

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

愛知学院大学

論 文 提 出 者	王 蔚
所 属 研 究 室	薬用資源学講座
論 文 題 目	マメ科植物（サンズコン）から単離した RXR アゴニストの生物活性に関する研究：アルツハイマー病治療薬への応用の可能性

マメ科植物（サンズコン）から単離した
RXR アゴニストの生物活性に関する研究：
アルツハイマー病治療薬への応用の可能性

【目的】

アルツハイマー病(AD)は、認知症の要因の一つとして広く知られている疾患であり、高齢化に伴う罹患者の増加は大きな社会問題となっている。AD は加齢とともに進行し、記銘力障害や記憶障害などを主とする中核症状と、幻覚、妄想、抑うつ、攻撃行動、徘徊などの周辺症状あるいは Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD) と呼ばれる行動・心理症状を発現する。AD の発症機序としては「アミロイドカスケード仮説」がよく知られており、アミロイドベータ(A β)タンパク質の脳内異常蓄積が引き金となり、炎症反応の活性化及び神経伝達障害などが連鎖的に惹起され、最終的に神経細胞内のタウタンパク質の異常なリン酸化による神経細胞死が起こると考えられてきた。また、最近、以前から提唱されていた「脳炎症仮説」並びに「感染症仮説」に新たなエビデンスが加わり、細菌由来物質がミクログリアの活性化を介して慢性的脳炎症を誘引し、認知機能障害を引き起こすことが報告された。しかし、これらの仮説に基づいて開発されたAD 治療薬候補は、いずれもその有効性が証明されておらず、これらの仮説の妥当性は疑問視されている。一方、AD 患者では、症状が顕在化する数十年前の段階において、低強度慢性炎症によると思われる病理学的変化が観察されており、AD 発症前の無症候期からの薬物治療が重要と考えられるようになってきた。

核内受容体は、リガンド依存的に遺伝子の発現を制御する転写因子である。細胞の増殖分化、脂質代謝、骨代謝、免疫応答などの生理機

能を調節する作用を有することが知られており、心血管系疾患、糖尿病、ADなど多くの疾患に対する創薬の標的として注目されている。特に、核内受容体スーパーファミリーのサブファミリー1に属するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)、肝臓X受容体(LXR)、レチノイン酸受容体(RAR)などは、不飽和脂肪酸、酸化ステロール、レチノイン酸などの脂溶性低分子化合物あるいはそれらの代謝産物を内在性リガンドとして活性化される。本研究で注目したレチノイドX受容体(RXR)は、RXR同士のホモダイマーとしてのみでなく、サブファミリー1に分類される核内受容体をパートナーとしたヘテロダイマーとしても存在する特徴的な受容体である。従って、RXRはパートナーとなる核内受容体毎に異なる応答配列に結合し、様々な下流遺伝子の転写を調節していることが判明している。実際に各種RXRアゴニストは動脈硬化症、2型糖尿病、自己免疫疾患などの疾患モデルマウスに対して有効性が確認されている。それらの作用はPPAR、LXR、RARなどとのヘテロダイマーの活性化を介して、あるいは、ホモダイマーの活性化を介して発現していると考えられている(Fig. 1)。また、PPAR、LXR、RAR、RXRなどのアゴニストがADモデルマウスに対して改善作用を示すことが最近報告され、その作用はA β の蓄積抑制、神経伝達の改善、神経細胞の再生、脳内炎症の抑制など、いくつかのカテゴリーに分類されている。

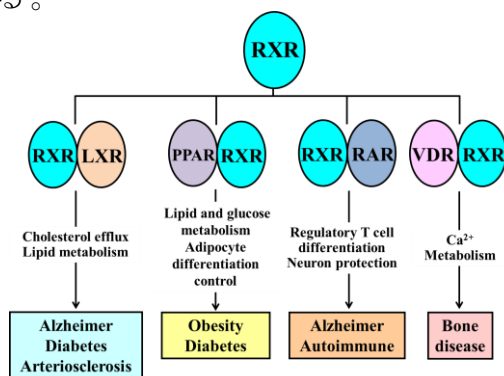


Fig. 1. 核内受容体アゴニストの疾患への応用

RXR アゴニストであるベキサロテン(BEX)は国内では皮膚 T 細胞リンパ腫の治療薬として使用されており、最近、AD モデルマウスにおいて A β 蓄積の減少と認知機能の改善作用を有することが報告され、AD 治療薬として期待された。しかし、BEX の A β 蓄積と認知機能の改善作用は、他のいくつかの臨床試験及び動物実験で確認できず、AD に対する BEX の有効性は依然として不明のままである。さらに、BEX の臨床応用は高トリグリセリド血症、甲状腺機能低下症、肝不全など重篤な副作用を示すため、生活習慣病等の治療への使用は現在認められていない。しかし、BEX は神経シナプスの生長に関係する遺伝子の発現を制御することや、A β によるミクログリアの活性化を阻害することにより炎症性サイトカイン産生を抑制することで、行動障害を改善することが報告されており、RXR アゴニストの AD への有効性に関するさらなる研究が必要とされている。

当研究室では、これまでに中国の本草書に記載されており、解毒、抗炎症、抗腫瘍を目的として使用されるサンズコン(マメ科植物 *Sophora tonkinensis* の根)から RXR アゴニストとして 2 種類のプレニルフラバノン(SPF1 及び 2)を同定した(Fig. 2)。SPF1 及び 2 の RXR に対する EC₅₀ 値はそれぞれ 0.77 μ M と 0.78 μ M であり、これまでに報告さ

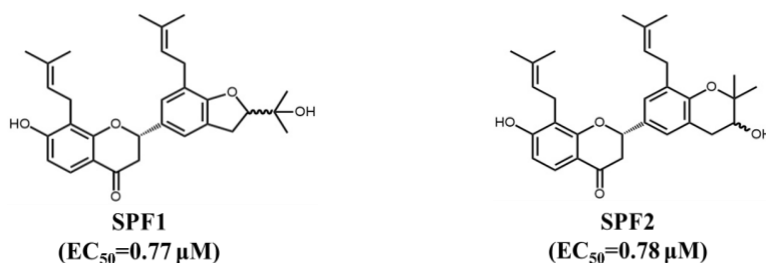


Fig. 2. サンズコンから単離したプレニルフラバノン

れている天然由来 RXR アゴニストの中で最も強い活性を持つ化合物

であった¹⁾。そこで本研究では、SPF1 及び 2 の AD への応用を検討することを目的に、これまでに明らかにされている AD の発症機序に着目した研究を行った。

【方法・結果】

RAW264.7 細胞を SPF1 または BEX (10 μ M) で 8 時間処理した後の mRNA 発現量を DNA マイクロアレイ法で解析したところ、SPF1 により 1.5 倍以上 mRNA 発現量が増加した遺伝子は 259 種類、BEX により 2 倍以上に mRNA 発現量が増加した遺伝子は 205 種類あった。そのうち、両化合物で共に増加した遺伝子は 67 種類あった。また、SPF1 と BEX では、誘導される炎症関連遺伝子の発現量に差異が認められた。SPF1 では growth differentiation factor 15 (GDF15) や activating transcription factor 3 (ATF3) などの抗炎症活性と関係する遺伝子が BEX に比べ特異的に誘導された。

次に、SPF1 及び 2 の抗炎症作用を検討した。予め SPF1 及び 2 で処理した RAW264.7 細胞では、LPS による炎症性サイトカイン IL-1 β 及び IL-6 の mRNA 量の増加が、無処理細胞に比べ抑制された。しかし、RXR アゴニスト活性を示さない類似化合物 sophoranone には、上記の抑制作用は観察されなかった。また、SPF1 及び 2 は TNF- α により誘導される IL-1 β 及び TNF- α mRNA の発現も同様に抑制した。さらに、SPF1 は LXR アゴニスト T0901317 の共存下で、より強い IL-1 β 及び IL-6 mRNA の発現抑制作用を示した。

SPF1 の抗炎症作用のメカニズムを詳細に検討するため、前述の DNA マイクロアレイの解析において発現の増加が認められた ATF3 遺伝子に着目した。SPF1 が ATF3 mRNA の発現に及ぼす影響を RT-qPCR 法に

より確認したところ、SPF1は有意にATF3 mRNA量を増加させ、その作用はT0901317によってさらに増強された。ATF3は炎症性転写因子NF- κ Bの核内移行及び転写を阻害することが報告されていることから、NF- κ Bの核内移行を免疫染色法により検証した。その結果、SPF1は有意にNF- κ Bの核内移行を抑制した。

次に、A β が惹起する神経細胞様PC12細胞のアポトーシスに対するSPF1及び2の効果を検討した。その結果、SPF1及び2並びにBEXはA β が誘導するアポトーシスを抑制した。その抑制作用はRXRアンタゴニストPA452で阻害された。さらに、SPF1及び2の抗アポトーシス作用はT0901317の共存下で増強し、ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)の発現量と相関していた。そしてABCA1の機能的阻害作用が報告されているシクロスポリンAによりSPF1及び2の抗アポトーシス作用は抑制された。

最後に、DNAマイクロアレイの解析においてSPF1により発現の増加が認められたメタロチオネイン(MT)2について検討した。SPF1及び2はMT2 mRNAの発現を増加させ、その作用はPC12細胞、Caco-2細胞、腹腔マクロファージでも観察された。さらに、SPF1によるMT2 mRNAの発現誘導作用はLXR及びRARアゴニストの共存下で増強された。興味深いことに、SPF1とSPF2はMT2 mRNAの発現を誘導することが知られている亜鉛の作用を著しく増強させた。

【考察】

本研究の結果より、SPF1及び2は主にRXR/LXRヘテロダイマーを活性化することでマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制すると考えられた。同時に、SPF1及び2によるRXR/LXRヘテロダイマー

の活性化は ATF3 の発現を増大させた。ATF3 は、NF- κ B の核内移行の阻害及び NF- κ B による炎症性サイトカインの転写を阻害することにより、抗炎症作用を示すことが報告されている。本研究においても、NF- κ B の核内移行の阻害が確認されたため、SPF1 及び 2 の抗炎症作用には ATF3 が寄与している可能性が示唆された。興味深いことに、BEX は ATF3 を誘導せず、また、SPF1 と BEX が示す抗炎症活性を有する遺伝子の発現プロファイルには大きな差異があるため、SPF1 は BEX とは異なる抗炎症メカニズムを有する可能性が考えられた。これまで RXR/LXR ヘテロダイマーを介した抗炎症作用の報告は少なかったが、今回新たな抗炎症作用の機序が示唆され、RXR アゴニスト及び LXR アゴニストの AD を始めとする慢性炎症性疾患への応用が期待される。

さらに本研究では、A β によって惹起された PC12 細胞のアポトーシスが、SPF1 及び 2 並びに BEX で抑制されたことより、RXR アゴニストは神経細胞に対して細胞保護作用を示すことが示唆された。また、SPF1 及び 2 は ABCA1 を誘導し、その作用は LXR アゴニストで増強されたことより、神経細胞における SPF1 及び 2 の作用も主に RXR/LXR ヘテロダイマーを介したものであると考えられた。ABCA1 は細胞膜上の脂質ラフトの脂質組成を調節し、炎症シグナルの細胞内への伝達を阻害することが報告されている。すなわち、SPF1 及び 2 の抗アポトーシス作用は、主に RXR/LXR ヘテロダイマーの活性化を介して誘導された ABCA1 が、A β によるアポトーシスシグナルを何らかの形で阻害している可能性が推察された。

また、SPF は生体内で過剰な重金属の解毒、活性酸素種(ROS)の消去、炎症制御など様々な生理作用を有する MT1/2 を誘導し、その作用は RXR/LXR 及び RAR/RXR ヘテロダイマーを介した作用であると考えら

れた。さらに、SPFはMT1/2を誘導することが知られている亜鉛の作用を増強することがわかった。MT1/2は、ADモデルマウスでROSを消去することによりA β による神経毒性を軽減させることや、A β が誘導するミクログリアの活性化を抑制することが報告されており、LXRアゴニスト、RARアゴニストあるいは亜鉛との共存下でMT2を強く誘導するSPFはADへの応用が期待される。

【結論】

1. SPF1及び2は、マクロファージ系細胞に対して、炎症性サイトカインの産生抑制作用を示した。その作用の一部に、RXR/LXRヘテロダイマーを介して発現誘導されたATF3によるNF- κ Bの核内移行の阻害が関与していることが考えられた。
2. A β が惹起するPC12細胞のアポトーシスに対して、SPF1及び2はアポトーシスを抑制し、神経細胞保護作用を有することがわかった。また、その作用はLXRアゴニストにより増強される一方で、ABCA1の機能的阻害剤により抑制されたことより、SPF1及び2はRXR/LXRヘテロダイマーを介しABCA1を誘導することにより、A β の細胞毒性からの細胞保護作用を示す可能性が推察された。
3. SPF1及び2は、RAW264.7細胞を始め数種の細胞でMT2 mRNAの発現を誘導した。その作用はLXRアゴニスト、RARアゴニスト及び亜鉛により増強され、MT2が持つ各種の生理作用の増強につながることを示唆された。
4. 本研究では、天然由来RXRアゴニストであるSPF1及び2の生物活性を詳細に検討し、これまでに報告のないRXRあるいはRXR/LXR及びRAR/RXRヘテロダイマーを介した生物活性を明らかにした。今後、

さらに有用な RXR アゴニストを探索するとともに、それらの AD への応用を目指した研究が期待される。

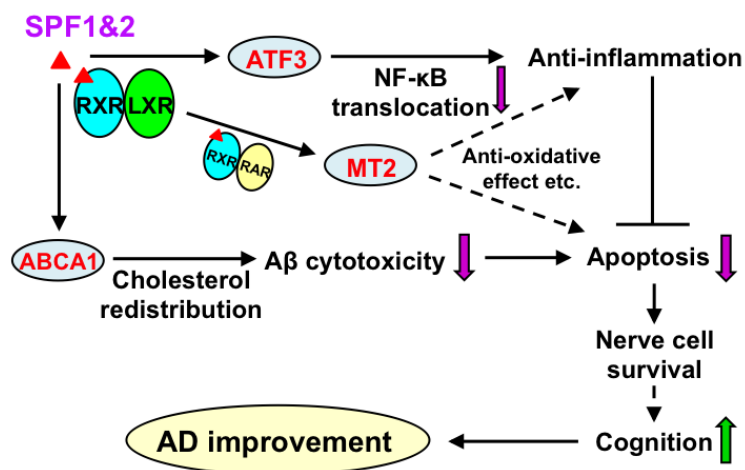


Fig. 3. SPF1 及び 2 が示した生物活性

【参考文献】

- 1) Inoue M, Tanabe H, Nakashima K, Ishida Y, Kotani H. Retinoids Isolated from *Sophora tonkinensis* with a Gene Expression Profile Distinct from the Synthetic Retinoid Bexarotene. *J. Nat. Prod.*, **77**, 1670–1677 (2014).
- 2) Wei Wang, Ken-ichi Nakashima, Takao Hirai, Makoto Inoue. Neuroprotective effect of naturally occurring RXR agonists isolated from *Sophora tonkinensis* Gagnep. on amyloid-β-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Nat. Med.*, in press.
- 3) Wei Wang, Ken-ichi Nakashima, Takao Hirai, Makoto Inoue. Anti-inflammatory effect of naturally occurring retinoid X receptor agonists isolated from *Sophora tonkinensis* Gagnep via RXR/LXR heterodimers. submitted.