

生薬中に存在する新規抗肥満活性物質の探索

申請代表者 中西 剛 岐阜薬科大学 准教授

■背景・目的

肥満は生活習慣病を始めとする様々な疾患の原因であり、特に北米においては重大な社会問題となっている。治療法としては、食餌療法や運動療法などがあるが、重度の肥満に対しては即効性に乏しく、十分な効果が得られないのが現状である。peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR δ) は、脂肪酸およびその誘導体などをリガンドとする核内受容体で、糖代謝、脂質代謝、エネルギー産生に関与することが知られている。PPAR δ は脂肪の燃焼を促進させる作用があり、恒常的に活性化した PPAR δ を脂肪細胞特異的に過剰発現させたマウスでは、高脂肪食を与えても肥満になりにくいことが明らかとなっているため、(Wang YX. et al., *Cell*. 113. 159-170, 2003), PPAR δ アゴニストは抗肥満薬としての作用が期待できる。化合物の核内受容体アゴニスト活性をハイスループットに評価する実験系としては、アゴニストによる転写活性化の際に起こる核内受容体と転写共役因子と結合を利用した *in vitro* 酵素評価系がいくつか開発されている (Kanayama T. et al., *J. Biochem.*, 133. 791-797, 2003) が、生薬の粗抽出検体の様に複数の成分を含む検体ではアゴニスト活性に依存しない非特異的な結合が発生し、ほとんどが擬陽性という事態も十分に予測される。一方で我々は、最近酵母 two-hybrid 法を利用した PPAR δ アゴニスト活性評価系の構築に成功した (特許出願中)。この実験系は、大量の検体を簡便に評価することができ、かつ、混合物を対象にした場合にも比較的正確な評価が可能である。

そこで、本研究では我々が構築した評価系を用いて、生薬検体のスクリーニングを行い、生薬中から PPAR δ アゴニスト活性を有する新たな抗肥満治療薬のリード化合物の探索を行った。

■結果・考察

PPAR δ アゴニスト活性を評価する手法としては、培養細胞を用いたレポーターアッセイと、酵母 two-hybrid 法を利用した系が存在する。前者は、核内受容体へのリガンド結合から標的遺伝子の転写活性化までを網羅しており、正確な評価が可能であるが、結果が得られるまでに数日かかり実験にかかるコストも高いという欠点がある。一方後者は、大量の検体を短時間に評価可能であるが、核内受容体のリガンド結合とコアクチベーターとの相互作用の有無のみで評価するため擬陽性が多くなるのが欠点である。そこで、まず各検体について最初に酵母 two-hybrid 系による一次スクリーニングを行い、活性を持つ可能性がある検体についてのみレポーターアッセイによる評価を行った。ポジティブコントロールとして合成 PPAR δ アゴニストである GW0742 を用いた。GW0742 はレポーターアッセイにおける検討では、100 pM 以上でレポーター遺伝子の活性上昇作用が認められ、酵母 two-hybrid 法による評価では、100 pM で 1.3 倍程度のレポーター遺伝子の活性上昇が認められているため、活性を持つ可能性がある検体の基準は、酵母 two-hybrid 法による評価で 1.3 倍以上のレポーター遺伝子活性上昇が認められたものとした。PPAR δ アゴニスト評価は、生薬抽出物 80 種類、局方生薬標準化合物 80 種類を対象に行った。

生薬抽出物 80 種類について酵母 two-hybrid 系を用いて評価を行ったところ、GW0742 において

3 倍程度のレポーター遺伝子の活性上昇が認められ、またいくつかの検体でアゴニスト活性が認められる結果が得られた。しかしいずれの検体にも色がついており、検体そのものの吸光度が結果に影響している可能性が考えられた。

溶媒コントロールに対するレポーター遺伝子の活性上昇率が 1.3 倍以上だった検体を対象として、培養細胞を用いたレポーターアッセイを行ったところ、検討したいずれの検体においても活性は認められなかった。以上より、今回検討した生薬抽出物については PPAR δ アゴニスト活性を有するものは存在しなかった。

続いて、局方生薬標準化合物について評価を行った。評価の結果、1.3 倍以上の活性上昇作用が認められたものは、saikosaponin c のみであった（図 1）。そこで次に、saikosaponin c についてレポーターアッセイによる評価を行った。その結果、GW0742 では、20 ~ 70 倍のレポーター遺伝子の活性上昇が認められたが、saikosaponin c では、全く活性が上昇しなかった。今回の検討では、10 μ M

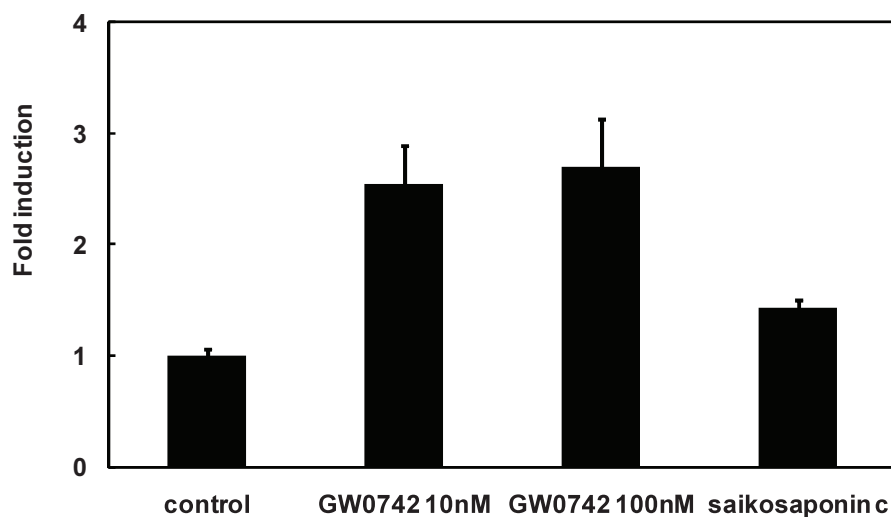


図 1. 酵母 two-hybrid 系による局方生薬標準化合物の PPAR δ アゴニスト活性評価

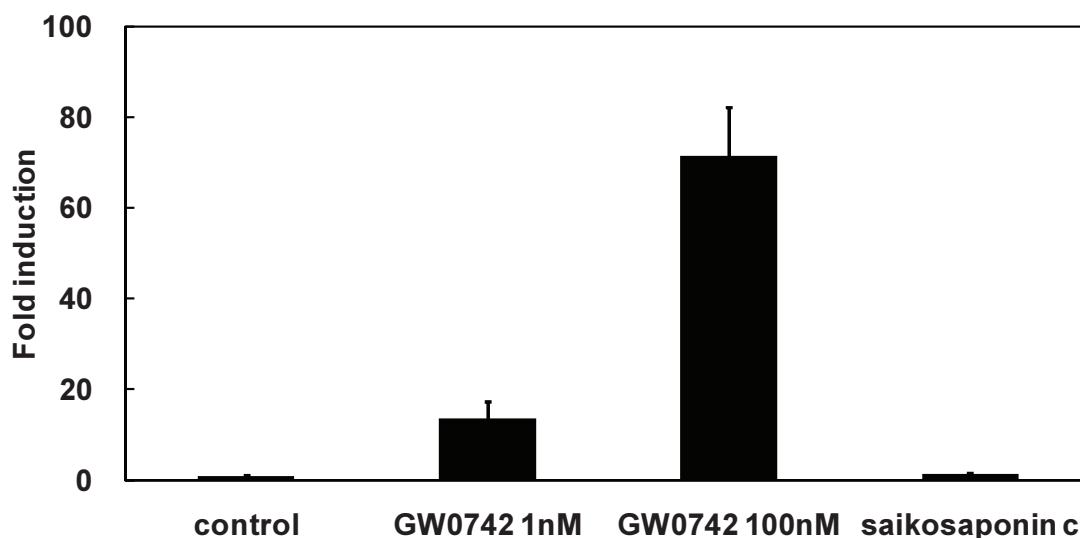


図 2. 培養細胞を用いたレポーターアッセイによる saikosaponin c の PPAR δ アゴニスト活性評価

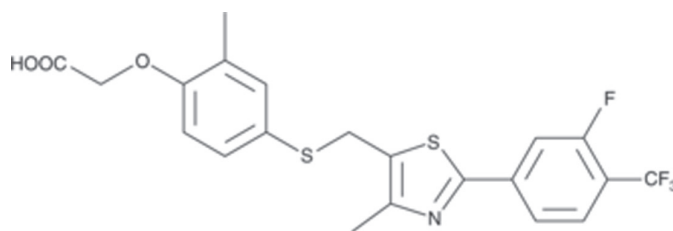


図3. GW0742 の分子構造

で検討を行ったが、この濃度では活性上昇作用を示すのに十分ではなかった可能性があるため、より高い濃度で活性を示すか検討する必要があると考えられる。

今回の研究では、酵母 two-hybrid 系による評価ではいくつかの検体でアゴニスト活性が認められる結果が得られたものの、レポーターアッセイによる評価では、いずれも活性が認められなかった。このことから、生薬検体中に PPAR δ アゴニスト活性を有するものが存在する可能性はあるものの、強力な活性ではないと考えられる。合成 PPAR δ アゴニストである GW0742 は、分子構造中にカルボキシル基、チアゾール環、ハロゲン原子を含む化合物である（図3）。一方、局方生薬標準化合物は、ステロイド骨格、トリテルペン構造を有する化合物が多いが、チアゾール環を持つ化合物は存在しない。また、カルボキシル基を有する化合物としては、Cinnamic acid, Ferulic acid 等があるが、これらの化合物の構造は単純で、いずれも GW0742 との共通点は少ない。このことと今回得られた結果から、ステロイド骨格、トリテルペン構造は PPAR δ アゴニスト活性とはあまり関連がないことが示唆された。

生薬抽出物についても検討を行ったが、こちらも活性があるものは見いだせなかった。今回使用したものは水抽出物であったが、核内受容体リガンドとなる化合物は脂溶性のものが多くを考えると、有機溶媒で抽出したものを用いた方が適切であったと考えられる。生薬の中には脂質代謝系に効果を示すものも存在することから、エタノールなどによる抽出物で検討を行えば、強力な PPAR δ リガンド活性を有するものが存在するかもしれない。生薬成分の中で、GW0742 に類似した構造、例えば Cinnamic acid, Ferulic acid よりも炭素数が大きい脂肪酸があればそちらについても検討することが望ましいと考えられる。

■結論

今回の検討の結果から、生薬検体中に強力では無いものの PPAR δ アゴニスト活性を有するもの存在する可能性が示唆された。また、ステロイド骨格及びトリテルペン構造は化合物の PPAR δ アゴニスト活性への寄与は小さいことが示唆された。