

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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4内科
研究者 片山茂裕

研究要旨 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の 3 種類のサブタイプ (PPAR α 、 δ および γ) に対する特異的リガンドを探索するため、coactivator-dependent receptor ligand interaction assay (CARLA) 法を確立した。RXR/PPAR リガンドのスクリーニングを行った結果、有用な RXR リガンドは見出せなかったが、強い PPAR α リガンドを見出した。また、PPAR α のリガンドであるベザフィブラートは、TNF α 、PMA による肝細胞の IL-6 産生を濃度依存的に抑制した。酸化 LDL の受容体である LOX-1 遺伝子を過剰発現するマウスの系統を樹立し、ApoE 欠損マウスとの交配をし、冠動脈硬化の進行を明らかにした。酸化 LDL は PPARs のリガンドとなる脂質成分を含んでおり、今後 PPAR α との関連を探索する。

分担研究者

- (1) 埼玉医科大学第4内科 井上郁夫
- (2) 国立循環器センター研究所 沢村達也
- (3) トーアエイヨー株式会社福島研究所 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 草間 寛

A. 研究目的

核内受容体である PPAR(peroxisome proliferator activated receptor)には、 α ・ β/δ ・ γ の3種類があり、PPAR α のリガンドは抗高脂血症薬として使われているフィブラートであり、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チアゾリジンである。本研究は、PPAR α の抗動脈硬化作用を統合的に明らかにし、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。

B. 研究方法

1. PPARs のクローニングと assay 系の確立

ヒト全長 PPAR α ・ β/δ ・ γ 、RXR α 、LXR をクローニングし、各々のルシフェラーゼアッセイを確立し、PPAR α ・ β/δ ・ γ のリガンドを検索した。また、SRC-1あるいはCBP/p300をアクチベーターとしたPPARsの転写活性を評価するcoactivator-dependent receptor ligand interaction

assay (CARLA)も確立した。(埼玉医科大学 井上郁夫・片山茂裕、キッセイ薬品工業薬理研究所 草間 寛)

2. 新規化合物の探索

ヒト HMG Co-A synthase 遺伝子上流に同定されている RXR/PPAR 応答配列 (RXRE/PPRE) 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および、マウス acyl Co-A oxidase 遺伝子上流に同定されている RXR/PPAR 応答配列 (RXRE/PPRE) 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、このレポーターベクターと共に PPAR、RXR をコトランスフェクションした系によるルシフェラーゼアッセイにより、RXR 及び PPAR を活性化する化合物の探索を行った。RXR アゴニストである LG100268 をリード化合物として構造展開を行い、RXR 活性化作用や PPAR γ /RXR α 活性化作用を検討した。また、既に抗糖尿病作用の確認されている自社化合物のスクリーニングも行った。(トーアエイヨー株式会社福島研究所 探索研究第2課 林 健二)

3. PPAR α リガンドであるベザフィブラートの新たな薬効

PPAR α リガンドであるベザフィブラートの TNF α 、PMA による肝細胞の IL-6 産生に及ぼす影響を検討した。(キッセイ薬品工業薬理研究所 草間 寛)

4. LOX-1 と PPARs との関わり

LOX-1 遺伝子を過剰発現するマウスの系統を樹立した。このマウスと ApoE 欠損マウス

スとの交配を行い、動脈硬化の進展とその機序について検討した。(国立循環器センター 研究所室長 沢村達也)

C. 研究成果

1. PPARs のクローニングと assay 系の確立

SRC-1 あるいは CBP/p300 をアクチベーターとした PPARs の転写活性を評価する coactivator-dependent receptor ligand interaction assay (CARLA)も確立した。フィブレート類およびチアゾリジン類は、濃度依存的に、グルタチオン-S-セファロースビーズ上に固定化された精製済 GST-hPPAR α および GST-hPPAR γ LBD 融合タンパクに対する、*in vitro* translation ビオチン標識済みの CBP/p300 の結合をそれぞれ添加濃度依存に誘導したが、SRC-1 を用いた場合の誘導と異なった。今回の CARLA による成績より、PPAR α ・ β/δ ・ γ のリガンドの PPARs への結合能力は、アクチベーターの 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。

2. 新規化合物の探索

RXR リガンドである LG100268 をリードとした探索において、1 μ M では LG100268 と同等の活性を示す化合物が見出されたが、この化合物の PPAR γ /RXR α 活性化作用の EC₅₀ 値は 560nM (LG100268=約 20nM) であり、*db/db* マウス等における *in vivo* 試験 (30mg/kg を 1 週間経口投与) においては、ほとんど血糖値低下等の病態改善の効果が確認されなかった。そこで、既に抗糖尿病作用の確認されている自社化合物ライブラリーに対し、PPAR および RXR 活性化作用のスクリーニングを行ったところ、TY-50754 及びその周辺化合物において、強い PPAR α 活性化作用が確認された。また、本化合物群は PPAR β/δ 活性化作用も有しており、一部は弱いながらも RXR α 活性化作用が見られた。その一方で、PPAR γ 活性化作用はほとんど確認されなかった。強い活性化作用を示した化合物について、さらに PPAR α 活性化作用を精査したところ、その EC₅₀ 値は TY-50754 においては 93nM であり、TY-51079 (TY-50754 周辺化合物のうち抗糖尿病作用が最も化合物) においては 65.3nM であった。

3. PPAR α リガンドであるベザフィブレードの新たな薬効

TNF α , PMA による肝細胞の IL-6 産生を、

ベザフィブレードの前処置は濃度依存的に抑制し、300 μ mol/L の濃度において有意な IL-6 産生抑制が認められた。

4. LOX-1 と PPARs との関わり

LOX-1 遺伝子を過剰発現するマウスの系統を樹立した。このマウスと ApoE 欠損マウスとの交配をおこなった結果、ICAM-1、VCAM-1 のような接着分子の発現が高まると共に、酸化 LDL の血管壁への沈着、マクロファージの浸潤が有意に亢進し、冠動脈硬化の進行が早まることを明らかにした。酸化 LDL は PPARs のリガンドとなる脂質成分を含んでいることが知られている。LOX-1 はこのようなりガンドを細胞表面で結合する受容体として働き、血管内皮細胞の機能を変化させ、動脈硬化の進行に関わっていると予想されている。

D. 考察

我々が確立した CARLA は、技術的に簡便なアッセイ法で、多数の化合物のスクリーニングが可能であり、材料と時間の両方の観点から経済性に優れている。また、同一のリガンドであっても、CBP/p300 を介する CARLA と SRC-1 を介する CARLA は、用いるコアクチベーターにより、その活性が著しく異なる場合があり、今後、さらなる検討を必要とすると思われた。

LG100268 からの化合物展開では臨床的に有用な化合物を見出せなかったことから、異なる骨格からのアプローチのための足がかりとして自社ライブラリーからのスクリーニングを行い、強力な PPAR α リガンドを見出した。この一連の化合物群は抗糖尿病薬として十分な薬効を有していることに加え、既存の Pioglitazone 等のインスリン抵抗性改善薬を比較して、TG 低下作用が顕著であることを特徴としている。今回確認された強力な PPAR α 活性化作用がその TG 低下作用に寄与していることも考えられる。しかしながら、本化合物群には、マウスへの投与において強い肝障害が確認されており、現状では臨床応用は困難である。

最近 PPAR β/δ のリガンドが抗肥満作用を示すことが報告され、この面からの展開も期待される。

E. 結論

PPAR リガンドを同定するための新しい信頼性の高いアッセイとして CBP/p300 ある

いは SRC-1 を介する CARLA について確立した。今回の RXR/PPAR 応答配列 (RXRE/PPRE) 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複製し、このレポーターベクターと共に PPAR, RXR をコトランスフェクションした系によるルシフェラーゼアッセイによる検討では、臨床応用可能なレベルの活性を有する RXR リガンドを見つけることは出来なかった。その一方で、副作用が強いため、臨床応用は困難であるが、強力な PPAR α 活性化作用を有する化合物を見出した。今回見出された化合物は重篤な肝障害が臨床応用の際の問題点であることから、今後は本化合物群をリードとして副作用回避を主目的とした分子設計を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima T, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Inoue I, Katayama S, Nagata A and Komoda T. Characterization of the epitopes specific for a monoclonal antibody 9F5-3a and quantification of oxidized-HDL in human plasma. *Annals of Clinical Biochemistry* (in press)

Inoue I, Katayama S. The possible actions of drugs: PPAR α agonist, PPAR γ agonist, A HMG-CoA reductase inhibitor, ACE inhibitor, or Ca-antagonist on vascular endothelial cells as therapeutic targets. *Current Drug Target Cardiovascular and Hematological Disorders* (in press)

Nagasaka H, Kikuta H, Chiba H, Murano T, Harashima H, Ohtake A, Senzaki H, Sasaki N, Inoue I, Katayama S, Shirai K, Kobayashi K. Two cases with transient lipoprotein lipase (LPL) activity impairment: evidence for the possible involvement of an LPL inhibitor. *Eur J Pediatr* 162:132-8, 2003

Maruyama S, Kato K, Kodama M, Okura Y, Hirono S, Fuse K, Hanawa H, Nakagawa O, Nakazawa M, Miida T, Yaoita E, Yamamoto T, Inoue I, Aizawa Y. R167653 suppresses the progression of experimental autoimmune myocarditis. *Mol Cell Biochem* 246(1-2):39-44, 2003

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 Atherosclerosis Thrombo* 10: 192-201, 2003

Matsunaga T, Nakajima T, Miyazaki T, Koyama I, Hokari S, Inoue I, Kawai S, Shimomura H, Katayama S, Hara A, Komoda T. Glycated high-density lipoprotein regulates reactive oxygen species and reactive nitrogen species in endothelial cells. *Metabolism* 52:42-9, 2003

Tatsuguchi, M., Furutani, M., Hinagata, J., Tanaka, T., Furutani, Y., Imamura, S., Kawana, M., Masaki, T., Kasanuki, H., Sawamura, T. Matsuoka, R: Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 303:247-250 2003.

Li, D., Williams, V., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Romeo, F. Mehta, J.L.: Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41:1048-1055, 2003.

Li, D., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T. Mehta, J.L.: LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:816-821, 2003.

Wilson, S.H., Chade, A.R., Feldstein, A., Sawamura, T., Napoli, C., Lerman, A. Lerman, L.O.: Lipid-lowering-independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 18:703-709, 2003.

Rodriguez-Porcel, M., Lerman, L.O., Herrmann, J., Sawamura, T., Napoli, C. Lerman, A.: Hypercholesterolemia and hypertension have synergistic deleterious effects on coronary endothelial function. *Cardiovasc Res*58:213-221, 2003.

Chade, A.R., Rodriguez-Porcel, M., Grande, J.P., Zhu, X., Sica, V., Napoli, C., Sawamura, T., Textor, S.C., Lerman, A. Lerman, L.O.: Mechanisms of renal structural alterations in combined hypercholesterolemia and renal artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1295-1301, 2003.

Li, L., Sawamura, T. Renier, G.: Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium. *Diabetes* 52:1843-1850, 2003.

Hu, B., Li, D., Sawamura, T. Mehta, J.L.: Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 307:1008-1012, 2003.

Chade, A.R., Best, P.J., Rodriguez-Porcel, M., Herrmann, J., Zhu, X., Sawamura, T., Napoli, C., Lerman, A. Lerman, L.O.: Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. *Kidney Int* 64:962-969, 2003.

Cominacini, L., Fratta Pasini, A.,

Garbin, U., Nava, C., Davoli, A., Criscuoli, M., Crea, A., Sawamura, T. Lo Cascio, V.: Nebivolol and its 4-keto derivative increase nitric oxide in endothelial cells by reducing its oxidative inactivation. *J Am Coll Cardiol* 42:1838-1844, 2003.

Kuhlmann, C.R., Schafer, M., Li, F., Sawamura, T., Tillmanns, H., Waldecker, B. Wiecha, J.: Modulation of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels by oxidized LDL and its contribution to endothelial proliferation. *Cardiovasc Res* 60:626-634. 2003.

2. 学会発表

第 35 回日本動脈硬化学会総会(平成 15 年 9 月 27 日)

埼玉医科大学第四内科井上 郁夫、
シンポジウム 3、スタチン、PPAR リガ
ンドの多面的作用 PPARs/RXR α と時計
遺伝子(BMAL1/CLOCK)のクロストーク

第13回国際動脈硬化学会(国立京都国際会館
2003年10月)

沢村達也

LOX-1 in atherosclerosis and
inflammatory diseases

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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