

博士(生命科学) 定金千春

学位論文題名

新規植物成分誘導体の抗腎疾患ならびに抗大腸炎効果に関する基礎研究

学位論文内容の要旨

2010年12月末時点における日本の慢性腎不全の患者数は29万人を超え、なお年々増加の一途を辿っている。それに伴う透析医療の増加は医療経済を圧迫しており、腎不全への進行にブレーキをかける薬剤の1日も早い開発が望まれている。慢性腎不全へ移行する腎疾患のうち、慢性糸球体腎炎は、メサンギウム増殖性糸球体腎炎(IgA腎症、非IgA腎症)、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎などに分類されるが、我が国においてはIgA腎症の罹患率が最も多い。その発症進展に免疫機序が関わっていることは周知の事実であるが、その発症原因を特定できておらず、現在、これら慢性糸球体腎炎に対する根本的な治療薬は存在していない。また、潰瘍性大腸炎は大腸に炎症が持続する原因不明の慢性炎症性疾患であり、慢性糸球体腎炎と同様に根本的な治療薬が存在しない疾患である。

アクテオサイドは、チョロギやフジテンニンソウ、地黄などの生薬および植物に含有されるポリフェノールの一種であり、これまでに腎炎に対する効果が見出されてきている。我々はアクテオサイドを慢性糸球体腎炎治療薬としてのシード化合物として位置付け、transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 1に対する効果を指標として合成展開を行い、活性化合物を見出してきた。

本研究では、アクテオサイド誘導体 TJN-259 のマウス IgA 腎症モデルに対する効果の検討および IgA 腎症と類似の病理変化を有するラットの抗 Thy-1 腎炎モデルに対するアクテオサイド誘導体 TJN-598 有効性を検討し、その薬効メカニズム解明を試みた。さらに、アクテオサイド誘導体 TJN-419 について、潰瘍性大腸炎に対する有効性に関して検討を行うとともに、マウスおよびラットの DSS 腸炎モデルにおける、炎症性サイトカイン IL-12 の関与を解析した。

【TJN-259 の抗 IgA 腎症作用】

本研究では、TJN-259 の自然発症型 IgA 腎症ならびに加速型 IgA 腎症に対する治療効果について、TGF- $\beta$ 1に対する作用を中心に検討を行った。IgA 腎症の自然発症モデルとして 28 週齢 ddY マウスを用いた。自然発症 IgA 腎症モデルマウスに対し、TJN-259 の効果についてメサンギウム領域の拡大および糸球体断面あたりの核数に対する作用を解析した。また、ddY マウスへの右腎動脈結紮とカーボンおよびウシ グロブリン投与により加速型 IgA 腎症モデルマウスを作製し、TJN-259 の効果について検討を行った。

TJN-259 の投与は、自然発症ならびに加速型 IgA 腎症マウスに対してメサンギウム拡大等、各病理学的指標に対して改善効果を示した。さらに、TJN-259 は、加速型 IgA 腎症の糸球体における TGF- $\beta$ 1 免疫組織学的発現の増加を抑制し、腎組織中の total および成熟型 TGF- $\beta$ 1 産生量を抑制した。

これらの結果から、TJN-259 は、腎炎治療薬候補としての可能性を示した。さらに、TJN-259 の IgA 腎症改善効果は、糸球体における TGF- $\beta$ 1 の産生のみならず、その活性化を抑制し、メサンギウムマトリクスの蓄積増加を減弱させるこ

とによるものと推測された。

#### 【TJN-598 の抗 Thy-1 腎炎作用】

ラットのメサンギウム増殖性腎炎のモデル系である抗 Thy-1 腎炎を用いて TJN-259 関連化合物の検討を行った。TJN-598 は、TJN-259 の後継化合物である。TJN-598 の phosphodiesterase(PDE)IV に対する阻害活性、および、抗 Thy-1 腎炎ラットにおいて誘発されるメサンギウム増殖に対する効果について検討した。さらに、抗 Thy-1 腎炎マウス由来单離糸球体における腫瘍壞死因子(TNF)- $\alpha$  と TGF- $\beta$ 1 の産生に対する効果を調査した。

アクテオサイド誘導体 TJN-598 は、抗 Thy-1 腎炎における糸球体域中のメサンギウム域比率、糸球体細胞数およびマトリクス蓄積を抑制し、メサンギウム拡大を阻害することが示された。本腎炎モデルラットでは、糸球体への炎症性細胞の浸潤が確認され、TJN-598 は、その单離糸球体からの成熟型 TGF- $\beta$ 1 ならびに TNF- $\alpha$  の産生を有意に抑制した。さらに、*in vitro* アッセイの結果より、TJN-598 は、PDEIV 阻害活性を有することが判明した。

TJN-598 は、抗 Thy-1 腎炎モデルラットのメサンギウム拡大に対して改善効果を発揮したが、その作用は、腎炎糸球体に浸潤した炎症性細胞からの TNF- $\alpha$  産生を PDEIV 阻害により抑制することによるものである可能性が示された。

#### 【TJN-419 の抗 DDS 誘発性大腸炎作用】

アクテオサイドは潰瘍性大腸炎の動物モデルである DSS 起起性大腸炎に対しても有効性が報告されていることから、その誘導体である TJN-419 の DSS 起起性大腸炎に対する効果を検討した。また、大腸炎の進行における炎症性サイトカイン IL-12 の関与について検討を行った。

DSS 大腸炎を惹起したマウスの大腸ならびに盲腸における IL-12 の発現を免疫染色法により解析した結果、大腸炎惹起 7 日目の両部位では、マクロファージと推測される浸潤細胞において明らかに IL-12 陽性細胞が増加していた。次に、DSS 腸炎マウスの大腸組織中における IL-12 と IL-10 発現レベルの経時変化を ELISA 法により解析した。その結果、IL-12 濃度は大きく増加している一方で、IL-10 濃度は顕著に低下しており、Th1/Th2 のインバランスが認められた。抗 IL-12 中和抗体の投与は、DSS 誘発性大腸炎における病態症状の発現(Clinical index)を抑制し、TJN-419 の投与もそれと同様の改善効果が認められた。また、TJN-419 は大腸組織からの IL-12 産生を有意に抑制し、直腸の潰瘍面積を縮小させた。リポポリサッカライドで刺激された培養マクロファージにおける IL-12 産生は、TJN-419 の添加によって濃度依存的に抑制された。

これらの結果は、IL-12 が DSS 誘発性大腸炎の進展に重要な役割を果たしていることを示唆し、TJN-419 が IL-12 の産生抑制を介して本大腸炎モデルの治療に効果を発揮することを示すものである。

今回の研究により、植物成分由来の新規化合物 TJN-259、TJN-598 および TJN-419 は、抗腎症および抗大腸炎作用を有することが明らかとなった。共に、難治性として治療が困難である疾患のモデルに対する効果であり、これらのモデルにおける各種サイトカイン等生体内物質の関与についてもその役割の一部が明確にされ、今後の医薬品研究に対し、有意義な成果であるといえる。

# 学位論文審査の要旨

主　查　教　授　武　田　宏　司  
副　查　教　授　南　雅　文  
副　查　教　授　菅　原　満  
副　查　准教授　金　田　勝　幸

## 学位論文題名

### 新規植物成分誘導体の抗腎疾患ならびに抗大腸炎効果に関する基礎研究

慢性糸球体腎炎および炎症性腸疾患は、原因不明の慢性炎症性疾患であり、根本的な治療薬が存在しない。本論文は、このような現況にある慢性糸球体腎炎および炎症性腸疾患に対する動物モデルを用い、各種サイトカインの関与と、植物成分であるアクトオサイド由来の新規化合物 TJN-259、TJN-598 および TJN-419 の抗腎症および抗腸炎作用を研究し、慢性糸球体腎炎および炎症性腸疾患に対する新規治療薬の開発上の有益な知見を得ることを目的として行われたものである。

第一章では TJN-259 の抗 IgA 腎症作用が検討された。自然発症 IgA 腎症モデルマウス (ddY マウス) では、メサンギウム領域の拡大およびメサンギウム細胞数の増加が認められたが、TJN-259 投与は有意にこれらの変化を抑制した。ddY マウスに対し、右腎動脈結紮とカーボンおよびウシーグロブリン投与を行って作製した加速型 IgA 腎症モデルマウスでは、血清クレアチニンが約 1.5 倍に増加したが、TJN-259 投与は血清クレアチニンの上昇を有意に抑制した。病理学的検索では、加速型 IgA 腎症マウスにおいてメサンギウム領域の拡大、半月体形成および分節性糸球体硬化の発生が認められたが、TJN-259 投与はこれらの変化を有意に抑制した。TJN-259 投与は、糸球体における collagen type IV および TGF- $\beta$  1 の染色スコア、腎組織中 TGF- $\beta$  1 蛋白濃度、特に成熟型 TGF- $\beta$  1 蛋白濃度を有意に低下させ、その抗腎症作用の機序として、TGF- $\beta$  1 の産生抑制が示唆された。

第二章ではメサンギウム増殖性腎炎のモデルである抗 Thy-1 腎炎を用い、TJN-259 の後継化合物である TJN-598 の抗腎症効果が検討された。本モデルでは、メサンギウム域の拡大、メサンギウム細胞数および基質の増加、糸球体への单球系細胞の浸潤、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞の増加、TGF- $\beta$  1 染色性の増加などが確認されたが、TJN-598 はこれらの変化を有意に抑制した。また TJN-598 は、単離糸球体からの成熟型 TGF- $\beta$  1 および TNF- $\alpha$  の産生、LPS 刺激腹腔マクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生を有意に抑制した。さらに、TJN-598 は、用量依存的かつ選択性 phosphodiesterase(PDE)IV 阻害活性 ( $IC_{50}$  値  $2.3 \mu\text{mol/l}$ ) を示した。以上より、TJN-598 は、抗 Thy-1 腎炎に対して抗腎症作用を有すること、その作用は PDEIV 阻害により腎炎糸球体に浸潤した炎症性細胞からの TNF- $\alpha$  産生を抑制することによるものである可能性が示された。

第三章では TJN-419 の抗 DSS 腸炎作用が検討された。アクテオサイドは炎症性腸疾患の動物モデルである DSS 腸炎に対して有効性が報告されていることから、その誘導体である TJN-419 の DSS 腸炎に対する効果を、IL-12 に注目して検討した。DSS 腸炎惹起 7 日目の大腸および盲腸粘膜では、IL-12 陽性の浸潤細胞が増加し、ELISA による検討では、IL-12(p70) が著増し IL-10 が顕著に低下していた。抗 IL-12 中和抗体の投与は、DSS 腸炎における臨床スコアを有意に抑制した。TJN-419 は DSS 腸炎惹起大腸組織からの IL-12 産生を有意に抑制し、臨床スコアおよび潰瘍面積を有意に縮小させた。さらに、TJN-419 は LPS で刺激された腹腔マクロファージからの IL-12 (p70, p40) 産生を濃度依存的に抑制した。以上の結果は、IL-12 が DSS 腸炎の進展に重要な役割を果たしていること、TJN-419 が IL-12 の産生抑制を介して本腸炎モデルに効果を発揮したことを示唆する。

これを要するに、著者は、難治性疾患である慢性糸球体腎炎および炎症性腸疾患の動物モデルを用いて、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  および IL-12 の関与を明らかにし、植物成分由来の新規化合物 TJN-259、TJN-598 および TJN-419 が、これらのサイトカインの産生を抑制することにより抗腎症および抗腸炎作用を発揮するとの新知見を得たものである。本研究で得られた知見は、難治性疾患である慢性糸球体腎炎および炎症性腸疾患に対する新規治療薬の開発に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。