

天然由来レチノイン酸受容体アゴニストの探索と機能解析

092A15 安井 友浩

天然薬物作用学講座

【目的】

我々は生存するために炭水化物、たんぱく質、脂質、ミネラル、ビタミンと5つの栄養素を必要とする。中でもビタミンは、ミネラルと合わせて微量栄養素とも呼ばれ、生体機能を補助する役割を担っている。この機能のうち、成長促進、生殖等の機能維持、皮膚や粘膜などの上皮組織の正常保持などにビタミンAが関与することが知られている。その主な作用は核内受容体であるretinoic acid receptor (RAR)を介したものである。RARは、ビタミンAの代謝物質であるall-trans-retinoic acid (ATRA)などのレチノイドをリガンドとする核内受容体であり、種々の細胞の分化増殖や形態形成を制御している。ATRAや合成レチノイドは臨床において急性前骨髄球性白血病の治療に用いられているが、催奇形性やレチノイン酸症候群などの副作用があり、その使用には制限がある。しかしながら、最近の研究でATRAが制御性T細胞の分化を誘導することや腸管免疫の維持に重要な役割を果たすことなどが明らかにされ、免疫系を巧妙に制御することにより今まで治療が難しいとされていた自己免疫疾患などへの応用も期待される。そこで、このようなRARリガンドの有用性に着目し、漢方方剤常用生薬より副作用が少ないRARリガンドの探索と解析を行った。

【方法・結果】

ルシフェラーゼ遺伝子上流にRAR response elementを組み込んだレポータープラスミドとRAR発現プラスミドをHEK293細胞に導入したレポーターアッセイ系でRARリガンドのスクリーニングを行った。試験薬としては漢方処方210種類に常用される生薬96種類のMeOH抽出エキスを用いた。その結果、コウカ・サンシシ・ジコッピ・ソウハクヒ・ドクカツなどに転写活性化が認められた。一方、インチンコウ・キョウカツ・ビヤクシなどに転写抑制が認められた。そこで最も強い転写活性が確認された『ドクカツ』より転写活性化能を指標に活性成分の単離・同定を行った。活性成分はMeOH抽出、液液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相H

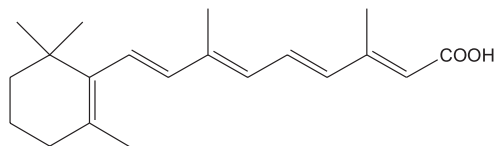
PLCを用いて単離した。さらに、NMRによる構造解析を行い、活性成分としてピマラン型ジテルペン的一种であるpimaradienoic acid (1)を同定した。化合物(1)は濃度依存的にRARを活性化し、その活性は 10^{-5} Mで 10^{-8} M ATRAよりも強かった。またRARアンタゴニストLE135によってRAR転写活性が完全に抑制されたことから、RARのアゴニストであることがわかった。次に化合物(1)が他の核内受容体を活性化するか比較検討したところ、retinoid X receptor、liver X receptor、peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) δ は活性化しなかったが、PPAR γ は弱いながら活性化した。また、化合物(2)と構造が類似した化合物との構造活性相関を検討したところ、abietic acid(2)が化合物(1)よりも強い活性を有することを見出した。次に化合物(1)の細胞機能に及ぼす作用をヒト白血病細胞HL-60細胞で検討した。HL-60細胞は、ATRAによりRARを介して顆粒球に分化することが知られており、顆粒球に分化する際に増加する活性酸素をNBT法で測定することによって分化誘導の有無を確認することができる。化合物(1)、(2)は共に活性酸素の産生を増加させたことから、HL-60細胞の分化を誘導することが明らかになった。

【考察】

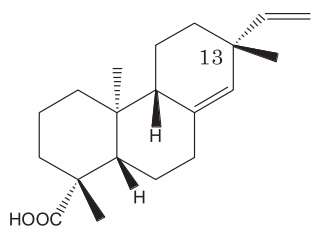
今回ドクカツよりRARアゴニストとして化合物(1)を単離同定した。さらに、類似化合物である化合物(2)は(1)よりも強いRAR転写活性があることを見出した。しかし、これらの化合物のRARアゴニストとしての活性はATRAに比べるとかなり弱いものであった。化合物(1)及び(2)とATRAの構造を比較するとカルボン酸を持つジテルペンである以外は構造が大きく異なっており、これらの化合物がRARアゴニストとして働くことは大変興味深い。また、化合物(1)と(2)の活性の相違はC13位の側鎖の若干の違いやカルボン酸の立体配置の違いによっていえると考えられる。今回RARリガンド活性を見出した化合物(1)及び(2)はこれまでに報告されている天然由来のレチノイドや合成レチノイドとは構造が大きく異なりそ

の有用性が期待される。また漢方方剤常用生薬の成分からこのような活性成分を見出せたことは、既存のレチノイドが持つ副作用を回避できる可能性が考えられ大変興味深い。最近、合成RARアゴニストAm80に炎症や自己免疫疾患に関与するIL-6の発現を抑えることや制御性T

細胞を誘導することが報告されている。今後、化合物(1)と(2)の制御性T細胞への作用や腸管免疫への作用など様々な免疫機能に及ぼす作用を検討していくことで免疫疾患の予防・治療への応用が可能になると考えられる。

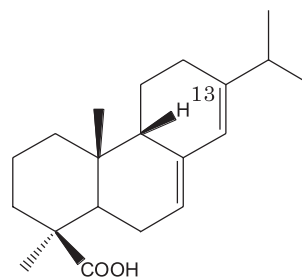


all-*trans* retinoic acid(ATRA)



pimaradienoic acid

compound (1)



Abietic acid

compound (2)