

ベルベリン誘導体による PPAR α / γ デュアルアゴニスト作用と糖尿病治療への応用

野伏 康仁

日本大学薬学部 医療薬学研究室

【研究目的】

核内受容体 PPAR γ のフルアゴニストであるチアゾリジン誘導体 (TZDs) は、脂肪細胞の機能を正常化させることにより、血糖降下作用を示す。しかし TZDs には脂質異常症の改善効果はほとんどないことに加え、PPAR γ の過剰な転写活性化に起因した体重増加や体液量増加による浮腫及び心不全などのリスクが懸念されている。これらの背景に、パーシャルな PPAR γ アゴニスト作用による血糖降下作用に PPAR α アゴニスト作用による脂質代謝改善作用を付加させた PPAR α / γ デュアルアゴニスト研究が行われている。近年、植物由来成分から PPAR γ アゴニスト作用を示す化合物がいくつか特定され、なおかつその活性は TZDs と比較してパーシャルな PPAR γ アゴニスト作用を示すものが多い。オウレンなどの天然物に含まれるベルベリンは、PPAR γ 活性の抑制作用に加え、体重増加抑制及び脂質代謝改善作用などの PPAR α アゴニスト作用を示すといった特徴を有している。申請者が所持するベルベリン誘導体の中に、PPAR γ の標的遺伝子の発現量を増加させる化合物を見出した。このことは、誘導体化により PPAR γ アゴニスト作用を獲得したことが推察できる。本研究では、パーシャルな PPAR γ アゴニスト作用を示すベルベリン誘導体を明らかにすることを目的とする。

【研究結果および研究経過】

ベルベリンは、PPAR γ 活性の抑制作用を介して脂肪蓄積抑制効果が知られている。そこで、脂肪細胞分化誘導と共に、4 μ M のベルベリンを 6 日間処理したところ、DMSO を処理した Control 細胞に比較して中性脂肪を蓄積した細胞の数が少ないことが顕鏡下で観察され、さらに定量的にも脂肪滴蓄積量の有意な減少が示された。すなわち、ベルベリンは前駆脂肪細胞から脂肪細胞分化に伴う中性脂肪の蓄積を抑制することが示された。また、上記と同様に 49 種のベルベリン誘導体を処理したところ、3 種の誘導体においてベルベリンと比較して強い脂肪蓄積の抑制効果が認められた。

ベルベリンには体重増加抑制及び脂質代謝改善作用などの PPAR α 活性化作用が既に報告されている。申請者は、ベルベリンの 13 位をエチル基で置換した誘導体に低い PPAR γ の標的遺伝子の発現量を増加させることを見出している。そこで、脂肪細胞分化誘導と共に、10 μ M のベルベリンを 6 日間処理したところ、13 位をエチル基で置換した誘導体以外の 5 種の誘導体においても小型脂肪細胞への分化を促進させることが形態学的及び分化マーカーである PPAR γ の遺伝子発現量の観点からも観察された。PPAR γ の活性化は、肥大化した脂肪細胞に細胞死を誘導させるとともに、前駆から小型脂肪細胞への分化を促進することで脂肪細胞の小型化を引き起こす。3T3-L1 前駆脂肪細胞を白色脂肪細胞へと分化誘導した後、ベルベリン誘導体または Control (DMSO) を 4 日間処理して生細胞数及び Oil red O 染色により測定した。その結果、ベルベリン誘導体は細胞死誘導作用及び脂肪細胞の小型化には影響をしていないことが示された。また、6 種の誘導体を白色脂肪細胞に 8 日間処理した細胞において、PPAR γ 及び PPAR α の遺伝子発現量を測定した。その結果、6 種の誘導体において、PPAR γ 発現量は Control 細胞に比較して有意な増加が示された。また、ピオグリタゾン処理した細胞に比較して PPAR γ 遺伝子の発現誘導は弱いものであった。一方で、3 種の誘導体において、PPAR α 発現量は Control 細胞に比較して有意な増加が示された。以上の結果から、3 種の誘導体において低いアゴニスト活性によって心不全などの副作用の軽減を考慮し、PPAR α/γ デュアルアゴニスト活性に基づいた新たな糖尿病治療薬としての可能性が示唆された。

PPAR α/γ デュアルアゴニスト活性及び最適濃度を検証するため、C57BL/6J マウスにベルベリン誘導体あるいはベルベリンを 5 日間投与し、脂肪組織(精巣上体周囲)ならびに肝臓における PPAR α 及び PPAR γ の標的遺伝子の発現量を測定した。その結果、脂肪組織ならびに肝臓における PPAR α 及び PPAR γ 等の遺伝子発現量に有意な差は認められなかった。

近年、白色脂肪組織においてミトコンドリアに富み、脱共役タンパク質 Uncoupling protein (Ucp1) を介して熱産生するベージュ脂肪細胞が誘導されることが明らかにされ、新たな脂質燃焼機構として注視されている。ベルベリン誘導体を成熟白色脂肪細胞に 8 日間処理したところ、ベージュ化マーカーである Ucp1 遺伝子発現量は、Control 細胞のそれと比較して有意に増加を示した。また、ピオグリタゾン処理した細胞と比較して Ucp1 遺伝子の発現誘導は軽度なものであった。この結果から、白色脂肪細胞からベージュ脂肪細胞への形質転換促進作用を示す有能な化合物であることが示された。

【本研究の今後の発展性、期待される点(本研究結果の学術的価値や今後の外部資金獲得目標等)】

本研究より、ベルベリンを誘導体化した 3 種の化合物において脂肪蓄積の抑制作用の増強が認められ、より低濃度での肥満予防薬としての応用が期待できる。また、異なる 3 種のベルベリン誘導体において、PPAR α/γ デュアルアゴニスト活性に基づいた新たな糖尿病治療薬としての可能性が示唆された。しかしながら、マウスを用いた研究において有意な差は認められなかった。今後、投与条件などの再検討を行い、PPAR γ の過剰な転写活性化による体重増加や脂質代謝を改善できる安全性の高い PPAR α/γ デュアルアゴニストの創製を目指す。PPAR α/γ デュアルアゴニスト活性を示したベルベリン誘導体の作用及び性質については、現在も *In vitro* 及び *In vivo* での解析を続けている。また、本化合物はパーシャルな PPAR γ アゴニスト作用を期待できるため、PPAR γ を創薬標的とした癌や肥満、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、アルツハイマー病治療薬としての可能性も秘めている。

ベージュ脂肪細胞は、熱産生能を介して脂肪細胞内に蓄積した脂質を燃焼し、エネルギー消費率を高めることから、肥満対策の新たな治療標的として注目されている。肥満の解消に向け、ベージュ脂肪細胞に特異的に誘導する成分探索が活発に行われているが、十分な安全性と有効性を備えた成分は未だ得られていない。申請者は、白色脂肪細胞からベージュ脂肪

細胞への形質転換促進作用を示す 6 種のベルベリン誘導体を見出しました。今後、ベルベリン誘導体の構造活性相関の更なる解明により、ベージュ化促進作用を介した肥満治療薬の分子基盤を新たに提供するとともに、有能なシード化合物となることが期待できる。

【外部研究費の獲得を主眼とし、本研究の外部発信予定について(これまであるいは今後の学会発表や論文投稿・特許申請等)】

脂肪蓄積の抑制効果が認められたベルベリン誘導体については、日本薬学会第 144 年会にて発表予定である。また現在投稿論文を準備している。PPAR α/γ デュアルアゴニスト活性が示唆されたベルベリン誘導体については、現在も動物を用いた研究や前駆脂肪細胞からのベージュ脂肪細胞分化誘導能について解析を進めている。特許申請を検討しながら、学会発表や学術論文を作成する。さらにデータを集積し、新規 PPAR α/γ デュアルアゴニストによるベージュ化作用を介した肥満治療薬としての研究で科学研究費助成事業 基盤研究 (C)や公益財団法人武田科学振興財団の研究費に申請する予定である。