

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860067

研究課題名(和文)新規フラボノイド化合物ライブラリーを基盤とする糖尿病網膜症予防薬の創薬研究

研究課題名(英文)Prevention research for diabetic retinopathy based on structure-activity relationship study of novel polymethoxyflavones

研究代表者

宮田 佳樹 (Miyata, Yoshiki)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：20433881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症の病態において、ミュラー細胞で誘発されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の過剰産生およびアポトーシス死のメカニズムを解析し、フラボノイド化合物のミュラー細胞に対する効果について検討した。その結果、ノビレチンはproMMP-9産生を抑制し、内因性のMMP阻害物質であるTIMPs産生を促進した。また、ミュラー細胞のアポトーシス死は小胞体ストレスによって誘導されることを明らかにし、ノビレチンは抗アポトーシス効果を示した。構造活性相関研究を通して、ノビレチンによるミュラー細胞の生存および機能制御に関わる構造特性を明らかにし、MMP阻害活性を有する新規フラボン誘導体を見出した。

研究成果の概要(英文)：Muller cells are a crucial component of the retinal tissue performing a wide range of functions including maintaining retinal structure. In diabetic retinopathy, hyperglycemia induces the dysfunction of Muller cells. We examined the mechanism of diabetes-induced overexpression of matrix metalloproteinases (MMP) and cell death in Muller cells. In addition, we examined the effect of nobiletin and the derivatives. Nobiletin could suppress proMMP-9 production and augment the production of TIMPs which are MMP endogenous inhibitors. Furthermore, we found that ER stress was one of key inducers involved in apoptotic cell death of Muller cells. Nobiletin was found to show anti-apoptotic action on the ER stress-induced Muller cell death. Through structure-activity relationship study, we clarified the structural feature related to the anti-MMP or apoptotic action by nobiletin. In addition, we found novel flavones with stronger inhibitory action on MMP production compared with nobiletin.

研究分野：薬物治療学

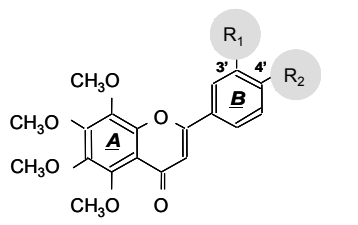
キーワード：フラボノイド ミュラー細胞 糖尿病網膜症 小胞体ストレス マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症（以下、網膜症）は我が国の主要な後天的失明原因疾患である。今日、網膜症の治療にはレーザー網膜光凝固や硝子体手術といった外科的治療と合わせ、抗 VEGF 薬の硝子体内投与による内科的治療が施行されている。近年、網膜細胞生物学的な観点から網膜症の病態メカニズムの解明が進み、網膜症の早期病態を標的とし、病態の進行を抑制し得る新たな内科的治療戦略の確立が期待されている。

2. 研究の目的

網膜特異的グリア細胞であるミュラー細胞は網膜の恒常性維持に関与し、その障害は網膜症の発症および進展に関与することが報告されている。例えば、網膜症の病態では、ミュラー細胞のアポトーシスあるいはピロトーシスに起因する細胞死が観察されるほか、蛋白質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の過剰産生は血液網膜関門の破綻や血管新生に関与する。すなわち、ミュラー細胞を標的とする薬物療法は新たな網膜症予防あるいは治療薬として期待できる。本研究では、ミュラー細胞が産生する MMP を制御し得る化合物の探索研究を柑橘由来ポリメトキシフラボノイド化合物であるノビレチンとその生体内代謝体ならびにノビレチンをリード化合物として合成した新規フラボン誘導体から成る化合物ライブラリーを用いて行う。また、ミュラー細胞死メカニズムの一端を解明することを研究目的とする。



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Nobiletin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
3'-demethylnobiletin	OH	OCH <sub>3</sub>
4'-demethylnobiletin	OCH <sub>3</sub>	OH
3',4'-didemethylnobiletin	OH	OH

3. 研究の方法

(1) 網膜ミュラー細胞由来 MMP 産生に対するフラボン誘導体の効果と構造活性相関研究

実験にはヒト網膜ミュラー細胞株 MIO-M1 を使用する。MIO-M1 細胞におけるノビレチンと新たに合成したフラボン誘導体の MMP 産生に対する効果をゼラチンゼイモグラフィ法により調べる。また、MMP 遺伝子発現に対する効果をリアルタイム PCR 法により検討する。MMP の内因性阻害物質 TIMPs 産生に対する効果はウエスタン

ブロット法によって検討する。

(2) 網膜ミュラー細胞の MMP 産生メカニズムの解析

MIO-M1 細胞由来 MMP の産生メカニズムについて、各細胞内情報伝達因子に対する特異的な阻害薬を用いて MMP 産生に対する関与をゼラチンゼイモグラフィ法により調べる。また、フラボン誘導体の細胞内情報伝達因子の発現動態に対する効果をウエスタンブロット法により検討する。

(3) 網膜ミュラー細胞の細胞死メカニズムの解析

網膜症病態で観察されるミュラー細胞のメカニズムについて、変性蛋白質の小胞体蓄積、小胞体ストレスが関与するか否かについて調べる。実験には小胞体ストレス誘導試薬としてツニカマイシンおよびサブシガルジンを使用する。薬物処理後、細胞核を染色し、蛍光顕微鏡により生細胞数を定量解析する。また、アポトーシスの指標となる DNA 断片化の有無をアガロース電気泳動法、アポトーシス関連蛋白質である CHOP および Caspase-3 の発現動態をウエスタンブロット法により解析する。

(4) 小胞体ストレス誘導性細胞死に対するフラボン誘導体の効果と構造活性相関研究

ノビレチンと新たに合成したフラボン誘導体の小胞体ストレス誘導性細胞死に対する効果を DNA 断片化の有無、アポトーシス関連蛋白質（CHOP および Caspase-3）の発現動態を指標として調べる。

4. 研究成果

(1) 網膜ミュラー細胞におけるノビレチンの MMP 阻害活性

MIO-M1 細胞に対してホルボールエステル（PMA）を処理すると、不活性型 MMP-9 (proMMP-9) 産生が誘導され、不活性型 MMP-2 (proMMP-2) が活性化する。ノビレチンは PMA によって誘導された proMMP-9 産生を濃度依存的に抑制した。また、ノビレチンは PMA 誘導性の MMP-9 mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。一方、ノビレチンは proMMP-2 活性化には影響を及ぼさなかった。ノビレチンは PMA 処理下、MIO-M1 細胞が産生する TIMP-1 および TIMP-2 産生を抑制した。

(2) 網膜ミュラー細胞由来 proMMP-9 産生への MAPK 経路の関与とノビレチンの効果  
MIO-M1 細胞に対してホルボールエステル（PMA）を処理すると、MAPK に属する ERK1/2、p38 および JNK のリン酸化が促進された。また、proMMP-9 産生に対する MAPK 阻害薬の効果について検討した結果、ERK 阻害薬 PD98059、p38 阻害薬 SB203580 および JNK 阻害薬 SP600125 は PMA 誘導性 proMMP-9 産生を濃度依存的に抑制した。そこで、ノビレチンの MAPKs リン酸化に対する効果について検討したが、いずれの MAPKs リン酸化に対してもノビレチンは影

響を及ぼさなかった。これらの結果より、ノビレチンの proMMP-9 産生抑制効果は MAPKs 非依存的な経路を介することが示唆された。

(3) 網膜ミユラー細胞におけるノビレチン生体内代謝体の proMMP-9 産生および TIMPs 産生に対する効果

Fig.1 に示す 3 種のノビレチンの生体内代謝体の proMMP-9 産生に対する効果について調べた結果、ノビレチンと同様にいずれの代謝体も PMA 誘導性 proMMP-9 産生に対して抑制効果を示し、特に、4'-デメチルノビレチンはノビレチンと比較しより強力な proMMP-9 産生抑制効果を示した。

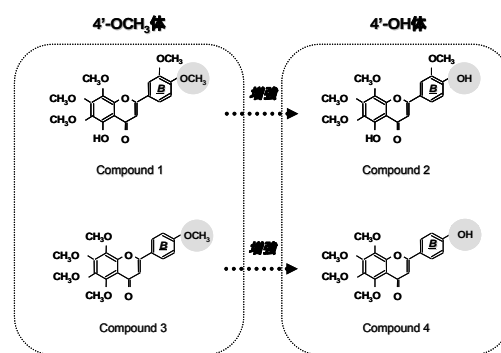
MIO-M1 細胞が産生する TIMPs に対して、ノビレチンと同様に 4'-デメチルノビレチンが TIMP-1 産生を促進する一方、3'-デメチルノビレチンは影響を与えず、3',4'-ジデメチルノビレチンは TIMP-1 産生に対して抑制効果を示した。TIMP-2 産生に対して、ノビレチンと同様に 3'-デメチルノビレチンおよび 4'-デメチルノビレチンは促進効果を示したが、3',4'-デメチルノビレチンは影響を及ぼさなかった。

	proMMP-9 (Inhibitory rate)	TIMP-1	TIMP-2
Nobiletin	45.4 ± 6.1%	↑	↑
3'-demethylnobiletin	86.9 ± 3.2%	-	↑
4'-demethylnobiletin	34.3 ± 9.3%	↑	↑
3',4'-didemethylnobiletin	75.0 ± 12.8%	↓	-

(4) MMP 阻害活性に関わる構造活性相関

ノビレチン構造 B 環の 4'位に位置するメトキシ基 (-OCH<sub>3</sub>) を水酸基 (-OH) とすることで、proMMP-9 産生抑制効果が増強することが明らかとなった。そこで、フラボン骨格 B 環 4'位に OH 基あるいは OCH<sub>3</sub> 基を有するフラボン誘導体 (4'-OH 体および 4'-OCH<sub>3</sub> 体) を合成し、proMMP-9 産生に対する抑制強度を比較した結果、4'-OCH<sub>3</sub> 体 (Compound 1 および Compound 2) と比較して対応する 4'-OH 体 (Compound 3 および Compound 4) でより強力な抑制効果が認められ、proMMP-9 産生抑制効果 (抑制率%) は以下の通りであった。

- Compound 1: 17.7±9.9%
- Compound 2: 78.2±7.1%
- Compound 3: not inhibition
- Compound 4: 51.0±9.5%

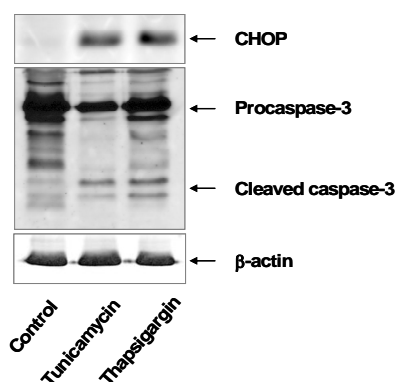


(5) 網膜ミユラー細胞死への小胞体ストレスの関与

MIO-M1 細胞に対して小胞体ストレス試薬であるツニカマイシンあるいはサブシガルジン処理した結果、アポトーシスの指標となる DNA 断片化および活性型 Caspase-3 の発現が認められた。また、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関わる CHOP 発現が誘導された。これらの結果より、小胞体ストレスが網膜症の病態で観察されるミユラー細胞のアポトーシス死に関与する可能性が示唆された。

(6) ノビレチンによる小胞体ストレス誘導性細胞死に対する抑制効果

小胞体ストレス誘導性細胞死に対するノビレチンの効果について検討した結果、ツニカマイシン誘導性の生細胞数の低下に対してノビレチンは抑制効果を示した。また、ノビレチンはアポトーシスの指標となる DNA 断片化および活性型 Caspase-3 発現を抑制した。一方、サブシガルジン誘導性の細胞死に対して、ノビレチンは抑制効果を及ぼさなかった。



(7) 抗アポトーシス効果に関わる構造活性  
相関

ノビレチン生体内代謝体のツニカマシ  
ン誘導性細胞死に対する効果をノビレチンと  
比較した。その結果、いずれの生体内代謝体  
もツニカマシン誘導性の細胞死に対して抑  
制効果を示さなかった。これらの結果より、  
ノビレチンによる抗アポトーシス効果には  
フラボン骨格 B 環 3'位および 4'位に位置す  
るメトキシ基 (-OCH<sub>3</sub>) が必須であることが  
示された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 宮田佳樹、ポリメトキシフラボンによる  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスの  
制御機構、日本薬学会 第 135 年会、  
2015 年 3 月 28 日、デザイン・クリエ  
ティブセンター神戸(兵庫)
- 2) 宮田佳樹、糖尿病網膜症における新規マ  
トリックスメタロプロテアーゼ阻害薬  
の研究開発、第 7 回 Retinal Research  
Meeting、2014 年 11 月 22 日、JR タワ  
ーホール&カンファレンス(東京)
- 3) 宮田佳樹、網膜ミュラー細胞における小  
胞体ストレス誘導性アポトーシスに対  
するフラボノイドの抑制効果、第 34 回  
日本眼薬理学会、2014 年 9 月 14 日、長  
良川国際会議場(岐阜)
- 4) 宮田佳樹、ポリメトキシフラボンによる  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスの  
制御機構、日本薬学会 第 134 年会、  
2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊  
本)
- 5) 宮田佳樹、網膜ミュラー細胞を標的とし  
た新規フラボノイド化合物ライブラリ  
ーを基盤とする創薬研究、第 6 回 Retinal  
Research Meeting、2013 年 11 月 30 日、  
JR タワーホール&カンファレンス(東  
京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 佳樹 (MIYATA, Yoshiki)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：20433881

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

忍足 鉄太 (OSHITARI, Tetsuta)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00279043