

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790966

研究課題名（和文）

黄連含有イソキノリンアルカロイドの糸球体腎炎治療候補薬としての応用研究

研究課題名（英文）Therapeutic effects of isoquinoline alkaloids isolated from Coptis Rhizoma, potential anti-glomerulonephritis

研究代表者

鈴木 裕可 (SUZUKI HIROKA)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：00581026

研究成果の概要（和文）：黄連含有イソキノリンアルカロイドが糸球体腎炎の病態に及ぼす影響を検討するため、生体において様々な作用を有することが知られる Transient receptor potential (TRP) チャネルに及ぼす影響を検討した。また、様々な薬物が TRP チャネルの活性化に及ぼす影響を検討し、抗リウマチ薬であるオーラノフィンやいくつかの NADPH oxidase 阻害薬が TRP ankyrin1 (TRPA1) を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Effects of isoquinoline alkaloids isolated from Coptis Rhizoma were examined on activity of Transient receptor potential (TRP) channel, which has multiple physiological functions in biological organs. Furthermore, stimulatory effects of various drugs including auranofin and some NADPH oxidase inhibitors on TRP ankyrin1 (TRPA1) channel were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体腎炎、黄連含有イソキノリンアルカロイド、TRPA1

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の腎疾患患者数は年々増加傾向にあり、世界的にも腎疾患患者数が増加している。しかし、現在の腎疾患の薬物療法は対症療法が主であり、未だ根本的な治療法が開発されていない。そのような中、蛋白リン酸化酵素 casein kinase2 (CK2) を阻害することにより糸球体腎炎を改善するという報告がなされた。そこで本研究では、CK2 を阻害することにより糸球体腎炎を改善する可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 申請者らはこれまでに、黄連含有イソキノリンアルカロイドである berberine、palmatine、coptisine が血管平滑筋細胞にお

いて、CK2 の活性化に関与する inositol polyphosphate multikinase (IPMK) の mRNA レベルを抑制することを見出している。そのため、これらアルカロイドが CK2 の活性に影響を及ぼすことにより、糸球体腎炎を改善する可能性を考え、これら化合物の腎疾患治療薬としての有効性を検討することを目的とする。

(2) Transient receptor potential (TRP) チャネルは、生体において様々な作用を有することが知られるカチオンチャネルである。TRP チャネルのうち、TRP vanilloid 1 (TRPV1)、TRPV4、TRP ankyrin1 (TRPA1) は生体内において痛みや炎症に関与することが報告されており、腎疾患にも関与する可能性が考えら

れる。

そこで、黄連含有イソキノリンアルカロイドである berberine、palmatine、coptisine が TRPV1、TRPV4、TRPA1 チャンネルを介して糸球体腎炎を改善する可能性を考え、これらアルカロイドが TRP チャンネルの活性化に及ぼす影響を検討した。

また、様々な薬物が TRPV1、TRPV4、TRPA1 チャンネルに及ぼす影響を検討した。さらに、腎臓において  $Ca^{2+}$  の再吸収に関与することが報告されている TRPV5 チャンネルに及ぼす影響についても検討した。

### 3. 研究の方法

(1)黄連含有イソキノリンアルカロイドが CK2 活性に及ぼす影響は CK2 キナーゼアッセイキットを用いて測定した。

(2)各種薬物が TRP チャンネルの活性化に及ぼす影響は、TRP チャンネル発現ベクターを導入した HEK293 に様々な薬物を作用させ、 $Ca^{2+}$  指示薬である fura-2 AM を用いて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) Berberine, palmatine, coptisine が CK2 活性に及ぼす影響

Berberine, palmatine, coptisine が CK2 活性に及ぼす影響を検討したが、大きな作用は見られなかった。

(2)

①Berberine, palmatine, coptisine が TRP チャンネルに及ぼす影響

TRPV1、TRPV4、TRPA1 発現ベクターを導入した HEK293 に berberine (30  $\mu$ M)、palmatine (30  $\mu$ M)、coptisine (30  $\mu$ M) を作用させ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、palmatine が TRPV1 活性化能を有している可能性が示唆された。今後、palmatine が TRPV1 を介して腎機能に及ぼす影響を検討する予定である。

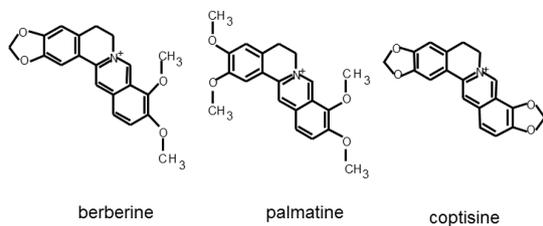


図 1  
黄連含有イソキノリンアルカロイドの構造

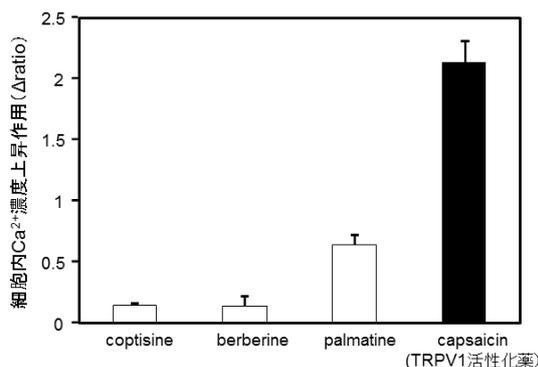


図 2  
Palmatine が TRPV1 活性化に及ぼす影響

②各種薬物が TRP チャンネルに及ぼす影響  
オーラノフィンが TRPA1 チャンネルに及ぼす影響

TRPV1、TRPV4、TRPA1 発現ベクターを導入した HEK293 に、関節リウマチ治療薬である DMARDs を作用させ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、オーラノフィン (AUR) が TRPA1 を介して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させることが明らかとなった。また、AUR は感覚神経に発現するその他の TRP チャンネルの活性化には影響を及ぼさないことも明らかとなった

(Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki et al, Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. Am J Physiol Cell Physiol., 304(4):C354-61, 2013, Fig.1,2 参照)。

これまでに TRPA1 の活性化には、TRPA1 の N 末端に存在するシステイン残基に様々な TRPA1 アゴニストが結合することが重要であることが明らかとなっている。そのため、AUR による TRPA1 活性化にどのシステイン残基が必要であるかを検討した。

TRPA1 の 414 番目、421 番目、621 番目、633 番目、641 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 (C414S、C421S、C621S、C633S、C641S) を作製し、AUR が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、AUR による TRPA1 活性化には 621 番目と 633 番目のシステイン残基が重要であることが明らかとなった (Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki et al, Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. Am J Physiol Cell Physiol., 304(4):C354-61, 2013, Fig.3 参照)。

また、AUR が生体内においても TRPA1 を活性化するかを検討した。これまでにヒト腹部神経芽細胞腫である IMR-32 をプロモデオキシウリジン (BrdU) 処理することにより神経細胞に分化すること、IMR-32 を BrdU 処理す

ることにより TRPA1 が機能発現することが報告されている。そこで、BrdU 処理した IMR-32 (nIMR-32) に AUR を作用させ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、AUR は nIMR-32 の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、その作用は TRPA1 を介していることが明らかとなった。

以上の結果より、AUR はヒトの末梢神経においても TRPA1 を活性化させ、生体に痛みを生じさせる可能性が考えられた (Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki et al, Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 304(4):C354-61, 2013, Fig.5 参照)。

#### NADPH oxidase 阻害剤が TRPA1 チャネルに及ぼす影響

これまでに過酸化水素により TRPA1 が活性化されることが報告されており、TRPA1 が生体内において酸化ストレスに関与することが考えられる。そこで、生体内において過酸化水素を生産する NADPH oxidase (NOX) に着目し、様々な NOX 阻害剤が TRPA1 の活性化に及ぼす影響を検討した。

まず、NOX 阻害剤である apocynin、diphenyleneiodonium (DPI)、VAS2870、plumbagin、2-acetylphenothiazine が TRPA1 発現ベクターを導入した HEK293 の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、検討した 5 つ全ての NOX 阻害剤が TRPA1 を介して濃度依存的に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させた。また、これらの NOX 阻害剤は感覚神経に発現するその他の TRP チャネルの活性化には影響を及ぼさないことも明らかとなった (図示せず、投稿準備中)。

次に、NOX 阻害剤のうち DPI が TRPA1 を活性化する作用機序の解明を行った。

これまでに、TRPA1 活性化薬であるマスタードオイル (MO) による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇作用がグルタチオン存在下において抑制されることから、MO が TRPA1 のシステイン残基に結合することにより TRPA1 を活性化するという報告がなされている。そこで、DPI による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇作用が、グルタチオンにより抑制されるかを検討した。

その結果、グルタチオン存在下において DPI による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇作用が抑制された。そのため、DPI は TRPA1 のシステイン残基に作用することにより TRPA1 を活性化していることが考えられた (図示せず、投稿準備中)。

次に、DPI による TRPA1 活性化にどのシステイン残基が必要であるかを検討した。

TRPA1 の 414 番目、421 番目、621 番目、633 番目、641 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 (C414S、C421S、C621S、

C633S、C641S) を作製し、DPI が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、DPI による TRPA1 活性化には 621 番目のシステイン残基が重要であることが明らかとなった (図示せず、投稿準備中)。

さらに、DPI が生体内においても TRPA1 を活性化するかを検討した。これまでに、当研究室においてヒト初代滑膜線維芽細胞を interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 処理することにより、TRPA1 が機能発現することを明らかにしている。そこで、DPI が IL-1 $\alpha$  処理したヒト初代滑膜線維芽細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響を検討した。

その結果、DPI は IL-1 $\alpha$  処理したヒト初代滑膜線維芽細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、その作用は TRPA1 を介していることが明らかとなった (図示せず、投稿準備中)。

以上の結果より、DPI は TRPA1 の 621 番目のシステイン残基に直接作用することにより TRPA1 を活性化することが明らかとなった。

今後、TRPA1 が腎機能に及ぼす影響を検討することにより、TRPA1 に作用する薬物が糸球体腎炎に及ぼす影響が明らかになると考えられる。

#### 様々な薬物が TRPV5 チャネルに及ぼす影響

現在、腎臓において  $Ca^{2+}$  再吸収に関与する TRPV5 チャネルに影響を及ぼす薬物についても探索を行っており、予備的なデータを得ている。今後、TRPV5 を介して腎機能に影響を及ぼす薬物についても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 4 件)

(1) Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki, Yuka Itoh, Katsuhiko Muraki.

TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells.

*Life Sciences*

査読有、Vol. 92, No. 4-5, 2013, 317-324

DOI: 10.1016/j.lfs.2013.01.002

(2) Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Katsuhiko Muraki.

Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the anti-rheumatic drug, auranofin.

*American Journal of Physiology - Cell Physiology*

査読有、Vol. 304, No. 2, 2013, 354-361

DOI:10.1152/ajpcell.2012.300096.2012

(3)Noriyuki Hatano, Yuka Itoh, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Ian C Wood, David J Beech, Katsuhiko Muraki.

Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat 1 (TRPA1) Gene Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release.

The Journal of Biological Chemistry  
査読有、Vol.287、No.38、2012、31962-31972  
DOI: 10.1074/jbc.M112.361139

(4) Hiroka Suzuki, Horoki Tanabe, Hajime Mizukami, Makoto Inoue.

Differential gene expression in rat vascular smooth muscle cells following treatment with coptisine exerts a selective antiproliferative effect.

Journal of Natural Products  
査読有、Vol.74、No.4、2012、634-638  
DOI: 10.1021/np100645d

[学会発表] (計4件)

①鈴木 裕可, 波多野 紀行, 村木 由起子, 伊藤 友香, 林 秀敏, 小野寄 菊夫, 村木 克彦

NADPH オキシダーゼ阻害剤は TRPA1 チャネルを活性化する

日本薬学会第133年会、2013年03月29日、横浜

②Hiroka Suzuki, Noriyuki Hatano, Yukiko Muraki, Yuka Itoh, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki.

Potent activation of TRPA1 channel by NADPH oxidase inhibitors.

第86回日本薬理学会年会、2013年3月21日、福岡

③鈴木 裕可, 楠神 枝里香, 神谷 絵梨奈, 藤 嵩久, 波多野 紀行, 村木 由起子, 村木 克彦

抗リウマチ薬オーラノフィンは TRPA1 チャネルを活性化する

日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌

④Noriyuki Hatano, Erika Kusugami, Erina Kamiya, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Katsuhiko Muraki.

Selective and potent activation of human TRPA1 by a disease modifying anti-rheumatic drug, auranofin.

第85回日本薬理学会年会、2012年3月16日、京都

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 裕可 (SUZUKI HIROKA)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：00581026

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし