

和漢薬由来核内受容体 Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) リガンドの探索研究

申請代表者 田邊 宏樹 愛知学院大学薬学部薬用資源学講座
所外共同研究者 井上 誠 愛知学院大学薬学部薬用資源学講座

講師
教授

【背景・目的】 芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon Receptor : AhR) は、ほとんどの細胞・組織に発現がみられる転写因子のひとつで、通常はheat shock protein90やAhr-interacting protein, p23などと会合した状態で細胞質に存在するが、多環性芳香族炭化水素化合物がリガンドとして結合すると、核内に移行しAhR Nuclear Translocator (ARNT) とヘテロダイマーを形成することにより、DNA上の異物応答配列 (XRE) に結合し、標的遺伝子である薬物代謝酵素などの転写活性化が引き起こされる。内因性のリガンドに関する報告は少なく、環境ホルモンとして知られるダイオキシン類は代謝を受けにくく、体内に蓄積し、過剰なタンパク質産生を引き起こすことによって毒性を発現すると考えられている。また、AhRには転写因子としてだけでなくE3ユビキチンリガーゼとして標的蛋白を分化する機能がある事も報告されている。さらに、AhRは近年、そのリガンドによっては、自己免疫疾患や細菌感染などに重要であるIL-17産生ヘルパーT細胞 (Th17) の分化制御に関与している事や、過剰な免疫反応を抑制する制御性T細胞 (Treg) の誘導に関与している事が報告されている。

本研究では、体質改善を得意とする漢方処方に繁用される生薬エキスや天然化合物からAhRリガンド (アゴニスト及びアンタゴニスト) を探索する事を第一目標とし実施した。さらにそれらリガンドによるT細胞分化に及ぼす影響を検討することで、慢性炎症を伴う疾患に対して、制御性T細胞誘導による治療効果を最終目標として実施した。また、その過程において、AhRリガンドは肝臓において薬物代謝酵素CYP1A1や1A2, 2Bなどを誘導することが知られている。生薬熱水抽出物による薬物代謝誘導活性を検討することで、漢方方剤同士の相互作用や、西洋薬との相互作用を予測することが可能になることも考え、本実験を行った。

【結果・考察】 まず、多検体を測定できるAhR応答配列を有したルシフェラーゼレポータープラスミドをヒト肝ガン細胞HepG2細胞に遺伝子導入し、各試験液によって誘導されてくるルシフェラーゼタンパク質の量をその酵素活性を測定することで実施した。HepG2細胞をDMEM High glucose培地 (10% FBS) を用いて、48well plateに 1.5×10^5 cell/wellになるように播種し、一晚培養した。新しいDMEM培地に置換後、AhR応答配列を有したルシフェラーゼレポータープラスミド及び、 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドをリン酸カルシウム法により8時間遺伝子導入した後、DNA-カルシウム複合体を洗浄し、被検薬を含有した培地に置換し、48時間後に細胞内タンパク質を抽出し、ルミノメーターを用いて誘導されたルシフェラーゼタンパク質量をその酵素活性を測定する事で検討した。また、各well間の誤差を修正するため、同じく細胞内タンパク質に発現している β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定し、測定されたルシフェラーゼ活性を補正した。Vehicleとして使用したDMSOを添加したwellのルシフェラーゼ活性を基準にして、各試験薬のルシフェラーゼ活性をRelative luciferase activity (RLA)として表した。各生薬熱水抽出物100 μ g/mLを添加した場合の

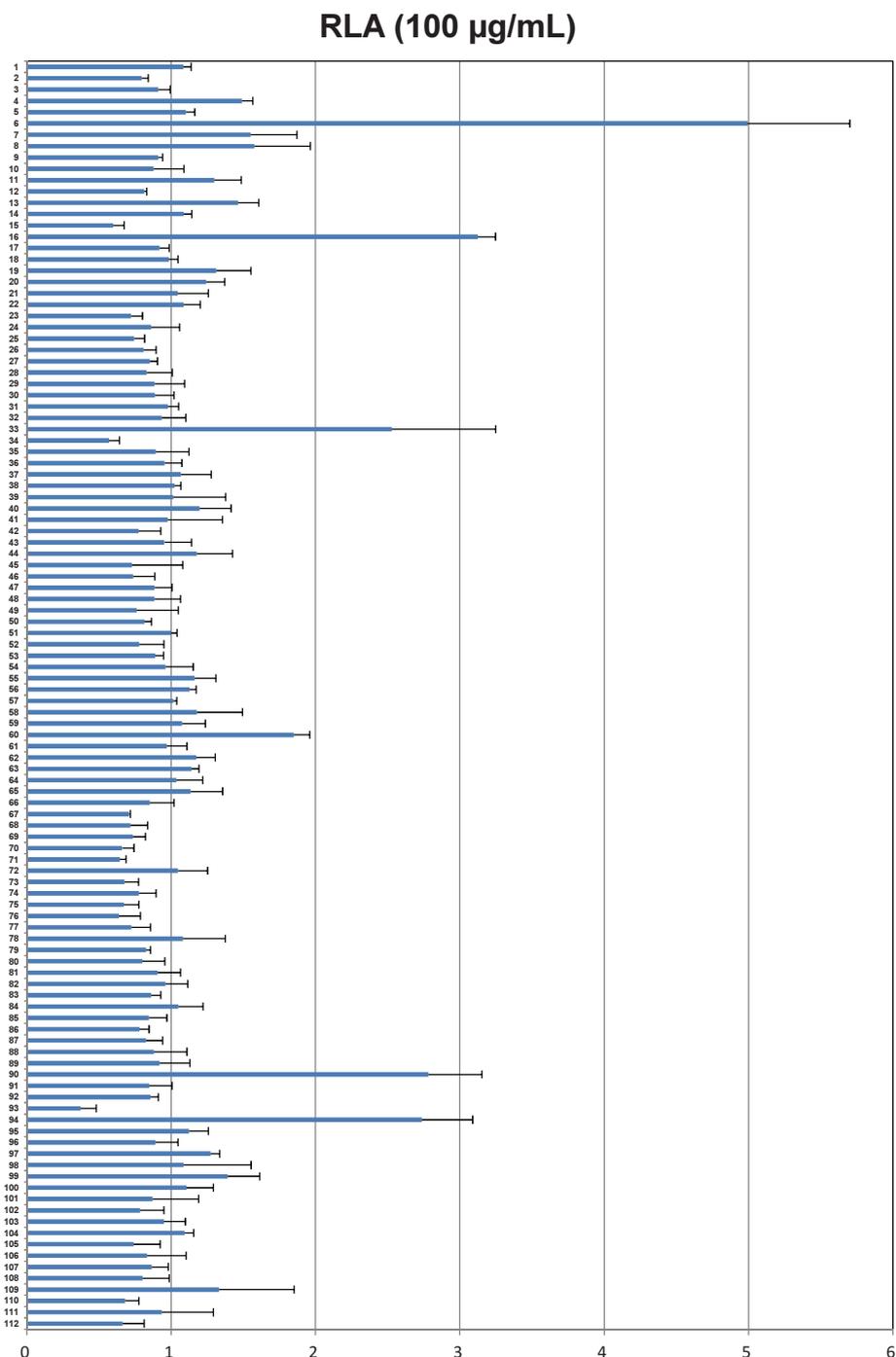


図1. 生薬熱水抽出物 (100 $\mu\text{g/mL}$) のAhRアゴニスト活性試験結果

RLA値のグラフを図1に示す。また、化合物に関しても10 μM を添加した場合のRLA値のグラフを図2に示す。

その結果、AhRアゴニスト活性の強かった生薬熱水抽出エキスとして、オウゴン、カンゾウ、ビャクシ、ブクリョウ、ゴシユユなどがみられた。それ以外にも、弱いながらもアゴニスト活性が認められる生薬が多数存在した。一方、アゴニスト活性の強かった化合物としては、既に報告のある evodiamine や baicalein, berberine 以外にも、coptisine にも活性が認められた。

RLA (10 μM)

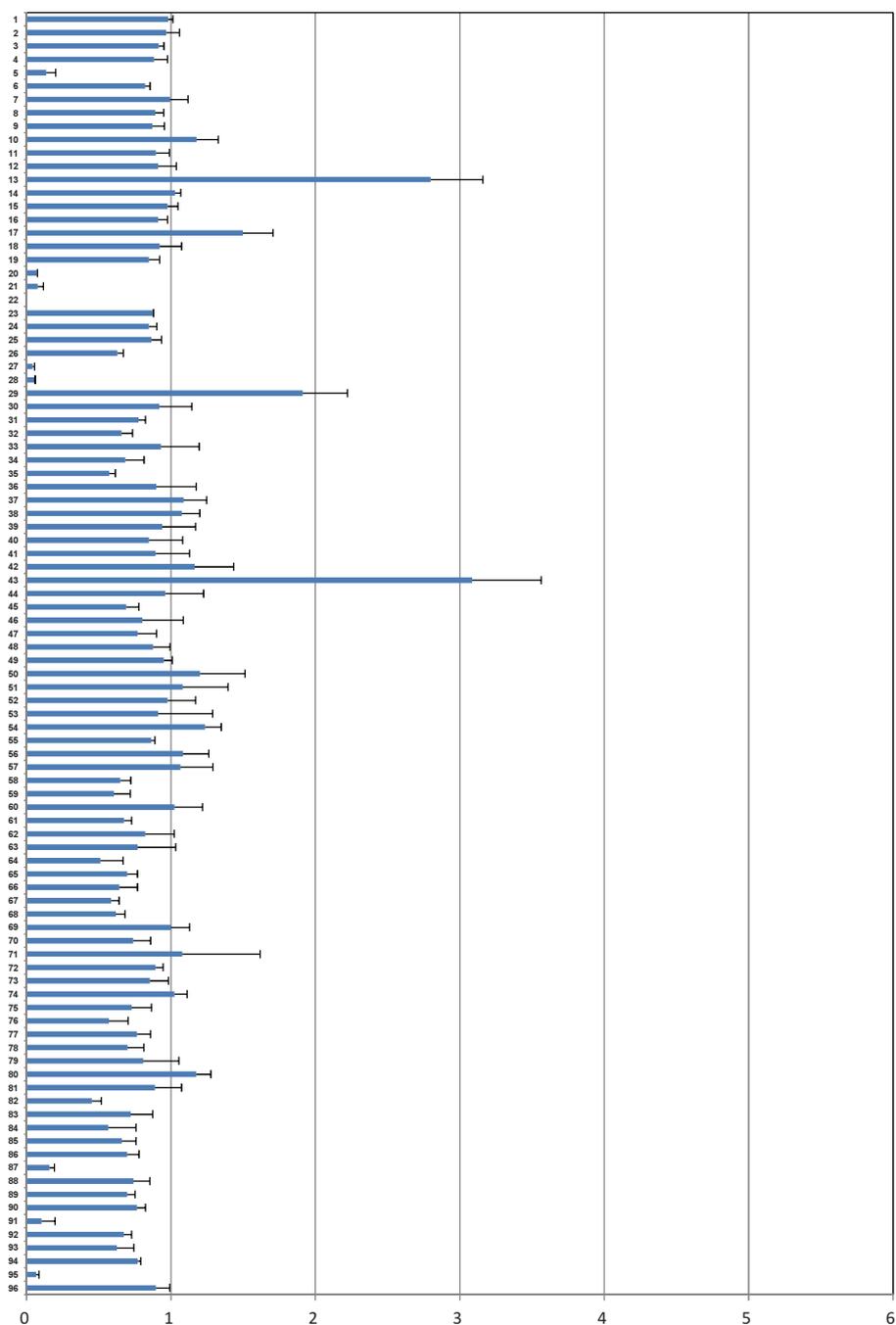


図2. 天然化合物 (10 μ M) のAhRアゴニスト活性試験結果

次に、アゴニスト活性の高かった化合物について、AhRを介した薬物代謝酵素CYP1A1タンパク質発現誘導に及ぼす効果を検討した。使用した細胞はルシフェラーゼレポーターアッセイと同じHepG2細胞を用いて実施した。12well plateに 2.0×10^5 cells/wellになるように播種し一晩培養した。各種化合物を含有した培地に置換し、48時間後にタンパク質を抽出し、誘導されたCYP1A1タンパク質発現量をウェスタンブロット法にて解析した。陽性コントロールとして使用した1 nM TCDDによって誘導されたCYP1A1タンパク質量を100%としたときの相対値にて表した。その結

果, CYP1A1タンパク質誘導活性を有する化合物として, baicalein, berberine, coptisineがあった。一方, evodiamineや ginsenoside Rc及び glabridinには誘導活性が存在しなかった。

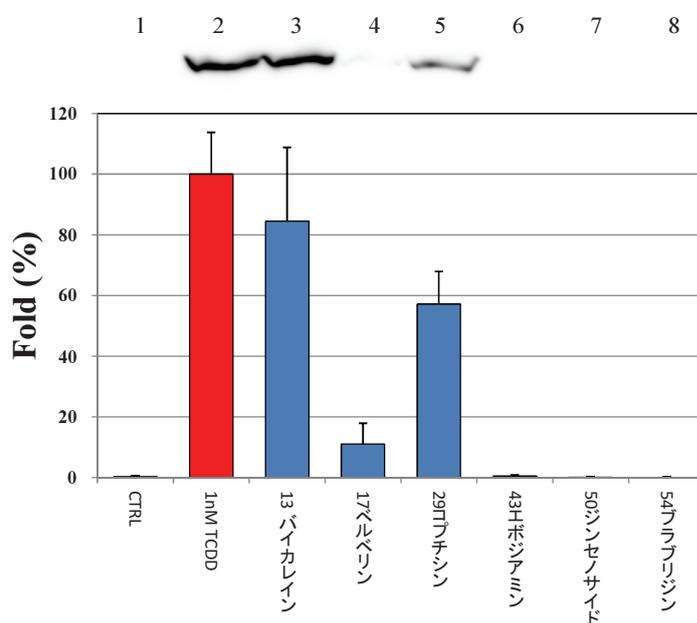


図3. CYP1A1タンパク質誘導活性試験の結果

【結論】 今回, AhR応答配列を有したルシフェラーゼレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイによって, 生薬熱水抽出物のAhRアゴニスト活性試験を実施した。AhRは元来, 芳香族炭化水素受容体と呼ばれているように, 平面的な多環構造を有する脂溶性化合物をリガンドとすることが多い受容体である。今回使用した熱水抽出エキスは, 水を用いた抽出法であり, 脂溶性成分の含有量はあまり多くないものと考えていたが, 実際には複数の生薬においてAhRアゴニスト活性が認められた。これらのことから, 今回の生薬エキスの作製方法のように熱水抽出を実施する漢方方剤中にも多くのAhRアゴニスト成分が含有されることが考えられた。また, 化合物に関するAhRアゴニスト活性試験の結果, 熱水抽出エキスで活性の確認された生薬の主要成分であったことから, これらの化合物が生薬エキスおよび漢方方剤中でもAhRアゴニスト活性を示し, 制御性T細胞やTh17細胞の誘導に寄与することで, 抗炎症作用が発揮されている可能性が考えられた。

また, AhRアゴニストはCYP1A1以外にも1A2や2Bなどの薬物代謝酵素を誘導する活性があることから, 今回複数の生薬熱水抽出物にAhRアゴニスト活性の認められた生薬に関しては, 他の西洋薬や健康食品との相互作用や副作用を考察することが可能であると考えられた。