

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460134

研究課題名 (和文) 天然由来レチノイドX受容体アゴニストの生活習慣病、炎症性疾患の予防・治療への応用

研究課題名 (英文) Application of naturally occurring retinoid X receptor agonists to lifestyle-related diseases and inflammatory diseases

研究代表者

井上 誠 (INOUE, Makoto)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50191888

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 生体機能調節作用が期待されるが報告が非常に少ない天然レチノイドX受容体 (RXR) アゴニストに焦点を絞り、それらの探索と特性解析、疾患モデル動物への応用を試みた。特にサンスコン由来 SPF1 と SPF2 は、RXR を介した抗炎症作用を示すこと、メタロチオネイン II の発現を亜鉛の共存下で著しく誘導すること、アミロイド β ($A\beta$) による神経細胞死を抑制することを新たに見出した。一方、プロポリス由来ドルパニンは RXR と PPAR γ を活性化するデュアルアゴニストであり、抗炎症作用、 $A\beta$ による神経細胞死の抑制作用を有することを見出した。これらの発見はこれまでに報告のない RXR アゴニストに関する新規の知見であった。

研究成果の概要 (英文) : There are only a few reports concerning naturally occurring retinoid X receptor (RXR) agonists, of which biological functions in vivo are expected so much. In this study focusing on naturally occurring RXR agonists, we explored new agonists, investigated their characteristics, and sought to apply them for animal models of several diseases. SPF1 and SPF2 isolated from the roots of *Sophora tonkinensis* and drupanin isolated from Brazilian propolis were intensively studied. We found that that SPF1 and SPF2 showed anti-inflammatory effect via RXR/LXR heterodimer, induced metallothionein II synergistically in the presence of zinc, and protected nerve-like cells from the death induced by amyloid β . Drupanin also showed anti-inflammatory effect and protective effect on cell death induced by $A\beta$. We demonstrated for the first time that RXR agonists possess this kind of biological effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：レチノイドX受容体 核内受容体 天然生理活性物質 生活習慣病 抗炎症作用 天然物

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は脂溶性低分子化合物をリガンドとする転写調節因子であり、ヒトでは 48 種類が知られている。それらの中でもサブファミリー 1 に属するペルオキシゾーム増殖剤感受性受容体 (PPAR α , δ , γ)、肝 X 受容体 (LXR α , β)、レチノイン酸受容体 (RAR α , δ , γ)、ビタミン D 受容体 (VDR)、胆汁酸受容体 (FXR) などは、サブファミリー 2 に属するレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成し、それぞれの核内受容体に対応するリガンドと結合することで核内に移行し、特定の DNA 結合配列に結合して遺伝子の転写を調節している。また、RXR はホモ二量体を形成して遺伝子の転写を調節することができる。サブファミリー 1 に属する核内受容体は生体内で脂質・糖代謝に関わるだけでなく抗炎症・免疫調節・細胞分化調節作用にも関与しており、それらの転写活性を調節している RXR は生理機能及び病態生理の調節に重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかし、RXR アゴニスト剤の開発は以下の主な理由で進んでいない。

(1) RXR がいくつかの核内受容体の活性調節に関与しているためにその制御が難しい。

(2) RXR/RAR と RXR/VDR ヘテロ二量体は RXR アゴニスト単独では活性化できないと考えられていた（現在ではリガンドに依存して活性化されることが示されている）。

(3) 現在までに、ベキサロテンが唯一合成 RXR アゴニストとして欧米 20 カ国以上で皮膚 T リンパ腫の治療薬として認可されているが、高脂血症、高コレステロール血症、甲状腺機能低下、白血球減少などの副作用のためにその使用は制限されており、生活習慣病への応用はなされていない。

(4) 合成 RXR リガンドがレチノイン酸や 9-*cis*-レチノイン酸をリード化合物として開発されてきた経緯を考えると、新たな特性を持った合成 RXR リガンドの創製は困難であ

る。

そこで本研究では、核内受容体の生体内での多彩な機能に着目し、生活習慣病、炎症性疾患の予防・治療薬の開発のために、構造の多様性に富む天然物を基盤に RXR を標的にした薬物の開発は非常に価値のあるものと考え、研究に取り組むことにした。

2. 研究の目的

レチノイド X 受容体 (RXR) の合成アゴニストは、疾患モデル動物でインスリン抵抗性、糖尿病、肥満、動脈硬化症、癌、皮膚炎（湿疹）に対して有効性を示すことが報告されている。現在、ベキサロテンが唯一合成 RXR アゴニストとして皮膚 T 細胞リンパ腫の治療薬として欧米で使用されているが、その副作用のために使用は制限されており生活習慣病へは応用されていない。本研究では RXR が他の核内受容体とは異なった特徴を有する核内受容体であることに着目し、各種の薬用植物を創薬資源として、ベキサロテンと異なった特性を持った天然由来 RXR アゴニストを探索するとともに、生活習慣病や慢性炎症性疾患への応用を目指した。さらに化学・物理・生物・薬理学的特性と構造の関係を詳細に解析し、多面的な観点より「構造活性相関データベース」を作製し、RXR アゴニストの有効な使用指針を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞、RAW264.7 細胞、3T3-L1 細胞、PC12 細胞、CaC02 細胞は理化学研究所細胞バンクより購入した。また、チオグリコレート刺激腹腔渗出マクロファージ、初代培養マウスアストロサイトは C57BL/6j マウスより単離し使用した。

(2) 漢方方剤常用生薬やマンマー産薬用植物を創薬資源として、スクリーニング系としてレポーターアッセイを使用し、天然物化学的手法を用いて、RXR アゴニストの単離、

構造決定を行った。

(3) RXR アゴニストの特性の解析は、PPAR α , β , γ , LXR α , β , RAR α , VDR, RXR α , β , γ のレポーターアッセイ系及び GAL4-two-hybrid アッセイ系を用いて解析した。また、各種細胞を使用して、RXR アゴニストによる標的遺伝子の転写活性からはリアルタイム PCR 法やウェスタンブロッティング法で解析した。

(4) RXR とアゴニストのタンパク質-リガンドドッキングは、Discovery Studio 3.1 (Accelrys 社) を使用し解析した。

(5) 既存の合成アゴニストベキサロテンと RXR アゴニストの遺伝子転写活性の比較検討はマイクロアレイ法で行った。

(6) ドデシル硫酸ナトリウム誘導潰瘍性大腸炎モデルマウス、高脂肪食負荷肥満モデルマウス、DNCB 接触性皮膚炎モデルマウスは本学薬学部動物実験施設で作製し RXR アゴニストの効果を検討した。

4. 研究成果

(1) サンズコン由来 RXR アゴニスト SPF1 と SPF2 の生物学的特性の解析

① SPF1 及び SPF2 が LPS 刺激 RAW264.7 細胞及び腹腔渗出マクロファージにおいて、インターロイキン 6 やシクロオキシゲナーゼ 2 などの産生を抑制し、それらの作用は RXR/LXR ヘテロダイマーを介していることを見出した。これまでの RXR/LXR ヘテロダイマーを介した RXR アゴニスト及び LXR アゴニストの抗炎症作用は報告がなく、新規の発見であった(論文作成中)。

② SPF1 と合成 RXR アゴニストベキサロテンの遺伝子発現に及ぼす効果を RAW264.7 細胞を用いてマイクロアレイ法で比較検討した。その結果、SPF1 が特異的に 2 倍以上 mRNA 発現量を増加させた遺伝子は 192 種類、ベキサロテンが特異的に 2 倍以上 mRNA 発現量を増加させた遺伝子は 138 種類であった。SPF1 は正

常群及びベキサロテン群に比べ、GDF15 や ABCA1 などの遺伝子 mRNA を増加させた。また、SPF1 とベキサロテンは同様に、メタロチオネイン 2 (MTII) mRNA の発現量を大きく増加させることを見出した。

③ SPF1 による MTII 遺伝子の発現に及ぼす効果を詳細に検討したところ、SPF1 は LXR アゴニストあるいは RAR アゴニストの共存下で MTII mRNA の発現を相乗的に増加させた。さらに興味深いことに、SPF1 は亜鉛 (Zn) による MTII mRNA の発現を著しく (>300~500 倍) 増加させ、さらにこの作用は LXR あるいは RAR アゴニストの共存下で増強された。これまでに、MTII mRNA の発現が RXR/LXR あるいは RXR/RAR ヘテロダイマーを介して活性化されるという報告はなく、新規の発見であった(論文準備中)。

④ SPF1 がアルツハイマー病発症の原因の一つと考えられているアミロイド β ($A\beta$) が誘導する神経系細胞 PC12 の細胞死に及ぼす効果を解析した。その結果、SPF1 は $A\beta$ による PC12 細胞のアポトーシスを抑制し、その作用は RXR アンタゴニストで抑制され、また、RXR/LXR ヘテロダイマーを介した作用であることが明らかになった。

(2) プロポリス由来 RXR アゴニストドルパニンの生物学的特性の解析

① ドルパニンの特性を検討するために核内受容体選択性を調べたところ、ドルパニンは RXR α , β , γ をほぼ同様に活性化し、また、PPAR γ にも弱い結合活性を示したことより、ドルパニンは RXR と PPAR γ に対するデュアルアゴニストでありことがわかった。ドッキングスタディーより、ドルパニンは 9-cis-レチノイン酸の RXR 結合サイトに結合することが明らかになった。そして PPAR γ のフルアゴニストであるロシグリタゾンよりは弱いものの、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導能を示した。

② ドルパニンの $A\beta$ により惹起される初代培養アストロサイトの細胞死に及ぼす影響を

調べたところで、ドルパニン用量依存的に、また、RXR 依存的に細胞死を抑制することを見出した。

(3) RXR アゴニストの疾患モデルマウスに及ぼす効果の解析

①SPF1 のドデシル硫酸ナトリウム (DSS) 誘導潰瘍性大腸炎モデルマウス、DNCB 接触性皮膚炎モデルマウスに及ぼす効果を検討した。DSS 誘導潰瘍性大腸炎モデルマウスには、サンズコン抽出物での効果を検討したが、有意な効果が観察されなかった。また、DNCB 接触性皮膚炎モデルマウスに対する SPF1 の効果を調べたところ、対照薬として使用したデキサメタゾンと同様に抑制効果は観察されず、激しい皮膚炎が惹起される本モデルは SPF1 の効果を検討するのに適切なモデルでなかった可能性が考えられた。

②ドルパニンの db/db 肥満糖尿病モデルマウスに及ぼす効果を検討した。ドルパニンを 2 週間腹腔内投与した後の空腹時血糖、グルコース糖負荷試験を行ったが有意な効果は観察されなかった。

③ドルパニンの高脂肪食餌誘導インスリン抵抗性モデルマウスに及ぼす効果を検討した。その結果、ドルパニンを 3 週間経口投与したところ、有意な血糖降下作用を示した。本実験の再現性及びドルパニンの用量依存的性、長期間投与の効果など、今後の検討課題とした。

(4) 新規天然由来 RXR アゴニストの探索研究を通して、当研究室で以前に同定した RXR アゴニストのホオノキオール類似化合物が強い RXR アゴニスト活性を示すことを見出した (データは公表できない)。さらに化学合成により類似化合物を半合成し構造活性相関について調べた。その結果、微妙な構造の相違により、RXR アゴニストだけでなく、PPAR γ アゴニスト活性や PPAR δ アゴニスト活性を示すようになることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Ken-ichi Nakashima, Naohito Abe, Masayoshi Oyama, Makoto Inoue. Yuccalides A-C, three new phenolic compounds with spiro-structures from the roots of *Yucca gloriosa*. *Fitoterapia*, 111, 154-159 (2016). (査読有り)
DOI:10.1016/j.fitote.2016.04.009.

② Makoto Inoue, Hiroki Tanabe, Ken-ichi Nakashima, Yukihiro Ishida, Hitoshi Kotani. Rexinoids isolated from *Sophora tonkinensis* with a gene expression profile distinct from the synthetic rexinoid bexarotene. *Journal of Natural Products*, 77, 1670-1677 (2014). (査読有り)

DOI:10.1021/np5002016

③ Ken-ichi Nakashima, Tohru Murakami, Hiroki Tanabe, Makoto Inoue. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1840, 3034-3041 (2014). (査読有り)

DOI: 10.1016/j.bbagen

〔学会発表〕 (計 6 件)

① 王蔚、中島健一、井上誠：サンズコン由来 RXR アゴニストの Metallothionein 誘導作用に関する研究 日本生薬学会第 63 回年会 平成 28 年 9 月 24 日 富山国際会議場 (富山県・富山市)

② 井上誠 分子標的型研究：和漢薬成分の核内受容体を介した生体調節作用 第 33 回和漢医薬学会学術大会 平成 28 年 8 月 27 日 星薬科大学 (東京都・品川区)

③ 王蔚、中島健一、井上誠：サンズコン由来 RXR アゴニスト prenylflavonoids の抗炎症作用 (2) 第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会 平成 28 年 7 月 11 日 愛知学院大学薬学部 (愛知県・名古屋)

④ 王蔚、中島健一、田邊宏樹、井上誠：サ

ンズコン由来 RXR アゴニストにより誘導される抗炎症作用関連遺伝子の発現解析 日本生薬学会第 62 回年会 平成 27 年 9 月 11 日 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

⑤ 王蔚、中島健一、田邊宏樹、井上誠：サンズコン由来 RXR アゴニスト prenylflavanones の抗炎症作用 日本生薬学会第 61 回年会 平成 26 年 9 月 14 日 福岡大学薬学部 (福岡県・福岡市)

⑥ Ken-ichi Nakashima, Toshiyuki Tanaka, Hiroko Murata, Kouichi Kaburagi, Makoto Inoue. Drupanin is naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. The American Society of Pharmacognosy 2014 annual meeting. 平成 26 年 8 月 4 日 Mississippi (USA)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：レチノイド X 受容体アゴニスト剤
発明者：井上誠、中島健一、田邊宏樹、池野久美子、中村正
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 5919241 号
取得年月日：平成 28 年 4 月 15 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.agu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 誠 (INOUE Makoto)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号：50191888

(2) 連携研究者

中島健一 (NAKASHIMA Ken-ichi)
愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号：70635135
田邊宏樹 (TANABE Hiroki)
愛知学院大学・薬学部・講師

(平成 28 年度より北陸大学薬学部准教授)
研究者番号：10415606

(4) 研究協力者

高木三千代 (TAKAGI Michiyo)

王 蔚 (OH I)