

2020 年度 課程博士学位論文

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

【薬学】生薬学分野 松本 朋子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Tomoko Matsumoto, Souichi Nakashima, Seikou Nakamura, Yasunao Hattori, Tomoshige Ando, Hisashi Matsuda. Inhibitory effects of cynaropicrin and related sesquiterpene lactones from leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on induction of iNOS in RAW264.7 cells and its high-affinity proteins. *J. Nat. Med.* **2021**, 75, 381–392. [第1章および第2章]

目次

序論.....	1
第一節 マクロファージにおける iNOS の誘導.....	1
第一項 マクロファージの活性化.....	1
第二項 iNOS による NO の産生.....	2
第三項 iNOS 産生に関わるシグナル伝達経路.....	2
第二節 セスキテルペンラクトン類の構造と生物活性.....	4
第三節 本研究の目的および方法.....	7
本論.....	9
第一章 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.....	9
第一節 LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対するアーティチョーク葉部抽出エキス、各種画分および含有セスキテルペンラクトンの抑制作用.....	9
考察.....	16
第二節 アーティチョーク葉部含有成分の作用様式.....	18
第一項 LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの iNOS 誘導抑制作用.....	18
考察.....	18
第二項 MAP カスケードに対する作用.....	21
考察.....	26
第三項 NF- κ B シグナル伝達経路に対する作用.....	27
考察.....	33
第四項 JAK-STAT シグナル伝達経路に対する作用.....	34
考察.....	37
小括.....	38

第二章 Cynaropicrin (1) に親和性を示すタンパク質の探索.....	39
第一節 LPS 刺激 RAW264.7 細胞中で親和性を示すタンパク質.....	39
考察.....	42
第二節 LPS 未刺激の RAW264.7 細胞に親和性を示したタンパク質.....	43
考察.....	45
小括.....	46
結論.....	47
謝辞.....	48
実験の部.....	49
第一章の実験.....	51
第二章の実験.....	56
引用文献.....	61

略語表

AP-1:	activator protein 1
<i>n</i> -BuOH:	<i>n</i> -butanol
CAPE:	caffeic acid phenethyl ester
cNOS:	constitutive NOS
COX-2:	cyclooxygenase-2
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF:	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DTT:	dithiothreitol
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS:	endothelial NOS
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
EtOAc:	ethyl acetate
GAS:	interferon-gamma activated site
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP:	horseradish peroxidase
IFN:	interferon
I κ B:	inhibitor of kappa B
IKK:	I κ B kinase
IL:	interleukin
iNOS:	inducible NOS
IRAK:	interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF9:	interferon regulatory factor 9
ISGF3:	interferon-stimulated gene factor 3
ISRE:	interferon-stimulated response elements
JAK:	Janus kinase
JNK:	c-Jun-N-terminal kinase
LPS:	lipopolysaccharide
NF- κ B:	nuclear factor-kappa B
NMR:	nuclear magnetic resonance
nNOS:	neuronal NOS
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MeOH:	methanol

MyD88:	myeloid differentiation primary response 88
NO:	nitric oxide
PBS:	phosphate-buffered saline
PGE ₂ :	prostaglandin E ₂
PMSF:	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF:	polyvinylidene difluoride
SAPK:	stress-activated protein kinase
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM:	standard error of the mean
STAT:	signal transducers and activators of transcription
TAK1:	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TIR:	Toll/Interleukin-1 receptor
TLR:	Toll-like receptor
TNF- α :	tumor necrosis factor alpha
TRAF6:	TNF receptor associated factor 6
TBS:	tris-buffered saline
TYK2:	tyrosine kinase 2

序論

第一節 マクロファージにおける iNOS の誘導

第一項 マクロファージの活性化

マクロファージは自然免疫反応において中心的な役割を果たす。グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分で、エンドトキシンであるリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) やT細胞やNK細胞が産生するIFN- γ による刺激を受け、活性化されると炎症性サイトカインを産生する¹。サイトカイン産生による炎症反応は適切な量であれば宿主に対して保護的に働くが、活性化が持続し、過剰に産生されると宿主の細胞や組織に対して傷害作用を示し、敗血症性ショックや糖尿病、がんなどの疾患の原因^{2,5}となる。また活性化マクロファージは誘導型NO合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) によりNOを産生する。適切な産生量であればNOは外敵に対する殺菌作用などを示すが、過剰に産生されると宿主の細胞や組織に対しても傷害作用を示し、他の炎症性メディエーターと同様に炎症をはじめとする疾患の原因となる⁶(Figure 1)。

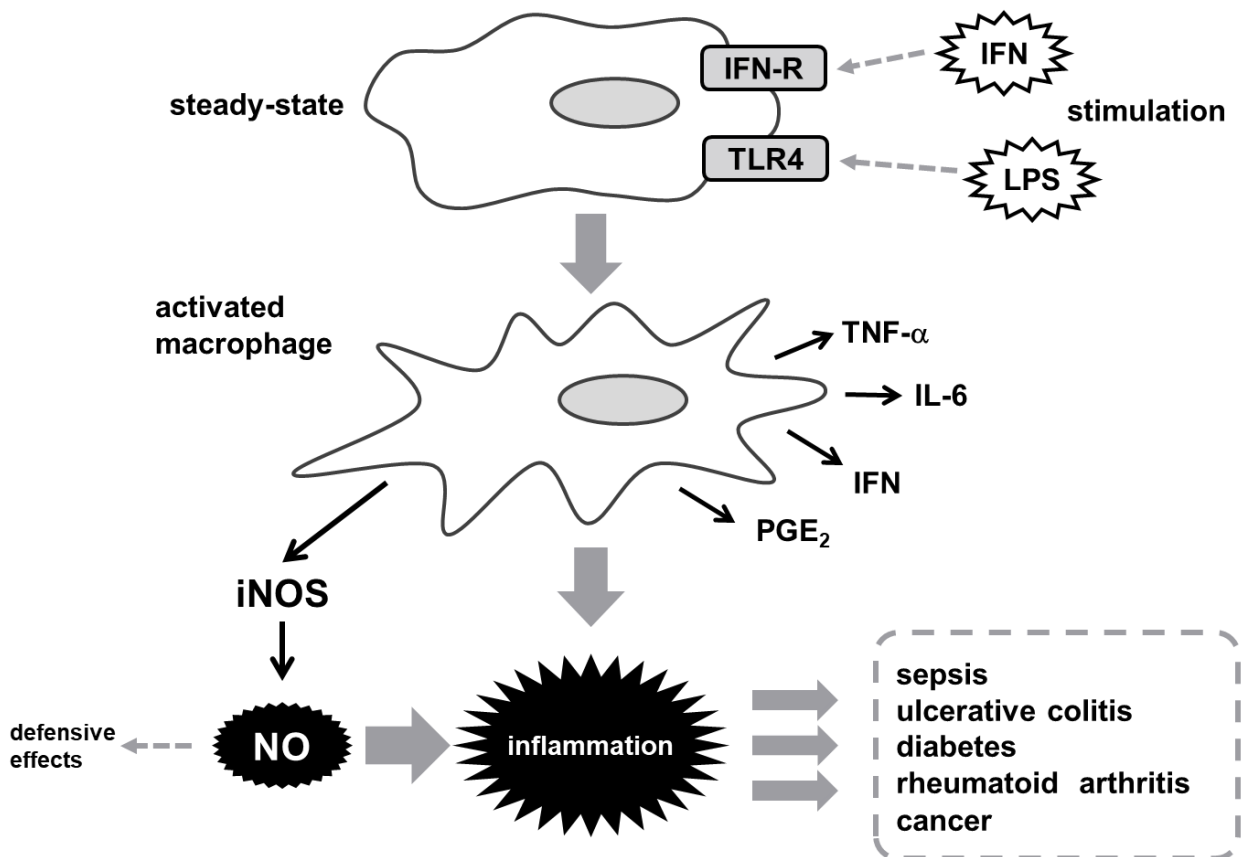


Figure 1. Macrophage activation.

第二項 iNOS による NO の産生

NO は生物学的小および病態生理学的過程において重要な細胞内および細胞間シグナル伝達分子である。哺乳類において、NO は生体内で 3 種類の NO 合成酵素 (NOS ; NO synthase) によりアルギニンから産生される。NOS には、主に神経細胞に発現している nNOS (neuronal NOS ; NOS I), マクロファージなどで誘導的に発現する iNOS (inducible NOS ; NOS II) と内皮細胞に発現している eNOS (endothelial NOS ; NOS III) の 3 つのアイソフォームが存在する。これら 3 つのアイソザイムの中で、nNOS と eNOS は構成型 NOS (constitutive NOS ; cNOS) であり休止細胞において恒常的に発現し、カルシウム依存的に活性化される⁷。一方、iNOS は休止細胞においてはほとんど発現せず、二重鎖 RNA (dsRNA) や LPS などの微生物由来成分が Toll-like receptor (TLR) によって認識されることで誘導され、IFN- γ 、インターロイキン-1 (IL-1), TNF- α などの炎症性サイトカインや、IFN- γ などによって発現が増強され、カルシウム非依存的に活性化される。iNOS は cNOS とは対照的に、長期間大量の NO を合成する。iNOS による NO の産生は病原体に対する非特異的防御反応の一つであるが、過剰な産生は宿主に対しても細胞および組織傷害作用を示し、関節リウマチや多発性硬化症、糖尿病、敗血症性ショックなどの炎症性疾患の病態に寄与する可能性がある。従って、iNOS による NO の過剰産生を抑制することは、炎症性疾患の治療に有用であると考えられている^{8,9}。

第三項 iNOS 産生に関わるシグナル伝達経路

iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路として、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケード、(nuclear factor- κ B) NF- κ B シグナル伝達経路、Janus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) シグナル伝達経路が挙げられる (Figure 2)。MAPK シグナル伝達経路は、細胞の増殖、分化、生存、アポトーシスおよび形質転換など、さまざまな細胞活動に関連する細胞内シグナルを伝達する。マクロファージにおいて、LPS が TLR4 に結合するとアダプタータンパク質である Myeloid Differentiation Protein-88 (MyD88) が Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) ドメインを介して TLR4 に結合する。MyD88 依存性経路は種々の炎症性サイトカインの産生に必須である。MyD88 は interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) を活性化し、IRAK が TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) をリン酸化する。TRAF6 が MAPKKK である transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) を活性化することにより、extracellular signal-regulated kinase (ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun-N-terminal kinase (SAPK/JNK) および p38 MAPK をリン酸化する。c-Fos および c-Jun サブユニットによって形成されるヘテロダイマーである AP-1 は ERK, JNK および p38 MAPK によりリン酸化され、核内へと移行して転写活性を示し、iNOS や cyclooxygenase-2 (COX-2) および TNF- α などの炎症性サイトカイン産生に関わる^{10,11}。MAPK 群は、癌や関節リウマチ、クローン病、神経変性疾患など多くの疾患の病因に関与しており、治療薬の重要な標的分子である¹²。

NF- κ B シグナル伝達経路は炎症や免疫反応、細胞増殖およびアポトーシスなどにおいて重要な役

割を果たす転写因子である。正常細胞や定常状態の細胞において、NF- κ B は I κ B (inhibitor of κ B) と結合することで不活化されている。LPS や TNF- α などによって TLR や TNF レセプターが刺激を受けることで、TRAF が TAK1 を活性化する。TAK1 によって活性化された I κ B kinase (IKK) 複合体が I κ B α をリン酸化し、リン酸化を受けた I κ B α はユビキチン化されてプロテアソームによって分解される。I κ B α が分解されることで NF- κ B は核内へと移行し、核内に移行した活性型 NF- κ B が NF- κ B 依存性遺伝子の転写を促進し、iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 などの産生を誘導する^{13,14}。

JAK-STAT シグナル伝達経路は、炎症性サイトカインの合成とケモカインの発現を調節することにより、炎症反応において重要な役割を果たす¹⁵。マクロファージは LPS 刺激に応答して IFN- β および IFN- γ を産生し、産生した IFN により IFN 受容体が刺激を受けることにより、STAT の活性化が引き起こされる^{16,17}。I 型インターフェロンである IFN- β は JAK1 および tyrosine kinase 2 (TYK2) を活性化し、STAT1 および STAT2 をリン酸化してヘテロダイマーを形成する。形成したヘテロダイマーは interferon regulatory factor 9 (IRF9) と結合して IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) を形成して核内へと移行し、interferon-stimulated response elements (ISRE) に結合し、転写活性を示す^{18,19}。II 型インターフェロンである IFN- γ は、JAK1 と JAK2 を活性化し、STAT1 の Tyr701 残基がリン酸化される。リン酸化を受けた STAT1 はホモダイマーを形成して核内へと移行し、IFN-gamma activated site (GAS) に結合し、転写活性を示す^{19,21}。JAK2/STAT1 経路は、マクロファージにおける LPS 刺激による iNOS 産生に不可欠であることが報告されている^{19,20}。

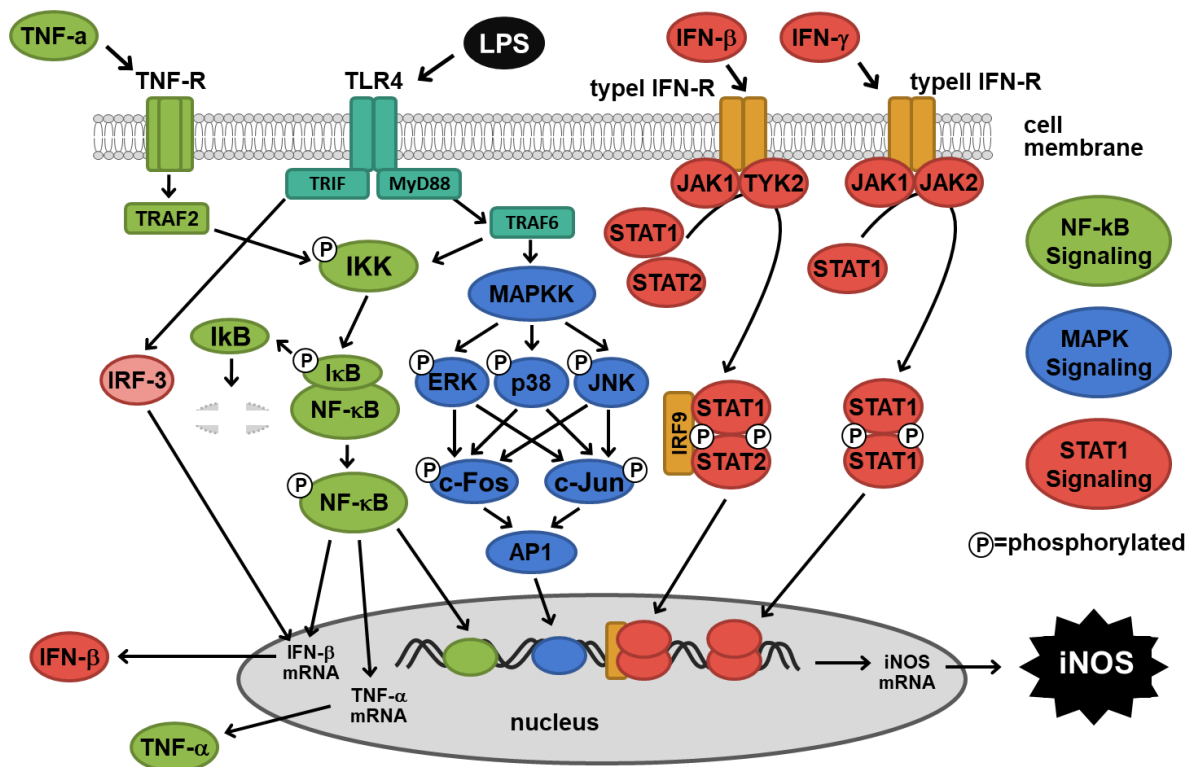


Figure 2. Signaling pathways for iNOS induction in macrophages.

第二節 セスキテルペンラクトン類の構造と生物活性

セスキテルペンラクトン類は環状エステル構造を有し、イソプレン単位3つからなる炭素数15の基本骨格を持つ化合物群である。Figure 3に代表的なセスキテルペンラクトンの骨格を示す。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²²。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²³。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²⁴、抗真菌活性²⁵および抗トリパノソーマ活性²⁶などが報告されている。正確な作用メカニズムについては不明なものが多いが、これらの活性の発現において α -methylene- γ -butyrolactone構造が最も重要であるとされ、 α -methylene- γ -butyrolactone構造のエキシメチレン基がマイケル付加により生体内の転写因子や酵素のシステインのチオール基と結合し、生物活性を示すことが示唆されている^{24, 27, 28}。

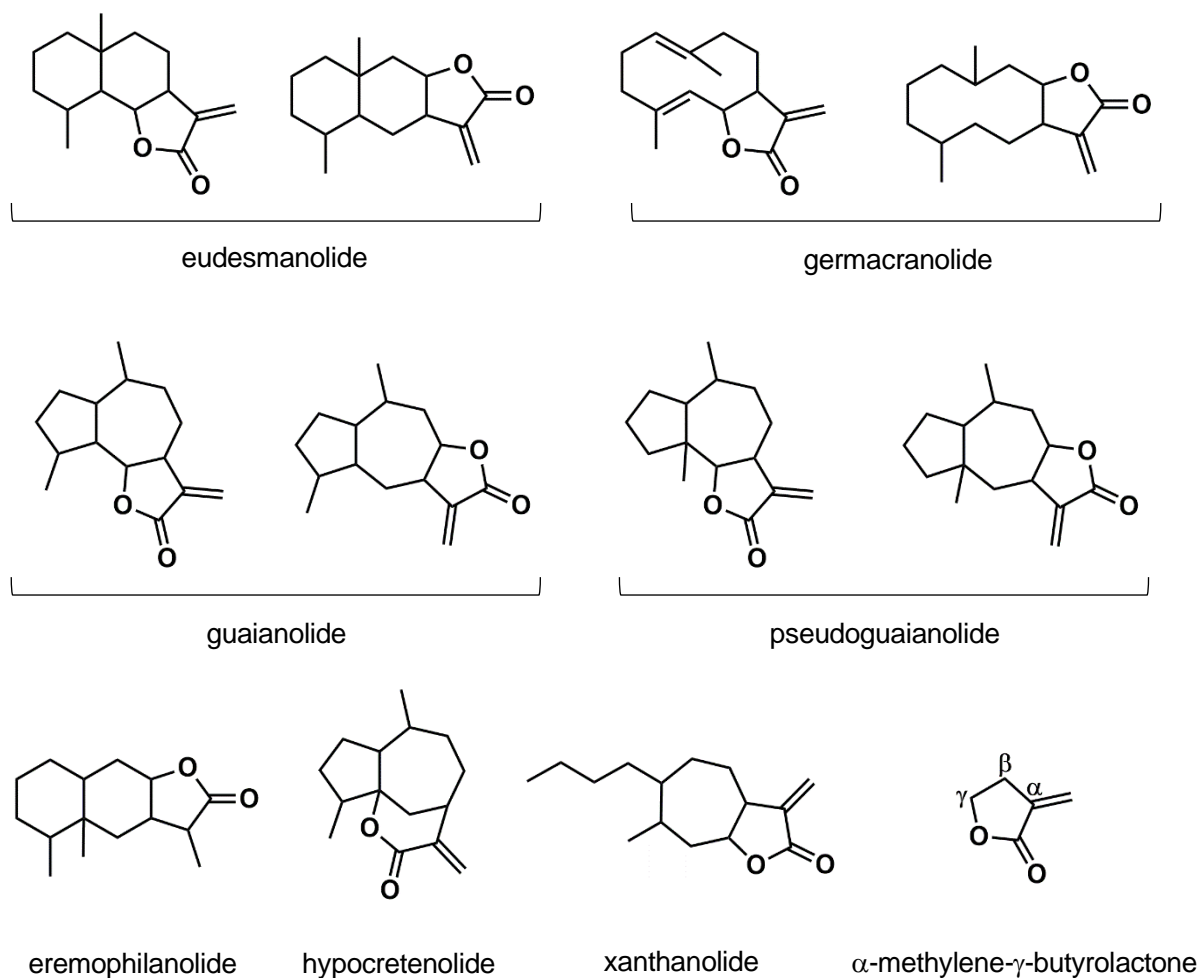


Figure 3. Chemical structures of sesquiterpene lactones and α -methylene- γ -butyrolactone.

α -Methylene- γ -butyrolactone 構造を有するセスキテルペンラクトン類は NF- κ 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。Costunolide, parthenolide および helenalin を例として示す (Figure 4) .

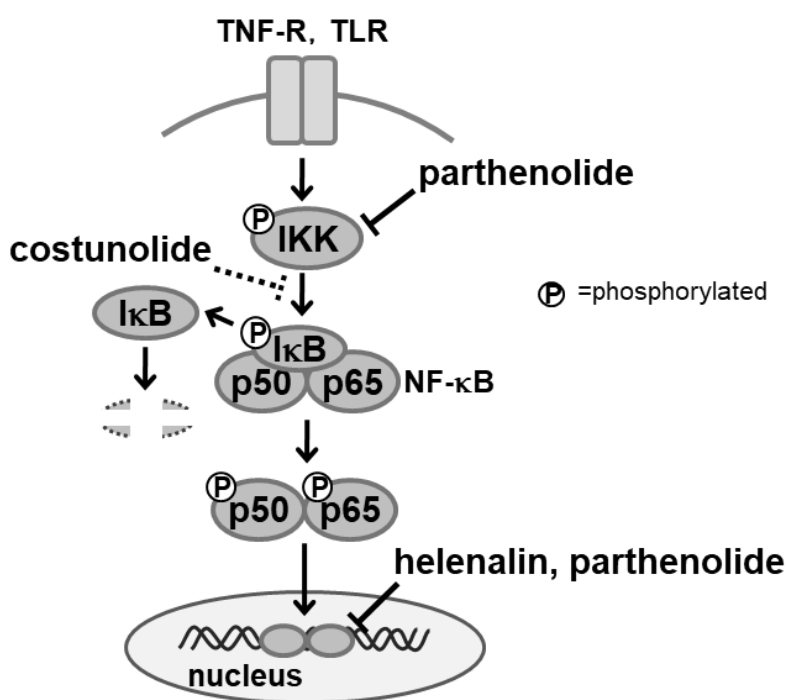
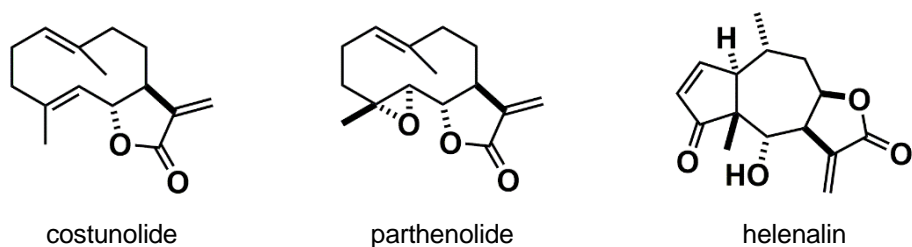


Figure 4. Chemical structures of bioactive sesquiterpene lactones and inhibitory effects on NF- κ B activation.

キク科植物モッコウ (*Saussurea lappa*) などに含有される germacranolide 型のセスキテルペンラクトンである costunolide は、標的タンパク質は明らかではないが、RAW264.7 細胞²⁹において I κ B α のリン酸化を抑制することにより NF- κ B の核内への移行量を減少させ、iNOS 誘導抑制作用を示すことが報告されている。

キク科植物ナツシロギク (feverfew, *Tanacetum parthenium*) などに含有される germacranolide 型のセスキテルペンラクトンである parthenolide は、I κ B のリン酸化を抑制することによる I κ B の分解抑制と、NF- κ B p65 サブユニットに直接結合することによる NF- κ B の DNA 結合阻害という二重のメカニ

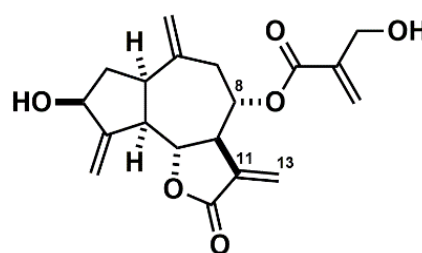
ズムが報告されている。ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞において parthenolide は IKK β の活性化ループにおける Cys179 残基をアルキル化することで I κ B の分解を抑制することから、I κ B のリン酸化の抑制が示唆され、さらに NF- κ B の DNA 結合を阻害することが報告されている³⁰。また、別の研究ではヒト T 細胞性白血病由来 Jurkat 細胞、ヒト胎児由来 293 細胞、HeLa 細胞および RAW264.7 細胞において NF- κ B の DNA 結合を阻害することが示されており、I κ B のリン酸化抑制作用よりも NF- κ B p65 サブユニットの Cys38 残基に直接結合することによる DNA 結合阻害作用がより強力であることが報告されている³¹。

一方、キク科植物 *Arnica montana* などに含有される pseudoguaianolide 型のセスキテルペンラクトンである helenalin は、ヒト T 細胞性白血病細胞由来 Jurkat 細胞において I κ B のリン酸化および NF- κ B の核内移行を抑制せず、NF- κ B p65 サブユニットに不可逆的に直接結合し DNA 結合を抑制することが報告されている²⁴。これら 3 種のセスキテルペンラクトンはいずれも α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有し、NF- κ B の活性化を抑制することが報告されているが、作用様式が異なることから、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造以外の活性への関与が示唆されている。その活性に関与する構造は未だ不明である。また、炎症における NF- κ B の役割については良く知られているが、セスキテルペンラクトン類の抗炎症作用が全て NF- κ B を介しているのかは不明である。

セスキテルペンラクトン類は多様な化学構造と生物活性を有し、特に強力な抗腫瘍作用と抗炎症作用を有することから、医薬品リード化合物の探索素材として有用である。しかしながら、セスキテルペンラクトン類の一部はキク科植物による接触性皮膚炎の原因^{32,33}となることや、草食動物に胃腸障害を引き起こす³⁴ことが知られている。毒性発現の詳細な作用機序についても未だ十分に解明されておらず、セスキテルペンラクトン類をシーズとした医薬品開発の問題点の一つとなっている。

第三節 本研究の目的および方法

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機構を明らかにすることを目的とした。また、構造活性相関に関する知見を得るため、研究素材として、cynaropicrin (1) をはじめとして guaianolide 類のセスキテルペンラクトン類を種々含有するアーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) を用いた (Figure 5)。アーティチョークはキク科の植物で、地中海諸国、アメリカ、アフリカなどに分布している。若い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³⁵。葉部には cynarin やクロロゲン酸などのカフェオイルキナ酸^{36,37}や、luteolin 配糖体や apigenin などのフラボノイド³⁸、そして主要成分である 1 などのセスキテルペンラクトン類を含有し、葉部抽出エキスの薬理作用として、抗酸化作用³⁹および抗高脂血症作用⁴⁰などが報告されている。アーティチョーク葉部抽出エキスや含有成分について、抗炎症作用も報告されている^{41,42}が、カフェオイルキナ酸やフラボノイド含有画分に着目したものであり、セスキテルペンラクトン類の抗炎症作用については明らかにされていない。



cynaropicrin (1)

Figure 5. Flower buds and leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and chemical structure of cynaropicrin (1).

化合物 1 は α -methylene- γ -butyrolactone 構造および 8 位に α , β -不飽和カルボニル構造を有する guaianolide 類のセスキテルペンラクトンで、様々な生物活性を有することが知られており、抗高脂血症作用⁴³、鎮痙作用⁴⁴、抗寄生虫作用⁴⁵、皮膚における抗光老化作用⁴⁶などが報告されている。構造活性相関に関する知見を得るため、アーティチョーク葉部酢酸エチル可溶性画分から単離した 1 およびその他微量セスキテルペンラクトンについてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて LPS 刺激による一酸化窒素産生抑制作用について検討した。抗炎症作用の評価方法として、簡便に測定ができ、他の炎症性メディエーター産生と相関性がある NO 産生抑制作用を指標に、化合物の構造と比較して検討した。NO 産生抑制活性を示した化合物についてウエスタンブロット法により iNOS 発現に対する作用を検討し、iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路である MAPK カスケ

ード, NF- κ B シグナル伝達経路, 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. また, 最も強い活性を示した **1** について TNF- α , IFN- β , IFN- γ および PGE₂ 産生に対する影響を検討した. さらに, 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, **1** に対して親和性を示すタンパク質の解明を試みた. **1** に対して親和性を示すタンパク質の探索方法として, COOH リンカー結合磁気ビーズを用いたアフィニティ精製を行った (Figure 6).

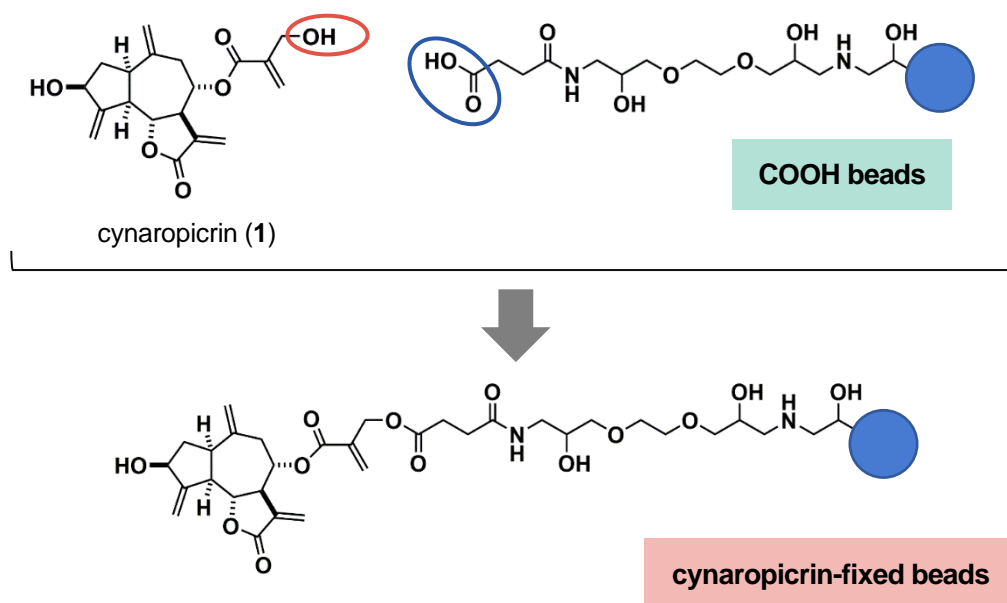


Figure 6. Immobilization of cynaropicrin (**1**) on COOH linker beads.

本論

第一章 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

第一節 LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対するアーティチョーク葉部抽出エキス、各種画分および含有セスキテルペンラクトンの抑制作用

アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) 葉部含有成分の抽出及び成分単離

セスキテルペンラクトン類の抗炎症作用、構造活性相関を解析するため、種々の構造をもつセスキテルペンラクトン類の単離をめざし、アーティチョークの乾燥葉部について、既報⁴³に従い成分単離を行った。すなわち、アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) の乾燥葉部 (2 kg) をメタノールを用いて熱時 (80°C) 抽出した後溶媒を留去し、メタノール抽出エキス (618 g, 30.9%) を得た。得られたメタノール抽出エキスを酢酸エチル、*n*-ブタノールおよび水を用いてそれぞれ酢酸エチル可溶性画分 (63.6 g, 3.2%), *n*-ブタノール可溶性画分 (45.6 g, 2.3%), 水可溶性画分 (508 g, 25.4%) に分離した。続いて、酢酸エチル可溶性画分 60 g を用いて逆相カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより、既知セスキテルペン cynaropicrin (**1**, 1248.7 mg, 0.066%)⁴⁷, grosheimin (**2**, 59.1 mg, 0.0031%)⁴⁸, 11 β ,13-dihydrocynaropicrin (**3**, 5.4 mg, 0.00029%)⁴⁹, 3 β -hydroxy-8 α -[(*S*)-3-hydroxy-2-methylpropionyloxy]guaia-4(15),10(14),11(13)-trien-1 α ,5 α ,6 β H-12,6-olide (**4**, 5.7 mg, 0.00030%)⁵⁰, 3 β -hydroxy-8 α -[2-methoxymethyl-2-propenyloxy]guaia-4(15),10(14),11(13)-trien-1 α ,5 α ,6 β H-12,6-olide (**5**, 5.0 mg, 0.00026%)⁵¹, deacylcynaropicrin (**6**, 26.2 mg, 0.0014%)⁴⁷ および isoamberboin (**7**, 6.8 mg, 0.00036%)⁵² を単離した (Chart 1, Figure 7)。これらの既知化合物については、¹H NMR, ¹³C NMR, 質量分析のスペクトルデータおよび旋光度を文献値と比較することにより同定した。

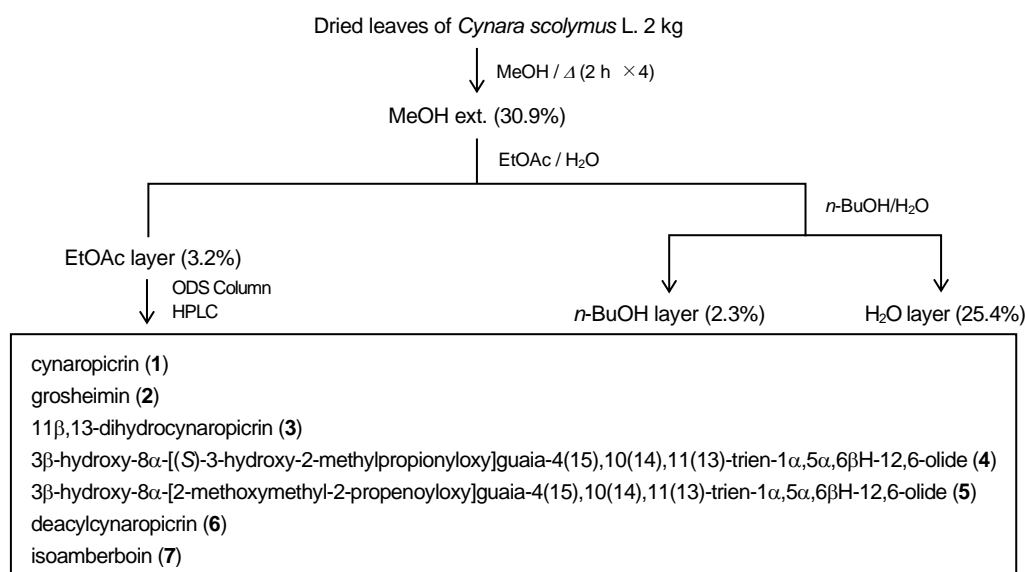
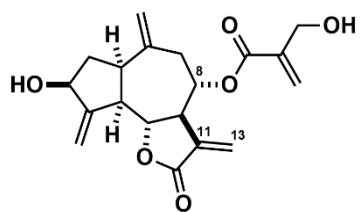
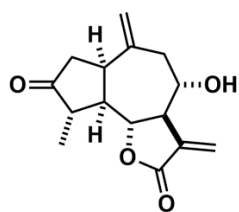


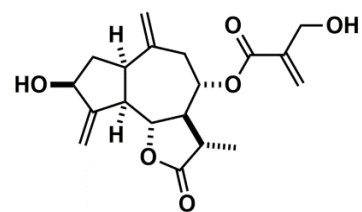
Chart 1. Isolation procedure of constituents (**1–7**) from the dried leaves of artichoke.



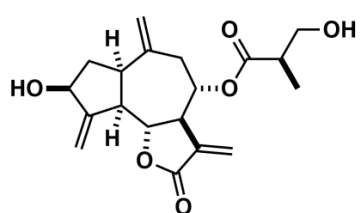
cynaropicrin (1)



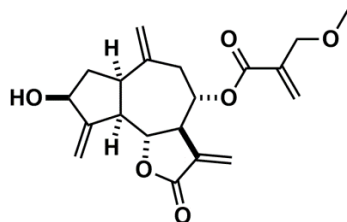
grosheimin (2)



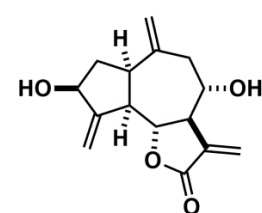
11β,13-dihydrocynaropicrin (3)



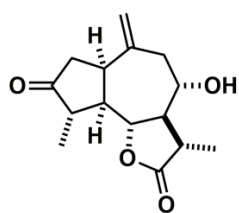
4



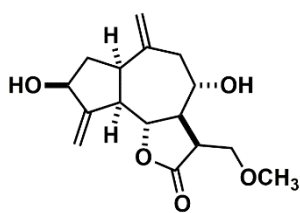
5



deacylcynaropicrin (6)



isoamberboin (7)



8

Figure 7. Chemical structures of isolated compounds from artichoke leaves (1–7) and synthesized cynaropicrin derivative (8).

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 1 より一部改変して引用]

LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対するアーティチョーク葉部メタノール抽出エキスおよびその画分の抑制作用

アーティチョーク葉部メタノール (MeOH) 抽出エキス, 酢酸エチル (EtOAc) 可溶性画分, *n*-ブタノール (*n*-BuOH) 可溶性画分, 水可溶性画分について, LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生抑制作用について検討した (Table 1). その結果, 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について強力な抑制作用が観察された ($IC_{50}=1.6 \mu\text{g/mL}$). また, $10 \mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞毒性を示した.

Table 1. Effects of methanolic extract of *C. scolymus* leaves and its fractions on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)							IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	0	0.3	1	3	10	30	100	
MeOH 抽出エキス	0.0 \pm 1.7	—	—	21.0 \pm 1.3*	26.6 \pm 5.2**	54.4 \pm 2.2**	98.9 \pm 1.3**	23.1
EtOAc 可溶性画分	0.0 \pm 1.8	9.4 \pm 3.8*	31.8 \pm 1.6**	76.6 \pm 2.8**	99.3 \pm 0.9** ^a	—	—	1.6
<i>n</i> -BuOH 可溶性画分	0.0 \pm 5.8	—	—	9.4 \pm 1.3	21.2 \pm 4.6**	49.0 \pm 1.7**	94.9 \pm 1.9**	30.0
H ₂ O 可溶性画分	0.0 \pm 5.8	—	—	6.5 \pm 5.5	3.5 \pm 4.1	1.2 \pm 3.1	6.2 \pm 6.1**	>100

RAW264.7 cells were seeded into a 96-well microplate at 2.0×10^5 cells/100 μL /well. Nitrite concentration was measured from the supernatant by the Griess reaction 18 h after incubation with LPS (final concentration of LPS, 5 $\mu\text{g/mL}$). Cytotoxicity was evaluated by the MTT colorimetric assay. Test samples were considered to have cytotoxic effects if the OD of the sample-treated group was decreased to below 80% of that in the vehicle-treated group.

Each value represents the mean \pm SEM ($n=4$).

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

^aCytotoxic effect was observed.

[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部改変して引用]

LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対する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抑制作用

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酢酸エチル可溶性画分から単離した既知セスキテルペンラクトン **1-7** について同様に NO 産生抑制作用を検討した (Figure 7, Table 2). また, cynaropicrin (**1**) を含む多くのセスキテルペンラクトン類は細胞毒性作用を示すことが知られており^{1,53}, 細胞毒性作用についても検討を行った (Table 3). なお, 比較対照物質として, caffeic acid phenethyl ester (CAPE)⁵⁴, parthenolide および α -methylene- γ -butyrolactone (Figure 8) を用いた.

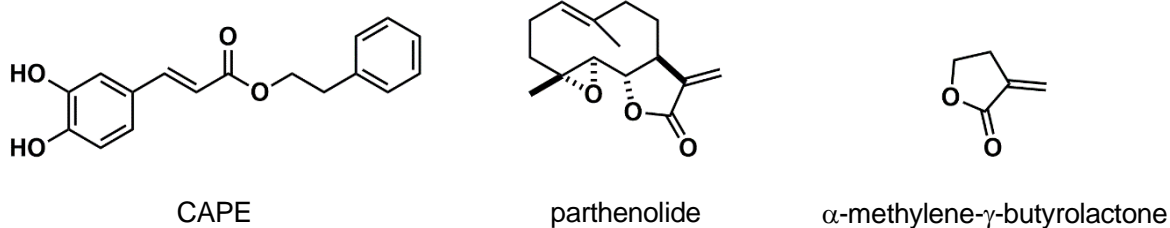


Figure 8. Chemical structures of reference compounds and α -methylene- γ -butyrolactone.

Table 2. Effects of constituents 1–7 of artichoke leaves and reference compounds on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

	Conc. (μM)	Inhibition (%)							IC ₅₀ (μM)
		0	0.3	0.6	1	3	6	10	
cynaropicrin (1)	0.0± 0.7	7.8± 3.2	10.5± 2.6**	45.0± 3.2**	81.6± 1.0**, a	—	96.7± 0.2**, a	—	1.2
grosheimin (2)	0.0± 0.7	—	—	19.2± 2.3*	36.8± 1.8**	71.0± 5.6**	88.1± 1.5**	95.9± 0.6**, a	3.5
11 β ,13-dihydrocynaropicrin (3)	0.0± 3.5	—	—	6.1± 6.2	20.9± 2.0**	35.2± 2.5**	56.0± 3.5**	101.5± 1.7**	8.7
4	0.0± 3.5	—	—	0.0± 5.6	12.1± 3.4	23.8± 2.6**	48.5± 6.8**	94.8± 3.7**, a	10.5
5	0.0± 1.3	—	—	12.3± 2.9**	60.5± 1.1**	91.9± 1.9**	100.8± 0.9**, a	100.5± 0.5**, a	2.4
deacylcynaropicrin (6)	0.0± 1.3	—	—	21.4± 3.2**	10.5± 4.3	30.1± 4.5**	46.7± 1.3**	71.2± 6.8**	17.7
isoamberboin (7)	0.0± 2.3	—	—	—	0.3± 3.7	—	4.3± 4.6	9.0± 4.1	>30
8	0.0± 14.2	—	—	-2.4± 9.7	7.6± 21.8	-3.3± 12.7	16.1± 12.5	40.3± 10.0	>30
CAPE	0.0± 3.3	—	—	-3.8± 2.6	19.6± 6.1**	76.4± 2.1**, a	93.7± 1.5**, a	100.1± 1.9**, a	4.4
parthenolide	0.0± 1.5	8.2± 4.1	—	47.8± 7.8	87.4± 3.0**	102.1± 2.1**, a	100.9± 1.6**, a	—	1.1
α -methylene- γ -butyrolactone	0.0± 4.6	—	—	9.3± 2.8	24.2± 4.0**	41.6± 4.9**	55.7± 2.7**	82.7± 1.9**	8.2

RAW264.7 cells were seeded into a 96-well microplate at 2.0×10^5 cells/100 μL /well. Nitrite concentration was measured from the supernatant by the Griess reaction 18 h after incubation with LPS (final concentration of LPS, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity was evaluated by the MTT colorimetric assay. Test compounds were considered to have cytotoxic effects if the OD of the sample-treated group was decreased to below 80% of that in the vehicle-treated group.

Each value represents the mean \pm SEM ($n=4$).

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

^aCytotoxic effect was observed.

[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部改変して引用]

Table 3. Effects of the constituents (1–6) of artichoke leaves and reference compounds on cell viability in RAW264.7 cells.

	Conc. (μM)	Cell viability (%)							IC ₅₀ (μM)
		0	0.3	0.6	1	3	6	10	
cynaropicrin (1)	100.0 \pm 5.3	101.8 \pm 6.5	101.1 \pm 2.9	103.9 \pm 8.7	73.5 \pm 6.2*	-	32.0 \pm 3.2**	-	5.8
grosheimin (2)	100.0 \pm 6.2	-	-	106.9 \pm 1.3	98.3 \pm 3.9	100.9 \pm 8.1	98.6 \pm 5.6	29.4 \pm 1.7**	15.3
11 β ,13-dihydrocynaropicrin (3)	100.0 \pm 1.6	-	-	109.0 \pm 5.7	114.7 \pm 5.5	112.8 \pm 3.0	128.2 \pm 13.0*	110.4 \pm 4.5	>30
4	100.0 \pm 1.6	-	-	118.0 \pm 9.3	140.8 \pm 11.8**	117.6 \pm 5.6	131.8 \pm 8.5*	74.7 \pm 3.0	>30
5	100.0 \pm 6.6	-	-	101.5 \pm 8.3	99.0 \pm 8.1	80.9 \pm 6.0	40.1 \pm 1.0**	10.0 \pm 0.5**	8.9
deacylcynaropicrin (6)	100.0 \pm 6.6	-	-	120.0 \pm 2.8	117.4 \pm 7.7	108.4 \pm 8.2	99.6 \pm 8.9	92.7 \pm 3.5	>30
8	100.0 \pm 9.3	-	-	-	106.2 \pm 8.1	106.7 \pm 9.0	107.2 \pm 5.9	103.7 \pm 15.0	>30
CAPE	100.0 \pm 6.0	-	-	104.7 \pm 5.4	97.3 \pm 6.5	67.7 \pm 1.8**	49.1 \pm 1.4**	51.3 \pm 2.7**	9.8
parthenolide	100.0 \pm 6.0	111.6 \pm 1.9	-	118.6 \pm 9.4	95.5 \pm 2.6	48.0 \pm 7.0**	28.9 \pm 4.2**	-	5.8
α -methylene- γ -butyrolactone	100.0 \pm 7.8	-	-	96.2 \pm 2.8	96.2 \pm 2.8	98.8 \pm 7.9	114.5 \pm 8.1	89.6 \pm 3.7	>30

RAW264.7 cells were seeded into a 96-well microplate at 5.0×10^4 cells/100 μL /well and were incubated with the test compounds for 18 h. Cytotoxicity was evaluated by the MTT colorimetric assay.

Each value represents the mean \pm SEM ($n=4$).

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Table S1 より一部改変して引用]

その結果, α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有する cynaropicrin (1), grosheimin (2), 4, 5 および deacylcynaropicrin (6) は濃度依存的にNO産生を抑制した. また, その中でも α -methylene- γ -butyrolactone 構造に加えて8位に α , β -不飽和カルボニル構造を有する 1 (IC_{50} =1.2 μ M) および 5 (IC_{50} =2.4 μ M) は特に強力なNO産生抑制作用を示した. また, α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有さず, 8位に α , β -不飽和カルボニル構造を有するアシル基のみを有する 11 β ,13-dihydrocynaropicrin (3) も中程度の抑制作用を示した (IC_{50} =8.7 μ M). これまでのセスキテルペンラクトン類の同様の研究報告から, α -methylene- γ -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 α -methylene- γ -butyrolactone の IC_{50} 値は8.2 μ M であり, 8位の α , β -不飽和カルボニル構造を有するアシル基も同様に重要であることが示唆された.

そこで, 8位のアシル基の影響を検討するため, α , β -不飽和カルボニル構造を有する 2-hydroxyethyl acrylate および 2-hydroxyethyl methacrylate について同様にNO産生抑制作用を検討した (Figure 9, Table 4). その結果, 2-hydroxyethyl acrylate はNO産生抑制作用を示したが, 2-hydroxyethyl methacrylate はNO産生抑制作用を示さなかった.



Figure 9. Chemical structures of reference compounds.

Table 4. Effects of 2-hydroxyethyl acrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conc. (μ M)	Inhibition (%)						IC_{50} (μ M)
	0	3	10	30	100	300	
2-hydroxyethyl acrylate	0.0 \pm 2.1	4.5 \pm 4.8	3.8 \pm 1.1	17.9 \pm 4.6*	56.6 \pm 5.3**	100.3 \pm 1.3**	85.3
2-hydroxyethyl methacrylate	0.0 \pm 7.6	—	7.8 \pm 5.4	5.8 \pm 2.7	14.1 \pm 4.7	-0.1 \pm 19.8	>300

Each value represents the mean \pm SEM ($n=4$).

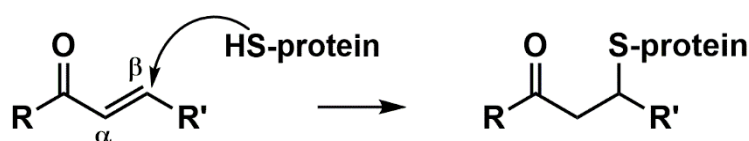
Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部改変して引用]

考察

セスキテルペンラクトン類の抗炎症作用、構造活性相関を解析するため、アーティチョーク葉部について成分単離を行い、酢酸エチル可溶性画分から単離した7種の既知セスキテルペンラクトンの LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生抑制作用を検討した。その結果、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有する cynaropicrin (1), grosheimin (2), 4, 5 および deacylcynaropicrin (6) は全て NO 産生抑制作用を示したことから、これまでのセスキテルペンラクトン類の報告と一致して、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造が活性発現に重要な構造であることが示された。さらに、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有さず、8 位に α , β -不飽和カルボニル構造を含むアシル基のみを有する 11 β ,13-dihydrocynaropicrin (3) も中程度の抑制効果を示した。化合物 3 の NO 産生抑制作用は、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有する化合物 4 や比較対照物質として用いた α -methylene- γ -butyrolactone と同程度の抑制を示したことから、8 位の α , β -不飽和カルボニル構造を有するアシル基も活性の発現において同様に重要であることが示唆された。また、5 は 1 の 4' 位の水酸基がメトキシ基に置換された化合物であるが、1 と 5 は同様に強力な NO 産生抑制作用を示したことから、4' 位の水酸基は活性の増強に影響しないことが示唆された。

また、 α , β -不飽和カルボニル構造の活性への影響を検討するため、2-hydroxyethyl acrylate および 2-hydroxyethyl methacrylate について同様に NO 産生抑制作用を検討したところ、2-hydroxyethyl acrylate は NO 産生抑制作用を示したが、2-hydroxyethyl methacrylate は NO 産生抑制作用を示さなかった。この結果は村上ら⁵⁵の報告と一致した。村上らは、RAW264.7 細胞において α , β -不飽和カルボニル構造を有する化合物の LPS 刺激による *Cox2*, *Nos2*, および *Tnfa* mRNA 発現に対する影響を検討し、2-hydroxyethyl acrylate は mRNA 発現を抑制したが、2-hydroxyethyl methacrylate は mRNA 発現を抑制しなかったことを示している。また、2-hydroxyethyl acrylate および 2-hydroxyethyl methacrylate の log P 値は大きく差がないが、RAW264.7 細胞における細胞毒性は前者が高い。2-hydroxyethyl acrylate および 2-hydroxyethyl methacrylate の β 炭素の¹³C NMR 値を比較すると、前者の方が δ_{CP} 値が大きいことから、両者の細胞毒性の差はマイケルアクセプターとしての反応性を示す β 炭素の求電子性の差に関連すると述べている。



Scheme 1. Michael addition of α , β -unsaturated carbonyl compounds and nucleophilic agent.

α , β -不飽和カルボニル構造はマイケルアクセプターとして機能するため、タンパク質のチオール基など生体内の様々な求核種と非特異的に共有結合することにより細胞傷害など望ましくない効果の発現に関連する可能性が指摘されてきた⁵⁶ (Scheme 1). 一方、セスキテルペンラクトン類の活性の発現において α -methylene- γ -butyrolactone 構造が最も重要であるように、 α , β -不飽和カルボニル構造は多様な薬理的活性にも関与している. ラジカル捕捉剤や抗酸化剤としての機能や、標的タンパク質へ共有結合することにより有益な効果をもたらす可能性もあることから、近年、マイケルアクセプターとして機能する構造を有する天然由来化合物は有益性が再評価されている^{57,58}. 代表例として、ウコン (*Curcuma longa*) に含有される curcumin^{59,60} やハナショウガ (*Zingiber zerumbet*) に含有される zerumbone^{61,62} (Figure 10) はともに抗腫瘍作用、抗炎症作用を有し、低分子医薬品リード化合物として構造活性相関や標的分子に関する研究が数多くなされている.

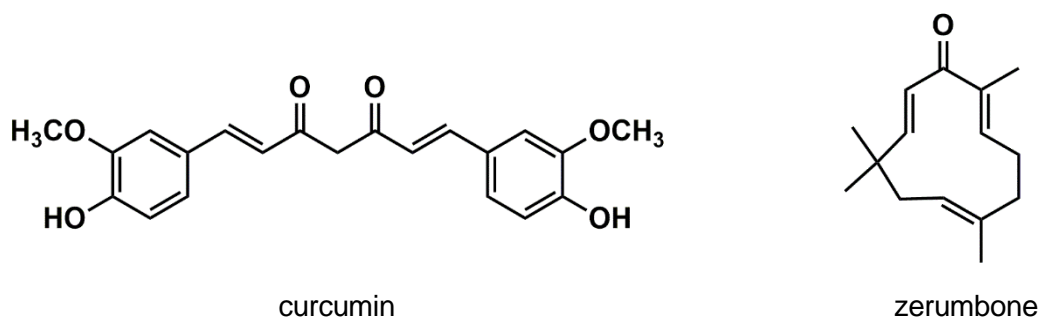


Figure 10. Chemical structures of curcumin and zerumbone.

本研究の結果からは、 α , β -不飽和カルボニル構造を有する化合物が全て活性および毒性を示すのではなく、周辺構造の影響を大きく受け、特に β 炭素の置換基が活性に影響することが示されたが、毒性の減弱および活性の増強を目的とした 8 位のアシル基の置換基の構造については更なる比較検討が必要である.

第二節 アーティチョーク葉部含有成分の作用様式

第一項 iNOS 誘導抑制作用

アーティチョーク葉部含有セスキテルペンラクトンのうち、NO 産生抑制作用を示した **1-6** について LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの iNOS 誘導抑制作用を検討した。

LPS 刺激 18 時間後の RAW264.7 細胞の細胞質画分における iNOS タンパク質を SDS-PAGE およびウエスタンブロット法により検出した結果、**1-3** は濃度依存的に iNOS 誘導を抑制し (Figure 11), **4-6** も同様の傾向を示した。また、比較対照物質として用いた CAPE も濃度依存的に iNOS 誘導を抑制した (Figure 12)。

考察

iNOS 産生抑制作用を示した化合物のうち、cynaropicrin (**1**) は、1 μM 以上の濃度で iNOS 誘導に対して有意な抑制効果を示し、濃度依存的に iNOS 誘導を抑制した。また、**1** の NO 産生抑制における IC_{50} 値は 1.2 μM であった (Table 2)。同様に、grosheimin (**2**) は iNOS 誘導に対して 3 μM 投与群では有意ではないが 30%程度の抑制を示し、10 μM 投与群で有意な抑制効果を示した。NO 産生抑制における IC_{50} 値は 3.5 μM であった。11 β ,13-Dihydrocynaropicrin (**3**) は 3 μM 以上の濃度で iNOS 誘導に対して有意な抑制効果を示し、NO 産生抑制における IC_{50} 値は 8.7 μM であった。また、**1** は第一節において細胞毒性試験を行った際、10 μM 投与群において細胞毒性を示したが (Table 3)、細胞毒性試験の条件とウエスタンブロッティングの際の培養条件が異なっており、ウエスタンブロッティングに用いるタンパク質抽出および定量を行った際、10 μM 投与群のタンパク濃度が 0 μM , 1 μM , 3 μM 投与群と同程度であったため、ウエスタンブロッティングの際の培養条件では毒性は強く出ていなかったと考えられる。化合物 **2** は 10 μM 投与群では細胞毒性を示さず、**3** は 10 μM 投与群および 30 μM 投与群で細胞毒性を示さなかった。

以上のことから、**1-3** の NO 産生抑制作用は iNOS 誘導抑制作用によることが示唆された。

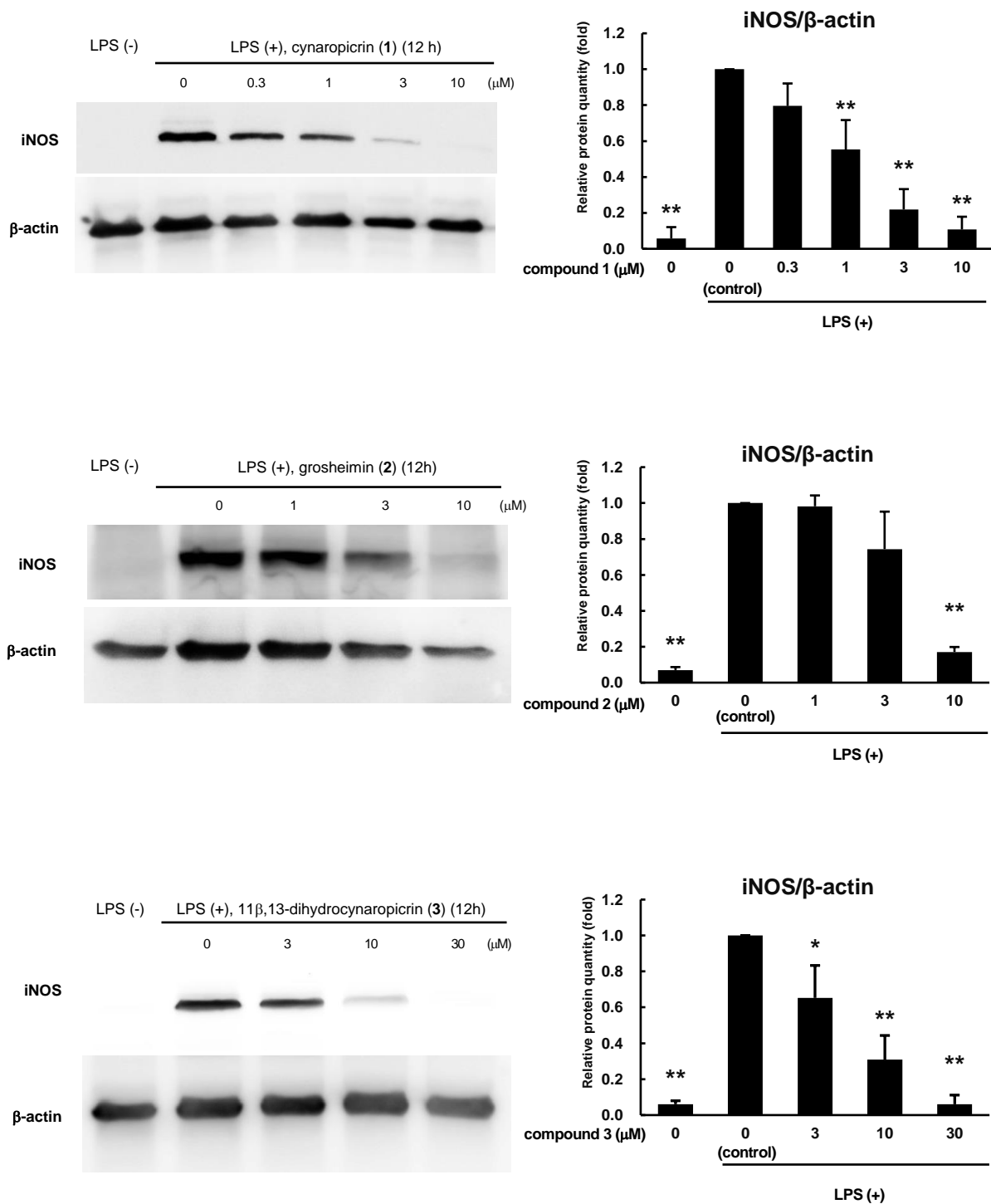


Figure 11. Effects of 1–3 on iNOS induction in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 12 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 μg/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β-Actin was used as internal control. Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 2 より一部改変して引用]

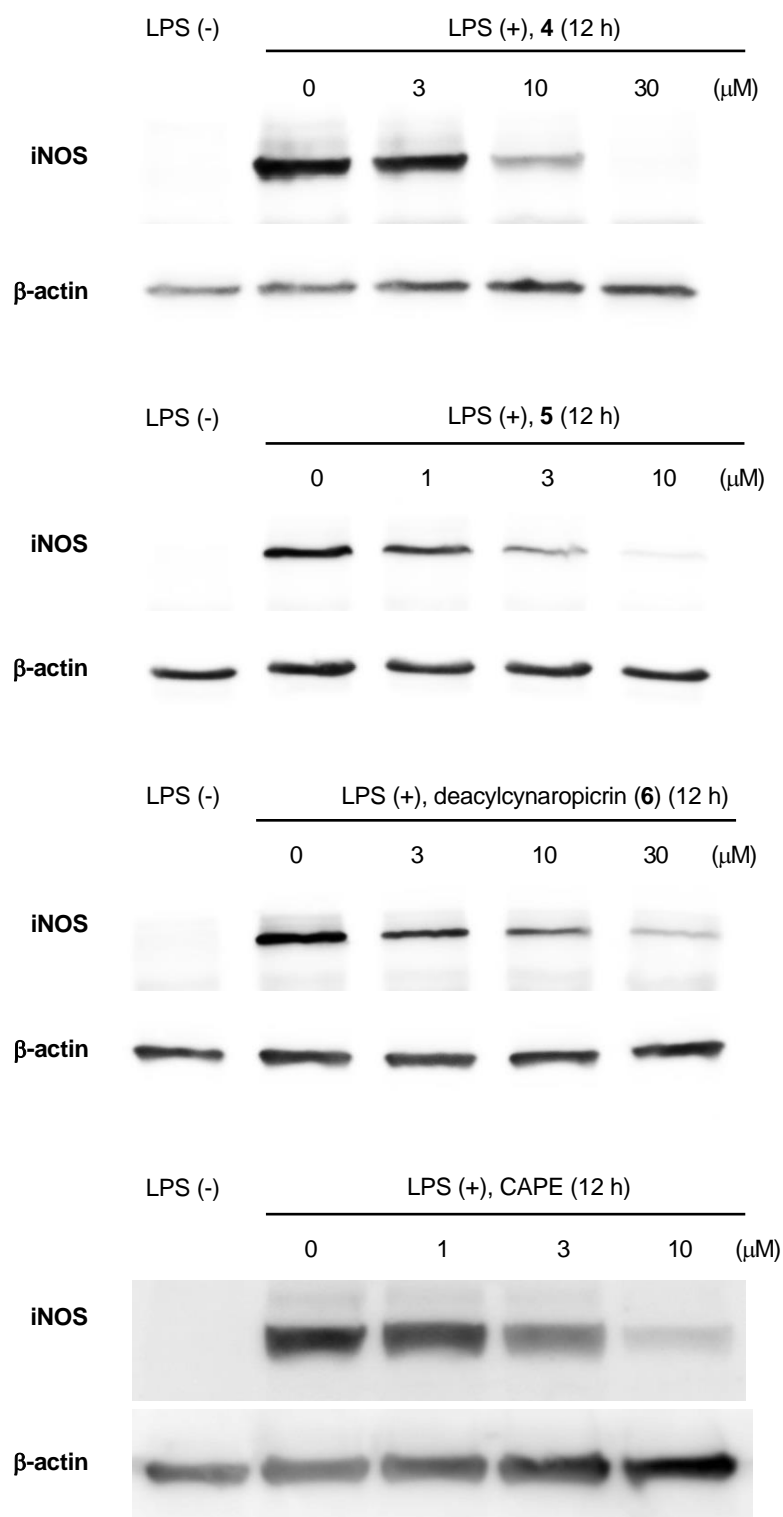


Figure 12. Effects of **4–6** and positive control (CAPE) on iNOS induction in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 12 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S2 より一部改変して引用]

第二項 MAPK カスケードに対する作用

iNOS 誘導作用を示した化合物のうち、1-4 について iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路である MAPK カスケード (Figure 13) に関わるタンパク質のリン酸化への影響を検討した。LPS 刺激 30 分後の RAW264.7 細胞の細胞質画分の ERK, JNK および p38 MAPK タンパク質を SDS-PAGE およびウエスタンブロット法により検出した結果、1-3 はいずれもこれらの MAPK 群のリン酸化を有意に抑制しなかった (Figure 14-16)。また、4 も同様の傾向を示した (Figure 17)。

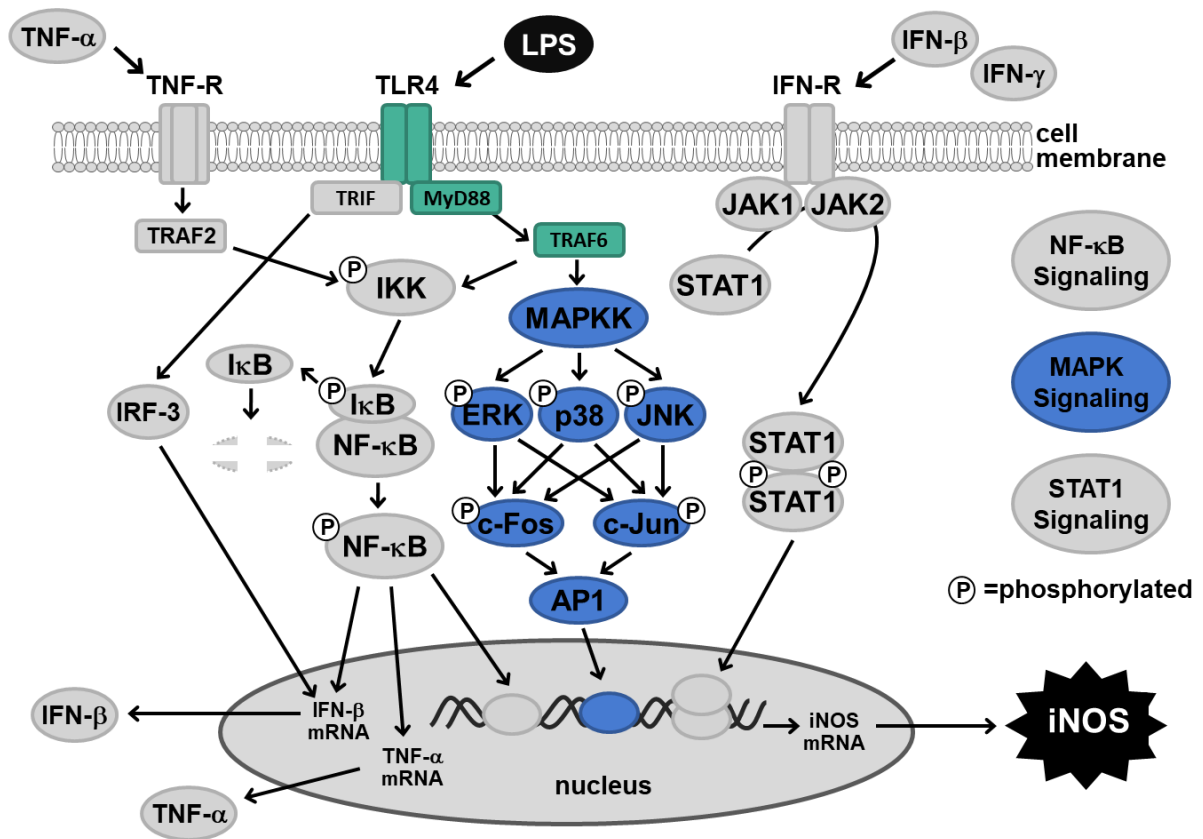


Figure 13. MAPK Signaling pathway in macrophages.

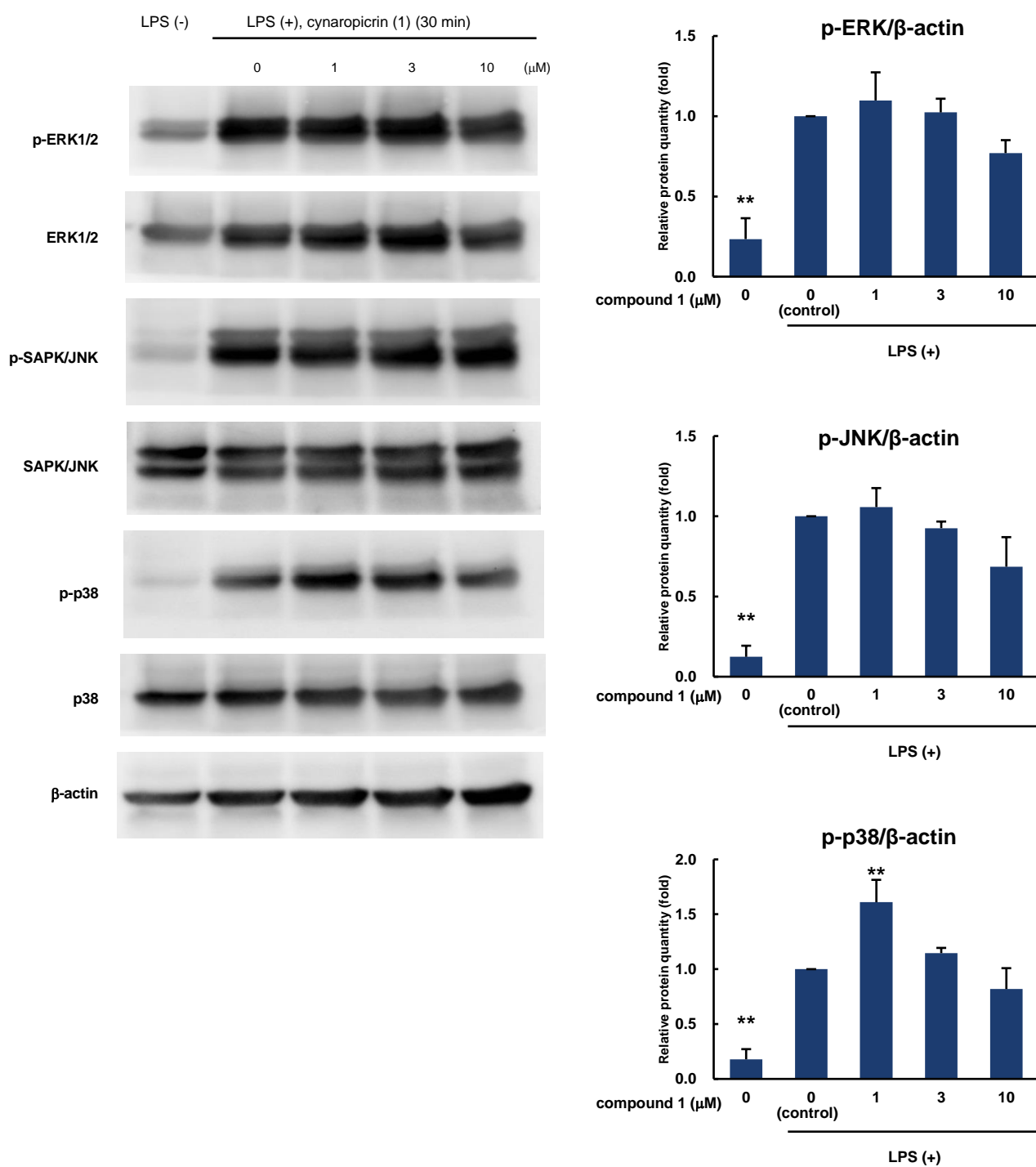


Figure 14. Effects of cynaropicrin (1) on MAPK signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control. Each bar represents the mean with SEM ($n = 3$). Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 3 より一部改変して引用]

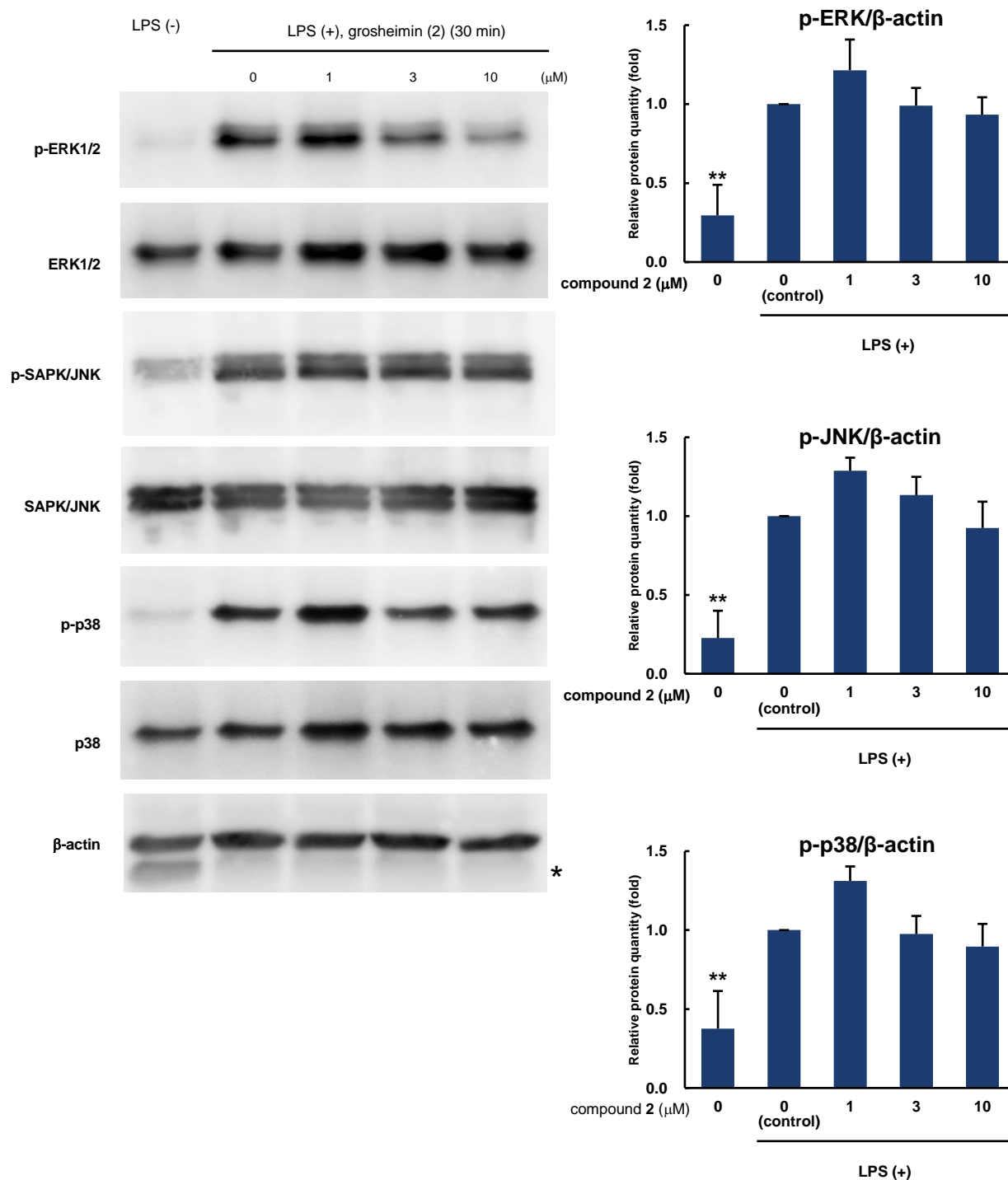


Figure 15. Effects of grosheimin (**2**) on MAPK signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control. An asterisk indicates non-specific bands. Each bar represents the mean with SEM ($n = 3$). Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 3 より一部改変して引用]

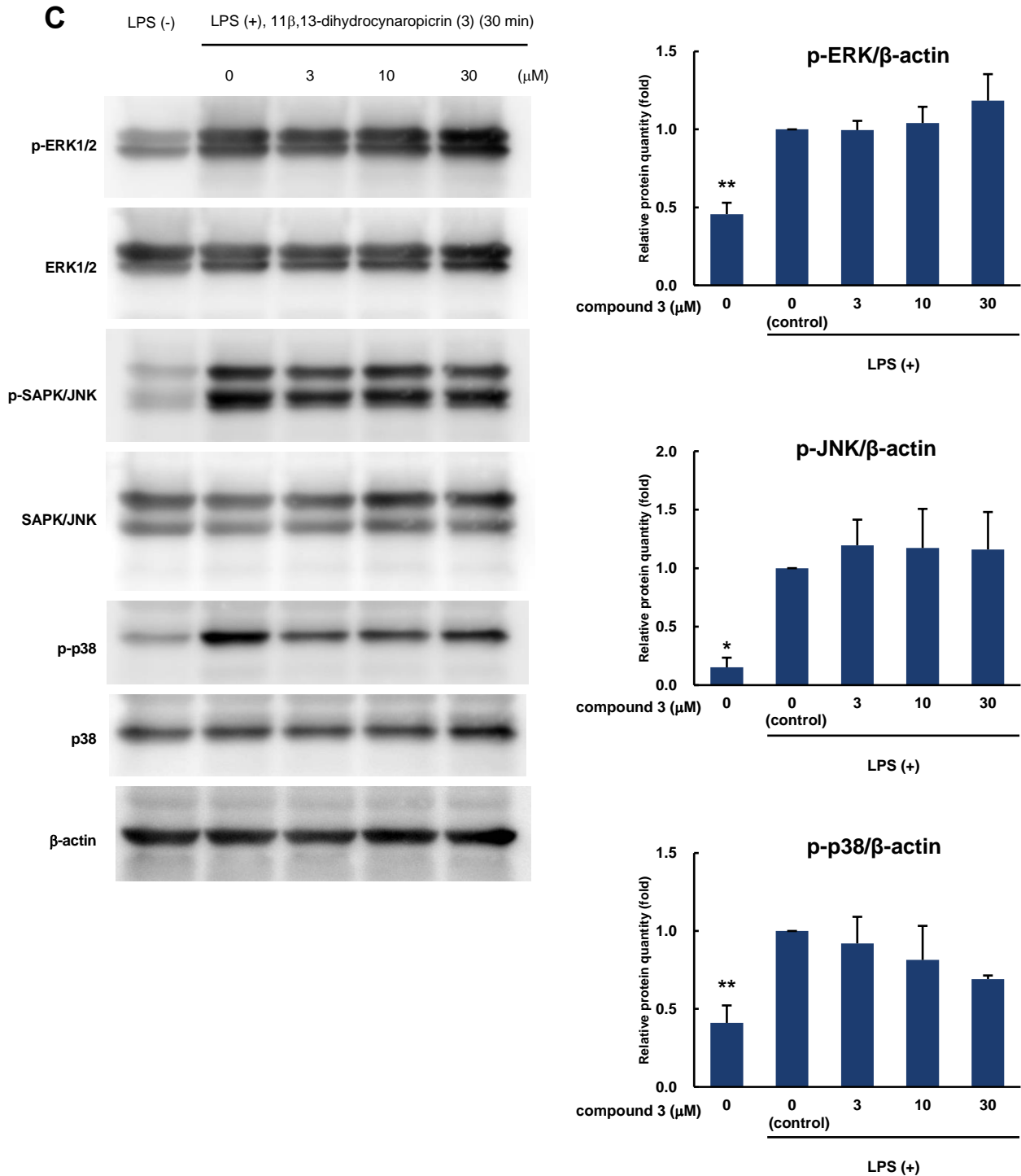


Figure 16. Effects of 11 β ,13-dihydrocynaropicrin (**3**) on MAPK signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control. Each bar represents the mean with SEM ($n = 3$).

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 3 より一部改変して引用]

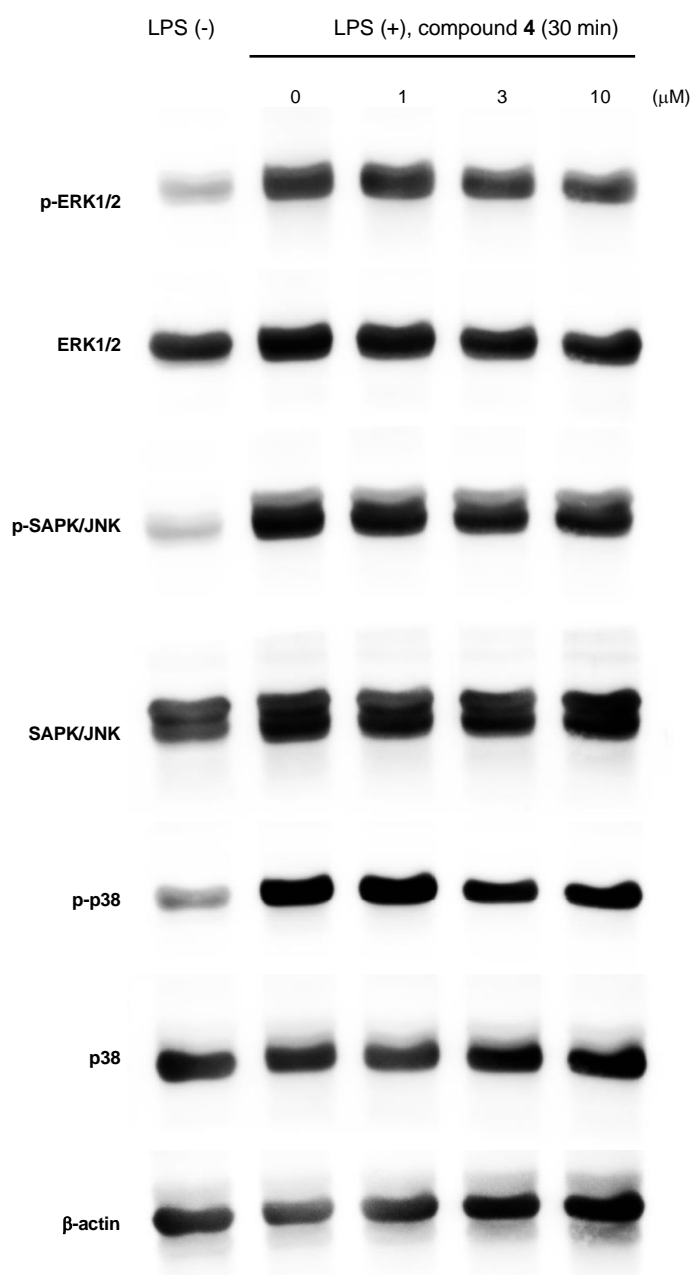


Figure 17. Effects of **4** on MAPK signaling pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S3 より一部改変して引用]

考察

iNOS 誘導作用を示した **1-4** について MAPK カスケードに関わるタンパク質のリン酸化への影響を検討した。ERK に関しては **1** の 10 μ M 処理群において減少傾向を示しているが、著者が所属する研究室の以前の報告において、MAPK-ERK キナーゼ 1 (MEK1) および MEK2 阻害剤である PD98059 は、LPS 刺激による NO 産生に対する抑制効果がほとんど見られない一方、JNK 阻害剤である SP600125 および p38 MAPK 阻害剤である SB202190 は NO 産生を有意に抑制したことを報告しており^{63,64}、ERK の阻害は **1** および **2** による iNOS 誘導抑制作用への寄与は少ないことが示唆された。また **1-4** は、p38 MAPK および JNK のリン酸化に対していずれも抑制作用を示さなかった。従って、MAPK カスケードは **1-4** の iNOS 産生抑制に関わる主要な作用点ではないと考えられる。

第三項 NF-κB シグナル伝達経路に対する作用

iNOS 産生抑制作用を示したアーティチョーク葉部含有セスキテルペンラクトンのうち, **1-4** についてNF-κB シグナル伝達経路 (Figure 18) に対する作用を検討した.

LPS 刺激 30 分後の RAW264.7 細胞の細胞質画分の IκB タンパク質を SDS-PAGE およびウエスタンブロット法により検出した. その結果, **1-3** はいずれも IκB タンパク質の分解を抑制しなかった (Figure 19).

また, LPS 刺激 30 分後の RAW264.7 細胞の核画分の NF-κB タンパク質の p65 サブユニットを SDS-PAGE およびウエスタンブロット法により検出した. その結果, **1-3** はいずれも NF-κB p65 サブユニットの核内発現レベルを有意に抑制したが (Figure 20), 細胞質の NF-κB p65 サブユニットの発現レベルには影響しなかった (Figure 21). また, **4** も同様の傾向を示した (Figure 22).

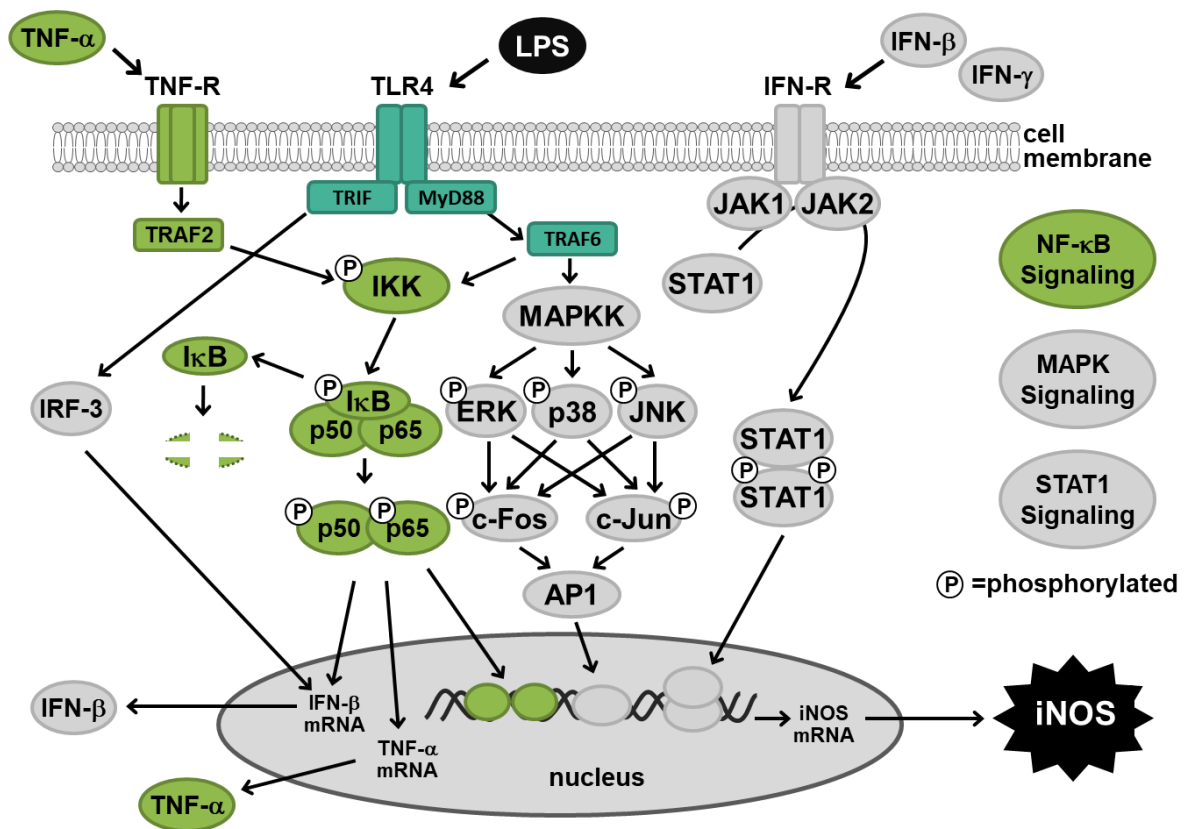


Figure 18. NF-κB Signaling pathway in macrophages.

NF- κ B p65 サブユニットの核内発現レベルの抑制が観察されたため、最も強い活性を示した **1** について NF- κ B により転写が促進される TNF- α 産生に対する影響を検討した。LPS 刺激 1 時間後および 3 時間後の RAW264.7 細胞における TNF- α 産生に対する影響を検討したところ、1 μ M および 3 μ M 処理群で有意に TNF- α 産生を抑制した。比較対照物質として用いた CAPE は、刺激 1 時間後において 3 μ M および 6 μ M 処理群で有意に TNF- α 産生を抑制した (Figure 23)。また、**1** について NF- κ B により転写が促進される COX-2 により合成される PGE₂ 産生に対する影響を検討したところ、1 μ M および 3 μ M 処理群で有意に PGE₂ 産生を抑制した。比較対照物質として用いた CAPE は、3 μ M および 6 μ M 処理群で有意に PGE₂ 産生を抑制した (Figure 24)。

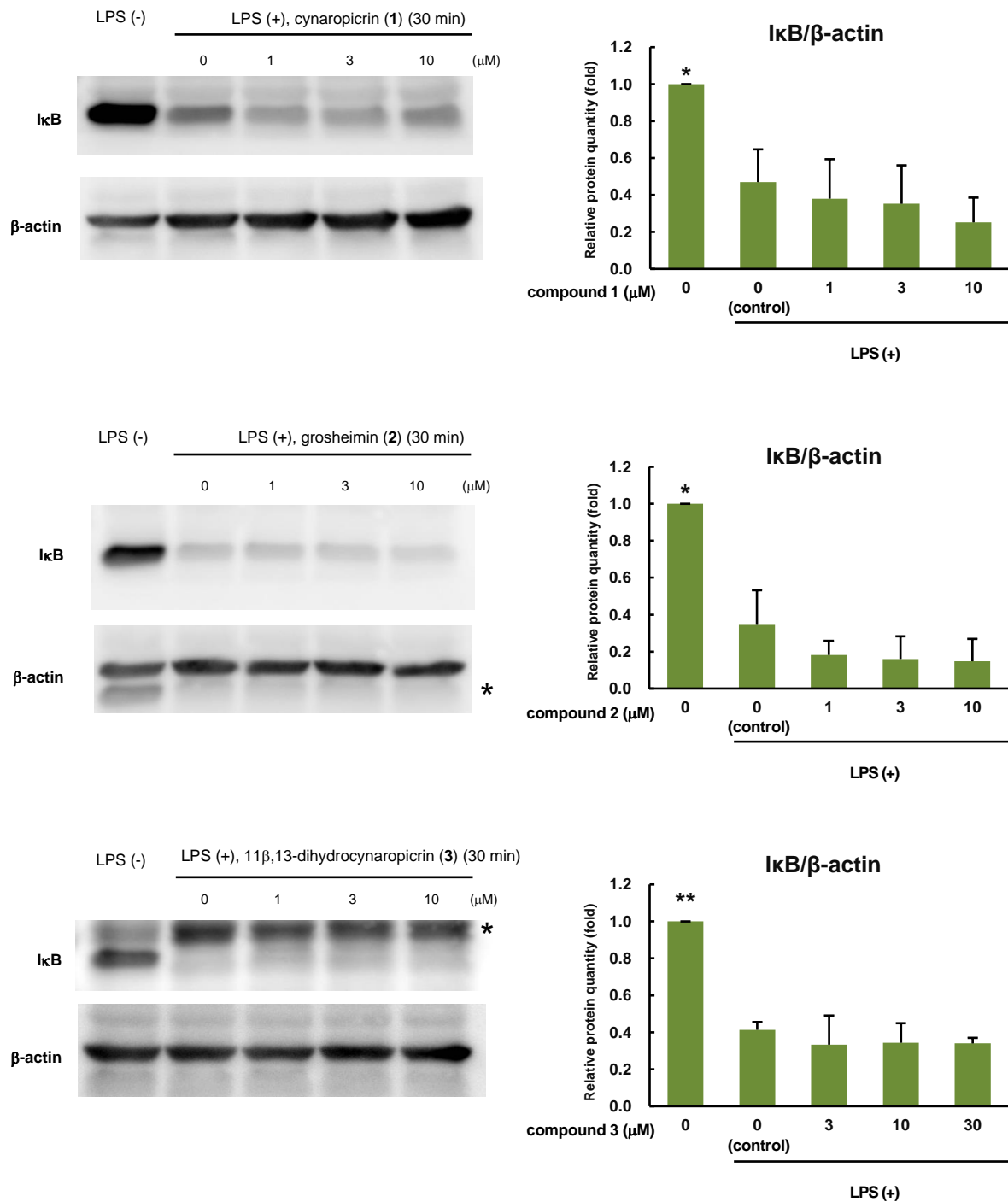


Figure 19. Effects of 1–3 on IκB degradation in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 μg/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β-Actin was used as internal control. Asterisks indicate non-specific bands. Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 3 より一部改変して引用]

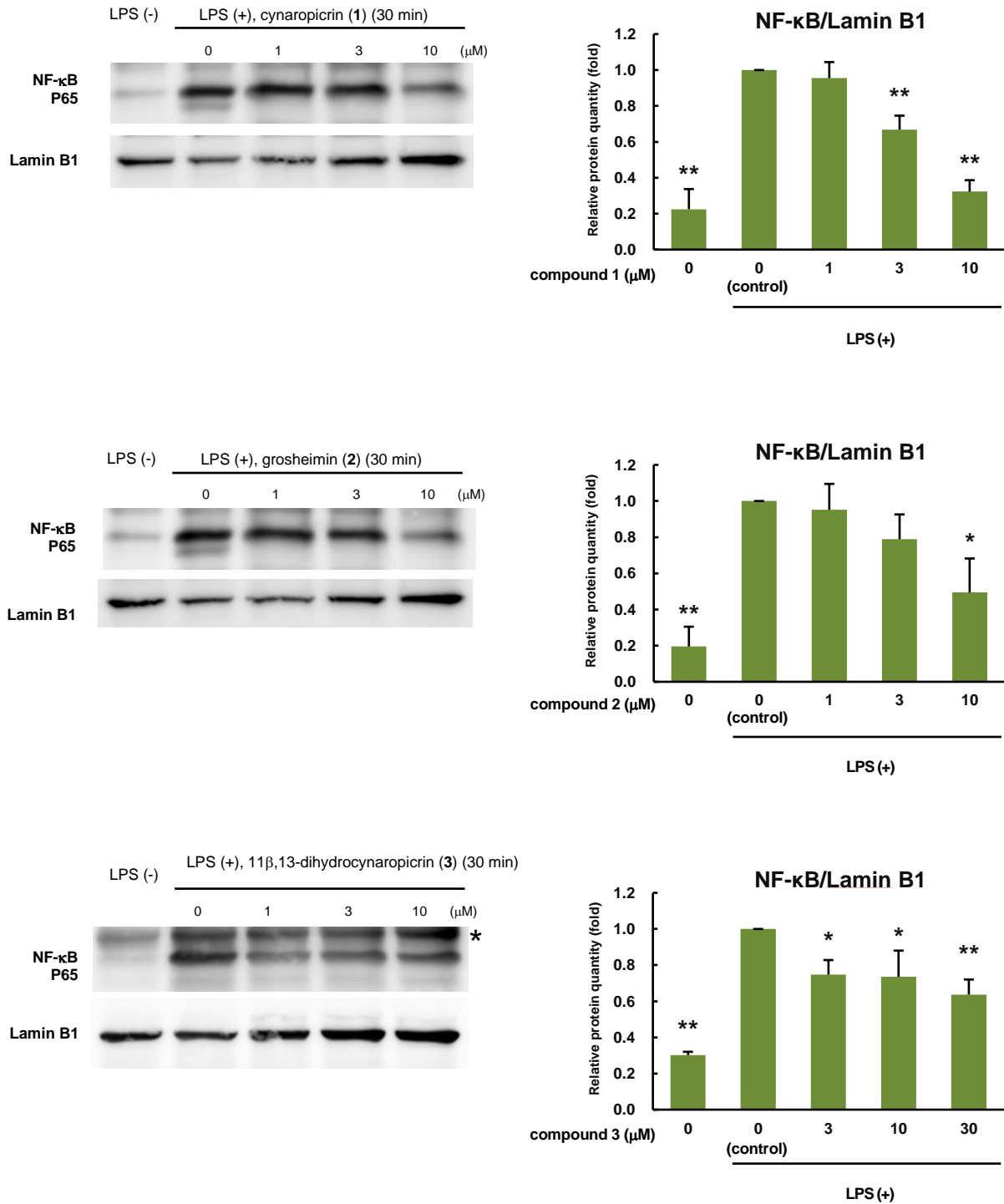


Figure 20. Effects of 1–3 on nuclear translocation of NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Nuclear fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 μg/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. Lamin B1 was used as internal control. An asterisk indicates non-specific bands. Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 4 より一部改変して引用]

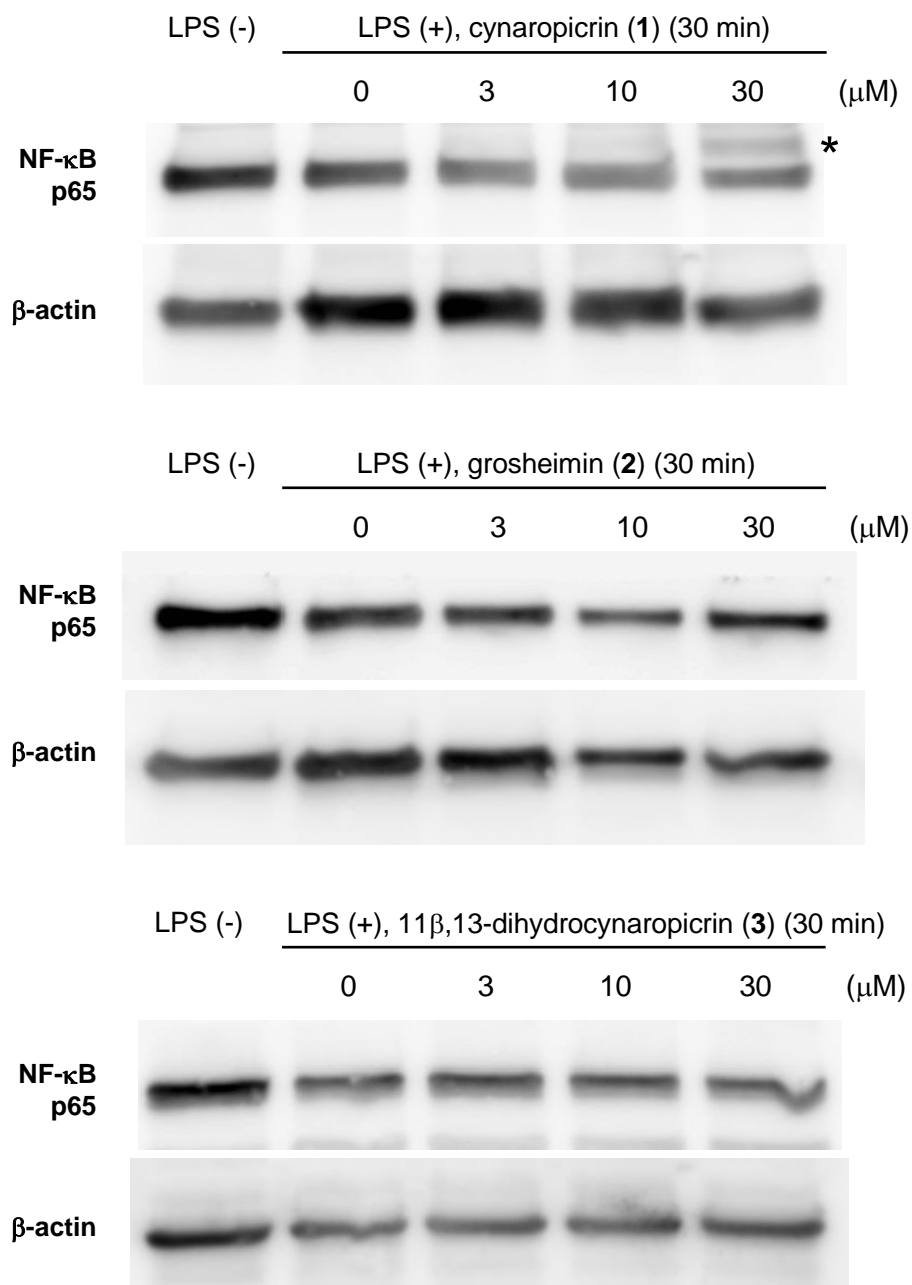


Figure 21. Effects of 1–3 on cytoplasmic NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of $5 \mu\text{g/mL}$ and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control. An asterisk indicates non-specific band.

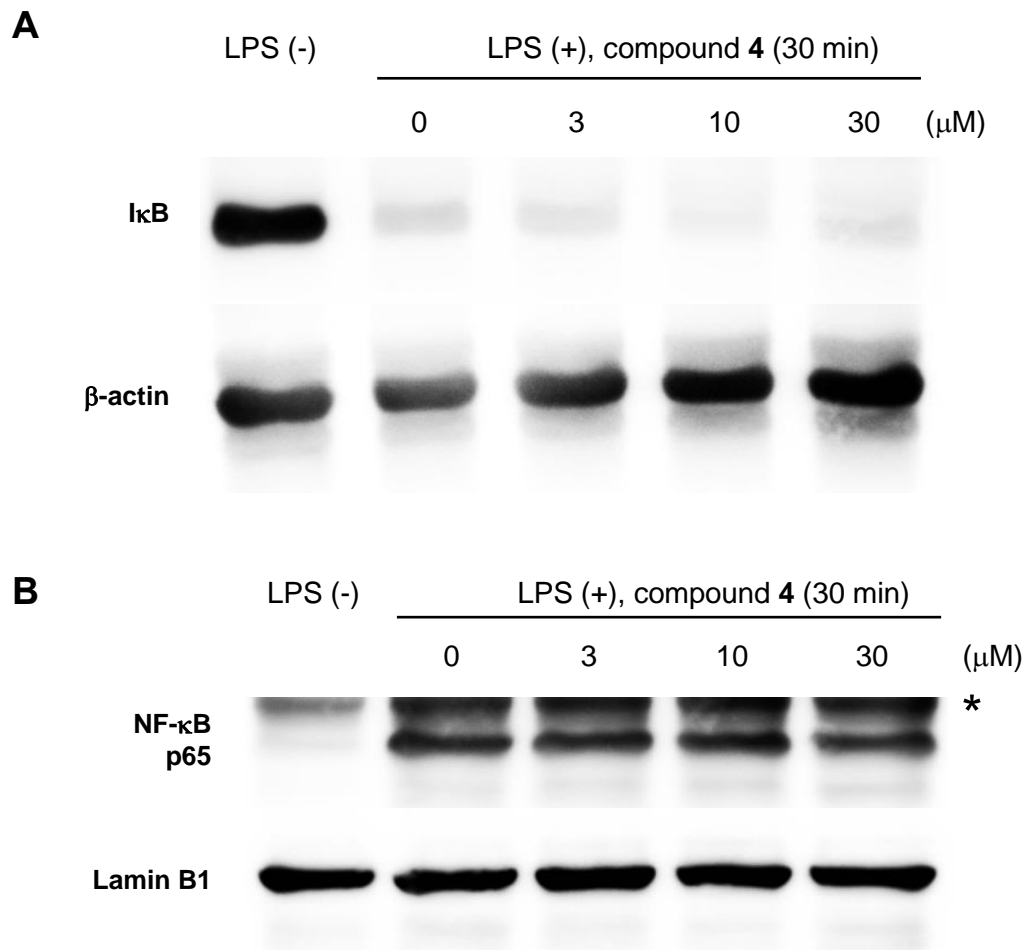


Figure 22. Effects of 4 on IκB degradation and nuclear translocation of NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate.

(A) Cytosolic fractions were extracted 30 min after incubation with LPS and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β-Actin was used as internal control. (B) Nuclear fractions were extracted 30 min after incubation with LPS at a final concentration of 5 μg/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. Lamin B1 was used as internal control. An asterisk indicates non-specific bands.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S3 より一部改変して引用]

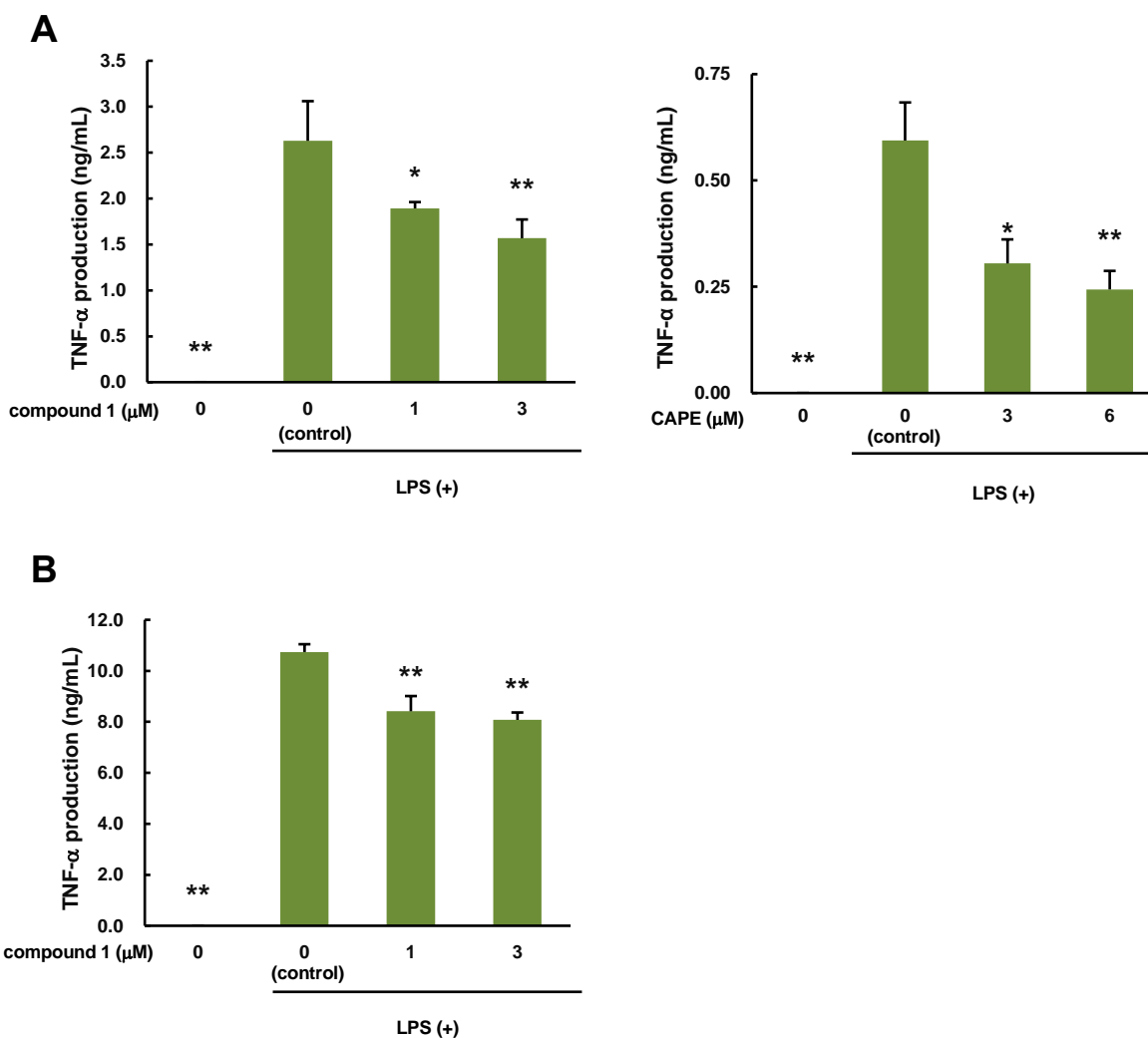


Figure 23. Effects of cynaropicrin (**1**) and CAPE on TNF- α production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were seeded into a 48-well microplate at 4.0×10^5 cells/200 μ L/well. TNF- α levels in culture media after stimulation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL for 1 h (A) and 3 h (B) were measured by Mouse TNF- α ELISA KIT (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation, Gunma, Japan) according to the manufacturer's instructions. Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S5 より一部改変して引用]

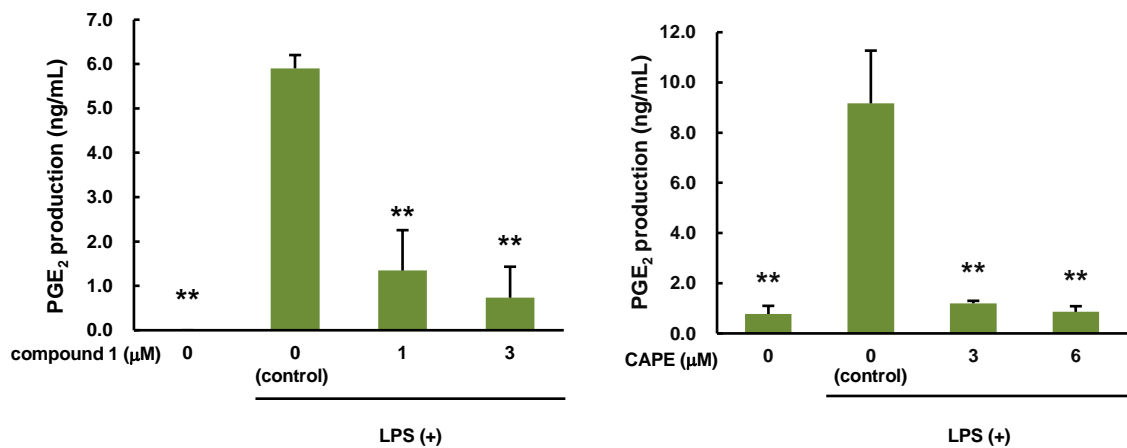


Figure 24. Effects of cynaropicrin (**1**) and CAPE on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were seeded into a 48-well microplate at 4.0×10^5 cells/200 μ L/well. PGE₂ levels in culture media 18 h after stimulation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL were measured by Prostaglandin E₂ Parameter Assay Kit (R&D Systems, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Each bar represents the mean with SEM (n = 3).

Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S7 より一部改変して引用]

考察

iNOS 産生抑制作用を示した化合物 **1-3** について NF- κ B シグナル伝達経路に対する作用を検討したところ、本研究の条件下ではいずれも I κ B タンパク質の分解を抑制しなかった。また、細胞質の NF- κ B p65 サブユニットの発現量には影響しなかったが、NF- κ B タンパク質の p65 サブユニットの核内発現レベルを有意に抑制したことから、I κ B のリン酸化より下流のシグナル伝達を阻害する可能性が示唆された。しかしながら、cynaropicrin (**1**) は *P. gingivalis* 由来の LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) において、I κ B タンパク質の分解を抑制することにより NF- κ B p65 サブユニットのリン酸化を抑制するという報告もある⁶⁵。先述のように、NF- κ B シグナル伝達経路は α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有するセスキテルペンラクトン類の主要な作用点であると考えられている。化合物 **1** と同様に α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有するセスキテルペンラクトンである helenalin は I κ B のリン酸化および NF- κ B の核内移行を抑制せずに NF- κ B の p65 サブユニットを直接アルキル化することが報告されている³。よって **1** も NF- κ B p65 サブユニットに直接結合することで核内発現レベルを抑制する可能性が考えられる。化合物 **1-3** による NF- κ B の抑制メカニズムについてはさらに詳細な検討が必要である。しかしながら、iNOS 誘導抑制に必要な用量と比較し、**1-3** による NF- κ B の核内核内発現レベルの抑制には、より高用量が必要であったことから、**1-3** の iNOS 誘導抑制作用は NF- κ B シグナル伝達経路のみによるものではないことが示唆された。

また、**1-3** について NF- κ B p65 サブユニットの核内発現レベルの抑制が確認されたため、最も強い活性を示した **1** について NF- κ B により転写が促進される TNF- α 産生に対する影響を検討したところ、1 μ M および 3 μ M 処理群で有意に TNF- α 産生を抑制した。**1** の TNF- α 産生に対する抑制作用は NF- κ B p65 サブユニットの核内発現レベルの抑制作用と同程度であった。また、**1** について NF- κ B により転写が促進される COX-2 により合成される PGE₂ 産生に対する影響を検討したところ、1 μ M および 3 μ M 処理群で強力的に PGE₂ 産生を抑制した。これらの結果から、**1** による PGE₂ 産生抑制は、NF- κ B シグナル伝達経路に対する抑制作用による COX-2 の発現抑制のみではなく、直接的な COX-2 酵素活性の阻害など、他のメカニズムが影響することが示唆される。

第四項 JAK-STAT シグナル伝達経路に対する作用

iNOS 産生抑制作用を示したアーティチョーク葉部含有セスキテルペンラクトンのうち、**1-4** について STAT1 シグナル伝達経路 (Figure 25) への影響について明らかにする目的で、STAT1 のリン酸化に対する作用を検討した。LPS 刺激 2 時間後の RAW264.7 細胞の細胞質画分の STAT1 タンパク質を SDS-PAGE およびウエスタンブロット法により検出した結果、**1-3** はいずれも STAT1 タンパク質の Tyr701 リン酸化を有意に抑制した (Figure 26)。また、**4** も同様の傾向を示した (Figure 27)。

さらに、最も強い活性を示した **1** について IFN 産生に対する影響を検討した。LPS 刺激 1 時間後の RAW264.7 細胞における IFN- γ 産生に対する影響を検討したところ、**1** は IFN- γ 産生を抑制しなかった。一方、LPS 刺激 3 時間後の RAW264.7 細胞における IFN- β 産生に対する影響を検討したところ、**1** は 1 μ M および 3 μ M 処理群で有意に IFN- β 産生を抑制した。比較対照物質として用いた CAPE は、3 μ M および 6 μ M 処理群で有意に IFN- β 産生を抑制した (Figure 28)。

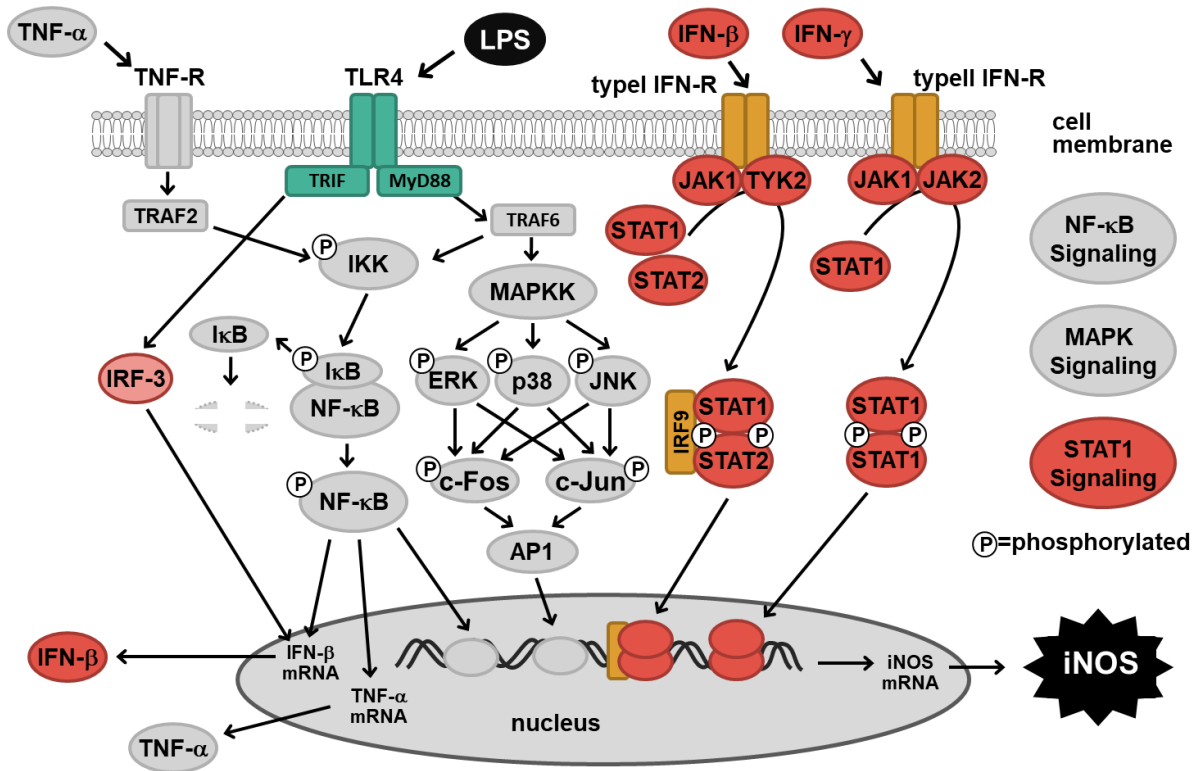


Figure 25. JAK-STAT Signaling pathway in macrophages.

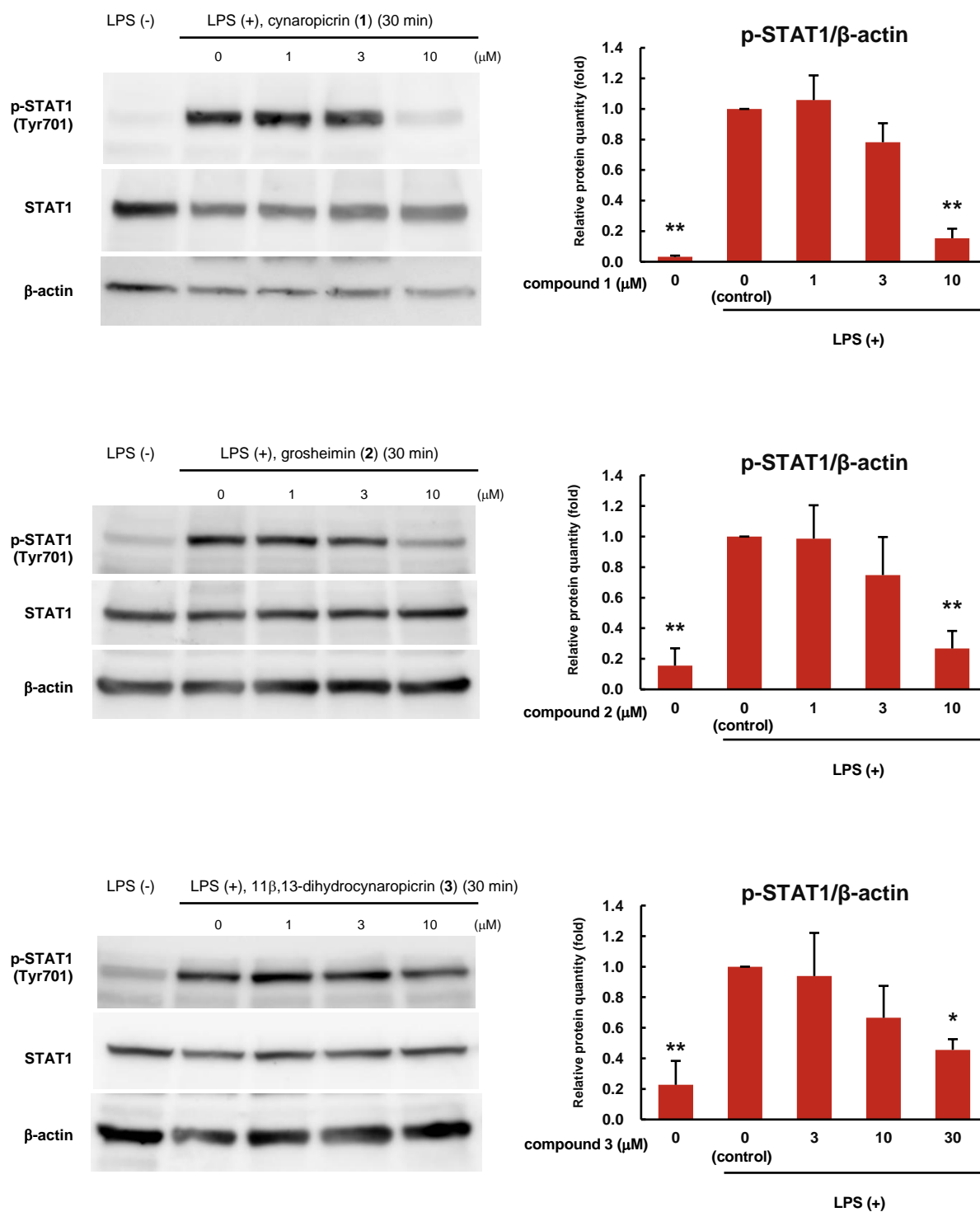


Figure 26. Effects of 1–3 on STAT1 phosphorylation in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 2 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 μg/mL and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β-Actin was used as internal control. Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 5 より一部改変して引用]

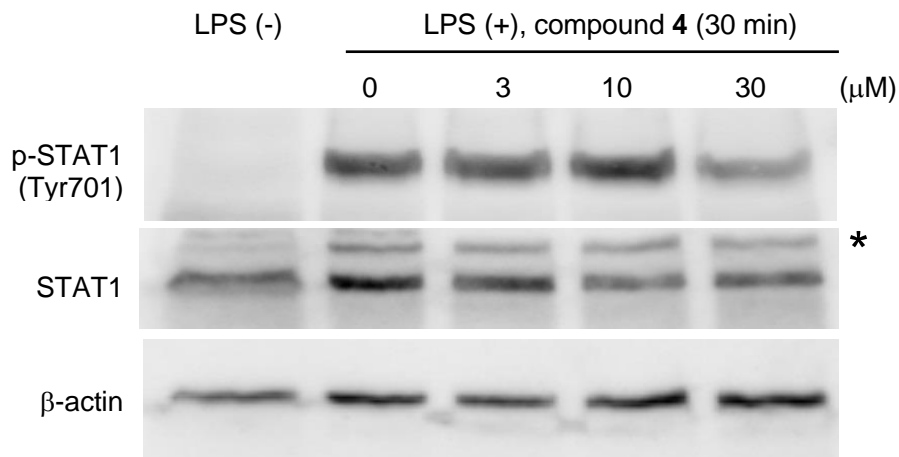


Figure 27. Effects of **4** on STAT1 phosphorylation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5.0×10^6 cells/2 mL/well) were seeded into a 6-well multiplate. Cytosolic fractions were extracted 2 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. β -Actin was used as internal control. An asterisk indicates non-specific bands.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S4 より一部改変して引用]

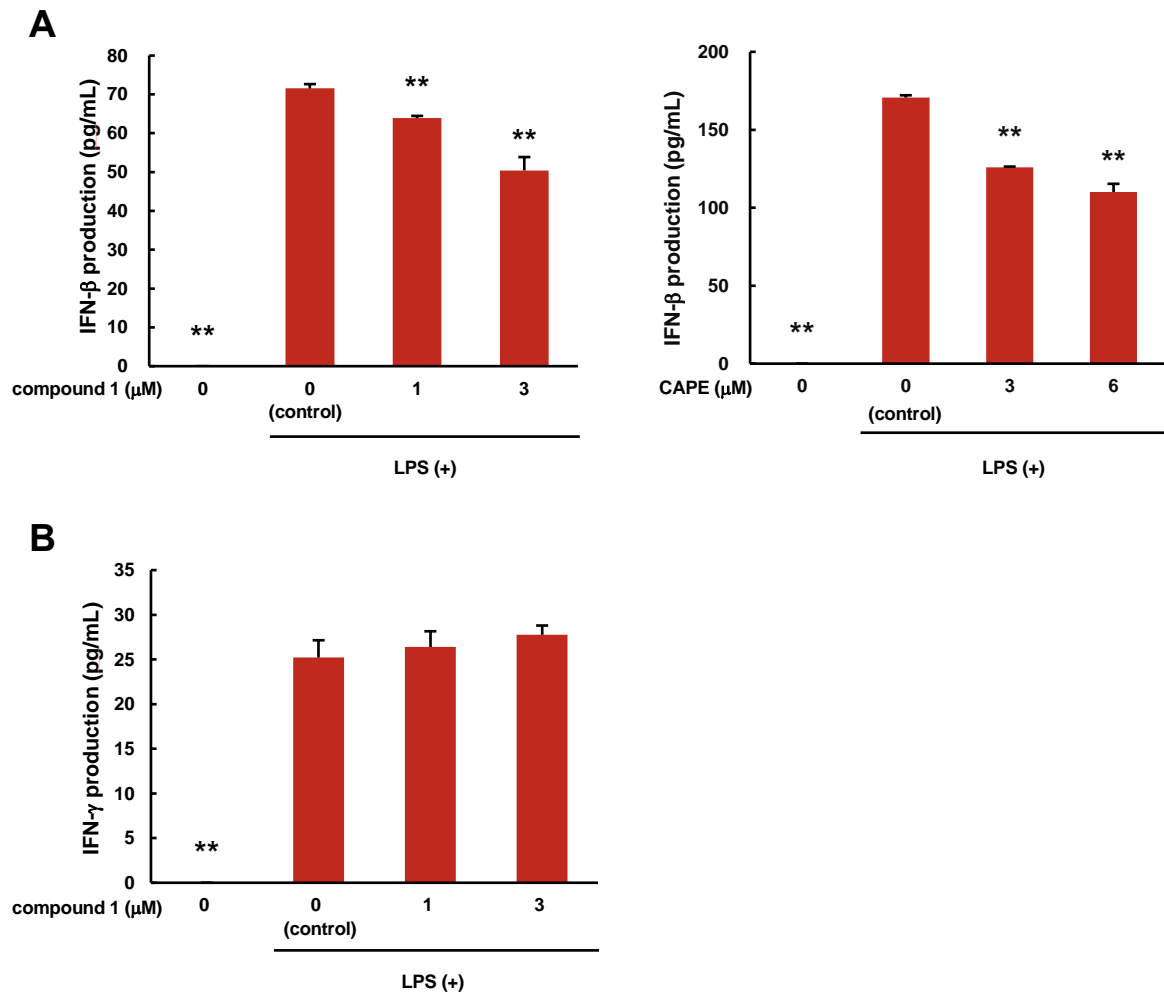


Figure 28. Effects of cynaropicrin (1) and CAPE on IFNs production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were seeded into a 48-well microplate at 4.0×10^5 cells/200 μ L/well. (A) IFN- β levels in culture media 3 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL were measured by Mouse IFN-beta Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. (B) IFN- γ levels in culture media 1 h after incubation with LPS at a final concentration of 5 μ g/mL were measured by Mouse IFN- γ ELISA KIT (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation, Gunma, Japan) according to the manufacturer's instructions.

Each bar represents the mean with SEM (n = 3). Significantly different from control, *p < 0.05, **p < 0.01.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S6 より一部改変して引用]

考察

iNOS 産生抑制作用を示した化合物 **1-3** について STAT1 のリン酸化に対する作用を検討したところ、いずれも STAT1 タンパク質の Tyr701 リン酸化を有意に抑制した。最も強い活性を示した cynaropicrin (**1**) について IFN 産生に対する影響を検討したところ、IFN- γ 産生に対しては抑制効果を示さなかったが、IFN- β 産生に対しては 1 μ M および 3 μ M 処理群で有意に IFN- β 産生を抑制した。3 μ M 投与群において、IFN- β 産生に対する **1** の抑制作用は STAT1 リン酸化の抑制作用と同程度であった。しかしながら iNOS 誘導抑制に必要な用量と比較すると、IFN- β 産生抑制にはより高用量での処理が必要であったことから、**1** の iNOS 誘導抑制作用は IFN- β 産生抑制や STAT1 のリン酸化抑制のみによるものではないことが示唆された。

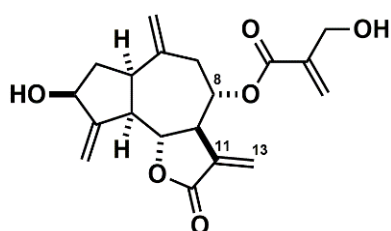
NF- κ B シグナル伝達経路に対して抑制作用を示すセスキテルペンラクトンの一部は JAK-STAT シグナル伝達経路にも作用することが報告されている。Parthenolide はヒト肝癌由来 Hep G2 細胞において Oncostatin M 刺激による STAT3 の Tyr705 残基のリン酸化を阻害することによりダイマー形成と核内移行を抑制することが報告されている⁶⁶。また、高用量の投与ではあるが、ウシ関節軟骨細胞において STAT1 および STAT3 の DNA 結合を阻害することも示唆されている⁶⁷。最近の研究では、parthenolide が JAK1, JAK2 および TYK2 を阻害する pan-JAK inhibitor として STAT3 の活性化を阻害することも報告されている⁶⁸。

Dehydrocostuslactone および costunolide は、詳細なメカニズムは明らかにされていないが、IL-22 もしくは IFN- γ で刺激したヒトケラチノサイトにおいて STAT1 および STAT3 の活性化を抑制することが報告されている⁶⁹。また、IL-6 で刺激した THP-1 細胞において JAK1, JAK2, および TYK2 のリン酸化を抑制することにより STAT3 Tyr705 残基のリン酸化を阻害することが報告されているが⁷⁰、costunolide の還元型で α , β -不飽和カルボニル構造を欠く dehydrocostunolide は STAT3 のリン酸化に対する抑制効果を示さなかったことから、セスキテルペンラクトンが示す JAK-STAT シグナル伝達経路の抑制作用に α , β -不飽和カルボニル構造の関与が示唆されている。本研究では **1-3** の STAT1 リン酸化抑制の機序は明らかにできなかったが、いずれも α , β -不飽和カルボニル構造を有することから、JAK 阻害作用を有する可能性が考えられる。また、著者が所属する研究室の以前の報告において、costunolide は LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージにおける IFN- β mRNA 発現の増大を抑制しないことを報告しており⁷¹、 α -methylene- γ -butyrolactone 構造を有する化合物であっても作用機序が異なることが示唆された。化合物 **1-3** の JAK に対する作用や他のシグナル伝達経路への影響など、より詳細な検討が必要である。

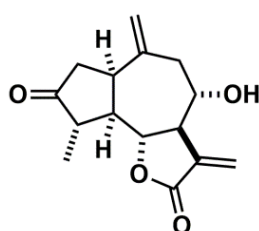
小括

第一章では、LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの iNOS 産生に対する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抑制作用と作用様式の検討を行った。NO 産生に対するセスキテルペンラクトン類を多く含むアーティチョーク葉部酢酸エチル可溶性画分の作用を検討した結果、比較対照物質 CAPE と同程度の抑制作用が観察された。酢酸エチル可溶性画分から単離した既知セスキテルペンラクトン **1-7** について、同様に NO 産生に対する作用を検討したところ、**1-6** は濃度依存的に NO 産生および iNOS 誘導を抑制した。活性の発現と化合物の構造を比較して検討した結果、セスキテルペンラクトンの活性の発現においてこれまで重視されていた α -methylene- γ -butyrolactone 構造に加え、8 位の α , β -不飽和カルボニル構造を有するアシル基も重要であることが示唆された。

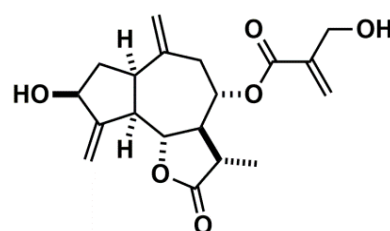
次に、iNOS 誘導抑制作用の作用様式を明らかにすることを目的として **1-4** について iNOS 発現に関わる主要なシグナル伝達経路に対する影響を検討した。MAPK シグナル伝達経路に対する作用を検討したところ、**1-4** は ERK, JNK, p38MAPK といった MAPK 群には影響を及ぼさなかった。NF- κ B シグナル伝達経路に対しては、本研究の条件下ではいずれも I κ B タンパク質の分解を抑制しなかった。一方、細胞質の NF- κ B p65 サブユニットの発現量には影響しなかったが、NF- κ B p65 サブユニットの核内発現レベルを有意に抑制した。JAK-STAT シグナル伝達経路に対しては、STAT1 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 (**1**) について TNF- α , PGE₂, IFN- β および IFN- γ 産生に対する影響を検討した結果、1 μ M および 3 μ M 処理群で有意な抑制作用が観察された。以上のことから、**1** は NF- κ B シグナル伝達と STAT1 シグナル伝達経路に対する抑制作用により強力な iNOS 誘導抑制作用を示すことが示唆された。



cynaropicrin (**1**)



grosheimin (**2**)



11 β ,13-dihydrocynaropicrin (**3**)

第二章 Cynaropicrin (1) に親和性を示すタンパク質の探索

第一節 LPS 刺激 RAW264.7 細胞中で親和性を示すタンパク質

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 (Figure 29) に対して親和性を示すタンパク質の解明を試みた. 標的タンパク質探索方法として, COOH リンカー結合磁気ビーズを用いてアフィニティ精製を行った.

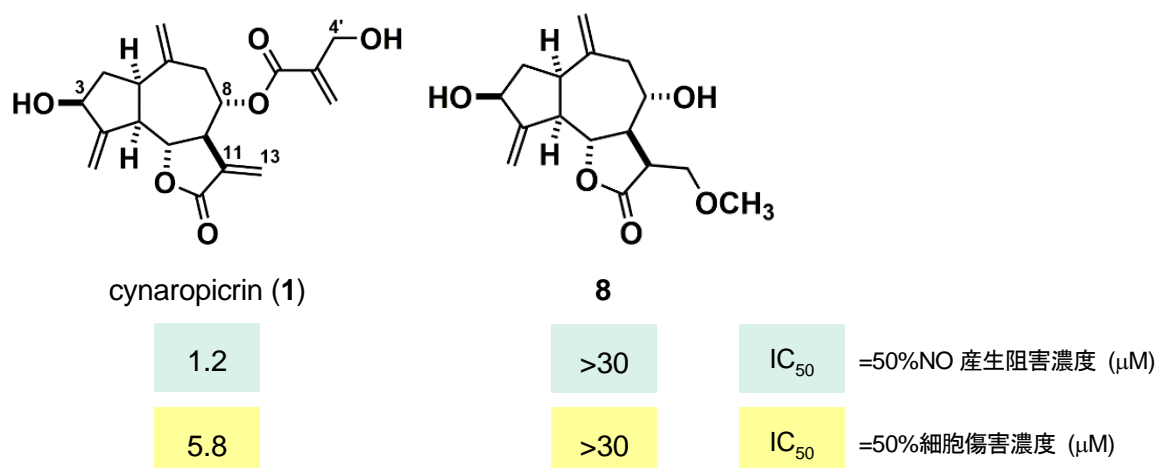


Figure 29. Chemical structures and inhibitory effects of cynaropicrin (1) and 8.

まず, 1 および 8 の COOH リンカー結合磁気ビーズへの固定化を行った. ビーズのカルボキシ基がリガンドの水酸基とエステル結合するため, 1 の固定化部位については, 3 位の水酸基もしくは 4' 位の水酸基が考えられるが, 反応性の違いから, 4' 位の水酸基に固定化されると推察した. また, 第一章において 1 の 4' 位の水酸基がメチル化された 5 (Figure 7) も 1 と同様に強力な NO 産生抑制作用を示した (IC₅₀=2.4 μM) (Table 2) ことから, 4' 位の水酸基は活性と関連が低い部位であると判断した. また, 8 のビーズへの固定化部位については, 3 位の水酸基もしくは 8 位の水酸基が考えられるが, 反応性の違いから 3 位の水酸基が優位であると推察した.

抗炎症作用に関わる標的分子に関する知見を得るため, 1 または 8 を固定化したビーズを LPS 刺激 30 分後の RAW264.7 細胞の細胞質および細胞膜画分の混合抽出物と反応させ, アフィニティ精製を行った. その結果, 複数のタンパク質が検出されたが, cynaropicrin (1) のみに特異的なタンパク質は検出されなかった (Figure 30). また, LPS 刺激 30 分後の RAW264.7 細胞の核画分から調製したタンパク質溶液を用いて同様にアフィニティ精製を行ったところ, 複数のタンパク質が検出され, そのうち 60 kDa 付近のタンパク質は cynaropicrin (1) のみに検出された. peptide-mass fingerprinting 法によりこのタンパク質の同定を試みた結果, poly (U)- binding-splicing factor (PUF 60) と同定された (Figure 31).

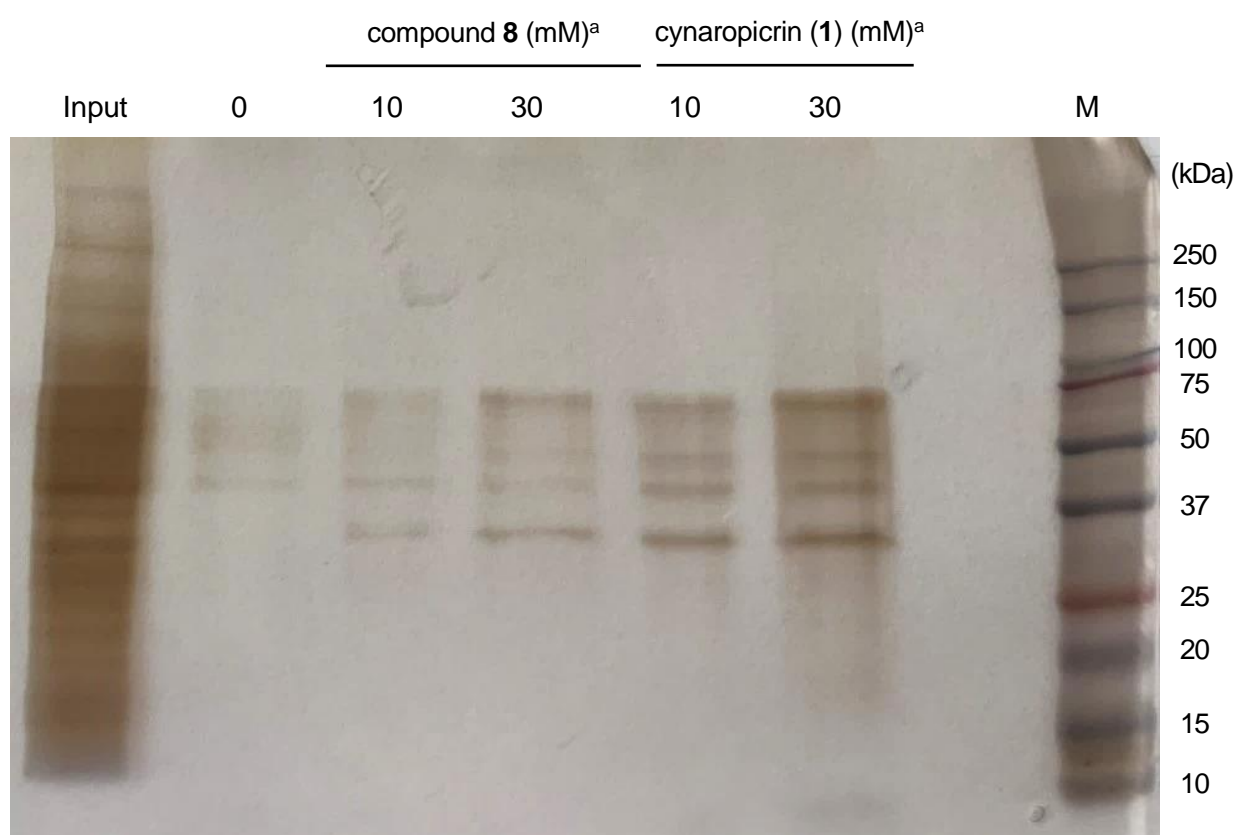


Figure 30. SDS-PAGE of cynaropicrin-binding proteins of LPS-stimulated RAW264.7 cell membrane and cytosolic extract.

Ligand-fixed beads were agitated with cell membrane and cytosolic fractions of RAW264.7 cell extract at 4 °C for 4 h. After washing with binding/washing buffer, the beads were dispersed in salt elution buffer to isolate low-affinity proteins and placed on ice for 5 min. After removing the supernatant, the beads were dispersed in Sample Buffer Solution and boiled for 5 min at 98 °C. The supernatant was electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, silver staining was performed.

Input : RAW264.7 cell membrane and cytosolic extract 30 min after incubation with LPS

M : Protein molecular weight markers

^aConcentrations of ligands used for preparing of ligand-fixed beads.

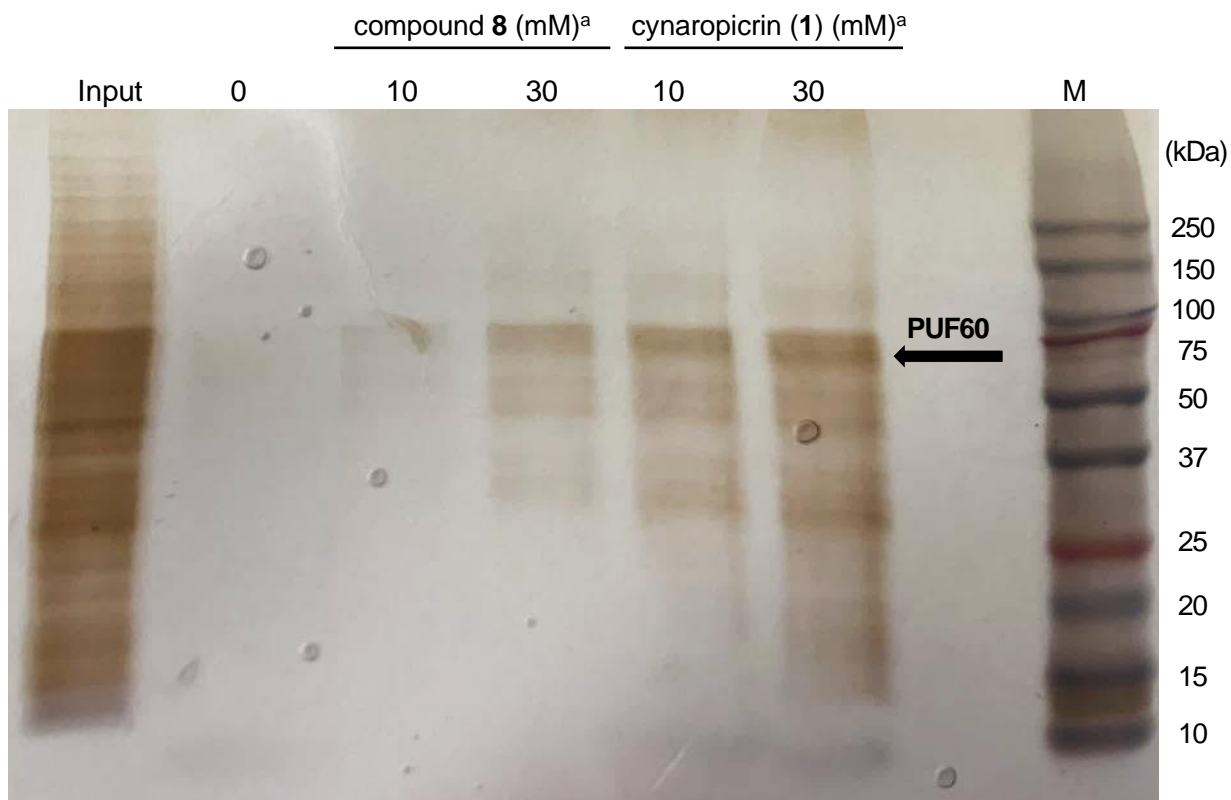


Figure 31. SDS-PAGE of cynaropicrin-binding proteins of LPS-stimulated RAW264.7 nuclear extract.

Ligand-fixed beads were agitated with the LPS-stimulated RAW264.7 cell extracts at 4 °C for 4 h. After washing with binding/washing buffer, the beads were dispersed in salt elution buffer to isolate low-affinity proteins and placed on ice for 5 min. After removing the supernatant, the beads were dispersed in Sample Buffer Solution and boiled for 5 min at 98 °C. The supernatant was electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gel. After fractions electrophoresis, silver staining was performed.

Input : RAW264.7 nuclear extract 30 min after incubation with LPS

M : Protein molecular weight markers

^aConcentrations of ligands used for preparing of ligand-fixed beads.

考察

PUF 60 は DNA および RNA に結合するタンパク質で、RNA スプライシングやアポトーシス、転写調節に関与する。がん患者やシェーグレン症候群などの自己免疫性疾患患者の血清で抗 PUF60 抗体が上昇することが報告されている^{72,73}。Sun ら⁷⁴は、PUF60 は乳がん患者において高度に発現しており、PUF60 の mRNA およびタンパク発現量のアップレギュレーションによりアポトーシスが阻害され、乳がんの進行が加速することを報告している。PUF 60 の詳細な機能は未解明であるが、がん治療と診断において有望なターゲットであるとされる⁷⁵。しかしながら、PUF60 の炎症性疾患との関連はほとんど明らかになっていない。一方、最近の研究で、PUF60 は免疫抑制作用を示す可能性があることが報告されている。Kew らは、HeLa 細胞、MEF 細胞および RAW264.7 細胞に黄色ブドウ球菌の細菌懸濁液を添加し、細胞内に取り込ませ洗浄後、培養した後のそれぞれの細胞における PUF60 の変化を検討した。その結果、いずれの細胞においても PUF60 の転写レベルおよびタンパク質レベルで発現量が減少した。また、RNAi により PUF60 遺伝子の発現を減少させると、HeLa 細胞においては IL-6, IL-8, CXCL2, IL-1 α , IL-18 および CCL5 の遺伝子発現量が増加した。RAW264.7 細胞では RNAi 効果が低いにもかかわらず CXCL2, IL-18 および CCL5 の遺伝子発現量が増加した。一方、PUF60 遺伝子を過剰発現させた HeLa 細胞では IL-6, IL-8, CXCL2, IL-1 α の遺伝子発現量は有意ではないが減少した。以上のことから、PUF60 が免疫反応に関連する可能性が示唆されている⁷⁶。

本研究では LPS 刺激 RAW264.7 細胞の核画分において、**1** と親和性があるタンパク質として PUF60 を見出したが、**1** が PUF60 に対して抑制的に作用するか、促進的に作用するかは明らかにできなかった。また、PUF60 と炎症反応との関連は十分に解明されていないため、iNOS 産生抑制との関連は現時点では不明である。

第二節 LPS 未刺激の RAW264.7 細胞中で親和性を示したタンパク質

非活性状態の細胞における cynaropicrin (**1**) の標的分子に関する知見を得るため、第一節と同様の方法で **1** または **8** を固定化したビーズを LPS 未刺激の RAW264.7 細胞の細胞質および細胞膜画分の混合抽出物と反応させ、アフィニティ精製を行った。その結果、複数のタンパク質が検出され、peptide-mass fingerprinting 法によりタンパク質の同定を試みたところ、50 kDa 付近のタンパク質は tubulin と同定され、30 kDa 付近のタンパク質は ANT2 (Adenine nucleotide translocator 2, ADP/ATP translocase 2) と同定された (Figure 32)。ANT2 と同定された 30 kDa 付近のタンパク質は **1** の場合のみに検出され、NO 産生抑制作用および細胞毒性を示さない **8** の場合では検出されなかった。

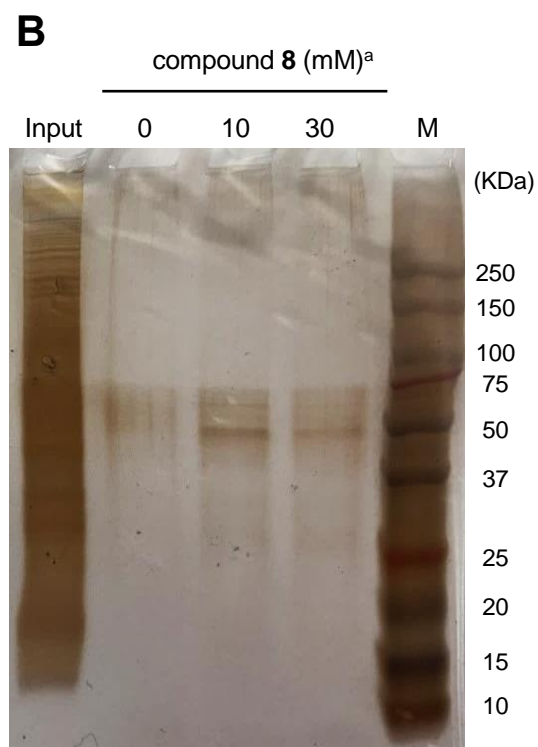
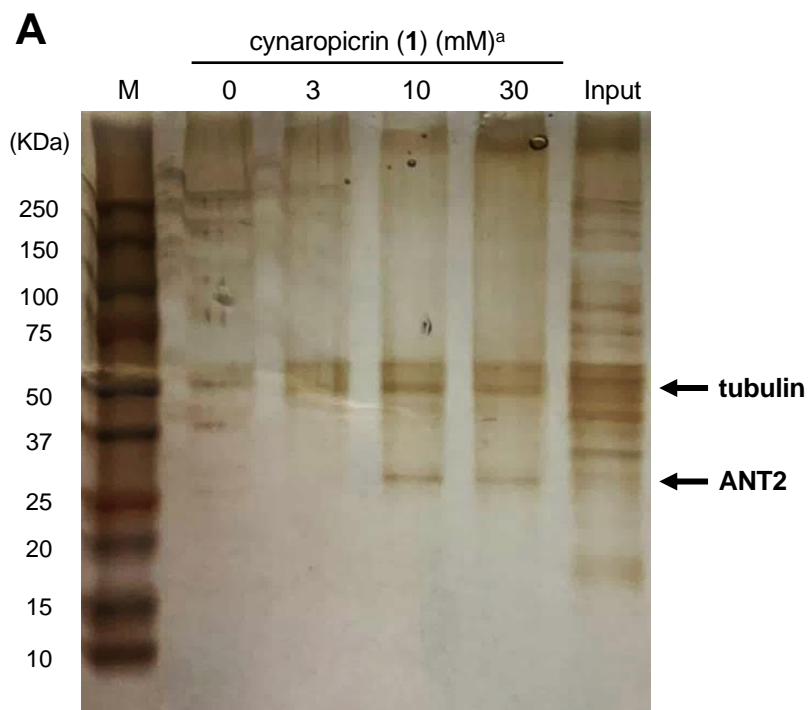


Figure 32. SDS-PAGE of cynaropicrin-binding proteins of RAW264.7 cell membrane and cytosolic extract.

Ligand-fixed beads were agitated with the LPS-stimulated RAW264.7 cell extracts at 4 °C for 4 h. After washing with binding/washing buffer, the beads were dispersed in salt elution buffer to isolate low-affinity proteins and placed on ice for 5 min. After removing the supernatant, the beads were dispersed in Sample Buffer Solution and boiled for 5 min at 98 °C. The supernatant was electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gel. After fractions electrophoresis, silver staining was performed.

Input : RAW264.7 cell membrane and cytosolic extract

M : Protein molecular weight markers

^aConcentrations of ligands used for preparing of ligand-fixed beads.

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. S8 より一部改変して引用]

考察

LPS 未刺激の RAW264.7 細胞の細胞質および細胞膜画分の混合抽出物と、cynaropicrin (**1**) または化合物 **8** を固定化したビーズを反応させ、アフィニティ精製を行った。その結果、結合タンパク質として、50kDa 付近のタンパク質は tubulin、30kDa 付近のタンパク質は ANT2 と同定した。50kDa 付近のタンパク質は **1** および NO 産生抑制作用および細胞毒性を示さない **8** にも検出されたため、iNOS 誘導抑制作用および毒性への tubulin の関与は低いことが示唆された。

ANT2 はミトコンドリア内膜に存在する ADP と ATP の交換輸送を行う担体で、アポトーシスに関与していると報告されている^{77, 78}。ANT2 を特異的に阻害する天然由来の化合物として carboxyatractyloside および bongkreki acid⁷⁷ が知られているが、共に強力な自然毒である。

Carboxyatractyloside はヒトおよび草食動物に対して有毒で、バングラデシュでは 2007 年のモンスーンによる飢饉の際に、キク科植物オナモミ (*Xanthium strumarium*) を摂取したことによる死亡例を含む集団食中毒が発生している⁷⁹。

グラム陰性細菌の一種である *Burkholderia gladioli* が産生する bongkreki acid は ANT2 を阻害することにより強力な毒性を示す。bongkreki acid で汚染された食品をヒトが摂取すると中毒症状を呈し、インドネシアや中国では bongkreki acid の摂取による死亡例が多数報告されている⁸⁰。

ANT2 と同定された 30kDa 付近のタンパク質は **1** の場合のみに検出され、NO 産生抑制作用および細胞毒性を示さない **8** には検出されなかったことから、ANT2 が **1** の細胞毒性に関与することが示唆された。さらに、**1** および **8** の構造の比較により、 α, β -不飽和カルボニル構造が ANT2 との親和性に関与することが示唆された。また、第一節において LPS 刺激 RAW264.7 細胞の細胞質および細胞膜画分の混合抽出物と反応させた際、30kDa 付近のタンパク質が検出されなかったことから、ANT2 は iNOS 産生に対する抑制作用には関与しないことが示唆された。

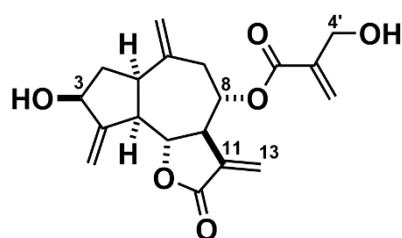
小括

第二章では, 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** について, COOH リンカー結合磁気ビーズへの固定化を行い, アフィニティ精製により **1** に親和性を示すタンパク質の解明を試みた.

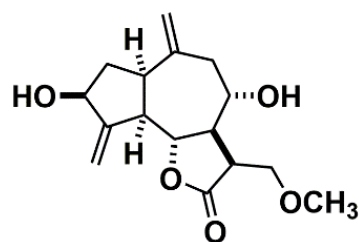
その結果, LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞抽出物において, **1** のみに親和性を示すタンパク質として PUF60 が同定された. しかしながら, **1** が PUF60 に対して抑制的に作用するか, 促進的に作用するかは明らかにできず, また, PUF60 と炎症関連疾患との関連は十分に解明されていないため, iNOS 産生抑制との関連は現時点では不明である.

LPS 未刺激の RAW264.7 細胞抽出物においては, **1** のみに親和性を示すタンパク質として ANT2 が同定された. 化合物 **1** および **8** の構造の比較により, 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 **1** の毒性に寄与することが示唆された.

なお, リガンド結合ビーズにタンパク質を反応させた後, 1MKCl を含む塩溶出バッファーを添加することにより比較的低親和性のタンパク質を遊離させており, 遊離したタンパク質に活性に影響するタンパク質が含まれている可能性が考えられる. 1MKCl バッファー中に遊離されたタンパク質についても SDS-PAGE による分離を行ったが, 今回の実験条件では分離が不明瞭であったため特異性の確認ができなかった. また, ビーズに結合した **1** とタンパク質のチオール基がマイケル付加型で有機化学的に結合し, 溶出されてこなかった可能性が考えられるが, 反応液中に DTT を添加することによって, ある程度防げたものと推察しており, 今回の実験条件では親和性にもとづいたタンパク質が精製されたものと考えられる.



cynaropicrin (**1**)



8

結論

本研究は、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 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**) や、その他微量セスキテルペンラクトン類を種々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。

第一章では、アーティチョーク葉部酢酸エチル可溶性画分から単離した既知セスキテルペンラクトン **1-7** について、LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生に対する作用を指標に活性の発現と化合物の構造を比較して検討した結果、セスキテルペンラクトンの活性の発現において、これまで重視されていた α -methylene- γ -butyrolactone 構造に加え、8位の α , β -不飽和カルボニル構造を有するアシル基も重要であることを見出した。

また、iNOS 誘導抑制作用の作用様式の検討を行ったところ、MAPK 群に対してはシグナル伝達抑制作用を示さなかったが、NF- κ B の p65 サブユニットの核内発現レベルおよび STAT1 の Tyr701 リン酸化を有意に抑制することを見出した。さらに、最も強い抑制作用を示した **1** について炎症性メディエーター産生に対する作用を検討したところ、TNF- α 、PGE₂ および INF- β 産生に対する有意な抑制作用が観察された。以上のことから、**1** の強力な iNOS 誘導抑制作用は、NF- κ B シグナルと STAT1 シグナル伝達経路の抑制作用によることが示唆された。

第二章では、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、**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。LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞抽出物から、**1** に親和性を示すタンパク質として PUF60 が同定された。また、LPS 未刺激の RAW264.7 細胞抽出物から **1** と親和性を示し、毒性への関係が示唆されるタンパク質として ANT2 が同定された。

α -Methylene- γ -butyrolactone 構造などの α , β -不飽和カルボニル構造はマイケルアクセプターとして機能するため、タンパク質のチオール基など生体内の様々な求核種と非特異的に共有結合して細胞傷害などの望ましくない効果を及ぼす可能性や、反応選択性の低さが指摘されてきた。しかし近年、マイケルアクセプターとして機能する構造を有する天然由来化合物は有益性が再評価され、低分子医薬品リード化合物として構造活性相関や標的分子に関する研究が数多くなされている。毒性の減弱および活性の増強を目的とした構造の最適化のために、詳細な構造活性相関や標的分子に関する知見が求められている。

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。

謝辞

本研究に際し、ご懇意なるご指導とご高配を賜りました京都薬科大学 生薬学分野 松田久司教授、ならびに中村誠宏准教授、中嶋聡一助教に衷心より深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり御助言を賜りました京都薬科大学 生化学分野 中山祐治教授、ならびに薬理学分野 田中智之教授に深く感謝申し上げます。

質量分析によるタンパク質の解析におきまして、大変お世話になりました京都薬科大学 共同利用機器センター 服部恭尚講師、安東友繁助教に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に際しご協力下さいました、生薬学分野 笠香織学士、同 米田太一学士をはじめとする大学院生、京都薬科大学生薬学分野職員、学生諸氏の皆様に深く感謝致します。

実験の部

分析機器

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR) および炭素核磁気共鳴スペクトル (^{13}C NMR) は JEOL JNM-ECS400 (400 MHz) および JEOL JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子株式会社, 東京) を用いて測定した。

旋光度は, Horiba high sensitive SEPA 300 digital polarimeter ($l=0.5$) (株式会社堀場製作所, 京都) を用いて測定した。

高分解能質量分析 (High resolution FAB-MS, EI-MS) は JEOL JMS SX 102 A (日本電子株式会社, 東京) を用いて測定した。質量分析 (FAB-MS, EI-MS, MALDI TOF/TOF-MS) は, JEOL JMS GC MATE 型質量分析装置 (日本電子株式会社) および 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems, MA, USA) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, ポンプは SHIMADZU LC-6AD を, 紫外可視分光光度計検出器は, SHIMADZU SPD-20A および SPD-10A を用いた。

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は, 順相系はシリカゲル Silica Gel BW-200 (150–350 mesh, 富士シリシア化学株式会社, 愛知), 逆相系は Chromatorex ODS DM1020T (100–200 mesh, 富士シリシア化学株式会社) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC ガラスプレートは, silica gel 60F₂₅₄ (Merck, 順相), RP-18 60F₂₅₄ (Merck, 逆相) を使用し, スポットの検出は, UV (254 nm), 1% Ce(SO₄)₂/10% H₂SO₄ 水溶液, *N,N*-dimethyl-1,4-phenylenediammonium dichloride を噴霧し, 加熱時の呈色により行った。

細胞培養

MC-18AIC (パナソニック株式会社, 大阪) CO₂ インキュベーターを使用し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で行った。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞 (ACTT No. TIB-71) は住商ファーマインターナショナル株式会社 (東京) より購入した。細胞は 10% FBS, 100 units/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン含有 DMEM 培地 (4500 mg/mL glucose) 中で培養した。

試薬および器具

DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), ペニシリン, ストレプトマイシン, lipopolysaccharide (from *E. coli*, 055: B5), caffeic acid phenethyl ester, α -methylene- γ -lactone および Oxyma Pure は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2-Hydroxyethyl methacrylate および fluoro-*N,N,N,N*-tetramethylformamidium hexafluorophosphate は 東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。

Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail, Protein Assay BCA Kit, Blocking One-P, Blocking One, Chemi-Lumi One, 2-アミノエタノールおよび HEPES はナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。

一次抗体 (iNOS, β -actin, p44/42 MAPK (ERK1/2), phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204), SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), I κ B α , phospho- I κ B α (Ser32), STAT1, phospho-STAT1 (Tyr701), NF- κ B p65 および Lamin B1) および二次抗体 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody) は Cell Signaling Technology (MA, USA) から購入した。

COOH beads (FG beads[®]) および Screening Buffer Kit は多摩川精機株式会社 (長野) から購入した。

N-Hydroxysuccinimide および 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride は株式会社ペプチド研究所 (大阪) から購入した。

Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting および Precision Plus Protein Dual Color Standards は Bio-Rad (CA, USA) から購入した。

その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。

第一章の実験

第一節および第二節の実験

原料生薬の入手

ルーマニア産アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) 葉部は2014年に株式会社前忠 (奈良) から入手した。

アーティチョーク葉部含有成分の抽出および成分単離

既報³に従い成分単離を行った。すなわち、アーティチョーク (*Cynara scolymus* L.) の乾燥葉部2 kgをMeOHを用いて80℃で2時間、熱時抽出後、抽出液を濾取した。残渣にMeOHを加え、同様の抽出操作を計4回行った。MeOH抽出液をまとめ、減圧下溶媒留去し、MeOH抽出エキス(618g, 葉部乾燥品からの収率30.9%)を得た。得られたMeOHエキスのうち613gをEtOAcとH₂Oで分配抽出し、さらにそのH₂O可溶性画分を*n*-BuOHおよびH₂Oを用いて分配抽出し、EtOAc可溶性画分(63.57g, 3.2%), *n*-BuOH可溶性画分(45.57g, 2.3%), H₂O可溶性画分(508g, 25.4%)を得た。

得られたEtOAc可溶性画分を順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 1.5 kg, *n*-Hexane-CHCl₃ (5:1 → 2:1 → 1:1 → 1:5 → 1:20 → 1:50, v/v) → CHCl₃-MeOH (50:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1, v/v) → MeOH] にて分画し, Fr. 1 (0.49 g), Fr. 2 (3.80 g), Fr. 3 (17.53 g), Fr. 4 (0.57 g), Fr. 5 (5.24 g), Fr. 6 (8.81 g), Fr. 7 (8.83 g), Fr. 8 (13.30 g)を得た。

Fr. 5 (5.24 g) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 200 g, MeOH-H₂O (10:90 → 20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → isopropanol] により精製した後, HPLCを用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (28:72, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **5** (5.0 mg) を単離した。

Fr. 6 (8.81 g) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 25 g, MeOH-H₂O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 70:30, v/v) → MeOH → isopropanol] により Fr. 6-1 (1 g), Fr. 6-2 (0.14 g), Fr. 6-3 (0.07 g), Fr. 6-4 (0.90 g), Fr. 6-5 (0.43 g), Fr. 6-6 (1.03 g), Fr. 6-7 (1.06 g), Fr. 6-8 (0.70 g), Fr. 6-9 (0.08 g), Fr. 6-10 (0.32 g), Fr. 6-11 (0.24 g), Fr. 6-12 (0.45 g), Fr. 6-13 (0.39 g), Fr. 6-14 (0.54 g), Fr. 6-15 (0.44 g), Fr. 6-16 (0.99 g) を得た。Fr. 6-5 (0.43 g) はさらに順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 21.5 g, CHCl₃-MeOH-H₂O (200:3:1 → 100:3:1 → 50:3:1, v/v/v) → MeOH] により精製し, Fr. 6-5-1 (0.4 mg), Fr. 6-5-2 (5.4 mg), Fr. 6-5-3 (125.4 mg), Fr. 6-5-4 (228.3 mg), Fr. 6-5-5 (21.6 mg), Fr. 6-5-6 (53.8 mg) を得た。Fr. 6-5-3 (125.4 mg) はHPLCを用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (16:84, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **2** (59.1 mg) および**7** (6.8 mg) を単離した。Fr. 6-6 (1.03 g) はHPLCを用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (22:78, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を行い, **1** (623.1 mg) を単離するとともに, Fr. 6-6-1 (7.1 mg), Fr. 6-6-2 (32.5 mg) を得た。Fr. 6-6-2 (32.5 mg) はHPLCを用いてさらに精製

[mobile phase: CH₃CN–H₂O (15:85, v/v), YMC-Triart PFP (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **3** (5.4 mg) を単離した. Fr. 6-7 (1.06 g) は HPLC を用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (22:78, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を行い, **1** (625.6 mg) を単離した. Fr. 6-8 (0.70 g) は HPLC を用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (22:78, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を行い, **4** (5.7 mg) を単離した. Fr. 6-10 (0.32 g) は HPLC を用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (30:70, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を行い, **6** (26.2 mg) を単離した.

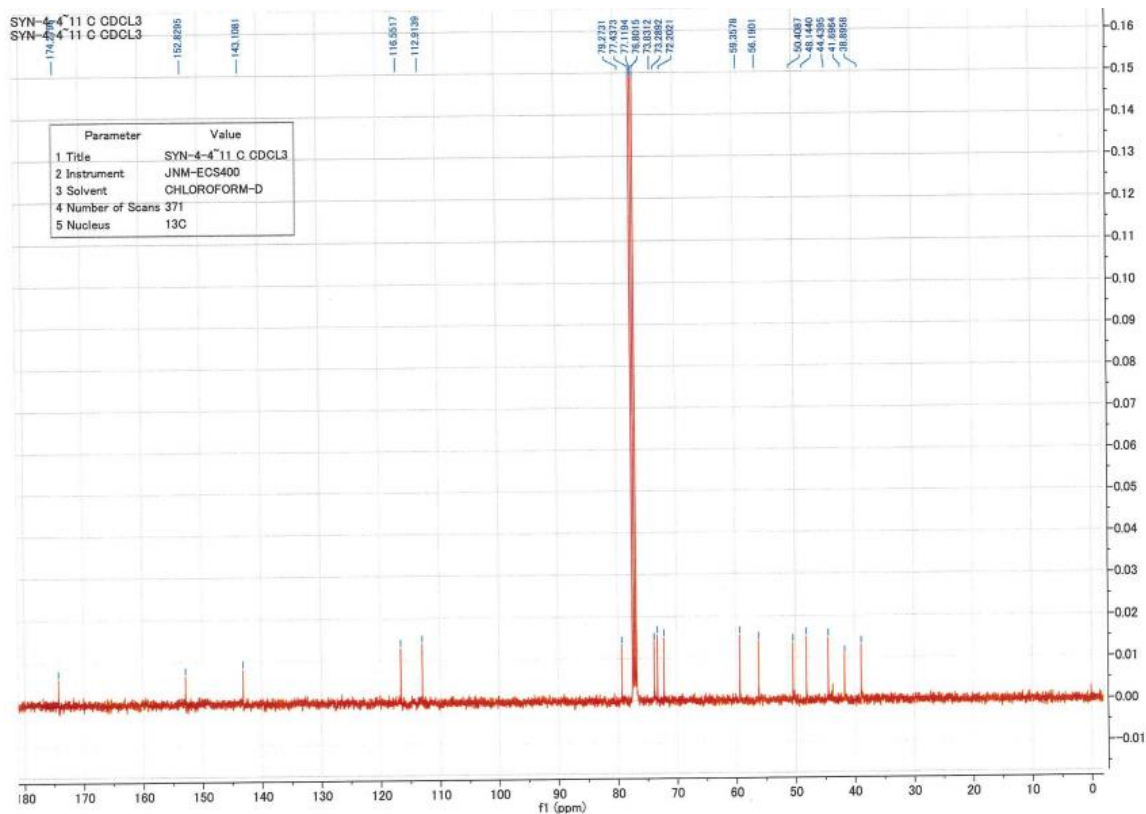
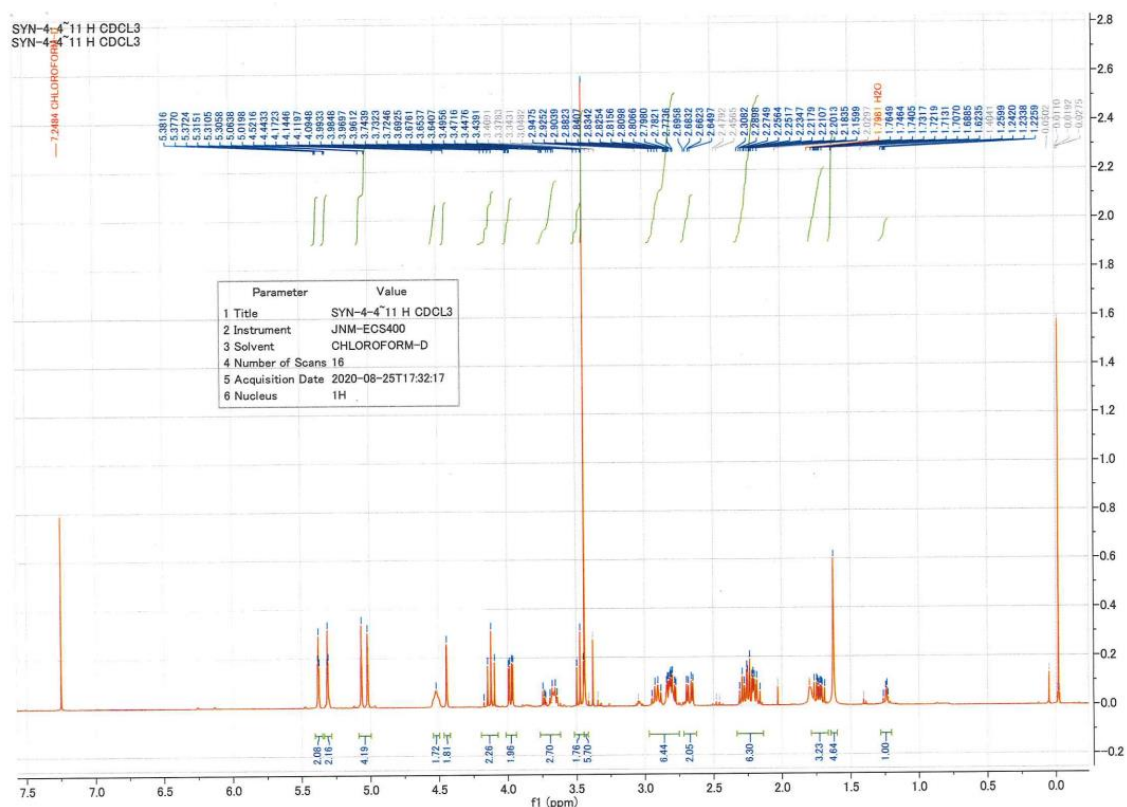
化合物 **8** の合成

Cynaropicrin (**1**) (0.08 mmol, 28.6 mg) に NaOMe を 22 mg (0.41 mmol, 5 eq.) 加え, 脱水 MeOH (2.0 mL) 中で 24 時間室温 N₂ 下で攪拌した. その後, 溶媒を減圧留去し, 得られた反応物を酢酸エチルおよび水を用いて液液分配 (3 × 5 mL) を行った. 次に, 酢酸エチル分画の溶媒を留去後, 得られた粗精製物を順相カラムクロマトグラフィー [n-hexane–EtOAc (1 : 1, v/v)] により精製し, **8** (7.9 mg, 収率 33%) を得た. 得られた化合物の構造は, 文献値⁵²の ¹H NMR, ¹³C NMR 値との比較から 3β, 8α-dihydroxy-13-methoxy-4(15),10(14)-guaidiene-12,6-olide と決定した

¹H NMR and ¹³C NMR data (CDCl₃) of compound **8**

position	compound 8		position	compound 8	
	δ _C	δ _H		δ _C	δ _H
1	44.4	2.82 (m)	10	143.1	
2	38.9	1.73 (m)	11	48.1	2.80 (m)
		2.22 (m)	12	174.3	
3	73.8	4.52 (m)	13	73.2	3.47 (dd, <i>J</i> = 9.6, 9.6)
4	152.8				3.98 (dd, <i>J</i> = 9.4, 3.4)
5	50.4	2.79 (m)	14	11.6	5.02 (br s)
6	79.3	4.14 (dd, <i>J</i> = 11.1, 11.1)			5.06 (br s)
7	56.0	2.22 (m)	15	112.9	5.31 (dd, <i>J</i> = 1.8, 1.8)
8	72.2	3.68 (m)			5.37 (dd, <i>J</i> = 1.8, 1.8)
9	41.7	2.29 (m)	13-OCH ₃	59.4	3.44
		2.67 (13.4, 5.0)			

¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopic data (CDCl₃) of compound **8**



LPS 刺激による RAW264.7 細胞からの NO 産生抑制作用

RAW264.7 細胞 2.5×10^5 cells/100 μ L/well を 96 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 100 μ L を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS (*Escherichia coli* 055: B5 由来) 10 μ g/ mL を含有する DMEM 培地 100 μ L を添加した (LPS 終濃度 5 μ g/mL)。その後 18 時間培養し、培地上清中に蓄積した NO₂ を Griess 法^{81, 82}により定量し、NO 産生量とした。すなわち、培養上清に同量の Griess 試薬 (1%スルファニルアミド, 0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸, 2.5%リン酸) を加えて混和し、10 分間室温で静置した後に、マイクロプレートリーダーにて吸光度 (測定波長 ; 570 nm, 参照波長 ; 655 nm) を測定し、培養上清に蓄積した NO₂ を定量した。阻害率 (%) は下の式を使って算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [(A-B)/(A-C)] \times 100$$

A-C: 亜硝酸濃度 (μ M)

A: LPS (+), 被験物質 (-); B: LPS (+), 被験物質 (+); C: LPS (-), 被験物質 (-)

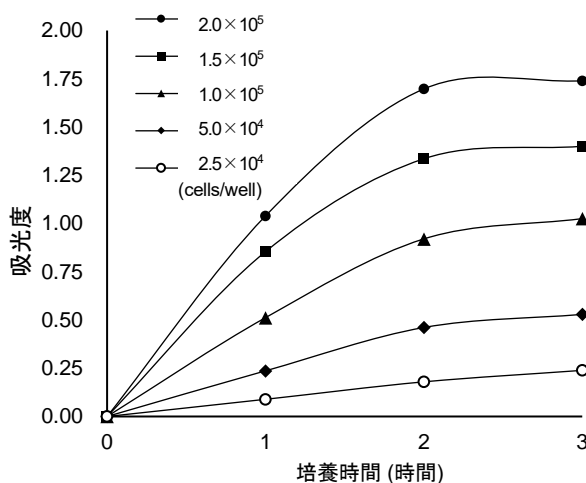
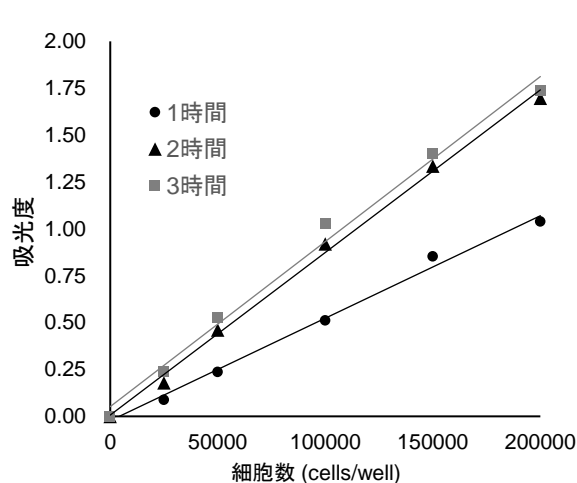
被験物質は DMSO に溶解した (DMSO 終濃度 0.5%)。比較対象物質として CAPE および parthenolide を用いた。

RAW264.7 細胞による細胞毒性評価

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイ法を用いて細胞毒性の評価を行った。すなわち、RAW264.7 細胞 5.0×10^4 cells/100 μ L/well を 96 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 100 μ L を添加し、さらに 10 時間培養後に DMEM 培地 100 μ L を添加した。その後 18 時間培養し、培養上清 100 μ L を除いたのち、MTT 溶液 (5 mg/mL in PBS) を 10 μ L 添加した。2 時間後、生成したホルマザンを 0.04 M HCl 含有 2-プロパノールで溶解し、マイクロプレートリーダーにて吸光度 (測定波長 ; 570 nm, 参照波長 ; 655 nm) を測定し、判定を行った。

被験物質は DMSO に溶解した (DMSO 終濃度 0.5%)。

1 ウェル当たりの細胞数、培養時間については予備実験の結果から最適条件を決定した。



RAW264.7 細胞からの全タンパク質の抽出

RAW264.7 細胞 5.0×10^6 cells/2 mL/well を 6 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 1 mL を添加し、さらに 10 時間培養後に LPS (*Escherichia coli* 055:B5 由来) 10 μ g/mL を含有する DMEM 培地 1 mL を添加した (LPS 終濃度 5 μ g/mL)。その後、30 分間、2 時間もしくは 12 時間培養し、細胞溶解緩衝液 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.5% Triton-X, 2 mM EDTA, 20 mM β -glycerophosphate, pH 7.4) に Protease Inhibitor Cocktail および Phosphatase Inhibitor Cocktail を加えてセルスクレーパーを用いて細胞を回収した後、超音波破碎した (Microson™ ultrasonic cell disruptor, USA)。遠心分離を行い、上清に Laemmli buffer (0.9 mM EDTA, 8% glycerol, 6% SDS, 3 mM Tris, 0.03% bromophenol blue, 6% 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を添加し、100°C で 5 分間加熱した後、-80°C で保管した。タンパク質の定量は、Protein Assay BCA Kit を用いて行った。

RAW264.7 細胞からの核タンパク質の抽出

RAW264.7 細胞 5.0×10^6 cells/2 mL/well を 6 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 1 mL を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS (*Escherichia coli* 055: B5 由来) $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する DMEM 培地 1 mL を添加した (LPS 終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)。その後、30 分間培養し、8-min Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio, CA, USA) を用い、手順書に従い実験を行った。タンパク質の定量は、Protein Assay BCA Kit を用いて行った。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット法による分析

等量のタンパク質 (全タンパク質は $50 \mu\text{g}$, 核タンパク質は $25 \mu\text{g}$) を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて 200 V, 40 mA, 1 時間の条件下で電気泳動を行い、タンパク質を分離した。電気泳動後、ゲルから polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写緩衝液 (38.4 mM Tris, 31.2 mM glycine, 20% MeOH, 1% SDS), Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD 社) を用い、100 V, 350 mA, 1 時間の条件下で転写した。次に、転写膜をリン酸化タンパク質 (p-ERK1/2, p-SAPK/JNK, p-p38, p-STAT1 (Tyr701)) を検出する際は Blocking One-P, 非リン酸化タンパク質 (iNOS, ERK1/2, SAPK/JNK, p38, STAT1, I κ B, NF- κ B p65, β -actin, Lamin B1) を検出する際は Blocking One に 30 分間浸漬し、ブロッキングを行った。転写膜は T-TBS で洗浄し、一次抗体 (1:1000) を室温で 1 時間反応させた。転写膜を T-TBS で洗浄した後、二次抗体 (horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), 1:5000) を室温で 1 時間反応させた。タンパク質の検出は Chemi-Lumi One を用い、LAS-4000 mini (FUJIFILM) にて画像の撮影および解析を行った。

TNF- α 産生量の測定

RAW264.7 細胞 4.0×10^5 cells/200 μL /well を 48 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 $200 \mu\text{L}$ を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する DMEM 培地 $200 \mu\text{L}$ を添加した (LPS 終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)。その後、1 時間もしくは 3 時間培養した。培養上清を回収し、レビス Mouse TNF- α ELISA Kit (富士フィルムワコーシバヤギ株式会社, 群馬) を用いて手順書に従い測定を行った。

PGE₂産生量の測定

RAW264.7 細胞 4.0×10^5 cells/200 mL/well を 48 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 200 μ L を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS 10 μ g/mL を含有する DMEM 培地 200 μ L を添加した (LPS 終濃度 5 μ g/mL)。その後、18 時間培養した。培養上清を回収し、Prostaglandin E₂ Parameter Assay Kit (R&D Systems, MN, USA) を用いて手順書に従い測定を行った。なお、LPS 刺激時間については刺激 1 時間後、3 時間後では PGE₂ は検出されなかったことから、刺激時間は 18 時間とした。

IFN- β 産生量の測定

RAW264.7 細胞 4.0×10^5 cells/200 mL/well を 48 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 200 μ L を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS 10 μ g/mL を含有する DMEM 培地 200 μ L を添加した (LPS 終濃度 5 μ g/mL)。その後、3 時間培養した。培養上清を回収し、Mouse IFN-beta Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA) を用いて手順書に従い測定を行った。なお、LPS 刺激時間については 1 時間後では IFN- β は検出されなかったことから、刺激時間は 3 時間とした。

IFN- γ 産生量の測定

RAW264.7 細胞 4.0×10^5 cells/200 mL/well を 48 ウェルマイクロプレートに播種し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、被験物質を含有する培地 200 μ L を添加し、さらに 10 分間培養後に LPS 10 μ g/mL を含有する DMEM 培地 200 μ L を添加した (LPS 終濃度 5 μ g/mL)。その後、1 時間培養した。培養上清を回収し、レビス Mouse IFN- γ ELISA Kit (富士フイルムワコーシバヤギ株式会社, 群馬) を用いて手順書に従い測定を行った。なお、LPS 刺激時間については刺激 1 時間後および 3 時間後の IFN- γ 産生量が同等であったことから、刺激時間は 1 時間とした。

第一章の統計処理

実験で得られた数値は平均値 \pm 標準誤差で表記した。群間の比較において、一元配置分散分析を行った後、対照群との平均値の有意差検定には多重比較検定法の一つである Dunnett 法を用い、危険率 p 値が 0.05 以下のものを有意とみなした。統計解析には Super ANOVA (ver 1.11, Abacus Concepts, Inc, CA, USA) を用いた。

第二章の実験

第一節および第二節の実験

RAW264.7 細胞からの細胞質画分と細胞膜画分の抽出

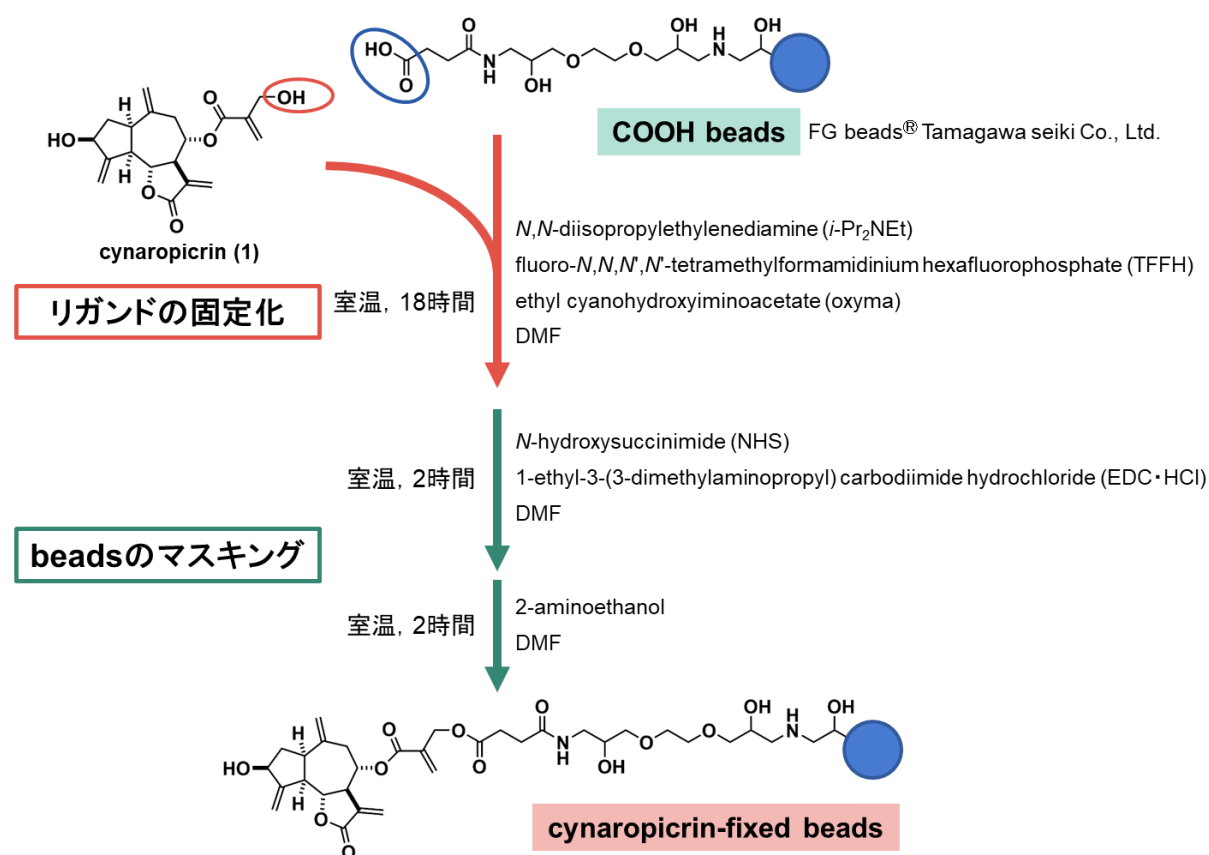
細胞抽出液の分画および調製は、手順書に従い実験を行った。すなわち、RAW264.7 細胞 8.8×10^7 cells/35 mL/flask を 175cm^2 フラスコで培養し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、LPS (*Escherichia coli* 055: B5 由来) $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する DMEM 培地 35 mL を添加し、30 分間培養した。培養後、RAW264.7 細胞をセルスクレーパーを用いて回収し、PBS (-) で洗浄した後、細胞の 2 倍量の Buffer A (10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) を添加して氷上で 15 分間静置した。その後、10% Triton X-100 を終濃度が 1% になるよう添加し、ボルテックスミキサーにて 10 秒間攪拌した後、遠心分離を行った。上清を回収し、細胞質画分と細胞膜画分の混合物を得た。上清を Buffer C (20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) で 10 倍に希釈し、 -80°C で保管した。タンパク質の定量は、Protein Assay BCA Kit を用いて行った。

RAW264.7 細胞からの核画分の抽出

RAW264.7 細胞 8.8×10^7 cells/35 mL/flask を 175cm^2 フラスコで培養し、6 時間前培養した。接着した RAW264.7 細胞を PBS (-) で洗浄後、LPS (*Escherichia coli* 055: B5 由来) $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する DMEM 培地 35 mL を添加し、30 分間培養した。培養後、RAW264.7 細胞をセルスクレーパーを用いて回収し、PBS (-) で洗浄した後、8-min Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio, CA, USA) を用い、手順書に従い実験を行った。タンパク質の定量は、Protein Assay BCA Kit を用いて行った。

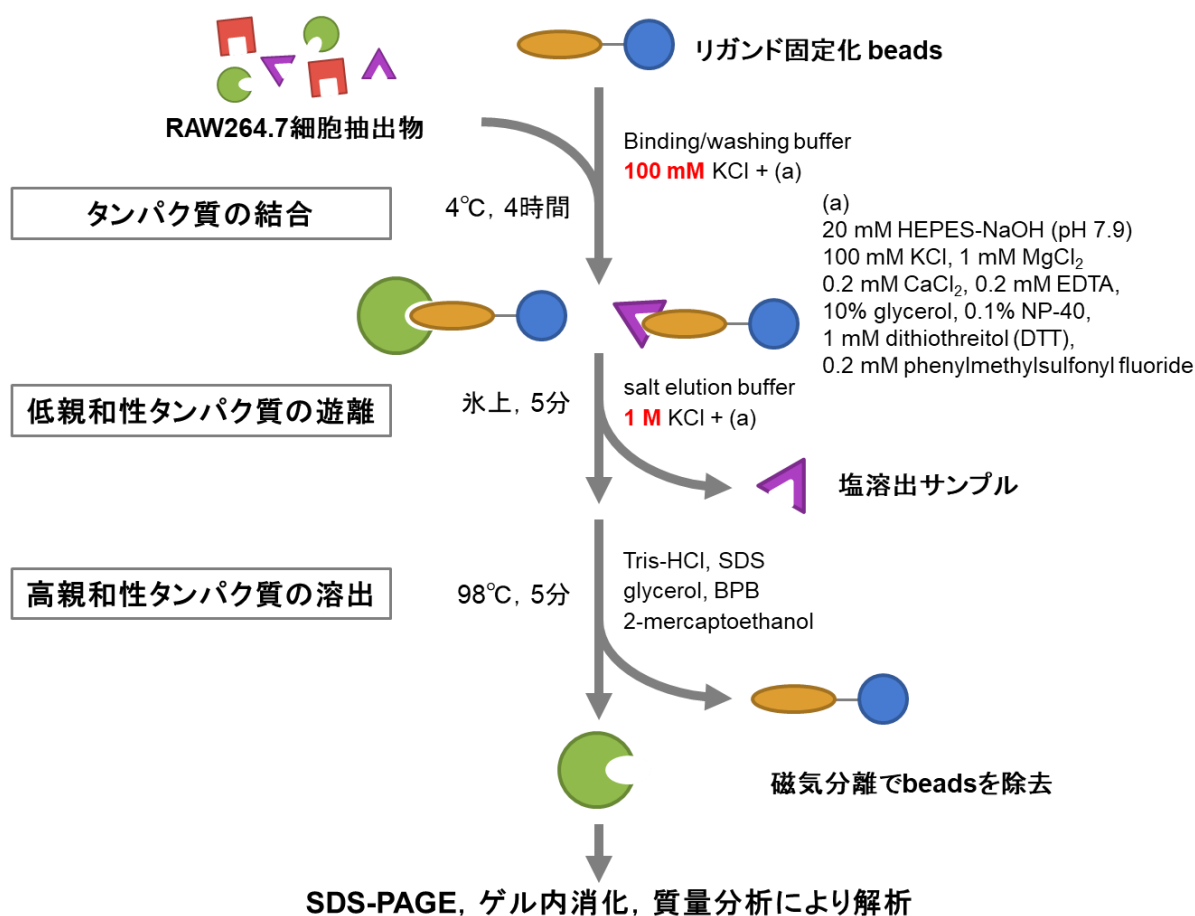
COOH beads へのリガンドの固定化

COOH beads (FG beads[®]) へのリガンドの固定化は、手順書に従い実験を行った。すなわち、COOH リンカー結合磁気ビーズ、リガンド、*N,N*-diisopropylethylenediamine (*i*-Pr₂NEt), fluoro-*N,N,N,N*-tetramethylformamidinium hexafluorophosphate (TFFH), および Oxyma Pure (ethyl cyanohydroxyiminoacetate) と *N,N*-dimethylformamide (DMF) 中でマイクロチューブミキサーを用いて攪拌しながら室温で 18 時間反応させ、リガンドをビーズに結合させた。ビーズを DMF で洗浄した後、DMF 中で *N*-hydroxysuccinimide (NHS) および 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC · HCl) と室温で 2 時間反応させた。ビーズを DMF で洗浄した後、2-aminoethanol と DMF 中でマイクロチューブミキサーを用いて攪拌しながら室温で 2 時間反応させ、ビーズのマスキングを行った。ビーズを超純水で洗浄した後、超純水中に分散させ、4°C で保管した。



リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製と同定

リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製は手順書に従い実験を行った。すなわち、リガンドを固定化したビーズ 0.5 mg と結合・洗浄バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) で総タンパク量を 1 mg/mL に調製した RAW264.7 細胞抽出液 200 μL をローテーターを用いて攪拌しながら 4°C で 4 時間反応させた。ビーズを結合・洗浄バッファーで洗浄した後、塩溶出バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) 30 μL に分散させ、氷上で 5 分間静置して低親和性タンパク質を遊離させた。上清は塩溶出サンプルとして回収し、試料用緩衝液 (2ME+)(×2) (0.125 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) 30 μL を添加した。ビーズは 2 倍に希釈した試料用緩衝液 (2ME+)(×2) 60 μL に分散させた。ビーズ分散液および塩溶出サンプルはともに 98°C で 5 分間加熱した。ビーズ分散液は上清を回収し、塩溶出サンプルとともに SDS-PAGE を行った。電気泳動後、銀染色 MS キットを用いて手順書通りに銀染色を行った。検出されたタンパク質についてゲル内消化を行い、質量分析を行った。質量分析データについて Mascot search (<http://www.matrixscience.com/>) にてタンパク質の同定を行った。



引用文献

- 1) Arango Duque, G.; Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 491.
- 2) Gao, J. J.; Filla, M. B.; Fultz, M. J.; Vogel, S. N.; Russell, S. W.; Murphy, W. J. Autocrine/Paracrine IFN- α Mediates the Lipopolysaccharide-Induced Activation of Transcription Factor Stat1 α in Mouse Macrophages: Pivotal Role of Stat1 α in Induction of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 4803–4810.
- 3) Liu, Y. C.; Zou, X. B.; Chai, Y. F.; Yao, Y. M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 520–529.
- 4) Coussens, L. M.; Werb, Z. Inflammation and Cancer. *Nature* **2002**, *420* (6917), 860–867.
- 5) Wang, Y.; Han, C. C.; Cui, D.; Li, Y.; Ma, Y.; Wei, W. Is Macrophage Polarization Important in Rheumatoid Arthritis? *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *50*, 345–352.
- 6) Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2005**, *4*, 471–479.
- 7) Wang, H.; Wang, L.; Xie, Z.; Zhou, S.; Li, Y.; Zhou, Y.; Sun, M. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (7), 1881.
- 8) Aktan, F. iNOS-Mediated Nitric Oxide Production and Its Regulation. *Life Sci.* **2004**, *75*, 639–653.
- 9) Dey, P.; Panga, V.; Raghunathan, S. A Cytokine Signalling Network for the Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* **2016**, *11*, e0161306.
- 10) Chan, E. D.; Riches, D. W. IFN- γ + LPS Induction of iNOS Is Modulated by ERK, JNK/SAPK, and P38 (MAPK) in a Mouse Macrophage Cell Line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *280*, C441-50.
- 11) Rao, K. M. K. MAP Kinase Activation in Macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 3–10.
- 12) Kim, E. K.; Choi, E.-J. Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 396–405.
- 13) Viatour, P.; Merville, M. P.; Bours, V.; Chariot, A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B Proteins: Implications in Cancer and Inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 43–52.
- 14) Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- κ B Signaling in Inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- 15) Ivashkiv, L. B.; Hu, X. Signaling by STATs. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, 159–168.
- 16) Jacobs, A. T.; Ignarro, L. J. Lipopolysaccharide-Induced Expression of Interferon-Beta Mediates the Timing of Inducible Nitric-Oxide Synthase Induction in RAW 264.7 Macrophages. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47950–47957.

- 17) Yu, Q.; Zeng, K.; Ma, X.; Song, F.; Jiang, Y.; Tu, P.; Wang, X. Resokaempferol-Mediated Anti-Inflammatory Effects on Activated Macrophages via the Inhibition of JAK2/STAT3, NF- κ B and JNK/P38 MAPK Signaling Pathways. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *38*, 104–114.
- 18) Gao, J.; Morrison, D. C.; Parmely, T. J.; Russell, S. W.; Murphy, W. J. An Interferon- γ -Activated Site (GAS) Is Necessary for Full Expression of the Mouse iNOS Gene in Response to Interferon- γ and Lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1226–1230.
- 19) Majoros, A.; Platanitis, E.; Kernbauer-Hölzl, E.; Rosebrock, F.; Müller, M.; Decker, T. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 29.
- 20) Wen, Z.; Zhong, Z.; Darnell, J. E., Jr. Maximal Activation of Transcription by Stat1 and Stat3 Requires Both Tyrosine and Serine Phosphorylation. *Cell* **1995**, *82*, 241–250.
- 21) Cai, B.; Cai, J. P.; Luo, Y. L.; Chen, C.; Zhang, S. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. *Inflammation* **2015**, *38*, 1599–1608.
- 22) Quintana, J.; Estévez, F. Recent Advances on Cytotoxic Sesquiterpene Lactones. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 4355–4361.
- 23) Chadwick, M.; Trewin, H.; Gawthrop, F.; Wagstaff, C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12780–12805.
- 24) Lyß, G.; Knorre, A.; Schmidt, T. J.; Pahl, H. L.; Merfort, I. The Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- κ B by Directly Targeting P65. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (50), 33508–33516.
- 25) Duraipandiyani, V.; Al-Harbi, N. A.; Ignacimuthu, S.; Muthukumar, C. Antimicrobial Activity of Sesquiterpene Lactones Isolated from Traditional Medicinal Plant, *Costus speciosus* (Koen Ex.Retz.) Sm. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 13.
- 26) Ulloa, J. L.; Spina, R.; Casasco, A.; Petray, P. B.; Martino, V.; Sosa, M. A.; Frank, F. M.; Muschietti, L. V. Germacranolide-Type Sesquiterpene Lactones from *Smilax sonchifolius* with Promising Activity against *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 567.
- 27) Fukuda, K.; Akao, S.; Ohno, Y.; Yamashita, K.; Fujiwara, H. Inhibition by Costunolide of Phorbol Ester-Induced Transcriptional Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in a Human Monocyte Cell Line THP-1. *Cancer Lett.* **2001**, *164*, 7–13.
- 28) Matsuda, H.; Toguchida, I.; Ninomiya, K.; Kageura, T.; Morikawa, T.; Yoshikawa, M. Effects of Sesquiterpenes and Amino Acid-Sesquiterpene Conjugates from the Roots of *Saussurea lappa* on Inducible Nitric Oxide Synthase and Heat Shock Protein in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 709–715.

- 29) Koo, T. H.; Lee, J. H.; Park, Y. J.; Hong, Y. S.; Kim, H. S.; Kim, K. W.; Lee, J. J. A Sesquiterpene Lactone, Costunolide, from *Magnolia Grandiflora* Inhibits NF-Kappa B by Targeting I Kappa B Phosphorylation. *Planta Med.* **2001**, *67*, 103–107.
- 30) Kwok, B. H.; Koh, B.; Ndubuisi, M. I.; Eloffsson, M.; Crews, C. M. The Anti-Inflammatory Natural Product Parthenolide from the Medicinal Herb Feverfew Directly Binds to and Inhibits IkappaB Kinase. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 759–766.
- 31) García-Piñeres, A. J.; Lindenmeyer, M. T.; Merfort, I. Role of Cysteine Residues of P65/NF-KappaB on the Inhibition by the Sesquiterpene Lactone Parthenolide and *N*-Ethyl Maleimide, and on Its Transactivating Potential. *Life Sci.* **2004**, *75*, 841–856.
- 32) Paulsen, E.; Andersen, K. E. Screening for Compositae Sensitization with Pure Allergens: Implications of Molecular Structure, Strength of Reaction, and Time of Testing. *Contact Dermatitis* **2011**, *64*, 96–103.
- 33) Paulsen, E.; Andersen, K. E. Screening for Compositae Contact Sensitization with Sesquiterpene Lactones and Compositae Mix 2.5% Pet. *Contact Dermatitis* **2019**, *81*, 368–373.
- 34) <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/sesqlactone/sesqlactone.html> Cornell University Department of Animal Science (accessed Feb 5, 2021)
- 35) Nassar, M. I.; Mohamed, T.K.; Elshamy, A. I.; El-Toumy, S. A.; Abdel Lateef.; A. M.; Farrag, A. R. Chemical Constituents and Anti-ulcerogenic Potential of the Scales of *Cynara scolymus* (artichoke) Heads. *J Sci Food Agric.* **2013**, *93*, 2494–2501.
- 36) Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. Globe Artichoke: A Functional Food and Source of Nutraceutical Ingredients. *J. Funct. Foods* **2009**, *1*, 131–144.
- 37) Sánchez-Rabaneda, F.; Jáuregui, O.; Lamuela-Raventós, R. M.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Identification of Phenolic Compounds in Artichoke Waste by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1008*, 57–72.
- 38) Mulinacci, N.; Prucher, D.; Peruzzi, M.; Romani, A.; Pinelli, P.; Giaccherini, C.; Vincieri, F. F. Commercial and Laboratory Extracts from Artichoke Leaves: Estimation of Caffeoyl Esters and Flavonoidic Compounds Content. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 349–357.
- 39) Salekzamani, S.; Ebrahimi-Mameghani, M.; Rezazadeh, K. The Antioxidant Activity of Artichoke (*Cynara scolymus*): A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies: Antioxidant Activity of Artichoke (*Cynara scolymus*). *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 55–71.
- 40) Magielse, J.; Verlaet, A.; Breynaert, A.; Keenoy, B. M. Y.; Apers, S.; Pieters, L.; Hermans, N. Investigation of the in Vivo Antioxidative Activity of *Cynara scolymus* (Artichoke) Leaf Extract in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 211–215.
- 41) Zapolska-Downar, D.; Zapolski-Downar, A.; Naruszewicz, M.; Siennicka, A.; Krasnodebska, B.; Koldziej, B. Protective Properties of Artichoke (*Cynara Scolymus*) against Oxidative Stress Induced in Cultured Endothelial Cells and Monocytes. *Life Sci.* **2002**, *71*, 2897–2808.

- 42) Xia, N.; Pautz, A.; Wollscheid, U.; Reifenberg, G.; Förstermann, U.; Li, H. Artichoke, Cynarin and Cyanidin Downregulate the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Coronary Smooth Muscle Cells. *Molecules* **2014**, *19*, 3654–3668.
- 43) Shimoda, H.; Ninomiya, K.; Nishida, N.; Yoshino, T.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Anti-Hyperlipidemic Sesquiterpenes and New Sesquiterpene Glycosides from the Leaves of Artichoke (*Cynara scolymus* L.): Structure Requirement and Mode of Action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 223–228
- 44) Emendörfer, F.; Emendörfer, F.; Bellato, F.; Noldin, V. F.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R. A.; Delle Monache, F.; Cardozo, A. M. Antispasmodic Activity of Fractions and Cynaropicrin from *Cynara scolymus* on Guinea-Pig Ileum. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 902–904.
- 45) da Silva, C. F.; Batista, D. da G. J.; De Araújo, J. S.; Batista, M. M.; Lionel, J.; de Souza, E. M.; Hammer, E. R.; da Silva, P. B.; De Mieri, M.; Adams, M.; Zimmermann, S.; Hamburger, M.; Brun, R.; Schühly, W.; Soeiro, M. de N. C. Activities of Psilostachyin A and Cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 5307–5314.
- 46) Tanaka, Y. T.; Tanaka, K.; Kojima, H.; Hamada, T.; Masutani, T.; Tsuboi, M.; Akao, Y. Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. Suppresses Photoaging of Skin by Inhibiting the Transcription Activity of Nuclear Factor-Kappa B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 518–523.
- 47) Ha, T. J.; Jang, D. S.; Lee, J. R.; Lee, K. D.; Lee, J.; Hwang, S. W.; Jung, H. J.; Nam, S. H.; Park, K. H.; Yang, M. S. Cytotoxic Effects of Sesquiterpene Lactones from the Flowers of *Hemisteptia lyrata* B. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 925–928.
- 48) Miyase, T.; Ueno, A.; Noro, T.; Kuroyanagi, M.; Fukushima, S. Studies on Sesquiterpene Glycosides from *Crepis japonica* Benth. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4451–4456.
- 49) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Garcia-Lliso, V.; Susanna, A.; Garcia-Jacas, N. Sesquiterpene Lactones, Lignans and Aromatic Esters from *Cheirolophus* Species. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1101–1107.
- 50) Marco, J. A.; Sanz, J. F.; Sancenon, F.; Susanna, A.; Rustaiyan, A.; Saberi, M. Sesquiterpene Lactones and Lignans from *Centaurea* Species. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3527–3530.
- 51) Ha, T. J.; Yang, M. S.; Pak, Y. New Guaiane-Type Sesquiterpene Lactones from *Hemisteptia lyrata* Bunge. *Heterocycles* **2002**, *57*, 151–155.
- 52) Ha, T. J.; Park, K. H.; Jang, D. S.; Lee, J. R.; Park, K. M.; Yang, M.S, New Sesquiterpene Lactones from *Hemisteptia lyrata* Bunge. *Heterocycles* **2002**, *60*, 623–629.
- 53) Gach, K.; Długosz, A.; Janecka, A. The Role of Oxidative Stress in Anticancer Activity of Sesquiterpene Lactones. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2015**, *388*, 477–486.
- 54) Natarajan, K.; Singh, S.; Burke, T. R., Jr; Grunberger, D.; Aggarwal, B. B. Caffeic Acid Phenethyl Ester Is a Potent and Specific Inhibitor of Activation of Nuclear Transcription Factor NF-Kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 9090–9095.

- 55) Murakami, Y.; Kawata, A.; Suzuki, S.; Fujisawa, S. Cytotoxicity and Pro-/Anti-Inflammatory Properties of Cinnamates, Acrylates and Methacrylates against RAW264.7 Cells. *In Vivo* **2018**, *32*, 1309–1322.
- 56) Aptula, A. O.; Roberts, D. W. Mechanistic Applicability Domains for Nonanimal-Based Prediction of Toxicological End Points: General Principles and Application to Reactive Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1097–1105.
- 57) Rodrigues, T.; Reker, D.; Schneider, P.; Schneider, G. Counting on Natural Products for Drug Design. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 531–541.
- 58) Avonto, C.; Tagliatalata-Scafati, O.; Pollastro, F.; Minassi, A.; Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Appendino, G. An NMR Spectroscopic Method to Identify and Classify Thiol-Trapping Agents: Revival of Michael Acceptors for Drug Discovery? *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2011**, *50*, 467–471.
- 59) Song, X.; Zhang, M.; Dai, E.; Luo, Y. Molecular Targets of Curcumin in Breast Cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 23–29.
- 60) Kahkhaie, K. R.; Mirhosseini, A.; Aliabadi, A.; Mohammadi, A.; Mousavi, M. J.; Haftcheshmeh, S. M.; Sathyapalan, T.; Sahebkar, A. Curcumin: A Modulator of Inflammatory Signaling Pathways in the Immune System. *Inflammopharmacology* **2019**, *27*, 885–900.
- 61) Murakami, A.; Takahashi, D.; Kinoshita, T.; Koshimizu, K.; Kim, H. W.; Yoshihiro, A.; Nakamura, Y.; Jiwajinda, S.; Terao, J.; Ohigashi, H. Zerumbone, a Southeast Asian Ginger Sesquiterpene, Markedly Suppresses Free Radical Generation, Proinflammatory Protein Production, and Cancer Cell Proliferation Accompanied by Apoptosis: The Alpha,Beta-Unsaturated Carbonyl Group Is a Prerequisite. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 795–802.
- 62) Girisa, S.; Shabnam, B.; Monisha, J.; Fan, L.; Halim, C. E.; Arfuso, F.; Ahn, K. S.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A. B. Potential of Zerumbone as an Anti-Cancer Agent. *Molecules* **2019**, *24*, 734.
- 63) Sae-Wong, C.; Matsuda, H.; Tewtrakul, S.; Tansakul, P.; Nakamura, S.; Nomura, Y.; Yoshikawa, M. Suppressive Effects of Methoxyflavonoids Isolated from *Kaempferia parviflora* on Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in RAW 264.7 Cells. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *136*, 488–495.
- 64) Morikawa, T.; Sueyoshi, M.; Chaipech, S.; Matsuda, H.; Nomura, Y.; Yabe, M.; Matsumoto, T.; Ninomiya, K.; Yoshikawa, M.; Pongpiriyadacha, Y.; Hayakawa, T.; Muraoka, O. Suppressive Effects of Coumarins from *Mammea siamensis* on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in RAW264.7 Cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4968–4977.
- 65) Hayata, M.; Watanabe, N.; Kamio, N.; Tamura, M.; Nodomi, K.; Tanaka, K.; Iddamalagoda, A.; Tsuda, H.; Ogata, Y.; Sato, S.; Ueda, K.; Imai, K. Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. Suppresses *Porphyromonas gingivalis* LPS-Induced Production of Inflammatory Cytokines in Human Gingival Fibroblasts and RANKL-Induced Osteoclast Differentiation in RAW264.7 Cells. *J. Nat. Med.* **2019**, *73*, 114–123.

- 66) Sobota, R.; Szwed, M.; Kasza, A.; Bugno, M.; Kordula, T. Parthenolide Inhibits Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) Induced by Cytokines of the IL-6 Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 329–333.
- 67) Legendre, F.; Dudhia, J.; Pujol, J.-P.; Bogdanowicz, P. JAK/STAT but Not ERK1/ERK2 Pathway Mediates Interleukin (IL)-6/Soluble IL-6R down-Regulation of Type II Collagen, Aggrecan Core, and Link Protein Transcription in Articular Chondrocytes. Association with a down-Regulation of SOX9 Expression: Association with a down-Regulation of Sox9 Expression. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2903–2912
- 68) Liu, M.; Xiao, C.; Sun, M.; Tan, M.; Hu, L.; Yu, Q. Parthenolide Inhibits STAT3 Signaling by Covalently Targeting Janus Kinases. *Molecules* **2018**, *23*, 1478.
- 69) Scarponi, C.; Butturini, E.; Sestito, R.; Madonna, S.; Cavani, A.; Mariotto, S.; Albanesi, C. Inhibition of Inflammatory and Proliferative Responses of Human Keratinocytes Exposed to the Sesquiterpene Lactones Dehydrocostuslactone and Costunolide. *PLoS One* **2014**, *9*, e107904.
- 70) Butturini, E.; Cavaliere, E.; de Prati, A. C.; Darra, E.; Rigo, A.; Shoji, K.; Murayama, N.; Yamazaki, H.; Watanabe, Y.; Suzuki, H.; Mariotto, S. Two Naturally Occurring Terpenes, Dehydrocostuslactone and Costunolide, Decrease Intracellular GSH Content and Inhibit STAT3 Activation. *PLoS One* **2011**, *6*, e20174.
- 71) Ando, S.; Matsuda, H.; Morikawa, T.; Yoshikawa, M. 1'S-1'-Acetoxychavicol Acetate as a New Type Inhibitor of Interferon-Beta Production in Lipopolysaccharide-Activated Mouse Peritoneal Macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3289–3294.
- 72) Kobayashi, S.; Hoshino, T.; Hiwasa, T.; Satoh, M.; Rahmutulla, B.; Tsuchida, S.; Komukai, Y.; Tanaka, T.; Matsubara, H.; Shimada, H.; Nomura, F.; Matsushita, K. Anti-FIRs (PUF60) Auto-Antibodies Are Detected in the Sera of Early-Stage Colon Cancer Patients. *Oncotarget* **2016**, *7*, 82493–82503.
- 73) Fiorentino, D. F.; Presby, M.; Baer, A. N.; Petri, M.; Rieger, K. E.; Soloski, M.; Rosen, A.; Mammen, A. L.; Christopher-Stine, L.; Casciola-Rosen, L. PUF60: A Prominent New Target of the Autoimmune Response in Dermatomyositis and Sjögren's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 1145–1151.
- 74) Sun, D.; Lei, W.; Hou, X.; Li, H.; Ni, W. PUF60 Accelerates the Progression of Breast Cancer through Downregulation of PTEN Expression. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 821–830.
- 75) Long, Q.; Hua, Y.; He, L.; Zhang, C.; Sui, S.; Li, Y.; Qiu, H.; Tian, T.; An, X.; Luo, G.; Yan, Y.; Zhao, A.; Shi, D.; Xie, F.; Chen, M.; Zheng, F.; Deng, W. Poly (U) Binding Splicing Factor 60 Promotes Renal Cell Carcinoma Growth by Transcriptionally Upregulating Telomerase Reverse Transcriptase. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 3002–3017.
- 76) Kew, C.; Huang, W.; Fischer, J.; Ganesan, R.; Robinson, N.; Antebi, A. Evolutionarily Conserved Regulation of Immunity by the Splicing Factor RNP-6/PUF60. *Elife* **2020**, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.57591>.
- 77) Dahout-Gonzalez, C.; Nury, H.; Trézéguet, V.; Lauquin, G. J.; Pebay-Peyroula, E.; Brandolin, G. Molecular, Functional, and Pathological Aspects of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Physiology (Bethesda)* **2006**, *21*, 242–249.

- 78) Chevrollier, A.; Loiseau, D.; Reynier, P.; Stepien, G. Adenine Nucleotide Translocase 2 Is a Key Mitochondrial Protein in Cancer Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 562–567.
- 79) Gurley, E. S.; Rahman, M.; Hossain, M. J.; Nahar, N.; Faiz, M. A.; Islam, N.; Sultana, R.; Khatun, S.; Uddin, M. Z.; Haider, M. S.; Islam, M. S.; Ahmed, B.-N.; Rahman, M. W.; Mondal, U. K.; Luby, S. P. Fatal Outbreak from Consuming *Xanthium strumarium* Seedlings during Time of Food Scarcity in Northeastern Bangladesh. *PLoS One* **2010**, *5*, e9756.
- 80) Anwar, M.; Kasper, A.; Steck, A. R.; Schier, J. G. Bongkreic Acid—a Review of a Lesser-Known Mitochondrial Toxin. *J. Med. Toxicol.* **2017**, *13*, 173–179.
- 81) Intayoung, P.; Limtrakul, P.; Yodkeeree, S. Antiinflammatory Activities of Crebanine by Inhibition of NF- κ B and AP-1 Activation through Suppressing MAPKs and Akt Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39*, 54–61.
- 82) Jang, J. Y.; Lee, M. J.; You, B. R.; Jin, J. S.; Lee, S. H.; Yun, Y. R.; Kim, H. J. *Allium hookeri* Root Extract Exerts Anti-Inflammatory Effects by Nuclear Factor- κ B Down-Regulation in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 126.