

# 天然物の構造をモチーフに開発した PPAR $\delta$ -RXR アゴニストの機能性に関する研究

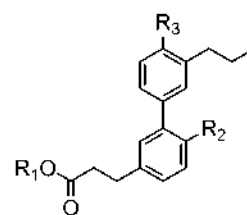
中島 健一

(医療生命薬学研究ユニット)

## 【背景・目的】

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) とレチノイド X 受容体 (RXR) は、いずれも核内受容体であり、相互にヘテロ二量体 (PPAR $\delta$ -RXR) を形成し、骨格筋や肝臓などに存在している。PPAR $\delta$  は、生体内で糖代謝や脂質代謝に関与しており、そのアゴニストにはインスリン抵抗性改善や非アルコール性脂肪性肝疾患改善などの効果が報告されているが、臨床応用には至っていない。一方で、パートナーとなる RXR は、PPAR $\delta$  に限らず、PPAR のサブタイプである PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  のほか、ファルネソイド X 受容体、肝臓 X 受容体、レチノイン酸受容体、ビタミン D 受容体など、種々の核内受容体とヘテロ二量体を形成して作用するほか、2分子の RXR で構成されたホモ二量体も存在することが報告されている。臨床では、合成 RXR アゴニストであるベキサロテン (BEX) が、皮膚 T 細胞リンパ腫の経口治療薬として用いられている。

最近、我々は PPAR $\delta$ -RXR ヘテロ二量体を高度に活性化する化合物として、6-hydroxy-3'-propyl propyl-[1,1'-biphenyl]-3-propanoic acid ethyl ester (6OHE) を報告した。6OHE は、当研究室で見出した天然由来 RXR アゴニストである honokiol 及び magnaldehyde B の構造を基に見出した合成リグナンであり、RXR ホモ二量体 (RXR-RXR) を極めて低濃度で活性化する作用を有していた (EC<sub>50</sub>: 12.7 nM; E<sub>max</sub>: 71.3%)。さらに、6OHE は、PPAR $\delta$ -RXR ヘテロ二量体に対して、合成 PPAR $\delta$  アゴニストである GW501516 (GW) よりも約 1.9 倍強い最大活性を示した。同化合物は、PPAR $\alpha$ -RXR 及び PPAR $\gamma$ -RXR ヘテロ二量体に対しては、それぞれフルアゴニストである WY14643 (WY) 及び Rosiglitazone (RGZ) の 22% 及び 14% の最大活性化率しか認めなかったことから、PPAR $\delta$ -RXR ヘテロ二量体を選択的に強く活性化するといえる。一方で、6OHE は、典型的な PPAR $\delta$  アゴニストとは異なり、PPAR $\delta$  単量体をほとんど活性化しないことも判明している。従って、6OHE による PPAR $\delta$ -RXR ヘテロ二量体の活性化には、6OHE の RXR 部分への作用が大きく関わっており、既存の化合物とは異なる活性化様式を示すことが示唆されたため、その生体に対する機能について興味を持たれた。過去の研究において、PPAR は、脂肪細胞や骨芽細胞など、間葉系幹細胞から派生する細胞の分化を調節することが明らかとなっている。そこで本研究では、将来の応用研究の方向性を見出すため、6OHE 及びその類縁体が脂肪細胞分化及び骨芽細胞分化に与える影響を培養細胞レベルで検証した。



6OHE : R<sub>1</sub>=Et, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H  
6OHA : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H  
4'OHE : R<sub>1</sub>=Et, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH

## 【結果及び考察】

### 1. 6OHE 及びその類縁体が脂肪細胞分化に与える影響

脂肪組織に豊富に発現する PPAR $\gamma$  は、脂肪細胞の分化や機能調節に重要な役割を果たすことが判明しており、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジンジオン系薬剤の標的分子となっている。一方で、PPAR $\delta$  に関しても、脂肪細胞の分化やアディポカインの生産・分泌の調節に関与していることがわかっている。本研究では、6OHE 及びその類縁体である 4'OHE について、マウス繊維芽細胞株 3T3-L1 細胞の脂肪細胞様細胞への分化に与える影響を検証した。4'OHE は、6OHE ほど RXR アゴニスト作用は強くないが、PPAR $\gamma$ -RXR ヘテロ二量体に対して強い活性化作用を示す化合物である。3T3-L1 細胞は、細胞培養液に、イソブチルメチル

キサンチン (IBMX)、インスリン、デキサメタゾン を添加し、2日毎にインスリン入りの維持培地に交換することで分化誘導した。各化合物は、分化開始から細胞の回収まで2日おきに培地交換のタイミングで添加した。一部を除き、染色及び細胞の回収は分化6日目に行った。

分化6日目において、脂肪滴を Oil Red O 溶液を用いて染色した結果、4'OHE は、PPAR $\gamma$  アゴニストである RGZ と同様に顕著に細胞への脂肪滴蓄積を促進したが、6OHE は PPAR $\delta$  アゴニストである GW とは反対に脂肪滴蓄積を抑制した。RT-PCR 法により、脂肪細胞に関連する遺伝子であり PPAR $\gamma$  の標的遺伝子でもある *Glut4*、*Hsl*、*Elovl3*、*Adipoq* の mRNA 量においても同様の知見が認められた。一方、同じく PPAR $\gamma$  の標的遺伝子である *Angptl4* 及び *Pdk4* の mRNA 量については、6OHE による減少は認められず、PPAR $\gamma$  アゴニスト添加時と同様の増加が認められた。

4'OHE の脂肪細胞分化誘導作用は、PPAR $\gamma$  アゴニスト作用によるところが大きいと考えられたが、6OHE が既存の PPAR $\delta$  アゴニストと相反し、脂肪細胞分化抑制作用を示したことに興味を持った。そこで、6OHE の強力な RXR アゴニスト作用と脂肪細胞分化抑制作用の関連性を探るため、同じく RXR アゴニストである BEX について同様の実験を行い、その結果、BEX も 6OHE と同様の作用を示した。従って、6OHE の脂肪細胞分化抑制作用は、RXR アゴニスト作用によるものである可能性が高いと考えられた。また、6OHE の加水分解体である 6OHA についても、ほぼ同様の作用を示すことを確認した。マウスを用いた薬物体内動態実験の結果、経口で投与した 6OHE は、血中では完全に 6OHA となって検出されることがわかっている。

さらに、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとも呼ばれる PPAR $\gamma$  及び CEBP $\alpha$  のタンパク質発現量をウエスタンブロッティング法により測定した。6OHE 及び 6OHA は、いずれも BEX と同様に PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2) 及び CEBP $\alpha$  (p42, p28) の発現を顕著に抑制することが判明した。次に、RXR アゴニストによる分化抑制が、分化過程のいずれの段階に影響しているか検証するため、6OHA 及び BEX 添加時の PPAR $\gamma$ 2 及び CEBP $\alpha$  mRNA の経時変化を RT-PCR 法により検証した。その結果、6OHA 及び BEX ともに、分化開始4日後には化合物非処理の細胞に対して有意な差が確認された。従って、RXR アゴニストは、脂肪細胞への分化の初期段階に影響を与えている可能性が高いと考えられた。

## 2. 6OHE 及び 6OHA が骨芽細胞分化に与える影響

過去の研究報告より、PPAR $\gamma$  アゴニストは前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を抑制する一方で、PPAR $\delta$  アゴニストは促進することが報告されている。本研究では、アスコルビン酸-2リン酸及び  $\beta$ -glycerophosphate を培養液に添加することでマウス骨芽細胞様細胞に分化する MC3T3-E1 細胞を用いた。各化合物は、分化開始から細胞の回収まで3日おきに培地交換のタイミングで添加した。

分化15、18、21日後において、それぞれアリザリンレッド染色により石灰化を調べた結果、PPAR $\delta$ -RXR を活性化する 6OHE 及び 6OHA は、いずれの日数においても顕著に石灰化を抑制した。同時に、GW 及び BEX についても検証を行ったところ、それぞれ石灰化の促進と抑制、相反する作用を示した。また、骨芽細胞マーカーとして用いられる *Alp* 及び *Bglap2* (オステオカルシン2) の mRNA 量を RT-PCR 法により測定した。その結果、6OHE、6OHA、BEX により *Alp* 及び *Bglap2* mRNA 量は、分化処理を行っていない細胞と同程度に低値であったのに対し、GW を添加した細胞では化合物添加なしで分化させた細胞よりも有意に高かった。以上の結果より、6OHE 及び 6OHA は MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を抑制することを明らかとし、その抑制作用は RXR アゴニスト作用によるものである可能性が高いと考えられた。

参考文献: K. Nakashima et al., *ACS Chem. Biol.*, 2020, **15**, 1526–1534