

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590025

研究課題名(和文)天然由来レチノイン酸受容体アゴニストの探索と免疫・アレルギー疾患への応用

研究課題名(英文) Search for naturally occurring retinoic acid receptor agonists and their application to immune and allergic 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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：多彩な免疫調節作用が期待されるレチノイン酸受容体(RAR)アゴニストの探索を漢方方剤常用生薬、薬用植物を用いて行った。その結果、これまでに報告のない新しい骨格を持った天然由来RARアゴニストとして、3つのジテルペンと1つのキサントフィルを単離した。それらの遺伝子発現プロファイルは既存のRARアゴニストであるall-transレチノイン酸とは異なっていた。新規RARアゴニストを単離した生薬抽出エキスは食物アレルギーを抑制したが、純度の高い化合物では抑制作用が観察されなかった。本研究で見出した新規RARアゴニストはATRAと異なる作用を示すことより免疫系疾患の予防・治療への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：Agonists for retinoic acid receptor (RAR), which are expected to show various immunomodulating effects, were explored in the present study using the crude drugs frequently used in many Kampo medicines and other medicinal plants. We isolated three diterpenes and one xanthophyll as RAR agonists, which possess the different structures from those of previously reported RAR agonists. Gene expression profiles were varied between the new RAR agonists and a well-known RAR agonist all-trans retinoic acid (ATRA). The extract of the crude drug, from which an RAR agonist was isolated, effectively suppressed the diarrhea of ovalbumin-induced food allergy model mice in a dose-dependent manner, while 85% pure RAR agonist isolated from a crude drug failed to show such anti-allergic effect. Since new RAR agonists found in this study show the effects distinct from those of ATRA, their intense study will help to apply new RAR agonist beneficially to immune and allergic diseases.

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：レチノイン酸受容体アゴニスト 核内受容体 天然物化学 ジテルペン キサントフィル 食物アレルギー 肥満 漢方薬常用生薬

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A は感染性疾患に対して宿主抵抗性を増大させることがよく知られており、ビタミン A の活性本体である all-trans レチノイン酸 (ATRA) が免疫系に多彩な作用を及ぼすことが調べられてきた。ATRA は、1) ヘルパー T 細胞の集団を Th2 > Th1 優位にする、2) B 細胞の抗体産生細胞への分化を促進する、3) マクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制する、ことなどが明らかにされている。さらに最近数年の間に ATRA が、1) 免疫系を抑制的に制御する T 細胞である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞 (Treg 細胞) の末梢での誘導に必要であること、炎症性 T 細胞である Th17 細胞と Treg 細胞の誘導を相反的に制御していること、Treg 細胞の腸管へのホーミングを誘導すること、などの大きな発見があった。また、ATRA が自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、1 型糖尿病動物モデルにおいて改善作用を示すことが報告されている。すなわち、これらの事実は ATRA が多くの自己免疫疾患に有効であることを裏付けるばかりではなく、腸管免疫系の制御に非常に重要な役割を果たしており、経口トレランスの誘導や食物アレルギーの抑制に有効であることを示唆している。

ビタミン A の活性本体である ATRA とそれと同等の活性を示す化合物群、より正確には ATRA の特異的核内受容体である retinoic acid receptor (RAR) の ATRA 結合部位に結合する化合物はレチノイドと総称される。現在、レチノイドには急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法剤として ATRA (医薬品一般名トレチノイン) が用いられている他、その異性体や類似の活性をもつ誘導体が、乾癬、角化症、重症のニキビなど、皮膚の炎症性・増殖性疾患の治療に用いられている。しかし、ATRA は多彩な作用を有するにも関わらず、催奇形性、皮膚炎惹起、口唇炎、血中脂質の上昇などの重篤な副作用があるばかりでなく、生物学的利用能が低いこと、物理的に不安定なことより、その使用は制限されてきた。しかし、ATRA に代わる安全性の高い新規 RAR アゴニストは、これまで難治性疾患と考えられてきた多くの自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、クローン病) やアレルギー疾患 (食物アレルギー、アトピー性皮膚炎他) の予防や治療に有用であると考えられ、それら新規 RAR アゴニストの探索研究は質の高い医療を提供するために重要と考える。

2. 研究の目的

ATRA 及びその誘導体は抗腫瘍薬、乾癬薬として使用されているが、催奇形性、レチノイン酸症候群、白血球増多症、血栓症、血管炎、感染症、錯乱などの重大な副作用があり、

副作用ありきの薬品開発は古い時代の方法論と考えられる。今回、RAR アゴニストの多彩な免疫調節作用、特に過剰な免疫反応を抑制する作用に注目し、ATRA とは構造、代謝、及び遺伝子活性化能が異なる安全性の高い RAR アゴニストを開発するために、長年臨床現場で使用され副作用の発現頻度が極めて低い漢方方剤に着目し、漢方方剤に使用される生薬から天然由来 RAR アゴニストの探索を試みた。生薬、薬用植物の抽出エキスは多くの成分を含んでおり、これまでにそれらが医療現場で使用されてきた情報と併せて利用することは、効率良く目的の活性を有する化合物を見出すための非常に有望な薬用資源と考えられる。しかしこれまでに天然由来 RAR アゴニストの探索は殆ど行われておらず、ATRA 及び 9-cis レチノイン酸 (9-cis-RA) などが知られているのみであり、合成 RAR アゴニストの多くはそれらの誘導体である。すなわち、ATRA と代謝経路が異なり、遺伝子発現誘導プロファイルが異なる新規 RAR アゴニストの探索は非常に重要である。

そこで、多くの生薬や薬用植物を使用して、網羅的に天然由来 RAR アゴニストを探索し、重篤な副作用を持たない免疫調節剤の開発を目指すことにした。

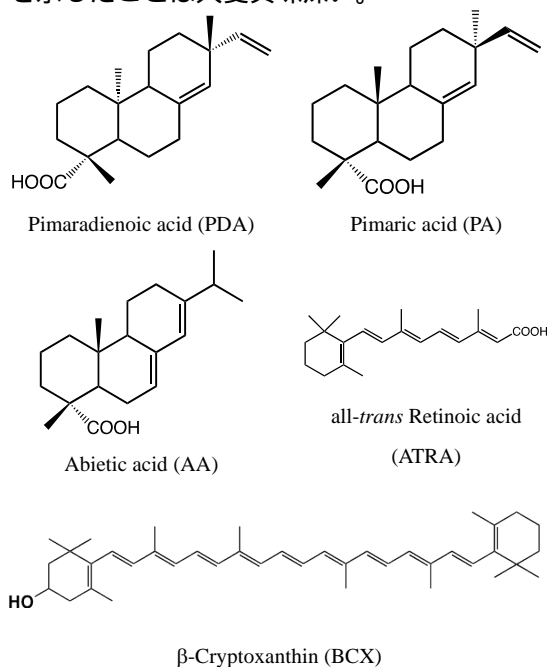
3. 研究の方法

天然由来 RAR アゴニストを探索すると共に、それらの自己免疫疾患、アレルギー性疾患の予防・治療への応用を目指すために、1) 免疫調節作用、アレルギー抑制作用、骨代謝抑制作用などが知られている漢方方剤を中心に、それらに繁用される生薬 150 種、その他の生薬 24 種、及び、天然物ライブラリー (120 種) を創薬資源として、新規 RAR アゴニストをルシフェラーゼレポーターアッセイでスクリーニングし、活性成分を単離同定した。2) 新規 RAR アゴニストは、溶媒による分配、各種カラムクロマトグラム及び HPLC による分離等の天然物化学の手法を用いて単離し、その後 NMR、MS などにより構造を決定した。3) 新規 RAR アゴニストの特性を調べるために、各種細胞における遺伝子の発現誘導をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。4) 新規 RAR アゴニストの免疫調節作用を卵白アルブミンで誘導した食物アレルギーマウスモデルを用いて検討した。5) 新規 RAR アゴニストが脂肪細胞分化調節に及ぼす効果を 3T3-L1 細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 RAR アゴニストとして、 β -cryptoxanthin (BCX), pimaradienoic acid (PDA), pimaric acid (PA), abietic acid (AA) を見出した。BCX は β -カロチンに構造が類似した炭素数 40 のキサントフィルであり、ATRA の 2 倍の分子サイズを有する化合物

であり、このような大きな分子が RAR を活性化することは新たな発見であった。ジテルペンである PDA, PA, AA は ATRA と同じ炭素数 20 の化合物であるが、それらの構造は ATRA とは大きく異なっており、RAR アゴニスト活性を示したことは大変興味深い。



(2) PDA の特性を検討した結果、PDA は RAR を活性化したが、本研究で調べた他の核内受容体、retinoid X receptor (RXR)、liver X receptor (LXR)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ と δ は活性化せず、RAR に特異的なアゴニストであることが明らかになった。しかし、AA はこれまでに報告があるように弱いながら PPAR γ を活性化した。構造活性相関の検討から、ジテルペンであるがステピオールのように 4 員環構造を持つものには活性はなく、また、カルボン酸をアミノ酸でアミド化することにより活性が消失したことから、活性にはカルボン酸が必要であることが示唆された。

次に細胞に対する作用を検討したところ、テトラカルシノーマ F9 細胞において RAR 標的遺伝子である *CYP26a1* の転写を ATRA は低濃度で強く活性化したのに対して、新規 RAR アゴニストは比較的高濃度で弱くしか活性化しなかった (AA = PA > PDA)。

HepG2 肝がん細胞において、RAR 標的遺伝子である constitutive androstane receptor (CAR) の転写を ATRA は弱くしか活性化しなかったが、PA, AA は有意に活性化した。PDA は殆ど活性化しなかった。

HL-60 急性前骨髄性白血病細胞の骨髄球への分化を、ATRA と同様に PDA, PA, AA は同程度の強度で誘導した。これらの結果から、新しく見出したジテルペン型の RAR アゴニストは細胞に対して RAR アゴニストとして働くことが明らかになった。それらの作用は、ATRA と異なっており、ATRA が *CYP26a1* の mRNA 発

現を非常に低濃度で強力に誘導したのに対して、新規 RAR アゴニストは弱く誘導した。また、ATRA は CAR の mRNA 発現は弱く誘導したのに対して、新規 RAR アゴニストは効率良く活性化した。さらに、HL-60 細胞の顆粒球への分化は同じ濃度で同様に促進した。すなわち、ATRA と新規 RAR アゴニストは実験系により異なった強度の活性を示し、これは今回見出した RAR アゴニストが ATRA とは異なった遺伝子発現誘導プロファイルを示すこと示唆していると考えられた。

(3) RAR アゴニストの効果を卵白アルブミン (OVA) で免疫感作した食物アレルギーモデルマウスを用いて検討した。食物アレルギーマウスモデルは、OVA 及び水酸化アルミニウムゲルを 0 日目、10 日目に腹腔内注射した後、次に OVA を 21 日目より 3 日ごとに 6 回胃内強制投与して作製した。単離した PDA は少量であったので、始めに PDA を単離した生薬ドッカツの抽出エキス (PDA 含量は 5.08% であった) を用いて検討した。ドッカツ抽出エキスは OVA をマウスに胃内強制投与する前から 2 週間経口投与して、下痢を観察することにより食物アレルギーの発症に及ぼす影響を調べた。その結果、20 mg/kg の用量では最終的に効果は観察されなくなってしまったが、100 と 500 mg/kg で用量依存的な食物アレルギーの抑制作用が観察され、500 mg/kg では全く下痢が観察されなかった。

そこで、大量に PDA を分取するのは困難であったため、PDA を高濃度 (約 80%) 含有する抽出画分を用いて、食物アレルギーに及ぼす影響を検討した。その結果、コントロール群では殆どのマウスで下痢が観察され、PDA 抽出画分を投与した群では著しい胃改善効果は観察されなかった。今回 PDA がドッカツエキスより多く含まれる抽出画分を用いたが、食物アレルギーに対する効果が観察されなかった。PDA の含量が高くなったために、溶解性の問題が生じた可能性が考えられた。今後 PDA の投与方法等を検討し、再度効果を検証する予定である。また、他の PA, AA, BCX についても同様な検討を行う予定である。

(4) RAR アゴニストのスクリーニングの結果、活性を示した生薬として、ドッカツ、ソウハクヒ、ジコッピ、カンゾウ、サフラン、マンケイシなどを見出した。そこで、ジコッピ、マンケイシから RAR アゴニストの単離を試みた。しかし、最終的に RAR アゴニストの単離はできなかった。原因としては、使用した生薬のロット差やメーカーの違いにより含量が異なること、精製を進めても活性が濃縮できないなどの問題点があり、構造解析に必要な量の化合物が得られなかった。

(5) 本研究で見出した新規 RAR アゴニストの含有抽出画分に食物アレルギーの予防・改善作用が観察されなかったため、RAR アゴニストの新たな利用方法として、ATRA で報告されている抗肥満、抗糖尿病作用を脂肪細胞の分化抑制作用に焦点を絞り検討した。ATRA は

これまでに脂肪前駆細胞の分化を抑制することが報告されている。そこで、BCX も同様に脂肪前駆細胞の分化を抑制するかを、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化に及ぼす効果を ATRA と比較しながら検討した。BCX は 3T3-L1 前駆脂肪細胞において RAR 標的遺伝子の *RAR γ 2*、*CRABP1*(cellular retinoic acid-binding protein II)の mRNA の発現を誘導し、それらの発現は RAR アンタゴニストで抑制された。すなわち BCX は RAR アゴニストとして機能することが明らかになった。BCX は 1, 5, 10 μ M の濃度で用量依存的に 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化増殖を抑制し、その作用は RAR のアンタゴニストで阻害された。すなわち、BCX は RAR を介して 3T3-L1 前駆脂肪細胞の抑制することが新たに明らかになった。また、CBX は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化初期に ATRA とは異なる機序で作用していることがわかり、現在さらに詳細に検討している。脂肪組織における脂肪細胞の肥大化には、炎症性細胞、免疫細胞が複雑に関与した低強度の持続的な炎症が重要な役割を果たしており、BCX の RAR を介した免疫系への抑制的な作用の関与も考えられ、引き続き研究を進めている。

(6) 本研究で生薬の品質に関して興味ある知見を得たので報告する。富山大学から提供を受けた生薬熱水抽出エキスを用いて RAR アゴニストのスクリーニングを行った。その結果、マンケイシにコントロールの 3 倍以上の活性を見出した。そこで大量に抽出液を調製するために生薬を数社から購入し活性を検討したところ、U 社のマンケイシの熱水抽出エキスだけに活性を見出し、他 3 社のマンケイシの熱水およびメタノール抽出エキスには全く活性を見出せなかった。活性があったのは日本 U 社の日本新潟産のマンケイシであったのに対し、活性がなかった 3 社のマンケイシは全て中国広西産であった。本研究ではマンケイシからの RAR アゴニストの単離に成功はしなかったが、生薬を漢方方剤として、あるいは、それ単独で使用する場合、成分の詳細な解析と少なくとも生薬の有効性を裏付ける薬効を示す活性成分の解析は、生薬や漢方方剤の有効で安全な使用のためには重要であると考えられた。

(7) 考察：本研究では、RAR アゴニストの探索研究を通して多くの RAR アゴニストを得ることができなかった。特にいくつかの生薬エキスで、カラムで分画しても活性が濃縮されず、同じような構造を持った多くの化合物の集合体であるエキスでは起こりうる現象であろうと考えられた。また、分画すると活性が低くなる場合もあり、これらは RAR に対するアゴニストを含むだけではなく、RAR の調節作用(RAR の構造を修飾するような活性)を有する化合物も存在しており、それらの混合物ではより強い活性を示し、分画した後では活性が低下した可能性が考えられた。単一の活性本体を同定するのが天然物化学の常

法であるが、新しい安全性の高い薬物の開発には、RAR アゴニストだけではなく、RAR を複雑に調節する複数の化合物の存在を考慮しながら、単離同定を進める必要もあるのではないかと本研究を通じて感じた。

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 2件)

Tanabe Hiroki, Yasui Tomohiro, Kotani Hiroshi, Nagatsu Akito, Makishima Makoto, Anagaya Sakae, Inoue Makoto. Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 査読有、vol.22. 3204-3212 (2014).

Shirakura Yoshiyuki, Takayanagi Katsuhiko, Mukai Katsuyuki, Tanabe Hiroki, Inoue Makoto. β -Cryptocanthin suppresses the adipogenesis of 3T3-L1 cells via RAR activation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 査読有、vol.57, 426-431 (2011).

[学会発表](計 2件)

田邊宏樹、小谷仁司、白倉義之、向井克之、井上誠、ククリプトキサンチンによる脂肪細胞分化抑制の作用機序解析、日本生薬学会第 58 回年会、2011 年 9 月 24 日(東京)。

田邊宏樹、小谷仁司、安井友浩、野口教好、榎島誠、井上誠、漢方方剤常用生薬由来レチノイン酸受容体アゴニストの探索と有用性の解析。第 28 回和漢医薬学会学術大会、2011 年 8 月 27 日(富山)。

[その他]

ホームページ等

愛知学院大学薬学部薬用資源学講座

http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med_res/top.html

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

(3) 連携研究者

永津 明人 (NAGATSU, Akito)

金城学院大学薬学部・教授

研究者番号：70244572

田邊 宏樹 (TANABE, Hikoki)

愛知学院大学薬学部・講師

研究者番号：10450606

小谷 仁司 (KOTANI, Hitoshi)

武蔵野大学薬学部・助教
研究者番号：10594640