

Doctoral Thesis

Discovery and molecular basis of the inhibitory  
effects of a methoxyflavanone from *Perilla*  
*frutescens* on age-related diseases

赤シソ由来メキシフラバノンの  
加齢性疾患に対する抑制作用の発見と  
分子基盤解明

(論文の要約)

Akira Maeda

Graduate School of Integrated Sciences for Life  
Hiroshima University

March 2023

## 目次

- 序論
- 第一章 PDMF は Th17 細胞応答を抑制し、コラーゲン誘発性関節炎を緩和させる
- 第二章 PDMF のがん特異的な細胞老化誘導作用と分子機構の解析
- 第三章 PDMF の細胞内イメージング技術の開発と動態解析
- 総括
- 参考論文

## ・ 序論

がんや骨関節疾患、神経変性疾患などの加齢性疾患の増加は高齢化社会における大きな問題となっており、健康寿命を延伸するためには当該疾患の発症・進行を包括的に遅延・抑制することが重要である。また近年では加齢性疾患進展における老化細胞の蓄積と慢性炎症の重要性が明らかとなりつつあり、細胞老化の観点から当該疾患対策を考える潮流も生まれつつある。

植物由来天然化合物 (フィトケミカル) の代表格であるフラボノイド類は、抗酸化能や酵素活性阻害等を介して加齢性疾患に対する抑制作用を発揮することが知られている。しかしながらフラボノイド類の標的分子と作用機構、ならびにその構造-活性相関の詳細については未解明の点も多い。

著者の所属研究室で赤シソ (*Perilla frutescens*) より単離・同定された新規のメキシフラバノン (*Perilla-derived methoxyflavanone*, PDMF; 8-hydroxy-5,7-dimethoxyflavanone) は、I型アレルギー抑制作用や制がん作用を示すこと、また、本分子は Akt や p53 がん抑制遺伝子を介して当該機能性を発揮しうることが明らかとなっている。Akt と p53 は各種加齢性疾患の制御にも重要な役割を果たしていることから、PDMF の当該疾患抑制を基調とした新たな機能性発掘と分子機序の解明にも期待がもたれた。そこで本研究では、PDMF の加齢性疾患に対する抑制作用を検証するとともに、その作用機構を解明することを目的とした。

第一章では、PDMF の 17 型ヘルパーT 細胞 (Th17 細胞) 応答および関節リウマチ (RA) に対する抑制効果を発見するとともに、その作用分子基盤を明らかにした。第二章では、PDMF のがん特異的な細胞老化誘導作用を見出し、その分子機構の解明を試みた。第三章では、PDMF の生体内における動態および局在を解析する端緒として、本分子の新たな細胞内イメージング系の構築を目指した。

## ・ 第一章 PDMF は Th17 細胞応答を抑制し、コラーゲン誘発性関節炎を緩和させる (参考論文 1)

RA は滑膜過形成や軟骨破壊を特徴とする関節における慢性自己免疫疾患であり、加齢性疾患にも分類される。Th17 細胞は RA の発症および進展に重要な役割を果たしている。Akt が Th17 細胞分化を正に制御すること、また、PDMF が Akt を抑制しうることを踏まえ、本章ではまず Th17 細胞の分化と機能に及ぼす本分子の効果を検証した。その結果、PDMF が Th17 細胞分化を著明に抑制するのみならず、分化後の Th17 細胞からの IL-17A 産生も有意に抑制することが判明した。さらに RA の病態モデルである II 型コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに PDMF を投与したところ、関節炎病態進展および *in vivo* における IL-17A の産生が共に抑制されることがわかった。

PDMF による Th17 細胞分化抑制機構を詳細に解析したところ、本分子は当該分化の主要サイトカインシグナル伝達経路である IL-6-STAT3 経路には影響を及ぼしていないこと、本分子の刺激により Th17 細胞分化と *reciprocal* に拮抗する制御性 T 細胞の誘導も起こっていないことが判明した。その上で、PDMF が Th17 細胞分化に重要な T 細胞抗原受容体 (TCR) 誘導性の Akt の活性化を著明に抑制することが明らかとなった。以上の結果から、PDMF が TCR-Akt シグナル経路を作用点として Th17 細胞分化を抑制し、RA 病態進展を緩和することが示唆された。

## ・ 第二章 PDMF のがん特異的な細胞老化誘導作用と分子機構の解析 (参考論文 2)

がん細胞は無限に増殖する細胞であり、生体内では不可逆的な細胞増殖停止プログラムである細胞老化が引き起こされることで、がんの進展を防いでいる。PDMF が細胞老化の主要な制御因子の一つである p53 をがん細胞で活性化する所見が先行研究で得られていたことに鑑み、本章ではまず、PDMF のがん細胞に対する老化誘導能を検証した。その結果、PDMF がヒト肺腺がん細胞株 A549 に対して細胞老化を顕著に誘導する一方で、初代細胞である正常ヒト気管支上皮細胞に対しては当該誘導能を示さないことがわかった。また、PDMF ががん細胞特異的に p53-p21 経路を活性化すること、RNA 干渉による p53 のノックダウンにより PDMF によるがん細胞に対する細胞老化誘導能が消失することも判明した。以上の結果から、PDMF は p53 を介してがん特異的な細胞老化誘導能を発揮することが明らかとなった。PDMF による当該細胞老化誘導の分子機序を更に解析したところ、p53 の上流ならびに下流の双方において新たなシグナル伝達経路が駆動している証拠を得た。この結果から、PDMF は新規の p53 依存的な機構により、がん細胞への細胞老化を誘導しうることが示唆された。

## ・ 第三章 PDMF の細胞内イメージング技術の開発と動態解析

PDMF の作用機構を規定する上で、同分子が細胞内外にてどのような局在・動態を辿るのかを知ることにも極めて重要である。しかしながら、フラボノイド類のイメージング自体に技術的な障壁が高いこともあり、当該動態の詳細は明らかにされていない。そこで本章では、PDMF の機能性を維持したまま、強い蛍光を発するイメージングプローブを創製した。更に本プローブを用いた共焦点レーザー顕微鏡観察により、本分子の生細胞内イメージングおよび細胞内局在解析が可能であることを立証した。

## ・ 総括

本研究では、赤シソ由来新規フラバノン・PDMF の加齢性疾患に対する抑制作用ならびにその作用機構の解明を目指した。第一章では、PDMF が Th17 細胞応答を抑制すると共に、本 T 細胞サブセットを病因とする RA 様関節炎病態を緩和させうることを示した。またこの作用機序として、PDMF が TCR-Akt シグナル伝達経路を負に制御することによって Th17 細胞分化を抑制していることを明らかにした。第二章では、PDMF ががん特異的な細胞老化誘導作用を示すことを見出すと共に、その分子機序が従来の DNA 損傷チェックポイントを介さない新規の p53 依存的なメカニズムによるものであることを発見した。第三章では PDMF の細胞内イメージング技術を確立した。

本研究で得られた成果は、フラボノイドを基調とした加齢性炎症疾患ならびにがんに対する抑制戦略を考える上での新たな視点を提供するものと期待される。また本研究は、フラボノイドをケミカルプローブとした加齢性疾患に対する新たな分子標的の発見、および細胞治療技術の開発においても有益な指針を与えることが期待される。

・ 参考論文

- (1) **A methoxyflavanone from the medicinal herb *Perilla frutescens* down-modulates Th17 response and ameliorates collagen-induced arthritis**

Akira Maeda, Kouki Hirano, Shunsuke Maeda, Ayana Okuizumi, Noriko Hirakawa, Kenji Baba,  
Takashi Fujimura, Seiji Kawamoto

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **637**, 294-299 (2022).

- (2) **A methoxyflavanone from *Perilla frutescens* induces cellular senescence in A549 human lung adenocarcinoma cells but not in normal human bronchial epithelial cells**

Akira Maeda, Takashi Fujimura, Noriko Hirakawa, Kenji Baba, Seiji Kawamoto

*Biological and Pharmaceutical Bulletin* **45**, 1581-1584 (2022).