

# 和漢薬由来核内受容体 Retinoic Acid Receptor (RAR) リガンドの探索研究

申請代表者 井上 誠 愛知学院大学大学院薬科学研究科 教授

## ■背景・目的

レチノイン酸は核内受容体 Retinoic acid receptor (RAR) を介して、細胞の増殖・分化、生体の恒常性維持、形態形成に関わる重要な役割を果たしている。さらに、レチノイン酸は免疫系において、ヘルパー T 細胞 (Th1/Th2 細胞) の活性化の制御や成熟 T 細胞の消化管へのホーミング制御に重要な役割を果たしているばかりではなく、最近、 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  制御性 T 細胞 (Treg) の誘導に必須の化合物であることが明らかにされた。実際に各種疾患モデル動物への Treg 細胞移入により、関節リウマチ、大腸炎、1 型糖尿病の発症が抑制されることが報告されている。漢方方剤には免疫調節作用を示すものが多くあるにも拘わらず、これまでに免疫系を抑制する和漢薬由来の低分子化合物に関する報告は殆どない。すなわち、漢方方剤の免疫調節作用を理解するためには、免疫系を抑制的に調節できる天然物の探索は非常に重要である。そこで今回、核内受容体 RAR がリガンドと一対一の厳格な特異性の下で遺伝子発現を調節しているのではなく、特異性が少々低い受容体として機能していることから、催奇形性や高脂血症の惹起などの重篤な副作用のために使用制限されているレチノイン酸に代わる天然由来 RAR リガンドの探索を計画した。

## ■結果・考察

今回、ヒト胎児腎臓細胞 HEK293 に、pCMX-hRAR-a RAR 発現ベクター、tk-bRE-Luc レポータープラスミド、pCMX-b-gal b-ガラクトシダーゼ発現ベクターをリン酸カルシウム法でトランスフェクションしたルシフェラーゼレポーターアッセイ系を使用して、富山大学から提供して頂いた生薬由来化合物セット 80 種と生薬エキスセット 120 種の RAR リガンド活性をスクリーニングした。その結果、化合物ではリモニン、センノシド A などに  $0.1 \mu\text{M}$  の濃度で若干の活性が見られた (Table I)。そこで、活性が若干観察された上位 7 つの化合物に関して、活性の濃度依存性を検討した。しかし、 $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1 \mu\text{M}$  の濃度では、それらの化合物に濃度依存的な活性は観察されなかった。これらの結果より、RAR の本来のリガンドである *all-trans*-レチノイン酸 (ATRA) と大きく構造の異なる化合物には RAR リガンド活性を見出すことはできなかった。なお、今回アッセイに使用した化合物の中で、使用した濃度で細胞死あるいは細胞の形態変化を誘導した化合物に関しては、RAR リガンド活性を測定できなかった (Table II)。

次に、生薬エキス 120 種類の RAR リガンド活性を  $1$ ,  $10$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  の濃度で測定した。その結果、マンケイシに最も強い活性を見出し、その活性は  $100 \mu\text{g/ml}$  で  $0.1 \mu\text{M}$  に匹敵するものであった (Table III, IV)。その他に、カンゾウ、サフラン、ダイオウ、チモ、ヨウバイヒ、トウキ、オウゴン、ビャクジュツなどに弱いながら活性が見出された。 $1$ ,  $10$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  の濃度で細胞毒性あるいは形態変化を誘導した生薬が 5 つあり、RAR リガンド活性は測定できなかった。活性が見出された生薬の含有化合物から、RAR リガンドとなりうる化合物に関して考察してみると、鎮痛、鎮痙、消炎の目的で使用されているマンケイシには、脂肪酸やフラボノイドの他にビタミン A 様化合物が含有されて

Table I. 天然物 80 種の RAR リガンド活性のスクリーニング

sample name	sample number	fold	SD
alisol A	3	0.29939	0.03169
alisol B	4	0.27508	0.05381
amygdalin	6	0.82868	0.01938
arbutin	7	0.81086	0.05191
astragaloside 4	8	0.74424	0.28144
atractylenolide 3	9	0.41393	0.07651
aucubin	10	0.87567	0.04106
baicalein	11	0.84886	0.02713
baicalin	12	0.63013	0.01764
barbaloin	13	0.74070	0.07735
bergenin	15	0.84081	0.03018
capillarisin	18	0.40405	0.01952
capsaicin	19	0.32111	0.04614
catalpol	20	0.98168	0.02332
(E)-cinnamic acid	21	0.98107	0.04583
dimethylesculetin	30	0.61351	0.01414
eleutherosideB	31	0.93746	0.05473
(-)-epigallocatechin gallate	32	0.81987	0.01418
epihesperidin	33	0.93158	0.01731
ergosterol	34	0.86150	0.07529
beta-eudesmol	35	1.00111	0.05764
(E)-ferulic acid	36	0.97998	0.04623
geniposide	37	1.08567	0.04657
geniposidic acid	38	1.18459	0.05603
gentiopicroside	39	1.11255	0.04990
[6]-gingerol	40	0.98479	0.04218
ginsenoside Rb1	41	1.05605	0.04436
ginsenoside Rc	42	1.06544	0.01659
ginsenoside Rd	43	0.99366	0.05736
ginsenoside Re	44	1.02561	0.09026
ginsenoside Rg1	45	1.20796	0.05607
glycyrrhizic acid	47	1.16987	0.07341
gomisin A	48	1.10430	0.04403
hesperidin	50	1.26410	0.17703
hirsutine	51	1.11815	0.07611
hypoconitine	53	1.11318	0.01591
icariin	54	0.87768	0.01166
isofraxidine	55	1.27579	0.11109
(Z)-ligustilide	56	1.04986	0.05106
limonin	57	1.41271	0.13060
loganin	58	1.27306	0.06783
mesaconitine	60	0.94967	0.03802
naringin	61	1.05447	0.06231
nodakenin	62	1.08047	0.03149
osthole	63	0.42553	0.12067
oxymatrine	64	1.11421	0.03858
paeoniflorin	65	1.21748	0.06917
paeonol	66	1.03391	0.08861
palmitate chloride	67	1.00874	0.06069
(S)-perillaldehyde	68	1.08486	0.06604
puerarin	69	1.06732	0.07862
rhynchophylline	70	0.74477	0.04516
saikosaponin b2	72	0.98143	0.02159
saikosaponin c	73	1.00940	0.05327
schizandrin	74	1.12929	0.07715
sennoside A	75	1.31800	0.03776
shikonin	76	0.55521	0.03818
[6]-shogaol	77	0.52126	0.05130
sinomenine	78	0.92781	0.12228
swertiamarin	79	1.10519	0.04155

  

sample name	sample number	fold	SD
limonin	57	1.41271	0.13060
sennoside A	75	1.31800	0.03776
isofraxidine	55	1.27579	0.11109
loganin	58	1.27306	0.06783
hesperidin	50	1.26410	0.17703
paeoniflorin	65	1.21748	0.06917
ginsenoside Rg1	45	1.20796	0.05607
geniposidic acid	38	1.18459	0.05603
glycyrrhizic acid	47	1.16987	0.07341
schizandrin	74	1.12929	0.07715
hirsutine	51	1.11815	0.07611
oxymatrine	64	1.11421	0.03858
hypoconitine	53	1.11318	0.01591
gentiopicroside	39	1.11255	0.04990
swertiamarin	79	1.10519	0.04155
gomisin A	48	1.10430	0.04403
geniposide	37	1.08567	0.04657
(S)-perillaldehyde	68	1.08486	0.06604
nodakenin	62	1.08047	0.03149
puerarin	69	1.06732	0.07862
ginsenoside Rc	42	1.06544	0.01659
ginsenoside Rb1	41	1.05605	0.04436
naringin	61	1.05447	0.06231
(Z)-ligustilide	56	1.04986	0.05106
paeonol	66	1.03391	0.08861
ginsenoside Re	44	1.02561	0.09026
saikosaponin c	73	1.00940	0.05327
palmitate chloride	67	1.00874	0.06069
beta-eudesmol	35	1.00111	0.05764
ginsenoside Rd	43	0.99366	0.05736
[6]-gingerol	40	0.98479	0.04218
catalpol	20	0.98168	0.02332
saikosaponin b2	72	0.98143	0.02159
(E)-cinnamic acid	21	0.98107	0.04583
(E)-ferulic acid	36	0.97998	0.04623
mesaconitine	60	0.94967	0.03802
eleutherosideB	31	0.93746	0.05473
epihesperidin	33	0.93158	0.01731
sinomenine	78	0.92781	0.12228
icariin	54	0.87768	0.01166
aucubin	10	0.87567	0.04106
ergosterol	34	0.86150	0.07529
baicalein	11	0.84886	0.02713
bergenin	15	0.84081	0.03018
amygdalin	6	0.82868	0.01938
(-)-epigallocatechin gallate	32	0.81987	0.01418
arbutin	7	0.81086	0.05191
rhynchophylline	70	0.74477	0.04516
astragaloside 4	8	0.74424	0.28144
barbaloin	13	0.74070	0.07735
baicalin	12	0.63013	0.01764
dimethylesculetin	30	0.61351	0.01414
shikonin	76	0.55521	0.03818
[6]-shogaol	77	0.52126	0.05130
osthole	63	0.42553	0.12067
atractylenolide 3	9	0.41393	0.07651
capillarisin	18	0.40405	0.01952
capsaicin	19	0.32111	0.04614
alisol A	3	0.29939	0.03169
alisol B	4	0.27508	0.05381

Samples were used at the concentration of 0.1  $\mu$ M.

Values represent means  $\pm$  S.D. of three determinants.

Table II. 細胞死あるいは形態変化を誘導した天然物

細胞死を誘導した生薬		形態変化を誘導した生薬	
sample name	sample number	sample name	sample number
aconitine	1	alkannin	5
albiflorin	2	bufalin	16
berberine chloride	14	bufotalin	17
curcumin	26	cinobufagin	22
dehydrocorydaline nitrate	27	cinobufotalin	23
dehydrocostuslactone	28	coptisine chloride	24
glabridin	46	corydaline	25
gomisin N	49	dehydrocapsaicin	29
honokiol	52	wogonin	80
magnolol	59		
saikosaponin a	71		

いることが知られており、その化合物が活性を示している可能性が考えられた。しかし、今回使用した生薬エキスは熱水抽出エキスであり、ビタミン A や ATRA のような脂溶性の高い化合物が含まれている可能性は低いと考えられる。今後、活性を示した化合物が ATRA かその類似化合物であるのかを検討して行く予定である。また、サフランにはクロシンなどのカロチノイド色素が含有されており、ATRA 類似化合物が含有されている可能性は高い。ダイオウ、チモには、アントラキノン、アンスロン、キサントン類が、トウキ、ビャクジュツ、ボウフウにはクマリン、クロモン、アセチレン化合物が、マンケイシ、カンゾウ、ヨウバイヒ、オウゴンにはフラボノイドが含まれており、RAR リガンド活性を示した生薬に含有される主要成分には、ある程度共通性があるように思われる。すなわち、これまでに知られている RAR リガンドである ATRA とは構造が大きく異なる RAR リガンドを見いだせる可能性が考えられる。

今回は生薬熱水抽出エキスを使用したが、これまでに我々は生薬メタノール抽出エキスを用いて同様の RAR リガンド活性のスクリーニングを行ってきた。その中では、ドクカツ、ソウハクヒ、ジコッピ、カンゾウ、コウカなどが弱い活性を示し、カンゾウ以外は熱水抽出エキスとは異なった生薬であった。ドクカツからはジテルペンの Pimaradienoic acid を RAR リガンドと同定した。メタノールエキスから単離された化合物は脂溶性の高いジテルペン化合物が単離されたことを考えると、今回使用した熱水抽出エキス中の RAR リガンド活性成分は、ATRA よりはかなり水溶性の高い化合物が予想され、本研究の目的である、ATRA に変わる RAR リガンドを見出すことができるのではないかと考えられた。

## ■結論

1. 生薬成分 80 種類の RAR リガンド活性をスクリーニングしたところ、強い活性を有する化合物は見いだせなかった。
2. 生薬抽出エキス 120 種類の RAR リガンド活性をスクリーニングしたところ、マンケイシが最も強い活性を示し、カンゾウ、サフラン、ダイオウ、チモ、ヨウバイヒ、トウキ、オウゴンなども弱いながら RAR リガンド活性を示した。

今後、生薬抽出エキス中の活性成分を単離・同定することにより、これまで報告されていない天然由来 RAR リガンドを見いだせる可能性が考えられた。さらに、それらの疾患治療・予防への応用が期待される。

Table III. 生薬抽出エキス 120 種の RAR リガンド活性のスクリーニング (サンプルナンバー順)

Sample No.	Vehicleに対する活性化率 (Relative Luciferase Activity)	RLA	
		fold	SD
1	インチンコウ	0.75808	0.12423
2	ウコン	1.07294	0.14313
3	エンゴサク	0.54250	0.03991
4	オウギ	1.19064	0.05169
5	オウゴン	1.52761	0.15674
8	オンジ	0.57315	0.05696
9	ガジュツ	1.15876	0.19837
10	カッコン	0.71282	0.01402
11	カロコン	1.06501	0.07785
12	カンキョウ	1.07910	0.24938
13	カンゾウ	1.77677	0.39763
14	キキョウ	1.27545	0.03702
15	ククカ	1.22065	0.13319
16	キジツ	1.10248	0.04299
17	キョウカツ	1.32100	0.01526
18	キョウニン	1.12001	0.09584
19	クジン	1.16163	0.15904
20	ケイガイ	1.04675	0.05667
21	ケイヒ	0.83857	0.08071
22	コウジン	1.00763	0.07658
23	コウブシ	1.24348	0.05453
24	コウボク	1.04413	0.05680
25	ゴシツ	1.22046	0.03073
26	ゴシユ	1.13013	0.11400
28	ゴミシ	0.95791	0.11741
29	サイコ	1.16157	0.10867
30	サイシン	1.14089	0.05691
31	サフラン	1.70132	0.18859
32	サンシシ	1.11158	0.12872
33	サンシユ	1.03952	0.18201
34	サンショウ	0.91258	0.13150
35	サンソウニン	1.05855	0.13921
36	ジオウ	1.07529	0.07567
37	エゾウコギ	1.04022	0.06622
38	ジコッピ	1.07534	0.14058
39	ジュクジオウ	0.94498	0.09499
40	シャクヤク	1.08886	0.07530
41	シャゼンシ	0.99664	0.04771
42	ショウキョウ	0.93010	0.06074
43	ショウマ	1.02878	0.07728
44	シンイ	0.96209	0.07018
45	セキシヤク	1.03885	0.04647
46	センキュウ	1.08951	0.13481
47	ソウジュツ	1.04025	0.15501
48	ソウハクヒ	0.91071	0.08032
49	ソヨウ	1.00523	0.12971
50	ダイオウ	1.59308	0.13736
51	タイソウ	1.02382	0.12594
52	タクシャ	1.07135	0.05068
53	チクセツニンジン	1.18544	0.09161
54	チモ	1.59277	0.07093
55	チョウジ	1.17136	0.07072
56	チョウトウコウ	1.40794	0.14913
57	チョレイ	1.21847	0.21176
58	チンピ	0.91191	0.05310
59	テンマ	0.89903	0.05764
60	テンモンドウ	1.32088	0.13993
61	トウキ	1.53675	0.17401
62	トウニン	1.19337	0.03896
63	ニンジン	1.41677	0.20421
64	パイモ	1.43100	0.18797
65	バクモンドウ	0.88455	0.03726
66	ハッカ	0.96638	0.09653
67	ハンゲ	1.25565	0.21661
68	ビヤクシ	0.90981	0.21022
69	ビヤクジュツ	1.48604	0.05093
70	ピンロウジ	1.42654	0.17830
71	ブクリョウ	1.42616	0.07084
72	ブシ	1.40789	0.04804
73	ボウイ	1.25702	0.08044
74	ボウフウ	1.44404	0.10843
75	ボタンピ	1.28211	0.20528
76	マオウ	1.06980	0.09179
77	マシニン	0.86034	0.08256
78	ヨクイニン	1.04575	0.14932
79	リュウタン	1.25885	0.27799
80	レンギョウ	1.14475	0.10034
81	インヨウカク	1.11653	0.09537
82	ウヤク	1.23162	0.03058
83	ガイヨウ	1.21789	0.08320
84	カシュウ	0.87366	0.08395
85	クマザサ	0.87016	0.07615
86	ケイケツトウ	1.28802	0.12029
87	コウカ	1.13709	0.06559
89	コオウレン	1.10747	0.04819
91	ゴマ	1.01283	0.08443
92	サンシチニンジン	1.03934	0.00527
93	サンリョウ	1.01633	0.03084
94	シツリシ	0.85179	0.01976
95	ショウブコン	1.05270	0.17083
96	ジンギョウ	1.08698	0.07704
97	セイコウ	1.30994	0.23774
98	セキショウコン	0.90830	0.11343
99	センブリ	0.97301	0.09786
100	ソウヨウ	1.16822	0.11018
101	ゾクダン	0.97736	0.16312
102	タンジン	1.20140	0.10594
103	トウジン	1.05285	0.12713
104	ドクカツ	1.16243	0.20524
105	トチュウ	0.95742	0.06157
106	ドブクリョウ	1.11757	0.05004
107	ニクジュウヨウ	1.11423	0.07663
108	ハクセンビ	1.01695	0.01586
109	ヒヤクブ	1.14193	0.02624
110	ビワヨウ	1.17375	0.00921
111	ボウコン	1.14903	0.06365
112	ホコツシ	1.10479	0.00331
113	マンケイシ	3.24908	0.28482
114	モッコウ	1.26352	0.09858
115	モツヤク	1.10890	0.07284
116	ヤクチ	1.03398	0.09141
117	ヤクモソウ	1.07339	0.05897
118	ヨウバイヒ	1.55290	0.12145
119	リョウキョウ	1.15574	0.03765
120	レイシ乾燥エキス	1.08691	0.06498

Extracts were used at the concentration of 100 µg/ml.

Values represent means ± S.D. of three determinants.

Table IV. 生薬抽出エキス 120 種の RAR リガンド活性のスクリーニング (活性の強い順)

Vehicleに対する活性化率  
RLA 活性の強い生薬順 (Relative Luciferase  
Activity)

No.	生薬名	RLA	
		fold	SD
113	マンケイシ	3.24908	0.28482
13	カンゾウ	1.77677	0.39763
31	サフラン	1.70132	0.18859
50	ダイオウ	1.59308	0.13736
54	チモ	1.59277	0.07093
118	ヨウバイヒ	1.55290	0.12145
61	トウキ	1.53675	0.17401
5	オウゴン	1.52761	0.15674
69	ビャクジュツ	1.48604	0.05093
74	ボウフウ	1.44404	0.10843
64	バイモ	1.43100	0.18797
70	ピンロウジ	1.42654	0.17830
71	ブクリョウ	1.42616	0.07084
63	ニンジン	1.41677	0.20421
56	チョウトウコウ	1.40794	0.14913
72	ブシ	1.40789	0.04804
17	キョウカツ	1.32100	0.01526
60	テンモンドウ	1.32088	0.13993
97	セイコウ	1.30994	0.23774
86	ケイケツトウ	1.28802	0.12029
75	ボタンビ	1.28211	0.20528
14	キキョウ	1.27545	0.03702
114	モッコウ	1.26352	0.09858
79	リュウタン	1.25885	0.27799
73	ボウイ	1.25702	0.08044
67	ハンゲ	1.25565	0.21661
23	コウブシ	1.24348	0.05453
82	ウヤク	1.23162	0.03058
15	キクカ	1.22065	0.13319
25	ゴシツ	1.22046	0.03073
57	チョレイ	1.21847	0.21176
83	ガイヨウ	1.21789	0.08320
102	タンジン	1.20140	0.10594
62	トウニン	1.19337	0.03896
4	オウギ	1.19064	0.05169
53	チクセツニンジン	1.18544	0.09161
110	ビワヨウ	1.17375	0.00921
55	チョウジ	1.17136	0.07072
100	ソウヨウ	1.16822	0.11018
104	ドクカツ	1.16243	0.20524
19	クジン	1.16163	0.15904
29	サイコ	1.16157	0.10867
9	ガジュツ	1.15876	0.19837
119	リョウキョウ	1.15574	0.03765
111	ボウコン	1.14903	0.06365
80	レンギョウ	1.14475	0.10034
109	ハクブ	1.14193	0.02624
30	サイシン	1.14089	0.05691
87	コウカ	1.13709	0.06559
26	ゴシュユ	1.13013	0.11400
18	キョウニン	1.12001	0.09584
106	ドブクリョウ	1.11757	0.05004
81	インヨウカク	1.11653	0.09537
107	ニクジュウヨウ	1.11423	0.07663
32	サンシシ	1.11158	0.12872
115	モツヤク	1.10890	0.07284
89	コオウレン	1.10747	0.04819

112	ホコツシ	1.10479	0.00331
16	キジツ	1.10248	0.04299
46	センキョウ	1.08951	0.13481
40	シャクヤク	1.08886	0.07530
96	ジンギョウ	1.08698	0.07704
120	レイシ乾燥エキス	1.08691	0.06498
12	カンキョウ	1.07910	0.24938
38	ジコッピ	1.07534	0.14058
36	ジオウ	1.07529	0.07567
117	ヤクモソウ	1.07339	0.05897
2	ウコン	1.07294	0.14313
52	タクシャ	1.07135	0.05068
76	マオウ	1.06980	0.09179
11	カロコン	1.06501	0.07785
35	サンソウニン	1.05855	0.13921
103	トウジン	1.05285	0.12713
95	ショウブコン	1.05270	0.17083
20	ケイガイ	1.04675	0.05667
78	ヨクイニン	1.04575	0.14932
24	コウボク	1.04413	0.05680
47	ソウジュツ	1.04025	0.15501
37	エゾウコギ	1.04022	0.06622
33	サンシュユ	1.03952	0.18201
92	サンシチニンジン	1.03934	0.00527
45	セキシヤク	1.03885	0.04647
116	ヤクチ	1.03398	0.09141
43	ショウマ	1.02878	0.07728
51	タイソウ	1.02382	0.12594
108	ハクセンビ	1.01695	0.01586
93	サンリョウ	1.01633	0.03084
91	ゴマ	1.01283	0.08443
22	コウジン	1.00763	0.07658
49	ソヨウ	1.00523	0.12971
41	シャゼンシ	0.99664	0.04771
101	ソクダン	0.97736	0.16312
99	センブリ	0.97301	0.09786
66	ハッカ	0.96638	0.09653
44	シンイ	0.96209	0.07018
28	ゴミシ	0.95791	0.11741
105	トチュウ	0.95742	0.06157
39	ジュクジョウ	0.94498	0.09499
42	ショウキョウ	0.93010	0.06074
34	サンショウ	0.91258	0.13150
58	チンビ	0.91191	0.05310
48	ソウハクヒ	0.91071	0.08032
68	ビャクシ	0.90981	0.21022
98	セキショウコン	0.90830	0.11343
59	テンマ	0.89903	0.05764
65	バクモンドウ	0.88455	0.03726
84	カシュウ	0.87366	0.08395
85	クマザサ	0.87016	0.07615
77	マシニン	0.86034	0.08256
94	シツリシ	0.85179	0.01976
21	ケイヒ	0.83857	0.08071
1	インチンコウ	0.75808	0.12423
10	カッコン	0.71282	0.01402
8	オンジ	0.57315	0.05696
3	エンゴサク	0.54250	0.03991

Extracts were used at the concentration of 100 µg/ml.  
Values represent means ± S.D. of three determinants.