

報告番号	㊦ 乙 第 号	氏 名	清水 智史
主 論 文 題 名：生薬および生薬成分の組合せによる生物活性増強メカニズムの解析			
(内容の要旨)			
<p>【序論】 漢方薬は、複数の生薬を組合せることにより薬効を示す医薬品であり、その有効性は経験的に伝えられてきた。近年、一部の漢方処方ではランダム化比較試験等の臨床試験が実施されるなど、西洋医学の観点から改めて有効性が示されつつある。しかし、多数の成分を含む生薬を複数組合せて薬効を示す漢方処方において、その有効成分が明らかになっている例は少ない。したがって、漢方処方の有効性 (薬理作用) に関与する成分を科学的に明らかにすることは、現代医療で漢方処方による治療を進めていく上で最も重要な研究課題である。また、漢方薬は多数の成分からなる薬物であることから、複数の成分の共存による相乗効果が重要なファクターであると考えられる。すなわち、生薬成分の組合せによる相乗効果を科学的に解明することは、漢方処方の有効性に関与する成分の解明に貢献する研究課題である。そこで本研究の目的として、生薬エキスや生薬成分を組合せることで生じる相乗効果に関与する化合物を見出すこと、相乗効果の作用機序の解析を行うことを設定した。</p>			
第 1 章 オウゴンのフラボノイドの組合せによる活性増強メカニズムの解析			
<p>【背景・目的】 当研究室の先行実験者である大嶋は、マウス由来マクロファージ様細胞株である J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用を指標に、黄連解毒湯の抗炎症作用の処方解析を行った。その結果、構成生薬の一つであるオウゴンが活性本体となる生薬であることを見出し、baicalein (B), wogonin (W), oroxylin A (O), 6-methoxywogonin が顕著な活性を示すことを見出した。さらにこれらの化合物について、水エキス中の各化合物の濃度を HPLC で定量するとともに、J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性を比較した結果、これらの化合物をエキス中の比 (baicalein : wogonin : 6-methoxywogonin : oroxylin A = 120 : 47 : 2.7 : 1) で組合せた混合物の活性によりエキスの活性を説明出来ること、さらにこの混合物の活性が各々単独の活性と比較して増強していることを見出した。本研究では、先行実験者が単離した化合物のうち、アッセイに用いるのに十分な量が確保できている baicalein, wogonin, oroxylin A およびそれらの等モル混合物 (F-mix) を用いて、J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生に関わるシグナル伝達経路に対する影響を検討し、フラボノイドの組合せによる生物活性増強メカニズムを解析することを目的とした。</p>			
		Fig.1 オウゴンのフラボンの構造式	

## 【方法】

**COX-2 酵素阻害活性:** COX (human) Inhibitor Screening Assay Kit (cayman) を用いた。

**細胞培養:** DMEM 培地で培養した J774.1 細胞を、被験物質で前処理後、LPS 存在下で一定時間インキュベートして各種アッセイに用いた。なお、LPS 濃度は先行実験者に合わせて 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

**PGE<sub>2</sub> や NO の定量:** LPS 添加から 6 時間後の培養上清を用いて、PGE<sub>2</sub> と NO をそれぞれ Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit (cayman) , グリンス試薬により定量した。

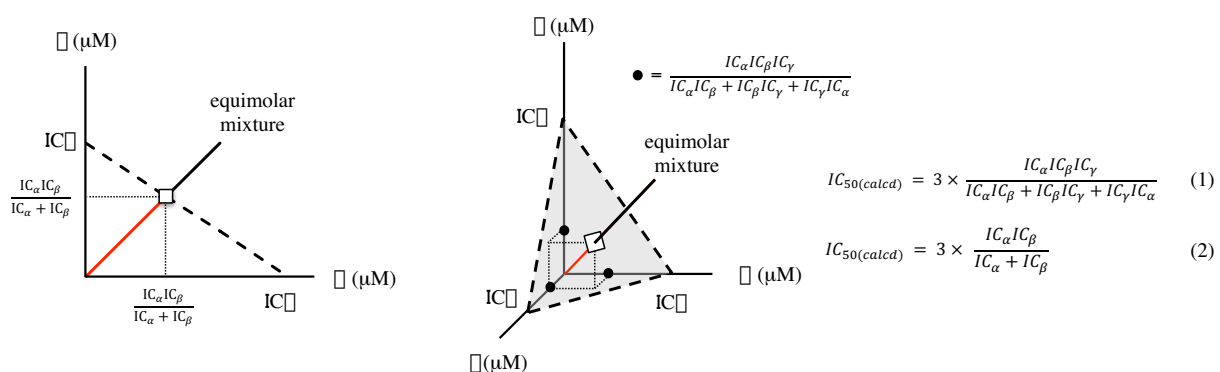
**タンパク発現量の比較 1:** LPS 刺激から 6 時間後の細胞から、全タンパクを EzRIPA Lysis kit (ATTO) により抽出した。LPS 刺激から 2 時間後の細胞から、核画分のタンパクを NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo) により抽出した。各サンプルのタンパク量をウェスタンブロット法により比較した。

**タンパク発現量の比較 2:** 4%ホルムアルデヒドを用いて 96 well プレート上に固定した細胞に対して、透過処理後、蛍光免疫染色を行った。DAPI を用いて核染色を行ったのち、CellInsight を用いた画像解析によりタンパク量を比較した。

**mRNA 発現量の比較:** LPS 刺激から 6 時間時の細胞から、Total RNA を TRIzol (Thermo) により抽出した。RT-PCR 法により mRNA 量を比較した。

**レポーター遺伝子アッセイ:** DMEM 培地で培養した RAW264.7 細胞に対して、pNF- $\kappa$ B-Luc と pRLTK をエレクトロポレーション法によりトランスフェクションした。サンプルで前処理後、LPS 存在下で 8 時間インキュベート後、Dual Luciferase Assay System (Promega) を用いて細胞を溶解し、化学発光を測定した。化学発光値を、細胞溶解液の総タンパク濃度で補正し、転写活性を比較した。

**相乗作用の評価:** イソボログラム法を拡張して用いた(**Fig. 2**)。F-mix は 3 つの化合物の等モル混合物であることから、すべての化合物が活性を示す場合には(1)の計算式により、いずれか 1 つが活性を示さない場合には(2)の計算式により、組合せた場合の理論的 IC<sub>50</sub> を算出した。理論的 IC<sub>50</sub> と実測値を統計的に比較し、有意に実測値が低ければ、相乗作用を示すと判定した。なお、F-mix の濃度は総分子数/溶液体積に基づいて表記した。



**Fig. 2** 本研究で用いたイソボログラム法の概略図と理論的 IC<sub>50</sub> の計算式

【結果・考察】まず3種のフラボンとその混合物のCOX-2に対する酵素阻害作用を検討した。阻害を示したのは baicalein ( $IC_{50} = 11.7 \mu M$ ) と oroxylin A ( $IC_{50} = 6.7 \mu M$ ) であり、wogonin は活性を示さなかった ( $IC_{50} > 40 \mu M$ )。F-mix ( $IC_{50} = 17.7 \mu M$ ) はCOX-2を阻害したが、相乗作用は示さなかった ( $IC_{50} (calcd) = 12.9 \mu M$ )。一方、J774.1細胞におけるLPS誘導性PGE<sub>2</sub>産生抑制活性は、baicalein ( $IC_{50} = 16.9 \mu M$ ), wogonin ( $IC_{50} = 1.88 \mu M$ ), oroxylin A ( $IC_{50} = 3.67 \mu M$ ) であり、これらから計算したF-mixの理論的 $IC_{50}$  ( $IC_{50} (calcd) = 3.47 \mu M$ )と比較してF-mixの $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 0.74 \mu M$ )は有意に ( $p < 0.01$ ) 低く、これらの化合物が相乗作用を示していると判断できた。

細胞系においてF-mixが相乗作用を示したことから、次に細胞内におけるCOX-2のタンパク発現やmRNA発現量に対する影響を検討した。ウエスタンブロット法によりCOX-2タンパク発現量を比較した結果、baicalein (33  $\mu M$ , 37.4%), wogonin (33  $\mu M$ , 37.5%) およびF-mix (100  $\mu M$ , 59.2%) が有意な抑制作用を示した。一方、COX-2のmRNA発現量に対しては、wogonin ( $IC_{50} = 50.2 \mu M$ ) とF-mix (100  $\mu M$ , 47.7%) が有意な抑制作用を示し、F-mixの抑制率はwogoninの活性で説明できた。

COX-2の発現に影響するシグナル伝達経路として、NF- $\kappa B$ 経路が報告されていることから、NF- $\kappa B$ の核内移行や転写活性に対する影響を検討した (Fig. 2)。ウエスタンブロット法によりNF- $\kappa B$ の核内移行に対する影響を比較した結果、baicalein (33  $\mu M$ , 38.4%), F-mix (100  $\mu M$ , 31.2%) が有意な抑制作用を示し、F-mixの抑制率はbaicaleinで説明できた (Fig. 3 上)。また、baicalein (33  $\mu M$ , 33.4%), wogonin (33  $\mu M$ , 57.3%), F-mix (100  $\mu M$ , 65.3%) はRAW264.7細胞におけるNF- $\kappa B$ の転写活性を有意に抑制した (Fig. 3 下)。WogoninはNF- $\kappa B$ の核内移行に影響しなかったことから、wogoninの作用点はNF- $\kappa B$ のDNAへの結合あるいは転写であると考えられ、baicaleinのNF- $\kappa B$ の転写活性に対する抑制作用は、NF- $\kappa B$ の核内移行の抑制に基づくと考えられた。F-mixのNF- $\kappa B$ の転写活性に対する抑制率はwogoninよりも有意に高かったことから、F-mixはbaicaleinの作用に基づいて核内のNF- $\kappa B$ の量を減少させた上で、wogoninの作用に基づいてNF- $\kappa B$ の転写活性を抑制すると考えられる。

J774.1細胞に対するLPS誘導性NO産生抑制活性は、baicalein ( $IC_{50} = 30.8 \mu M$ ), wogonin ( $IC_{50} = 29.0 \mu M$ ), oroxylin

A (44.9  $\mu M$ )であった。これらから算出したF-mixの理論的 $IC_{50}$  ( $IC_{50} (calcd) = 33.6$

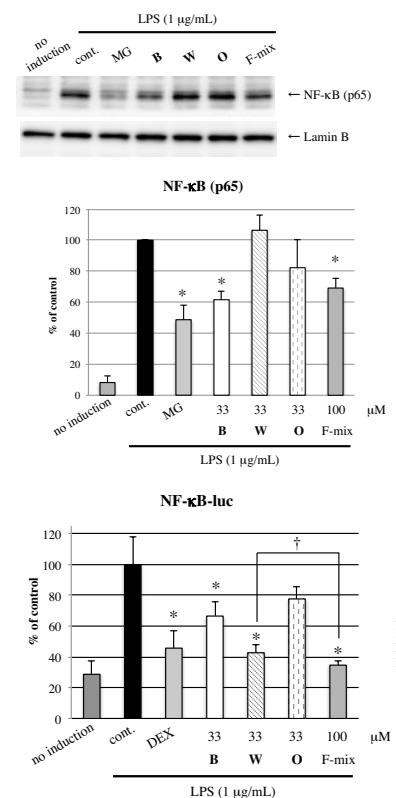


Fig. 3 NF- $\kappa B$ の核内以降およびレポーター活性に対する影響  $n = 3$  (mean  $\pm$  S.D.) \* :  $p < 0.01$

MG : MG132 (10  $\mu M$ )

DEX : dexamethasone (1  $\mu M$ )

B : baicalein W : wogonin O : oroxylin A

F-mix : equimolar mixture of baicalein, wogonin and oroxylin A

$\mu\text{M}$ )と比較して、F-mix の  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50} = 15.3 \mu\text{M}$ ) は有意に ( $p < 0.01$ ) 低く、これらの化合物は相乗作用を示していると判断できた。

iNOS の mRNA 発現量に対しては、baicalein ( $\text{IC}_{50} = 37.8 \mu\text{M}$ ) と wogonin ( $\text{IC}_{50} = 11.6 \mu\text{M}$ ) が有意な抑制作用を示し、F-mix の  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50} = 8.6 \mu\text{M}$ ) は理論的  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50} (\text{calcd}) = 26.6 \mu\text{M}$ ) より有意に ( $p < 0.01$ ) 低かったことから、これらの化合物は相乗作用を示すと判断した。iNOS タンパク発現量に対する影響について、ウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法との結果を比較したところ、両者の結果は高い相関を示したことから、以降は蛍光免疫染色法に基づいてタンパク発現量に対する影響を比較した。iNOS のタンパク発現量に対する抑制活性は、baicalein ( $\text{IC}_{50} = 22.6 \mu\text{M}$ ), wogonin ( $\text{IC}_{50} = 21.5 \mu\text{M}$ ), oroxylin A ( $\text{IC}_{50} = 36.8 \mu\text{M}$ ) であった。F-mix の  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50} = 10.7 \mu\text{M}$ ) は、F-mix の理論値 ( $\text{IC}_{50} (\text{calcd}) = 25.5 \mu\text{M}$ )と比較して、有意に ( $p < 0.01$ ) 低かったことから3種の化合物は相乗作用を示すと判断した。I $\kappa$ B のリン酸化に対する影響を蛍光免疫染色法で比較した結果、baicalein (33  $\mu\text{M}$ , 38%)と F-mix (100  $\mu\text{M}$ , 42%)が抑制作用を示し、F-mix の抑制率は baicalein で説明できた。Nrf2 に対する影響を蛍光免疫染色法で比較した結果、wogonin (100  $\mu\text{M}$ ), oroxylin A (11~100  $\mu\text{M}$ )が有意な発現増加作用を示した。F-mix は 100  $\mu\text{M}$  において有意な発現増加作用を示し、11, 33  $\mu\text{M}$  においても増加傾向を示したことから、F-mix の Nrf2 発現増加作用には主として oroxylin A が寄与していると考えられた。

【結論】 個々の化合物の主たる作用は、baicalein は I $\kappa$ B のリン酸化およびそれに続く NF- $\kappa$ B の核内移行の抑制、wogonin は NF- $\kappa$ B の転写活性の抑制、oroxylin A は COX-2 酵素活性の阻害と Nrf2 発現量の増加であることを明らかにした。このように、F-mix を構成する個々の化合物は、構造が類似しているにも関わらず、LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> や NO 産生に関わる NF- $\kappa$ B 経路の異なる段階を阻害していた (Fig. 3)。一方で、F-mix は I $\kappa$ B のリン酸化や NF- $\kappa$ B の核内移行、COX-2 酵素活性といった個々の作用点に対しては相乗作用を示さなかった。したがって、F-mix が示す LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> や NO 産生に対する相乗的な抑制作用は、個々の化合物の作用によって、NF- $\kappa$ B の一連のシグナルが多段階的に抑制されることに基づく結論付けた。本研究はオウゴンのフラボノイドを組合せてシグナル分子への影響を比較した初めての試みであり、オウゴンの抗炎症作用の作用機序の解明に結びつく新たな知見を得たものである。

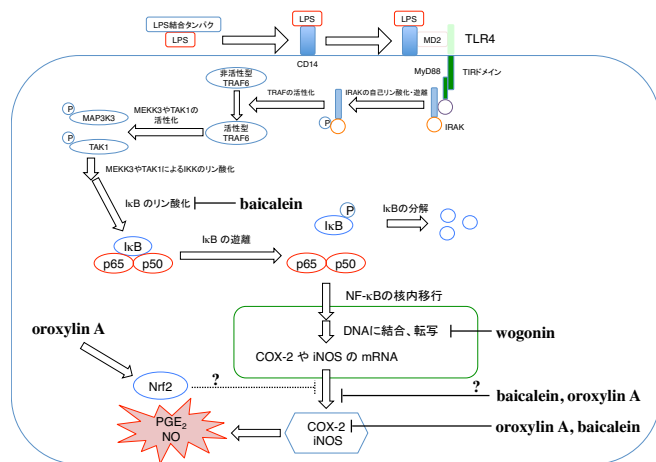


Fig. 4 オウゴンのフラボノイドの作用点

第2章 四逆散の抗炎症作用に関する処方解析

【背景・目的】 四逆散は、サイコ(B)、シャクヤク(P)、キジツ(I)、カンゾウ(G)で構成される漢方処方であり、体力中等度以上で、胸腹部に重苦しさがあり、不安不眠のあるものに用いられる。臨床では胆嚢炎や慢性副鼻腔炎などの炎症性疾患にも用いられるため、四逆散の薬効には抗炎症作用が関わっている可能性がある。先行実験者である藤井は、四逆散および構成生薬の水エキス混合物を用いて、J774.1細胞に対するLPS誘導性NO産生抑制作用を比較することにより、抗炎症作用の処方解析を行った。その結果、**B+P+I** もしくは **B+P+G** の組合せにより四逆散の活性を説明できることを見出した。さらに、単独で最も活性の低いシャクヤクを抜くと、顕著に活性が低下したことから、四逆散の活性にはシャクヤクの寄与が大きいことが示唆された。先行実験者の藤井は、これらの組合せのうち個々の活性の低い生薬の組合せである **B+P+I** に着目し、「シャクヤクの水エキス」と「サイコの水エキスとキジツの水エキスの混合物 (BI)」との組合せで相乗作用を示すことを見出した。しかしその相乗作用に関与する化合物や、相乗作用のメカニズムは未だ明らかとなっていない。本研究ではシャクヤクから化合物の単離を進め、**BI** との相乗作用を示す化合物を見出すことを目的とした。

【方法】細胞アッセイ: J774.1細胞に対する各種アッセイを、第1章と同様の手順で行った。なお、LPS濃度は先行実験者に合わせて100 ng/mLとし、NOの定量をLPS刺激から24時間後に行った。

相乗作用の判定: 個々のサンプルの% of controlの値(% of LPScontと表現する)の積から期待値を算出した(Fig. 5左)。また、**BI**をcontrolとした際の組合せ時の値(% of BIと表現する)を算出した(Fig. 5右)。% of BIにおいて、実測値が有意に高い抑制率であれば、相乗作用を示すと判定した

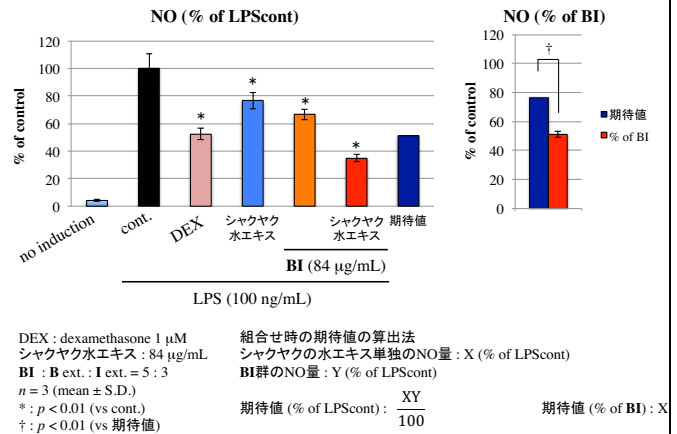


Fig. 5 BI との組合せによる相乗作用の判定

【結果・考察】 シャクヤクの水エキスを、DIAION HP-20, Sepabeads SP207, シリカゲル, Cosmosil 75C<sub>18</sub>-OPN を用いて分画し、15種の既知化合物を単離・同定した。単離した化合物のうち paeonilactone A (11p) は、単独で用いた場合には有意なNO産生抑制作用を示さなかった(50 μM, % of LPScont: 89.2%)ものの、**BI**と組合せた場合の% of BI (50 μM, 69.9%)は、期待値 (= 89.2%)と比較して有意に低かったことから、paeonilactone A (11p) は **BI** との相乗作用を示すと考えられた。さらに、iNOSタンパク発現量に対して

も組合せによる相乗作用を示した。一方で iNOS の mRNA 発現量に対しては相加的に、IFN-β の mRNA 発現量に対しては拮抗的に作用した。

Paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は NO 産生抑制作用・iNOS タンパク発現抑制作用・iNOS や IFN-β の mRNA 発現抑制作用を示した。なお、これらの化合物は BI と組合わせた場合、相加的に作用すると考えられた。

活性を示した化合物並びに BI を用いて、NF-κB の核内移行や MAPK のリン酸化に対する影響を検討した結果、paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は ERK のリン酸化を抑制した。一方で、

paeonilactone A (11p) や BI は NF-κB の核内移行や MAPK のリン酸化には影響しなかった。

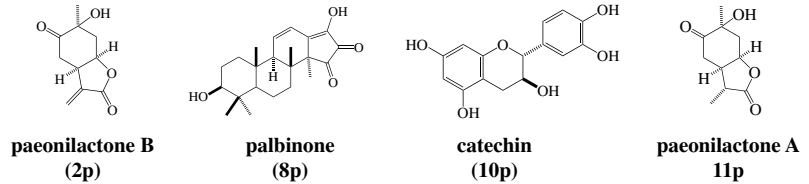


Fig. 6 活性を示した単離化合物

【結論】シャクヤクより単離した化合物のうち、paeonilactone A (11p) は単独で用いた場合には NO 産生抑制作用を示さないが、BI と組合せた場合に濃度依存的な抑制作用を示すことを見出した。Paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は、ERK のリン酸化を抑制することにより、NO 産生量を抑制することが示唆された (Fig. 7)。

シャクヤクの生物活性に関して、主要成分である paeoniflorin の生物活性に着目した報告が多い。また catechin (10p) はシャクヤク以外の生薬などにも含まれており、生物活性の報告は多数存在する。一方で、paeonilactone B (2p), palbinone (8p), paeonilactone A (11p) の生物活性に関する報告はほとんど存在しないことから、本研究で見出したこれらの化合物の生物活性に関する知見は、シャクヤクの有効性の科学的な解明に繋がる成果である。

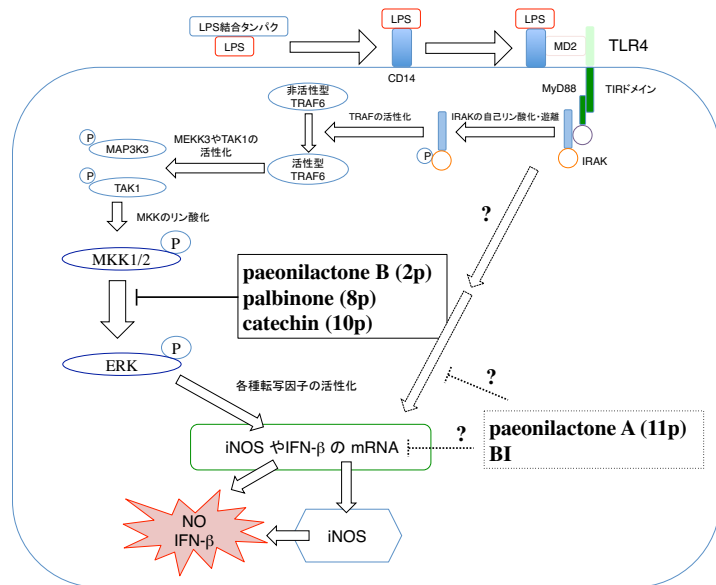


Fig. 7 シャクヤク由来化合物の作用点

【主論文に関する原著論文】

T. Shimizu, N. Shibuya, Y. Narukawa, N. Oshima, N. Hada and F. Kiuchi, *J. Nat. Med.*, Published online 18 September 2017. DOI 10.1007/s11418-017-1129-y.