

静岡県特産みかん果皮成分ノビレチン類縁体の機能性評価

(研究代業者)

静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野

助教 砂川 陽一

【背景・目的】

心疾患は日本人の死亡原因の中で悪性新生物に次いで第2位に位置し、2010年には年間約19万人の患者が亡くなっている。このように、心疾患は日本国民の疾病における大きな位置を占めている。中でも心不全は増加しつつある高血圧性心疾患や心筋梗塞、狭心症などの虚血性心疾患をはじめとしたあらゆる心疾患の最終像と位置付けられており、心不全は心疾患死亡患者の主たる死亡原因となっている。

これまで、心不全に対する薬物療法は β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) (13-15)、アンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB) といった高血圧や心筋梗塞などの種々のストレスによって亢進した神経・体液性因子をターゲットに行われてきた。これらの薬物を用いることにより5年生存率の改善などを認めるが、心不全患者予後は悪く、全体での5年生存率は依然として50%程度であり予後は不良である。そのため、患者のQOL改善や医療費軽減の観点からも、新規心不全治療薬の開発は、臨床的・社会的に重要である。

申請者らは静岡県での生産量が多い温州みかんに着目し、その有効成分の解析を行ってきた。特に、現代人が直面している疾患である生活習慣病（糖尿病、肥満、高血圧など）、ガン、アレルギー疾患（花粉症など）、アルツハイマー病、脳ストレスなどに対して、温州みかん果皮抽出物のノビレチンが有効であることが見出されている。この中でも申請者はノビレチンが心筋細胞の肥大及び心筋梗塞後の左室リモデリング、心機能の低下を改善させることを見出しており、心不全の治療や予防的効果を狙った臨床応用が期待される。しかしながら、みかん果皮に含有しているノビレチンは収穫時期によりいくつかのメトキシ基が脱メトキシ化された類縁体として存在している。また、生体内では代謝を受けることで多数の脱メトキシ化類縁体として存在している。これら類縁体がノビレチンと比較して活性の差があるのかどうかよく分かっていない。共同研究機関である東海大学の浅川倫宏准教授はノビレチンの効率的な合成方法の開発に成功しており、この合成系を利用した多数のノビレチン類縁体の合成を実現させた。このように合成化されたノビレチン類縁体を活用することで、他の研究施設では実施不可能な研究を

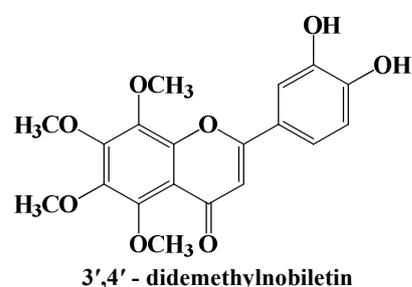
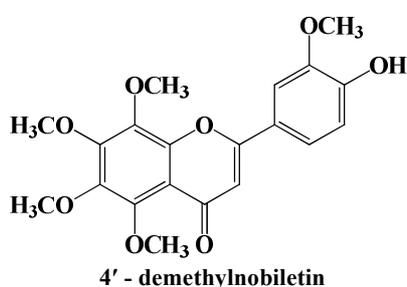
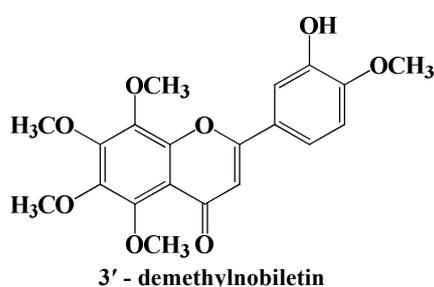
遂行することが可能となった。

そこで本研究では、化学合成したノビレチンの代謝産物を用いて、ノビレチンの心筋細胞肥大抑制作用の比較検討を行った。

【方法】

今回用いたノビレチンの代謝産物とその構造式は下記の通りである。

| | |
|-------------------------|------------------|
| 3' - demethylノビレチン | 東海大学 浅川倫宏准教授より提供 |
| 4' - demethylノビレチン | |
| 3',4' - didemethylノビレチン | |



これらノビレチン誘導体やノビレチンは100 mMとなるようにDMSOに溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。コントロールとして、溶媒であるDMSOを使用した。

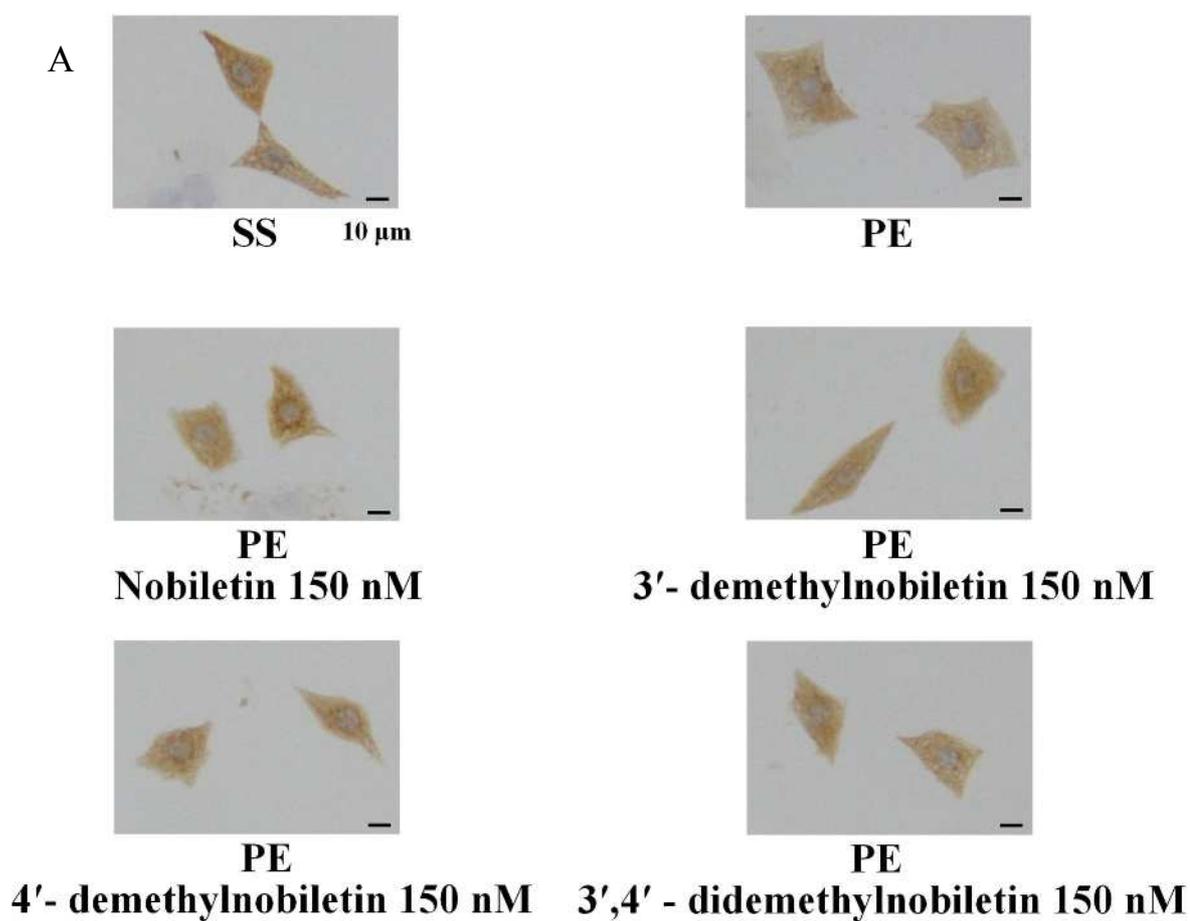
1~2日齢の新生児ラットから心臓を摘出、コラゲナーゼ/パンクレアチン溶液により心筋細胞を単離、培養Wellに播種し、36時間CO₂インキュベーターにて培養した。その後、ノビレチンやその誘導体を10、150 nMにて処理し、その2時間後にα1アゴニストであるフェニレフリン (PE ; 30 μM) 刺激を行った。48時間培養後、10%ホルマリン溶液にて固定を行い、anti-β-MHC抗体で免疫染色を行い、β-MHC陽性心筋細胞を呈色させた。その後顕微鏡下にてβ-MHC陽性心筋細胞の形態を観察、撮影した。無作為に選んだ細胞40個の面積をImage J 1.42を用いて測定した。

【結果】

ノビレチン代謝物はPE誘導性の心筋細胞肥大をノビレチンと同様に抑制した

ノビレチンは吸収後、肝臓で代謝をうけデメチル化代謝物になる。そこで、ノビレチン代謝物もノビレチンと同様に心筋細胞肥大抑制効果があるか検討を行った。PE刺激により心筋細胞肥大を誘導する系にノビレチンならびに3' - demethylnobiletin, 4' - demethylnobiletin, 3',4' - didemethylnobiletinを投与した。その後、免疫染色し、心筋細胞面積の測定によりその効果を評価した。その結果、PE刺激により心筋細胞が肥大した

(1.31倍, $p < 0.01$) が、ノビレチン ($p < 0.01$) ならびに3' - demethylnobiletin (1.16倍, $p < 0.05$), 4' - demethylnobiletin (1.06倍, $p < 0.01$), 3',4' - didemethylnobiletin (1.10倍, $p < 0.01$) は、それぞれこれを有意に抑制した (Fig. B)。なお、ノビレチンとノビレチン代謝物間で肥大抑制効果に有意な差はなかった。



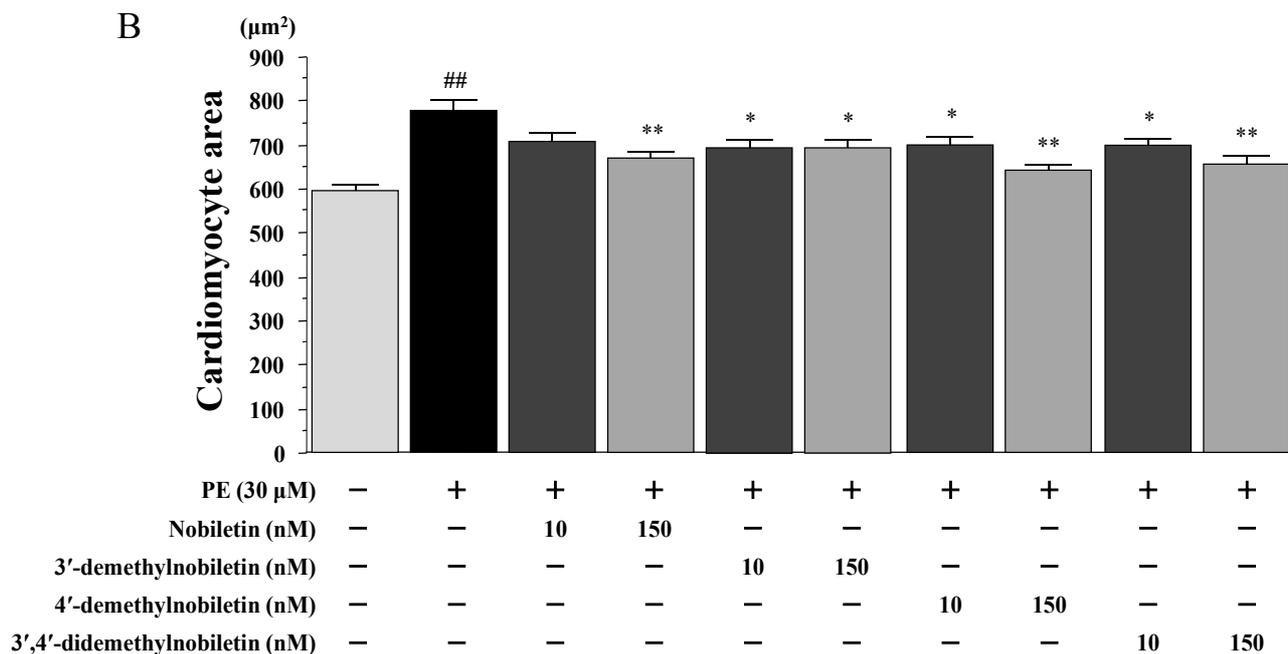


Fig. ノビレチン代謝物はPE誘導性の心筋細胞肥大をノビレチンと同様に抑制した

培養心筋細胞にノビレチンとその代謝物 (3' - didemethylnobiletin, 4' - didemethylnobiletin, 3',4' - didemethylnobiletin) で前処理 (10, 150 nM) を行い、2時間後にPE刺激 (30 µM) により肥大を誘導した。刺激48時間後、β-MHC抗体で免疫染色を行い、細胞写真を撮影し、無作為に選んだ細胞40個の面積をImage J 1.42を用いて測定した。A. 代表的な細胞写真。

B. 細胞面積の定量化した結果。*: $p < 0.05$ vs. PE, **: $p < 0.01$ vs. PE, ##: $p < 0.01$ vs. Control

【考察】

申請者らの研究成果により、これまでノビレチンがPE誘導性の心筋細胞肥大ならびに肥大反応遺伝子のプロモーター活性亢進を150 nMという低濃度で抑制することを見出した。今回、その評価系を用いて、ノビレチンの代謝産物の効果を検討した。そして3' - demethylnobiletin, 4' - demethylnobiletin, 3',4' - didemethylnobiletinのいずれも心筋細胞の肥大をノビレチンと同様（150 nM）の濃度にて抑制することを見出した。ノビレチンが全部で6個のメトキシ基を有しており、細胞透過性が他のフラボノイドよりも高いことが考えられる。今回の3'位、4'位のメトキシ基の差異で心筋細胞肥大の抑制作用に差が認められなかったことから、これらの部位は細胞透過性にあまり関与していないことが示唆された。

申請者は過去にノビレチンと同様の骨格を持つタンゲレチン（3'位、4'位のメトキシ基がないポリメトキシフラボノイド）とノビレチンとの比較検討を行った。その結果では、タンゲレチンの肥大抑制効果が認められるが、その効果はノビレチンよりも弱く、3'位、4'位のメトキシ基の有無により効果の減弱が認められた。3'位、4'位の官能基がなくなることで、ノビレチン誘導体の細胞透過性が減弱した、もしくはノビレチン標的因子への作用が減弱したことが考えられる。ノビレチンのターゲット分子の同定などその詳細なメカニズムについては今後の検討課題であるが、*in vitro*においてノビレチンが心筋細胞の肥大反応を抑制することが示されたため、*in vivo*での心肥大抑制と心不全の発症や進展を抑制する可能性が示された。

ノビレチンの心筋細胞肥大抑制効果は他のノビレチンの作用に関する論文に比べても150 nMと低濃度で認められ、心臓特異的に作用している可能性がある。また、吸収後の代謝物もノビレチンと同程度の効果が認められたことから、ノビレチンそのもののみならず、代謝されたのちも血中濃度が持続し、心リモデリングを抑制しているものと考えられる。

以上の事から、柑橘類抽出物ノビレチンによる心不全の前段階で生じる心肥大をターゲットとした新規心不全治療・予防の可能性が示された。また、今後その詳細メカニズムの解析を行うことは心肥大の病態解明と心不全治療・予防につながるものとする。