

血管内皮細胞を健常化して血栓形成因子の発現を抑制する 生薬および生薬由来化合物の探索

申請代表者 大藏 直樹 帝京大学薬学部病態生理学教室
所外共同研究者 厚味 巖一 帝京大学薬学部病態生理学教室

准教授
教授

【背景・目的】 血管内皮細胞が健常な状態では、血管内皮細胞が産生する血栓形成因子と抑制因子のバランスが保たれて血液の流動性が維持されるが、生活習慣病やそれに伴う炎症性刺激などが原因で血管内皮細胞が傷害を受けると、血栓形成因子が増加してこのバランスが崩れ、血栓症を発症する。本研究の目的は、血管内皮細胞で増加する血栓形成因子の産生を抑制する生薬や化合物を見出すことである。このような物質は、血栓症の新たな予防法や治療法に応用出来る可能性がある。

ところで、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) は、血栓溶解反応の最終段階で働くプラスミンの産生経路を阻害するプロテアーゼインヒビターで、血管内皮細胞が産生する血栓形成因子の一つである。PAI-1の血中濃度の増加は血栓症の発症と深く関わるため、PAI-1の産生の抑制は血栓症の予防や治療に利用できる可能性がある。我々はこれまでに、あした葉やプロポリスなどの健康食品中の成分が血管内皮細胞の炎症性刺激により増加するPAI-1産生を抑制することや、これらを摂取したマウスがリポポリサッカライド(LPS)投与により血栓形成傾向となったマウスでの血中PAI-1増加を抑制することから、健康食品には血栓症予防や治療に有効なものがある可能性を示してきた⁽¹⁾⁽²⁾。

本研究では、血管内皮細胞で増加するPAI-1産生の抑制を指標とした評価系を用い、共同研究で供与された生薬抽出物及び生薬化合物を対象としたスクリーニングにより有効な物質の探索を行った。

【方法】 0.1%ゼラチン溶液でコートした96wellプレートにEA.hy926を 2×10^4 cells/wellで播種して培養し、培養開始48時間後に1%FBS含有DMEM (D-Glucose:1g/L) に交換して24時間培養した。次に化合物(DMSO溶解物)または生薬エキス(水抽出エキス)をそれぞれ20 μ Mあるいは10 μ g/mLとなるように添加した1%FBS含有DMEMに培地交換し、さらにその3時間後にTNF- α (10ng/mL)を添加した培地に交換して刺激した。刺激から24時間後に培地を取り出し、遠心分離(1000rpm, 5分間, 4 $^{\circ}$ C)により不溶物を除いて上清を回収し、抗ヒトPAI-1モノクローナル抗体(MA31C9, Molecular Innovation)とビオチン化ウサギ抗ヒトPAI-1抗体(ASHPAIGF, Molecular Innovation)を用いたサンドイッチELISA法により培養液上清中のPAI-1濃度を測定した。化合物の溶媒であるDMSOの存在下TNF- α で刺激した時の培地中に増加したPAI-1抗原量を1とし、1より低い値はPAI-1産生が低下すると評価した。また、化合物や生薬の細胞毒性の評価には、水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩であるWST-8を用いた細胞増殖測定法(Cell Counting Kit-8, 同仁化学研究所)を使用した。TNF- α 未刺激の細胞の450nmにおける吸光度から595nmにおける吸光度を差しひいたものを1とし、1より著しく低い値を示すものは細胞毒性があると評価した。なお、陽性対照には、すでに我々が血管内皮細胞からのPAI-1産生抑制作用を報告したクリシンを使用した⁽²⁾。

【結果・考察】 生薬由来化合物はAconitine, Albiflorin, Alisol A, Alisol B, Alkannin, Amygdalin, Arbutin, Astragaloside IV, Atractylenolide III, Atractylodin, Atropine Sulfate, Aucubin, Baicalein,

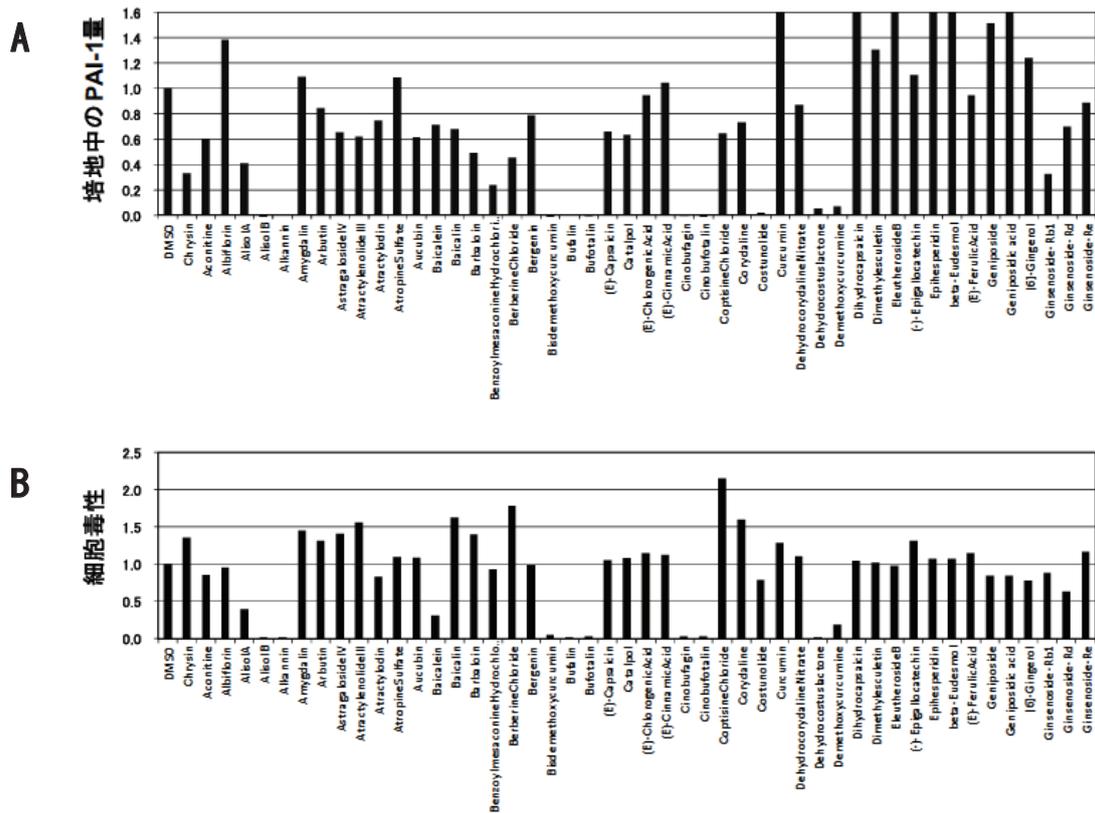


図1 ヒト臍帯静脈内皮細胞由来細胞株(EA.hy926)をTNF- α 刺激した時の培地中のPAI-1増加への生薬由来化合物の影響(A)と生薬由来化合物添加時にみられた細胞毒性(B)

Baicalin, Barbaloin, Benzoylmesaconine Hydrochloride, Berberine Chloride, Bergenin, Bisdemethoxycurcumin, Bufalin, Bufotalin, Capillaricin, (E)- Capsaicin, Catalpol, (E)-Chlorogenic Acid, (E)-Cinnamic Acid, Cinobufagin, Cinobufotalin, Coptisine Chloride, Corydaline, Costunolide, Curcumin, Dehydrocorydaline Nitrate, Dehydrocostuslactone, Demethoxycurcumin, Dihydrocapsaicin, Dimethylscutellin, Eleutheroside B, (-)-Epigallocatechin Gallate, Epigallocatechin Gallate, Epigallocatechin Gallate, beta-Eudesmol, (E)-Ferulic Acid, Geniposide, Geniposidic Acid, [6]-Gingerol, Ginsenoside-Rb1, Ginsenoside-Rc, Ginsenoside-Rd, Ginsenoside-Re, Ginsenoside-Rg1 (48種類) について検討を行った。その結果, Bisdemethoxycurcumin, Bufalin, Bufotalin, Cinobufagin, Cinobufotalin, Benzoylmesaconine Hydrochloride, Costunolide, Dehydrocostuslactone, Demethoxycurcumin, Ginsenoside-Rb1, Ginsenoside-Rdを添加したものでは, TNF α 添加により上昇したPAI-1産生増加が対照(DMSO)より低い値を示した(図1 A)。Benzoylmesaconine Hydrochloride, Costunolideについては, 細胞毒性の指標である脱水素酵素活性の低下が小さかったが, Bisdemethoxycurcumin, Bufalin, Bufotalin, Cinobufagin, Cinobufotalin, Dehydrocostuslactone, Demethoxycurcuminは細胞毒性の指標である脱水素酵素活性が著しく低下した(図1 B)。生薬エキスによる効果の検討には, 血液の滞りを改善するとされる駆オ血薬であるサンリョウ(山稜), ショウキョウ(生姜), コウカ(紅花), トウニン(桃仁)について検討を行ったが, 有意な抑制効果は見られなかった。

本研究の申請時には, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用する予定で計画し, 研究開始当初はHUVECでの検討を行ったが, 臍帯の個体差や保存状態の影響を受けるため, 多種の試料を均

一な条件でスクリーニングするには不都合があると判断した。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞由来細胞株(EA.hy926)を利用した測定系を新たに構築して探索を行うことにより、均一な条件でのスクリーニングが可能となった。しかし、期間内に全ての化合物でのスクリーニングを終了するまでには至らなかった。Benzoylmesaconine HydrochlorideとCostunolideは、EA.hy926を用いた検討で有効な化合物である可能性が示唆されたが、今後HUVECで同様な効果がみられるかを検討した後、生体内で血管内皮に作用し血栓予防的に働く可能性を検討する必要がある。

【結論】 供与された生薬由来化合物の中からPAI-1産生を抑制する可能性を示す化合物が幾つか見つかったことから、血管内皮細胞で増加する血栓形成因子の産生を抑制する可能性がある生薬や化合物を見出すという目的は達成できたと思われる。本研究の成果は、天然物成分を効果的に利用した血管内皮細胞の健常化による血栓症の予防法や治療法の開発につながるものであると考えられる。

【文献】

- (1) Ohkura et al. Xanthoangelols isolated from *Angelica keiskei* inhibit inflammatory-induced plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) production *Biofactors*. 2011;37:455-61
- (2) Ohkura et al. Propolis and one of its constituent chrysin inhibit plasminogen activator inhibitor-1 production induced by tumore necrosis factor- α and lipopolysaccharide *Journal of Apicultural Research* 2012;51:179-184