

核内受容体PPAR δ リガンドの探索と筋委縮への応用

092A06 勝川 千尋

天然薬物作用学講座

【目的】

生体で最大のエネルギー消費器官である骨格筋は肝臓とともにエネルギー代謝の中心となる臓器である。骨格筋にはミトコンドリアが豊富に存在しており、脂肪酸 β 酸化能、糖代謝能が高く、生体内に取り込まれた糖質の80%以上は骨格筋によって代謝を受ける。しかし、近代化社会における運動不足は骨格筋の機能低下、委縮を引き起こし、肥満症、高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病に罹患しやすくしている。また、高齢化による筋力低下及び骨格筋量の減少も生活習慣病の患者を増していると考えられる。特に人では年齢が50歳を過ぎた辺りから急激に筋量が減少する筋委縮がみられる。この筋委縮の原因のひとつとして、ミトコンドリア機能の低下が考えられている。ミトコンドリアは運動によって活性化されるが、逆に、運動不足や座位姿勢の生活習慣により徐々に機能低下が引き起こされる。このミトコンドリアの機能維持、活性化に重要な役割をしているものとしてPGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)- γ coactivator-1)が知られており、実際にPGC-1 α の活性化により筋委縮が改善されるという報告がある。このPGC-1 α の誘導と活性化に関与する因子のひとつとして核内受容体PPAR δ が知られている。PPAR δ は各臓器に広く存在しているが、主に骨格筋で脂肪酸 β 酸化、を亢進し、エネルギーの脱共役を行っている転写因子である。PPAR δ のアゴニストによる活性化は肥満改善、運動の耐久力の増強、インスリン感受性の増加、さらには炎症の抑制など多面的効果が報告されている。そこで、我々はPPAR δ アゴニストの有用性に着目して、漢方方剤210処方に繁用される生薬からPPAR δ アゴニストを探索し、活性成分の単離・同定を試みた。さらに、PPAR δ アゴニスト活性を持つ生薬が筋委縮モデルマウスに及ぼす効果を検討した。

【方法・結果】

ヒト胎児腎細胞HEK293にPPAR δ 発現プラスミド及びluciferase遺伝子のの上流にPPAR response elementを組み込んだレポータープラスミドをco-transfectionしたレポ-

ターアッセイを使用し、96種類の生薬エキスを終濃度100 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、PPAR δ の活性化能を指標にスクリーニングを行った。その結果、カロニン、インチンコウ、イレイセンの順に高いPPAR δ アゴニスト活性を見出した。これらの活性はPPAR δ 合成アゴニストであるGW501516の1nM程度の活性であった。そこで、活性の最も高かったカロニンからMeOH抽出、有機溶媒による液液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLCにより、PPAR δ アゴニスト活性を持つ化合物を単離した。さらに、その化合物を ^1H 及び ^{13}C -NMRで解析し、二重結合を2つと水酸基を1つ持つ水酸化不飽和脂肪酸であることを推測した。次に、PPAR δ アゴニストを含有するカロニンの有用性を、デキサメタゾン誘導筋委縮モデルマウスの筋委縮に対する改善作用を調べることにより検討した。デキサメタゾン誘導筋委縮モデルマウスは毎日1回、1週間 デキサメタゾンを5 mg/kgの濃度で皮下注射し作製した。その後、カロニンを粉末餌に混ぜ、2週間服用させ、ヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋の重量を測定した。さらに、PGC-1 α 、NRF-1 (nuclear respiratory factor-1)、TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A)など骨格筋、ミトコンドリアの機能調節に関与している遺伝子のmRNAレベルをリアルタイムRT-PCRで測定した。その結果、デキサメタゾン投与による体重減少は交感神経作動薬クレンブテロール投与群では改善されたが、カロニン投与群では改善されなかった。しかし、デキサメタゾン投与による筋重量の減少はカロニン投与群で改善する傾向がみられた。さらに、PGC-1 α 、NRF-1、TFAMなどのミトコンドリア機能に関与する遺伝子のmRNAレベルはカロニン投与群で発現が上昇する傾向がみられた。

【考察】

生薬エキス中のPPAR δ アゴニストのスクリーニングによりPPAR δ アゴニスト活性を見出したカロニンには、これまでに解熱、鎮咳、利尿作用が報告されている。しかし、本研究で検討した筋委縮改善作用や筋肉の代謝改善

作用などに関する報告はない。本研究でカロニンが、脂肪酸の β 酸化系の活性化、ミトコンドリアの生成などに関与しているPGC-1 α などの遺伝子のmRNAレベルを上昇させ、筋委縮の改善傾向を示したことより、カロニンの新しい作用として骨格筋の機能調節作用が示唆された。また、PPAR δ アゴニストとして水酸化不飽和脂肪酸を単離したが、これまでに本研究室では同種の水酸化不飽和脂肪酸をヨクイニンより単離しており、植物の種子に多く存在する成分かもしれない。脂肪酸は50~100 μ M以上の高濃度でPPAR α 、 δ 、 γ のアゴニストになることが知られているが、水酸化されることにより強力なPPARアゴニストになることを我々はすでに報告している。さらに、PPAR δ アゴニストに抗肥満作用、インスリン抵抗性の改善作用、抗動脈硬化作用の報告があることから、カロニンにはミトコンドリア β 酸化系の活性化による脂肪燃焼の亢進により生活習慣病を予防、改善する可能性も期待される。本研究で行った核内受容体リガンド活性を指標としたスクリーニングは、核内受容体の作用に基づき生薬の新しい応用を考えることができ有益であると考えられる。さらに、様々な核内受容体リガンド活性のスクリーニングデータの蓄積は、様々な疾患の発症機序の解析データに基づき、既存の漢方方剤より治療効果の高い生薬の組合せを持った漢方方剤を作製し、治療に応用することを可能にすると考えられ、今後の研究が期待される。