

## 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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380060

研究課題名(和文) 炎症性サイトカインの情報伝達の分子メカニズムの解明とバイオプローブによる制御

研究課題名(英文) Molecular mechanism of inflammatory cytokine signaling and its regulation by bioprobes

研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：20242307

研究成果の概要(和文)：

炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  や interleukin-1 は、転写因子 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の情報伝達経路を活性化し、その遺伝子発現を介して様々な細胞機能を制御している。炎症性サイトカインは、自己免疫疾患、がん、糖尿病に関与していることが明らかになってきている。本研究では、炎症性サイトカインによって誘導される NF- $\kappa$ B の情報伝達や遺伝子発現に作用する小分子化合物(バイオプローブ)の作用メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：

Inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1, induce the activation of the transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway, and regulate diverse cellular functions through its gene expression. Inflammatory cytokines are shown to be involved in autoimmune diseases, cancer, and diabetes. In this study, mechanisms of actions of bioactive small compounds (bioprobes) on the NF- $\kappa$ B signaling pathway and gene expression induced by inflammatory cytokines were elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：(1) シグナル伝達 (2) 生理活性 (3) 炎症性サイトカイン (4) NF- $\kappa$ B (5) トリエン-アンサマイシン (6) トリコテセン (7) オイデスマン

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や interleukin-1 (IL-1) は、炎症局所において、他のサイトカインやケモカインの産生を誘導するだけでなく、血管内皮細胞に直接作用し、その表面に細胞接

着因子を誘導することによって、白血球の集積を促進する。これらの炎症反応は、本来、生体防御機構の一部であるが、過剰もしくは慢性的な反応は病気の原因になる。事実、炎症性サイトカインは、自己免疫疾患、がん、糖尿病に関与していることが明らかになっ

てきている。

TNF レセプター-1 と IL-1 レセプターの細胞内領域には、デスドメインと Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインがそれぞれ存在している。これらの細胞内ドメインには、それぞれ特定のアダプタータンパク質が会合し、おもに転写因子 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の情報伝達経路を活性化する。NF- $\kappa$ B 応答遺伝子には、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子、生存因子等が含まれ、それらの遺伝子発現を介して様々な細胞機能が制御されている。

## 2. 研究の目的

我々は、微生物や植物由来の天然物、合成化合物を含む化合物ライブラリーをスクリーニングし、サイトカインの情報伝達や遺伝子発現を阻害する小分子化合物の同定と作用メカニズムの解析を行ってきた。これまでに、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  と IL-1 $\alpha$  によって誘導される細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を阻害する小分子化合物として、トリエン-アンサマイシン系化合物やオイデスマン誘導体等を見出した。本研究では、炎症性サイトカインの情報伝達や遺伝子発現における小分子化合物の作用メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、血管内皮細胞のモデル細胞として、おもにヒト肺がん腫 A549 細胞を用いた。A549 細胞は、TNF- $\alpha$  と IL-1 $\alpha$  の刺激によって、NF- $\kappa$ B 情報伝達経路が活性化される。細胞表面の ICAM-1 の発現量を Cell ELISA 法、NF- $\kappa$ B 情報伝達に關与するタンパク質の発現量、細胞内局在、翻訳後修飾に対する影響をウェスタンブロッティング、高分子合成に対する影響を放射性同位元素で標識した前駆体を用いたアイソトープ実験等で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) マイトトリエン II の作用メカニズム

我々は、トリエン-アンサマイシン系化合物の一つであるマイコトリエン II (mycotrienin II) (図 1) が IL-1 $\alpha$  に比べて TNF- $\alpha$  によって誘導される細胞表面の ICAM-1 発現を強く阻害することを見出した。マイコ

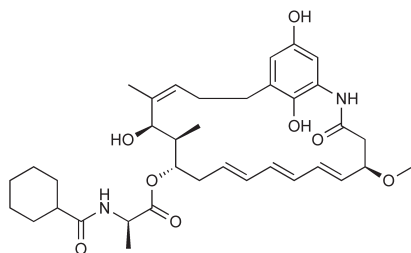


図 1 マイコトリエン II の構造

トリエン II は、DNA 合成や RNA 合成に影響しない条件下でタンパク質合成を選択的に阻害し、無細胞翻訳系においても阻害活性を示した (図 2)。他のトリエン-アンサマイシン系化合物である mycotrienin I、trienomycin A、trierixin、quinotrierixin、quinotrierixin HQ は、マイコトリエン II と同様に、ICAM-1 の発現誘導および無細胞翻訳系を阻害した。以上の結果から、マイコトリエン II は、直接的なタンパク質合成阻害剤であること、並びに TNF- $\alpha$  によって誘導される ICAM-1 発現を選択的に阻害することが明らかになった。

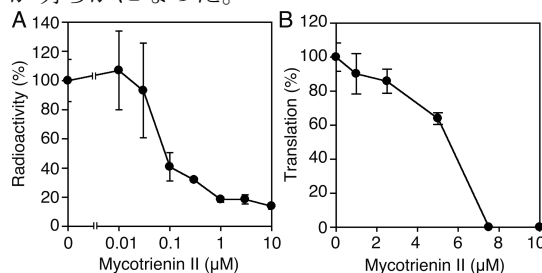


図 2 マイコトリエン II はタンパク質合成を阻害する (A) A549 細胞をマイコトリエン II で 1 時間前処理した後、 $[^3\text{H}]$ -ロイシンで 2 時間標識し、高分子画分への放射活性の取り込みを測定した。(B) ウサギ網状赤血球ライゼートを用いた転写/翻訳システムに対するマイコトリエン II の影響を検討した。

### (2) サイトトリエン A の作用メカニズム

トリエン-アンサマイシン系化合物の一つであるサイトトリエン A (cytotrienin A) (図 3) はアポトーシスインデューサーとして見出され、最近、真核生物翻訳伸長因子 eEF1A の機能を阻害することが示されている。我々は、サイトトリエン A が IL-1 $\alpha$  に比べて TNF- $\alpha$  によって誘導される細胞表面の ICAM-1 の発現を選択的に阻害することを見出した。サイトトリエン A は、TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) による TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングを誘導した (図 4)。TACE 阻害剤 TAPI-2 は、TNF- $\alpha$  によって誘導される inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) の分解に対するサイトトリエン A の阻害効果を抑制した (図 4)。さらに、MEK 阻害剤 U0126 および p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 は、サイトトリエン A によって誘導される TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングを阻害し、TNF- $\alpha$  によ

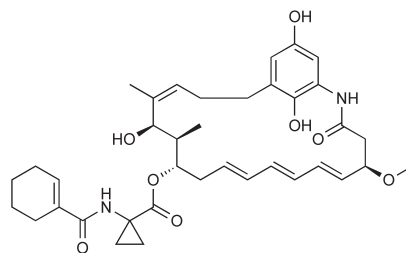


図 3 サイトトリエン A の構造

て誘導される IκBα 分解に対するサイトトリエン A の阻害効果を抑制した。また、U0126 と SB203580 の存在下では、サイトトリエン A は TNF-α および IL-1α によって誘導される ICAM-1 発現をほとんど同じ濃度で阻害した。以上の結果から、サイトトリエン A は リポトキシックストレス応答を誘導するタンパク質合成阻害剤であり、ERK と p38 MAP キナーゼの活性化を介して、TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを誘導し、TNF-α による ICAM-1 発現を選択的に阻害することが明らかになった。

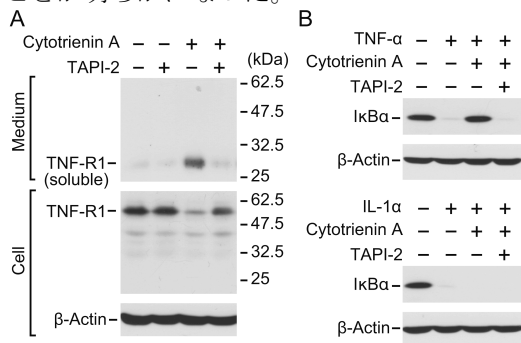


図4 サイトトリエン A は TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを誘導する

(A) A549 細胞を TAPI-2 (25 μM) で 30 分間前処理した後、サイトトリエン A (1 μM) で 1 時間処理した。(B) A549 細胞を TAPI-2 (25 μM) で 30 分間前処理し、サイトトリエン A (1 μM) で 1 時間処理した後、TNF-α もしくは IL-1α で 15 分間刺激した。培地画分および細胞ライゼートをウェスタンブロッティングで解析した。

### (3) トリコテセン系マイコトキシンの作用メカニズム

トリコテセン系マイコトキシンは真核生物の翻訳プロセスを阻害し、MAP キナーゼスーパーファミリーの活性化を介して遺伝子発現を制御していることが報告されている。トリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (deoxynivalenol) および 3-アセチルデオキシニバレノール (3-acetyldeoxynivalenol) (図5) は IL-1α に比べて、TNF-α によって誘導される ICAM-1 の発現を選択的に阻害したが、T-2 トキシン (T-2 toxin) やベルカリン A (verrucarin A) では、選択的阻害がまったく観察されなかった。デオキシニバレノールと 3-アセチルデオキシニバレノールは、TNF-α によって誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害したが、IL-1α によって誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害しなかった。さらに、デオキシニバレノールと 3-アセチルデオキシニバレ

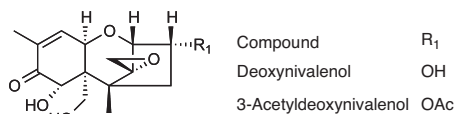


図5 デオキシニバレノールの構造

ノールは TACE を介して TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを誘導することを見出した。デオキシニバレノールは、添加後 5 分から 30 分にかけて ERK1/2 のリン酸化を一過的に亢進させたが、p38 MAP キナーゼは、デオキシニバレノールの添加後 5 分以内にリン酸化され、2 時間後までリン酸化されたままであった (図6)。U0126 と SB203580 は、デオキシニバレノールによって誘導される TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを阻害した (図6)。さらに、U0126 と SB203580 の存在下では、TNF-α と IL-1α によって誘導される ICAM-1 の発現がデオキシニバレノールによって同濃度で阻害された。以上の結果から、デオキシニバレノールは、ERK と p38 MAP キナーゼの活性化を介して、TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを誘導し、TNF-α によって誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害することが明らかになった。

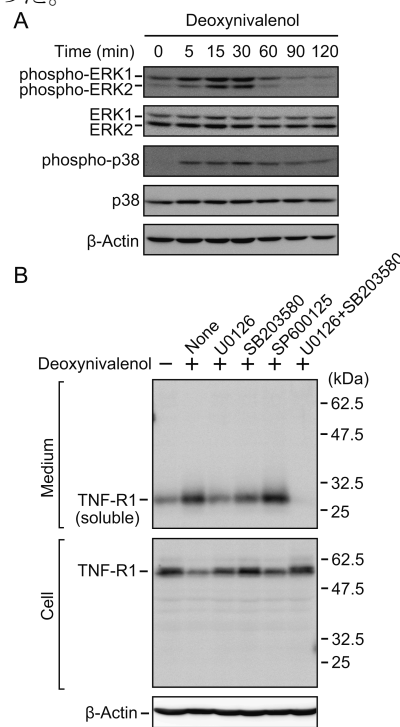


図6 デオキシニバレノールは ERK と p38 MAP キナーゼを介して TNF レセプター 1 のエクストドメインシエディングを誘導する

(A) A549 細胞をデオキシニバレノール (1 μM) で処理した。(B) A549 細胞をプロテインキナーゼ阻害剤 (10 μM) で 1 時間前処理した後、デオキシニバレノール (1 μM) で 1 時間処理した。培地画分および細胞ライゼートをウェスタンブロッティングで解析した。

### (4) オイデスマン誘導体の作用メカニズム

オイデスマン (eudesmane) 骨格を有するセスキテルペンラクトンを合成し、NF-κB シグナル伝達経路に対する構造活性相関を検討した。その結果、オイデスマン誘導体が分子構造のわずかな違いにより TNF-α や IL-1α に

よって活性化される NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路において異なるステップを阻害することが

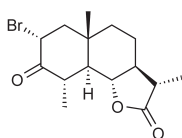


図7 SRC2の構造

明らかになった。 $\alpha$ -プロモケトン構造をもつ (11S)-2 $\alpha$ -bromo-3-oxoeudesmano-12,6 $\alpha$ -lactone (santonin-related compound 2: SRC2)

(図7)は IL-1 $\alpha$ で刺激した場合、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化と分解を阻害するが、TNF- $\alpha$ で刺激した場合、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化と分解を阻害せず、NF- $\kappa$ Bサブユニット p65/RelAの核移行のステップを選択的に阻害することを見出した。p65のN末端には、DNA結合、二量体化、核内移行等に重要な Rel1ホモロジドメインが存在している。p65のRel1ホモロジドメインに含まれる Cys-38をSerに置換した p65(C38S)変異体を作製し、p65(C38S)を安定発現させた A549細胞を構築した。これらの p65(C38S)トランスフェクタントでは、野生型 p65に比較して、p65(C38S)の核移行に対する SRC2の阻害作用が低下していた(図8)。以上の結果から、SRC2は p65の Cys-38に作用することによって、p65の核以降を阻害することが明らかになった。

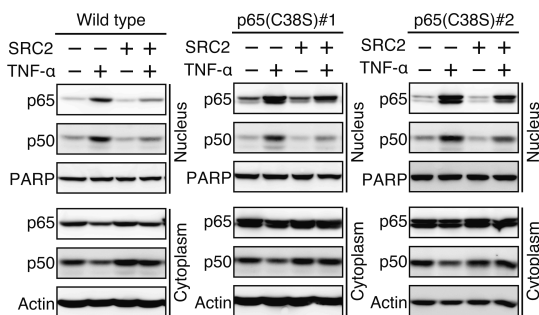


図8 SRC2は p65の Cys-38を標的としている野生型 A549細胞および Cys-38をSerに置換した p65(FLAG タグを付加)を発現させた A549細胞トランスフェクタント (p65(C38S)#1、p65(C38S)#2)を SRC2 (30  $\mu$ M) で1時間処理した後、TNF- $\alpha$ で30分間刺激した。核画分と細胞質画分をウェスタンブロットティングで解析した。

#### (5) 今後の展望

本研究では、トリエン-アンサマイシン系化合物であるマイコトリエニン II とサイトトリエニン A が直接的なタンパク質合成阻害剤であること、サイトトリエニン A が ERK や p38 MAP キナーゼの活性化を介したリポキシクストレス応答を誘導することを明らかにした。今後、トリエン-アンサマイシン系化合物の作用機序を解析することによって、ERK と p38 MAP キナーゼを介した TNF レセプター1のエクトドメインシエディングの

分子メカニズムが明らかになることが期待される。一方、本研究では、オイデスマン誘導体の一つである SRC2 の標的タンパク質が p65であることを明らかにした。SRC2を含むオイデスマン誘導体は TNF レセプター1 と IL-1 レセプターの情報伝達経路に異なる作用を示す。したがって、オイデスマン誘導体の作用メカニズムを解析することによって、TNF レセプター1 と IL-1 レセプターの情報伝達機構における新たな分子メカニズムが明らかになることが期待される。

#### 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16件)

- ① Seiya Hirano、Takao Kataoka、Deoxynivalenol induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 and thereby inhibits the TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling pathway、European Journal of Pharmacology、査読有、Vol.701、2013、144-151  
DOI: 10.1016/j.epharm.2013.01.019
- ② Mari Sawamoto、Takao Kataoka、Shigeru Taketani (他3名、5番目)、The p53-dependent expression of frataxin controls 5-aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage in cancerous cells、Photochemistry and Photobiology、査読有、Vol. 89、2013、163-172  
DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01215.x
- ③ Ryuichi Tamura、Takao Kataoka (他5名、最後)、Santonin-related compound 2 inhibits the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B subunit p65 by targeting cysteine 38 in TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling pathway、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、Vol. 76、2012、2360-2363  
DOI: 10.1271/bbb.120619
- ④ Ryuichi Tamura、Takao Kataoka (他10名、最後)、Eudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、査読有、Vol. 22、2012、207-211  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.11.029
- ⑤ Takao Kataoka、Translation inhibitors and their unique biological properties、

- European Journal of Pharmacology、査読有、Vol. 676、2012、1-5  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.044
- ⑥ Yuriko Yamada、Takao Kataoka (他2名、最後)、Cytotrienin A, a translation inhibitor that induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 via activation of ERK and p38 MAP kinase、European Journal of Pharmacology、査読有、Vol. 667、2011、113-119  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.05.072
- ⑦ Tomonobu Yokomichi、Takao Kataoka (他6名、最後)、Ursolic acid inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and prevents TNF- $\alpha$ -induced gene expression by blocking amino acid transport and cellular protein synthesis、Biomolecules、査読有、Vol. 1、2011、32-47  
DOI: 10.3390/biom1010032
- ⑧ Yoshiko Ohgari、Takao Kataoka、Shigeru Taketani (他5名、6番目)、Roles of porphyrin and iron metabolisms in the  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells、Photochemistry and Photobiology、査読有、Vol. 87、2011、1138-1145  
DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00950.x
- ⑨ Tuan Thanh Chau、Mutsumi Ishigaki、Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Ferrochelatase catalyzes the formation of Zn-protoporphyrin of dry-cured ham via the conversion reaction from heme in meat、Journal of Agricultural and Food Chemistry、査読有、Vol. 59、2011、12238-12245  
DOI: 10.1021/jf203145p
- ⑩ Yuriko Yamada、Takao Kataoka (他3名、最後)、Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines、Journal of Antibiotics、査読有、Vol. 64、2011、361-366  
DOI: 10.1038/ja.2011.23
- ⑪ Ming Zhao、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他9名、8番目)、The structure of a new cardenolide diglycoside and the biological activities of eleven cardenolide diglycosides from *Nerium oleander*、Chemical & Pharmaceutical Bulletin、査読有、Vol. 59、2011、371-377  
DOI: 10.1248/cpb.59.371
- ⑫ Liming Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他10名、10番目)、Polar cardenolide monoglycosides from stems and twigs of *Nerium oleander* and their biological properties、Journal of Wood Science、査読有、Vol. 57、2011、47-55  
DOI: 10.1007/s10086-010-1138-x
- ⑬ Yuhua Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他8名、9番目)、The biological activities of cardenolide triglycosides from stems, twigs, and leaves of *Nerium oleander*、Journal of Wood Science、査読有、Vol. 57、2011、56-65  
DOI: 10.1007/s10086-010-1132-3
- ⑭ Saki Gotoh、Takayuki Nakamura、Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Egr-1 regulates the transcriptional repression of mouse  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase 1 by heme、Gene、査読有、Vol. 472、2011、28-36  
DOI: 10.1016/j.gene.2010.10.008
- ⑮ Takumi Chinen、Takao Kataoka、Takeo Usui (他6名、6番目)、Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway、Toxicology Letters、査読有、Vol. 199、2010、341-346  
DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.09.017
- ⑯ Tuan Thanh Chau、Mutsumi Ishigaki、Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Porcine ferrochelatase: the relationship between iron-removal reaction and the conversion of heme to Zn-protoporphyrin、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、Vol. 74、2010、1415-1420  
DOI: 10.1271/bbb.100078
- [学会発表] (計22件)
- ① 田村隆一 (片岡孝夫)、オイデスマン誘導体は転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路において複数のステップを阻害する、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ② 平野誠也 (片岡孝夫)、TNF レセプター1 のシグナル伝達経路に対するタンパク質合成阻害剤の作用機序の解析、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)



- ③ 森元今日子 (片岡孝夫)、炎症性サイトカインによる NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路と遺伝子発現に対するキナクリンの作用機序の解析、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ④ 木村奏恵 (片岡孝夫)、ヒト白血病細胞株におけるカスパーゼ 8 の細胞内局在性、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ 松下由果 (片岡孝夫)、カスパーゼ制御因子 c-FLIP<sub>L</sub> は Fas リガンドによる NF- $\kappa$ B の活性化を正負に調節する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑥ 西田愛 (片岡孝夫)、T-box 転写因子 T-bet および eomesodermin のサイトカイン産生誘導における作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑦ 松下由果 (片岡孝夫)、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化におけるカスパーゼ 8 とその調節因子 c-FLIP の機能解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑧ 片岡孝夫、マイコトリエニン II はタンパク質合成阻害剤として NF- $\kappa$ B 応答性遺伝子の発現を阻害する、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑨ 横道公伸 (片岡孝夫)、炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現誘導に対するウルソール酸の作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑩ 田村隆一 (片岡孝夫)、転写因子 NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路に対するオイデスマン誘導体の作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)

[図書] (計 2 件)

- ① Liming Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他 10 名、11 番目)、Daya Publishing House、Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine Vol. 1、2012、1-77

- ② Liming Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他 14 名、12 番目)、Nova Science Publishers、Pentacyclic triterpenes as promising agents in cancer、2010、89-126

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：20242307

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：