

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総合研究報告書

マクロファージの活性化に対するアカメガシワ及びシジュウムの調節作用

協力研究者 石井 里枝 埼玉県衛生研究所 主任

研究要旨 アカメガシワ果皮の 80%アセトン抽出エキス (MJE) はインターフェロン- γ (IFN- γ) 及びリポポリサッカライド (LPS) で刺激したマクロファージ様株化細胞 RAW 264.7 細胞の一酸化窒素 (NO) 産生を抑制した。そして、7 種の phloroglucinol 誘導体を活性成分として同定した。これらの誘導体の中で isomallotochromanol が最も強い抑制作用を示した (IC_{50} : 10.7 μ M)。MJE 及びこれら phloroglucinol 誘導体は iNOS mRNA の発現を抑制することによる NO 合成酵素 (iNOS) の誘導阻害と、iNOS の酵素活性に対する阻害作用という二つのメカニズムにより NO 抑制作用が発現することが明らかとなった。また、MJE 及び phloroglucinol 誘導体はプロスタグランジン (PG) 産生の初発酵素である PLA₂ の酵素活性、律速酵素であるプロスタグランジン合成酵素 (PGHS) -1 及び-2 の酵素活性、PGHS-1 蛋白発現量に対して影響を及ぼさず、PGHS-2 mRNA 発現を阻害することにより、特異的に PGHS-2 蛋白誘導を抑制する結果、PGE₂ 産生を低下させることが明らかとなった。さらに、これらは TNF- α 及び IL-6 の遺伝子発現を阻害し、TNF- α 及び IL-6 産生を抑制した。これら NO、PGE₂、TNF- α 及び IL-6 の抑制作用の機序は I κ B の分解抑制、NF κ B 活性化の阻止によるものであることが明らかとなった。

一方、シジュウム葉 80%アセトン抽出エキス (PS) は IL-12 (p40) 産生に対し影響を及ぼさなかったが、単離成分 5 種は増強作用を、2 種は抑制作用を示した。

A. 研究目的

マクロファージは生体防御や炎症反応において重要な役割を担う細胞である。活性化したマクロファージが産生する NO、PG、TNF- α 及び IL-6 等のメディエーターは生体外部からの病原体等の侵入に対する防御

やがん細胞に対する攻撃など重要な分子として同定されている一方、急性及び慢性炎症反応において、宿主の正常な組織や細胞を障害することが報告されている。

一方、アカメガシワ果皮エキスはこれまで抗がん作用、抗ウイルス作用などが報告

されているが、その他の薬理学的作用は十分明らかとなっていない。我々はマクロファージからの NO 産生を抑制する植物を探索する目的で広くスクリーニングを行ったところ、このアカメガシワ果皮エキスに抑制活性が認められた。そこで、活性成分を単離するとともに NO、PGE₂、TNF- α 及び IL-6 産生に対する作用とその機序について検討した。

一方、PS はアトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患に有用であることが協同研究者らによって明らかとなっている。そこで、Th1/Th2 細胞の分化に関与する IL-12 の産生に対する PS 及び成分の影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 活性成分の単離

MJE を水に懸濁し、ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノールで液々分配した。ジエチルエーテル画分からシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、2,6-dihydroxy-3-methyl-4-methoxyaceto-phenone

(1)、mallotophenone (2)、mallotojaponin (3)、butyrylmallotolerin (4)、

mallotochromene (5)、malloto-chromanol

(7)、isobutyrylmalloto-chromanol (8)、

isomallotochromanol (10) を得た。また、構造

活性相関を検討するため、化合物 3 の isoprenyl 側鎖を hydroxy 基を介して閉環させ、malloto-chroman (6) 及び

isomallotochromene (9) を合成した。構造

式を Fig.1 に示す。

(2) NO 産生抑制作用と iNOS 蛋白の抽出

マクロファージに株化細胞 RAW264.7 細胞を用いた。細胞を Ham's F12 培地 (10% ウシ胎児血清含有) で 2 時間培養した後、

MJE または phloroglucinol 誘導体を種々の濃度で培地に添加した。また、同時に IFN- γ (10 U/ml) 及び LPS (100 ng/ml) を添加した。8 時間培養後、上清を採取し、NO の酸化体である NO₂ を Griess 法で定量した。また、iNOS 蛋白を定量するため細胞を集め、溶解し、細胞抽出物を得た。

(3) iNOS 蛋白の定量

(2) で得られた細胞抽出物の蛋白 60 μ g 分を SDS-PAGE に供した。ゲル上の蛋白を PVDF メンブランへ転写し、モノクローナル抗マウスマクロファージ iNOS 抗体、ラビット抗マウス IgG 抗体、最後に I²⁵ 標識 Protein A と反応させた。メンブラン上の 130 kDa の iNOS 蛋白量を I²⁵ の放射活性を定量することにより求めた。

(3) iNOS 酵素活性阻害作用

a. Intact Cell 系

RAW264.7 を IFN- γ (10 U/ml) 及び LPS (100 ng/ml) 共存下、16 時間培養し、iNOS を発現させた。その細胞を Hanks 液に懸濁し、MJE または phloroglucinol 誘導体を添加した。5 分間培養した後、L-arginine 及び carboxy-PTIO を加え、反応を開始した。1 時間培養した後、上清中の NO₂ を定量した。

b. Vitro 系

a と同様に、RAW264.7 細胞に iNOS を発現させた。細胞を溶解し、iNOS 粗抽出物として使用した。反応液に iNOS 粗抽出物、MJE または phloroglucinol 誘導体及び L-[U-¹⁴C]arginine を加え、15 分間反応させた。上清を採取し、イオン交換樹脂で生成した L-[U-¹⁴C]citrulline と未反応の L-[U-¹⁴C]arginine とを分離した。L-[U-¹⁴C]citrulline 画分の放射活性を測定することにより、生成した L-[U-¹⁴C]citrulline を定量した。

(4) iNOS mRNA の定量

RAW264.7 細胞を IFN- γ 及び LPS 共存下、MJE または phloroglucinol 誘導体を添加し 6 時間培養した。その後、total RNA を抽出し、RT-PCR に供した。iNOS のプライマーに 5'-ACCTACTTCC TGGACATTACGACCC-3' [s]、5'-AAGGG AGCAATGCCCGTA CCAG GCC-3' [a] (456 bp) を、 β -actin のプライマーに 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCAA-3' [s]、5'-CT CTTTGATGTCACGCACGATTC-3' [a] (540 bp) を使用した。

(5) PGE₂、TNF- α 及び IL-6 産生抑制試験

RAW264.7 細胞を 2 時間培養後、MJE または phloroglucinol 誘導体及び LPS (100 ng/ml) を添加し、16 時間培養した。上清を採取し、ELISA で定量した。

(6) アラキドン酸 (AA) 遊離活性に対する作用

RAW264.7 細胞を [1-¹⁴C]AA を含む培地で 18 時間培養した。細胞を回収し、取り込まれなかった AA を除去するため PBS で洗浄し、MJE または phloroglucinol 誘導体及び LPS (100 ng/ml) を添加し、0-2 時間培養した。培養上清を採取し、遠心後、上清の放射活性を液体シンチレーションアナライザーで測定した。

(7) PGHS-1 酵素活性に対する作用

RAW264.7 細胞を cycloheximide 含有培地で調製し、4 時間培養後、細胞を回収した。PBS で洗浄後、新たに cycloheximide 含有培地で調製し、10 分間培養後、MJE または phloroglucinol 誘導体及び AA を添加、さらに 3 時間培養した。培養上清を採取し、上清中の PGE₂ 量を ELISA で測定した。

(8) PGHS-2 酵素活性に対する作用

RAW264.7 細胞を 2 時間培養後、aspirin

を添加し、さらに 4 時間培養した。細胞を回収し、取り込まれなかった aspirin を除去するため、PBS で洗浄した。新たに LPS 含有培地で調製した。MJE または phloroglucinol 誘導体を添加し、さらに 30 分間培養した。培養上清を採取し、上清中の PGE₂ 量を ELISA で測定した。

(9) PGHS-1 蛋白量及び PGHS-2 蛋白量に対する作用

RAW264.7 細胞に MJE または phloroglucinol 誘導体及び LPS (100 ng/ml) を添加した。8 時間培養後、細胞を回収し、細胞抽出物を得た。60 μ g 蛋白量の細胞抽出液を SDS-PAGE に供した。一次抗体としてポリクローナルヤギ抗 PGHS-1 抗体またはポリクローナルラビット抗 PGHS-2 抗体を、PGHS-1 の検出には二次抗体としてラビット抗ヤギ IgG 抗体を使用した。PGHS-1 及び PGHS-2 とともに、最後に ¹²⁵I-標識 proteinA と反応させた。

(10) PGHS-2、TNF- α 及び IL-6 mRNA 発現抑制作用

RAW264.7 細胞を MJE または phloroglucinol 誘導体、LPS (100ng/ml) 共存下、6 時間培養した。その後、total RNA を抽出し、RT-PCR に供した。プライマーは PGHS-2 mRNA には 5'-TCAAAAGAAGTG CTGGAAAAGGTT-3' [s]、5'-TCTACCTG AGTGTCTTTGACTGTG-3' [a] を、TNF- α mRNA のプライマーには 5'-CCAA GGGATGAGAAGTTCCCAA-3' [s]、5'-CTCCTGGTATGAGATAGCAAA-3' [a] を、IL-6 mRNA のプライマーには 5'-TTCCT CTCTGCAAGAGACT-3' [s]、5'-TGTAT CTCTCTGAAGGACT-3' [a] を用いた。

(11) 核蛋白及び細胞質蛋白の抽出

RAW264.7 細胞を MJE または phloroglucinol 誘導体及び LPS (100ng/ml) 共存下、1 時間培養した。細胞を回収し、細胞質抽出画分と核抽出画分を採取した。

(1 2) NF- κ B 抑制実験

EMSA により行った。DNA プローブ (NF- κ B コンセンサス配列: 5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3') を [γ - 32 P] ATP で標識した。バンドの特異性を確認するために、非標識 DNA プローブを用いて競合実験を行った。また、ポリクローナルヤギ抗 NF κ B p50 抗体またはポリクローナルラビット抗 NF κ B p65 抗体を用いてスーパーシフトさせることにより、DNA 結合蛋白を同定した。

(1 3) I κ B α 蛋白分解抑制試験

60 μ g 蛋白量の細胞抽出液を SDS-PAGE に供した。一次抗体にポリクローナルヤギ抗 I κ B α 抗体を、二次抗体にラビット抗ヤギ IgG 抗体を使用した。最後に 125 I-標識した proteinA と反応させた。

(1 4) IL-12 (p40) 産生に対する作用

細胞を調製し、2 時間培養した。IFN- γ (100 U/ml) を添加し、8 時間培養後、PS または単離成分を添加し、16 時間培養した。培養後、上清を採取し、ELISA で IL-12 (p40) を定量した。

(1 5) 統計処理

結果は Dunnett の多重比較法により統計学的有意差を分析した。

C. 研究結果

(1) NO 産生抑制作用

RAW264.7 細胞を IFN- γ 及び LPS 共存下、8 時間培養したところ、顕著な NO 産生が観察された。MJE はこの NO 産生を濃度依

存的に抑制した (IC $_{50}$: 28.9 μ g/ml)

(Fig.2)。活性成分として単離した phloroglucinol 誘導体の中で 2-5、7、8、10 が顕著な抑制作用を示した。これら化合物の中で 10 は最も強い抑制活性を示した (IC $_{50}$: 10.7 μ M)。構造活性相関のため合成した 9 もまた著しい抑制活性を示した (IC $_{50}$: 14.3 μ M)。しかし、これら phloroglucinol 誘導体の構成単位である 1、及び 6 は抑制作用を示さなかった。細胞の viability を MTT 法及び鏡検による形態観察により確認したところ、MJE (30 μ g/ml) 及び単離成分 1-10 (30 μ M) はいずれも細胞の viability に対し影響を及ぼさなかった。

(2) iNOS 酵素活性阻害作用

intact cell 系で、MJE は 30 及び 100 μ M の濃度で NO 産生を 84% 及び 72% に減少させた (Fig.3)。また、phloroglucinol 誘導体は 100 μ M の濃度で 10 が 40%、8 が 49%、4 が 50%、7 が 51%、3 が 55%、9 が 59%、2 が 70% に NO 産生を抑制した。しかし、5 は阻害作用を示さなかった。また、vitro の系では、intact cell 系で強い抑制作用を示した MJE、10、8 及び 4 について検討したが、Table 1 に示すようにいずれも阻害作用を示した。その活性の強弱は intact cell の系で得られた結果と同様な傾向を示した。

(3) iNOS 誘導抑制作用

抑制効果は IFN- γ 及び LPS で活性化した RAW264.7 細胞中の iNOS 蛋白量を 100 とし、相対量で表した。iNOS の誘導に対して、MJE は濃度依存的に抑制作用を示した (Fig.4)。また、phloroglucinol 誘導体は 10 (IC $_{50}$: 1.6 μ M)、9 (IC $_{50}$: 2.7 μ M)、4 (IC $_{50}$: 4.3 μ M)、8 (IC $_{50}$: 6.5 μ M)、3

(IC_{50} : 14.5 μ M)、7 (IC_{50} : 16.8 μ M)、5 (IC_{50} : 23.8 μ M)、2 (30 μ M で 45.7% の抑制活性) に抑制作用が認められた。

(4) iNOS mRNA 発現抑制作用

MJE 及び iNOS 蛋白抑制作用が強く認められた 3、9、10 について iNOS mRNA 発現に対する抑制作用について検討した。MJE 及びいずれの化合物も顕著な抑制作用を示し、特に 9 及び 10 は 30 μ M 濃度でほとんど iNOS mRNA 発現を阻害した (Fig. 5)。

(5) PGE₂ 産生抑制作用

MJE は濃度依存的に抑制作用を示した。また、検討した 7 種 (2-4、7-10) の phloroglucinol 誘導体も抑制作用を示し、その活性の強さは 10 (IC_{50} : 1.0 μ M) > 9 (IC_{50} : 6.0 μ M) > 3 (IC_{50} : 7.2 μ M) > 4 (IC_{50} : 23.8 μ M) = 7 (IC_{50} : 23.8 μ M) > 8 (IC_{50} : > 30 μ M) > 2 (IC_{50} : > 30 μ M) であった (Fig. 6)。特に化合物 9 と 10 は 7 種の phloroglucinol 誘導体の中で強い抑制作用を示した。

(6) AA 遊離に対する作用

刺激 30 分後から培養液中には放射活性の増加が認められ、その後 1 時間までの間に急速に増加した。しかし、それ以降、顕著な遊離は認められなかった (Fig. 7)。

LPS 刺激と同時に MJE または phloroglucinol 誘導体を添加し、AA 遊離に対する抑制効果を検討したところ、MJE (30 μ g/ml) 及び各 phloroglucinol 誘導体 (30 μ M) は測定した 0.5、1、2 時間いずれの時間においても AA 遊離抑制作用を示さなかった (Fig. 7)。このことは、MJE 及び phloroglucinol 誘導体はホスホリパーゼ

(PL) A₂ 酵素に対し影響を及ぼさないことを示唆するものである。

(7) PGHS の酵素活性に対する作用

PGHS-1 酵素活性については cycloheximide 共存下 AA 添加時に産生される PGE₂ 量を測定した。cycloheximide は新たな PGHS-2 蛋白の合成を抑制するものであり、産生する PGE₂ は PGHS-1 由来と考えられる。また、PGHS-2 については Aspirin で既存の PGHS 酵素活性を阻害し、LPS (100ng/ml) と共に、6 時間培養することにより新たに PGHS-2 蛋白を誘導した。この時の PGE₂ 産生は PGHS-2 由来のものと考えられる。

非選択的阻害剤の indomethacin と PGHS-2 選択的阻害剤の NS-398 を用いて、この実験系の有用性について確認した。PGHS-1 由来の PGE₂ 産生に対し、indomethacin は抑制作用を示した (IC_{50} : 0.14 μ M) (Fig. 8 (A))。一方、NS-398 も抑制効果を示したが、その効果は indomethacin よりも 20 倍以上弱いものであった (IC_{50} : 2.15 μ M)。PGHS-2 由来の PGE₂ 産生に対しては indomethacin (IC_{50} : 0.12 μ M)、NS-398 (IC_{50} : 0.23 μ M) とともに強い抑制作用を示した (Fig. 8 (B))。PGHS-2 の IC_{50} 値に対する PGHS-1 の IC_{50} 値の比は indomethacin が 1.2、NS-398 が 9.4 であり、indomethacin は非選択的、NS-398 は PGHS-2 選択的阻害剤であることが確認できた。

以上の結果をもとに、MJE 及び 3、9、及び 10 の PGHS 活性に対する作用を検討した。Fig. 8 に示すように MJE 及び phloroglucinol 誘導体は PGHS-1 及び PGHS-2 由来の PGE₂ 産生をいずれも抑制しなかった。このことから、MJE 及び phloroglucinol 誘導体はいずれの酵素活性も直接、阻害しないことが示唆された。

(8) PGHS 量に対する影響

MJE 及び phloroglucinol 誘導体の PGHS-1 及び 2 蛋白発現量に対する影響をウエスタンブロットにより検討した。PGHS-1 は Fig. 9 に示すように無刺激の RAW264.7 細胞中にも検出され、定常状態においても発現しており、LPS の刺激によっても、その蛋白量はほとんど影響を受けなかった。MJE と検討した 2, 3, 9 及び 10 はいずれも PGHS-1 蛋白量に対して影響を及ぼさなかった。

PGHS-2 は、無刺激の RAW264.7 細胞中には検出されなかったが、LPS の刺激により顕著に誘導された (Fig. 10)。MJE 及び検討した 2, 3, 9 及び 10 はこの PGHS-2 誘導を抑制した。活性の強さは 10 (IC_{50} : $0.8 \mu M$) > 9 (IC_{50} : $1.9 \mu M$) > 3

(IC_{50} : $4.3 \mu M$) > 2 (30 μM で 19% の阻害作用) であった。

(9) PGHS-2 mRNA 発現に対する作用

MJE 及び 3, 9, 10 について PGHS-2 mRNA 発現に対する作用を RT-PCR により検討した。無刺激の RAW264.7 細胞中にも PGHS-2 mRNA の発現がわずかに観察されたが、LPS の刺激により顕著な PGHS-2 mRNA の増加が認められた (Fig. 11)。MJE 及び 3, 9, 10 は濃度依存的にその発現を抑制し、特に PGHS-2 蛋白誘導を強く抑制した 9 と 10 は mRNA 発現に対しても顕著な抑制作用を示した。以上のことから、MJE 及び phloroglucinol 誘導体は PGHS-2 mRNA 発現を阻害することにより、PGHS-2 蛋白の誘導を抑制していることが示唆された。

(10) TNF- α 産生抑制作用

RAW264.7 細胞を LPS (100 ng/ml) で 16 時間刺激したところ、29.1 ng/ml/8.0 $\times 10^5$ cells の TNF- α 産生が認められた。LPS の

添加と同時に種々の濃度の MJE 及び phloroglucinol 誘導体 (1-3, 7-10) を添加し、その抑制効果について検討した。その結果、MJE は 3, 10, 30 $\mu g/ml$ 濃度でそれぞれ 32, 40, 38% の抑制率を示した (Fig. 12)。また、phloroglucinol 誘導体は化合物 1 を除き、濃度依存的に抑制効果を示した。各 phloroglucinol 誘導体の TNF- α 産生抑制作用は 10 (IC_{50} : $0.7 \mu M$) > 9 (IC_{50} : $7.5 \mu M$) > 3 (IC_{50} : $8.7 \mu M$) > 2 (IC_{50} : $23.3 \mu M$) > 7 (IC_{50} : $29.8 \mu M$) > 8 (IC_{50} : $>30 \mu M$) であった。

(11) IL-6 産生に対する影響

LPS (100 ng/ml) で 16 時間刺激したところ約 100 ng/ml/8.0 $\times 10^5$ cells の IL-6 産生が認められた。LPS と同時に種々の濃度の MJE 及び phloroglucinol 誘導体を添加し、抑制作用について検討した。MJE は 10, 30 $\mu g/ml$ 濃度でそれぞれ IL-6 産生を 44, 54% の抑制率を示した。また、phloroglucinol 誘導体は化合物 1 及び 8 を除き、IL-6 産生を濃度依存的に抑制した (Fig. 13)。phloroglucinol 誘導体の抑制作用は 10 (IC_{50} : $0.3 \mu M$) > 9 (IC_{50} : $3.8 \mu M$) > 3 (IC_{50} : $14.8 \mu M$) > 2 (IC_{50} : $16.9 \mu M$) > 7 (IC_{50} : $23.7 \mu M$) であった。

(12) TNF- α 及び IL-6 mRNA 発現に対する作用

MJE 及び化合物 3, 9, 10 について TNF- α 及び IL-6 mRNA 発現に対する抑制作用を RT-PCR により検討した。MJE 及び phloroglucinol 誘導体いずれも濃度依存的に顕著な抑制作用を示した (Fig. 14, 15)。

(13) NF κ B 活性化に対する影響

核内に移行した NF κ B の量を EMSA で観察した。LPS で 1 時間刺激した細胞では DNA-NF κ B 複合体が観察された (Fig. 16

(A))。NF κ B 結合部位を含む非標識のプローブとして用いた DNA 断片を過剰量、反応液に添加したところ、完全にバンドが消失した (XS-cold)。いくつかのバンドとして現れた DNA-NF κ B 複合体を同定するために、p50 と p65 に対する抗体を用いて検討した。p50 抗体処理は Fig. 16

(A) に示した I 及び II、両方のバンドをスーパーシフトさせた。また、p65 抗体処理は I のバンドのみシフトしたことから、I のバンドは p50/p65 のヘテロダイマーであり、II のバンドは p50/p50 のホモダイマーであることが示唆された。II のバンドの下方にあるバンドは非特異的バンドであると思われた。

化合物 9 と 10 は 10、30 μ M で p50/p50 及び p50/p65 両方の DNA 複合体量を顕著に減少させた (Fig. 16 (B))。

(14) I κ B 分解抑制作用

次に、化合物 9 と 10 の I κ B α の分解に対する作用をウエスタンブロット法により検討した。LPS 刺激した細胞の細胞質中の I κ B α 量は無刺激の細胞の I κ B α 量を 100 とした場合、21% に減少していた (Fig. 17)。化合物 9 と 10 は 10、30 μ M の濃度で LPS 刺激による I κ B α 量の減少を抑制した。これらの結果から、9 と 10 は I κ B α 量の減少を抑制することによって、NF κ B の核内移行を阻止していると考えられる。

(15) IL-12 (p40) 産生作用

PS 及び 11-17 の化合物 (Fig.18) の IL-12 (p40) 産生に対する作用を検討した。PS は有意な作用を示さなかったが、11-15 の化合物に産生増強作用が認められた。特に 11、15 はコントロールの 5.2 倍、3.5 倍の

産生量を示した。また、16、17 は抑制作用を示した (Fig. 19)。

D. 考察

NO、PGE₂、TNF- α 及び IL-6 産生に対する phloroglucinol 誘導体の抑制活性の強さはほぼ同様の傾向を示した。そこで構造と活性の関係を検討した。NO 産生抑制活性の強さは 30 μ M 濃度で 10 > 9 > 4 > 8 \approx 3 \approx 7 > 2 > 5 の順であった。化合物 1 は抑制活性を示さなかった。一方、2 は 26% の抑制活性を示した。このことから、作用の発現には二量体の構造が必須であることが示唆された。また、3 は 2 よりも強い作用を示したことから、C-3 に結合する isoprenyl 側鎖が活性を増強させていると考えられる。また、5 はその isoprenyl 側鎖が acetyl 基に対し *ortho* の位置に存在する hydroxy 基を介して閉環する構造であるが、その抑制活性は 3 よりも弱い。一方、9 は側鎖が *para* の位置に存在する hydroxy 基を介して閉環する構造で、3 よりその活性は著しく強いものであった。このことから、phloroglucinol 骨格の isoprenyl 側鎖の存在やその閉環の位置は NO 産生抑制活性の強弱に重要な要素であることが示唆された。また、iNOS 酵素活性阻害作用では 10、8、4 及び 7 が強い阻害作用を示した。これらの化合物はいずれも、側鎖または chroman 環に free hydroxy 基が結合しており、それが iNOS 酵素活性阻害作用に寄与しているものと考えられる。また、iNOS 誘導抑制作用は 10 > 9 > 4 > 8 > 3 > 7 > 5 > 2 の順であり、その傾向は NO 産生抑制作用と同様の傾向を示した。iNOS 誘導抑制作用は iNOS 酵素活性阻害作用よりも低濃

度で発現していることから、NO産生抑制作用は主として iNOS mRNA 発現抑制することによる iNOS 酵素誘導阻害により発現するものと考えられた。

また、MJE 及び phloroglucinol 誘導体は PGHS-2 mRNA 発現を阻害することにより、特異的に PGHS-2 蛋白誘導を抑制したことから、MJE 及び phloroglucinol 誘導体は炎症作用を発揮するとともに非選択的 PGHS 阻害剤と比較し、副作用の軽減が期待できると考えられる。

phloroglucinol 誘導体は PKC 活性化剤の 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate による発癌プロモーションを抑制することが報告されている。このことから、phloroglucinol 誘導体は PKC の活性化に影響することが考えられる。また、PKC- δ の特異的阻害剤である rottlerin はヒト単球において PKC- δ の細胞質-細胞膜間の trans-location を阻害し、NF κ B の DNA への binding 活性を減少させ、TNF- α 及び IL-1 産生を抑制することが報告されている。rottlerin はアカメガシワと同属のクスノハガシワの果実の表面の毛及び腺毛の主成分である。今回検討した phloroglucinol 誘導体は rottlerin と同様に phloroglucinol 骨格を有し、構造が類似していることから、同様の作用機序が考えられた。

E. 結論

NO, PGE₂, TNF- α 及び IL-6 は炎症の進行や急性期反応に深く関与しているメディエーターであり、phloroglucinol 誘導体がマクロファージからのそれらの産生を抑制することは、NO や PGE₂ が関連する炎症性疾患の治療薬の開発にとって phloroglucinol

誘導体の一つのリード化合物として有用である可能性を示唆するものである。

また、PS 成分は IL-12 産生増強作用を示したことから、これら成分は Th1/Th2 への分化や NK 細胞の活性化等を通じて、抗アレルギー作用あるいは免疫賦活作用が期待できるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

R. Ishii, M. Horie, K. Saito, M. Arisawa, S. Kitanaka, Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by Murine Macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- γ *Biochim. Biophys. Acta.* 1568 (2001) 74-82.

R. Ishii, M. Horie, K. Saito, M. Arisawa, S. Kitanaka, Prostaglandin E₂ production and induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 is inhibited in a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, by *Mallotus japonicus* phloroglucinol derivatives, *Biochim. Biophys. Acta.* 1571 (2002) 115-123.

R. Ishii, M. Horie, K. Saito, M. Arisawa, S. Kitanaka, Inhibition of lipopolysaccharide induced pro-inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor- κ B activation by *Mallotus japonicus* phloroglucinol derivatives, *Biochim. Biophys. Acta.* 1620 (2003) 108-118.

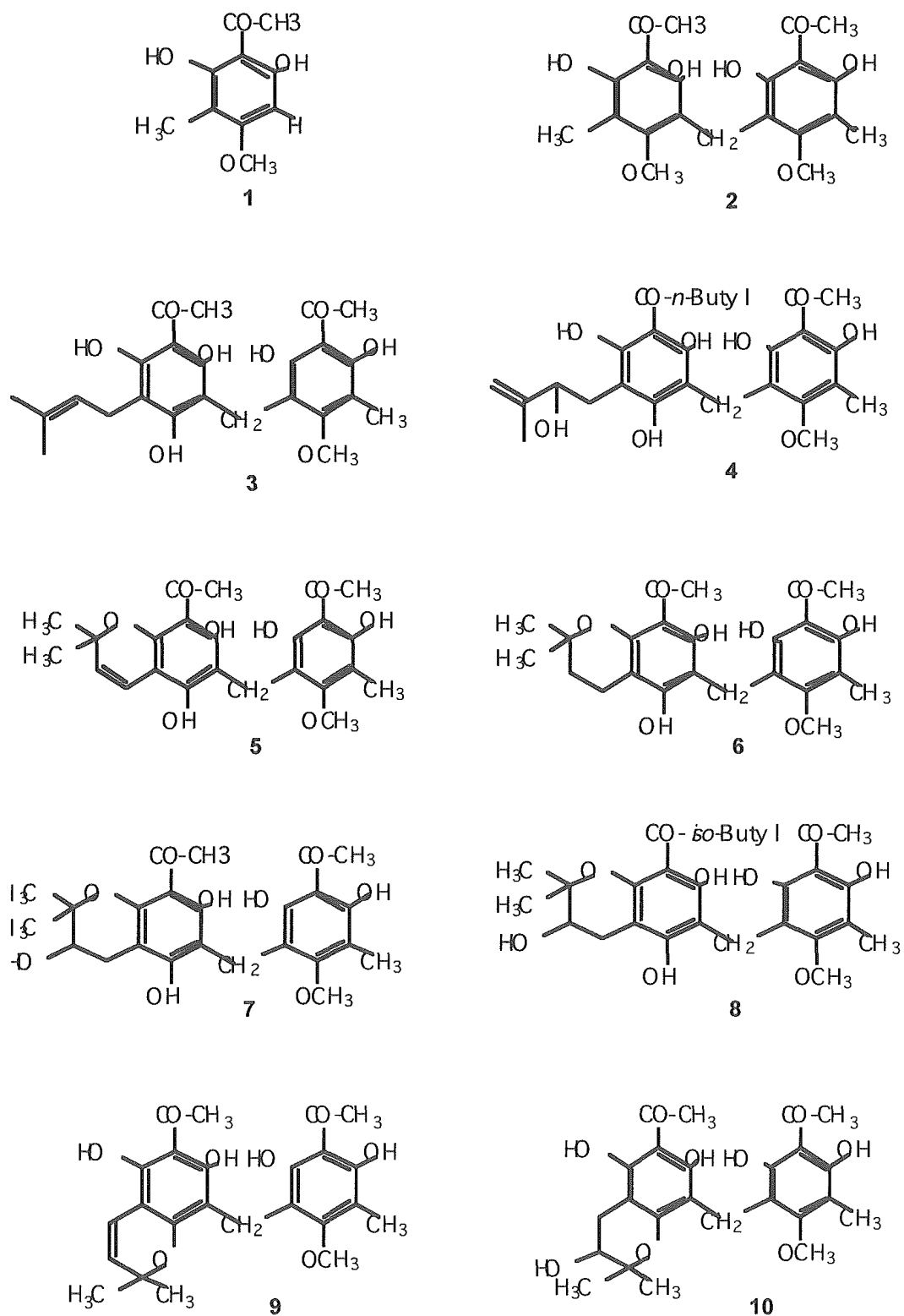


Fig. 1. Chemical Structures of Phloroglucinol Derivatives Isolated from MJE

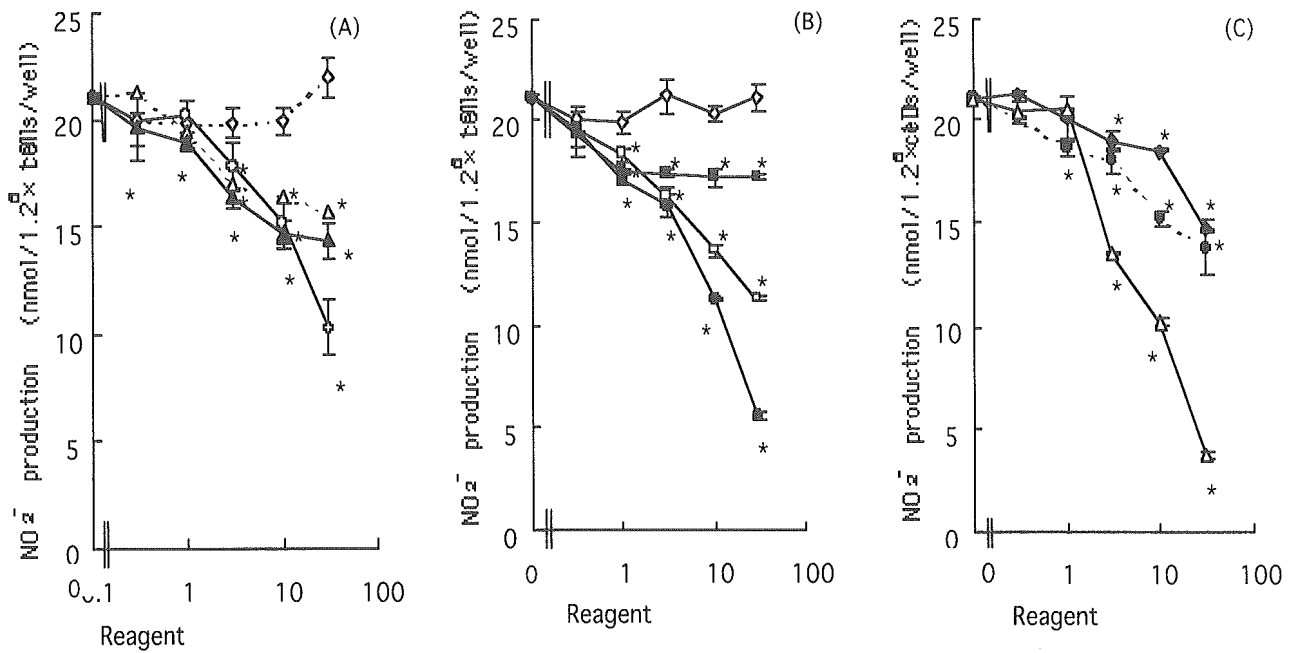


Fig. 2. Inhibitory Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on NO Production

The symbols correspond to: (A) MJE (○), 1 (◇), 2 (△), and 3 (▲), (B) 4 (□), 5 (■), 6 (◇), and 9 (●), and (C) 7 (◆), 8 (●), and 10 (△). The results are the means ± S.E. for two independent experiments comprising duplicate assays. Statistical significance: **P* < 0.01 VS. corresponding controls (cells treated with 10 U/ml IFN- γ + 100 ng/ml LPS).

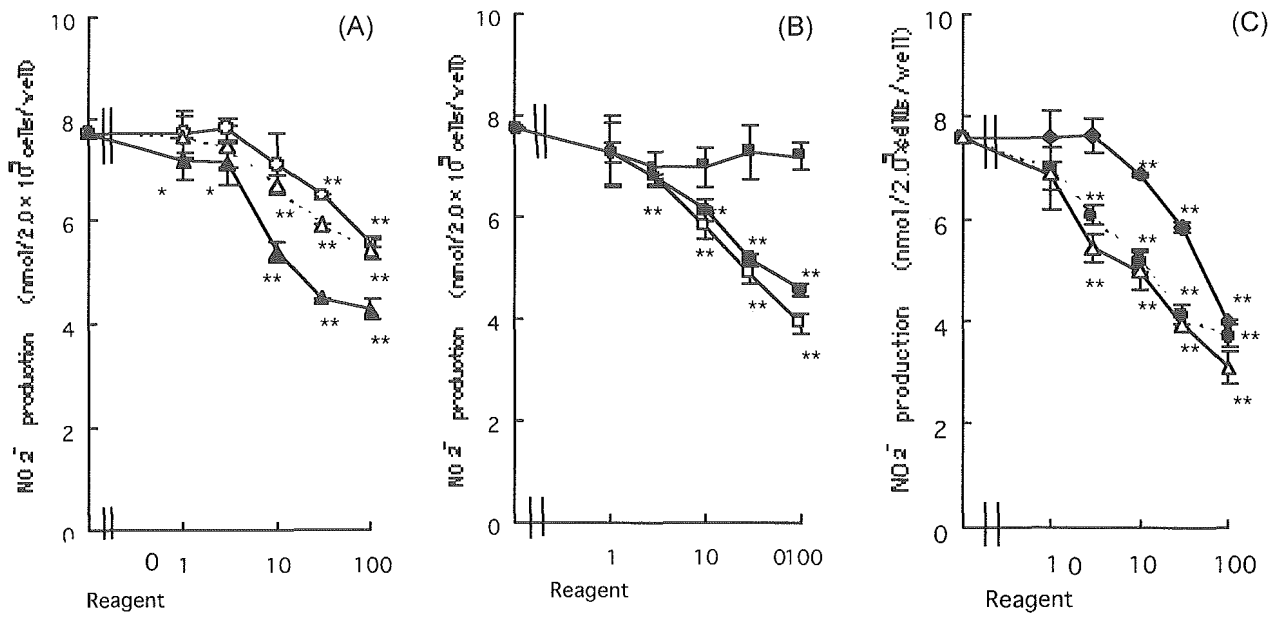


Fig. 3. Concentration Dependence of Inhibitory Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on iNOS Activity in Preactivated Macrophages

The symbols correspond to: (A) MJE (○), 2 (△), and 3 (▲), (B) 4 (□), 5 (■), and 9 (●), and (C) 7 (◆), 8 (●), and 10 (△). The results are presented as the means \pm S.E. for two different experiments involving duplicate assays. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS. corresponding controls (cells treated with 100 ng/ml LPS + 10 U/ml IFN- γ).

Table 1. Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on Conversion of [14C] Arginine to [14C]Citrulline by Cell Extract

	Reagent conc. (μ g/ml or μ M)	L-citrulline production (pmol/mg protein cell extract/min)		
Control		186.1	\pm	10.2
MJE	100	160.5	\pm	14.3 *
	30	190.3	\pm	5.6
	10	187.6	\pm	10.4
4	100	127.4	\pm	8.4 **
	30	164.2	\pm	7.6 *
	10	182.8	\pm	6.2
8	100	121.5	\pm	6.8 **
	30	166.7	\pm	11.4 *
	10	187.1	\pm	6.4
10	100	95.2	\pm	5.8 **
	30	162.4	\pm	5.4 *
	10	181.4	\pm	5.2
L-NIO	1000	2.1	\pm	0.2 *

The results were presented as the means \pm S.E. for two different experiments involving duplicate assays. Statistical significance: * P < 0.05, ** P < 0.01, vs. corresponding controls.

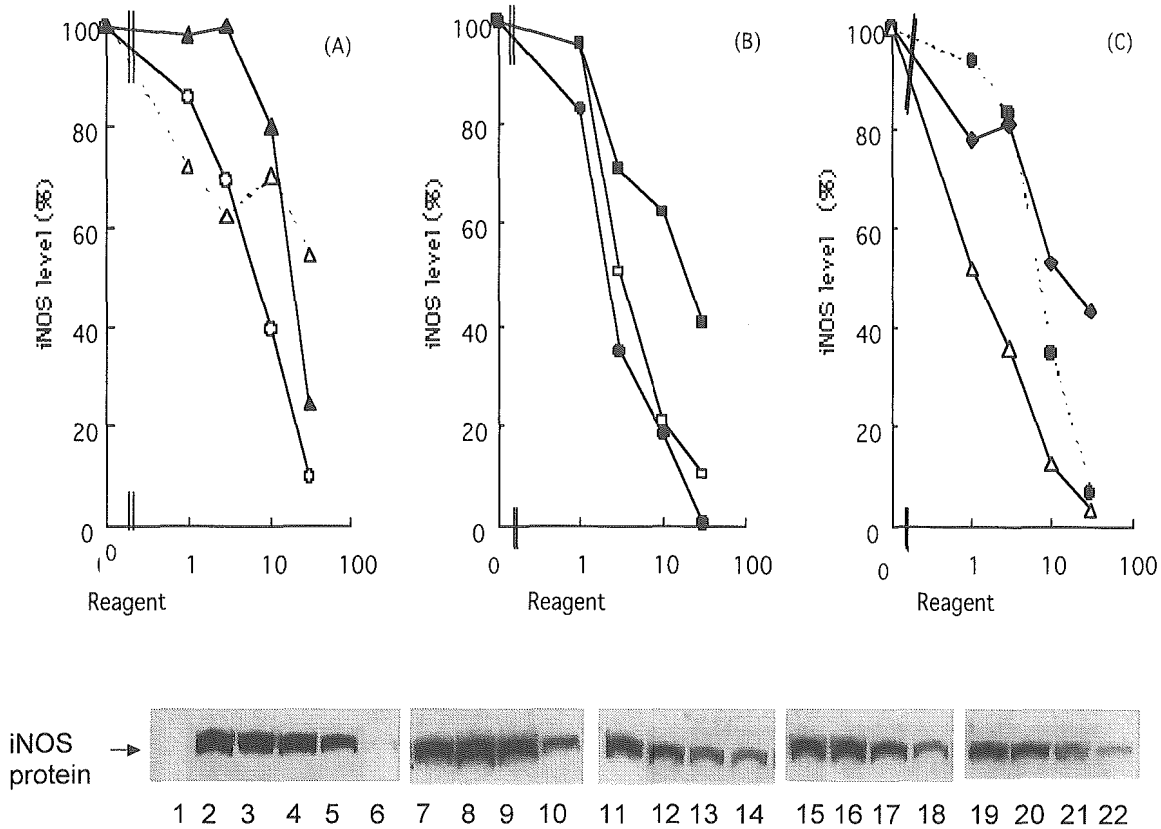


Fig. 4. Inhibition of iNOS Induction by MJE and Phloroglucinol Derivatives

The results are expressed relative to the amount of iNOS in 60 μ g of the control cells (100%: treated with IFN- γ + LPS, but MJE or other compounds not added). The symbols correspond to: (A) MJE (\circ), 2 (\triangle), and 3 (\blacktriangle), (B) 4 (\square), 5 (\blacksquare), and 9 (\bullet), and (C) 7 (\blacklozenge), 8 (\bullet), and 10 (\triangle). In the lower panel the bands corresponding to the 130 kDa iNOS protein are indicated. The numbers correspond to: 1. control (absence of IFN- γ or LPS), 2. control (presence of LPS + IFN- γ), 3. MJE 1 μ g/ml, 4. MJE 3 μ g/ml, 5. MJE 10 μ g/ml, 6. MJE 30 μ g/ml, 7. 3 1 μ M, 8. 3 3 μ M, 9. 3 10 μ M, 10. 3 30 μ M, 11. 5 1 μ M, 12. 5 3 μ M, 13. 5 10 μ M, 14. 5 30 μ M, 15. 7 1 μ M, 16. 7 3 μ M, 17. 7 10 μ M, 18. 7 30 μ M, 19. 10 1 μ M, 20. 10 3 μ M, 21. 10 10 μ M, 22. 10 30 μ M.

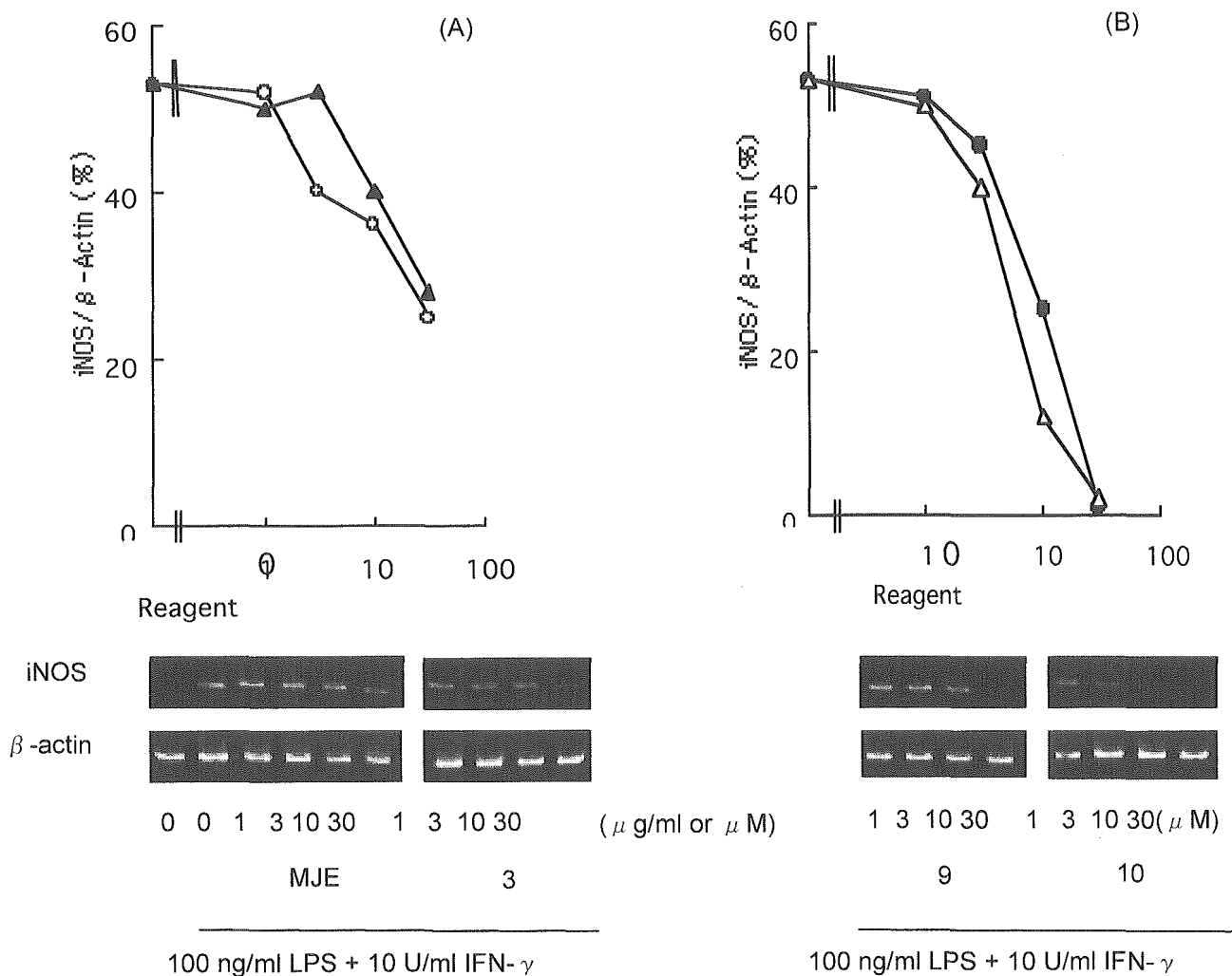


Fig. 5. Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on iNOS mRNA Expression

The symbols correspond to: (A) MJE (\circ), and 3 (\blacktriangle), (B) 9 (\bullet), and 10 (\triangle). The lower panel shows the PCR products corresponding to the iNOS (456 bp) and β -actin (540 bp) bands. The results are for a typical example of repeated experiments.

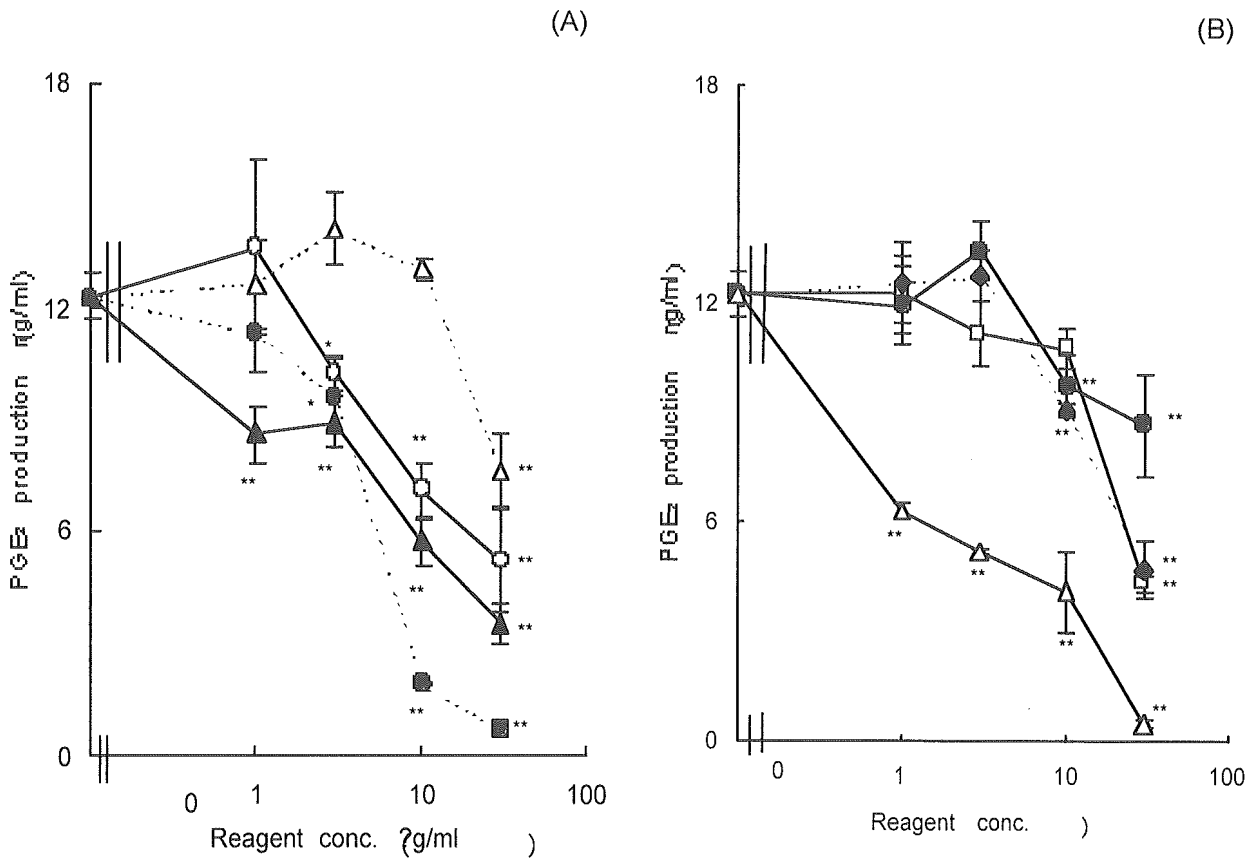


Fig. 6. Inhibitory Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on LPS-Induced PGE₂ Production in RAW 264.7 Cells

The symbols correspond to: (A) MJE (○), 2 (△), 3 (▲), and 9 (●), and (B) 4 (□), 7 (◆), 8 (●), and 10 (△). The results are the means ± S.E. for two independent experiments involving triplicate assays. Statistical significance: **P* < 0.05, ***P* < 0.01 VS. corresponding controls (cells treated with 100 ng/ml LPS).

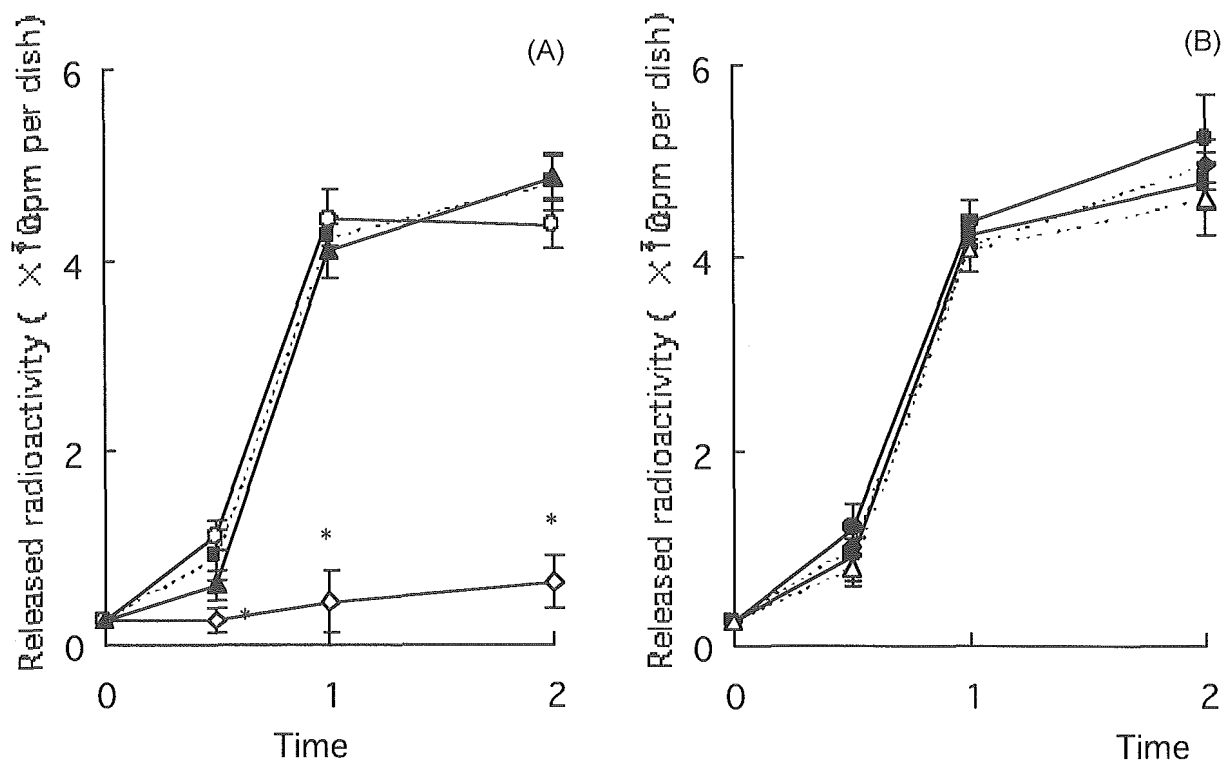
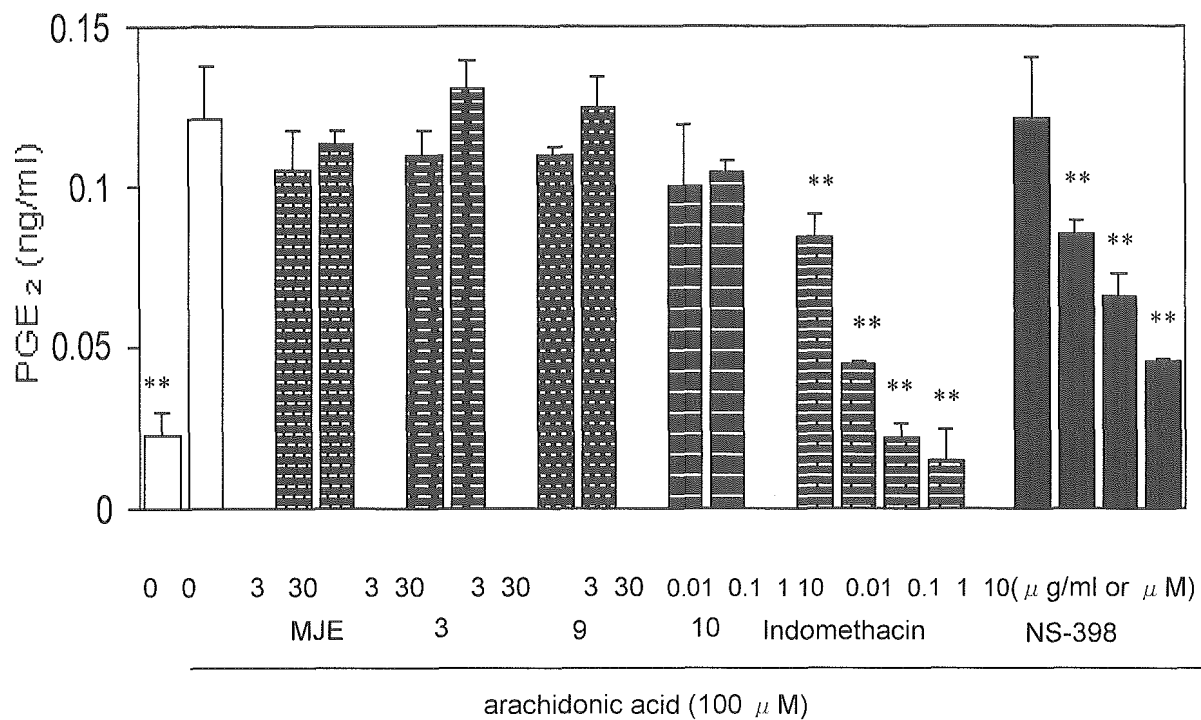


Fig. 7. Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on Release of Radioactivity from [14C]Arachidonic Acid-Labeled Macrophages

The symbols correspond to: (A) control cells (treated with LPS) (■), + NONE (absence of LPS) (◇), 30 μg/ml MJE (○), and 30 μM 3 (▲), and (B) control cells (■), 30 μM 7 (◆), 30 μM 9 (●), and 30 μM 10 (△). The results are the means ± S.E. for two independent experiments involving duplicate assays. Statistical significance: * $P < 0.01$ VS. corresponding controls (cells treated with 100 ng/ml LPS).

(A) PGHS-1



(B) PGHS-2

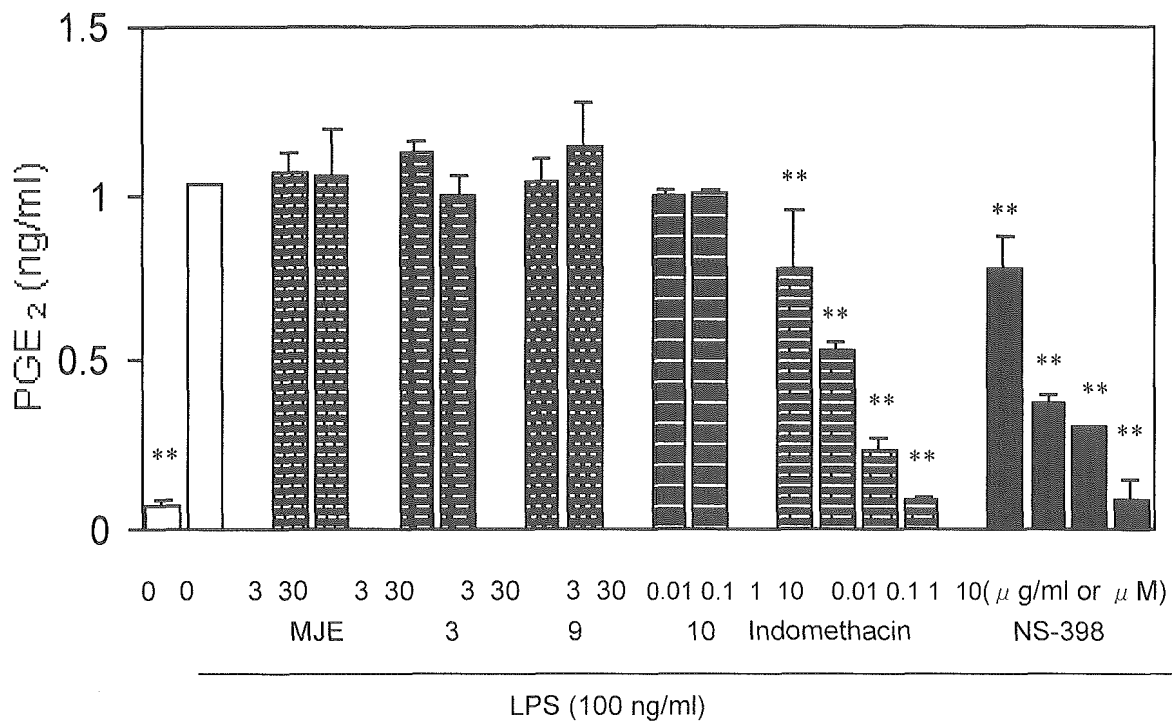


Fig.8. Direct Effects of MJE and Phloroglucinol

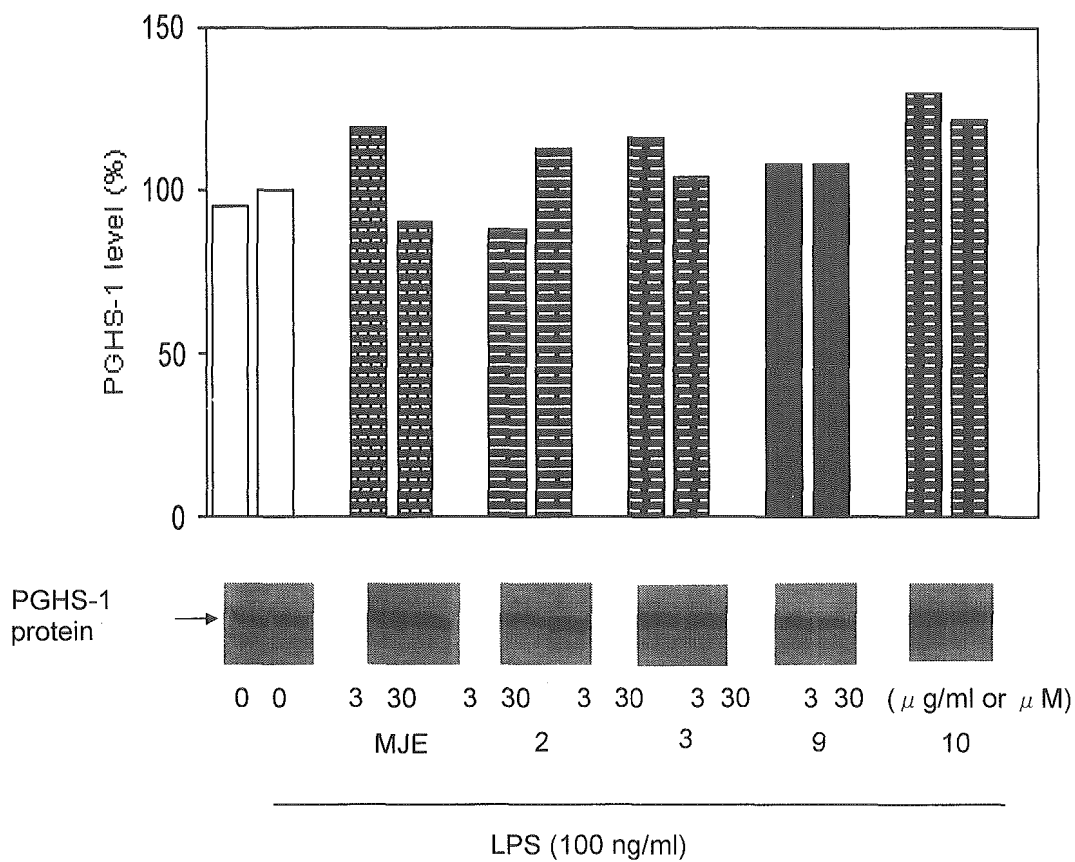


Fig. 9. Effects of MJE and Phloroglucinol Derivatives on PGHS-1 Protein Level
 The results are expressed relative to the amount of PGHS-1 in 60 μg of the control cell (100%: treated with LPS, but MJE of other compounds not added).

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総合研究報告書

研究協力者 瀬尾尚宏 浜松医科大学皮膚科学教室 助手

研究要旨 シジュウムやホソバキンソウに代表される天然生薬は Th1 環境優位な体質改善に有用であり、アトピー性皮膚炎、花粉症、喘息などの Th2 細胞介在型アレルギー疾患治療に期待されているが、その薬効機序については今だ不明な部分が多い。近年、Th1 細胞誘導抑制作用を持つ調節性 T (Tr) 細胞が同定された。Tr 細胞は天然生薬の薬効機序に何らかの関連があると考えられるが、それについての報告は今だ無い。そこで本研究では天然生薬の Tr 細胞機能に及ぼす影響についてマウスを用いた系で検討を行った。結果、IL-10 依存的な Tr 細胞増殖はシジュウムで強く、ホソバキンソウで微弱に抑えられることが判明した。さらにシジュウム経口投与マウスは Th1 細胞優位な体質変化が見られ、皮下移植した B16 細胞増殖を強く抑制した。以上より、天然生薬の中でも特にシジュウムは、Th2 細胞介在型アレルギー疾患治療に有用であることは勿論のこと、がんの予防効果を持つことも判明した。

A. 研究目的

シジュウムやホソバキンソウに代表される天然の生薬は免疫学的な Th1/Th2 バランスを Th1 細胞優位な状態に導く効果があるため、アトピー性皮膚炎、花粉症、喘息などに代表される Th2 細胞が介在したアレルギー疾患の治療や予防への応用に大きく期待されている。近年、この抗アレルギー機能を持つシジュウムやホソバキンソウによる Th1 細胞誘導機構が、それら生薬の Th1 細胞への直接作用ではなく、Th2 細胞活性を抑制する作用であることがいくつか報告された。

ところで近年免疫学では Th1 細胞介在性の炎症性自己免疫疾患や抗腫瘍免疫応答など Th1 細胞介在免疫反応を抑える細胞として調節性 T(Tr)細胞が新たに分類されたが、天然抗アレルギー製剤による Tr 細胞の動態に関する研究は今だ行われておらず、報告も皆無である。そこで本研究では天然生薬の Th1 細胞誘導とその誘導を調節する可能性の高い Tr 細胞との関連について詳細に検討を行った。

B. 研究方法

シジュウムの葉、皮、根より熱水

またはエタノール抽出した成分、またはホソバキシソウより抽出し分離精製した5種類の活性成分(P3DC-4-2, P3DC-4-3, P3DC-4-4, P3DC-4-5, P2G2)を *in vitro* における Th1, Th2, Tr 細胞誘導時の培養液中に種々の濃度で混合し、誘導に伴う増殖の変化を測定した。

種々の濃度で葉、皮、根抽出シジュウムを経口投与した B6 マウスの皮下に B16 メラノーマ細胞を移植し、その後の腫瘍増殖および脾臓での Tr 細胞活性を IL-10 依存的な *in vitro* 増殖アッセイで、IL-4, IL-10, TGF- β , IFN- γ 産生能を ELISPOT アッセイで、さらには Th1 細胞活性を刺激後の CD4+IFN- γ +細胞数の変化のフローサイトメトリ分析により検討した。

C. 研究結果

シジュウムの葉(エタノール抽出、熱水抽出)、根(エタノール抽出)、皮(エタノール抽出)より抽出した各成分は、*in vitro* における Th1 細胞や Th2 細胞の誘導増殖には何の影響も持たなかった。

シジュウムの IL-10 依存的な *in vitro* Tr 細胞誘導抑制効果は葉(エタノール抽出) > 皮(エタノール抽出) > 根(エタノール抽出)の順で強く、葉(熱水抽出)は何の抑制効果も見られなかった。

経口投与後のマウス脾細胞の Tr 細胞活性は葉(熱水抽出)で保持されていたが、葉(エタノール抽出) > 皮(エタノール抽出) > 根(エタノール抽出)の順で抑制されていた。葉(エタノール抽出)経口投与後のマウス脾臓ではあコントロール(無処理または葉(熱水抽出)投与群)に比べ IL-4, IL-10, TGF- β 産生が抑制され、IFN- γ 産生が亢進していた。また経口投与後の脾臓における Th1 細胞数は、葉(エタノール抽出) > 皮(エタノール抽出) > 根(エタノール抽出)の順でコントロール群よりも増加しており、葉(エタノール抽出)ではコントロールのほぼ倍に増加していた。また葉(熱水抽出)投与後のマウス脾臓中の Th1 細胞数はコントロール群のそれと同じであった。

皮下移植した B16 細胞増殖は葉(エタノール抽出)、皮(エタノール抽出)、根(エタノール抽出)を前投与したマウスの順で抑制されるが、葉(熱水抽出)で抑制効果は見られなかった。

ホソバキシソウより抽出した5成分全てが Tr 細胞誘導抑制活性を持つが、P2G2 が最もその効果が強かった。しかしながらその抑制活性もコントロールの5~10%程度でありシジュウムに比べると非常に弱い抑制効果しか持たないことが判明した。