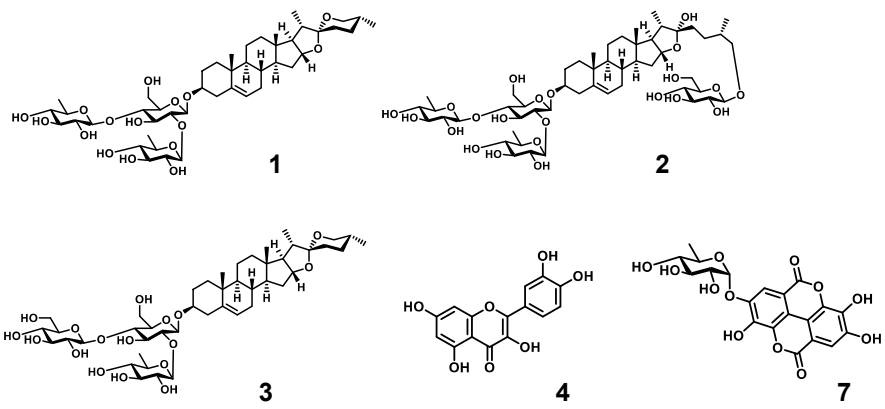
119　関節リウマチ滑膜細胞のアポトーシス誘導天然物の探索	原　康雅

【目的】関節リウマチは、慢性炎症を生じる自己免疫疾患である。本疾患では、関節内の滑膜組織に流入した免疫細胞がサイトカインを介して、滑膜線維芽細胞の異常増殖と滑膜線維芽細胞による炎症性サイトカインなどの産生を引き起こし、関節破壊に至る。異常増殖した滑膜線維芽細胞は、疾患初期の炎症発生や慢性期の免疫細胞とのサイトカインによる相互作用など、関節リウマチにおいて重要な役割を担っている。そのため、滑膜線維芽細胞の異常増殖の抑制あるいは異常増殖した滑膜線維芽細胞選択的なアポトーシスシグナル誘導は関節リウマチの新たな治療標的となりうる。そこで、今回、独自に保有する天然資源である熱帯植物や放線菌の抽出物から、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株へのアポトーシス誘導作用を有する天然物を探索した。

【方法】タイ産植物抽出物および土壌放線菌培養抽出物を探索資源として、まず、細胞毒性を指標にスクリーニングを行った。各抽出物より、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞株 MH7A の細胞生存率が 30%以下であるものを選択した後（1 次スクリーニング）、MH7A の細胞生存率が、ヒト胎児由来腎細胞株 HEK293 または正常ヒト由来肺線維芽細胞株 WI38VA13 sub 2 RA の細胞生存率より低いもの（2 次スクリーニング）をヒットサンプルとした。さらに、単培養抽出物で細胞生存率が 95%以上であった放線菌に関して、放線菌 2 種の共培養を実施し、単培養と比較して共培養抽出物に MH7A の細胞毒性が観察されたものをヒットサンプルとした。なお、細胞毒性は Fluorometric microculture cytotoxicity assay を用いて測定した。スクリーニングにて得られたヒットサンプルを大量に抽出し、MH7A への細胞毒性を指標に分画し、細胞死誘導作用を有する天然物の単離・精製を行った。

【結果】タイ産植物抽出物ライブラリー内の 724 種について、MH7A 細胞毒性を指標とした 1 次スクリーニングを実施した結果、211 種がヒットサンプルとして得られた。この 211 種のうち、HEK293 を用いた 2 次スクリーニングでは 85 種が、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングでは 38 種がヒットサンプルとして得られた。また、これらのうち 12 種は両細胞の生存率が MH7A の細胞生存率よりも高いサンプルであった。放線菌単培養抽出物ライブラリー内の 772 種の抽出物について、1 次スクリーニングにより 76 種がヒットサンプルとして得られた。次に、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングでは 15 種がヒットサンプルとして得られた。また、単培養抽出物で細胞毒性を示さなかった放線菌の共培養抽出物 15 種のうち、4 種が単培養抽出物と比較して、MH7A に対する細胞毒性を有していた。ヒットサンプルとして得られたオオホザキアヤメ科植物 *Cheilocostus speciosus* の根茎メタノール抽出物を、MH7A 細胞毒性を指標に分画することで、既知サポニンである化合物 **1**～**3** を得た。MH7A に対する化合物 **1**～**3** の IC_{50}はそれぞれ、2.9 μM、10.0 μM、3.5 μM であった。次に、ウルシ科植物 *Spondias mangifera* の葉部メタノール抽出物を分画し、既知化合物 **4**～**8** を得た。化合物 **4**～**7** はいずれも本植物より単離報告のある天然物であったが、化合物 **8** は本植物より初めての単離報告であった。化合物 **4**～**8** の MH7A に対する細胞毒性を評価したところ、化合物 **4** および **7** は MH7A に対する細胞毒性を有し、その IC_{50}はそれぞれ、158.7 μM、51.8 μM であった。

MH7A に対して細胞死誘導作用を有する天然物



119. 関節リウマチ滑膜細胞のアポトーシス誘導天然物の探索

原　康雅

千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室

Key words：関節リウマチ，滑膜線維芽細胞毒性，タイ産植物，放線菌単培養，放線菌共培養

緒　言

関節リウマチは、主に関節における慢性炎症疾患であり、自己免疫疾患の一つである。日本の患者数はおよそ 60～100 万人と推定され、男性よりも女性が多く発症する。関節リウマチ患者の滑膜では炎症性免疫細胞の浸潤と滑膜組織中の滑膜線維芽細胞の過増殖により炎症が慢性化し、やがて骨や軟骨が蝕まれ関節破壊がもたらされる。現在の関節リウマチ治療は、メトトレキサートを第一選択とした抗リウマチ薬（disease modified anti rheumatic drugs：DMARDs）を用いる治療法や、DMARDs と TNF-α阻害薬や IL-6 阻害薬などの生物学的製剤を併用する治療法が推奨され、炎症反応の抑制が行われているが、半数以上の患者が十分な治療効果を得られておらず、また治療薬による易感染性などの副作用が報告されている。そのため、関節リウマチの治療には抗炎症療法とは異なる別のアプローチが求められている。

関節リウマチにおいて、滑膜線維芽細胞は、疾患初期から関節内で異常増殖し、免疫細胞とのサイトカインを介した相互作用による炎症発生や関節破壊などに重要な役割を担っている。近年、関節リウマチの病態に関して、滑膜線維芽細胞が産生する GM-CSF が関節炎の炎症に重要であること［1］や、アポトーシスを誘導するデスレセプター経路に関与する death receptor（DR）5 に対して抗 DR5 抗体投与により関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞は特異的にアポトーシスが誘導されること［2］、など様々な滑膜線維芽細胞に関する知見が報告されている。これらの知見をもとに、我々は関節リウマチの滑膜線維芽細胞の異常増殖抑制やアポトーシス等の細胞死を誘導する化合物が関節リウマチ治療に有効ではないかと考え、研究に着手した。

当研究グループは、400 種を超える熱帯植物の抽出物や 1,500 種を超える土壌や河川、海砂から分離した放線菌 1 株の単独培養（単培養）抽出物を独自に保有しており、目標とする生物活性を持つ天然物を単離できる可能性がある。しかし、更なる天然物探索資源の拡充のために、今回、放線菌の「共培養」にも着目した。これまでの研究成果［3～5］より、通常微生物 1 種では産生しない天然物を、微生物が他生物との相互作用を経て産生していたことから、微生物と他生物が直接的な相互作用や分泌分子などを介した間接的な相互作用を行うことで、微生物は新たな天然物を産生すると考えた。自然界にて同一環境に存在する微生物と他生物間でも直接的、あるいは間接的な相互作用が行われていることから、微生物の生育環境を模倣した共培養が未知の天然物探索に有効であると考え、生育環境が近い放線菌同士を組み合わせた放線菌 2 株の共培養抽出物を得ることで、天然物探索資源の拡充が図れるのではないかと考えた。

そこで、今回、放線菌の共培養による天然物探索資源の拡充をしつつ、独自に保有する天然資源である熱帯植物や放線菌の抽出物から、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株へのアポトーシス誘導作用を有する天然物を探索した。

方　法

1. 使用細胞株

細胞毒性評価には、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株 MH7A（RCB1512）、ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 および正常ヒト由来肺線維芽細胞株 WI-38 VA13 sub 2 RA（JCRB9057）を用いた。MH7A［6］は文部科学省/国立研究開発法人日本医療開発機構ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC より購入した。WI-38 VA13 sub 2 RA［7］は JCRB 細胞バンクより購入した。MH7A は RPMI1640＋10%FBS 培地、HEK293 は DMEM

＋10%FBS 培地、WI-38 VA13 sub 2 RA は EMEM（非必須アミノ酸、1.5 g/L $NaHCO_3$含有）＋10%FBS 培地で、37℃、5%CO_2下で培養した。

2. 生物活性試験

細胞毒性は、Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay（FMCA 法）［8］により測定した。

96 ウェル黒色マイクロプレートに、細胞を各ウェルに2×10^3cells/200 μL で播種し、24 時間後にサンプルを添加した。72 時間後に培地を除去後、3.5 μg/mL fluorescein diacetate（FDA）含有 PBS 溶液を各ウェルに 200 μL 添加し、1 時間、37℃、5%CO_2下で培養した。培養後、生体内酵素により FDA から生じる fluorescein の蛍光量を、マイクロプレートリーダー Fluoroskan Ascent にて測定した（Ex : 485 nm、Em : 538 nm）。ネガティブコントロールには 0.1% DMSO を用い、ポジティブコントロールには actinomycin D を用いた。1 次スクリーニングには、MH7A を用い、2 次スクリーニングには、HEK293 または WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた。細胞生存率は、次の式で求めた。

細胞生存率（%）＝100×［サンプルの蛍光量］／［ネガティブコントロールの蛍光量］。

3. 植物

植物は、当研究グループがこれまでに共同研究者と採取し保管していたタイ産植物（KKP）を用いた。各植物をメタノールで抽出した後、得られたメタノール抽出物を 50 mg/mL DMSO 溶液として調製した。これをタイ産植物ライブラリーとし、スクリーニングの際には、50 μg/mL に調製し用いた。

4. 放線菌単培養

放線菌は、当研究グループがこれまでに日本国内で採取した土壌、河川サンプルより単離した放線菌（CKK）を用いた。放線菌 1 株を Waksman 液体培地にて培養して得られた培養液を酢酸エチルで液液分配し、得られた酢酸エチル層を乾固した後、50 mg/mL DMSO 溶液として調製した。これを放線菌単培養抽出物ライブラリーとし、スクリーニングの際には、50 μg/mL に調製し用いた。

5. 放線菌共培養

単培養にて生物活性を示さなかった放線菌でも、生物活性を示す天然物の遺伝子等が発現していない可能性がある。そこで、放線菌を用いた共培養を行い、生物活性を示す天然物の遺伝子や他の微生物の産生した天然物を修飾する遺伝子が発現すれば、新規骨格構造や生物活性を有する天然物を産生する可能性が期待できる。そのため、共培養には、生物活性を示さなかった放線菌の組み合わせを選択した。また、共培養には、同一日、同一環境より単離された 2 種の放線菌の組み合わせを用いた。

Waksman 液体培地 2 mL を各ウェルに加えた 24 ウェル透明マイクロプレートに放線菌を播種し、28℃、160 rpm の往復振盪培養により 5 日間前培養した。培養後、前培養液のOD_{620}値を測定した。Waksman 液体培地 2 mL を各ウェルに入れた別の 24 ウェル透明マイクロプレートを用いて、各放線菌前培養液をOD_{620} 0.01 となるように各ウェルに添加し、2 株の放線菌による共培養を開始した。このプレートは、28℃、160 rpm の往復振盪培養により 5 日間共培養を行った。同時に共培養に用いた放線菌の単培養を実施した。培養後、2,000 rpm で 30 分間遠心分離し、得られた培養上清 100 μL を凍結乾燥により乾固後、50 mg/mL DMSO 溶液として調製した。スクリーニングの際には、50 μg/mL に調製し用いた。

結　果

1. 植物資源のスクリーニング

タイ産植物抽出物ライブラリー内の 724 種について、MH7A 細胞毒性を指標とした 1 次スクリーニングを実施した。MH7A の細胞生存率が 30%以下を示したサンプルをヒットサンプルとしたところ、211 種がヒットサンプルとして得られた。次に、正常ヒト由来細胞株に対して細胞毒性の低いヒットサンプルを見出すために、HEK293 と WI-38 VA13 sub 2 RA への細胞毒性を指標とした 2 次スクリーニングをそれぞれ実施した。2 次スクリーニングでは MH7A の細胞生存率より 30%以上高いものをヒットサンプルとしたところ、211 種のうち、HEK293 を用いた場合では 85 種が、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた場合では 38 種がヒットサンプルとして得られた。また、これらのうち 12 種は両細胞

で生存率が MH7A よりも高いサンプルであった。

2. 放線菌抽出物のスクリーニング

放線菌単培養抽出物ライブラリーの 772 種の抽出物について、MH7A 細胞毒性を指標とした 1 次スクリーニングを実施した。細胞生存率が 30%以下を示したサンプルをヒットサンプルとしたところ、76 種がヒットサンプルとして得られた。次に、WI-38 VA13 sub 2 RA への細胞毒性を指標とした 2 次スクリーニングを実施した。2 次スクリーニングでは MH7A の細胞生存率より WI-38 VA13 sub 2 RA の細胞生存率が高いものをヒットサンプルとしたところ、51 種のうち、15 種がヒットサンプルとして得られた。また、MH7A の細胞生存率が 95%以上を示した抽出物を産生する放線菌 12 種を用いて、今回始めて構築した 24 ウェルマイクロプレートを用いた共培養を 15 種の組み合わせで行い、15 種の抽出物を得た。しかし、今回作製した共培養抽出物のうち、4 種の共培養抽出物は単培養抽出物と比較して、MH7A に対する細胞毒性を有していたが、その細胞生存率の差は大きくなかった。

3. MH7A 細胞毒性を示した植物からの成分探索

まず、分画対象として、MH7A と比較して HEK293 に対して細胞毒性を示さなかったタイ産オオホザキアヤメ科植物 *Cheilocostus speciosus* の根茎を選択した。本植物根茎 40 g をメタノール 0.5 L で 2 回抽出し、メタノール抽出物 3.2 g を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し 1 シリーズ（1A-1I）を得たところ、1F、1G が顕著な MH7A 細胞毒性を示した。1F（313.6 mg）を ODS カラムクロマトグラフィー及び HPLC により分画することで、化合物 **1**（28.4 mg）を得た。また、1G（2.44 g）を、MH7A 細胞毒性を指標に、ODS カラムクロマトグラフィー及び HPLC により分画することで、化合物 **2**（3.0 mg）、化合物 **3**（10.0 mg）を得た。化合物 **1**～**3** の NMR および MS などの各種スペクトルデータを解析した結果、化合物 **1** を dioscin、化合物 **2** を protodioscin、化合物 **3** を gracillin と同定した（図 1）。いずれも本植物より単離報告のある既知サポニンであった。

MH7A に対する化合物 **1**～**3** の IC_{50}はそれぞれ、2.9 μM、10.0 μM、3.5 μM であった。また、HEK293 に対する化合物 **1**～**3** の IC_{50}はそれぞれ、4.4 μM、7.0 μM、4.7 μM であった（図 1）。

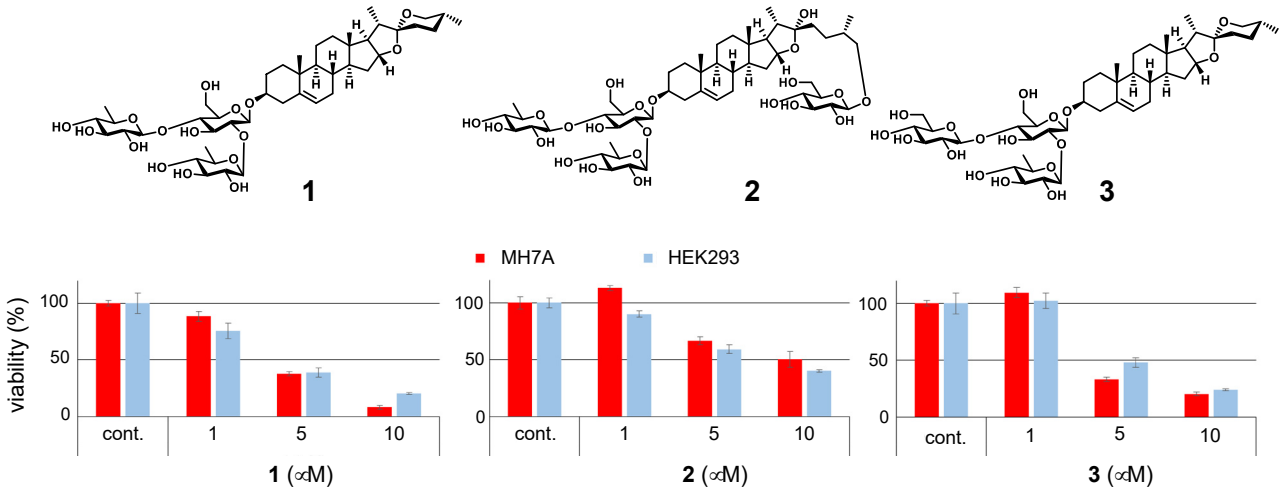


図 1. タイ産植物 *Cheilocostus speciosus* より単離された天然物 **1**～**3** の構造とその細胞毒性
各細胞株に対する細胞毒性評価は、*n*=3 で行い、0.1% DMSO をネガティブコントロール（cont.）として使用した。

次に、分画対象として、HEK293 および WI-38 VA13 sub 2 RA と比較して MH7A に細胞毒性を示したタイ産ウルシ科植物 *Spondias mangifera* の葉部を選択した。本植物葉部 131 g をメタノール 0.5 L で 4 回抽出し、メタノール抽出物 20.1 g を得た。Daiaion HP-20 カラムクロマトグラフィーで分画し、メタノールとアセトン画分に分画した。メタノール画分を 10%メタノールで再溶解し、ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次液液分配した。液液分配後の 4 画分に関して、MH7A および WI-38 VA13 sub 2 RA に対する細胞毒性評価を行ったところ、酢酸エチル画分は、WI-

38 VA13 sub 2 RA と比較して MH7A に強い細胞毒性を示した。酢酸エチル画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し 1 シリーズ（1A-1I）を得たところ、1C は WI-38 VA13 sub 2 RA と比較して MH7A に細胞毒性を示した。この 1C（2.5 g）を ODS カラムクロマトグラフィーや HPLC にて分画し、化合物 **4**（6.0 mg）、**5**（10.0 mg）、**6**（5.2 mg）、**7**（9.3 mg）、**8**（4.6 mg）を得た。化合物 **4**～**8** の NMR および MS などの各種スペクトルデータを解析した結果、化合物 **4** を quercetin、化合物 **5** を quercetin 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside、化合物 **6** を rhamnetin 4-*O*-rutinoside、化合物 **7** を eschweilenol C、化合物 **8** を ellagic acid 4-*O*-*α*-xylopyranoside と同定した（図 2a）。化合物 **4**～**7** はいずれも本植物より単離報告のある天然物であったが、化合物 **8** は本植物より初めての単離報告であった。

化合物 **4**～**8** の細胞毒性評価を行ったところ、化合物 **4** および **7** は MH7A に対する細胞毒性を有し、その IC_{50} はそれぞれ、158.7 μM、51.8 μM であった。また、WI-38 VA13 sub 2 RA に対する化合物 **4**、**7** の IC_{50} はそれぞれ、152.1 μM、38.1 μM であった（図 2b）。化合物 **4** は 3 位に単糖が結合している化合物 **5**、二糖が結合している化合物 **6** よりも MH7A に対して強い細胞毒性を示した。また、化合物 **7**、**8** は糖の種類により、MH7A に対する細胞毒性が異なっていた。

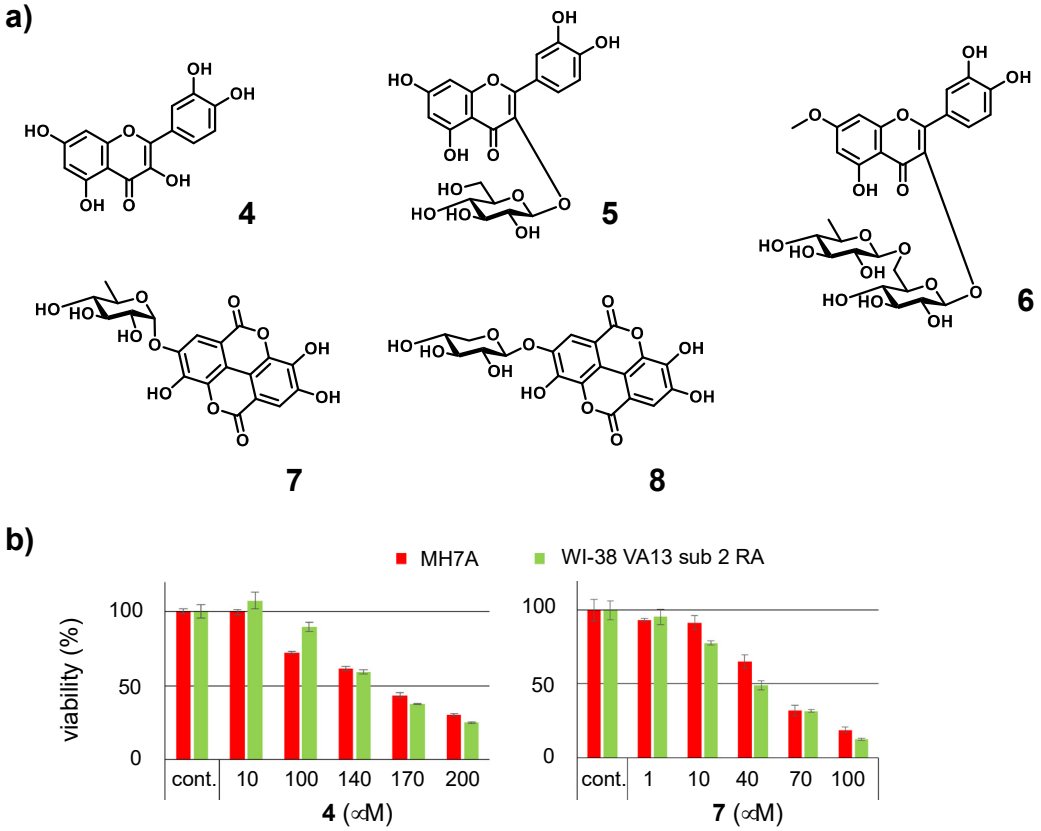


図 2. タイ産植物 *Spondias mangifera* より単離された天然物 **4**～**8** の構造とその細胞毒性

a）化合物 **4**～**8** の構造。

b）化合物 **4** および **7** の細胞毒性。

各細胞株に対する細胞毒性評価は $n=3$ で行い、0.1% DMSO をネガティブコントロール（cont.）として使用した。

考　察

今回、タイ産植物抽出物ライブラリー724 種について MH7A に対する選択的な細胞毒性を有する抽出物のうち、HEK293 を用いた 2 次スクリーニングで 85 種、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングで 38 種をヒットサンプルとして得た。また、放線菌エキスライブラリーより MH7A に対する選択的な細胞毒性を有する抽出物のうち、

WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングで 15 種をヒットサンプルとして得た。MH7A に対する選択的な細胞毒性を有したタイ産植物 2 種（*Cheilocostus speciosus*、*Spondias mangifera*）より化合物 8 種を単離した。化合物 **1**～**3**、**4**、**7** は MH7A に対する細胞毒性を有していたものの、他の細胞株に対する細胞毒性も有していた。今回、MH7A 選択的な細胞毒性を有する天然物は単離できなかったものの、未分画の画分に MH7A 選択的な細胞毒性を有する画分が存在することから、MH7A 選択的な細胞毒性を有する天然物の存在が期待される。引き続き、未分画の画分や、他の植物・放線菌抽出物の分画を進めることで、MH7A 選択的な細胞毒性を有する天然物を探索する。また、今回、細胞毒性を有する天然物の単離には至ったものの、その細胞死が、アポトーシスによるものかの検討を行うことができなかった。そのため、今後単離した化合物も含めて、アポトーシス誘導による細胞毒性か否かの検討を進めていく。

謝　辞

本研究に対して多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に、心より御礼申し上げます。

文　献

1) Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik A J, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 cells induced synovial stromal and innate lymphoid cell secretion of the cytokine GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis. Immunity. 2018 Jun 19;48(6):1220-32.e5. Epub 2018 May 22. PMID: 29802020 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.009.

2) Ichikawa K, Liu W, Fleck M, Zhang H, Zhao L, Ohtsuka T, Wang Z, Liu D, Mountz J D, Ohtsuki M, Koopman W J, Kimberly R, Zhou T. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. J Immunol. 2003 Jul 15;171(2):1061-9. PMID: 12847280 DOI: 10.4049/jimmunol.171.2.1061.

3) Hara Y, Arai MA, Sakai K, Ishikawa N, Gonoi T, Yaguchi T, Ishibashi, M. Dehydropropylpantothenamide isolated by a co-culture of *Nocardia tenerifensis* IFM 10554^{T} in the presence of animal cells. J Nat Med. 2018 Jan;72(1):280-9. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29209902 DOI: 10.1007/s11418-017-1161-y.

4) Hara Y, Arai MA, Toume K, Masu H, Sato T, Komatsu K, Yaguchi T, Ishibashi M. Coculture of a pathogenic actinomycete and animal cells to produce nocarjamide, a cyclic nonapeptide with Wnt signal-activating effect. Org Lett. 2018 Sep 21;20(18):5831-4. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30156858 DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02522.

5) Jomori T, Hara Y, Sasaoka M, Harada K, Setiawan A, Hirata K, Kimishima A, Arai M. *Mycobacterium smegmatis* alters the production of secondary metabolites by marine-derived *Aspergillus niger*. J Nat Med. 2020 Jan;74(1):76-82. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31321600 DOI: 10.1007/s11418-019-01345-0.

6) Miyazawa K, Mori A, Okudaira H. Establishment and characterization of a novel human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte line, MH7A, immortalized with SV40 T antigen. J Biochem. 1998 Dec 1;124(6):1153-62. PMID: 9832620 DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022233.

7) Girardi AJ, Weinstein D, Moorhead PS. SV40 transformation of human diploid cells. A parallel study of viral and karyologic parameters. Ann Med Exp Biol Fenn. 1966;44(2):242-54. PMID: 4290661.

8) Lindhagen E, Nygren P, Larsson R. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. Nat Protoc. 2008 Jul 31;3(8):1364-9. PMID: 18714304 DOI: 10.1038/nprot.2008.114.