

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月16日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590278

研究課題名（和文）生薬を主に用いた炎症疾患に対する新しい治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of novel strategy for the treatment of inflammatory diseases with natural products such as herbal ingredients

研究代表者

石黒 和博 (KAZUHIRO ISHIGURO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60432275

研究成果の概要（和文）：

- (1) Dehydrocorydaline の作用および有用性を証明し論文発表と特許出願を行った。
- (2) 活性化 T 細胞の IL-17 産生を抑制する生薬成分として Atractylodin を同定した。
- (3) 酢酸が T 細胞の活性化を制御する分子機序を解明し論文発表を行った。
- (4) ハプテン-タンパクを特異的に蛍光観察できる腸炎モデルを開発し論文として公表した。
- (5) 腸炎の評価に有用な大腸粘膜蛍光観察試薬を開発し論文発表と特許出願を行った。

研究成果の概要（英文）：

- (1) The action and therapeutic benefit of Dehydrocorydaline were demonstrated.
- (2) Atractylodin was found to inhibit IL-17 production in activated T cells.
- (3) The molecular mechanism of acetate action on T cell activation was elucidated.
- (4) The novel colitis model for fluorescence observation of hapten-protein was developed.
- (5) The novel agent for fluorescence observation of colitis was developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症、腸炎、天然化合物、生薬、マクロファージ、T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎とクローン病）や関節リウマチなど難治性の炎症疾患ではマクロファージやT細胞が異常に活性化し炎症性サイトカインを多量に産生することで病態形成に深く関与している。炎症疾患に対する新しい治療法の基盤を形成するためにはマクロファージやT細胞の活性化を制御する化合物を発見し、その作用機序を分子レベルで解析することが重要である。

生薬は伝統的に様々な疾患の治療に利用され有用なものが選別されてきた。この生薬に含まれる成分の化学構造は combinatorial chemistry による合成化合物では得ることができない多様性を有している。したがって、生薬成分は創薬の元となる seeds を探すために極めて有用な library を構成している。

我々は活性化マクロファージをターゲットした治療法の基盤を構築するため、生薬成分の中から lipopolysaccharide (LPS) で活性

化したマクロファージの **viability** を低下させる化合物のスクリーニングを行った結果、エンゴサクの成分である **Dehydrocorydaline** を同定していた。

酢酸は腸内細菌で最も産生される中短鎖脂肪酸でありビフィズス菌でも産生される。この酢酸には転写因子 **NFAT** と核内輸送体 **importin beta** の結合を妨げ T 細胞の活性化を制御する作用があることを我々は発見していた。一方、転写因子が **importin beta** に結合するにはアダプター分子を必要とするが **NFAT** のアダプター分子は未だ同定されていなかった。我々は酢酸の作用機序を分子レベルで解明することにより **NFAT-importin beta** 結合に働くアダプター分子を同定できると考えた。

腸炎に対する新たな治療法の効果を判定する場合、**TNBS** などの化合物をハプテンとしてマウスに注腸することで作成した腸炎モデルが利用されている。しかし、従来の腸炎モデルでは抗原となり腸炎を起こすハプテン-タンパクをハプテン単独と区別し特異的に観察することはできないため治療法の効果判定の際にハプテン-タンパクの形成を確認できなかった。この問題を解決するためにはハプテン-タンパクを特異的に観察できる新しい腸炎モデルの開発が必要であった。

大腸粘膜の組織学的情報を得るため蛍光観察が行われる。この蛍光観察にはフルオレセインが用いられているが大腸粘膜に直接使用することができず得られる組織学的情報も乏しい。蛍光観察の有用性を高めるためには新たな蛍光観察試薬が必要であった。

## 2. 研究の目的

我々は主に生薬成分など天然化合物を利用して炎症疾患に対する新しい治療戦略を構築することを目的として

- (1) **Dehydrocorydaline** の薬理作用と応用
- (2) サイトカイン産生制御を示す化合物同定
- (3) 酢酸が示す T 細胞活性化制御の分子機序に関する研究を行った。また、炎症疾患の中でも特に腸炎に対する研究を促進するため
- (4) ハプテン-タンパクを特異的に観察することができる腸炎モデルの開発
- (5) 大腸粘膜蛍光観察試薬の開発も行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 培養細胞などを用いて **Dehydrocorydaline** の薬理作用を解析し、マウスの炎症疾患モデルを利用して **Dehydrocorydaline** による治療的応用を検討した。
- (2) 活性化 T 細胞のサイトカイン産生に対して影響を与える化合物を同定するため、これまで集めた生薬成分の中で文献報告が少な

く薬理作用が不明のものを中心にスクリーニングを行った。

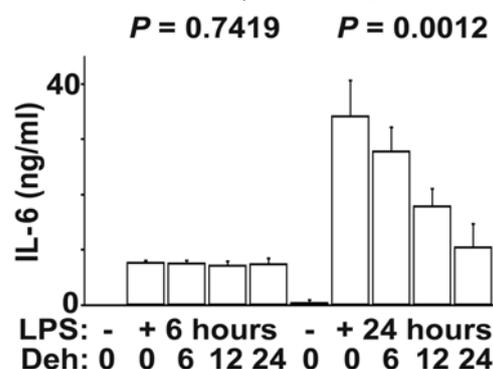
(3) 酢酸はヒストンのアセチル化を誘導することにより遺伝子の発現を制御する。これに対して酢酸は転写因子 **NFAT** と核内輸送体 **importin beta** の結合を介助するアダプター分子のアセチル化を誘導することにより **NFAT** と **importin beta** の結合を制御すると推測し研究を進めた。

(4) **NBD-Cl** は単独では蛍光を示さないがタンパクと結合するとフルオレセインや **GFP** と同様な蛍光を示す。したがって、**NBD**-タンパクの形成を蛍光を介して観察することができる。この **NBD-Cl** を用いて腸炎モデルの作成を行った。

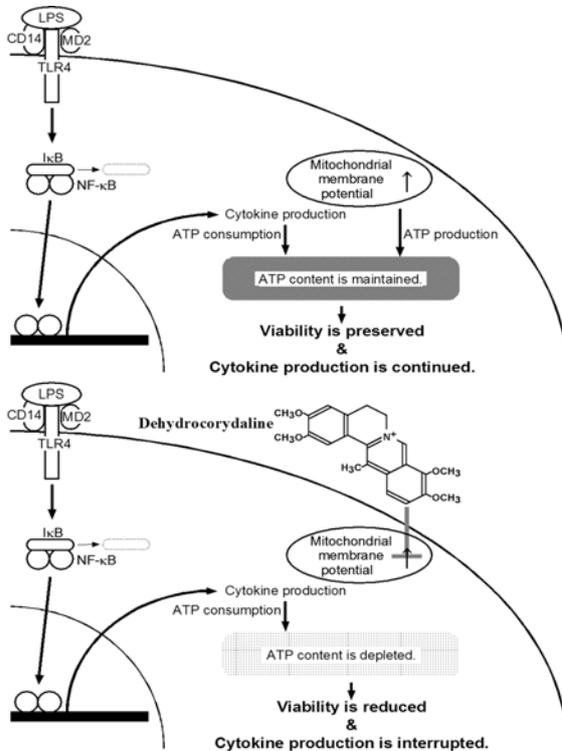
(5) 大腸粘膜の腺管は主に杯細胞からなり杯細胞は酸性ムコタンパクが豊富であるため細胞内部の **pH** が比較的低い。一方、炎症細胞は **lysosomes** が豊富であり **lysosomes** の内部も **pH** が比較的低い。**NBD-PZ** は生理的 **pH** 以下で著しく蛍光強度が高まることを我々は発見している。この **NBD-PZ** を用いて大腸粘膜蛍光観察試薬の開発を試みた。

## 4. 研究成果

(1) **Dehydrocorydaline** の薬理作用と応用  
**LPS** 存在下、**Dehydrocorydaline** が **viability** に与える影響を **macrophage-derived RAW264.7 cells**, **primary macrophages**, **colon cancer-derived SW620 cells** において検討したところ、**RAW264.7 cells** で最も **viability** を低下させ、**primary macrophages** がそれ続き **SW620 cells** では **viability** の低下を認めなかった。これらの細胞で **LPS** による **IL-6** 産生とミトコンドリア膜電位上昇を比較検討したところ、いずれも **RAW264.7 cells** で最も顕著であり **primary macrophages** がそれに次いだ一方、**SW620 cells** では両者ともに認めなかった。なおミトコンドリア膜電位は **rhodamine 123** だけでなく **JC-1** でも評価した。更に **RAW264.7 cells** における **IL-6** 産生を **LPS** 投与 6 時間後、24 時間後に測定した結果、**Dehydrocorydaline** は 6 時間後から 24 時間後に見られる **IL-6** 産生増加を阻害することが分かった (下図; *P*, ANOVA)。



IL-6 産生に伴い細胞内では ATP が消費される。ミトコンドリアにおける ATP 産生は膜電位によるため膜電位上昇は ATP 産生を増加させ細胞内 ATP 量を維持するために働く。Dehydrocorydaline はこの膜電位上昇を阻害することにより活性化マクロファージ特異的に ATP を枯渇させ細胞死を誘導し IL-6 の産生を中断させる (下図)。

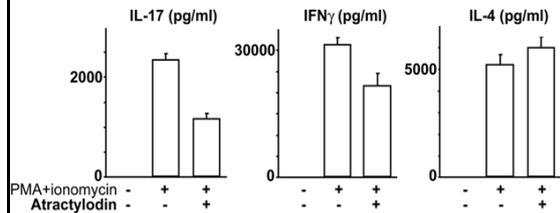


Dehydrocorydaline は基底レベルのミトコンドリア膜電位を下げることはないため活性化していないマクロファージや LPS により IL-6 などサイトカインを産生しない細胞に対しては作用しないと考えられる。

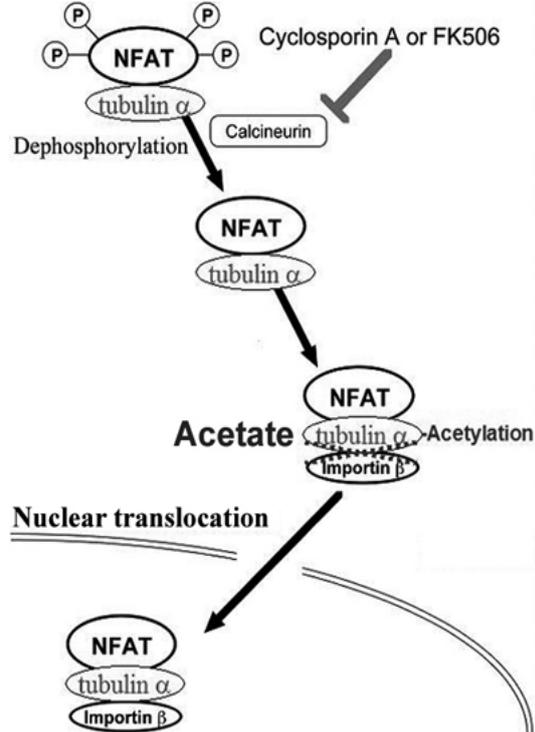
なお Dehydrocorydaline の副作用を検討するためマウスに 9.6  $\mu\text{mol/kg}$  投与したが肝障害を示す ATL 血漿中濃度上昇や腎障害を示す BUN 上昇を認めなかった。この投与量は LPS 投与マウスで体重減少改善作用を証明した量 (4.8  $\mu\text{mol/kg}$ ) の 2 倍に相当する。

Dehydrocorydaline の作用機序を考慮して腸炎に対する治療効果を検討するに先立ち、腸炎においてマクロファージがミトコンドリア膜電位を上昇させるほど活性化してかどうかを解析した。その結果、腸炎粘膜から分離したマクロファージでミトコンドリア膜電位の上昇を認めなかった。但し、粘膜からマクロファージを分離するには数時間にわたる作業が必要とされるため、その間にマクロファージを活性化する刺激がなくなりミトコンドリア膜電位が基底レベルに戻ってしまった可能性がある。Dehydrocorydaline の適応を見極めるためには *in vivo* においてミトコンドリア膜電位を評価できる手法を開発する必要がある。

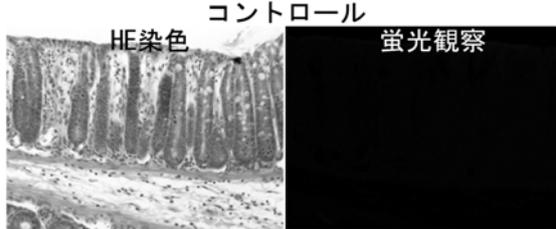
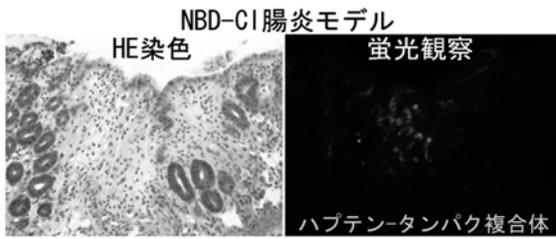
(2) サイトカイン産生制御を示す化合物同定ソウジュツに含まれる Atractyloidin は IL-17・IFN $\gamma$  の産生を高度・中等度抑制するが IL-4 の産生には影響を与えないことが分かった (下図)。今後もスクリーニングを進める一方、Atractyloidin の炎症疾患に対する治療効果および作用機序を解析していく。



(3) 酢酸が示す T 細胞活性化制御の分子機序 酢酸は脱アセチル化酵素である HDAC6 の活性を阻害し tubulin  $\alpha$  のアセチル化を誘導する。この tubulin  $\alpha$  こそが NFAT の N 末端側に結合し NFAT と importin beta との結合に対してアダプターとして働く分子であった。Tubulin  $\alpha$  のアセチル化はそのアダプター機能を阻害し、その結果、NFAT と importin beta との結合が妨げられることが分かった (下図)。

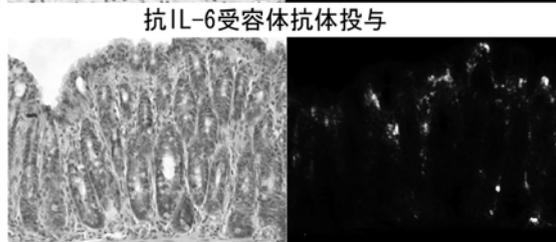
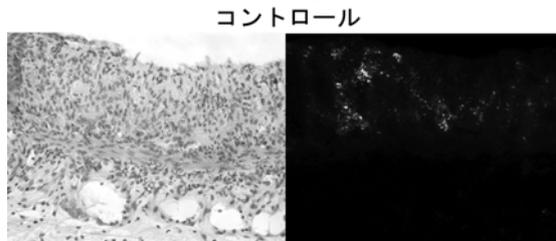


(4) ハプテン-タンパクを特異的に観察することができる腸炎モデルの開発 NBD-Cl を 1-2 mg/ml 40% ethanol の濃度でマウスに注腸すると大腸粘膜での NBD-タンパク形成を蛍光を介して観察することができ、腸炎はこの NBD-タンパクを中心に誘発されていた (下図、次ページ)。



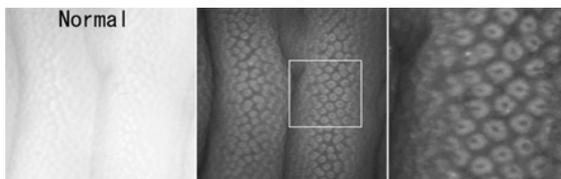
更に flow cytometry により NBD-タンパクが主にマクロファージに取り込まれ、その結果、T 細胞が活性化することも証明できた。

この腸炎モデルでは IL-6 が著明に産生されるため抗 IL-6 受容体抗体の治療効果の判定に用いたところ、NBD-タンパクの形成を蛍光観察で確認した上で腸炎が抑制されることを証明できた (下図)。



#### (5) 大腸粘膜蛍光観察試薬の開発

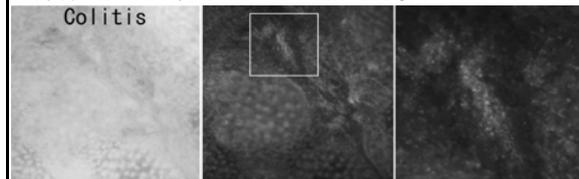
NBD-PZ を PBS 緩衝液 (pH 7.4-7.5) で 1 µg/ml の濃度に調製し大腸粘膜蛍光観察試薬とした。この試薬でマウスの大腸粘膜を 3 分間浸した後に蛍光観察を行ったところ、粘膜の腺管を円環状蛍光像として観察できた (下図)。



なお NBD-PZ そのものの蛍光強度は PBS 緩衝液中では十分低いため蛍光観察を行う前に洗浄を行う必要はなく試薬で大腸粘膜を浸したまま蛍光観察が可能であり極めて簡便に使用できる。

一方、腸炎の粘膜では腺管の破壊に伴い円環状蛍光像が消失し、それに代わり浸潤した

炎症細胞が有する lysosomes を点状蛍光像の集簇として観察できた (下図)。



#### 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 4 件)

1. Kazuhiro Ishiguro, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Dehydrocorydaline inhibits elevated mitochondrial membrane potential in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2011, 11, 1362-1367 査読有

2. 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 査読有

3. Kazuhiro Ishiguro, Takafumi Ando, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Novel mouse model of colitis characterized by hapten-protein visualization. *Biotechniques* 2010, 49, 641-648 査読有

4. Kazuhiro Ishiguro, Takafumi Ando, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Novel application of low pH-dependent fluorescent dyes to examine colitis. *BMC Gastroenterol.* 2010, 10, 4 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 48 回日本消化器免疫学会総会  
石川県金沢市 2011 年 7 月 21 日発表  
ハプテン-タンパク複合体を蛍光観察できる新しい腸炎モデルの開発  
石黒和博ら

2. 第 47 回日本消化器免疫学会総会  
滋賀県大津市 2010 年 7 月 8 日発表  
大腸粘膜蛍光観察検査試薬の開発  
石黒和博ら

3. JDDW 2009 シンポジウム  
京都 2009 年 10 月 15 日発表  
大腸粘膜の腺管および炎症細胞の新しい蛍光観察法  
石黒和博ら

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：活性化マクロファージ特異的細胞死誘導薬

発明者：石黒和博ら

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願2009-284267

出願年月日：平成21年12月22日

国内外の別：国内

名称：腸管粘膜蛍光観察用検査試薬

発明者：石黒和博ら

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/051760

出願年月日：平成22年8月2日

国内外の別：国際

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

English website

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/3189/gastroenterology.html>

Japanese website

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1640/shoukakishikkanbyoutairon.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石黒 和博 (KAZUHIRO ISHIGURO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60432275

### (2) 研究分担者

安藤 貴文 (TAKAFUMI ANDO)

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 (HIDEMI GOTO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10215501

### (3) 連携研究者

該当者なし