

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

## 第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## PPAR $\alpha$ をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発

所属 埼玉医科大学第四内科

研究者 片山茂裕

### 分担研究者

- (1) 埼玉医科大学第四内科 井上郁夫
- (2) 国立循環器センター研究所 沢村 達也
- (3) トーアエイヨー(株) 福島研究所 探索研究第2課 林 健二
- (4) キッセイ薬品工業(株)開発研究部 薬理研究所薬理第二研究室 草間 寛

### 要旨

PPAR $\alpha$ のリガンドの新しい生理作用や作用機序がいくつか明らかになり、これら薬剤のスクリーニング系がほぼ確立した。本年度は、臨床応用可能な化合物を見出すことは出来なかったが、今後も、同様に PPAR および RXR リガンドの探索を継続する。

### 1. 研究目的

PPAR は peroxisome proliferator によって活性化される核内受容体スーパーファミリーの1種であり、 $\alpha$ ・ $\beta$ ・ $\gamma$ の3種類が知られている。PPAR $\gamma$ のリガンドは、インスリン抵抗性改善薬として臨床応用されている。一方、PPAR $\alpha$ のリガンドは古くより抗高脂血症薬として使われているフィブラートであることが明らかにされた。リガンドにより活性化されたPPAR $\alpha$ は、retinoid X receptor(RXR)と結合してヘテロダイマーを形成し、核内で転写因子として働く。我々は、PPAR $\alpha$ のトリグリセリド低下作用に加えて、過酸化脂質低下作用やラジカルスカベンジャーとしての作用を明らかにし、さらには cyclooxygenase-2(COX-2)を抑制しサイトカインなどを介した細胞の活性化にも関わっていることを示してきた。本研究では、血管内皮細胞の酸化LDL受容体である LOX-1 の発現に PPAR $\alpha$ がどのように関わっているかを含めて、これら PPAR $\alpha$ の抗動脈硬化作用を統合的に明らかにする。さらに、PPAR $\alpha$ と RXR の新たな薬物活性の評価体系を確立し、新たな PPAR $\alpha$ 活性を有する化合物の探索を行い、高脂血症や糖尿病を含めた生活習慣病の予防薬の開発を目的とする。

### 2. 研究方法

ヒト PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ および RXR $\alpha$ の DNA を骨格筋あるいは肝臓 cDNA ライブラリからクローニングした。この配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを作製した。また、RXR/PPAR 応答配列 (RXRE/PPRE) を含むラット CRBP II 遺伝子プロモーター領域をラットゲノム DNA よりクローニングし、この配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを作製した。これに加えて、薬物のレセプターに対する親和性を評価する方法 (Coactivator-dependent Receptor Ligand Assay: CARLA) を作成し、PPAR および RXR を活性化する化合物の探索を行った。また、LXR 活性化作用

を有する化合物の探索のために、LXR 応答配列 (LXRE) を有するレポーターベクターの構築を試みた。これとは別に、培養肝細胞を炎症性サイトカインなどで刺激して引き起こされる炎症反応に対する PPAR  $\alpha$  のリガンドであるベザフィブラートの効果を検討した。

LOX-1 の発現が酸化 LDL により誘導される事をこれまでに明らかにしてきたが、本年度は酸化 LDL 受容体 LOX-1 の LOX-1 の発現誘導についてさらに解析を行った。

### 3. 研究成果

本年度、ヒトの全長の PPAR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、LXR  $\alpha$ 、RXR  $\alpha$ 、FXR の全塩基配列を含む哺乳類ベクターおよび PPAR が結合する遺伝子領域を含む配列をルシフェラーゼ上流に連結し調整した。また、SREBP-1 の N 末、CBP/p300 の N 末、および SRC-1 の全塩基配列を含む哺乳類ベクターも調節し、種々の細胞にそれぞれの遺伝子を導入することを確認した。加えて、HMG-CoA inhibitors (スタチン) は CARLA では CBP/p300 を介する PPAR への結合能は示さないものの、ベザフィブラートによる PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  の転写活性を増加させることを明らかにした。また、スタチンとフィブラートを同時に添加すると、NF  $\kappa$ B の活性化が抑制され、逆に NF  $\kappa$ B の活性化は PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  の活性化を抑制した。

CRBP II 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイによる RXR 及び PPAR 活性化作用の測定系を確立し、幾つかの化合物のアッセイを行ったが、陽性対照においている LG100268 (RXR リガンド) の活性を凌ぐ化合物は見出せなかった。また、LXRE を有するレポーターベクターを作製し、DNA シーケンスを確認した。アッセイ系の妥当性は現在検討中である。

PPAR  $\alpha$  のリガンドであるベザフィブラートの肝細胞に対する作用の検討では、サイトカインによる肝細胞からの IL-6 の産生、NF- $\kappa$ B 活性化が確認された。

酸化 LDL 受容体 LOX-1 の LOX-1 の発現誘導についてさらに解析を行い、各種物質による LOX-1 の発現誘導が活性酸素に依存していることが明らかとなった。さらに、酸化 LDL による NO の減少が活性酸素の産生と並行しておき、これは LOX-1 の機能抑制により共に抑えられた。このように LOX-1 と酸化ストレスとの密接な関係が明らかとなった。

また LOX-1 のリガンド結合メカニズムについて解析を行い、LOX-1 の C 末端にある 10 残基がリガンド結合に必須であり、特にその中の塩基性アミノ酸が重要であることを明らかにした。一方、新しい LOX-1 のリガンドとしてバクテリアやフィブロネクチンを同定し、LOX-1 の生理機能がこのようなりガンドとの相互作用により発揮される可能性を示した。上記の成果のほかに、LOX-1 遺伝子ノックアウトマウスの作成に成功し、C57BL/6 の遺伝的背景への置換を行った。

### 4. 考察

これらの結果は、スタチンが PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  の転写活性を協調して増加させることを示唆している。また、スタチンとフィブラートは協調して NF  $\kappa$ B の活性化を抑制している。従来全く別の薬剤と考えられてきた両薬剤が PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  を介してクロストークを形成している可能性が示唆された。

研究目的を見据えた場合、*in vivo* において血中脂質や血糖値等の低下作用を示す化合物であることが期待される。現在、リガンド探索における、アッセイ濃度を 1  $\mu$ M において篩い分けスクリーニングを行っているが、糖尿病モデルマウスなどによる RXR リガンドの投与実験の知見から、*in vivo* における効果を期待するには PPAR あるいは RXR に対する EC<sub>50</sub> 値が 10nM 以下であることが望ましいと考えられるため、アッセイにおける濃度設定をより低い用量で行うことが必要ではないかと考えられた。

LOX-1 と PPAR との関連については、今後 LOX-1 遺伝子ノックアウトマウスを利用し、LOX-1 が欠損することにより PPAR により調節されている遺伝子群の発現がどのように変化するのかを Gene Chip などによる解析により明らかにしていく。

## 5. まとめ

本年度に作成した系が、3つの PPAR のリガンドを効率良くスクリーニングできることが明らかになった。また、その結果として、スタチンがフィブラートの PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  の転写活性を協調して増加させることも明らかになり、両薬剤が PPAR  $\alpha$ /RXR  $\alpha$  を介してクロストークしている可能性が明らかになった。PPAR  $\alpha$  の肝臓における病態生理学的意義を明らかにするために、サイトカインによる肝細胞刺激条件および NF- $\kappa$ B 活性化が認められる実験条件を検討し、実験系として利用しうる可能性が示唆された。

LOX-1 の発現誘導が、酸化ストレスと強い関連があること、そして、リガンド認識機構が明らかになるとともに細菌のようなリガンドが同定された事から、生体防衛や炎症と深いかわりのあることが予想された。これは PPAR 分子の機能とも深く関連していると考えられ、今後さらに両者の関係を探ってきたい。

今回は、臨床応用可能な化合物を見出すことは出来なかったが、今後も、同様に PPAR および RXR リガンドの探索を継続するが、同時に、LXR 活性化作用も検討する予定である。また、今回構築したラット CRBP II 遺伝子の RXRE を組込んだレポーターベクターの RXRE の転写活性への影響を詳細に調べるために、RXRE 配列内の AGGTCA のコンセンサスを1つずつ欠失させた deletion mutant を作製し、転写活性の変化を調べることを予定している。

## 6. 研究発表

- (1) Inoue, I., Itoh F., Aoyagi S., Tazawa S., Kusama H., Akahane M., Mastunaga T., Hayashi K., Awata T., Komoda T., Katayama, S. Fibrate and Statin Synergistically Increase the Transcriptional Activities of PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  and Decrease the Transactivation of NF $\kappa$ B. *Biochem Biophys Res Commun.* 290: 131-139, 2002.
- (2) Matsunaga T., Nakajima T., Sonoda M., Koyama I., Kawai Si., Inoue, I., Katayama, S., Hirano K., Hokari S., Komoda T. Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxynitrite-treated lipoproteins. *J Biochem (Tokyo)* 130: 285-293, 2001.
- (3) Inoue, I., Goto S., Matsunaga T., Nakajima T., Awata T., Hokari S., Komoda T., Katayama, S.: The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR $\gamma$  increase Cu $^{2+}$ , Zn $^{2+}$ -superoxide dismutase (CuZn-SOD) and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50: 3-11, 2001.
- (4) Matsunaga T., Iguchi K., Nakajima T., Koyama I., Miyazaki T., Inoue, I., Kawai Si., Katayama, S., Hirano K., Hokari S., Komoda T. Glycated high-density lipoprotein induces apoptosis of endothelial cells via a mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 714-720, 2001.
- (5) Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A.M., Cascio, V.L., Sawamura, T.: The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, 276(17): 13750-13755, 2001
- (6) Chen, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T.: Conserved carboxyl-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized LDL binding. *Biochem J*, 355(Pt2): 289-296, 2001.

- (7) Kakutani, M., Ueda, M., Naruko, T., Masaki, T., and Sawamura, T.: Accumulation of LOX-1 ligand in plasma and atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: Identification by a novel enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(1): 180-185, 2001.

7. 知的所有権の取状況

なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社