

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07960

研究課題名(和文) NLRP3インフラマソーム活性化を阻害する甘草成分の作用解明と創薬研究への展開

研究課題名(英文) Search for the target molecule of the licorice component inhibiting NLRP3 inflammasome and development into drug discovery research

研究代表者

本田 裕恵 (HONDA, Hiroe)

富山県薬事研究所・主任研究員

研究者番号：10463134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食摂餌2型糖尿病モデルマウスにおいて、甘草成分であるIsoliquiritigenin (ILG)混餌投与は内臓脂肪組織炎症及び線維化を抑制した。In vitroでの解析の結果、ILGはマクロファージにおいてMincleやTLR4により誘導される線維化関連遺伝子の発現を抑制した。また、db/dbマウスにおいてILGの混餌投与は、インスリン抵抗性や糖負荷試験の結果を改善した。高脂肪食摂餌マウスとは異なり、db/dbマウスではILGによって内臓脂肪組織の慢性炎症状態は改善されず、膵臓の損傷を改善する効果を認めた。更にDARTS法により、ILGの標的タンパク候補を複数得た。

研究成果の概要(英文)：Isoliquiritigenin(ILG), one of the licorice components, suppressed visceral adipose tissue inflammation and fibrosis in high-fat diet (HFD)-fed model mice of type 2 diabetes. As a result of in-vitro analysis, ILG suppressed the expression of fibrosis-related genes induced by Mincle and TLR4 in macrophages. We also demonstrated that the administration of ILG to db/db mice improves insulin resistance and glucose tolerance test. In db/db mice, ILG did not suppress the chronic inflammation of visceral adipose tissue unlike HFD-fed mice, and improved the pancreatic damage state. In addition, we identified several candidate target proteins of ILG inhibiting the NLRP3 inflammasome activation by the DARTS method.

研究分野：免疫学

キーワード：NLRP3 IL-1 糖尿病 イソリクイリチゲニン

1. 研究開始当初の背景

平成24年の国民健康・栄養調査(厚生労働省)によれば、糖尿病が強く疑われる人・可能性を否定できない人は全国で2050万人と推計されている。近年の研究から、2型糖尿病の病態には脂肪組織や膵臓における慢性的な炎症状態が深く関与していることが明らかとなりつつある。2型糖尿病患者の血中では遊離脂肪酸が増加しており、これが病態に関与することが示唆されていたが、最近これらを感じずるストレスセンサーNLRP3インフラマソームが同定された。パルミチン酸はNLRP3インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインIL-1の産生を引き起こす(Wen H, *Nat Immunol.*, 2011)。肥満の脂肪組織では、NLRP3インフラマソームの構成因子やIL-1の発現が増加しており、またNLRP3遺伝子欠損マウスは、野生型に比べ脂肪組織や肝臓でのインスリンシグナルが増強されていることから、NLRP3インフラマソームが炎症性反応の誘導、インスリン抵抗性に関与していることが明らかになっている(Stienstra R, *Cell Metab.*, 2010; Vandanmagsar B, *Nat. Med.*, 2011)。また、膵臓においては、膵島アミロイドポリペプチド(IAPP)がマクロファージや細胞のNLRP3インフラマソームを活性化することが報告されている(Masters SL, *Nat. Immunol.*, 2010)。IAPPは2型糖尿病の進行に伴い、膵臓でアミロイド沈着を引き起こす。IL-1は膵島細胞のアポトーシスを誘導するほか、インスリン感受性細胞のインスリンシグナルを減弱化させ、インスリン抵抗性を誘導する。興味深いことに、2型糖尿病治療薬であるグリブライドは、IAPPによるIL-1産生を抑制する効果が報告されており(Masters SL, *Nat. Immunol.*, 2010)、これが抗糖尿病効果の一部を担っていると考えられている。これらのことから、脂肪組織や膵臓の炎症状態を改善し、IL-1等の産生を抑制することは2型糖尿病の予防や治療に重要と考えられる。IL-1を標的とした糖尿病治療として海外ではIL-1レセプター拮抗剤を用いた臨床試験が行われ、インスリン産生量増加やグリコヘモグロビン量の減少効果が認められる等、良好な成績を収めている(Claus M, *N Engl J Med.*, 2007)。従って、IL-1やNLRP3インフラマソームは2型糖尿病の重要な標的分子であると考えられる。しかし、現在の生物学的製剤を長期間皮下注射を行うことは身体に対する負担が大きいこと、薬剤が組換えタンパク体であり非常に高額であることなどから、実際の治療には結びついていない。そこで、IL-1をターゲットとした内服可能な低分子薬剤の開発が求められている。

2. 研究の目的

近年、糖尿病や肥満等の生活習慣病は、免疫系の破綻に伴う慢性的持続性炎症を基盤として発症・進展することが明らかになりつつある。我々は最近、生薬甘草の成分イソリク

イリチゲニン(ILG)がNLRP3インフラマソームの活性化を強力に阻害し、高脂肪食摂取マウスにおいて体重増加やインスリン抵抗性を改善する作用を持つことを見出した。本研究ではこれらの研究を更に発展させ、(1)ILGの動物レベルにおける有効性を更に検証すること、(2)ILGがNLRP3インフラマソームの活性化を阻害する分子機序を解明すること、を主目的とする。以上より、免疫学的手法を用いてILGの新規薬理作用を解析し、ILGのNLRP3インフラマソーム活性化阻害機序の解明と糖尿病を標的とした新しいコンセプトの予防法・治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ILGの動物レベルにおける更なる有効性の検証

高脂肪食摂取マウスでの内臓脂肪組織線維化に与える影響

(a) 高脂肪食摂取マウスの内臓脂肪組織炎症・線維化に与えるILGの影響

C57BL/6(6週令)に高脂肪食をILGと共に混餌投与し、20週間後インスリン抵抗試験を行い、精巣上体脂肪組織の免疫組織学的な解析や、炎症性サイトカインやケモカイン、また線維化に係る遺伝子の発現をリアルタイムPCRで検討した。

(b) 脂肪組織線維化関連タンパクの発現誘導に与えるILGの影響

マウスチオグリコール酸誘導腹腔マクロファージにTLR4のリガンドであるlipid AやMincleのリガンドであるTrehalose 6,6'-dimycolate(TDM)を添加し、ILGが線維化に関与する遺伝子の発現を抑制するか否かについてリアルタイムPCRで検討を行った。

(c) マクロファージと脂肪細胞の相互作用による内臓脂肪組織炎症モデルに対するILGの効果

脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞株とマウスマクロファージ細胞株RAW264.7を共培養するとTNF- α 、MCP-1といった炎症性サイトカインやケモカインの発現が上昇するが、ILGのこれらの発現に与える影響を調べた。また、ILGが脂肪細胞、マクロファージのいずれに作用しているかを調べるため、脂肪細胞にILG存在下でTNF- α を添加し、MCP-1の発現に影響を与えるかを検討した。また、マクロファージにILG存在下でパルミチン酸を添加し、TNF- α の発現に与える影響を検討した。

db/dbマウス(自然発症型糖尿病モデルマウス)に対するILGの抗糖尿病効果の検討
db/dbマウス(6週令)にILGを混餌投与し、7週間後にインスリン抵抗性試験、糖負荷試験を実施した。その後解剖を行い、精巣上体脂肪組織でのTNF- α 、MCP-1及びIL-1の遺伝子発現を比較した。また、精

巣上体脂肪組織への免疫細胞の浸潤についてフローサイトメトリ法を用いて解析を行った。さらに、精巣上体脂肪組織を *ex vivo* にて培養し、上清中の IL-1 の産生量について検討した。骨格筋での Akt リン酸化をウェスタンブロッティングで調べ、インスリンシグナルに与える影響についても検討した。

(2) ILG が NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害する分子機序の解明(ILG 標的タンパクの探索)

DARTS 法 (*1) による検討を行った。すなわち、LPS(1 µg/ml) にてプライミングを行い、ATP(2 mM) で刺激を行ったマウス骨髄由来マクロファージ若しくは J774.A1 細胞を溶解し、ILG と混ぜて室温で 30 分反応させた。その後プロテアーゼと混合し、25 °C で 30 分間反応させた後、SDS-PAGE を行った。ILG の添加量を増加させた際に減少するバンド、若しくは増加するバンドを切り出し、nanoLC-MS/MS によるタンパク同定を行った。

*1 DARTS 法; タンパクが化合物と結合すると構造が変化するため、タンパク分解酵素による分解能に変化が生じることを利用して、化合物が直接結合するタンパクを同定する手法

4. 研究成果

(1) ILG の db/db マウスでの更なる有効性の検証

高脂肪食摂餌マウスでの内臓脂肪組織線維化に与える影響

(a) 高脂肪食摂餌マウスの内臓脂肪組織炎症・線維化に与える ILG の影響

ILG 混餌マウスでは、インスリン抵抗性が改善し、内臓脂肪組織における TNF- α や MCP-1 の発現が減少していた。また、組織線維化に關与する TGF- β 、Collagen type I alpha 1 chain、TIMP-1 の発現が減少していた。さらに、免疫組織学的な解析から、高脂肪食摂餌によって誘導される内臓脂肪組織のコラーゲンによる線維化が ILG 混餌により抑制されていることが確認された。

(b) 脂肪組織線維化関連タンパクの発現誘導に与える ILG の影響

マクロファージに Lipid A, TDM を添加することにより、TNF- α 、TIMP-1 及び PDGF-B のタンパクの発現が上昇するが、ILG の添加によりこれらの発現は抑制された。

(c) マクロファージと脂肪細胞の相互作用による内臓脂肪組織炎症モデルに対する ILG の効果

マクロファージと脂肪細胞との共培養により、TNF- α 及び MCP-1 の発現が上昇するが、ILG はこれらの発現を減少させた。ILG 存在下で脂肪細胞に TNF- α を添加したところ、MCP-1 の発現上昇

が抑制された。また、マクロファージに ILG 存在下でパルミチン酸を添加したところ、TNF- α の発現上昇が抑制された。従って、ILG は両方の細胞に作用していることが明らかとなった。

db/db マウス(自然発症型糖尿病モデルマウス)に対する ILG の抗糖尿病効果の検討

ILG 混餌投与により、db/db マウスの体重に変化は認められなかったが、インスリン抵抗試験並びに糖負荷試験において有意な改善効果が認められた。また、骨格筋での Akt のリン酸化の抑制が ILG 混餌群では改善しており、インスリンシグナルの改善効果が認められた。高脂肪食摂餌モデルマウスとは異なり、db/db マウスでは ILG 混餌投与群において内臓脂肪組織での TNF- α や IL-1 の遺伝子発現や、免疫細胞の浸潤状態及び *ex vivo* 培養した場合の内臓脂肪組織からの IL-1 の産生には影響が認められなかった。一方、膵臓中のインスリン含量は有意に増加し、血中のプロインスリン濃度は低い傾向が認められた(膵臓の機能が低下すると前駆体の状態での分泌が起こる。)これは、ILG により膵臓の損傷が抑制されたことを示唆していると考えられた。

(2) ILG が NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害する分子機序の解明(ILG 標的タンパクの探索)

ILG の標的分子の探索のため、DARTS 法による解析を行い、5 つの候補タンパクを得た。siRNA による当該タンパクのノックダウンの実験を行い、NLRP3 インフラマソーム活性化への当該タンパクの関与について検討を行っている。

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3件)

Okamoto N, Mizote K, Honda H, Saeki A, Watanabe Y, Yamaguchi-Miyamoto T, Fukui R, Tanimura N, Motoi Y, Akashi-Takamura S, Kato T, Fujishita S, Kimura T, Ohto U, Shimizu T, Hirokawa T, Miyake K, Fukase K, Fujimoto Y, Nagai Y, Takatsu K.: Fuculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017 Sep 15;292(37):15378-15394.
Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H,

Sasaoka T.: Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J. Endocrinol.*, 2017 Dec;235(3):179-191., pii: JOE-17-0351.

Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Tanaka M, Suganami T, Sasahara M, Miyake, K, Takatsu K.: Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. *Sci. Rep.*, 6, 23097; doi: 10.1038/srep23097.

〔学会発表〕(計5件)

本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志: 糖尿病モデルマウスの内臓脂肪組織に対するイソリクイリチゲニンの抗炎症・抗線維化作用の解析, 日本薬学会 第138年会, 2018, 3, 26, 金沢.

Okamoto N, Honda H, Akashi-Takamura S, Nagai Y, Takatsu K.: Agonistic effects of synthetic derivatives of funiculosin on mouse/human TLR4/MD-2. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016, 12, 5, 沖縄.

渡邊康春, 長井良憲, 本田裕恵, 高津聖志: 天然薬物イソリクイリチゲニンは自然免疫系に作用し、内臓脂肪組織の線維化を抑制する, 第37回日本肥満学会, 2016, 10, 8, 東京.

本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志: 甘草成分イソリクイリチゲニンは内臓脂肪組織の炎症・線維化を抑制する, 日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 25, 富山.

本田裕恵, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 渡邊康春, 常山幸一, 林宏明, 藤井勲, 平井嘉勝, 高津聖志: 甘草成分イソリクイリチゲニンは NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害し、2型糖尿病の慢性炎症を改善する, 日本薬学会 第136年会, 2016, 3, 29, 横浜.

〔図書〕(計2件)

Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K: Chapter 8 Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In "Biological activities and action mechanisms of licorice ingredients" (ed. H. Sakagami), InTech, Zagreb, 2017, pp. 121 - 134 (ISBN 978-953-51-3119-9).

Nagai Y, Honda H, Watanabe Y, Takatsu

K.: Chapter 30 Potential therapeutic natural products for the treatment of obesity-associated inflammation by targeting TLRs and inflammasomes. In "Chronic Inflammation -Mechanisms and Regulation-" (M. Miyasaka and K. Takatsu), pp. 379-397, *Springer Japan*, Tokyo, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

富山県薬事総合研究開発センター

<http://www.pref.toyama.jp/branches/1285>

/

富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 裕恵 (HONDA, Hiroe)

富山県薬事研究所・主任研究員

研究者番号: 10463134

(2) 連携研究者

長井 良憲 (NAGAI, Yoshinori)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・

客員教授

研究者番号: 30431761