

氏名(生年月日) まつもとともこ 松本朋子 (1989年3月23日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第199号

学位授与の日付 2021年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 セスキテルペンラクトン cynaropicrin の RAW264.7 細胞における iNOS 誘導抑制作用および親和性を示すタンパク質の解明研究

論文審査委員 (主査) 教授 松田 久司

(副査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 田中 智之

## 論文内容の要旨

### 序章

ラクトン構造を有するセスキテルペンラクトン類は多様な化学構造を有し、これまでに 5000 以上の化合物が同定されている。様々な薬用植物に含有されるが、中でもキク科植物に最も多く含まれ、多くは苦味を呈して草食動物や昆虫に対して摂食阻害効果を示す。セスキテルペンラクトン類には多様な生物活性が知られており、抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗不安作用、抗真菌活性および抗トリパノソーム活性などが報告されている。活性の発現においては  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone 構造が最も重要であるとされ、helenalin、parthenolide および costunolide などは nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性化を抑制することで腫瘍細胞に対する細胞毒性や抗炎症作用を示すことが報告されているが、それらの標的タンパク質は未だ不明である。一方、セスキテルペンラクトン類の一部は接触性皮膚炎の原因となるなど、毒性を有することも知られている。毒性発現の詳細な作用機序については未だ解明されておらず、セスキテルペンラクトン類をシードとした医薬品開発の問題点の一つとなっている。

本研究では、セスキテルペンラクトン類の主要な作用の 1 つである抗炎症作用の作用様式を明らかにすることを目的として、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて inducible nitric oxide synthase (iNOS) およびサイトカイン産生に対する影響を検討し、親和性を示すタンパク質の探索を行った。研究素材として、主要成分である cynaropicrin (**1**) などのセスキテルペンラクトン類を含有するキク科植物アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) 葉部を用いた。

### 第1章 アーティチョーク葉部含有セスキテルペンラクトン類の iNOS 誘導抑制作用と作用様式

アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) の頭状の蕾は世界各地で野菜として食され、葉部はハーブティーとして嗜好される他、肝炎や高脂血症の治療、利尿や胆汁分泌促進を目的としてヨーロッパの伝統医学で用いられてきた。葉部抽出エキスの薬理作用として、抗酸化作用および抗高脂血症作用などが報告され、**1** には抗高脂血症作用、鎮痙作用、抗寄生虫作用、皮膚における抗光老化作用などが報告されている。

セスキテルペンラクトン類を多く含む酢酸エチル可溶性画分の lipopolysaccharide (LPS) 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対する作用を検討した結果、比較対照薬 caffeic acid phenethyl ester ( $IC_{50}=4.4 \mu M$ ) と比べて、同等の抑制作用が観察された ( $IC_{50}=1.6 \mu g/mL$ )。そこで、構造活性相関に関する知見を得る目的でアーティチョーク葉部から単離した既知セスキテルペンラクトン **1-7** および誘導体 **8** について同様に NO 産生抑制作用を検討した結果、**1-6** は NO 産生を濃度依存的に抑制した ( $IC_{50}=1.2, 3.5, 8.7, 10.5, 2.4, 17.7 \mu M$ )。これまでのセスキテルペ

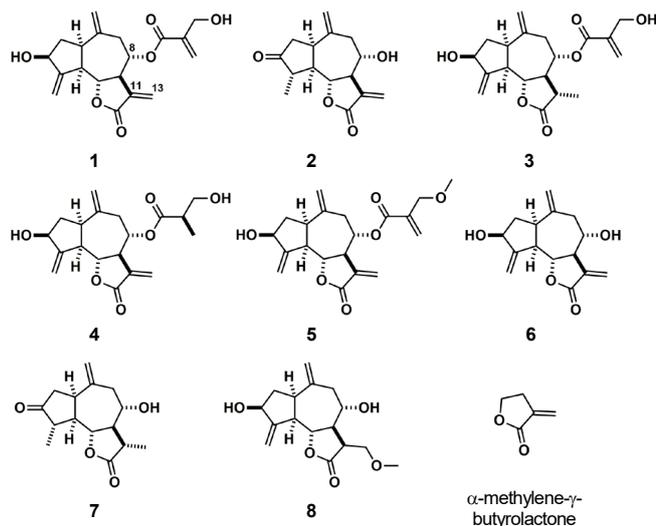


図1. 化合物 **1-8** および関連化合物の化学構造

ンラクトン類の同様の研究報告から  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone 構造が強力な活性発現に必須であると考えられているが、本研究において  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone の  $IC_{50}$  値は  $8.2 \mu M$  であり、8 位の  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル構造を有するアシル基も同等に重要であることが示唆された。作用様式を明らかにすることを目的として **1-4** について iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路に対する影響を検討した。すなわち、mitogen-activated protein kinases (MAPK)、炎症誘発性メディエーターを誘導する NF- $\kappa$ B および interferon (IFN) に応答して炎症性サイトカイン産生の合成とケモカインの発現を調節する Janus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) シグナル伝達経路に関わるタンパク質発現量への影響を検討したところ、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase (SAPK/JNK)、p38 MAPK といった MAPK 群には影響を及ぼさなかったが NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットの核内移行および STAT 1 の Tyr701 リン酸化を有意に抑制した。さらに、最も強い抑制作用を示した **1** について tumor necrosis factor- $\alpha$ 、prostaglandin  $E_2$  および IFN- $\beta$  産生に対する影響を検討した結果、 $1 \mu M$  および  $3 \mu M$  処理群で有意に抑制した。

## 第2章 Cynaropicrin (**1**) に親和性を示すタンパク質の探索

セスキテルペンラクトン類の標的分子に関する知見を得るため、cynaropicrin (**1**) および **1** より誘導し、NO 産生抑制作用および細胞毒性を示さない **8** に対して親和性を示すタンパク質の解明を試みた。すなわち、**1** および **8** の水酸基にリンカーを介して結合した磁気ビーズを用いてアフィニティ精製を行った。RAW264.7 細胞抽出物から精製したタンパク質を SDS-PAGE により分離したところ、複数の特異的バンドが検出された。得られたバンドについてゲル内消化を行い、peptide-mass fingerprinting 法よりタンパク質の同定を行った結果、**1** および **8** に親和性を示すタンパク質として tubulin が同定され、**1** のみに親和性を示すタンパク質として ATP/ADP translocase 2 (adenine nucleotide translocase2; ANT2) が同定された。以上のことから、**1** および **8** の構造の比較により、 $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル構造が ANT2 との親和性に関与し、ANT2 が **1** の毒性に寄与することが示唆された。

## 総括

アーティチョーク葉部抽出物に RAW264.7 細胞における LPS 刺激による NO 産生に対する強い抑制作用を見出した。含有セスキテルペンラクトン **1-4** に LPS 刺激による iNOS の誘導抑制作用を見出し、NF- $\kappa$ B および STAT 1 の活性化を抑制することを明らかにした。さらに、標的タンパク質の探索を目的に **1** と親和性を示すタンパク質の解明を試みた結果、毒性発現に関わる ANT2 が検出された。本研究において、構造活性相関と毒性発現の機序の一部を明らかにしたことで、セスキテルペンラクトン

類をシーズとした医薬品開発に関わる有用な知見が得られたと考えられる。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

本研究では、キク科植物アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) に含まれるセスキテルペンラクトン類を単離・精製し、セスキテルペンラクトン類の主要な作用の1つである抗炎症作用の作用様式を明らかにすることを目的として、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて inducible nitric oxide synthase (iNOS) およびサイトカイン産生に対する影響を検討するとともに親和性を示すタンパク質の探索を行った。

### 《審査結果の要旨》

#### 第1章 アーティチョーク葉部含有セスキテルペンラクトン類の iNOS 誘導抑制作用と作用様式

セスキテルペンラクトン類を多く含む酢酸エチル可溶性画分はリポ多糖 (LPS) 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生を抑制した。そこで、構造活性相関に関する知見を得る目的でアーティチョーク葉部から cynaropicrin を含む既知セスキテルペンラクトン類7種を単離し、NO 産生抑制作用を検討した結果、7種に NO 産生抑制作用が認められた (IC<sub>50</sub> 値: 1.2–17.7 μM)。従来の研究報告から強い活性発現には α-methylene-γ-butyrolactone 構造が必須であると考えられているが、8位に結合した α,β-不飽和カルボニル構造を有するアシル基も同等に重要であることが示唆された。作用様式を明らかにすることを目的として cynaropicrin など4種類の成分について iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路に対する影響を検討した。すなわち、MAPK、NF-κB および JAK-STAT シグナル伝達経路に関わるタンパク質発現量への影響を検討したところ、ERK、SAPK/JNK および p38 MAPK といった MAPK 群には影響を及ぼさなかったが、NF-κB の p65 サブユニットの核内発現レベルおよび STAT 1 の Tyr701 リン酸化を有意に抑制した。さらに、最も強い抑制作用を示した cynaropicrin について TNF-α、prostaglandin E<sub>2</sub> および IFN-β 産生に対する影響を検討した結果、1 μM および 3 μM 処理群で有意な抑制作用が観察された。

#### 第2章 Cynaropicrin に親和性を示すタンパク質の探索

セスキテルペンラクトン類の標的分子に関する知見を得るため、cynaropicrin から NO 産生抑制作用および細胞毒性を示さない不活性誘導体を作製し、cynaropicrin および不活性誘導体に対して親和性を示すタンパク質の解明を試みた。すなわち両化合物の水酸基にリンカーを介して結合した磁気ビーズを用いてアフィニティ精製を行った。RAW264.7 細胞抽出物から精製したタンパク質を SDS-PAGE により分離したところ、親和性を示す複数のタンパク質が検出された。検出されたタンパク質についてゲル内消化を行い、peptide-mass fingerprinting 法により同定を試みた結果、両化合物に親和性を示すタンパク質として tubulin が同定され、cynaropicrin のみに親和性を示すタンパク質として細胞毒性に関与する可能性のある ATP/ADP translocase 2 (adenine nucleotide translocase 2; ANT2) が同定された。以上のことから、両化合物の化学構造の比較により、α,β-不飽和カルボニル構造が ANT2 との親和性に関与し、ANT2 が cynaropicrin の細胞毒性に寄与することが示唆された。

### 《結論》

以上、申請者はアーティチョーク葉部から得られた4種のセスキテルペンラクトン類に LPS 刺激に

よる RAW264.7 細胞からの iNOS の誘導抑制作用を見出し、NF- $\kappa$ B および STAT 1 の活性化を抑制することを明らかにした。さらに、標的タンパク質の探索を目的に cynaropicrin と親和性を示すタンパク質の解明を試みた結果、iNOS 発現抑制に関わるタンパク質の同定はできなかったが、細胞毒性発現に関わる ANT2 が検出された。本研究において、構造活性相関と細胞毒性発現の機序の一部を明らかにしたことで、セスキテルペンラクトン類をシーズとした医薬品開発に関わる有用な知見が得られたと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。