

ローズマリン酸の抗酸化作用とラット肺組織マトリックス メタロプロテアーゼ阻害作用について

佐々木健郎*, 佐藤久美子, 新井 栄吉, 吉崎 文彦

Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid Contributes to Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity in Rat Lung

Kenroh SASAKI,* Kumiko SATO, Eikichi ARAI, and Fumihiko YOSHIZAKI

(Received November 22, 2005)

Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid, being found to have a multitude of biological activities such as anti-inflammation, antimutagen and antioxidant. In order to establish the relationship between antioxidants and matrix metalloproteinase (MMP) -inhibitory activity, rosmarinic acid and caffeic acid were evaluated for their potential in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and blocking of MMP activity. Gelatinase activity was measured using the gelatin degradation and/or gelatin-zymography assay. From comparison of the different levels of DPPH radical scavenging activity, it was deduced that a crucial role in inhibition for MMP activity might play by an antioxidant activity. This comparative study is proposed as a basis for designing the enhanced antiproteolytic activities, and no or reduced side effects for use in hindering inflammation, cancer invasion or metastasis and angiogenesis in lung.

Key words — rosmarinic acid; antioxidant activity; matrix metalloproteinase; rat lung

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) は細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) を分解する金属プロテアーゼであり, 膜型及び分泌型として存在している. 組織のリモデリングや治癒など生体の恒常維持のため必要不可欠な酵素であり, 通常生体内では内因性の阻害タンパク質によりその活性が調節されている. 疾患との関わりも密接であり, 脳虚血^{1,2)} や癌の浸潤・転移³⁾, 関節リウマチ⁴⁾ に関与している. また, 単球, マクロファージ細胞⁵⁾ あるいは星状細胞⁶⁾ におけるタンパク質のプロセッシング, あるいはアミロイド前駆体タンパク質やアミロイド β -ペプチド (A β) の産生の亢進, 及びA β 分解の低下によるA β の脳内蓄積にも関与していると考えられている. 近年, 活性酸素により惹起される酸化ストレス

が心繊維芽細胞におけるコラーゲン合成やMMP活性を制御することが報告され⁷⁾, また心細胞以外にラット肺⁸⁾ やヒト静脈内皮細胞⁹⁾ などで, 活性酸素種がコラーゲン代謝を制御すると報告されている. 活性酸素種はキサンチンオキシダーゼ系, ミトコンドリア電子伝達系, アラキドン酸代謝系あるいは白血球細胞, 特に好中球で産生され, それ自体が疾患との関連から注目されているが, 活性酸素種の産生とMMP活性との関連には特に興味を持たれる.

一方, ロズマリン酸は植物に広く分布するフェニルプロパノイドの一種であるカフェー酸と3, 4-ジヒドロキシフェニル乳酸のエステルであり, その生合成経路も明らかにされている¹⁰⁾. 一般にムラサキ科 (Boraginaceae) 及びシソ科 (Labiatae) 植物に分布し, その生物活性は多様

であるが、特に強い抗炎症作用あるいは抗酸化作用を示すとされる。すなわち、抗炎症作用の機序として5-リポキシゲナーゼの阻害作用¹¹⁾、肥満細胞からのヒスタミン遊離の抑制作用¹²⁾あるいはスーパーオキシドラジカルの除去作用(抗酸化作用)¹³⁾等が報告されている。また、特に抗酸化作用は、天然物ポリフェノール類中、フラボノイドであるケルセチンよりもさらに強いことが知られている¹⁴⁾。

これらのことから、抗酸化作用を有する化合物とMMP活性への影響との関連性を明らかにする目的で、ロズマリン酸及びカフェー酸のMMP活性に対する阻害作用について検討した。

実験方法

1. 使用薬物

ゼラチン、4-aminophenylmercuric acetate (APMA) 及びカフェー酸はSigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) はAldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), SDS-PAGEに用いる試薬はBio-Rad Co., Ltd. (Hercules, CA, USA), ロズマリン酸はフナコシ(東京)から購入した。その他の試薬はナカライテスク(京都)のものを使用した。

2. DPPHラジカル除去活性の測定

DPPHラジカル除去活性の測定はLeeらの方法¹⁴⁾に準じて行った。すなわち、5-100 μ Mのロズマリン酸水溶液10 μ lをDPPHの0.5mg/mlメタノール溶液と混和し、37°Cで30min間インキュベーションした後、515nmの吸光度を測定し、H₂Oのみを添加した対照群との吸光度差からラジカル除去活性を算出した。

3. 使用動物

9-10週齢、200-220gのWistar系雄性ラットを使用した。ラットは恒温恒湿(25 \pm 1°C, 55 \pm 5%)で明期(7:00~19:00)及び暗期(7:00~19:00)の環境下、固形飼料(CE-2, 日本クレア)と水道水を自由に摂取させた。

4. ゼラチン分解活性の測定

ゼラチン分解活性の測定はDemeuleら¹⁵⁾の方法に準じて行った。肺組織を5倍量のTris-HCl

buffer (50mM, pH 7.5, 4°C)にてホモジナイズし上清画分(9000 \times g, 4°C, 20 min)を得た。これを0.5mM APMA (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 7.5)と共に37°Cで1 h インキュベーションした。タンパク質量はBradfordら¹⁶⁾の方法に従って測定し、1.0 mg/mlに設定して使用した。これに1.0 mg/mlのゼラチン基質溶液を添加し、37°Cで18 h インキュベーション後7.5% acrylamide/bisacrylamide (29:1)分離ゲルにアプライし、Mini-Protein III apparatus (Bio-Rad)にて200Vで40 min間SDS-PAGEを行った。分子量マーカーには、myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa)を用いた。タンパク質はrapid stain Coomassie Brilliant Blue kit (ナカライテスク)を用いて染色した。

5. ゼラチンゼイモグラフィー

ゼラチン基質のゼラチンゼイモグラフィーは非還元SDS-PAGEにて行った。肺ホモジネート上清画分は2-mercaptoethanolを除くLaemmli sample bufferに溶解し、1.0 mg/mlのゼラチンを含むSDS-PAGE gelにより前項4.と同様の条件で泳動を行った。泳動後ゲルは室温で0.25% Triton X-100で15 min 2回、H₂Oで10min洗浄し、インキュベーションバッファー [(50mM Tris-HCl (pH 7.6), 20mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.02% Brij-58)] 中37°Cで18 h インキュベーションした。ゲルはrapid stain Coomassie Brilliant Blue kitを用いて染色した。

5. MMP活性の定量

SDS-PAGEにより得たゲル中の分子量211 kDaのタンパク質バンド、あるいはゼラチンゼイモグラフィー法による消化痕はスキヤナ(EPSON ES-2200)でPCに取り込み、定量的画像解析法(L Process V2.0及びImage Gauge V4.0 C FUJI PHOTOFILM Co., Ltd.)により処理した。

6. 統計処理

統計処理はSigma Stat statistical software ver.2.03 (SPSS Inc., IL, USA)を用いて行った。各測定値は平均値あるいは平均値 \pm 標準誤差で表示し、Kruskal-Wallis ANOVA rank test (p<0.05)により有意差を検討した。

結果及び考察

ロズマリン酸の抗酸化作用をDPPHラジカル除去活性により測定した結果をFig.1に示す。ロズマリン酸及びカフェー酸は共に有意なラジカル除去作用を示し、用量依存的であった。その IC_{50} 値はそれぞれ $37.07 \pm 4.67 \mu M$ 及び $79.69 \pm 6.67 \mu M$ であり、ロズマリン酸の抗酸化作用はカフェー酸に比較し、約2倍強いものであった。ロズマリン酸は、 $110^\circ C$ で流速 $7.0 ml/min$ の酸素曝気下の強力な酸化条件下で、メチルリノレン酸の自動酸化を抑制し、その阻害作用はカフェー酸よりも強いことが報告されている¹⁷⁾。Fig.1の結果から本実験でも同様の傾向が認められた。さらに、Tournaireら¹⁸⁾は、フラボノイドの抗酸化作用の検討において、B環のカテコールの存在がスーパーオキシドラジカルの除去作用に重要であることを示唆しているため、Fig.1の結果は抗酸化活性にカフェー酸及びロズマリン酸のカテコールが関与すると推察される。

次に肺組織MMP活性に対するカフェー酸及びロズマリン酸の影響を検討するために、APMAにより活性化されたMMP群によるゼラチン分解作用に対する阻害について検討した。ゼラチンに特異的な分子量 $211 kDa$ のバンドはAPMA処理群では完全に消失したが、 $10mM$ EDTAによりこの消失は阻害された (Fig.2)。ロズマリン酸はこのゼラチン分解活性を用量依存的に阻害し有意であった。結果をFig.3に示す。尚、以下の実験は3回以上繰り返し、その平均値を表示した。EDTAによる阻害を100%とした場合に、ロズマリン酸 $100 \mu M$ で62%の阻害を認め、 IC_{50} 値は $78.09 \mu M$ であった。カフェー酸でも同様の検討を行ったが、阻害はロズマリン酸に比較して極めて弱く、 $100 \mu M$ で11.5%であった。

さらにMMPファミリーの中でも特に、IV型コラゲナーゼと称されるMMP-2 (ゼラチナーゼA) に対する影響を、基質にゼラチンを用いたSDS-PAGE ザイモグラフィー法により検討した。ザイモグラフィー法では、ゲルの染色後に観察される透明なバンドはMMPのゼラチン分解活性と一致する。これらの透明なバンドは $66 kDa$ の活

性型MMP-2、 $72 kDa$ の潜在型MMP-2とそれぞれ同定した (Fig.4-A)。 $66 kDa$ のバンドはEDTA添加により完全に消失し、ロズマリン酸添加により用量依存的に部分的に消失し有意であった (Fig.4-B, 4-C)。分子量 $66 kDa$ の活性型MMP-2のバンドの消失を定量的に画像解析した結果、その阻害活性はEDTAによる阻害を100%とした場合に、ロズマリン酸 $100 \mu M$ で65%、 $5 \mu M$ で25%の阻害を認め、 IC_{50} 値は $27.2 \mu M$ であった (Fig.5)。カフェー酸でも同様の検討を行ったが、阻害はロズマリン酸に比較して弱く、 IC_{50} 値は $100 \mu M$ で45%であった。

APMAが有する自動触媒作用によりMMPの活性化が起きるが、その機序についてはItoh¹⁹⁾らや、Fridman²⁰⁾らによりマトリックスメタロプロテアーゼ組織阻害物質 (TIMP) の阻害機序と共に詳細に検討されている。すなわち、APMAのMMP群に対する活性化機構は単純ではなく、①チモーゲンとして存在するpro体MMP群の活性化、②TIMP群と複合体を形成しているMMP群の活性化、及び③MMP-TIMP複合体あるいは潜在型から活性型MMPに変換される際のMMP中間体に対する他のMMP群による活性化機構に大別される。MMP-TIMP複合体ではAPMAの存在下、潜在型MMP-2あるいは-9は活性型MMP-2あるいは-9に変換されるが、そのままでは活性型MMPのZn結合部位はシステイン残基に含まれる-SH基を利用しZnと共役しており²¹⁾、TIMPによりマスキングされそのままではゼラチナーゼ活性を発現しない。しかし、組織ホモジネートのAPMA処理においてはMMP-2あるいは-9以外の種々のMMP類がAPMAにより遊離される。このことは他の活性型MMPのZn結合部位とTIMPとの結合を惹起することになり、組織中では活性型MMP群はゼラチナーゼ活性を発現するようになる。また、APMAで活性化した組織タンパク質分解活性は疾患に関与するECM分解活性と一致することから、我々はAPMAを薬物誘発性MMP活性化モデルとしてin vitro及びex vivoにおける実験に応用した²²⁾。

一方、酸化ストレスにより誘発されるECM分解の原因としては、MMPをはじめとするプロテ

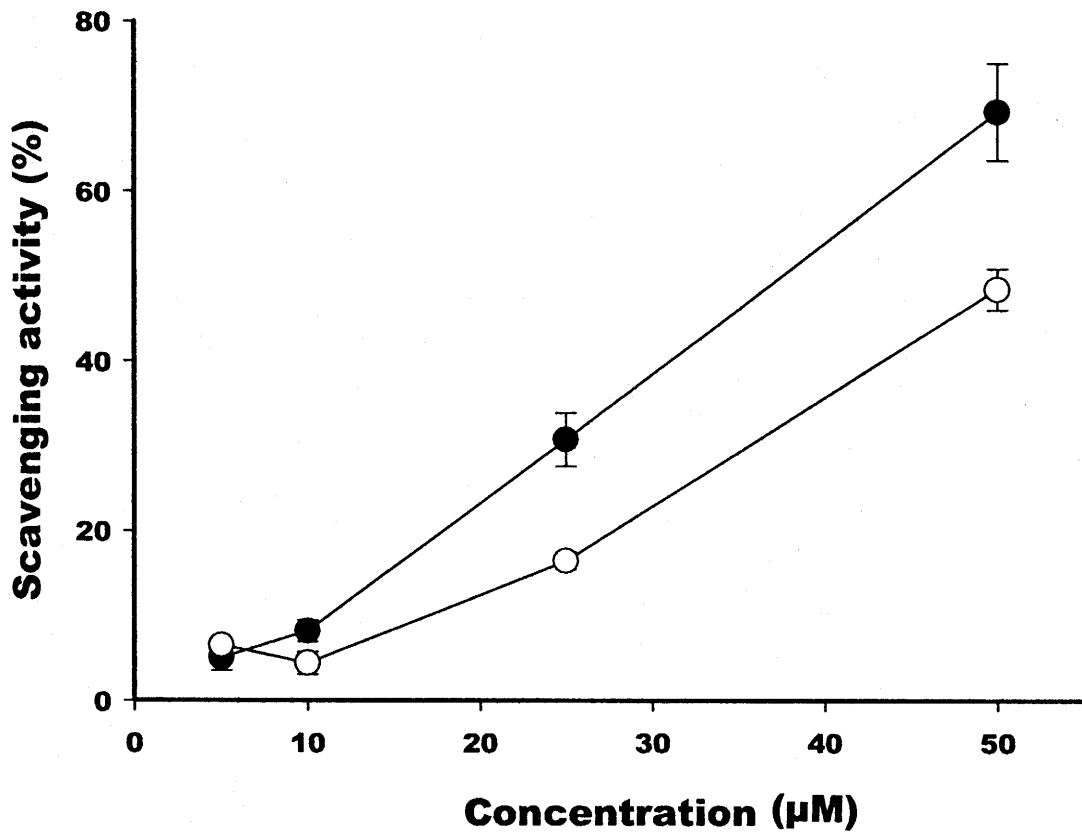


Fig.1. DPPH-radical Scavenging Activity of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid
 -●-, rosmarinic acid; -○-, caffeic acid. Vertical lines show the standard error of the mean. (n=4)

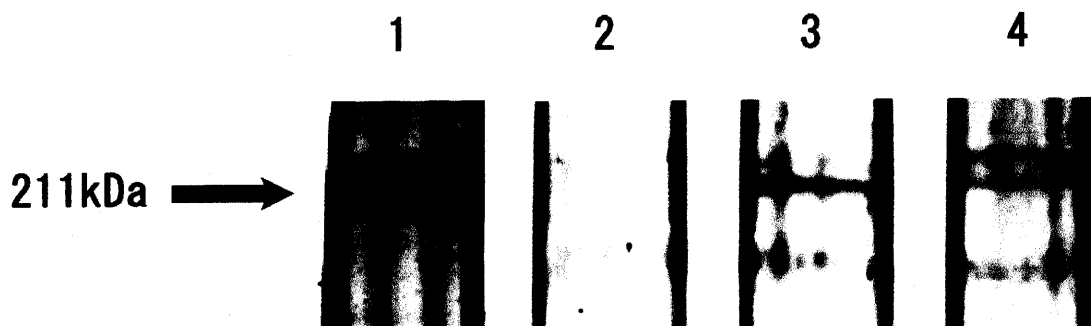


Fig.2. Gelatinolytic Activity of Lung $9000 \times g$ Supernatant Fraction Activated by APMA
 Activation, incubation and electrophoresis were carried out as described in Materials and Methods. Lane:1, gelatin alone; 2, gelatin, $9000 \times g$ supernatant fraction treated with APMA only; 3, gelatin, $9000 \times g$ supernatant fraction treated with APMA and 10mM EDTA; 4, gelatin, $9000 \times g$ supernatant fraction treated with APMA and $100 \mu M$ rosmarinic acid. Arrow indicates 211kDa.

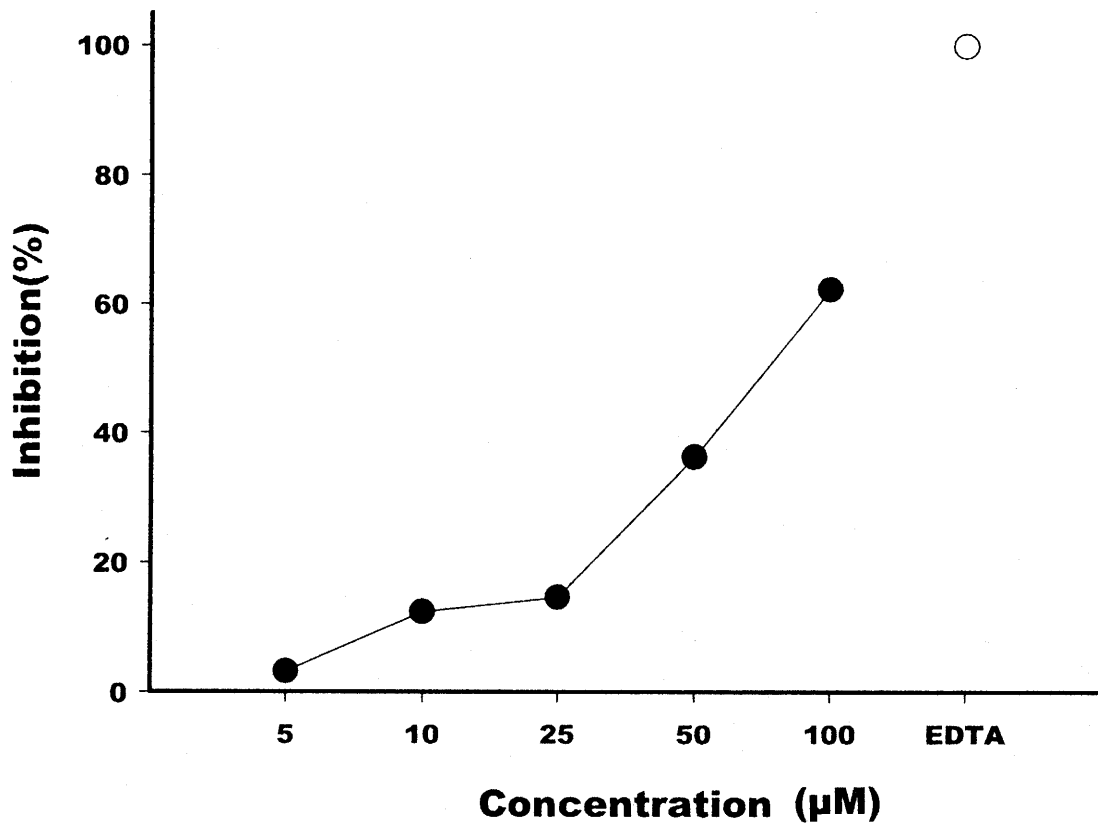


Fig.3. Effect of Rosmarinic Acid on Gelatinolytic Activity of Lung 9000 × g Supernatant Fraction

Quantification for inhibitory activity was performed by determination of the disappearance of gelatin-peculiar protein band (211 kDa). The inhibitory activity is shown as the percentage of EDTA-control value. Each experiment was performed independently in triplet, and the data are shown as mean (n=3-5).

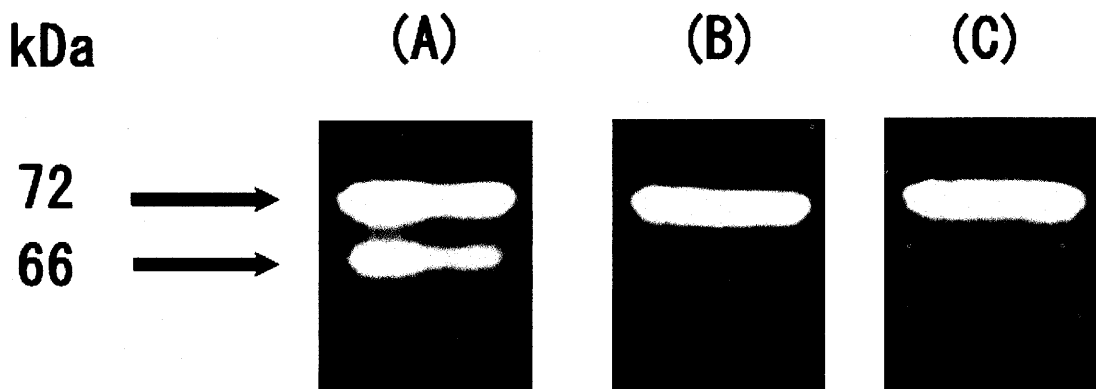


Fig.4. SDS-PAGE Gelatin-Zymography of Lung 9000 × g Supernatant Fraction

Augmentation of gelatinolytic activity was performed as described in Fig. 2. The supernatant fraction was incubated with or without EDTA or rosmarinic acid for 18 h, and applied to gelatin (1.0 mg/ml) - containing gel in non-reducing conditions. A. Control. The clear bands correspond to pro MMP-2 and activated MMP-2. B. With EDTA. C. With 100 µ M rosmarinic acid.

アーゼの直接的な関与と生体内レドックス制御の崩壊による内因性抗酸化システムの欠落, すなわち種々の酵素活性の変動を考慮しなければならぬ. Siwikら⁷⁾は心線維芽細胞におけるコラーゲン合成及びMMPに対する活性酸素種の影響を過酸化水素とキサンチンオキシダーゼによるスーパーオキシドラジカルの産生から, さらに細胞外SODとサイトソルSOD活性, あるいはグルタチオン及びカタラーゼ活性の抑制による過酸化水素レベルの上昇に深く関与するとされる²³⁾, グルコース6-リン酸の阻害による細胞内スーパーオキシドレベルの上昇から検討した. その結果, 過酸化水素とスーパーオキシドは共にコラーゲン感受性の [³H] - prolineの取り込みを阻害することから, コラーゲン合成を阻害

し, プロコラーゲン $\alpha 1$ (I), $\alpha 2$ (II), $\alpha 3$ (III)のmRNA量の低下をも誘発した. 同時に, MMP-2, MMP-9, MMP-13の活性亢進も惹起し, ECM分解を誘発することを報告している. また, ラット肺組織においても過酸素供給状態において潜在型MMP-2と潜在型MMP-9のmRNAの発現が促進されること⁸⁾, さらにキサンチンオキシダーゼは潜在型MMPの発現を促進し, TIMP-2の発現を抑制することも報告されており, MMP活性にスーパーオキシドラジカルが深く関与することが示唆されている²⁴⁾.

本結果より, ロズマリン酸はDPPHラジカルを除去する強い抗酸化作用を示すと共にMMP阻害作用を示し, カフェー酸はロズマリン酸に比較し抗酸化作用は弱く, MMP阻害作用も弱いこ

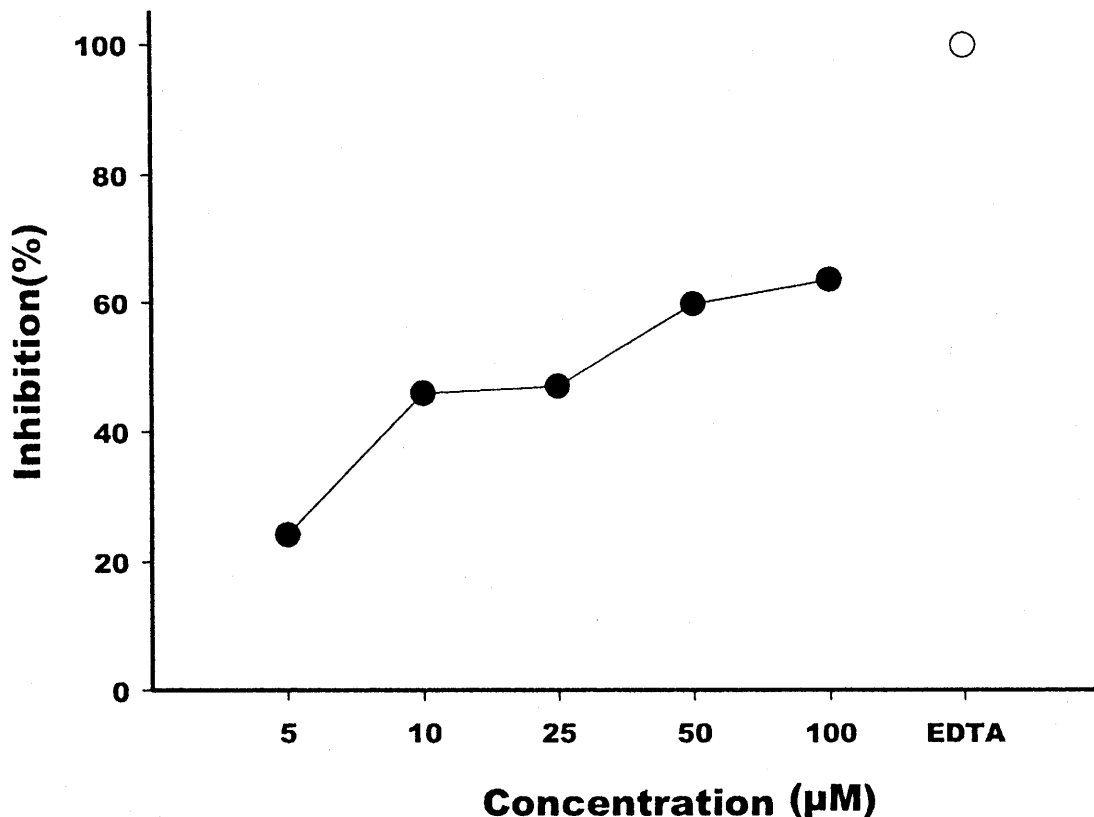


Fig.5. Effect of Rosmarinic Acid on SDS-PAGE Gelatin-Zymography in Lung 9000 × g Supernatant Fraction
Quantification for inhibitory activity was performed by determination of the disappearance of gelatin-gel staining. The inhibitory activity is shown as the percentage of EDTA-control value. Each experiment was performed independently in triplet, and the data are shown as mean (n=4-5).

とが明らかになった。この結果は抗酸化作用とMMPの阻害作用との密接な関連性を示唆している。すなわち、生体内でのMMPの活性化とゼラチンあるいはコラーゲン分解作用の発生機序の解明、あるいはECM分解及びMMPが関与する様々な疾患の治療への抗酸化性物質の応用の可能性を示唆するものと考ええる。

REFERENCES

- 1) Rosenberg G.A., Navratil M., Barone F., Feuerstein G., *J. Cereb. Blood Flow & Metab.*, **16**, 360 – 366 (1996).
- 2) Romanic A.M., White R.F., Arleth A.J., Ohlstein E.H., Barone F.C., *Stroke*, **29**, 1020 – 1030 (1998).
- 3) John A., Tuszyński G., *Pathol. Oncol. Res.*, **7**, 14 – 23 (2001).
- 4) Hayakawa T., Yamashita K., Kodama S., Iwata H., Iwata K., *Biomed. Res.*, **12**, 169 – 173 (1991).
- 5) Chong Y.H., Song J.H., Shin S.A., Chung J.H., Suh Y.H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 23511 – 23517 (2001).
- 6) Deb S., Zhang J.W., Gottschall P.E., *Brain Res.*, **970**, 205 – 213 (2003).
- 7) Siwik D.A., Pagono P.J., Coolucci W.S., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **280**, c53 – 60 (2001).
- 8) Pardo A., Barrios R., Maldonado V., Melendez J., Perez J., Ruiz v., Segura-Valdez L., Sznajder J.I., Selman M., *Am. J. Pathol.*, **153**, 833 – 844 (1998).
- 9) Belkhiry A., Richards C., Whaley M., McQueen S.A., Orr F.W., *Lab. Invest.*, **77**, 533 – 539 (1997).
- 10) Petersen M., Simmonds M.S.J., *Phytochemistry*, **62**, 121-125 (2003).
- 11) Yamamoto H., Sakakibara J., Nagatsu A., Sekiya K., *J. Agri. Food. Chem.*, **46**, 862 – 865 (1998).
- 12) Rimando A.M., Inoshiri S., Otsuka H., *Syoyakugaku-Zasshi*, **41**, 242 – 247 (1987).
- 13) Nakamura Y., Ohto Y., Murakami A., Ohigashi H., *J. Agri. Food. Chem.*, **46**, 4545 – 4550 (1998).
- 14) Lee S.K., Zakaria H., Chung H., Luvengi L., Games E.J.C., Mehta R.J., Kinghorn D., Pezzuto J.M., *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **1**, 35 – 46 (1998).
- 15) Demeule M., Brossard M., Page M., Gingras D., Beliveau R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**, 51 – 60 (2000).
- 16) Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 – 2548 (1976).
- 17) Cuvelier M.E., Richard H., Berset C., *JAOCS*, **162**, 981 – 987 (2002).
- 18) Tournaire C., Croux S., Maurette M.T., Beck I., Hocquaux M., Braun A.M., Oliveros E., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **19**, 205 – 215 (1993).
- 19) Itoh Y., Binner S., Nagase H., *Biochem. J.*, **308**, 645 – 651 (1995).
- 20) Fridman R., Toth M., Pena D., Mabashery S., *Cancer Res.*, **55**, 2548 – 2555 (1995).
- 21) Vallee B.L., Auld D.S., *Biochemistry*, **29**, 5647 – 5659 (1990).
- 22) Sasaki K., Tateoka N., Ando H., Yoshizaki F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 459 – 465 (2005).
- 23) Tian W.N., Braunstein J.D., Pang J., Stuhlmeier K.M., Xi Q.C., Tian X., Stanton R.C., *J. Biol. Chem.*, **273**, 10609 – 10617 (1998).
- 24) Kawaguchi Y., Tanaka H., Okada T., Konishi H., Takahashi M., Ito M., Asai J., *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 39 – 44 (1996).