

ヒアルロン酸の代謝に影響を及ぼす 生薬由来化合物及び生薬エキスの探索

申請代表者 柿崎 育子 弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター糖鎖工学講座 准教授

■背景・目的

ヒアルロン酸は、皮膚、軟骨などの結合組織をはじめ、生体内の至る所に存在し、他の分子と相互作用して恒常性の維持に働くが、加齢によってその量は減少する。一方、炎症や癌などの部位では、ヒアルロン酸の過剰な蓄積により悪性度を増す。ヒアルロン酸の合成と分解は複雑に調節されている。ヒアルロン酸量を調節することができれば、加齢に伴う疾患や癌の悪性化の防御につながると考えられる。本研究では、ヒアルロン酸の代謝に影響を及ぼす生薬標準品化合物及び生薬エキスを探索することを目標とした。研究期間内には、生薬エキス及び生薬標準品化合物のヒアルロン酸を加水分解する酵素（ヒアルロニダーゼ）の活性に及ぼす影響を調べた。

■方法

ヒアルロン酸（平均分子量80,000）を基質として、ヒアルロニダーゼ（ウシ精巣由来, Sigma-Aldrich）の加水分解反応を行った。各種生薬エキスまたは生薬標準品化合物をそれぞれ最終濃度が1mg/ml、200 μ Mとなるように反応系に添加し、反応後の生成物をHPLCにて分析した。最近の我々の報告の方法（Kakizaki et al.: *Carbohydr Polym.* **121**, 362-371, 2015）に基づき、最終生成物であるヒアルロン酸四糖と六糖の生成量をもとに加水分解活性を評価した。生薬化合物のうち、欠番のもの代わりに、ヒアルロニダーゼの阻害剤として知られるアピゲニンと同濃度で添加した。

■結果・考察

生薬エキスでは、ヒアルロニダーゼの加水分解に対して阻害効果が期待されるものが2種、やや期待されるものが5種、促進効果かどうかの検討が必要なものが2種見出された。生薬エキスを加えないコントロールのうち、HPLC分析の際に後半でインジェクトした方で、活性が低く計算された。このカラムは、複数のサンプルのインジェクトによって劣化しやすく、そのためにピーク面積が小さく計算される傾向があるので、生薬エキスのような未精製のものを含むサンプルを再検討する場合には、インジェクトする順番を変えることも必要と考えられる。

全ての生薬標準品化合物で、ヒアルロニダーゼの加水分解の阻害が観察された。化合物No.1からNo.48の阻害は、アピゲニンの阻害効果に相当した。化合物No.49からNo.96では、5種の化合物を除いてNo.1からNo.48の結果よりも、阻害効果は低めに計算された。研究開始前の文献検索で、化合物No.1からNo.96の中で、ヒアルロン酸代謝の関連が報告されているものは、10件であったので、今後は報告のある化合物と構造的な関連を考察しなければならない。

ヒアルロニダーゼは加水分解と糖転移反応を触媒し、いずれかの至的条件下でも両反応が進行している。従って、ヒアルロニダーゼによる加水分解機構はまだ充分には明らかにされておらず、特に長鎖のヒアルロン酸を基質とした場合の機構は複雑であると考えられる。今回のスクリーニングでは、

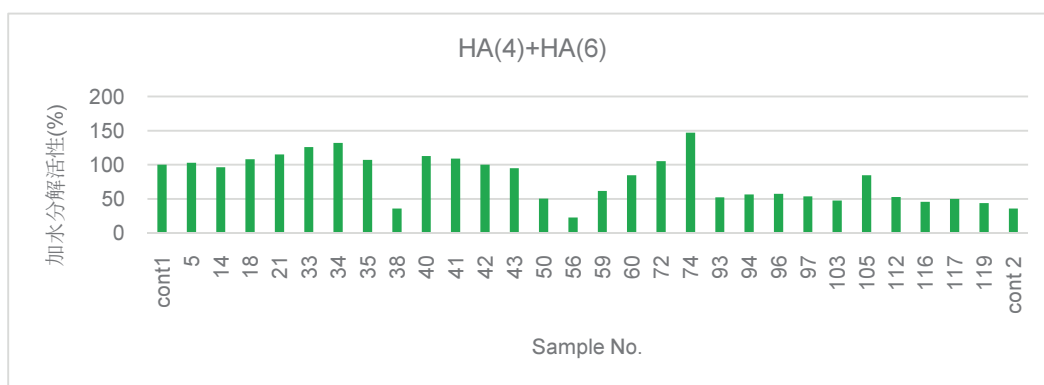
長鎖のヒアルロン酸を基質として用いたが、阻害あるいは促進効果を明らかにするためには、次のステップとして、ヒアルロナーゼの基質の最小単位であるヒアルロン酸八糖を基質とした実験が必要である。現在、ヒアルロナーゼの糖転移の反応系に生薬エキスあるいは生薬標準品化合物を添加する実験を行っている。

■結論

生薬標準品化合物の多くが、ヒアルロナーゼによるヒアルロン酸の加水分解を阻害する可能性が考えられた。今後、さらなる検討が必要である。

<図>

ヒアルロナーゼの加水分解活性に及ぼす生薬エキスの影響

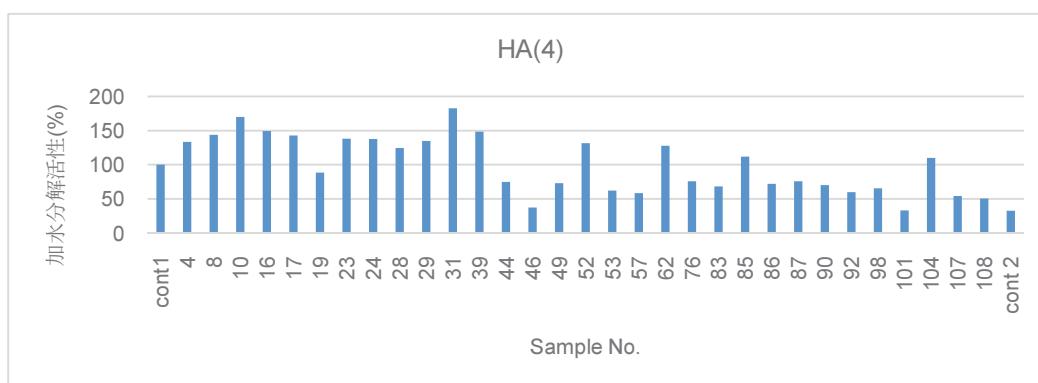


Cont, 生薬エキス (1mg/ml) を入れない場合 (Control).

HA(4)+HA(6)、HA(4)、HA(6) はそれぞれ、反応生成物のヒアルロン酸四糖と六糖の両者のピーク面積の総和、四糖のみ、六糖のみのピーク面積より計算したものである。生薬エキスのみのピークが、四糖、六糖のいずれかと重なる場合には、重ならない方のピーク面積より計算した。

Cont1 の加水分解活性を 100% として示した。

番号のないものは、生薬エキスのみのピークとヒアルロン酸オリゴ糖のピークが重なって判断できなかったためグラフから除外した。



実際のクロマトグラムとグラフから、

阻害効果が期待されるもの、Nos.38, 56.

阻害効果がやや期待されるもの、Nos.46, 50, 101, 111, 118

促進効果かどうかの検討が必要なもの、Nos. 10, 31.

