

平成 22 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590029
 研究課題名 (和文) 苔類およびキノコ類よりコレステロール排出に関与する核内受容体
 活性化物質の探索
 研究課題名 (英文) Search for the Activating Substances of Nuclear Receptors as
 Regulator of Cholesterol Catabolism from Liverworts and Mushrooms
 研究代表者
 橋本敏弘 (HASHIMOTO TOSHIHIRO)
 徳島文理大学・薬学部・教授
 研究者番号：10075955

研究成果の概要 (和文)：

最近、核内受容体であるヒト肝臓Xレセプター (liver X receptor; LXR)およびFarnesoid X receptor (FXR)の活性化によるコレステロールの排出機構が見出されている。苔類およびキノコ類より、LXRおよびFXR活性化物質の検索を行った。苔類ウスバゼニゴケから、LXR α 選択的アゴニストとして、大環状ビスビベンジル化合物、riccardin C (RC)が見い出された。マウスにRCを経口投与すると、血中トリグリセリドレベルを増加することなく、血中HDLレベルを上昇させた。苔類ゼニゴケから、FXR アゴニスト活性を示すmarchantins AおよびEが見出された。

研究成果の概要 (英文)：

Recently, the mechanisms of the regulator of cholesterol catabolism by the activation of liver X receptor (LXR) and farnesoid X receptor (FXR) were found. The activating substances of LXR and FXR were searched from liverworts and mushrooms. We identified a macrocyclic bis(bibenzyl), riccardin C from the liverwort *Blasia pusilla*. Riccardin C functions as LXR α selective agonist. Riccardin C increases plasma HDL level without elevating triglyceride level in mice. We identified marchantins A and E from the liverwort *Marchantia polymorpha* as FXR agonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生薬・天然物化学

1. 研究開始当初の背景

コレステロール低下剤には、HMG-COA還元酵素阻害剤が臨床上高い評価を受けているが、高い血清コレステロール値を持つ家

族性高コレステロール血症の患者、あるいは冠動脈疾患を持つ患者に対し、目標とする低レベルの血清コレステロール値まで下げるには十分な効果を有しておらず、この

ような患者にも有効な高脂血症治療剤が望まれていた。最近、核内受容体であるヒト肝臓 X レセプター α (liver X receptor; LXR)および Farnesoid X receptor (FXR)の活性化によるコレステロールの排出促進機構が明らかになり、これら核内受容体の活性化によるコレステロール低下薬の開発が最近注目されていた。血漿中の、HDL (高比重リポ蛋白質=善玉コレステロール)は、LDL (低比重リポ蛋白質=悪玉コレステロール)より他の組織に運ばれたコレステロールを血管壁細胞から運び出し、胆汁酸への分解が可能な肝臓に輸送する機能を持つ。したがって HDL 上昇作用を示す薬物は、虚血性心疾患の予防治療に有用と期待されていた。細胞からコレステロールを放出して HDL を形成する過程には、膜トランスポーターATP binding cassette protein A1 (ABCA1)や ABCG1 が必須の役割を担う。これらの遺伝子発現は、核内受容体 LXRにより直接促進されることから、新たな創薬ターゲットとして LXR に注目が集まっていた。そこで、国立衛研との共同研究において、LXR アゴニストの探索を行い、苔類ウスバゼニゴケ (*Blasia pusilla*)に大量に含まれる大環状ビスビベンジル化合物, Riccardin C (RC)を見出した。RC は、LXR α 依存の遺伝子転写を濃度依存的に増加させたが、LXR β に対しては全く活性を示さない極めて興味ある生理活性を示した。

2. 研究の目的

四国を中心に西日本各地で苔類およびキノコ類を採集し、苔類およびキノコ類の溶媒抽出エキスについて、カラムクロマトグラフィーなどにより精製し、LXR, FXR などの核内受容体の活性化物質の単離、構造決定を行う。LXR α 選択的アゴニストである Riccardin C 誘導体の合成を行い、構造活性相関について検討する。また新たに単離された天然化合物は、アセチル化、メチル化により誘導体の合成を行い、核内受容体に対する作用を調べ、構造活性相関について検討する。

3. 研究の方法

四国を中心に西日本各地で採集した100種以上の苔類およびキノコ類は、エーテル、酢酸エチル、メタノールなどを用いて抽出し、その抽出液の濃縮には、今回申請したロータリーエバポレーター、冷却水循環装置、濃縮装置を用いて行う。1g以上に得られたコケ類の抽出エキスについては、シリカゲルおよびSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより粗分画し、LXR, FXR などの核内受容体の活性化を指標として、コレステロール低下物質の単離、構造決定を行う。現在までに、顕著な活性が見られ

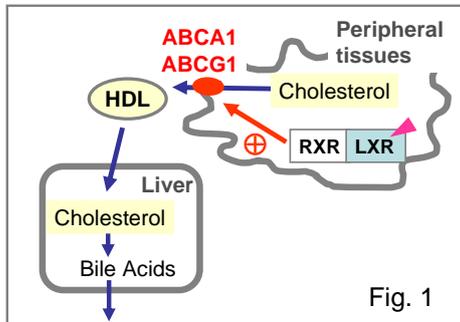
た日本産ウスバゼニゴケ (*Blasia pusilla*)、ジンガサゴケ (*Reboulia hemisphaerica*)、トサハネゴケ (*Porella furuticosa*)、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)、フタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*)など12種の苔類およびメタノール抽出エキスについて生理活性物質の単離を行った。得られた新規化合物の構造は、高分解能NMRスペクトル、X線結晶解析、化学反応などにより明らかにした。LXRアゴニストの探索は、レポーターアッセイ法により行った。CV-1細胞に、ヒトLXR α (あるいはLXR β)およびRXR α の発現ベクター、LXR応答配列をエンハンス領域に含むシフェラーゼレポーター遺伝子、効率補正用の β -ガラクトシダーゼ発現ベクターを導入し、薬物処理24時間後のルジフェラーゼ活性を測定した。FXRはリガンドと結合しFXR結合配列(FXRE)に結合することにより、下流の遺伝子の転写活性を行う。FXR結合配列下にCMV promoterの3'側 201 bp と enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)遺伝子をつないだプラスミド (レポータープラスミド) と SV40 promoter 下に enhanced cyan fluorescent protein (ECFP)遺伝子をつないだプラスミド (内部標準測定用プラスミド)、核内受容体発現用プラスミドとしてRXR遺伝子を有するプラスミド及びFXR遺伝子を有するプラスミドの4種をCOS7細胞に導入した。この細胞の培養液に被験化合物を添加し、約40時間後EYFPとECFPの蛍光を測定した。FXRの転写活性は、(EYFPの蛍光値) / (ECFPの蛍光値)の値により評価を行った。

4. 研究成果

(1) 苔類由来 Riccardin C の LXR アゴニスト活性および HDL 産生促進

血漿中の HDL (高比重リポ蛋白質、いわゆる善玉コレステロール) が低下すると動脈硬化性疾患の危険が増大する。これは HDL が抗動脈硬化作用を有するため、すなわち HDL は血管壁細胞に蓄積して動脈硬化の原因となるコレステロールを運び出し、胆汁酸への分解が可能な肝臓に輸送する機能をもつことによる。したがって HDL 上昇作用を示す薬は虚血性心疾患の予防治療に有用と期待される。細胞からコレステロールを放出して HDL を形成する過程には、膜トランスポーターATP binding cassette protein A1(ABCA1)や ABCG1 が必須の役割を担っている (Fig. 1)。これらの遺伝子発現は核内受容体 liver X receptor (LXR)により直接促進されることから、新たな創薬ターゲットとして LXR に注目がされている。

我々はLXRアゴニストの探索を行い、ウスバゼニゴケ由来の riccardin C (RC) を見いだした。本化合物はLXR α 選択的なアゴニスト活性を示す極めてユニークなリガンドであり、マクロファージ系細胞において ABCA1 および ABCG1 発現増加によって HDL 産生を促進する効果を示した。



徳島県神山町にてウスバゼニゴケ (dry 1.25 kg) のメタノール抽出エキスをシリカゲル (CHCl₃-MeOH gradient) および Sephadex LH-20 (CHCl₃-MeOH=1:1) カラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、Riccardin C (RC)(667 mg) および Riccardin F (RF)(183 mg) を単離した。徳島文理大学薬学部の福山愛保教授のグループとの共同研究により RC の全合成 (RC 合成品: S1) が完成した。RC のメチルエーテル化などにより、7 種の誘導体 (S2~S8) の合成を行い、LXR 活性化試験を行った (Fig. 2)。RC および RC 合成品 (S1) は LXR α 活性化作用を示したが、7 種の誘導体 (S2~S8) には活性が認められなかった。また RC および RC 誘導体は、LXR β 活性化作用を示さなかったことから、RC は LXR α 選択的なアゴニストであることが分かった。(Fig 3, Fig. 4)

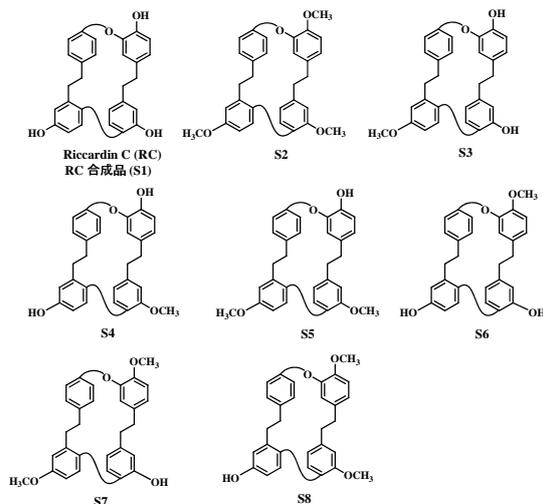


Fig. 2. Riccardin C and the synthetic analogs.

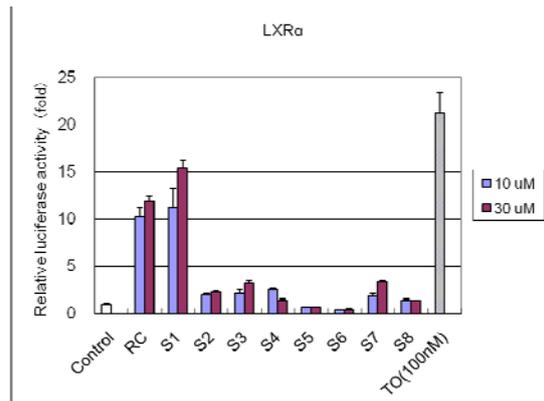


Fig. 3. Activation of LXR α by RC derivatives.

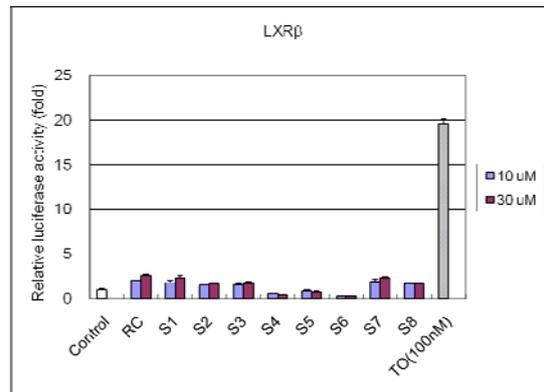


Fig. 4. Activation of LXR β by RC derivatives.

以上の事実から、LXR 活性化には RC の 3 個のフェノール基の存在と大環状構造のコンフォメーションが重要であることが示唆された。動物実験を進めるために、大量のウスバゼニゴケを徳島県下、数ヶ所で採集し、RC を g オーダーで単離した。そこでマウスに RC を経口投与すると血中 HDL レベルを上昇させる作用を示し、血中トリグリセリドレベルを減少させた。(Fig. 5)

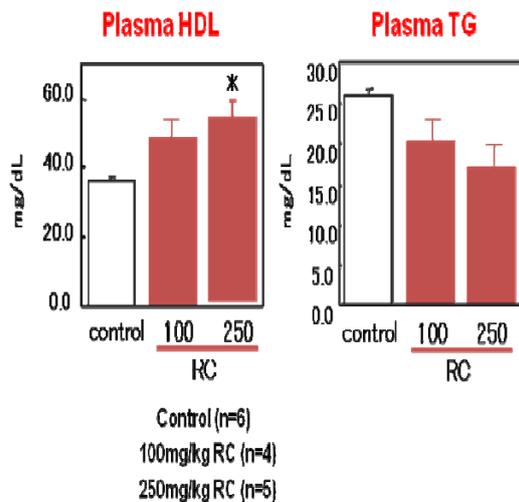


Fig. 5. RC increases plasma HDL level without elevating triglyceride level in mice.

(2) 苔類由来 Marchantin 類の FXR アゴニスト活性

胆汁酸はコレステロールより合成されるが、この転換は最終産物である胆汁酸により抑制される。胆汁酸により活性化される FXR は律速酵素であるコレステロール7・ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) の遺伝子発現を抑制することにより、このフィードバック制御を担っている。Farnesoid X receptor (FXR) のを欠損したマウスでは、血中コレステロール、胆汁酸、トリグリセリド等の上昇をきたす。FXR は、BSEP と SHP のプロモーター領域に結合し、直接発現を誘導させる。SHP は、CYP7A1 の発現に必要な LRH-1 と結合することにより、CYP7A1 の発現を間接的に抑制する。また LXR は、CYP7A1 の転写を促進する重要なレセプターである (Fig. 6)。

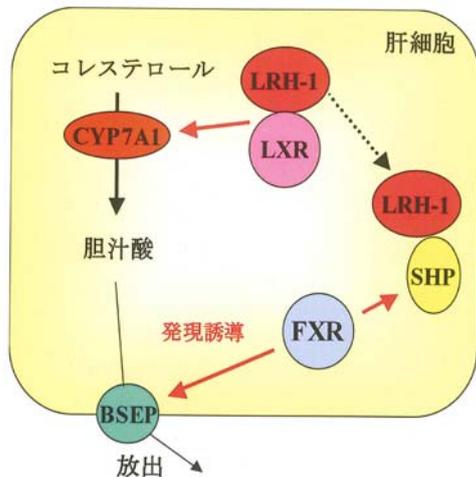
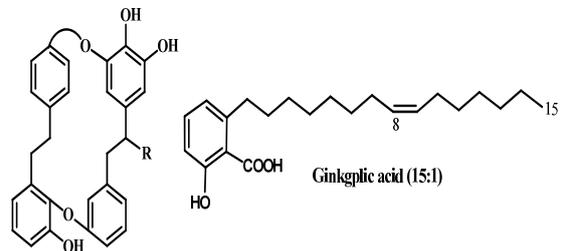


Fig. 6. FXR and LXR as regulator of cholesterol catabolism.

したがって、FXR の活性化剤には、血清トリグリセリド、コレステロール低下作用が期待され、高脂血症の予防治療薬の有力な候補となる。FXR のリガンドは、ケノデオキシコール酸 (CDCA) をはじめとする胆汁酸分子であり、CDCA により FXR の転写活性が増強される。CDCA は、毒性をもつリコール酸に代謝されるため、医薬品としての活用は困難である。しかし、胆汁酸とは異なる骨格を持つ化合物は、毒性物質へ代謝されない高脂血症予防治療薬として期待される。そこで天然および合成品について、レポーターアッセイ法による FXR 活性化の評価を行った。この結果、苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) に大量に含有される marchantins A, E、銀杏 (*Ginkgo biloba*) より大量に得られる ginkgolic acids 15:1, 17:1 が、同濃度の CDCA と同等もしくは

高い率で FXR 転写活性の促進を引き起こした (Fig. 7, Fig. 8)。これらの化合物は、RXR の活性化は引き起こさず、FXR を活性化することにより、レポーター遺伝子の発現を上昇した。



R=H: Marchantin A
R=OCH₃: Marchantin E

Fig. 7. Farnesoid X receptor (FXR) agonists.

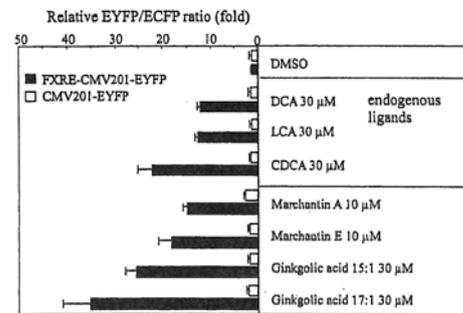


Fig. 8. The activations of FXR by marchantins A, E and ginkgolic acids.

FXR が生体において機能している肝臓、腸由来の培養細胞においてレポーターアッセイを行った。HepG2 において Marchantin 類による FXR の活性化が弱い、その他は FXR の活性化が引き起こされた (Fig.9)。

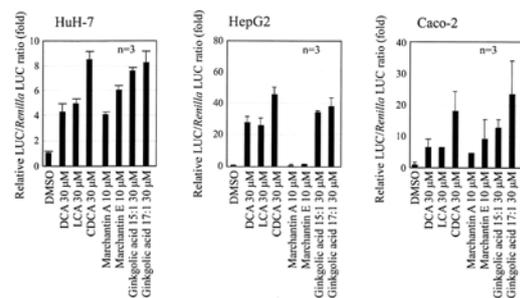
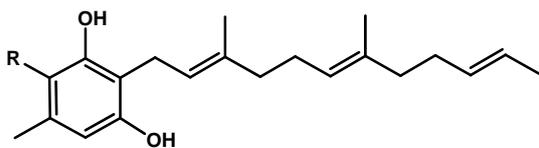


Fig. 9. The difference of FXR-activation in the reporter assay.

コハネゴケ、フタバネゼニゴケ、ジンガサゴケ、シダレゴヘイゴケより大環状 LXR アゴニストとしては、Plagiochin A, Ptychantol A が見出された。

(3) キノコ類については、ニンギョウタケモドキ科キノコのコモリタケ、ニンギョ

ウタケから FXR アゴニストである Grifolin 類 (Grifolin, Grifolic acid) が得られた (Fig.10)。



R=H: Grifolin
R=COOH: Grifolic acid

Fig. 10. Grifolin and grifolic acid from the mushroom belonging to Scutigeraceae

さらにホシアンズタケより4種の新規セスキテルペン、フルイタケより3種の新規トリテルペン、ハナビラタケより3種の新規フタリド化合物を単離した。これらの新規化合物の生理活性については現在検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Hirasawa, A., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Tsujimoto, G. (他7名; 9番目), Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 査読: 有, 380 (3), 247-255 (2009).
- ② Hioki, H., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Fukuyama, Y., (他7名; 9番目), Synthesis of Riccardin C and Its Seven Analogues. Part 1: The Role of Their Phenolic Hydroxy Groups as LXR Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読: 有, 19 (3), 738-741 (2009).
- ③ Suzuki, T., Sato, Y., Nishimaki-Mogami, T., Hashimoto, T., (他9名; 8番目), The Novel Compounds that Activate Farnesoid X Receptor: the Diversity of Their Effects on Gene Expression. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読: 有, 107 (3), 285-294 (2008).
- ④ キノコ類より生活習慣病予防薬および抗耐性菌薬の探索研究. 橋本敏弘, 吉川和子, 梅山明美, 浅川義範, 日本菌学会西日本支部会報, 査読: 有, 2008, 7, 19-26.

[学会発表] (計 41 件)

- ① 食用キノコ類および地衣類より糖尿病予防薬の探索. ○橋本敏弘, 吉川和子, 國土直樹, 浅川義範, 木村隆, 井ノ瀬利明, 平澤明, 辻本豪三, 第3回食品薬学シンポジウム (大阪), 2009. 11. 12-13.

- ② ○國土直樹, 吉川和子, 井ノ瀬利明, 平澤明, 辻本豪三, 橋本敏弘, ハナビラタケの生活習慣病予防作用を有する化学成分. 日本薬学会第128年会, 2008. 3. 26-28, 横浜.
- ③ きのこと類より生活習慣病予防薬および抗耐性菌薬の探索研究. ○橋本敏弘, 菌学会西日本支部大会—特別講演, 2007. 10. 20, 彦根.

[図書] (計 3 件)

- ④ 高石喜久, 馬場きみ江, 本田義昭編 分担: 橋本敏弘『薬学生のための天然物化学テキスト』廣川書店 2009. 3.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①名称: 糖尿病進行抑制作用を有する組成物

発明者: 山本恭介, 井ノ瀬利明, 木村 隆, 吉川和子, 橋本敏弘, 平澤 明, 辻本豪三

権利者: ユニチカ

種類: 特許出願

番号: 2008-227107

出願年月日: 2008/9/4

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/~shouyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 敏弘 (HASHIMOTO TOSHIHIRO)

徳島文理大学薬学部・教授

研究者番号: 10075955

(2) 研究分担者

梅山 明美 (UMEYAMA AKEMI)

徳島文理大学薬学部・准教授

研究者番号: 40160329

(3) 研究分担者

吉川 和子 (YOSHIKAWA KAZUKO)

徳島文理大学薬学部・助教

研究者番号: 40166921