

<平成 25 年度助成>

## オートファジー誘導による細胞内クリアランスを介した 抗炎症作用を有する食品因子の探索

河合慶親

(名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻)

### 1. 背景と目的

真核細胞には主要な2つのタンパク質分解機構が存在する。一つがユビキチン-プロテアソーム系であり、もう一つがオートファジーである。ユビキチン-プロテアソーム系は一般的に寿命の短いタンパク質や、タンパク質合成の過程で正しく折りたたみがされなかったミスフォールドタンパク質、変性タンパク質などの異常タンパク質の分解を行っているのに対し、オートファジーはユビキチン-プロテアソーム系と同様、異常タンパク質の分解の他に、寿命の長いタンパク質やユビキチン-プロテアソーム系では分解できない巨大な凝集タンパク質、障害を受けたオルガネラなどの分解も行っている。オートファジーにおいては、オートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜中に分解基質を取り込み、分解酵素を豊富に含むリソソームと融合して基質をバルク分解するため、ミトコンドリアのようなサイズのオルガネラも分解することができる。

オートファジーの実行に必須である遺伝子が酵母において同定されて以降、これらの哺乳類ホモログに対するノックアウトマウスを使った研究を通して、オートファジー不全と疾病との関連が明らかとなってきた。例えば、オートファジーに必須な遺伝子である Atg5 を神経特異的にノックアウトしたマウスでは、神経変性疾患に特徴的な運動障害が認められ、神経細胞には凝集タンパク質の蓄積が認められた<sup>1)</sup>。同じくオートファジーに必須な Atg7 を膵臓β細胞特異的にノックアウトし

たマウスでは、インスリン分泌が減少し、耐糖能障害が起きるなど糖尿病様の症状が認められた<sup>2)</sup>。また、Atg5 を全身モザイク状にノックアウトしたマウスでは、肝臓に腫瘍が認められた<sup>3)</sup>。対照的に Atg5 を過剰発現させたマウスでは寿命が17.2%延びることが報告された<sup>4)</sup>。これらの報告から、オートファジー不全は、ヒトが加齢に伴って発症する様々な疾病や老化の一因である可能性が強く示唆された。

オートファジー不全による疾病の発症機構については、未だ不明な点が多い現状であるが、近年、オートファジー不全による細胞内恒常性破綻がマクロファージの炎症誘導に重要であることが指摘されている。多くの加齢性疾患の発症や進展の過程において炎症反応が重要な役割を担うと考えられていることから、オートファジー機構を活性化する食品成分の探索・応用は、炎症反応が関与する様々な慢性疾患に対する有効かつ新たな予防戦略として期待される。実際に、マウスにおいてオートファジー誘導物質として知られるラパマイシン投与による寿命延長効果が認められている<sup>5)</sup> ことから、オートファジー誘導作用を有する低分子化合物の *in vivo* での有効性も期待される。これまでに天然低分子化合物の抗炎症作用については、MAPキナーゼやNFκB経路を阻害することにより、抗炎症作用を示す化合物が数多く同定・報告されているが、オートファジーによる細胞内クリアランス機構に着目した抗炎症性物質の探索例はほとんどなかった。よって、マクロファージ細胞に対してオートファジーを誘導する

化合物を確立しこれを応用することは、新たな抗炎症戦略の一つとなりうる。特に、ポリフェノールに代表される天然食品成分は、食品中に比較的多くかつ幅広く含まれるため、安全性を兼ね備えた抗炎症性物質としての有効利用が可能である。さらには、筆者らのグループでは、ポリフェノールが炎症部位において選択的にマクロファージに蓄積し、抗炎症作用を発揮する仕組みを見出している<sup>6,7)</sup>。以上のような背景から、本研究では培養マクロファージ細胞株を用いて、天然ポリフェノールを中心としてオートファジー誘導物質を探索することを目的とした。

## 2. マクロファージ細胞におけるオートファジー誘導物質の探索

本研究ではJ774.1マウスマクロファージ様細胞株を用い、オートファジーを誘導するポリフェノールを探索することとした。マクロファージの炎症応答研究ではRAW264系細胞が広く用いられるが、炎症性サイトカインの一つでありオートファジーとの関連性も指摘されているインターロイキン $1\beta$  (IL- $1\beta$ )の産生能がRAW264系細胞では低く、J774系細胞において優れているとの報告があったため、本研究ではJ774.1細胞株を用いることとした。オートファジー活性を評価するマーカータンパク質として、本研究ではp62を用いた。p62はオートファジーの分解基質(凝集タンパク質やユビキチン化タンパク質)に結合し、さらにオートファゴソームの形成に関与するLC3と結合することで分解基質とともにオートファゴソーム内に取り込まれるため、オートファジー分解に伴ってp62も分解される。よって、p62は分解基質のリクルートを担うとともにオートファジー分解能を反映する良好なマーカーとして広く用いられる。

ポリフェノール類は天然に数千種類以上存在することが知られ、その化学構造や天然における分布などはデータベース化されており、さらには主

要な化合物の多くは市販で入手可能である。筆者らは、ポリフェノール類を様々なグループに分類し、計65種類のポリフェノール化合物群を整備した(一部は、本研究助成金を利用して拡充したものである)。この化合物群は、基本骨格や水酸基数・結合位置が異なる様々なポリフェノールを含んでおり、活性を有するポリフェノールを探索するのみならず、その構造活性相関性を理解するにも非常に有用である。そこで、本化合物群の中からオートファジーを誘導するポリフェノールを探索するため、J774.1細胞に各種ポリフェノールを50  $\mu$ Mとなるよう投与し、ウェスタンブロット法を用いてp62タンパク質量の変化を検討した(ただし、ブテインについては50  $\mu$ Mで細胞毒性が認められたため、25  $\mu$ Mで検討を行った)。その結果、当初の予想に反して、p62タンパク質量を減少させるポリフェノールは認められなかった。一方で、興味深いことにケルセチンやケンフェロール、ブテイン、エリオジクチオールなどのポリフェノールは、p62タンパク質量を有意に増加させた。検討した65種類のポリフェノールのうち代表的な結果をFig. 1に示した。p62タンパク質を顕著に増加させたポリフェノールのうち、ケルセチンについてさらに検討を行ったところ、濃度および時間依存的なp62タンパク質発現量の増加が認められた。一般的に、p62タンパク質の蓄積はオートファジー分解が阻害された結果として考えられている。リソソーム酸性化阻害剤でありオートファジー分解の阻害剤として用いられるバフィロマイシンA<sub>1</sub>の投与によって、確かにp62タンパク質の蓄積が認められるが、同じくオートファジーマーカーであるLC3-IIやユビキチン化タンパク質の蓄積も確認される。しかしながら、これらのポリフェノールを投与した場合にはLC3-IIやユビキチン化タンパク質の蓄積は観察されなかった。よって、ポリフェノール処理によるp62タンパク質発現量の増加はオートファジーの阻害によるものではないこ

とが示唆された。

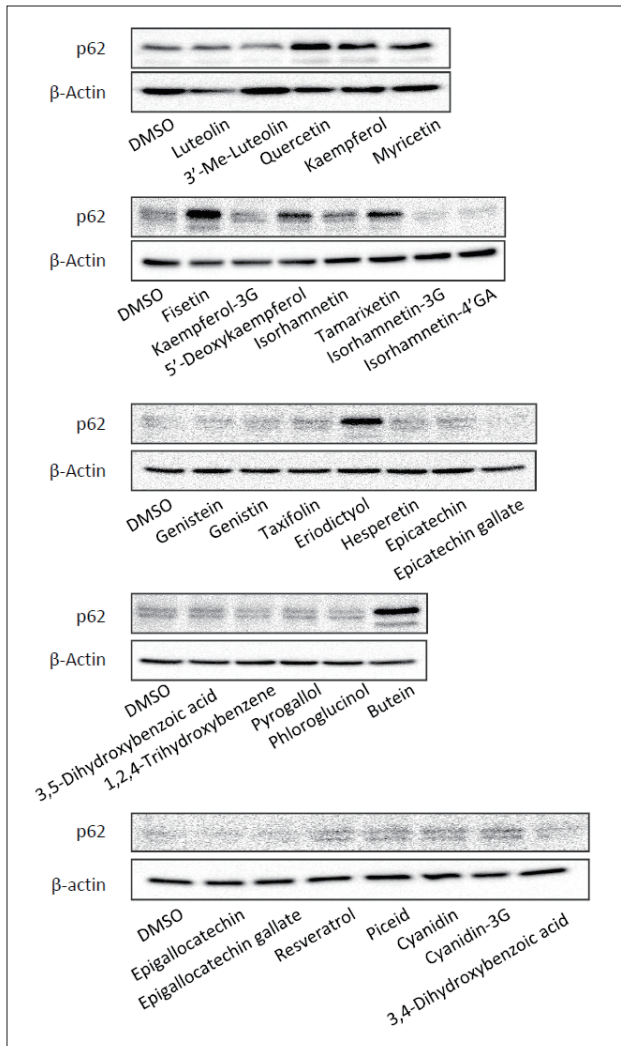


Fig. 1

### 3. p62 タンパク質発現を増加させるポリフェノールの構造活性相関

p62タンパク質発現量を増加させたポリフェノール類について、その構造活性相関に着目したところ、p62タンパク質発現量を増加させるポリフェノールは主に3つのグループに分けられた。一つ目が、ケルセチン、ケンフェロール、フィセチンなどのフラボノール類である。ケルセチンC環3位の水酸基を欠いたルテオリンではp62誘導活性を示さなかったことから、3位に水酸基を有するフラボノール構造が重要であることが示唆された。また、B環の3'位および4'位に水酸基を有するカテコール構造を持つものは、二電子酸化に

よってo-キノンの構造を取ることににより、強力な抗酸化活性を示すほか、種々の生理活性が報告されている。しかし、カテコール構造を持たないケンフェロールでもp62発現誘導作用を示したため、カテコール構造のp62発現誘導活性への寄与は小さいと考えられた。一方で、ケルセチンのB環5'位に水酸基が付加されたミリセチンやA環6位に水酸基を持つケルセタゲチン、同じくA環の8位に水酸基を持つゴシッペチンなどではp62発現誘導活性は認められなかったことから、水酸基の数が活性に重要であることが示唆された。水酸基の数が重要である理由の一つとしては、水酸基が増えると水溶性が増すため、細胞に取り込まれにくくなり、活性が低くなると考えられた。また、A環7位の水酸基がメトキシ化されているラムネチンや5位の水酸基を欠いたフィセチンも活性を持つことから、A環5位と7位の水酸基は活性に重要でないと考えられた。

二つ目のグループがフラバノンであり、エリオジクチオールで顕著なp62発現誘導作用が認められた。一方で、エリオジクチオールのB環4'位の水酸基がメトキシ化されているヘスペレチンや、3'位の水酸基がメトキシ化されているホモエリオジクチオール、3'位の水酸基を持たないナリンゲニンなどでは、p62発現の増加は認められなかったことから、フラバノンにおいてはB環カテコール構造がp62発現誘導活性に重要であることが示唆された。最後のグループがカルコンである。カルコンはフラボンのC環1位の酸素が還元され、開環したポリフェノールであり、分子内に $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造をもつことが特徴である。検討したカルコン類であるブテイン、イソリキリチゲニン、ホモブテイン、2,2',4'-トリヒドロキシカルコン、4,2',5'-トリヒドロキシカルコンのすべてにおいてp62タンパク質発現の増加が認められた。このため、カルコン特有の構造である $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造が重要であることが示唆さ



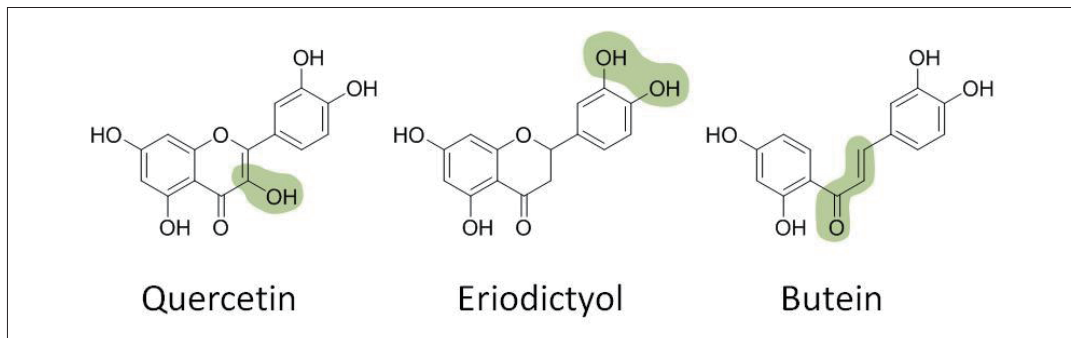


Fig. 2

れた。Fig. 2 に、p62 発現を顕著に誘導した 3 つのポリフェノールの化学構造と、活性発現に重要と考えられる部分構造を示した。

#### 4. ポリフェノール類による p62 mRNA 発現誘導とそのメカニズム

特定のポリフェノールによって p62 タンパク質発現量の増加が認められ、その増加はオートファジー阻害によるものでないと示唆されたことから、これらポリフェノール類は p62 遺伝子の発現を誘導している可能性が考えられた。そこで、p62 mRNA 発現量についても検討を行うこととした。p62 タンパク質発現量の検討の際に用いた 65 種類のポリフェノールを同様に処理し、4 時間後の p62 mRNA 発現についてリアルタイム RT-PCR 法により評価した。その結果、ブテインとエリオジクチオールが最も顕著な p62 mRNA 発現誘導作用を示した。これ以外にも、p62 タンパク質発現を増加させたポリフェノールでは、やはり p62 mRNA 発現を誘導することが明らかとなった。よって、これらのポリフェノールは、p62 の mRNA 発現誘導を介してそのタンパク質量を増加させる可能性が示唆された。また、ケルセチンを摂取した後のヒト血漿中におけるケルセチンの最大総濃度は 1-2  $\mu\text{M}$  程度であるが、この血漿中濃度に相当する 2  $\mu\text{M}$  のケルセチン投与においても、p62 mRNA 発現は 2 倍程度に増加することが明らかとなった。

次に、これらポリフェノール類による p62 発現

誘導機構について検討を行うこととした。p62 の転写因子として最もよく知られているのが NF-E2-related factor 2 (Nrf2) である。Nrf2 は基底状態では Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と相互作用しており、その転写因子としての活性が負に制御されている。しかし、酸化ストレスや酸化剤などにより Keap1 のチオール基が修飾を受けることによって、または Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) や Protein Kinase C (PKC)、PRKR-like ER kinase (PERK) といったキナーゼにより Nrf2 が直接リン酸化を受けることによって Nrf2 が核内に移行し、転写因子として働く<sup>8)</sup>。そこで、ポリフェノール処理による Nrf2 の核内移行と p62 発現誘導との関連について検討を行うこととした。

p62 のタンパク質発現および mRNA 発現とともに増加させたケルセチン、ケンフェロール、ブテイン、エリオジクチオールと、対照として p62 発現誘導作用の認められなかったルテオリン、レスベラトロール、エピカテキンを細胞に 3 時間処理し、核画分中に存在する Nrf2 を評価した。その結果、p62 発現誘導作用の認められた 4 種のポリフェノールのいずれにおいても Nrf2 の核移行が認められ、ルテオリン、レスベラトロール、エピカテキンでは Nrf2 の核移行は認められなかった (Fig. 3)。よって、p62 mRNA 発現と転写因子 Nrf2 の核内移行は高い相関性を示すことが明らかとなった。

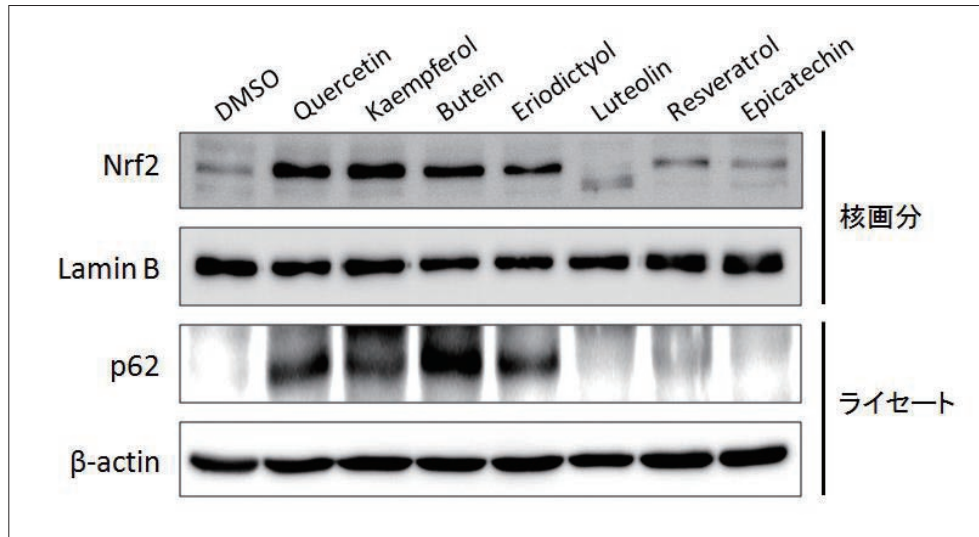


Fig. 3

### 5. p62 発現を誘導するポリフェノール類による抗炎症作用

ここまで、オートファジー分解の指標として p62 に着目して検討を進めてきたが、このような p62 発現誘導作用とマクロファージの炎症応答との関連性についても検討を行うこととした。炎症性サイトカインの一種である IL-1 $\beta$  の前駆体型である pro-IL-1 $\beta$  は、オートファジー分解の基質になりうることが報告されており<sup>9)</sup>、オートファジー活性の促進は抗炎症に繋がることが期待される。そこで、p62 発現増加に伴う抗炎症作用を検討するため、上記の検討において p62 を増加させたケルセチンとケンフェロールを 8 時間前処理してあ

らかじめ p62 発現を誘導した後に LPS 刺激を 4 時間行い、発現誘導された pro-IL-1 $\beta$  タンパク質に対する作用を検討した。その結果、ポリフェノールの前処理によって IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量に変化は見られなかったが、pro-IL-1 $\beta$  タンパク質量が減少した (Fig. 4 左)。さらに、LPS 刺激後に pro-IL-1 $\beta$  から IL-1 $\beta$  へのプロセッシングを促進する ATP を添加した後、培地中に分泌された IL-1 $\beta$  を測定したところ、ケルセチンとケンフェロールの前処理によって IL-1 $\beta$  分泌量の有意な減少が認められた (Fig. 4 右)。以上の結果より、ケルセチンとケンフェロールによる p62 発現増加は pro-IL-1 $\beta$  の分解を介して炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の産生を抑制することが示唆された。最近

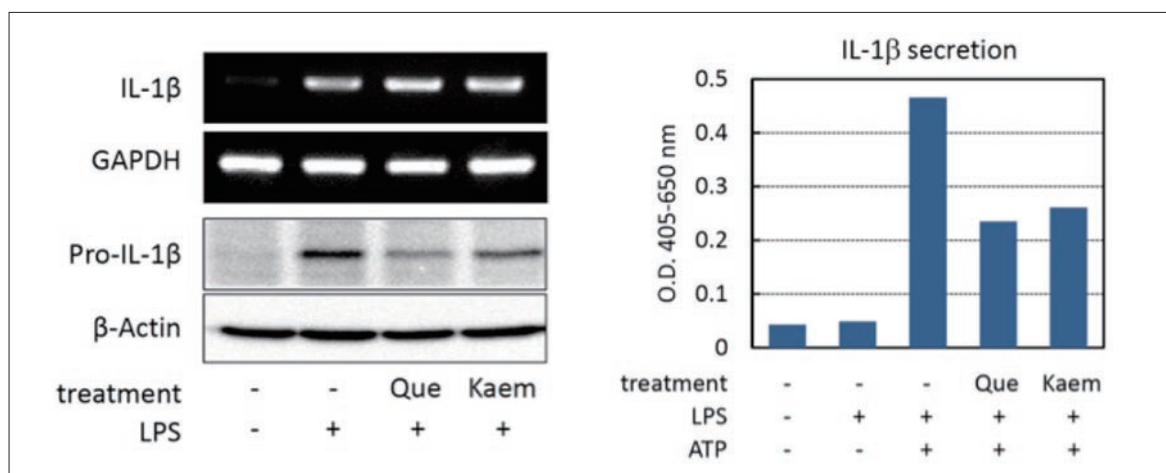


Fig. 4

では p62 を過剰発現させた細胞において、異常タンパク質の分解が促進されることも報告されており<sup>10)</sup>、p62のタンパク質発現の増加がオートファジー分解の促進に働くことが期待される。

#### 謝 辞

最後に本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Hara *et al.*, *Nature* 441,885-889 (2006)
- 2) Ebato *et al.*, *Cell Metab.* 8, 325-332 (2008)
- 3) Takamura *et al.*, *Genes Dev.* 25, 795-800 (2011)
- 4) Pyo *et al.*, *Nat Commun.* 4, 2300 (2013)
- 5) Harrison *et al.*, *Nature* 460, 392-395 (2009)
- 6) Kawai *et al.*, *J. Biol. Chem.* 283, 9424-9434 (2008)
- 7) Ishisaka *et al.*, *PLoS One* 8, e80843 (2013)
- 8) Bryan *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 85, 705-717 (2013)
- 9) Harris *et al.*, *J. Biol. Chem.* 286, 9587-9597 (2011)
- 10) Xu *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol.* 203, 73-84 (2014)

## Screening of polyphenols that exhibit anti-inflammatory activity through the induction of autophagic degradation

Yoshichika Kawai

Graduate School of Bioagricultural Sciences

Nagoya University

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a major degradation pathway as well as ubiquitin-proteasome system, and is ubiquitously found in eukaryotes. During autophagy, cytoplasmic constituents and organelles are sequestered by autophagosomes (double-membrane vesicles) and then degraded by fusion with the lysosomes. Autophagy is a major degradation pathway for cytoplasmic constituents and organelles to maintain the homeostasis of cells. Recent studies have suggested that autophagy impairment is implicated in the development of a variety of chronic diseases such as carcinogenesis, neurodegenerative diseases, and diabetes. More recently, the involvement of autophagy impairment in the macrophage inflammation has also been suggested. These observations raised the possibility that the induction of autophagy could be the plausible strategy for the prevention of various age-related diseases. Epidemiological studies have suggested that the intake of natural phytochemicals such as polyphenols may be protective against a variety of chronic diseases including cardiovascular diseases and carcinogenesis, whereas the precise molecular mechanisms for the protective effects are largely unknown. Although thousands of polyphenols have been isolated and identified, the structure-activity relationships and detailed molecular actions including the target molecules responsible for their health-beneficial effects have not been fully elucidated. In this study, we screened polyphenols that exhibit anti-inflammatory activity in macrophages through the induction of autophagy and then examined the structure-activity relationships and the molecular actions *in vitro*. We have found that flavonols (quercetin, kaempferol, and fisetin), flavanone (eriodictyol), and chalcones (butein *etc.*) significantly induced the mRNA expression of p62, an adaptor protein of autophagic degradation. It is found that these polyphenols induced the nuclear translocation of Nrf2, a transcriptional factor of p62. Finally, we also found that pre-incubation of macrophages with quercetin or kaempferol, resulting in the induction of p62, decreased the pro- and mature-forms of interleukine-1 $\beta$  without affecting the mRNA levels, suggesting that these polyphenols could induce the protein degradation of interleukine-1 $\beta$  protein through the induction of autophagy. These results showed that some specific polyphenols could be the new anti-inflammatory agents through the induction of autophagy in macrophages.