

## RAW 264.7 細胞における LPS で誘導される誘導型 NO 合成酵素の発現に対する Caffeic Acid Undecyl Ester の阻害について

小山内 優, 菅野 秀一, 佐々木崇光, 平塚 真弘, 石川 正明\*

### Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Caffeic Acid Undecyl Ester in RAW 264.7 Macrophages

Yuu OSANAI, Syu-ichi KANNO, Takamitsu SASAKI, Masahiro HIRATSUKA, and Masaaki ISHIKAWA

(Received November 20, 2008)

We synthesized caffeic acid undecyl ester (CAUE), and found that it exhibited strong inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in murine macrophage-like RAW 264.7 cells. We examined the effect of CAUE on the expression inducible nitric oxide synthase (iNOS) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Western blot analysis performed with specific anti-iNOS antibody showed that a decrease in NO was accompanied by a decrease in the level of iNOS protein with dose-dependent manner (CAUE: 0.1 ~ 1.0  $\mu$ M). To clarify the mechanistic basis for CAUE's ability to inhibit the induction of iNOS, we examined the effect of CAUE on nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, Inhibitor- $\kappa$ B ( $\text{I}\kappa$ B) degradation and phosphorylation of extracellular-signaling regulated kinases, ERK 1/2. CAUE potently suppressed the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B,  $\text{I}\kappa$ B degradation and activation of ERK. Since NF- $\kappa$ B was activated by following  $\text{I}\kappa$ B $\alpha$  degradation, the recovery of  $\text{I}\kappa$ B $\alpha$  protein indicating that CAUE inhibited the activation of degradation following NF- $\kappa$ B. These findings suggest that CAUE has the inhibitory effect on LPS-induced NO production and expression of iNOS in macrophage by the inhibition of  $\text{I}\kappa$ B degradation and NF- $\kappa$ B activation, which may be mediated through blockage in the phosphorylation of ERK.

**Key words** — caffeic acid undecyl ester; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; nuclear-factor- $\kappa$ B; RAW 264.7 macrophage

## 緒 言

炎症反応は、生体に異物が浸入したり、感染、外傷、やけどあるいはアレルギーなどの有害刺激が作用したときに起こる生態防御反応である。炎症反応による痛みは生体にとっての危険信号を知らせる必要不可欠なもの1つではあるが、過剰に発現した場合は生体組織の損傷や機能低下など人体にとって悪影響を呈するため、抗炎症薬などによる治療が必要となってくる。

有害刺激による炎症反応は、微小循環系の変化と炎症細胞の浸潤の過程を経て形成された肉芽組織が修復され治癒する。しかしながら、修復過程が合理的に進行しない場合や局所への障害が持続する場合には、炎症は慢性化あるいは遷延することになる。障害された組織や炎症細胞が産生する化学伝達物質の一酸化窒素 (NO)、ヒスタミン、プロスタグランジン (PG)、セロトニン、血漿キニン類、ロイコトリエン類、血小板活性化因子 (PAF)、バズエキシン、

サイトカイン類あるいは細胞増殖因子などは、疼痛と機能障害を引き起こす原因となる。<sup>1)</sup>

NOは血管内皮細胞より産生される血管平滑筋弛緩因子の本態であるが、<sup>2,3)</sup> マクロファージがNO合成機能を有し、<sup>4)</sup> 感染や炎症病巣において産生されるサイトカインのインターロイキン- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) などにより、誘導型NO合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) の発現が誘導され、産生される。<sup>5)</sup> 過剰に生成したNOは、単独あるいはスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) と反応してDNA障害性を有するペルオキシ亜硝酸 (peroxynitrite; ONOO $^-$ ) を産生し、細胞や組織に障害を与え、炎症症状を増悪する。iNOSやPG合成酵素シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の遺伝子発現を調節しているのが、炎症、腫瘍、細胞分化、アポトーシスなどの発現に関与する核内転写因子 (nuclear factor kappa B) NF- $\kappa$ Bであることから、NF- $\kappa$ B活性の阻害によるNO産生の抑制が炎症症状

の緩和に繋がることになる。<sup>6,7)</sup> 近年, 新たな炎症の治療法として, 炎症時にみられる NF- $\kappa$ B 発現の亢進を転写レベルで制御する試みも報告されている。<sup>8-11)</sup>

プロポリスの効能については, 紀元前 300 年の記録から読み取れ,<sup>12)</sup> 抗炎症作用物質として古来より民間療法として使用されてきた。しかし, 国立健康・栄養研究所が公開する「健康食品の安全性・有効性情報」<sup>13)</sup> において, ヒトに対する効果があるとされているのは「免疫・がん・炎症」の項目のみである。現在明らかになっている有効成分としては caffeic acid や caffeic acid phenethyl ester (CAPE) であるが, 詳細な薬効や作用機序について不明な点が多い。著者らは, caffeic acid octyl ester (CAOE) が, ヒト腫瘍細胞に対してアポトーシスによる殺細胞作用と, LPS 刺激による NO 産生とマウスにおけるカラゲナン浮腫を抑制することを報告している。<sup>14)</sup> その過程において, CAPE の基本骨格である caffeic acid のアルキル側鎖の炭素数を伸長させた種々の誘導体を合成し, 炭素数 11 の caffeic acid undecyl ester (CAUE) が, マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 細胞における LPS 刺激による NO 産生に対して最強の NO 産生抑制作用を示すことを報告した。<sup>15)</sup> 本研究では, CAUE の LPS 刺激により産生される NO に対する抑制効果の発現機序を検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 使用細胞および培養条件

本研究で用いたマウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 (ATCC TIB71) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入したものを使用した。RAW 264.7 は RPMI 1640 培地を用い, 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, penicillin G (100U/mL)/streptomycin (100  $\mu$ g/mL) を添加し, 37°C インキュベーター (95% 空気, 5% CO<sub>2</sub>) 中で 75 cm<sup>3</sup> フラスコにより継代培養し使用した。<sup>16)</sup>

### 2. 使用薬物

CAUE (Fig. 1) は本学薬剤学教室の上井らの協力を得て合成したものを使用した。CAUE は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し, 細胞増殖に影響のない 0.5% 以下の濃度で使用した。Lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* O55: B5) はナカライテスク, その他の試薬は市販の特級品を用いた。<sup>15)</sup>

### 3. 細胞毒性試験

RAW 264.7 細胞を 96-well plate に  $2 \times 10^5$  cells/well に調整後播種し, 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で 12 時間インキュベートした。その後, 新たに CAUE を添加した培地に交換して培養した。所定の時間に MTT 試薬 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) を滅菌リン酸緩衝生理食塩水: PBS (-) に 5 mg/mL で溶解] を 10  $\mu$ L/well で加え 90 分間培養した。その後, 培地を吸引除去し, 塩酸を添加した塩酸イソプロパノール溶液 (0.04 N HCl) を 100  $\mu$ L/well 加え, 明暗色の formazan を十分に溶出させた後 590 nm における吸光度を Inter-med model NJ-2300 microplate reader を用いて測定した。細胞の生存率 (%) は control 群との吸光度の比較により算出した。<sup>17)</sup>

### 4. NO 産生量の測定

RAW 264.7 細胞を 96-well plate に  $2 \times 10^5$  cells/well に調整後播種し, 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で 12 時間インキュベートした。その後, 新たに CAUE を添加した培地に交換して 1 時間培養し, さらに LPS 濃度が 1  $\mu$ g/mL となるように添加し 24 時間培養した。遊離した NO 量は, 上澄 50  $\mu$ L に Griess 試薬 [2.5% sulufanilamide, 2.5% phosphoric acid, 0.05% N-(1-naphtyl) ethylenediamine] を 50  $\mu$ L を添加し 540 nm における吸光度を Inter-med model NJ-2300 microplate reader を用いて測定した。なお標準物質として NaNO<sub>2</sub> (和光純薬) を用い, 検量線を作成し, NO 量を算出した。<sup>17,18)</sup>

### 5. Western blotting

RAW 264.7 細胞を 92 mm dish に  $8 \times 10^5$  /mL で播種し, 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で 12 時間前培養した。その後, CAUE を添加した培地に交換し 1 時間培養後に LPS 濃度が 1  $\mu$ g/mL となるように添加し, 所定時間培養した。LPS と CAUE を処置した細胞は PBS (-) で洗浄後, 1.5 mL

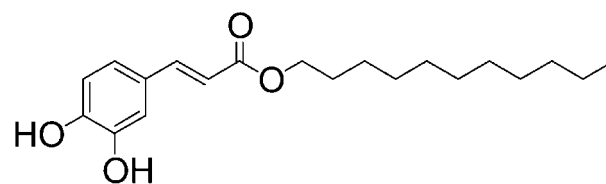


Fig. 1. Chemical structure of caffeic acid undecyl ester (CAUE)

チューブに回収し 3,000 rpm にてホモジナイズし、S-9 画分を回収した。その後 95°C でタンパク質を不活性化させた後、SDS-PAGE にて分離した。iNOS は 7.5%，それ以外は 10% ポリアクリルアミドゲルにて分離した後、セミドライ式プロット法を用いて PVDF 膜へ転写した。転写後 PVDF 膜をブロッキングバッファの 10% スキムミルクを含む T.TBS (0.05% Tween 20 含 Tris-buffered saline) にて 6 時間ブロッキングし、30 分間 T.TBS にて洗浄した後に T.TBS で希釈した抗 iNOS 抗体、抗 COX-2 抗体、抗 p65、抗 phospho-p65、抗 p38、抗 phospho-p38、抗 p44/42、抗 phospho-p44/42 あるいは抗 I $\kappa$ B- $\alpha$  抗体 (一次抗体) にて 4°C、一夜インキュベートした。T.TBS にて 30 分間洗浄した後、希釈した抗 iNOS 抗体、抗 COX-2、抗 p65、抗 phospho-p65、抗 p38、抗 phospho-p38、抗 p44/42、抗 phospho-p44/42 あるいは抗 I $\kappa$ B- $\alpha$  抗体 (二次抗体) で室温、1 時間インキュベートした。T.TBS にて 30 分間洗浄した後、ECL puls を用いて反応後 X 線フィルムに転写し検出を行い、iNOS タンパク量は PVDF 膜を FAS-1000 を使用しバンドを取り込み定量した。<sup>19,20)</sup>

LPS による刺激時間

iNOS, COX-2; 15 時間, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, ERK (p44/42); 30 分間培養。

## 6. TNF- $\alpha$ 産生量の測定

RAW 264.7 細胞を 35 mm dish に  $2 \times 10^5$  cells/mL に調整後播種し、10% FBS を含む RPMI 1640 培地で 12 時間インキュベート後、新たに CAUE を添加した培地に交換した。その後、1 時間インキュベートし、LPS を処置し、15 時間培養した。TNF- $\alpha$  産生量の測定は、cytokine-specific ELISA kit (Bio Source) を使用しマニュアルに従って行った。<sup>21)</sup>

## 7. プライマーの配列

今回使用した primer は以下の配列のものを使用した。

iNOS

FP-1 5'-GTGGCTTCCAGCTCCCTGAG-3'

RP-1 5'-GTCCTGAACGTAGACCTTGGGTTT-3'

FP-2 5'-CCTGGTACGGGCATTGCT-3'

RP-2 5'-GCTCATGCGGCCTCCTT-3'

COX-2

FP-1 5'-CCCAGCACTTCACCCATCAG-3'

RP-1 5'-CCATCCTTGAAAAGGCGCAG-3'

FP-2 5'-GGAAAAGGTTCTTCTACGGAG-3'

RP-2 5'-GGGTAGATCACTTCTACCTGAGTG-3'

GAPDH

FP-1 5'-ATCATCCCTGCATCCACTGG-3'

RP-1 5'-GGAAGAGTGGGAGTTGCTGTT-3'

FP-2 5'-GCATGGCCTCCGTGTTTC-3'

RP-2 5'-GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT-3'

## 8. リファレンス配列

iNOS mRNA のリファレンス配列として、GeneBank の M87039, COX-2 配列として NM\_011198, GAPDH mRNA の配列として BC082592 を用いた。

## 9. cDNA のクローニング

### 9-1. 細胞の回収

RAW 264.7 細胞を 92 mm dish に  $8 \times 10^5$ /mL で播種し 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で 12 時間インキュベートした。その後、CAUE を添加した培地に交換して 1 時間培養した。さらに LPS 濃度が  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加し 12 時間培養した。CAUE, LPS 処置した細胞は PBS (-) で洗浄後、回収した。総 RNA は ISOGEN reagent (ニッポンジーン) を用いて抽出した。

### 9-2. RNA の抽出

回収した細胞溶解液にクロロホルムを加え、15 秒間激しく攪拌した後、これを 3 回繰り返した。三層に分離した後 12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移した。同じ操作を行い、不純物を除去した後、イソプロピルアルコールを添加し 2-3 回転倒混和した。続いて 15,000 rpm にて 10 分間遠心分離し上清を別のアシストチューブに移し、75% エタノールを添加し 11,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を完全に除去し、ペレットに DEPC 水を  $20 \mu\text{L}$  加え溶解した。

### 9-3. cDNA の合成

抽出した total RNA を  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  に希釈したものをテンプレートとして用いた。SuperScript first-strand synthesis (Invitrogen) を使用し、マニュアルに従い、cDNA を作製した。

### 9-4. PCR による iNOS, COX-2, GAPDH cDNA の増幅

作製した cDNA をテンプレートとして用いた。

反応液組成は template cDNA 1.0  $\mu$ L, forward primer (FP-1) 0.5  $\mu$ L, reverse primer (RP-1) 0.5  $\mu$ L, 滅菌精製水 8  $\mu$ L, 2  $\times$  Amplitaq Gold 10  $\mu$ L にて全量 20  $\mu$ L となるように調整した。反応は、変性を 95°C で 30 秒間, アニーリングを 65°C で 30 秒間, 伸長反応を 72°C で 30 秒間のサイクルを 35 サイクル行い, 72°C で 7 分間処理した。PCR 産物は, 2% アガロースゲル (ethidium bromide を含む) を用いて 100 V, 20 分間電気泳動を行った後, UV 照射によりバンドを確認した。確認されたバンドを Montage PCR centrifugal filter devices (日本ミリポア) により精製した。

#### 9-5. PCR 産物のライゲーションおよびトランスフォーメーション

クローニングベクター (pCR 2.1-TOPO) 0.5  $\mu$ L を用い, 精製した PCR 産物 2.0  $\mu$ L, salt solution 0.5  $\mu$ L を加え, 室温にて 5 分間インキュベートしてライゲーションを行った。次に調整した反応液 1  $\mu$ L を TOP10 大腸菌コンピテントセル 25  $\mu$ L に加え, 30 分間氷上にてインキュベートし, heat shock (42°C, 30 秒間) によりトランスフォーメーションを行った。これに SOC medium を 125  $\mu$ L 添加後, 37°C, 200 rpm にて 1 時間振とう培養後, 反応液を 20  $\mu$ L と 100  $\mu$ L に分けカナマイシン含有 LB 寒天培地に播種し, 37°C で 16 時間培養した。

#### 9-6. 液体培養およびプラスミド精製

コロニーを竹串にてピックアップし, 2  $\mu$ L カナマイシン含有液体培地にて 37°C で 16 時間, 200 rpm で振とう培養を行った。プラスミド精製は QIAprep miniprep (Qiagen) を用い添付マニュアルに従い, プラスミドを溶出した。

#### 9-7. シークエンス解析

96°C で 1 分間処理した精製プラスミドを 2.5  $\mu$ L, 2.5 倍濃度 buffer [200 mM Tris-HCl (pH 9.0), 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>] 1.0  $\mu$ L, 10 mM primer 0.5  $\mu$ L, DTCS quick start master mix 1.0  $\mu$ L を混合し, 全量 5.0  $\mu$ L となるように反応液を調整した。反応は, 96°C を 20 秒間, 50°C を 20 秒間, 60°C を 2 分 30 秒間のサイクルを 35 サイクル行った。シークエンス反応終了後, 反応物中の未反応蛍光色素の除去と濃縮をエタノール沈殿で行い, Sample loading solution

(SLS) に溶解した後に DNA シークエンサーで塩基配列を確認した。

#### 10. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の定量

9-3 の cDNA をテンプレートとして, リアルタイム RT-PCR 法により iNOS mRNA の定量をした。検量線用 cDNA については, テンプレート 1.0  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 8.6  $\mu$ L, forward primer (FP-2) 0.2  $\mu$ L, reverse primer (RP-2) 0.2  $\mu$ L, SYBR Green PCR 10.0  $\mu$ L を混合し, 全量 20  $\mu$ L となるように反応液を調整した。一方, CAUE 処置群においてはテンプレート 1.0  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 8.6  $\mu$ L, forward primer 0.2  $\mu$ L, reverse primer 0.2  $\mu$ L, SYBR Green PCR 10.0  $\mu$ L を混合し, 全量 20  $\mu$ L となるように反応液を調整した。反応条件は, 95°C で 10 分処理後, 変性を 95°C 15 秒間, アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 1 分間のサイクルを 35 サイクル行った。得られた増幅曲線において指数関数的に増幅が認められる領域で threshold cycle (Ct) を測定し, 検量線用 cDNA クローン挿入プラスミドの Ct に対してテンプレートコピー数の常用対数をとった負の直線を検量線とした上で, 個々の増幅曲線より得られた Ct より mRNA の発現量を比較した。

#### 11. 統計処理

有意差検定は危険率を 1 あるいは 5% として, Fisher's PLSD あるいは Scheffe's F test を用いた。

## 結 果

#### 1) RAW 264.7 細胞に対する CAUE の殺細胞作用

CAUE の基本骨格である caffeic acid あるいは caffeic acid の誘導体において, 殺細胞作用が報告されていることから, <sup>14a)</sup> RAW 264.7 細胞に対する殺細胞を, 細胞のミトコンドリア活性を指標とする MTT assay を用いて検討した。RAW 264.7 細胞を種々の濃度の CAUE で 24 時間培養したとき, CAUE の濃度に依存した殺細胞作用が観察され, 2.5  $\mu$ M 濃度から有意差が認められた (Fig. 2)。

#### 2) LPS で誘導される NO に対する CAUE の NO 産生抑制作用

CAUE の LPS 刺激による NO 産生に及ぼす影響について RAW 264.7 細胞に CAUE を処理し産生される NO を Griess 試薬を用い比色法により測定し

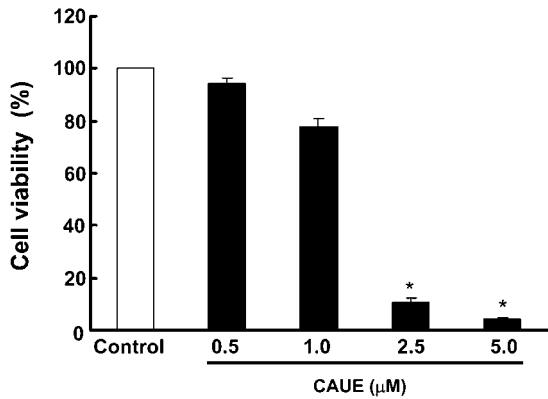


Fig. 2. Effect of CAUE on cell viability in RAW 264.7 cells

Cells were treated with various concentrations (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 μM) of CAUE for 24 h, and then cell viability was determined by MTT assay. Control cells were treated with DMSO. Cytotoxicity is expressed as a percentage of control cells. Each values represent the mean ± S.E. for three different experiments performed in triplicate. \*P<0.01 versus control.

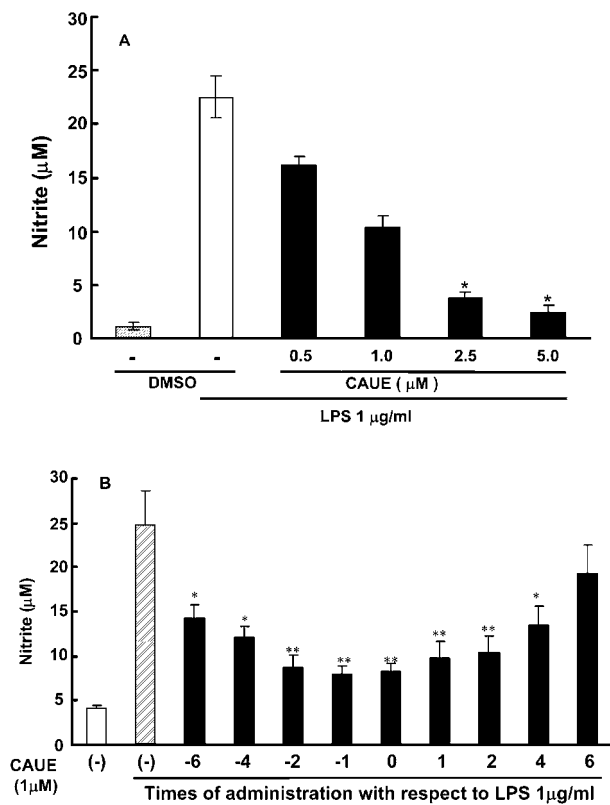


Fig. 3. Dose-(A) and time-(B) dependent inhibitory effect of CAUE on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

The cells were incubated with LPS (1 μg/mL) in the absence or presence of CAUE for 24 h, and then nitrite concentrations in the medium were determined using Gress reagent. Control cells were treated with DMSO. A: Cells were incubated for 24 h with LPS (1 μg/mL) in the absence or presence CAUE (0.5 ~ 5 μM). CAUE was added 1h before the incubation with LPS. B: Cells were treated with CAUE (1 μM) at different time points. Each values represent the mean ± S.E. for three different experiments performed in triplicate. \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus LPS alone (2nd column).

た. NO 産生は CAUE 2.5 μM より有意な産生低下が認められた. しかしながら, Fig. 2 において 2.5 μM より有意な殺細胞が認められたことから以降の検討においては 1.0 μM を最高濃度とし検討した (Fig. 3A). LPS 刺激による NO 産生に対する抑制化合物の多くは, 投与タイミングが重要であることが報告されているので, <sup>22)</sup> LPS 刺激による NO 産生に及ぼす CAUE 投与タイミングについて, 検討した. CAUE は LPS 前処理, 同時あるいは後処理において前後 6 時間検討した. CAUE は, LPS 刺激を行う 1 時間前に CAUE を処置したときに, 最も強い NO 産生の抑制作用が観察された (Fig. 3B).

### 3) 誘導型 NO 合成酵素に対する CAUE の影響

LPS 刺激による NO 産生の増大は, マクロファージ細胞の Toll 様受容体の活性化あるいは炎症性のサイトカインの産生誘導による iNOS の発現増大に起因することから, <sup>23)</sup> iNOS のタンパク質を Western blot 法と mRNA をリアルタイム RT-PCR 法で測定し, CAUE の影響を検討した. LPS 刺激により, iNOS タンパク質の発現の誘導が観察された. LPS 刺激を行う 1 時間前に CAUE を処置したときには, ほぼ用量に依存した抑制が観察された (Fig. 4).

同様に LPS 刺激により増大した iNOS mRNA の発

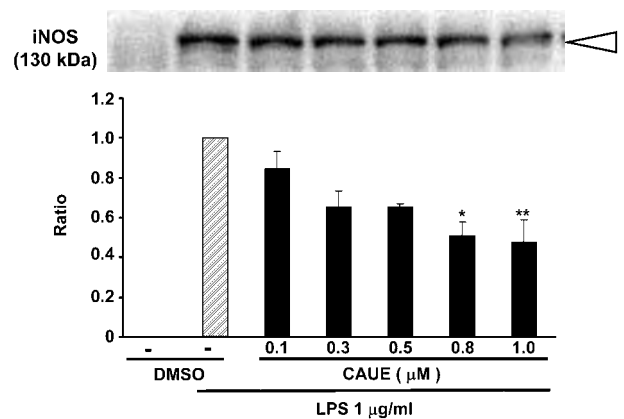


Fig. 4. Effect of CAUE on the expression level of iNOS protein in RAW 264.7 cells

Cells were preincubated in medium containing CAUE at the various concentrations for 1 hr and then treated with LPS (1 μg/mL) for 15 h. Control cells were treated with DMSO. The level of iNOS protein was determined 15 h after treatment of cells with LPS, with or without CAUE at various doses. Cell lysates were then prepared and subjected to Western blotting using an antibody specific for murine iNOS. The ratio of fluorescence intensity between the CAUE treated group and LPS alone was calculated. Each values represent the mean ± S.E. for three different experiments performed in triplicate. \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus LPS alone.

現量は, CAUE 処置により用量に依存した低下が認められ, 0.3  $\mu\text{M}$  から有意差が認められた (Fig. 5).

#### 4) COX-2, TNF- $\alpha$ に対する CAUE の影響

さらに, 炎症の化学伝達物質の指標 COX-2 と TNF- $\alpha$  の発現に及ぼす CAUE の影響を検討した. 細胞の LPS 刺激により COX-2 の発現増大がタンパク質および mRNA レベルで観察され, この増大

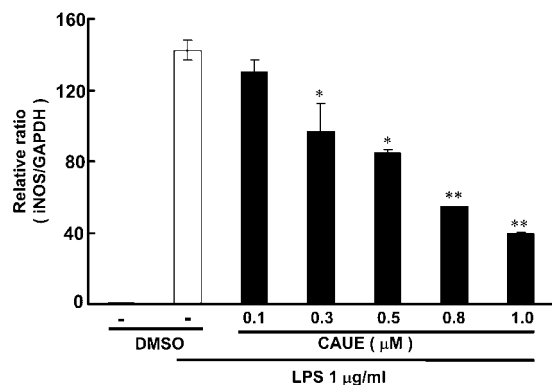
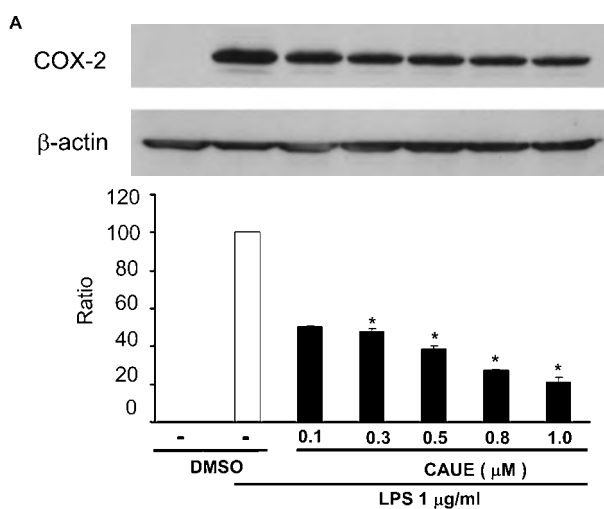


Fig. 5. Effect of CAUE on the level of iNOS mRNA in LPS-treated RAW 264.7 cells

Cells were pretreated with DMSO or the various concentrations of CAUE for 1 h and then treated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for another 15 h. iNOS mRNA was analyzed by Real-Time RT-PCR. Control cells were treated with DMSO. PCR using housekeeping gene GAPDH mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The density ratios of iNOS to GAPDH were calculated. Values represent the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. Each values represent the mean  $\pm$  S.E. for three different experiments in triplicate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus LPS alone.



は CAUE 処置によりほぼ用量に依存して抑制された (Figs. 6A, B).

LPS 刺激により, TNF- $\alpha$  の増大が観察され, この増大も CAUE 処置によりほぼ用量に依存する抑制が観察された (Fig. 7).

#### 5) NF- $\kappa\text{B}$ 活性化に対する CAUE の影響

iNOS や COX-2 タンパク質の発現は, 核内転写因子 NF- $\kappa\text{B}$  により調節されていることから, <sup>6,7</sup> NF- $\kappa\text{B}$  (p65/p50) 活性化の指標である核内のリン酸化体 p65 の発現量を測定した. LPS 刺激により, リン酸化体 p65 の発現量の増大が観察されたが, CAUE 処置により明らかに低下が認められたが用量依存性は認められなかった (Fig. 8).

#### 6) I $\kappa\text{B}$ に対する CAUE の抑制作用

CAUE が, iNOS タンパク質の発現調節因子 NF- $\kappa\text{B}$  の活性化を抑制することが認められたので, LPS 刺激による NF- $\kappa\text{B}$  の活性化調節因子 inhibitor kappa B (I $\kappa\text{B}$ ) に及ぼす CAUE の影響を検討した. I $\kappa\text{B}$  は細胞質中で, NF- $\kappa\text{B}$  と結合体を形成して NF- $\kappa\text{B}$  の活性化および核内移行を抑制することにより, NF- $\kappa\text{B}$  による iNOS, COX-2 あるいは炎症性サイトカイン発現遺伝子を抑制する.<sup>24)</sup> しかしながら, I $\kappa\text{B}$  は LPS 刺激により I $\kappa\text{B}$  分解酵素 I $\kappa\text{B}$  kinase (IKK) により分解されるため, NF- $\kappa\text{B}$  の抑制因子としての機能が消失し, 活性化状態の NF- $\kappa\text{B}$  が核内へ移行することになる. Fig. 9 に示すように, LPS 刺激による I $\kappa\text{B}$  の分解が観察されたが,

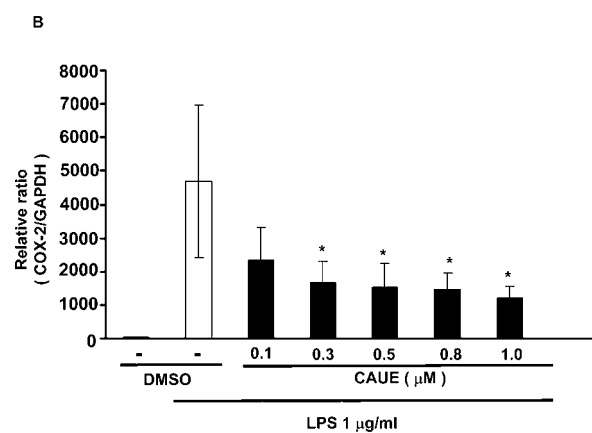


Fig. 6. Effect of CAUE on the expression level of LPS-induced COX-2 protein and mRNA in LPS-treated RAW 264.7 cell

A: Cells were treated with various concentration of CAUE for 1 h. LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was then added, and cells were incubated for 15 h. Control cells were treated with DMSO. Total cellular protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane, and detected with specific antibodies. B: Samples were treated described in the legend to Fig. 5, and Real-Time RT-PCR was performed to compared the mRNA levels of COX-2. PCR of GAPDH was performed to verify that the initial cDNA contents of samples were similar. The ratio of fluorescence intensity between the CAUE treated groups and LPS alone was calculated. Each values represent the mean  $\pm$  S.E. for three different experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  versus LPS alone.

CAUE 処置により I $\kappa$ B の分解が用量依存的に抑制された。なお、0.8  $\mu$ M の CAUE 処置ではコントロール群と同程度まで I $\kappa$ B の分解が抑制された。

### 7) MAPK に対する CAUE の影響

NF- $\kappa$ B の調節因子として、mitogen-activated protein kinase (MAPK) も存在し、MAPK は、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun

N-terminal kinase (JNK) および p38 の 3 つに大別され、リン酸化されることにより活性化される。<sup>25)</sup> LPS 刺激による MAPK に及ぼす CAUE に対する影響を検討した。LPS 刺激により、p38 のリン酸化の促進は認められなかったが、ERK (p44/42) のリン酸化の促進が観察され、CAUE (1.0  $\mu$ M) 処置により抑制が認められた (Fig. 10)。

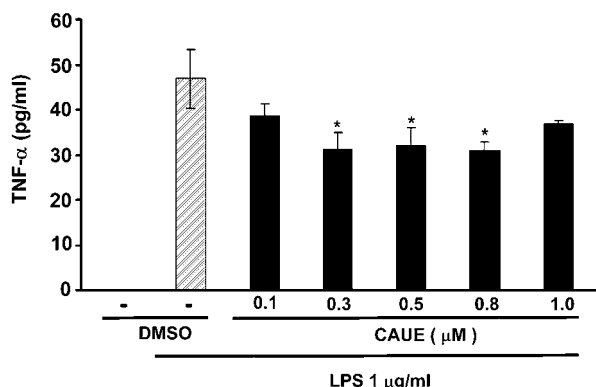


Fig. 7. Effect of CAUE on release of TNF- $\alpha$  in LPS-treated RAW 264.7 cell

Cells were treated with various concentration of CAUE for 1 h. LPS (1  $\mu$ g/mL) was then added, and cells were incubated for 15 h. Control cells were treated with DMSO. TNF- $\alpha$  was quantified using ELISA kit according to the manufacturer's instructions. Each values represent the mean  $\pm$  S.E. for three different experiments performed in triplicate. \* $P$ <0.05 versus LPS alone.

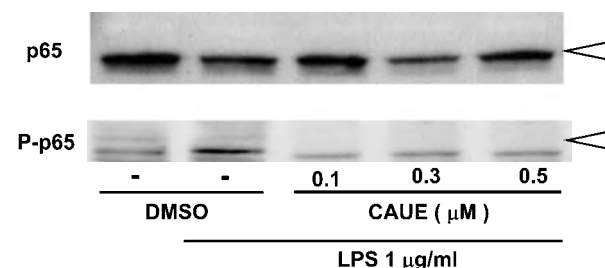


Fig. 8. Effect of CAUE on nuclear translocation of p65 in LPS-treated RAW 264.7 cell

Cells were pretreated with various concentration of CAUE for 15 min and then treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 30 min. Control cells were treated with DMSO. The p65 subunit of NF- $\kappa$ B was determined by Western blot analysis. This experiment was repeated twice with similar results.

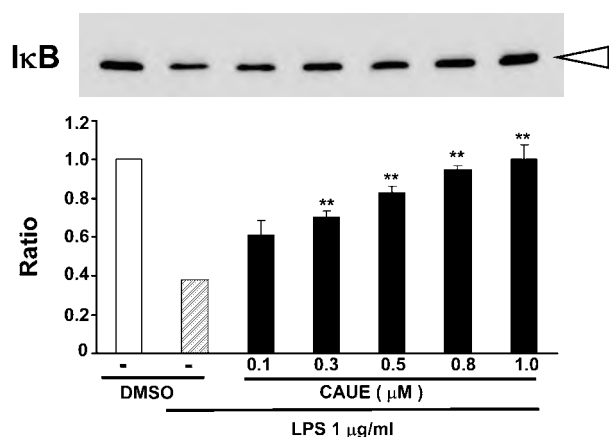


Fig. 9. Effect of CAUE on I $\kappa$ B degradation in LPS-treated RAW 264.7 cells

Cells were preincubated with various concentration of CAUE for 15 min and treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 30 min. Control cells were treated with DMSO. The protein levels of I $\kappa$ B was determined by Western blot analysis. The ratio of fluorescence intensity between the CAUE treated group and LPS alone was calculated. Each values represent the mean  $\pm$  S.E. for three different experiments performed in triplicate. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 versus LPS alone.

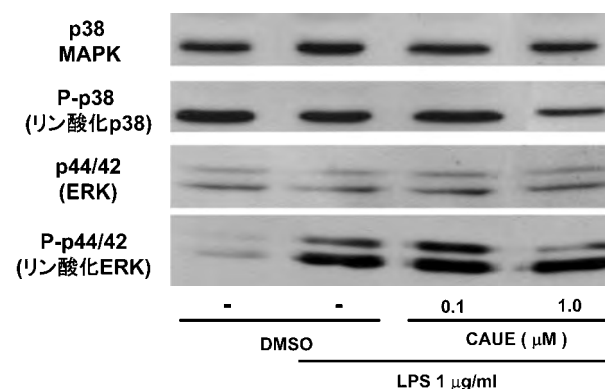


Fig.10. Effect of CAUE on phosphorylation of MAPKs in LPS-treated RAW 264.7 cell

Cells were treated with various concentration of CAUE before being incubated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 30 min. Control cells were treated with DMSO. The phosphorylation of MAPKs was detected by immunoblot analysis using antibodies against the corresponding activated form of MAPKs (dually phosphorylated on Tyr/Thr). The blots above were then stripped and reprobed with antibodies against the corresponding MAPKs. The experiment was repeated twice with similar results.

## 考 察

古くから人類は病気の治療のために経験的に有効な植物を民間薬あるいは漢方薬として用いているが、生薬に含まれている成分の作用機序については解明されていないものも多い。従って、生薬構成成分の作用機序を明らかにすることは生薬の民間薬あるいは漢方薬としての有用性を明確にする上で重要であり、当教室では、種々のフラボノイド化合物の抗炎症作用あるいは殺細胞作用の発現機序を明らかにしてきた。<sup>19,21,26)</sup>

一方、世界で広く使用されているアスピリンは、古代から痛み止め（鎮痛）や熱さまし（解熱）に使われた柳の皮に含まれる成分であるサリシンを原型にして合成されたものである。筆者らは、新しい作用機序を有し、副作用の少ない抗炎症薬のリード化合物を民間薬として繁用されているプロポリス成分の caffeic acid 誘導体から探索することを目的として、マクロファージにおいて LPS 刺激で誘導される NO 産生を抑制する化合物の探索とその作用機序の解明を試みた。

NO 合成酵素には neuronal NOS (nNOS), endothelial (eNOS), iNOS の 3 つのアイソザイムが存在する。炎症の場における血管拡張因子としての NO は、LPS や炎症性サイトカインなどの刺激によりマクロファージ、血管平滑筋あるいはグリア細胞において、iNOS により誘導される炎症の化学伝達物質である。<sup>27)</sup>

iNOS による過剰な NO 発現が炎症の誘因として重要な役割を果たすことは、ヒトあるいは動物の炎症において iNOS の発現の程度が炎症の重症度と相関し、ONOO<sup>-</sup>の生成を示す nitrotyrosine が認められること、さらに NOS 阻害剤の多くが抗炎症作用を有し、iNOS 遺伝子欠損マウスでは炎症の発症が弱められることから明らかである。<sup>28)</sup>

マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 を用いて、LPS 刺激により産生誘導される NO を炎症の指標とし、CAUE について検討をした。RAW 264.7 細胞を CAUE を添加した培地中で 24 時間培養したとき、CAUE の用量に依存して殺細胞作用が観察され、2.5  $\mu$ M 以上の濃度において有意差が認められた (Fig. 2)。マクロファージ細胞における、LPS あるいは炎症性サイトカイン刺激による NO 産生の抑制効果には、NO 産生抑制化合物の投与タイミングが重要であることが指摘されているので、<sup>22)</sup>

LPS 刺激と CAUE の投与タイミングについて検討した。RAW 264.7 細胞における、LPS 刺激による NO 産生が、LPS の用量に依存して増大し、LPS 1  $\mu$ g/mL による NO 産生が NO 合成阻害薬 N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により抑制されることを観察しているもので、<sup>6)</sup> 1  $\mu$ g/mL の LPS を使用した。LPS 処理に対して CAUE を前処理したところ、CAUE の用量に依存した NO 産生の抑制が観察された (Fig. 3A)。しかしながら Fig. 1 より 2.5  $\mu$ M より有意な殺細胞作用が認められることから CAUE 処理 2.5  $\mu$ M より認められる NO 産生の低下は細胞死に起因するものと考えられる。よって以降の検討においては 1.0  $\mu$ M を最高濃度とし検討を行った。さらに LPS と CAUE の処理タイミングにおける NO 産生に及ぼす影響について検討したところ、LPS 刺激 1 時間前に CAUE を処置したとき、最も強い NO 産生の抑制が観察された (Fig. 3B)。LPS 刺激による NO 産生に対して、CAUE の効果発現には至適タイミングが存在することから、CAUE が直接的に NO を捕捉するのではなく、LPS がマクロファージ細胞の CD14 レセプターと結合することにより、細胞が活性化することによるシグナル伝達機構を介して炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , インターロイキン-1 (IL-1), IL-6, IL-8 などをコードする遺伝子の転写を促進して、サイトカインを産生する過程を阻害することを示唆している。<sup>29)</sup> LPS 刺激により産生する NO が、CAUE 処置により抑制されたことから、NO 産生に関与する iNOS のタンパク質と mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。LPS 刺激による iNOS タンパク質と mRNA の誘導は、CAUE 処置によりほぼ用量依存的に抑制効果が観察されたので、LPS 刺激による NO 産生の CAUE による抑制作用が iNOS の誘導抑制によることが明らかとなった (Figs. 4, 5)。さらに、LPS 刺激による炎症に関与する COX-2 のタンパク質と mRNA 発現および炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の誘導に対しても CAUE は用量依存的な抑制作用を示した (Fig. 6, 7)。

iNOS や COX-2 の発現の調節因子の一つである NF- $\kappa$ B は、あらゆる細胞に存在し、5 つの転写因子、p50/p105 (NF- $\kappa$ B<sub>1</sub>), p52/p100 (NF- $\kappa$ B<sub>2</sub>), p65 (RelA), c-Rel, RelB の総称である<sup>30)</sup>。NF- $\kappa$ B は p65 と p50 のヘテロダイマーを形成し、無刺激状態では、I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ) と結合し、不活性体として細胞質中にとどまって



いる。しかし、細胞が LPS や TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  などの刺激を受け、I $\kappa$ B kinase により I $\kappa$ B がリン酸化され、ユビキチン化された後、プロテアソームによって分解されると、活性化した NF- $\kappa$ B ヘテロダイマーは核内へ移行し、iNOS, IL-1, TNF- $\alpha$ , COX-2 などの DNA 配列を認識し、結合することで標的遺伝子の発現を調節している。<sup>31,32)</sup>

LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の核内移行を、NF- $\kappa$ B p65 (RelA) の核内発現を指標として、CAUE の影響を検討した。LPS 刺激により、リン酸化 p65 の誘導が観察され、その誘導は CAUE によって抑制された (Fig. 8), このとき、NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するタンパク質 I $\kappa$ B の分解抑制も観察された (Fig. 9)。

以上のことから CAUE は、NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するタンパク質 I $\kappa$ B の分解を抑制することにより、炎症性サイトカインあるいは iNOS の誘導と NO 産生を抑制することが明らかとなった。

NF- $\kappa$ B は種々の炎症性サイトカインの発現および免疫系の増殖や機能発現、細胞のがん化など種々の生命現象に深く関与することが報告されている。ヒトの関節炎とよく似た病態を示すマウスコラーゲン関節炎 (collagen-induced arthritis: CIA) の発症には T 細胞の活性化が関与することが知られている。<sup>33,34)</sup> T 細胞の機能の一つに抗原応答性のサイトカインの産生があり、T 細胞が活性化されると IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞 (Th1) と IL-4 や IL-5 を産生するヘルパー T 細胞 (Th2) へと分化する。Th1 細胞が産生するサイトカインが、CIA の関節炎の発症と急性症状を誘発することから、NF- $\kappa$ B 阻害活性を認めた CAUE は、ヒトの関節炎の発症を抑制できる可能性が示唆された。

現在、炎症治療薬として用いられている非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は COX を阻害することによって PG 産生を抑制する。一方、CAUE は、複数の炎症性サイトカインの発現を抑制するので、より強力な抗炎症作用が期待できると考えられた。NSAIDs であるアスピリンやインドメタシンなどのような非特異的 COX-1/COX-2 阻害薬は、胃腸障害や腎障害などの副作用をもつので、COX-1 を抑制せず COX-2 だけを選択的に抑制する副作用の少ない薬の開発が期待されている。CAUE が COX-2 タンパク質の発現調節因子 NF- $\kappa$ B に対して、阻害活性を示したので、胃腸障害や腎障害などの副作用が低い抗炎症薬として期待され、COX-1 に対する作用についての検討が待たれる。

NF- $\kappa$ B の調節因子として、種々の増殖因子やストレス刺激により活性化されるセリン/スレオニンキナーゼの MAPK も存在し、その活性化にはスレオニンとチロシン残基の双方のリン酸化が必要とされている。<sup>24,35)</sup> この両残基をリン酸化する酵素がセリン/スレオニン/チロシンキナーゼの MAPK キナーゼである。MAPK は、ERK, JNK, p38 の 3 つに大別され、それぞれの上流域において特異的なカスケードを形成している。<sup>36)</sup> ERK は増殖因子受容体などの下流で細胞の増殖や分化のシグナル伝達に、JNK と p38 はストレス刺激や炎症性サイトカインなどで活性化され、アポトーシスシグナル伝達に関与している。CAPE が ERK の活性を抑制することが報告されていることから、<sup>37)</sup> CAUE の NF- $\kappa$ B 抑制作用における、MAPK キナーゼの関与についても検討した。LPS 刺激による p38 の活性化は認められなかったが、p44/42 (ERK) の活性化が観察され、CAUE 処置により p44/42 (ERK) と p38 活性の抑制が認められた。今回の測定系においては JNK の測定が検出限界以下であり、CAUE の JNK に対する影響については観察することはできなかったが、CAUE は、MAP キナーゼの ERK と p38 活性を抑制することにより NF- $\kappa$ B の活性を抑制していることが明らかとなった。このことは、iNOS の活性化が ERK と p38 を介する NF- $\kappa$ B の活性化によるとする報告と符号するものである。<sup>38-40)</sup>

炎症の発現機構には NF- $\kappa$ B 以外の炎症関連する転写因子として activator protein-1 (AP-1), Jak-STAT 経路, バクテリアの転写因子あるいは好中球など複数の転写因子および物質の関与が存在することからこれらの炎症性シグナル伝達機構に及ぼす CAUE の作用の検討も必要と思われる。<sup>41)</sup>

## 謝辞

本研究にあたり、caffeic acid 誘導体の合成の指導をいただいた、本学薬品反応化学教室の竹下光弘教授および薬剤学教室の上井幸司博士に深謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Kundu J. K., Surh Y. J., *Mutat. Res.*, **659**, 15-30 (2008).
- 2) Furchgott R. F., Zawadzki J. V., *Nature*, **288**, 373-376 (1980).

- 3) Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S., *Nature*, **327**, 524-526 (1987).
- 4) Sarkar D., Saha P., Gamre S., Bhattacharjee S., Hariharan C., Ganguly S., Sen R., Mandal G., Chattopadhyay S., Majumdar S., Chatterjee M., *Int. Immunopharmacol.*, **8**, 1264-71 (2008).
- 5) Singer II, Kawka D. W., Scott S., Weidner J. R., Mumford R. A., Riehl T. E., Stenson W. F., *Gastroenterology*, **111**, 871-885 (1996).
- 6) Lechner M., Lirk P., Rieder J., *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 277-289 (2005).
- 7) Kim Y. W., Zhao R. J., Park S. J., Lee J. R., Cho I. J., Yang C. H., Kim S. G., Kim S. C., *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 165-73 (2008).
- 8) Elliott M. J., Maini R. N., Feldmann M., Long-Fox A., Charles P., Katsikis P., Brennan F. M., Walker J., Bijl H., Ghrayeb J., *Arthritis Rheum.*, **36**, 1681-1690 (1993).
- 9) Criscione L. G., St Clair E. W., *Curr. Opin. Rheumatol.*, **14**, 204-211 (2002).
- 10) Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Genovese M. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J., Finck B. K., *New Engl. J. Med.*, **343**, 1586-1593 (2000).
- 11) Taylor P. C., *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 1095-1106 (2003).
- 12) Ghisalberri E. L., *Bee World*, **60**, 59-84 (1979).
- 13) <http://www.nih.go.jp/eiken/>
- 14) a) Ujibe M., Kanno S., Osanai Y., Koiwai K., Ohtake T., Kimura K., Uwai K., Takeshita M., Ishikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2338-2341 (2005); b) 小山内優, 氏部真優子, 菅野秀一, 石川正明, 第57回日本薬理学会北部会, 弘前, 2006年9月, 要旨集 p67.
- 15) Uwai K., Osanai Y., Imaizumi T., Kanno S., Takeshita M., Ishikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 7795-7803 (2008).
- 16) Kanno S., Ishikawa M., Takayanagi M., Takayanagi Y., Sasaki K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 446-450 (2000).
- 17) Kanno S., Shouji A., Hirata R., Asou K., Ishikawa M., *Life Sci.*, **75**, 353-365 (2004).
- 18) Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138 (1982).
- 19) Kanno S., Tomizawa A., Ohtake T., Koiwai K., Ujibe M., Ishikawa M., *Toxicol. Lett.*, **166**, 131-139 (2006).
- 20) Osanai Y., Kanno S., Uwai K., Takeshita M., Ishikawa M., *Pharmacometrics*, **75**, 19-24 (2008).
- 21) Kanno S., Shouji A., Tomizawa A., Hiura T., Osanai Y., Ujibe M., Obara Y., Nakahata M., Ishikawa M., *Life Sci.*, **78**, 673-681 (2005).
- 22) Wakabayashi I., *Pharmacol. Toxicol.*, **84**, 288-291 (1999).
- 23) Aktan F., *Life Sci.*, **75**, 639-653 (2004).
- 24) Mercurio F., Zhu H., Murray B. W., Shevchenko A., Bennett B. L., Li J., Young D. B., Barbosa M., Mann M., Manning A., Rao A., *Science*, **278**, 860-866 (1997).
- 25) Kyriakis J. M., Avruch J., *Physiol. Rev.*, **81**, 807 (2001).
- 26) Kanno S., Tomizawa A., Hiura T., Shouji A., Ohtake T., Kimura K., Ishikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 527-530 (2005).
- 27) Clancy R. M., Amin A. R., Abramson S. B., *Arthritis Rheum.*, **41**, 1141-1151 (1998).
- 28) Kankuri E., Vaali K., Knowles R. G., Lahde M., Korpela R., Vapaatalo H., Moilanen E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1128-32 (2001).
- 29) Liu Y., Wang Y., Yamakuchi M., Isowaki S., Nagata E., Kanmura Y., Kitajima I., Maruyama I., *Infect Immun.*, **69**, 2788-2796 (2001).
- 30) Hayden M. S., Ghosh S., *Genes Dev.*, **18**, 2195-224 (2004).
- 31) Baldwin A. S. Jr., *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 649-683 (1996).
- 32) Tse A. K., Wan C. K., Shen X. L., Yang M., Fong W. F., *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1443-1457 (2005).
- 33) Seki N., Sudo Y., Mizuhara H., Orito K., Imasaki A., Ono S., Hamaoka T., Senoh H., Fujiwara H., *J. Immunol.*, **148**, 3093-3099 (1992).
- 34) Seetharaman R., Mora A. L., Nabozny G., Boothby M., Chen J., *J. Immunol.*, **163**, 1577-1583 (1999).
- 35) Hsiao G., Shen M. Y., Chang W. C., Cheng Y. W., Pan S. L., Kuo Y. H., Chen T. F., Sheu J. R., *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1383-1392 (2003).
- 36) Cobb M. H., Goldsmith E. J., *J. Biol. Chem.*, **270**, 14843-14846 (1995).
- 37) Jung W. K., Choi I., Lee D. Y., Yea S. S., Choi Y. H., Kim M. M., Park S. G., Seo S. K., Lee S. W., Lee C. M., Park Y. M., Choi I. W., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **40**, 2572-82 (2008).
- 38) Wsselboreg S., Bauer M. K. A., Vogt M. L., Schulze-

- Osthoff K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 12422-12429 (1997).
- 39) Feng G.-J., Goodridge H. S., Harnett M. M., Wei X.-Q., Nikolaev A. P., *J. Immunol.*, **163**, 6403-6412 (1999).
- 40) El-Mahmoudy A., Shimizu Y., Shiina T., Matsuyama H., El-Sayed M., Takewaki T., *Int. Immunopharmacol.*, **5**, 195-207 (2005).
- 41) Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H., Moilanen E., *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, **4**, 471-479 (2005).