

抗消化性潰瘍効果を示す漢方薬の有効成分としての リン脂質メディエーター研究

申請代表者	田中 保	徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学系)衛生薬学分野	准教授
所外共同研究者	藤川 昂樹	徳島大学大学院医歯薬学研究部	大学院生
所内共同研究者	渡辺 志朗	栄養代謝学分野	准教授
所内共同研究者	藤田 恭輔	栄養代謝学分野	助教

【報告セミナー要旨】

【目的】

リゾホスファチジン酸 (LPA) は特異的受容体を介し、細胞増殖や細胞遊走を誘導するリン脂質メディエーターで、血管新生や創傷治癒に関わっている。最近、我々は経口投与したホスファチジン酸 (PA) が胃内で LPA に変換されること、胃の表層粘液細胞は 2 型 LPA 受容体を発現しており、この受容体の活性化は胃粘膜防御因子のプロスタグランジン E2 産生を増強させることを見出した (Tanaka *et al.* BioFactors, 2014)。実際、LPA やその前駆体としての PA の経口投与はアスピリン誘導性胃潰瘍を効果的に抑制した (Tanaka, *et al.* Dig. Dis. Sci., 2013)。PA は動物脂質に少なく、植物脂質に多い。本研究では、PA や LPA は抗胃潰瘍を効能とする生薬の有効成分の一つではないかと考え、胃腸障害に効くとされる生薬の PA および LPA 含量を調べ、その脂質抽出物の抗 NSAIDs 潰瘍効果を調べた。

【方法】

胃腸障害に効くとされる生薬として、ウイキョウ、ガジュツ、エンゴサクなど、21 種をリストアップした。粉末素材から常法により脂質を抽出し、TLC を用いて PA および LPA を単離後、定量した。LPA および PA の分子種は MALDI-TOF MS により調べた。カルボキシメチルセルロースに懸濁させた脂質液をマウスに経口投与し、その 30 分後にアスピリンあるいはインドメタシンを経口投与した。3 時間後、単離した胃をホルマリンで固定し、胃表面にできる潰瘍の長さを測定し、胃潰瘍の程度を数値化した。

【結果と考察】

調べた中でキキョウが最も豊富に PA を含んでいた (1900 nmol/g)。PA はパルミトイル/リノレオイル型 (16:0/18:2) やジリノレオイル型 (18:2/18:2) であった。一方、LPA を最も豊富に含む生薬はシャクヤクで (560 nmol/g)、16:0 や 18:2 を含む LPA 分子種が主であった。これらの生薬から抽出した脂質の抗インドメタシン誘導性潰瘍効果について調べたところ、キキョウ脂質はリン脂質量として 1.2 mg/kg の投与で、シャクヤク脂質はリン脂質量として 4mg/kg で共に総潰瘍長を 50% に縮小させた。対象に用いた卵黄脂質は同量で有意な効果を示さなかった。以上より、少なくともキキョウやシャクヤクの抗潰瘍作用の有効成分に PA や LPA が関与している可能性が考えられた。

■背景・目的

リゾホスファチジン酸(LPA)は多くの動物細胞に作用して、増殖や遊走などの応答を誘導する増殖因子様リン脂質である。血液を始め体液中に存在するLPAの役割の1つは創傷治癒と考えられており、傷ついた皮膚へのLPAの塗布は傷の治癒を促進させる(1)。LPAは消化管においても組織の修復や維持に関与しており、経口投与したLPAが放射線や抗がん剤処理によって誘導した小腸粘膜のアポトーシスを回避させること(2)、直腸投与したLPAが2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸で惹起される炎症性大腸炎を緩和することが示されている(3)。我々もLPAの経口投与が拘束ストレスやアスピリン誘導性の胃潰瘍形成を有意に抑制すること(4,5)やヒト胃由来HGC-27細胞の遊走を促進すること(9)を見出している。既にLiらにより2型LPA(LPA2)受容体が小腸由来細胞の管腔側の頂側膜に発現していることが示されているが(6)、我々もLPA2がマウス胃の表層粘液細胞に存在することを確認した(5,7)。我々はLPA2を発現するヒト胃由来MKN74細胞において、LPAはシクロオキシゲナーゼ2(COX2)のmRNAのアップレギュレートを介してプロスタグランジンE2(PGE2)の産生を促進させることを見出している(7)。PGE2は代表的な胃粘膜防御因子で、粘膜血流量を増加させ、炭酸水素イオンの分泌を促進し、胃酸分泌を抑制する。このPGE2促進作用は先に示した抗アポトーシス作用と共に、LPAの消化管粘膜保護作用を説明する機序と考えられる。

消化管におけるLPA源には唾液や胃液などの分泌液がある。実際、唾液にはLPAが含まれている(8)。もう1つのLPA源は食物とその消化物である。我々は以前、キャベツやダイコンといったアブラナ科の野菜にLPAが多く含まれていることを見出した(9)。一方、我々は胃において、ホスファチジン酸(PA)のホスホリパーゼA2(PLA2)消化物としてLPAが生じることを明らかにしている(5,9)。天然物にはリゾ型よりも対応するジアシル型の方が多く、キャベツの場合、LPAよりもPAの方が10倍以上多い。従って、胃以降の消化管において、食に含まれるLPAそのものよりも、PAのPLA2消化がより多くのLPAをもたらすと考えられる。現在、理由は解析中であるが、我々が行った抗アスピリン潰瘍モデルマウスにおいて、PAの傾向投与はLPAよりも効果的であることも判明している(5)。

以上のことを考え合わせると、LPAやPAを多く含む素材が漢方薬などの天然医薬品に使われている可能性は高い。

本研究ではこの可能性を調べるため、胃腸障害に効くとされる生薬におけるLPA/PA含量を調べた。また、PAやLPAを多く含むものについて抗胃潰瘍効果を調べることにした。

■結果・考察

1) 生薬の選定およびPA/LPA分子種分析

日本薬学会編「薬学生・薬剤師のために知っておきたい生薬100」を参考に、胃腸障害への効能、特に胃潰瘍を抑制あるいは予防するとの記載がある生薬21種をリストした。これらの生薬より脂質を抽出し、TLCを用いてLPAおよびPAを単離した。単離したPAおよびLPAについてリン酸モノエステル捕獲試薬のPhos-tagを用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を行い、構造を確認すると共に分子種分析を行った。典型的な結果としてシャクヤクのPAおよびLPAのマスペクトルを図1A, Bにそれぞれ示す。図1-Aにおいて高いイオン強度で観察される m/z 1259.77および m/z 1283.76はそれぞれ、16:0/18:2-PAおよび18:2/18:2-PAと帰属可能である。また、これらよりも2マス低い質量数を有するイオンも存在するが、これらは16:0/18:3-PAおよび18:2/18:3-PAと帰属可能である。一方、シャクヤクLPAのMALDI-TOF MS(図1-B)に

表1 抗胃潰瘍など消化管を丈夫にする効能を示す生薬リスト

Name (カタカナ)	Name (漢字)	Name(English)	効能
ウイキョウ	茴香	Fennel	抗消化性潰瘍潰瘍作用
ガジュツ	我朶	Zedoary	種々の胃潰瘍に対する保護
エンゴサク	延胡索	Corydalis Tuber	抗消化性潰瘍作用
オウバク	黄柏	Phellodendron bark	胃出血、胃潰瘍抑制
オウレン	黄連	Coptis rhizome	苦味健胃整腸薬
カロコン	か楼根	Trichosanthes Root	抗消化性潰瘍作用
カンゾウ	甘草	Glycyrrhiza, Licorice Root	消化性潰瘍
キキョウ	桔梗	Platycodon Root	抗潰瘍作用
クジン	苦参	sophora root	抗ストレス潰瘍作用
ゴミシ	五味子	Schisandra Fruit	ストレス胃潰瘍予防
サイコ	柴胡	Bupleurum Root	抗潰瘍作用
シャクヤク	芍薬	Peony root	ストレス潰瘍予防
シュクシャ	縮砂	Amomum seed	胃酸分泌制御作用
ショウキョウ	生姜	Ginger	抗潰瘍、下痢抑制
カンキョウ	乾姜	Ginger	抗潰瘍、下痢抑制
ショウマ	升麻	Cimicifuga Rhizoma	抗潰瘍作用
チクセツニンジン	竹節人參	Panax Rhizoma	ストレス潰瘍抑制作用
ハンゲ	半夏	Pinella tuber	急性胃カタル
ビャクジュツ	百じゆつ	Atractylodes Rhizome	エタノール誘発胃潰瘍抑制
ソウジュツ	蒼じゆつ	Atractylodes lancea Rhizome	抗胃潰瘍
ブクリョウ	ぶくりょう	Poria Sclerotium	抗胃潰瘍作用
ボタンピ	牡丹皮	Moutan Bark	ストレス性胃潰瘍抑制

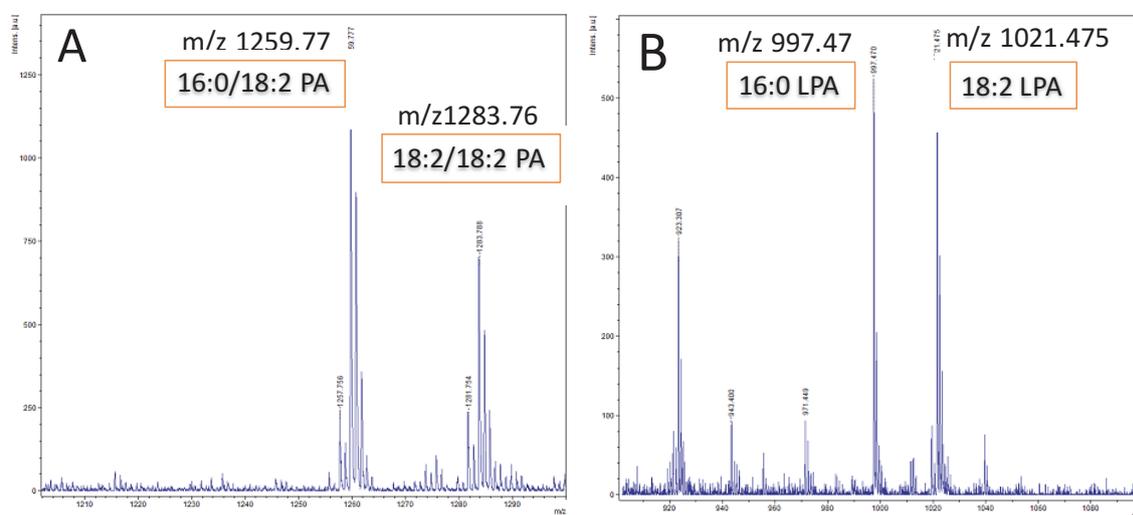


図1 シャクヤク由来PA(A)あるいはLPA(B)のPhos-tagの複合体のマトリックス支援レーザー脱離イオン化法によるマススペクトル

て検出される m/z997.47 および m/z1021.48 はそれぞれ、16:0-LPA および 18:2-LPA である。このようにしてリストした生薬から PA および LPA を単離し、MALDI-TOF MS による分子種分析を行った。得られたそれぞれのイオン強度の和より各分子種の相対的な割合を計算し、分子種組成のめやすとした。この結果を表2 および表3 に示す。

表2 胃腸障害に効くとされる生薬のPA分子種組成

Name	% of each molecular species	Name	% of each molecular species
ガジュツ	----	カンキョウ	100% 18:2/18:2 PA
エンゴサク	----	チクセツニンジン	60% 16:0/18:2 PA 16% 16:0/18:1 PA 24% 18:2/18:2PA
オウバク	----	ショウマ	100% 16:0/18:2 PA
ウイキョウ	32% 16:0/18:2PA, 16% 16:0/18:1PA 16% 18:2/18:2PA 22%18:1/18:2PA, 14%18:1/18:1PA	ショウキョウ	75% 16:0/18:2 PA 16% 16:0/18:3 PA,9% 18:2/18:2
オウレン	60% 16.:0/18:2PA 40% 18:2/18:2PA	シュクシャ	48% 16:0/18:2 PA,52 % 16:0/18:1 PA
サイコ	100%16:0/18:2 PA	ビャクジュツ	67% 16:0/18:2 PA,33% 18:2/18:2 PA
ゴミシ	77 % 16:0/18:2PA 23% 16:0/18:1 PA	ソウジュツ	66% 16:0/18:2 PA,34% 18:2/18:2 PA
クジン	53% 16:0/18:2 PA 47% 18:2/18:2 PA	ボタンピ	55% 16:0/18:2 PA,45% 18:2/18:2
キキョウ	62% 16:0/18:2 PA 38% 18:2/18:2 PA	シャクヤク	53% 16:0/18:2 PA,28% 18:2/18:2 PA,10%18:2/18:3 PA,9% 16:0/18:3 PA
カンゾウ	62% 16:0/18:2 PA 38% 18:2/18:2 PA	ブクリョウ	----

表3 胃腸障害に効くとされる生薬のLPA分子種組成

Name	% of each molecular species	Name	% of each molecular species
ガジュツ	----	カンキョウ	22% 16:0 LPA 78% 18:2 LPA
エンゴサク	37% 16:0 LPA, 63 %18:2LPA	チクセツニンジン	100% 16:0 LPA
オウバク	39 %16:0 LPA 61%18:2LPA,,	ショウマ	46% 16:0 LPA,45% 18:2 LPA,9% 18:1 LPA
ウイキョウ	41% 16:0LPA 27% 18:1LPA, 32% 18:2LPA,	ショウキョウ	44% 16:0 LPA,46 % 18:2 LPA
オウレン	-----	シュクシャ	
サイコ	100% 16:0 LPA	ビャクジュツ	33% 16:0 LPA,67 % 18:2 LPA
ゴミシ	-----	ソウジュツ	
クジン	-----	ボタンピ	21% 16:0 LPA,14% 18:1 LPA,57% 18:2 LPA,8%18:3 LPA
キキョウ	12% 16:0 LPA 4% 18:3 LPA 83% 18:2 LPA	シャクヤク	45% 16:0 LPA,55% 18:2 LPA
カンゾウ	22% 16:0 LPA 78% 18:2 LPA	ブクリョウ	-----

2) 胃腸障害に効くとされる生薬のLPA, PA含量

現在までに19種の生薬についてPA含量を測定した。その結果、PA含量の高い生薬で2000 nmol/gであったがほとんどの生薬は700 nmol/g以下であった。我々は食品に含まれるPA含量を調べ、キャベツや大豆といった植物が約700 nmol/gと、高いPA含量を示すことを明らかにしている。これらの野菜を食事の際に摂取する量（100 g程度）を考えれば、生薬乾燥粉末のPA含量は際立って高いわけ

ではない。一方、LPA含量は少ない生薬で検出限界以下、多いもので600 nmol/gであった。これまで調べた食品ではキャベツやブロッコリーが特にLPAを多く含んでいたが、その量は高々約20 nmol/gである。一度に摂取する量を考えても600 nmol/gのLPA含量は際立っているように思える。予備的ではあるが、この生薬由来の脂質はインドメタシン潰瘍を抑制する効果を示した。現段階で、この効果は乾燥粉末に含まれるLPAによるとは断言できないが、その可能性は十分にあると思われる。

■結論

経口摂取したホスファチジン酸 (PA) は消化管内でリゾホスファチジン酸 (LPA) に消化される。胃粘膜上皮細胞の管腔側には2型LPA受容体が発現しており、抗アポトーシスやプロスタグランジンE2産生を誘導し、消化管粘膜の恒常性維持に関わっている可能性がある。我々は以前、LPAやその前駆体のPAの経口投与は抗胃潰瘍効果を示すことを見出した。本研究ではPAやLPAを薬効成分とする生薬について検索した。その結果、高度にLPAを濃縮した生薬が存在し、この生薬の抗胃潰瘍効果にLPAが関わっている可能性が示された。今後、さらなる実験を通して生薬成分の薬効成分としてリゾリン脂質メディエーターが機能していることを明らかににしたいと考える。

■文献

- 1) Balazs, L., Okolicany, J., Ferrebee, M., Tolley, B., Tigyi, G.: Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 280, R466-472, 2001
- 2) Deng, W., Balazs, L., Wang D-A., Van Middlesworth, L., Tigyi, G., Johnson, L.R.: Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis, *Gastroenterology*, 123, 206-216, 2002
- 3) Sturm, A., Sudermann, T., Schulte, K-M., Goebell, H., Dignass, A. U., Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid, *Gastroenterology*, 117, 368-377, 1999
- 4) Adachi, M., Horiuchi, G., Ikematsu, N., Tanaka, T., Terao, J., Satouchi, K., Tokumura, A.: Intragastrically administered lysophosphatidic acid protect against gastric ulcer in rats under water-immersion restraint stress, *Dig. Dis. Sci.*, 56, 2252-2261, 2011
- 5) Tanaka, T., Morito, K., Kinoshita, M., Ohmoto, M., Urikura, M., Satouchi, K., Tokumura, A.: Orally administered phosphatidic acids and lysophosphatidic acids ameliorate aspirin-induced stomach mucosal injury in mice, *Dig. Dis. Sci.*, 58, 950-958, 2013
- 6) Li, C., Dandridge, K.S., Di, A., Marrs, K.L., Harris, E.L., Roy, K., Jackson, J.S., Makarova, N.V., Fujiwara, Y., Farrar, P.L., Nelson, D.J., Tigyi, G.J., Naren, A.P.: Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependent protein interactions, *J. Exp. Med.*, 202, 975-986, 2005
- 7) Tanaka, T., Ohmoto, M., Morito, K., Kondo, H., Urikura, M., Satouchi, K., Tokumura, A.: Type 2 lysophosphatidic acid receptor in gastric surface mucous cells: Possible implication of prostaglandin E2 production, *BioFactors*, in press
- 8) Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A.: lysophosphatidic

- acid, a growth factor-like lipid, in the saliva, *J. Lipid Res.*, 43, 2049-2055, 2002
- 9) Tanaka, T., Horiuchi, G., Matsuoka, M., Hirano, K., Tokumura, A., Koike, T., Satouchi K.:
Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves,
Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 1293-1300, 2009