

# 漢方薬紫雲膏の主要活性成分であるシコニンの生体防御作用の 解明とそれに基づく新規適応症探索

申請代表者	清水 忠道	富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 皮膚科学講座	教授
所外共同研究者	近藤 隆	富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 放射線基礎医学講座	教授
所内共同研究者	門脇 真	病態制御部門 消化管生理学分野	教授

## 【報告セミナー要旨】

シコニンおよびその誘導体の生体防御作用について1) 紫外線防御効果の検討, 2) 熱ショックタンパク質(HSP)誘導作用およびアポトーシス誘導作用の分子機構の解明, および3) マスト細胞及び樹状細胞に対する作用の解明について検討した。

第一にヒト不死化ケラチン細胞株HaCaTを用いてシコニンの光学異性体であるアルカニン誘導HSP70がUVB誘導アポトーシスに及ぼす影響について検討した。

アポトーシスの指標にDNA断片化, ホスファチジルセリンの細胞膜表面への発現およびcaspase-3の活性化を用い, さらにHSP70, HSP90のタンパク質発現および遺伝子解析を行った。アルカニンの前培養は, UVB (40 mJ/cm<sup>2</sup>) 誘発アポトーシスを有意に抑制した。フローサイトメーターを用いてcaspase-3のタンパク質発現の変化を検討したところ, アルカニンの前培養によりUVB誘発cleaved caspase-3のタンパク質発現を有意に抑制した。一方, HSP70の阻害剤であるKNK437は濃度依存的にHSP70のタンパク質発現を抑制し, UVB誘導アポトーシスを促進した。網羅的遺伝子発現解析ではアルカニンのUVB誘導アポトーシスに対する細胞保護機能に関与する可能性のある遺伝子ネットワークが明らかになった。

シコニンによるHSP誘導作用については, ヒトリリンパ腫細胞株U937を用いた探索研究で, 低濃度で誘導されることが判明した。その機構解明でHSF-1を調べたところ, この関与はなく, 網羅的遺伝子発現解析ではNrf2の増加を認めた<sup>1)</sup>。また, 高濃度ではアポトーシス誘導を誘発し, その分子機構の一端が明らかになった。

マスト細胞への影響については, シコニンがマスト細胞の活性化を強力に抑制することが判明した。その作用機序を解明するため, GeneChipを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ, シコニンは, マスト細胞の活性に伴い発現が劇的に上昇する核内オーファン受容体NR4Aの発現を著明に抑制した。さらに, siRNAを用いてNR4Aをロックダウンしたマスト細胞では, 抗原刺激による活性化の抑制が認められた。以上のことから, シコニンのマスト細胞に対する活性化抑制作用にはNR4Aが関与することが考えられる。

1) Ahmed K, Furusawa Y, Tabuchi Y, Emam H F, Piao J-L, Hassan MA, Yamamoto T, Kondo T and Kadowaki M: Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response. Int J Hyperthermia 28,1-8, 2012.

## ■背景・目的

紫根を主要な薬効成分とする漢方薬紫雲膏は、江戸時代の医師・華岡青洲が創案した外用膏薬であり、ひび・あかぎれ・切り傷・火傷・かぶれ・褥瘡など、膿や滲出液の少ない皮膚症状や痔疾の治療にも用いられている。痔疾治療薬内服「ボラギノール」EPには紫根エキスが処方されている。紫根の主成分であるシコニンには、抗炎症作用、肉芽促進作用などの創傷治癒促進作用、抗菌作用、抗腫瘍作用など幅広い薬理作用が近年報告されているが、シコニンの薬理作用の全貌や作用機序等の詳細な検討は未だ十分には行われていない。2005年から4年間に渡り行われた南米ペルーでの臨床試験により、紫雲膏は、全世界に約1200万人の患者がいると推測されているリーシュマニア症に非常に有効な薬物であるということが報告された。これは、紫雲膏の肉芽形成促進作用と抗原虫作用によるものと考えられるが、詳しい作用機序は分かっていない。

本研究グループは和漢医薬学総合研究所の和漢薬ライブラリーの漢方薬に多く用いられている80種類の生薬の抽出物及び80種類の生薬含有標準化合物質を用いて、ヒト単球系リンパ腫U937細胞における熱ショック・タンパク質HSP70の誘導能および粘膜型マスト細胞様RBL 2H3細胞における抗原刺激脱顆粒に対する抑制作用を評価した。その結果、いずれの評価系においてもシコニンに最も強い作用を見出した。そこで、本研究は、シコニンとその光学異性体であるアルカニンの生体防御作用を分子、細胞および個体レベルで詳細に検討し、新規適応症を探索することを目的とした。

## ■方法

### ・シコニンおよびその誘導体の生体防御作用に関する検討

細胞としてヒト不死化ケラチン細胞株HaCaTおよびヒトリンパ腫細胞株U937を使用した。前者は紫外線防護効果の検討に、後者はアポトーシス実験に使用した。アポトーシスの指標にはDNA fragmentation, ホスファチジルセリンの細胞膜表面への発現およびcaspase-3の活性化を用いた。HSP70をはじめとするタンパク質発現の検討にはwestern blot法を用いた。さらにGeneChipシステムを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、標的関連遺伝子に焦点を絞ったネットワーク解析も試みた。

### ・マスト細胞に対するシコニンの活性化抑制作用の作用機序の検討

BALB/cマウスの大腿骨髄細胞から粘膜型骨髄細胞由来マスト細胞(mBMMC)を作製し、DNP特異的IgE抗体-DNP-BSA抗原による脱顆粒およびカルシウム・イオノフォアA23187による脱顆粒に対する効果を検討した。さらにGeneChipシステムを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、標的関連候補遺伝子のsiRNAを用いたノックダウンを試みた。

## ■結果・考察

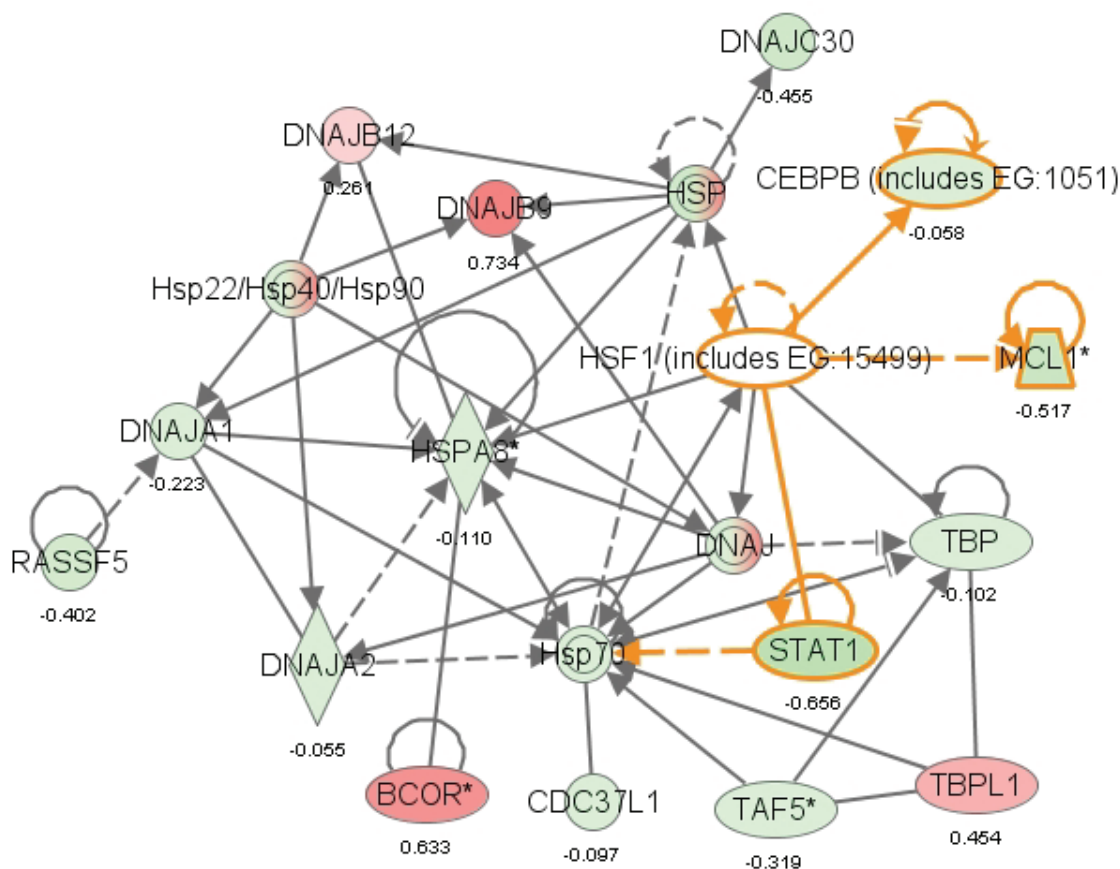
### ・シコニンおよびその誘導体の生体防御作用に関する検討

第一にヒト不死化ケラチン細胞株HaCaTを用いてシコニンの誘導体であるアルカニン誘導HSP70がUVB誘導アポトーシスに及ぼす影響について検討した。アルカニンの前培養は、UVB(40 mJ/cm<sup>2</sup>)誘導アポトーシスを有意に抑制した。フローサイトメーターを用いてcaspase-3のタンパク質発現の変化を検討したところ、アルカニンの前培養によりUVB誘導cleaved caspase-3のタンパク質発現を有意に抑制した。一方、HSP70の阻害剤であるKNK437は濃度依存的にHSP70のタンパク質発現を抑制し、UVB誘導アポトーシスを促進した。網羅的遺伝子発現解析ではアルカニンのUVB誘導アポトーシスに対する細胞保護機能に関与する可能性のある遺伝子ネットワークが明らかになっ

た。HSP は温熱処理により誘導される生体防御に働くタンパク質であり、その中のHSP70は紫外線によるストレスから細胞を防御することが知られている。アルカニンは、漢方薬のアルカンナの根(紫根)から抽出された成分であり、皮膚において抗炎症作用を有する。本遺伝子ネットワーク解析ではUVB照射により炎症性サイトカインを含む遺伝子が大きく発現変化したのに対し、UVB照射前のアルカニン処理はHSPおよび細胞保護機能に関与する遺伝子 (HSPA13, HSPA5, BCOR, DNAJB)の発現を増やした(図1)。

図1 アルカニンによるHSP誘導および紫外線防護効果に関して得られた遺伝子ネットワーク

HSPs pathway



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

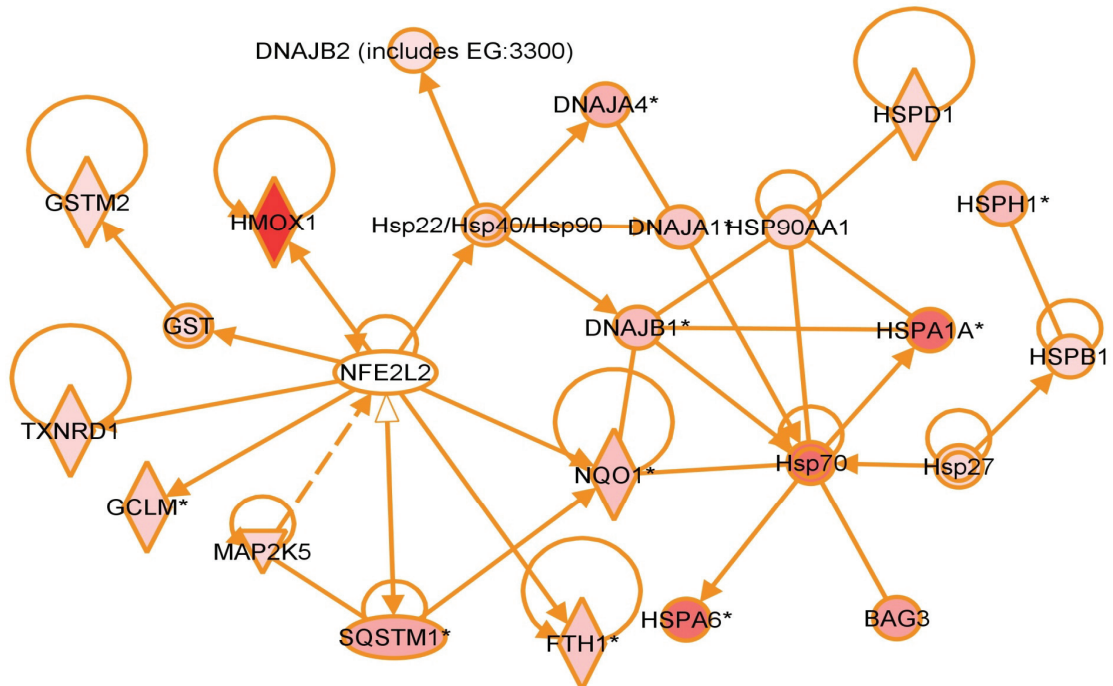
さらに、UVB照射により発現変化した炎症性サイトカインに及ぼすアルカニンの影響を検討するためUVB照射前のアルカニン処理によるNFκBの変化を調べたところ、UVB照射により消失したIκB-αの産生量を顕著に増加した。以上の結果より、HaCaT細胞におけるアルカニン誘導HSP70は、HSPを含む細胞保護機能関連遺伝子の発現を増加することによりUVB誘導アポトーシスを抑制することが明らかになった。

次にシコニンおよびその誘導体の生体防御作用についてHSP誘導作用およびアポトーシス誘導作用の分子機構について検討した。シコニンによるHSP誘導作用については、ヒトリンパ腫細胞株U937を用いた探索研究で、低濃度で誘導されることが判明した。その機構解明についてHSF (heat shock factor) -1を調べたところ、この関与はなく、網羅的遺伝子発現解析ではNrf2の増加を認めた<sup>1)</sup>。

従って、シコニンによるHSP誘導は一般的なHSF-1を介するものではなく、Nrf2を介する機構によるものと思われる(図2)。また、高濃度ではアポトーシスを誘発するが、さらに濃度が高くなるとネクロプトーシスを誘発した。現在、その分子機構について継続して調べている。

図2 シコニンによるHSP誘導に関して得られた遺伝子ネットワーク

NRF2 mediated genes UP 2.0 fold



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

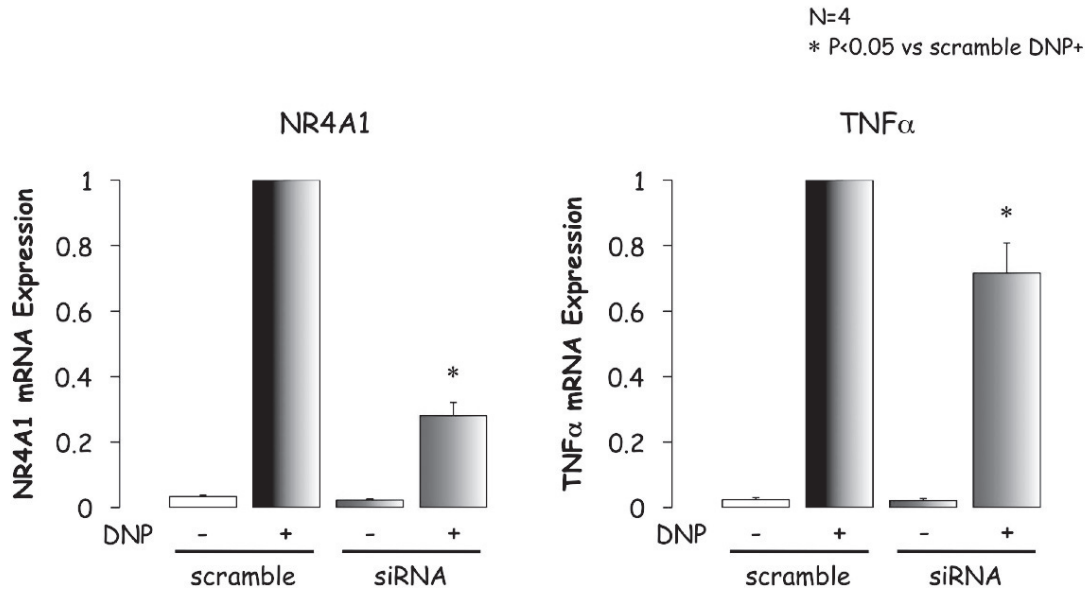
・マスト細胞に対するシコニンの活性化抑制作用の作用機序の検討

シコニンは粘膜型マスト細胞の抗原刺激およびカルシウム・イオノフォア刺激による脱顆粒と腫瘍壊死因子TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) の遺伝子発現を共に強力に抑制した。しかし、抗原刺激およびカルシウム・イオノフォア刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇に対しては影響を与えなかった。そこで、その作用機序を解明するため、GeneChipを用いた網羅的遺伝子解析を行った。ところ、網羅的遺伝子発現解析では、DNP-BSAによる抗原刺激およびカルシウム・イオノフォアA23187による刺激により、特徴的に核内オーファン受容体のNR4AサブファミリーNR4A1, NR4A2, NR4A3が、非常に強く発現亢進していたが、シコニンはいずれの刺激に対しても、この発現亢進をほぼ完全に抑制した。この結果はリアルタイムPCRにて確認した。

さらに、現在NR4Aの発現を抑制する薬剤が見出されていないので、NR4A1およびNR4A2に対するsiRNA (small interfering RNA) の細胞内移入による遺伝子発現抑制を行ったところ、DNP-BSA抗原刺激による腫瘍壊死因子TNF $\alpha$ の遺伝子発現が抑制された(図3)。従って、網羅的遺伝子解析で明らかとなったシコニンによる核内オーファン受容体のNR4Aサブファミリーの発現抑制は、シコニンによるマスト細胞の不活性化にともなう事象ではなく、シコニンがNR4Aサブファミリーの発現抑制を介してマスト細胞を不活性化させることが示唆された。



図3 粘膜型マスト細胞でのNR4A1のノックダウン



## ■結論

漢方薬紫雲膏の主要活性成分であるシコニンの生体防御作用の解明とそれに基づく新規適応症探索を研究課題としてシコニンおよびその光学異性体の生体防御作用について1) アルカニンによる紫外線防御効果の検討, 2) HSP誘導作用およびアポトーシス誘導作用の分子機構の解明, および3) マスト細胞に対する作用の解明について検討した。これらの研究には, GeneChipを用い網羅的に遺伝子発現を解析することにより, 作用機序の一端を分子レベルで明らかにすることができた。今後, 引き続きHSPや細胞死に関わる探索研究を行うと共に, 漢方医学的な意義と分子機構を検討していく予定である。本手法は今まで複雑系とされていた漢方薬の機構を明らかにすることに有用であり, 漢方薬利用における科学的合理性の構築に貢献すると思われる。

また, 本研究は漢方薬に多く用いられている80種類の生薬の抽出物及び80種類の生薬含有標準化合物質から見出した薬理作用を基に研究を展開している。一般的な医薬品シードであるケミカルライブラリーと違い, 漢方薬には永年の多種多様な臨床情報という貴重な付加情報が付帯されている。この蓄積された臨床情報と先端的研究技術を駆使した基礎研究という科学的基盤を有機的に融合することにより, 臨床予測性の高いトランスレーショナル研究を推進することが可能となると考える。

本研究での紫根の主要な薬効成分であるシコニンの作用に関する基礎研究と, その科学的エビデンスに基づく新規かつ最適な適応症の開拓は, その研究成果を和漢医薬学関連研究者に還元することにより, 漢方薬・和漢薬をベースとした新規治療薬開発に繋がる研究となると考えている。

## ■文献

- 1) Ahmed K, Furusawa Y, Tabuchi Y, Emam H F, Piao J-L, Hassan MA, Yamamoto T, Kondo T and Kadowaki M: Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response. *Int J Hyperthermia* 28, 1-8, 2012.