

- ・研究助成題目 「疾患予防・未病治療を見据えたフェロトーシス阻害剤の探索・評価」
- ・助成期間 2021 年 4 月～2022 年 3 月

・研究背景及び目的

生体内で脂質が酸化を受けると、連鎖的な脂質過酸化反応が開始され、大規模な膜障害が生じる。近年、この脂質過酸化反応及び酸化脂質が関与する細胞死「フェロトーシス」が提唱され、非常に注目を集めている。我々はこれまで、脂質過酸化反応の起点である脂質ラジカルをターゲットとした化合物スクリーニング系を構築し、既承認薬の中から網膜疾患モデル動物に対し有効な化合物を見出すことに成功している。そこで本研究では、本スクリーニング系を利用し、疾患予防あるいは未病を治すために、薬用植物の中から有効な成分を探索することを目的とした。

・研究方法

LPO 抑制剤のスクリーニング

先行研究の条件に基づき、薬用植物エキ斯拉イブラリーを用いて、脂質ラジカル抑制作用を有する化合物スクリーニングを実施した。次に、ヒット化合物が RSL-3 および Erastin 誘導性のフェロトーシス細胞死を抑制するか否か、ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) を用いて評価した。また、マウス由来初代培養肝細胞に対して、RSL-3 および FINO₂ 誘導性のフェロトーシス細胞死抑制活性を MTT アッセイにて評価した。

アセトアミノフェン (APAP) 誘発性肝障害モデルマウスによる病態抑制評価

次にスクリーニングで見出した化合物が疾患モデル動物に対して有効か否か、APAP 誘発性肝障害モデルを用いて評価した。薬用植物抽出エキスは APAP の 1 時間前に経口投与した。また、既存のフェロトーシス抑制剤である Ferrostatin-1 (Fer-1) を陽性対照として、APAP の 1 時間前に腹腔内投与した。APAP 投与から 3 時間後に採血および肝臓を摘出し、血漿中 ALT、AST 活性の測定と肝臓組織パラフィン切片の HE 染色を行い、肝障害を評価した。

・研究成果

薬用植物抽出エキ斯拉イブラリーを用いたスクリーニング

薬用植物抽出エキ斯拉イブラリー 8008 種に対して、蛍光プローブを用いた LPO 抑制評価を行い、阻害率上位 60 種を次の評価へと進めた。続いて、HepG2 細胞を用いてフェロトーシス抑制能を評価し、阻害率上位 8 種を次の評価へと進めた。最後に、マウス由来初代培養肝細胞を用いてフェロトーシス抑制能を評価し、高い抑制能を示した薬用植物抽出エキス No.22 を肝障害モデルマウスへ適用する候補として選定した。

APAP 誘発性肝障害モデルマウスに対する病態保護効果

APAP 誘発性肝障害モデルマウス血漿中の ALT、AST 活性を測定した結果、APAP 投与群で上昇した ALT、AST 値は薬用植物抽出エキス No.22 によって有意に抑制された (Fig. 1a)。また、APAP 投与群で広範囲に観察された肝臓組織切片中損傷部位が薬用植物抽出エキス No.22 により縮小した。以上より、薬用植物抽出エキス No.22 は APAP 誘発性の肝障害を抑制することが示された。

APAP 誘発性肝障害モデルマウスにおける酸化脂質の評価

先行研究で、APAP 投与時に酸化リン脂質の一種である oxidized phosphatidylcholine (oxPC) が増加することが報告されている。そこで、薬用植物抽出エキス No.22 が酸化リン脂質の生成を抑制したかどうか、質量分析装置を用いて評価した。その結果、PC 34:2;O や PC 34:2;O2 などの Full-length oxPC が APAP 投与群で増加し、薬用植物抽出エキス No.22 によって抑制された (Fig. 1b)。

APAP 誘発性肝障害モデルマウスにおけるフェロトーシスの評価

これまで、APAP 誘発性肝障害モデルの細胞死にフェロトーシスが関与することが報告されている。そこで、フェロトーシスの代表的なマーカーであるシクロオキシゲナーゼ 2 (*Ptgs2*) の mRNA 量を測定した。その結果、APAP 投与群で *Ptgs2* の mRNA 量が増加し、薬用植物抽出エキス No.22 によって抑制された (Fig. 1c)。以上より、薬用植物抽出エキス No.22 は *in vivo* でもフェロトーシスを抑制することが示唆された。

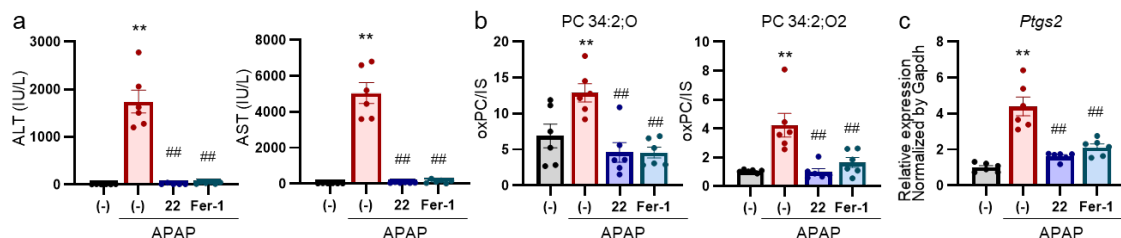


Fig. 1. APAP 誘発性肝障害モデルマウスに対する薬用植物抽出エキス No.22 の効果

(a) 血漿中の ALT、AST 活性、(b) 酸化リン脂質に相当する MS ピーク面積値、(c) 肝組織中の *Ptgs2* の mRNA 量。22: 薬用植物抽出エキス No.22、Fer-1: Ferrostatin-1、IS (Internal standard): 18:1-d7 LysoPC (Mean + SD, n = 6, **p < 0.01 v.s. untreated control; ##p < 0.01 v.s. APAP-treated control)

・まとめ

本研究で選定した薬用植物抽出エキス No.22 はすでに食品成分の一種に含まれている。さらに、薬用植物抽出エキス No.22 は経口投与で、腹腔内投与の Fer-1 と同等の効果を示したことから、その有用性が期待できる。また、薬用植物抽出エキス No.22 が APAP 誘発性肝障害モデルマウス肝臓中で上昇した酸化リン脂質の生成を有意に抑制した。この酸化リン脂質はどのような機能を有しているのであろうか？今後、疾患モデル動物に対する検証を進めると共に、どのような酸化脂質が起点となり疾患を誘導しているのか否か検討を進めていきたい。