析



細胞を用いて、検討を行った。その結果、マウス腹腔マクロファージも同様に、シコニンとLPSによる細胞障害性は確認された (Fig. 3A and B)。一方、3T3細胞では、LPSに対する応答性は有しているのに対し、シコニンとLPSによる細胞障害性は確認されなかった (Fig. 3C and D)。以上の結果より、シコニンとLPSによって誘導される細胞障害性は、生体内でも起こりうる可能性が示唆され、さらに本細胞傷害性はマクロファージに特異的なものであることも示唆された。

Fig. 3 腹腔マクロファージならびに線維芽細胞に対するシコニンとLPSの影響



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)

1. Atsushi Koike, Makio Shibano, Hideya Mori, Kiyoko Kohama, Ko Fujimori, and

Fumio Amano. Simultaneous Addition of Shikonin and Its Derivatives with Lipopolysaccharide Induces Rapid Macrophage Death. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, No. 39, 2016, 969-976

[学会発表](計 5 件)

小池敦資, 芝野真喜雄, 森秀哉, 藤森功, 天野富美夫 LPS とシコニンによって誘導されるマクロファージの細胞障害性に対する解析 第 135 回日本薬学会年会 2009年3月27日 神戸

小池敦資, 芝野真喜雄, 藤森功, 天野富美夫 シコニン含有生薬のエンドトキシンによる汚染とシコニン・エンドトキシンが誘導するマクロファージの細胞障害性の解析 フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー 2015年9月17日 神戸

A. Koike, M. Shibano and F. Amano, Simultaneous addition of shikonin derivatives and lipopolysaccharide induces rapid death of macrophages ASCB annual meeting 2015 2015年12月16日 San Diego

小池敦資, 芝野真喜雄, 藤森功, 天野富美夫 シコニンと LPS の併用によって誘導されるマクロファージ細胞死を抑制する化合物の探索 第 136 回日本薬学会年会 2016年3月27日 横浜

齊藤英美加, 小池敦資, 藤森功, 天野富美夫 クルクミンと LPS によって誘導されるマクロファージの細胞障害性の解析 第 136 回日本薬学会年会 2016年3月27日 横浜

[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

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushi>

tu/seitaibougyo.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小池 敦資 (Koike, Atsushi)

大阪薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：00625725

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：