

自然免疫受容体 TLR または核内受容体 FXR シグナルの活性化に関する研究
-鹿角霊芝由来ルシデニン酸類と SLRP family タンパク質 Tsukushi に着目して-

分子機能薬学専攻 遺伝子機能応用学分野 渡邊 健司

近年、創薬の標的として、自然免疫に関わる受容体である Toll-like receptor (TLR) と、代謝反応を制御する核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) が注目されている。TLR は、宿主の自然免疫関連細胞に発現する受容体であり、さまざまな病原体の構成成分 (PAMPs) や、細胞傷害、アポトーシスによって遊離される内因性因子 (DAMPs) を認識して活性化され、サイトカインを産生することで生体防御に寄与する。一方、FXR は、胆汁酸をリガンドとする核内受容体の一つであり、その肝臓における活性化は、血中の脂質代謝や糖代謝を改善する作用を有することが明らかとなってきた。本研究では、TLR または FXR シグナルを調節する因子の探索を究極の目的とし、第 1 に、古来より免疫賦活・代謝調節効果がうたわれてきた鹿角霊芝に着目し、そのトリテルペン抽出画分 (TE: triterpene extract) からの TLR・FXR シグナル活性化因子の分離・精製・同定とその機能解析を行った。また、第 2 に、近年、自然免疫への関与が多く報告されている small leucine rich proteoglycan (SLRP) family タンパク質の一つで、その免疫学的機能が明らかでない Tsukushi (TSK) に着目し、TLR シグナルに対する影響について、種々の検討を行った。

1) 熊本県産鹿角霊芝由来トリテルペン抽出画分 (TE) からのルシデニン酸類の同定と TLR シグナル活性化に対する影響

鹿角霊芝は、古来より不老長寿の妙薬とされて重宝されてきた霊芝の一つであり、多様な疾病に有効とされている。鹿角霊芝は、一般の霊芝と比べて、希少価値が高いのみならず、その含有成分や効能においてもユニークな特徴を有する。さらに興味深いことに、大量栽培法の確立により研究が盛んに行われるようになった結果、用いる菌株や栽培環境に応じて、含有成分が大きく異なることも明らかとなってきた。そこで、本研究では、鹿角霊芝の有する種々の作用の本体を明らかにすることを究極の目的とし、熊本県産鹿角霊芝を試料とし、機能性成分を多く含有するトリテルペン抽出画分 (TE) に着目した。本検討では、まず、TE および精製成分による自然免疫賦活作用の詳細を明らかにするため、自然免疫関連受容体 TLR シグナルに対する影響を評価した。

まず、熊本県産鹿角霊芝よりトリテルペン画分を抽出し、含有成分を HPLC 法により分析した。その結果、TE には、既報のガノデリン酸類ではなく、ルシデニン酸類を多く含有することが明らかになった。次に、ヒト単球様細胞 THP-1 細胞を用いて、TE による自然免疫活性化効果について検討した。その結果、TE は、単独または TLR4 を活性化する LPS によって誘導されるサイトカイン産生能を増強することが示された。このとき、TE は、LPS 誘導性の p38 活性化を増強し、一方、JNK 活性化を抑制することで、自然免疫賦活作用を発揮することが示唆された。さらに、その作用の本体の特定を試みたところ、TE 中に最も多く含まれる Lucidenic acid A, D₂, F を同定し、中でも、Lucidenic acid A が JNK 活性化を抑制し、Lucidenic acid F が、p38 の活性化を増強する本体であることを明らかにした。

2) TEからのさらなる成分の分離・精製・同定と FXR シグナル活性化に対する影響

前項の結果より、TE は、ルシデニン酸類を多く含有するユニークな組成であることが明らかとなった。また、最近の報告で、霊芝由来のトリテルペン成分が、核内受容体である FXR のリガンドとなることが示唆された。これらの点に鑑み、本検討では、TE からのさらなる成分の分離・精製・同定を行い、さらに、脂質代謝・糖代謝に対する作用の詳細を明らかにするため、FXR シグナル活性化に対する影響を評価した。

まず、TE による FXR 活性化効果について検討した。その結果、TE は、ヒト肝細胞株 HepG2 細胞における CYP7A1 遺伝子の発現を減少させたことから、FXR 活性化作用を有することが明らかになった。また、TE に含まれるさらなる成分の同定を試みた結果、新たに、Lucidenic acid B, E₂, Q を同定した。ここで、前項で抽出した Lucidenic acid A, D₂, F とこれらの成分を合わせ、スクリーニングを行ったところ、Lucidenic acid D₂, Q が、FXR 活性化作用を有することが明らかになった。

次に、FXR 活性化が直接的に糖代謝を改善するか否かを明らかにするため、既存の FXR リガンドである胆汁酸成分 Chenodeoxycholic acid (CDCA) 処置後のインスリンシグナルについて検討した。その結果、CDCA は、濃度依存的にインスリン刺激下の Akt のリン酸化を増強し、さらに、インスリン抵抗性状態を反映した高グルコース負荷 HepG2 細胞における Akt のリン酸化も、正常レベルまで回復させた。興味深いことに、TE も、CDCA と同様にインスリンシグナルを増強することを見出し、このとき、FXR 活性化作用を有した Lucidenic acid D₂, Q のみが、インスリンシグナルを増強することを明らかにした。

3) SLRP family 蛋白質 TSK による TLR4 シグナル抑制作用

TSK は、主に細胞外マトリックスの構成成分となる分泌蛋白質の一つである。TSK は、特に発生初期において、種々の器官発生に関わるシグナル分子と相互作用し、発生制御に関わることが知られているが、発生期以降における機能やその発現調節などに関する詳細は、ほとんど明らかではない。そこで本検討では、特に、近年、他の SLRP family 分子との相互作用の報告がある LPS-TLR4 シグナルにおける TSK の役割について検討した。

まず、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) を用いて、LPS シグナルにおける TSK の機能を確認した。その結果、TSK は LPS 誘導性の TNF α 産生を抑制することがわかった。次に、TSK の有無による下流シグナル応答の違いについて検討したところ、TSK は p38 の活性化抑制を介して TNF α 産生抑制効果を示すことを明らかにした。また、LPS による TNF α の産生が病態形成に大きく寄与する LPS shock model を用いた検討の結果、TSK $-/-$ マウスへの LPS 腹腔内投与は、TSK $+/+$ マウスに対する実験群と比較して、マウス生存率を有意に低下させた。このとき、TSK $-/-$ マウスの臓器では、TSK $+/+$ マウスのものと比較して TNF α mRNA の発現が顕著に上昇していた。以上の結果より、TSK は、in vitro, in vivo において LPS-TLR4 シグナルを負に制御することを示した。

以上、本研究は、熊本産鹿角霊芝中の TE および TE 中のルシデニン酸類の一部が TLR・FXR シグナルを活性化することを初めて見出し、また、TLR シグナルを負に制御する内因性因子として TSK を初めて同定した。本知見は、TLR・FXR の活性化調節に対して基礎的知見を提供するものであり、免疫関連薬・糖代謝改善治療薬開発の一助となるものである。