

PPAR α 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) 国立循環器病センター研究所沢村達也
- (3) ト-アエイヨ- (株) 福島研究所探索研究第二課 林 健二
- (4) キッセイ薬品 (株) 開発研究部薬理研究所第2研究室 草間 寛

要旨

PPAR α 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、 α ・ β ・ γ の3種類が知られている。PPAR γ 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 α 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 α 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 α 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 α がどのように関わっているかを含めて、これら PPAR α の抗動脈硬化作用を統合的に明らかにする。さらに、PPAR α とRXRの新たな薬物活性の評価体系を確立し、新たな PPAR α 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 α 、PPAR δ 、PPAR γ およびRXR α 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する。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する。また、RXR/PPAR 応答配列 (RXRE/PPRE) を含むラット CRBP β 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

の上流に組み込んだレポーターベクターを作製する。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なう。

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る。

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、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ない、創薬への応用の可能性を探る。

3. 研究成果

初年度、ヒトの全長の PPAR α 、 β 、 γ 、LXR α 、RXR α 、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。本年度は、ヒト全長 SRC-1、CBP/p300 の N 末、およびヒト全長 CBP/p300、それぞれを、GST 融合蛋白として精製し、アクチベターの SRC-1 あるいは CBP/p300 を介した、新たな PPAR α 、 β の転写活性を評価する CARLA を確立した。この CARLA を用いた成績より、HMG-CoA inhibitors (スタチン) は CBP/p300 を介する PPAR への結合能は示さないものの、ベザフィブラトによる PPAR α /RXR α 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トを同時に添加すると、NF κ B の活性化が抑制され、逆に NF κ B の活性化は PPAR α /RXR α の活性化を抑制した。また、PPAR α 、 β 、 γ のリガンドの PPAR α 、 β 、 γ への結合能力は、アクチベターの SRC-1 あるいは CBP/p300 の違いにより、著しく異なることが判明した。

初年度に、CRBP \square 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 LG100268 (RXR リガンド) の活性を凌ぐ化合物は見出せなかった。本年度に、PPAR/RXR のリガンドとして、1 μ M の濃度において LG100268 と同等の活性を示す化合物を見出したが、本化合物は 10nM 以下の濃度で活性を示さなかったことから、in vivo での薬効は期待できないと考えられた。また、PPRE/RXRE の配列の差が転写活性に及ぼす影響を精査するために、測定系に用いるレポーターベクターとして、HMG Co-A synthase 及び Acyl Co-A oxidase の PPRE/RXRE を組込んだレポーターベクターを作製し検討を行ったが、現在のところ明確な転写活性の差は見出されていない。

酸化 LDL 受容体 LOX-1 の発現誘導について解析を行い、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や、エンドセリン-1 により亢進すること、HMG-CoA reductase により抑制され、酸化 LDL による LOX-1 を介した細胞接着分子の発現を抑制することを in vitro で示した。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、スタチンの生体への投与は、脂質低下作用とは独立して LOX-1 の発現を抑制すること、生体内で動脈硬化、虚血再灌流による臓器障害を抑制することを示すとともに、抗 LOX-1 抗体の投与により白血球動態を制御することができ、炎症反応、虚血再灌流傷害による

心筋梗塞などの進行を抑制可能であることをラットの病態モデルにより示した。一方、酸化 LDL による内皮細胞のアポトーシスが Fas に依存しており、この反応が LOX-1 を介していることや、LOX-1 が樹状細胞に発現しており、LOX-1 分子を介して腫瘍抗原を提示させることにより効率よく腫瘍細胞の増殖を生体内で抑えることができることを示した。

LOX-1 のリガンド結合メカニズムについても解析を行い、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リ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、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. 考察とまとめ

考察

これらの結果は、スタチンが PPAR α /RXR α 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 κ 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 α /RXR α 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 μ 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 EC₅₀ 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。そのため、それぞれを GST 融合蛋白として精製し、リガンド依存性およびコアクチベータ依存性の結合実験や、リコンビナント PPAR \cdot RXR タンパク質を使ったバインディングアッセイ系を確立し、最終年度も引き続き、より低濃度で活性を示すリガンドの探索を行なう。

本年度までの研究により、LOX-1 が免疫系と深くかかわっていることが明らかになった。また LOX-1 の発現が薬剤により抑制されうることも明らかとなった。フィブラート系の薬剤による PPAR α を介した抗炎症作用が知られているが、本年度の結果を踏まえ、LOX-1 の発現をフィブラート系の薬剤により抑制できるかどうかを解析する。さらに最終段階にある LOX-1 遺伝子トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの解析について、内皮細胞機能、炎症、酸化ストレス、動脈硬化などの点についてさらに解析を進めたい。

まとめ

スタチンがフィブラートの PPAR α /RXR α 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 α /RXR α 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。LOX-1 の発現誘導が、酸化ストレスと強い関連があること、そしてそのリガンド認識機構が明らかになるとともに、生体防御や炎症・免疫と深いか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いききたい。

今年度までには、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し、同時に、LXR 活性化作用も検討する予定である。

5. 研究発表

- 1 Inoue I, Hayashi K, Yagasaki F, Nakamura K, Matsunaga T, Xu H, Inukai K, Awata T, Komoda T, Katayama S. Apoptosis of endothelial cells may be mediated by genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) and PPAR α . *J Atherosclero Thrombo* (in press)
- 2 Wilson SH, Chade AR, Feldstein A, Sawamura T, Napoli C, Lerman A, Lerman LO. Lipid-lowering independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolemia. *Nephrol Dial Transplant* (in press).
- 3 Matsunaga T, Nakajima T, Miyazaki T, Koyama I, Hokari S, Inoue I, Kawai S, Katayama S, Hirano K, Hokari S, Komoda T. Glycated high-density lipoprotein regulates reactive oxygen species and reactive nitrogen species in endothelial cells. *Metabolism* 52:42-9, 2003
- 4 Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T, Sawamura T.: Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):1274-79, 2003.
- 5 Kataoka K, Hasegawa K, Sawamura T, Fujita M, Yanazume T, Iwai-Kanai E, Kawamura T, Hirai T, Kita T, Nohara R.: LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 17;300(3):656-60, 2003.
- 6 Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:1635-9, 2002
- 7 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 α /RXR α and Decrease the Transactivation of NF κ B. *Biochem Biophys Res Commun*. 290: 131-139, 2002
- 8 Jono, T., Miyazaki A., Nagai R., Sawamura T., Kitamura T. and Horiuchi S.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett*, 511: 170-174, 2002.
- 9 Li, D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL.: Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther.*,302(2): 601-5, 2002.
- 10 Chen M, Masaki T, Sawamura T.: LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.*, 95(1):89, 2002.

- 11 Morawietz, H., Duerrschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin. Sci.*, 103Suppl 1:9S-12S, 2002.
- 12 Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura T., Bonnefoy J, Jeannin P. Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-Mediated Antigen Cross-Presentation. *Immunity*, 17(3):353, 2002.
- 13 Nakagawa, T., Akagi, M., Hoshikawa, H., Chen, M., Yasuda, T., Mukai, S., Ohsawa, K., Masakai, T., Nakamura, T., and Sawamura, T. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 46(9):2486-94, 2002.
- 14 Li D, Williams V, Liu L, Chen H, Sawamura T., Antakli T, Mehta JL. LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP1 and inflammation. *Am J physiol*, 283: H1795-801, 2002.
- 15 Imanishi T, Hano T, Sawamura T., Takarada S, Nishino I. Oxidized low density lipoprotein potentiation of Fas-induced apoptosis through lectin-like oxidized-low density lipoprotein receptor-1 in human umbilical vascular endothelial cells. *Circ J*. 66(11): 1060-4, 2002.
- 16 Nakagawa T, Yasuda T, Hoshikawa H, Chen M, Yasuda T, Mukai S, Ohsawa K, Masakai T, Nakamura T, Sawamura T. LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-included cell death---possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 91-97, 2002.
- 17 Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Sawamura T. Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death included by ischemia-reperfusion in the rat retina. *Arch Ophthalmol*, 120(12):1707-13, 2002.
- 18 Matsunaga T, Nakajima T, Sonoda M, Koyama I, Kawai S, 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
- 19 Inoue I., Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase (CuZn-SOD) and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50: 3-11, 2001
- 20 Matsunaga T, Iguchi K, Nakajima T, Koyama I, Miyazaki T, Inoue I., Kawai S, 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.
- 21 Halvorsen, B., Staff, A.C., Henriksen, T., Sawamura, T., and Ranheim, T.: 8-iso-Prostaglandin F₂ increases expression of LOX-1 in JAR cells. *Hypertension*, 37(4): 1184-1190, 2001.
- 22 White, S.J., Nicklin, S.A., Sawamura, T., and Baker, A.H.: Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension*, 37(2): 449-455, 2001.

- 23 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.
- 24 Nagase, M., Ando, K., Nagase, T., Kaname, S., Sawamura, T., and Fujita, T.: Redox-sensitive regulation of LOX-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(3): 720-725, 2001.
- 25 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.
- 26 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.
- 27 Chen, M., Kakutani, M., Narukko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T.: Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(1): 153-158, 2001.
- 28 Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.: LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol*, 166:5108-5114, 2001.
- 29 Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 499:215-219, 2001.
- 30 Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284:961-965, 2001.
- 31 Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin. *FEBS Lett*, 504:65-68, 2001.
- 32 Chen, M., Nagase, M., Fujita, T., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of lox-1 ligand and age. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:962-968, 2001.
- 33 Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Sawamura, T., Fujita, M., Yanazume, T., Toyokuni, S., Adachi, S., Kihara, Y. and Sasayama, S.: Activation of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circulation*, 104:2948-2954, 2001.

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし

- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし