

令和5年度（第46回） 研究・調査助成について

令和5年4月1日から5月31日にわたり公募を行い、選考委員会において慎重なる審議の結果、下記の5編が採用された。（1編あたり50～80万円、総額330万円）

1. 河村 逸外（カワムラ ハヤト）・・・80万円
【所属】 名古屋市立大学 消化器・代謝内科学
【題目】 肝臓がん治療薬レンパチニブの副作用、尿蛋白を軽減する蓮肉の作用とその活性成分の探索
2. 倉地 秀明（クラチ ヒデアキ）・・・80万円
【所属】 名古屋市立大学大学院医学研究科 神経毒性学分野 技術職員
【題目】 東洋医学の生薬由来物質レスベラトロールによる放射線誘発消化管腫瘍の発生予防効果
3. 廣明 秀一（ヒロアキ ヒデカズ）・・・60万円
【所属】 名古屋大学 創薬科学研究科 構造分子薬理学分野 教授
【題目】 桜皮エキスに含まれるフラボノイドの上皮バリア機能に関する影響
4. 寺坂 和祥（テラサカ カズヨシ）・・・60万円
【所属】 名古屋市立大学大学院薬学研究科 生薬学分野 講師
【題目】 生薬ハンゲの咽頭刺激痛の原因となる因子を低減したカラスビシャクの開発
5. 日坂 真輔（ヒサカ シンスケ）・・・50万円
【所属】 名城大学薬学部薬学科 助教
【題目】 漢方方剤投与後の血中メタボローム解析を介した血中動態プロファイルの構築」（令和4年度からの連続申請）

〔助成金対象研究報告〕 ①

題目：肝臓がん治療薬レンバチニブの副作用、尿蛋白を軽減する蓮肉の作用とその活性成分の探索

研究代表者：名古屋市立大学大学院医学研究科

研究協力者：名古屋市立大学大学院医学研究科

研究協力者：名古屋市立大学大学院薬学研究科

河村逸外

野尻俊輔

牧野利明

緒言

日本で肝臓がんは、毎年3万人が死亡するがん死亡者数第5位の疾患である。初期の肝臓がんは手術やラジオ波等局所療法が中心であるが、中等度以上に進行した症例では放射線治療、血管造影、分子標的薬の適応となる。とくに、門脈に浸潤あるいは多臓器に転移した場合は、分子標的薬の良い適応となり、ソラフェニブ、レゴラフェニブの他、2018年よりレンバチニブが保険適応となった。

レンバチニブは血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR1-3)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR1-4) 等多種類の増殖因子受容体チロシンキナーゼを阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。奏効率は24.1%、病勢コントロール率も75.5%と高く、有用な薬剤である。

レンバチニブの最大の問題は、副作用が多彩でその発症率が高いことである。手足症候群44.3%、尿蛋白45.7%、高血圧49.4%と高い割合でみられそのほか血液毒性、甲状腺機能低下症、食欲不振等種類が多い。そのうち、高血圧、手足症候群、甲状腺機能低下症は治療法があるが、尿蛋白に対しては有効な手段がない。蛋白尿が増加し続けると血清蛋白が減少し、血清アルブミン値低下をきたす。肝臓の治療においてアルブミンの維持は予後を規定する第一因子であり、治療上、尿蛋白を抑えることは非常に重要である。

レンバチニブによる蛋白尿出現は、糸球体基底膜のポドサイトの細胞骨格の変化による巣状分節性糸球体効果症 (FSGS) 様変化によるとされている。

レンバチニブは、ポドサイトのRelA発現を促進、それが制御しているc-mipの発現が亢進することで、アクチンファイバー (F-actin) の形態が変化する¹⁾。

現在、その尿蛋白出現を予防する薬剤は知られていないが、名古屋市立大学病院肝臓内科において、中医学での考え方による生薬治療を行った結果、山薬、白朮、山茱萸、黄耆、蓮肉、益母草、桑螵蛸などを含む処方を用いて、レンバチニブによる尿蛋白が著名に改善した症例をいくつか経験した。

そこで、同大学院薬学研究科生薬学分野において、レンバチニブによるマウス培養ポドサイトに対する細胞毒性に対する、上述した生薬エキスの保護作用を評価したところ、蓮肉エキスに最も高い活性を認めた。本研究では、レンバチニブ誘導ポドサイトでの細胞毒性に対する蓮肉エキスの保護作用を担う活性成分を探索し、その有用性の科学的な根拠を探索し、臨床経験の科学的な根拠の構築を目指す。

方法

日本薬局方に適合する山薬、白朮、山茱萸 (それぞれLot No.0D09、0AJ0510、0L08M) を大晃生薬 (名古屋) から、黄耆と蓮肉 (それぞれ、Lot No.AJ9001、23006011) をツムラ (東京) から、益母草 (Lot No.62615) を高砂薬業 (大阪) から購入した。また、桑螵蛸 (Lot no.102317001) は、栃本天海堂 (大阪) から購入した。それぞれの生薬をミルで粉碎後、1.0gにMeOHを15mL加え、30分間、超音波処理後、ろ過してろ液を得た。残渣に同様の操作を行い、計3回、抽出して得たる液を合

わせ、減圧濃縮、乾固して、得られたエキス量を秤量した。各生薬の抽出効率、山薬、白朮、山茱萸、黄耆、蓮肉、益母草、桑螵蛸、それぞれ2.0、24、37、17、5.0、4.0、9.0 (w/w) %であった。活性が認められた蓮肉エキスについては、水に懸濁して、ヘキサソ、酢酸エチル、水飽和BuOHそれぞれで順次分液して、ヘキサソ画分、酢酸エチル画分、BuOH画分を得て、さらにその後の水層を80% EtOHに懸濁し、遠心し、EtOH可溶部(+)と不溶部(-)に分画した。

レンバチニブは、レンバチニブメシル酸塩製剤レンビマ®を、エーザイ(東京)より購入し、4mgカプセルを開封し、リン酸緩衝調整触媒陰水(0.15M、pH7.2、PBS)に懸濁させたものを使用した。

不死化処理マウスポドサイト(MPC細胞)は、千葉大学腎臓内科学 浅沼 克彦 教授より供与されたものを使用した。この細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mLペニシリン、100µg/mLストレプトマイシン、20U/mLのインターフェロン(IFN)γ含有RPMI1640培地を用いて、5%CO₂下、33°Cでの培養により維持され、実験時にはIFNγを含まない培地で37°Cで14日間、培養することで、ポドサイト様に分化させた。分化させたMPC細胞は、コラーゲンコートした培養プレートに播種した。

また、ヒト肝臓がん細胞由来株化細胞であるHepG2細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mLペニシリン、100µg/mLストレプトマイシンを含むダルベッコ修正イーグル培地(DMEM)で、5%CO₂下、37°Cで培養することで維持し、実験に使用した。

細胞毒性はMTT法で評価した。細胞を96穴プレートに5千個/wellで播種し、5%CO₂下、37°Cで24時間、培養した。その後、培地をレンバチニブと各サンプルを含むものに交換し、24時間、培養した。細胞表面をPBSで洗浄後、培地を薬物を含まないものに交換し、さらに20時間、培養した。培地を5mg/mL MTTを含むものに交換し、4時間培養した。培地を除去後、10%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含む50%ジメチルスルホキシド水

溶液を100µL/well加え、室温で振盪させながら3時間、インキュベートすることで、細胞を溶解した。その後、570nmの吸光度を測定、別に各濃度の細胞を播種したwellから得た検量線を使用して、各well内の生細胞数を算出し、細胞生存率を得た。

全てのデータは平均値 ± 標準誤差(S.E.)として表示した。データの統計解析は、Excel統計(エスミ、東京)を使用し、他群間の検定には、一元配置分散分析(ANOVA)を行った後、Dunnetの多重t検定により対照群との比較を行った。危険率p<0.05の場合に統計学的に有意とした。

結果と考察

レンバチニブは、MPC細胞に対して濃度依存的な細胞毒性を示した(図1)。

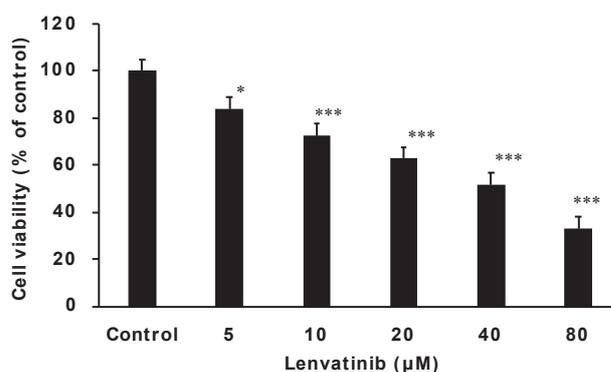


図1 レンバチニブのMPC細胞に対する細胞毒性
MPC細胞をレンバチニブを含む培地で24時間培養し、細胞毒性をMTT法で評価した。データは平均 ± 標準誤差(n=5)で示す。統計処理は、Dunnetの多重t検定を行った。*p<0.05、***p<0.001 vs control群。

次に、レンバチニブのMPC細胞毒性に対する各生薬MeOHエキス(100µg/ml)の保護作用を検討した。その結果、今回、選択した生薬のうち、黄耆、山薬、白朮、益母草、山茱萸、蓮肉の各エキスが、レンバチニブ10µMで見られたMPC細胞における細胞毒性に対して有意な保護作用を示したのに対して、桑螵蛸エキスは有意な細胞毒性を示した。各生薬のうち、蓮肉が最も高い細胞毒性保護作用を示した(図2)。

レンバチニブは、肝臓に使用されることから、肝臓がん由来細胞に対するレンバチニブの細胞毒性

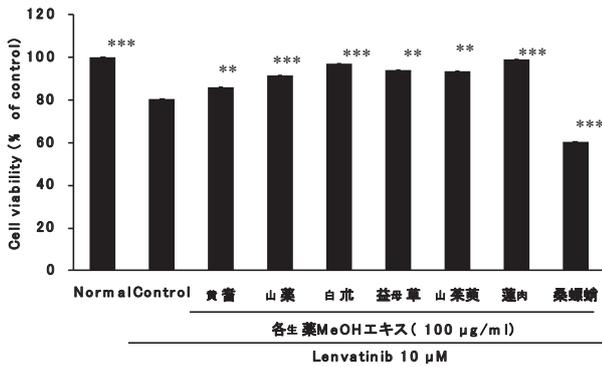


図2 MPC細胞に対するレンバチニブの細胞毒性に対する各生薬エキスの作用

MPC細胞をレンバチニブ (10 μM) と各生薬MeOHエキス (100 μg/ml) を含む培地で24時間培養し、細胞毒性をMTT法で評価した。データは平均±標準誤差 (n = 5) で示す。統計処理は、Dunnetの多重t検定を行った。**p* < 0.05、****p* < 0.001 vs control群。

に対する各生薬エキスの作用を検討した。ヒト肝がん由来HepG2細胞に対するレンバチニブの細胞毒性に対して、白朮と桑螵蛸の各エキスはさらに有意な細胞毒性を示したが、黄耆、山薬、益母草、山茱萸、蓮肉の各エキスは有意な影響を示さなかった(図3)。このことから、黄耆、山薬、益母草、山茱萸、蓮肉はレンバチニブの肝がん細胞に対する毒性には影響を与えずに、ポドサイトを保護する可能性があると考えられた。

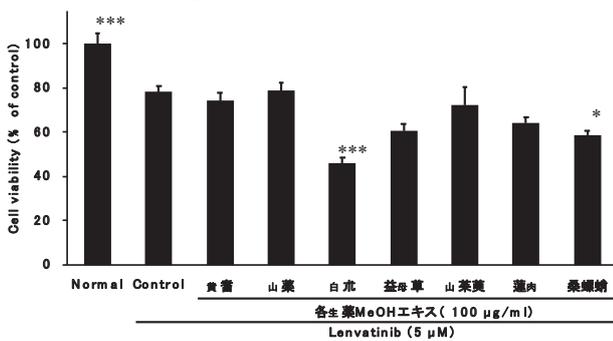


図3 HepG2細胞に対するレンバチニブの細胞毒性に対する各生薬エキスの作用

HepG2細胞をレンバチニブ (5 μM) と各生薬MeOHエキス (100 μg/ml) を含む培地で24時間培養し、細胞毒性をMTT法で評価した。データは平均±標準誤差 (n = 5) で示す。統計処理は、Dunnetの多重t検定を行った。**p* < 0.05、****p* < 0.001 vs control群。

レンバチニブのMPC細胞毒性に対して最も強い保護作用を示した蓮肉に注目することとし、蓮肉エキスの作用の濃度依存性を検討した。その結果、蓮

肉エキスの細胞保護作用は0.8 mg/mLの濃度で最大となり、それ以上の濃度では有意な細胞毒性を示した(図4)。

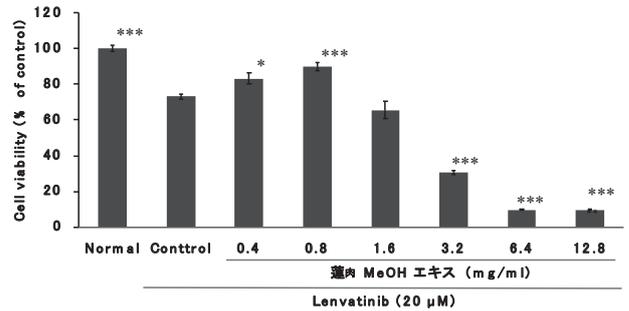


図4 MPC細胞に対するレンバチニブの細胞毒性に対する蓮肉エキスの作用

MPC細胞をレンバチニブ (20 μM) と蓮肉MeOHエキスを含む培地で24時間培養し、細胞毒性をMTT法で評価した。データは平均±標準誤差 (n = 5) で示す。統計処理は、Dunnetの多重t検定を行った。**p* < 0.05、****p* < 0.001 vs control群。

さらに、蓮肉エキスに含まれる活性成分を探索するために、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、BuOH画分、80% EtOH可溶部と不溶部に分画し、それぞれの作用を評価した。その結果、BuOH画分が有意な細胞毒性を示した一方で、80% EtOH可溶部と不溶部それぞれがレンバチニブの細胞毒性に対する有意な保護作用を示した(図5)。

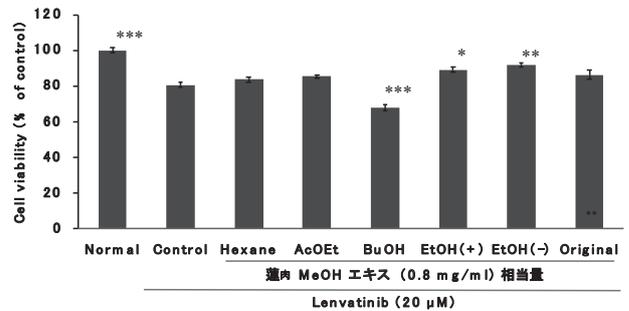


図5 MPC細胞に対するレンバチニブの細胞毒性に対する蓮肉エキス分画物の作用

MPC細胞をレンバチニブ (20 μM) と蓮肉MeOHエキス分画物を元のエキス (Original) 0.8 mg/ml相当量を含む培地で24時間培養し、細胞毒性をMTT法で評価した。データは平均±標準誤差 (n = 5) で示す。統計処理は、Dunnetの多重t検定を行った。**p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001 vs control群。

蓮肉には、lotusine、liensinine、neferineなどのアルカロイド、(±)-gallo catechin、epicatechin、(-)-catechinなどのカテキン類、camphene、1,8-cineolなどの精油成分、β-sitosterol等のステロイ

ド、9-hydroxymegastigm-7-en-9-oneなどのセスキテルペンの他、脂肪酸、多糖類、オリゴ糖、単糖類、ビタミン類、必須アミノ酸など、さまざまな化合物が含まれることが報告されている²⁾。これらのうち、アルカロイド、精油成分、セスキテルペン、ステロイド、脂肪酸はヘキサン層または酢酸エチル層へ、カテキン類は酢酸エチル層またはBuOH層へ、単糖類、ビタミン類、必須アミノ酸類はEtOH(+)画分へ、オリゴ糖類と多糖類はEtOH(-)画分へ、それぞれ移行すると予想される。単糖類、ビタミン類、必須アミノ酸、オリゴ糖、多糖類は蓮肉に限らず多くの植物由来素材に含まれる一次代謝産物である。本研究で、山薬、白朮、山茱萸、黄耆、蓮肉、益母草の各エキスにレンバチニブのポドサイト細胞毒性に対する有意な保護作用が見られたのも、ビタミン類、必須アミノ酸などの一次代謝産物が活性を示した可能性がある。今後、蓮肉に限らず、これらの生薬に含まれる有効成分の分離を進めていきたい。

謝 辞

本研究に多大なご支援をいただきました、東洋医学研究財団に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Izzedine, H. et al., Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy. *Kidney Int.* 85(2) 457-470, 2014.
- 2) Sharma, B.R., et al., A comprehensive review on chemical profiling of *Nelumbo nucifera*: Potential for drug development. *Phytother. Res.* 31(1), 3-26, 2017.
- 3) Bishayee, A. et al., Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and its bioactive phytochemicals: A tribute to cancer prevention and intervention cancers, *Cancers* 14(3) 529, 2022.

〔助成金対象研究報告〕 ②

題目：東洋医学の生薬由来物質レスベラトロールによる放射線誘発消化管腫瘍の発生予防効果

研究代表者：名古屋市立大学大学院 医学研究科 神経毒性学分野 技術職員 倉地 秀明

研究協力者：名古屋市立大学大学院 医学研究科 神経毒性学分野 教授 酒々井 眞澄

研究協力者：量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 放射線医学研究所 アーカイブ利用研究グループ
グループリーダー 森岡 孝満

1. 諸言

1.1 研究の背景と目的

東洋医学の生薬にはイタドリ (*Polygonum cuspidatum*) があり、その根 (虎杖根、コジョウコン) にはレスベラトロール (resveratrol) が豊富に含まれている。レスベラトロールはポリフェノール化合物に分類されるフィトケミカル (phytochemical) の一種であり、この物質は72の植物種に含まれることがわかっている。食品では、赤ワイン、ブドウ、ピーナッツに含まれており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗真菌作用などが報告されている (1)。さらに、レスベラトロールが持つ血小板凝集抑制や脂質代謝への作用は、虚血性心疾患に伴う死亡数の減少を説明する疫学的エビデンスとして注目されている (2)。

日本における医療被ばく線量は世界平均と比べて高い (3)。よって、放射線治療後の二次発がんリスク、特に小児は放射線感受性が高く、リスクの上昇が懸念されるため、その予防策を講ずることが重要である。そこで、我々が着目したのはレスベラトロールである。動物実験ではがん予防効果を含む様々な効果が報告されており、機序としてカロリー制限の模倣効果が考えられている (4)。しかし、レスベラトロールを用いた放射線発がんの予防効果、特に放射線高感受性臓器のひとつである消化管についての報告は少ない。

我々はこれまでに、放射線医学研究所 (量子医学研究所, 千葉市) と共同で放射線照射に伴う特異的 LOH (Loss of heterozygosity) パターンに関する研

究 (5) およびレスベラトロールの抗腫瘍効果 (6) について研究を行ってきた。LOHとはヘテロ接合性の消失、つまり染色体上の対立遺伝子座の欠失を意味しており、共同研究者の森岡らは家族性大腸腺腫症の改良動物モデルである C3B6F1*Apc*^{Min/+} マウスの18番染色体上のLOH解析により、マウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン (これをS-typeとする)と放射線照射されたマウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン (これをR-typeとする)に分類した (5)。S-typeでは染色体末端から*Apc* 遺伝子座までがB6マウス染色体に置き換わるLOHパターンを示すのに対し、R-typeでは*Apc* 遺伝子座付近に部分的な欠失が生じるLOHパターンを示す特徴がある (我々はこれを「放射線シグネチャー」と呼んでいる) (5)。また、C3B6F1*Apc*^{Min/+} マウスを用いた我々の先行研究では放射線照射により腫瘍の数とサイズの増大がみられた (7)。さらに、パイロット研究では放射線照射後0.01%レスベラトロール飲水投与によりC3B6F1*Apc*^{Min/+} マウスの小腸に発生した腫瘍のうち長径2 mm以上の腫瘍の数が減少した (未発表データ)。このような背景から、本研究では放射線照射されたマウスの小腸に発生した腫瘍サンプル、およびレスベラトロールの投与によって発生数が減少した腫瘍サンプルを用いて放射線シグネチャーをそれぞれ解析することでレスベラトロールの小腸腫瘍発生抑制効果に特徴づけられる放射線シグネチャーを調べた。

2. 材料と方法

2.1 化合物

レスベラトロール (Sigma-Aldrich) は dimethyl sulfoxide (DMSO) (FUJIFILM Wako Pure Chemical) に溶解し、-20℃で保存した。使用する際は DMSO 濃度が0.3%になるように細胞培養培地に添加した。

2.2 細胞培養

American Type Culture Collection より入手したヒト大腸がん細胞株 HCT116 および HT29 は、10% fetal bovine serum (FBS; Biowest) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて、37℃、5% CO₂ 条件下インキュベーター内で培養した。

2.3 細胞増殖アッセイ

24-well plate (Thermo Fisher Scientific) を使用し、HCT116細胞または HT29細胞を各 well に 4.0×10^4 個播種し一晩培養した。その後、濃度 50, 100, 150 μM となるようにレスベラトロールを添加し 48 時間処理した。対照 (コントロール) は DMSO (0.3%) とした。48 時間培養後 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT; Nacalai Tesque) を終濃度が 0.5 mg/mL となるように細胞培養培地に交換し 2 時間培養、培地を除去し、形成されたホルマザンを DMSO に溶かした。得られた溶解液の吸光度 (535 nm) を測定した。コントロールの細胞増殖率を 100% として各濃度のレスベラトロール処理での細胞増殖率を求めて増殖曲線を作成した。各アッセイは先行研究にならって複数回行った (6)。

次の式により IC₅₀ (50% 増殖抑制濃度) を計算した。

$$IC_{50} (\mu M) = (H-50) / (H-L) \times (C_L - C_H) + C_H$$

H (%) : 生存率 50% 以上で最も 50% に近い生存率

L (%) : 生存率 50% 以下で最も 50% に近い生存率

CH (μM) : H の時の化合物の濃度

CL (μM) : L の時の化合物の濃度

2.4 フローサイトメトリーアッセイ

1×10^6 個の HCT116 細胞または HT29 細胞を 10-cm dish (Thermo Fisher Scientific) に播種し一晩培

養後、濃度 150 μM となるようにレスベラトロールを添加し 24 時間処理した。コントロールは DMSO (0.3%) とした。24 時間処理後、細胞をトリプシンで剥がし回収後、70% エタノールで固定した。その後、RNase (200 μg/mL) (Nacalai Tesque) 処理し propidium iodide (0.1 mg/mL) (Nacalai Tesque) を加えて核を染色した。解析装置は FACSCanto II (BD Biosciences) を使用し FACS DIVA ソフトにて細胞周期のヒストグラムを作成した。各アッセイは先行研究にならって複数回行った (6)。

2.5 動物実験

2.5.1 実験動物と放射線照射

雄 B6 *Apc*^{Min/+} マウス (Jackson Laboratory)、雌 C3H/HeJ マウス (Charles River Laboratories) を購入し交配することで C3B6F1*Apc*^{Min/+} マウスを得た。マウス耳組織より DNA を抽出し *Apc* 遺伝子型をチェックすることで仔の genotype を決定した。マウスは室温 23 ± 2℃、湿度 50% ± 10%、明/暗 12 時間の環境下で基礎食 (MB-1, Funabashi farm) にて飼育した。実験開始後、C3B6F1*Apc*^{Min/+} マウスが 2 週齢の時点で全てのマウスに 2 Gy の X 線を 1 回全身照射した。照射後 2 週間目 (4 週齢) に、マウスを次のように 2 群に分けた。コントロール群 (n=10) (vehicle として 0.04% エタノール飲水投与)、0.01% レスベラトロール群 (n=10) (0.01% レスベラトロール飲水投与)。30 週齢目で安楽死後、小腸を摘出し、10% 緩衝ホルマリン液で固定した。腫瘍組織はパラフィン包埋後、腫瘍を薄切 (5 μm)、抗 β-カテニン抗体 (BD Biosciences) で免疫組織化学染色、腫瘍細胞に β-カテニンが高発現している部位をレーザーマイクロダイセクション (Leica Biosystems) で分離回収後、QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。動物実験は実験計画書の申請・承認後、施設の「動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して実施された。

2.5.2 PCR と LOH 解析

LOH 解析の概要を図 1 に示す。コントロール群およびレスベラトロール群の小腸に発生した腫瘍の

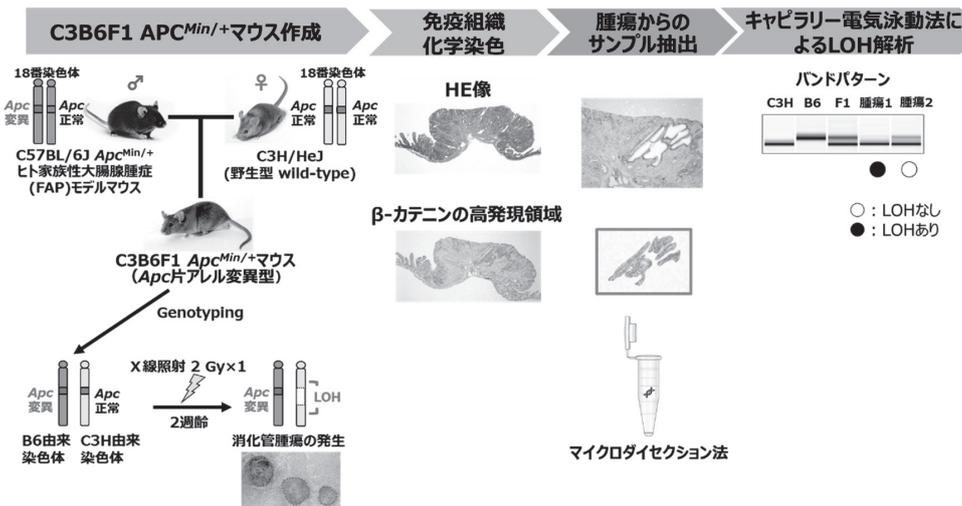


図1. LOH解析の概要

うち、長径が2 mm以上の腫瘍組織からマイクロダイセクション法にてサンプルを切り出し、ここからDNA (QIAamp DNA Micro kit) を抽出した。また、各群の小腸の非腫瘍組織からDNAを抽出した。18番染色体上の*Apc*領域に想定されるLOHを検出するためPCR法とキャピラリー電気泳動法を行った。ゲノムDNA増幅用の反応液は10× buffer 1.5μL、2 mM dNTP 1.5μL、10μM forward/reverse primer set各0.4μL、HiDi taq (Mexix Biochemica) 0.15μL、超純水 10.05μL、テンプレートDNA 1μLとした。反応条件は、95℃ 2分、57℃ 5分を1サイクル、72℃ 30秒、95℃ 15秒、57℃ 15秒を42サイクル、72℃ 2分を1サイクルとした。LOH検出用の反応液は、10× buffer 1.5μL、2mM dNTP 1.5μL、25mM MgCl₂ 1.5μL 10μM forward/reverse primer set 各 0.4μL、AmpliTaq Gold (Thermo Fischer) 0.075μL、超純水 8.625μL、テンプレートDNA 1μLとした。反応条件は、95℃ 9分、60℃ 5分を1サ

イクル、72℃ 15秒、95℃ 15秒、60℃ 15秒を20サイクル、72℃ 30秒、95℃ 30秒、60℃ 30秒を25サイクル、72℃ 2分を1サイクルとした。PCRで増幅したDNA fragmentはキャピラリー電気泳動システム (Qiagen) で解析した。

LOHの判定については非腫瘍組織からPCR増幅されて得られたDNA fragmentと小腸腫瘍組織から得られたDNA fragmentをそれぞれ比較し、C3Hマウス染色体由来のDNA fragmentのバンドの有無・濃淡・移動度などの複数のパラメータを評価しLOHの有無を最終的に判定した。この判定に基づき、S-typeおよびR-typeのLOHパターン（放射線シグネチャー）を検証した。GenotypingおよびLOH解析用のプライマーセットおよびPCR増幅されて得られたDNA fragmentのサイズ (bp) を表1に示す。

2.6 統計解析

統計解析にはSPSS (IBM) を用いた。データの正規分布を確認後、2群の平均値の比較ではStudent

表1. ジェノタイプングおよびLOH解析に使用したプライマーセット

名称	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列	B6由来 DNA fragment (bp)	C3H由来 DNA fragment (bp)
<i>Apc</i> ⁺ allele	5'-TTCTGAGAAAGACAGAAAGTTT-3'	5'-TGTCGCCTCGGGAGGTATGA-3'		176
<i>Apc</i> ^{Min} allele	5'-TGTCGCCTCGGGAGGTATGA-3'	5'-TTTGGCTATCTGGGCTGCAG-3'	133	
D18Mit120	5'-ACTGCACTGGTCCCATTTTC-3'	5'-CAATAGTTGAAATCAGACAGGC-3'	178	156
D18Mit184	5'-ACACATGTGTAGGTAGGTAGGTAGG-3'	5'-CGCACAAGGACTACTGAAACA-3'	172	127
D18Mit186 (<i>Dec</i>)	5'-AAGTGTGGGCAAAGGCTAA-3'	5'-CTTAGTATAGTGTGCATGAGTGTGA-3'	126	108
D18Mit187	5'-TGCTTGAAGAAAGAGATCCTACG-3'	5'-GACATGCATGCCTGTAAGTCC-3'	118	100

t検定、正規分布が確認できない場合はMann-Whitney U検定をそれぞれ行った。3群の比較では一元配置分散分析後、Games-Howel多重比較検定を行った。2集団2カテゴリーのデータにはFisher検定を行った。 $P<0.05$ にて有意差ありと判定した。

3. 結果

3.1 細胞増殖アッセイ

レスベラトロールのヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制効果を検証した。レスベラトロールは、ヒト大腸がん細胞株であるHCT116およびHT29に対して濃度依存性の増殖抑制効果を発揮した(図2)。HCT116およびHT29細胞株に対するレスベラトロールの IC_{50} 値はそれぞれ111 μ Mおよび114 μ Mであった。

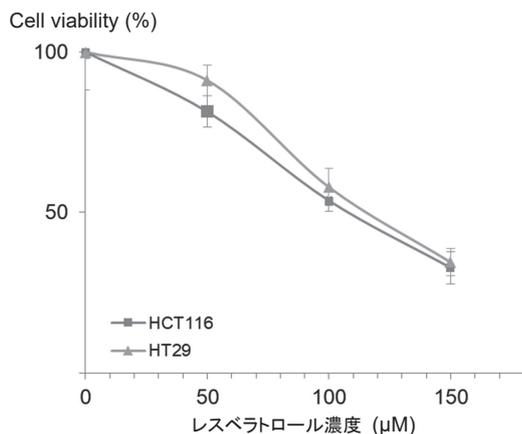


図2. レスベラトロールのヒト大腸がん細胞に対する増殖抑制効果

3.2 フローサイトメトリーアッセイ

レスベラトロールはHCT116およびHT29細胞株に対して増殖抑制効果を示したことから、レスベラトロールの細胞周期への影響とアポトーシス誘導能の有無を解析した。HCT116細胞株では150 μ Mレスベラトロールばく露群の各%分画は、subG1期10%、G1期68%となり、それぞれコントロール群に比べて有意に増加($P<0.05$)、それに伴いレスベラトロールばく露群のS期およびG2/M期はコントロール群と比較してそれぞれ10%および14%だけ有意に減少した($P<0.05$) (表2と図3)。一方で、HT29細胞株ではコントロール群とレスベラトロールばく露群の%分画はともにG1期61%であった。S

期の比較では有意差は見られなかったが、レスベラトロールばく露群ではコントロール群に比べて7%増加した。レスベラトロールばく露群の%分画についてG2/M期はコントロール群よりも10%有意に減少し、subG1期は2%有意に増加した(表2と図3)。

表2. ヒト大腸がん細胞株に対するレスベラトロールの細胞周期への影響およびSubG1期の誘導

細胞株	処理	%分画			
		sub-G1	G1	S	G2/M
HCT116	Control (0.3% DMSO)	0.48 \pm 0.08 ^a	54.04 \pm 0.54 ^a	30.12 \pm 2.0 ^a	15.26 \pm 1.57 ^a
	150 μ M レスベラトロール	10.40 \pm 3.52 ^b	68.42 \pm 2.79 ^b	20.14 \pm 3.15 ^b	1.03 \pm 0.34 ^b
HT29	Control (0.3% DMSO)	0.40 \pm 0.06 ^a	60.70 \pm 0.97	23.07 \pm 1.62	15.54 \pm 1.44 ^a
	150 μ M レスベラトロール	2.33 \pm 0.37 ^b	61.28 \pm 3.42	30.18 \pm 4.51	5.95 \pm 1.38 ^b

各分画にある細胞の割合(%分画, 平均値 \pm SD)を示す。同列の平均値に異符号(a, b)が記載された場合は有意差あり($P<0.05$)。

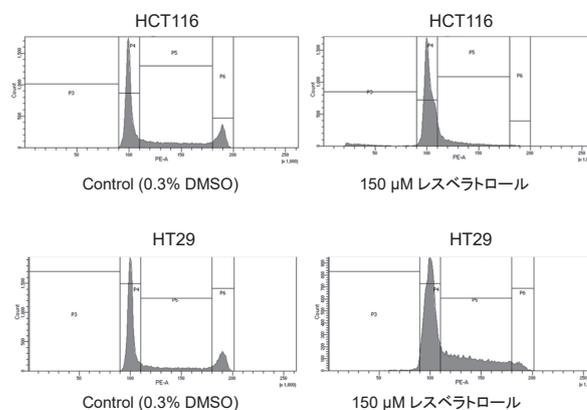


図3. ヒト大腸がん細胞株(HCT116およびHT29細胞株)に対するレスベラトロールの細胞周期への影響およびSubG1期の誘導(ヒストグラム)

3.3 LOH解析

動物実験において、コントロール群およびレスベラトロール群に発生した長径2mm以上の腫瘍は、マウス1匹当たりそれぞれ平均42個および22個であり(マウス1匹当たりの腫瘍数を多発度(multiplicity)と呼ぶ)有意差を認めた($P<0.05$)。各群の腫瘍から解析用サンプルを無作為に選んだ。コントロール群を計9サンプル、レスベラトロール群を計13サンプルとし、18番染色体上に存在する計6つのマーカーについてLOH解析を行った。ここでは、LOHパターンを次の二つに分ける。マウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン(これをS-typeとする)と放射線照射されたマウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン(これをR-typeとする)である

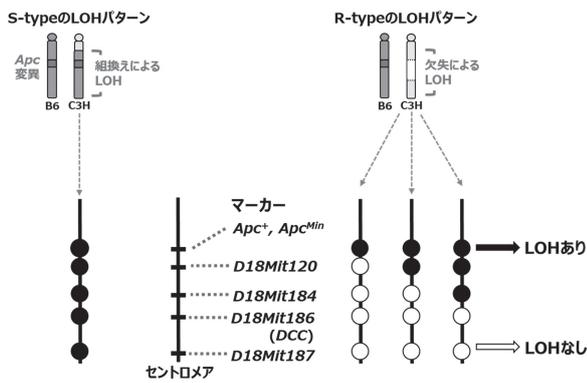


図4. 18番染色体上のマーカーが示すLOHパターン (放射線シグネチャー)

LOHパターンは次の2種類に分類される (5)。マウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン (これをS-typeとする) と放射線照射されたマウスの小腸に発生する腫瘍が示すLOHパターン (これをR-typeとする) である。図では●がLOHあり、○がLOHなしをそれぞれ示す。各マーカーが示すDNA fragmentのバンド情報からLOHの有無を判定している (材料と方法p6参照)。

(図4)。解析の結果、コントロール群ではS-typeが4/9 (44%)、R-typeが5/9 (56%) でありレスベラトロール群ではS-typeが4/13 (31%)、R-typeが9/13 (69%) であった (表3と図5)。18番染色体上に存在する6つのマーカーについてLOHのパター

ンは、コントロールおよびレスベラトロール群ともにR-typeの頻度が高い結果であった。Fisher検定では有意差は認めなかった。(表3)

4. 考察

本研究では、東洋医学の生薬由来物質レスベラトロールの細胞レベルでの抗がん効果と個体レベルでの小腸腫瘍発生抑制効果に特徴づけられる放射線シグネチャーを調べた。レスベラトロールはヒト大腸がん細胞株の増殖抑制、細胞周期G1期停止 (G1 arrest) およびアポトーシス誘導作用 (subG1 fraction)、放射線照射を受けた個体に発生した小腸腫瘍 (≥2mm) ではR-typeのLOHパターンの頻度が高い傾向にあることを見出した。

腫瘍組織におけるLOH解析では、腫瘍組織の周辺に存在する正常組織 (間質含む) の混入がLOH判定の精度に大きく影響することを我々は経験している。このような状況を極力回避するために本研究では組織切片から作成されたスライド標本での腫瘍の確認とβ-カテニンタンパク高発現部位の同定 (免疫組織化学染色)、マイクロダイセクション法に

表3. 各実験群におけるLOHパターンの頻度と割合

実験群	S-type	R-type
コントロール群	4/9 (44%)	5/9 (55%)
レスベラトロール群	4/13 (31%)	9/13 (69%)

各数値は解析に用いたサンプル数を示す。

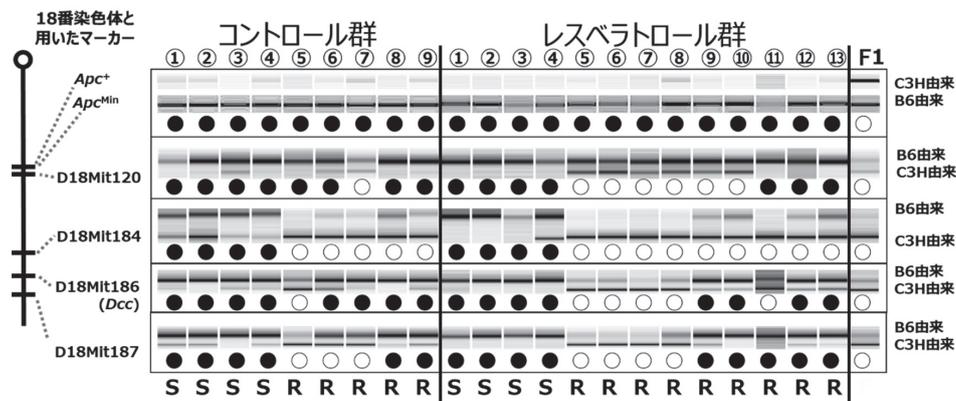


図5. LOH解析による各DNAサンプルのバンドパターン

①～⑨および①～⑬はコントロール群の腫瘍およびレスベラトロール群の腫瘍からそれぞれ無作為に選んだDNAサンプル番号を示す。F1はC3B6F1ApcMin/+マウスを示す。●はLOHあり、○はLOHなしを示す。SはS-type、RはR-typeを示す。

よる腫瘍組織の核出を行った。 β -カテニンは大腸がんを含む様々ながん腫に過剰発現しWntシグナル経路の細胞内シグナル伝達因子として働く(8)。また、このタンパクはヒトやげっ歯類の消化管前がん病変や腫瘍細胞に高発現するため腫瘍同定のバイオマーカーとしても有用であり(9)、今回このシステムを利用した。これらの手法は我々の研究室と共同研究施設(量研)において確立しており、よって今回のLOH解析用のDNAサンプル調製は適切に行われたと我々は考えている。

ゲノム上のLOHをスクリーニングするには適度な数のマーカー(多くはマイクロサテライト上の塩基配列を利用)が適度な範囲に設定される必要がある。よって本研究では、18番染色体上に存在するApc遺伝子領域の解析に広く用いられている6種類のマーカーを利用した。先行研究により、Apc遺伝子変異(point mutation)をきっかけに自然発症した腫瘍ではApc遺伝子座からテロメア側にゲノムの広い範囲で遺伝子組み換えによるLOHが起きやすく、放射線照射後に発生した腫瘍ではApc遺伝子座付近の狭い範囲で遺伝子の欠失(deletion)によるLOHが起きやすい(5)。本研究の結果から、このLOHパターンの傾向が再現されており、コントロールおよびレスベラトロール群ともにR-typeの頻度が高いということがわかった。レスベラトロール群では腫瘍の多発度(multiplicity)はコントロール群と比較して有意に減少しているので($P<0.05$)、少なくとも現状では、レスベラトロールの小腸腫瘍発生抑制効果に特徴づけられる放射線シグネチャーはR-typeのパターンであることを示唆している。しかし本研究の限界は、LOH解析に使用した腫瘍サンプル数が限られていること、18番染色体上のマーカーの数がデータの信頼性に十分であるかの検証が必要であると考えられる。これらを踏まえて現在、サンプル数を増やして解析を継続中である。また、レスベラトロールの予防効果を正確に検証するには発生初期のサイズが小さい腫瘍(長径 ≤ 2 mm)も解析対象にする必要がある。

我々は本研究を放射線発がんの軽減につながる食

品や化合物の摂取による効果とリンクするLOHシグネチャー発見の端緒にしたい。このようなLOHシグネチャーはがん予防の新たなバイオマーカーとなる可能性がある。

5. 謝辞

本研究の遂行ならびに研究成果をまとめるにあたり丁寧にご指導いただいた名古屋市立大学大学院医学研究科神経毒性学分野の酒々井眞澄教授に深甚なる謝意を表します。LOH解析にご協力いただいた国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構の森岡孝満博士(グループリーダー)に心から感謝の意を表します。細胞実験にご協力をいただいた名古屋市立大学神経毒性学分野の関係者に深くお礼申し上げます。最後に、本研究への研究助成金を提供していただいた(公財)東洋医学研究財団に深謝いたします。

6. 文献

1. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beercher CWW, Fong HHS, Fransworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220, 1997
2. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem* 30: 91-113, 1997.
3. Berrington A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet* 363: 345-351, 2004.
4. Vidoni C, Ferraresi A, Esposito A, Maheshwari C, Dhanasekaran D N, Mollace V, Ishidoro C. Calorie Restriction for Cancer Prevention and Therapy: Mechanisms, Expectations, and Efficacy. *J Cancer Prev* 26: 224-236, 2021.
5. Yanagihara H, Morioka T, Yamazaki S, Yamada Y, Tachibana H, Daino K, Tsuruoka C, Amasaki Y, Kaminishi M, Imaoka T, Kakinuma S. Interstitial

- deletion of the *Apc* locus in β -catenin-overexpressing cells is a signature of radiation-induced intestinal tumors in C3B6F1*Apc*^{Min/+} mice. *J Radiat Res* 64: 622-631, 2023
6. Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 8: 893-903, 2002.
 7. Morioka T, Yamazaki S, Yanagihara H, Sunaoshi M, Kaminishi M, Kakinuma S. Calorie Restriction Suppresses the Progression of Radiation-Induced Intestinal Tumours in C3B6F1*Apc*^{Min/+} Mice. *Anticancer Res* 41: 1365-1375, 2021.
 8. Suzui M, Masuda M, Lim JT, Albanese C, Pestell RG, Weinstein IB. Growth inhibition of human hepatoma cells by acyclic retinoid is associated with induction of p21^{CIP1} and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Res* 62: 3997-4006, 2002.
 9. Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *J Toxicol Pathol* 26: 335-341, 2013.

〔助成金対象研究報告〕 ③

題目：桜皮エキスに含まれるフラボノイドの上皮バリア機能に関する影響

研究代表者：名古屋大学大学院創薬科学研究科

研究協力者：名古屋大学大学院創薬科学研究科

研究協力者：名古屋大学大学院創薬科学研究科

教授 廣 明 秀 一

大学院生 江 本 結 理

技術員 天野（合田）名都子

諸 言

タイトジャンクション（TJ）は上皮細胞で細胞間を密着させて細胞間隙の物質の通過を妨害し、外界からの異物の体内への侵入を阻止するバリアとして機能する細胞間接着装置である。TJは上皮細胞の頂端部に位置し、隣接細胞の細胞膜を隙間なく接着することで、細胞間の物質を制御している（文献1）。2009年に古瀬（生理学研究所）らが、E3酵素LNX1p80がTJの主要構成成分であるクローディン（CLDN）をユビキチン化しTJを抑制することを見だした（文献2）。著者らは、この発見に着想を得て、細胞質に存在する二種類のタンパク質、ZO1とLNX1が、拮抗的にTJの主要成分である膜タンパク質クローディン（CLDN）に作用し、TJの形成促進と内在化・分解の動的平衡状態になっているのではないか、という仮説（TJ動的平衡仮説）を立てた。ここで、著者らは、ZO1とLNX1に含まれる共通の構造モチーフであるPDZドメインとCLDNの相互作用に着目した。PDZドメインは約100アミノ酸の球状のタンパク質ドメインで、主に膜タンパク質のC末端4～6残基を認識して結合する。そこでPDZの選択的阻害剤を用いて、TJ形成促進因子とTJ分解因子のどちらか片方を阻害することによる、TJ開閉の双方向制御の確立を目指した。

そこで、著者らは、漢方薬成分に含まれるフラボノイドが、神経細胞のシナプス膜足場タンパク質PSD95のPDZドメインに結合する、という報告（文献3）に着想を得て研究を重ね、既にいくつかのフ

ラボノイドのTJ緩和活性を報告した（文献4～6）。他方、TJ強化作用があるフラボノイドについては、柑橘系果皮に含まれるnaringenin、naringinにモデル細胞であるイヌ近位尿細管上皮細胞MDCK IIのTJ強化を確認していたものの、健康上の課題解決に至るような、バリア強化薬としての薬理活性の検証には至っていなかった。

本研究の将来的なゴールの一つは、漢方薬やハーブなどの成分から、腸管粘膜層とともに腸管バリア機能の中核を担う腸管上皮細胞のTJを増強する成分を確立することである。近年、リーキーガット（腸管壁浸漏）あるいは過敏性大腸炎（下痢型）の初期において、ストレスやFODMAPとよばれる食品由来刺激成分、あるいは腸内細菌の影響により、腸管のTJが傷害され、炎症惹起物質の体内への侵入が起こる経路が着目されている。そこで、著者らは、OTC漢方薬による腸管バリア強化に検討の余地がある、と考えた。特に、漢方薬原料である桜皮（ヤマザクラ樹皮、Pruni Cortex）には、前述のnaringeninによく似たフラボノイド成分が含まれており（図1）、他方、そのnaringenin類縁の成分を含む植物として、米国原産ハーブであるヤーバサンタは「健康茶」として市場に流通していた。そこで桜皮とヤーバサンタの抽出物および含有成分がTJとバリア機能に与える作用について、MDCK II細胞を用いて、バリア強化剤としての応用可能性を調べた。

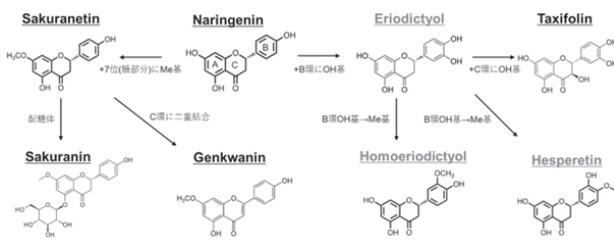


図1. フラボノイド naringenin とその関連化合物。

方法

細胞培養

MDCKII 細胞を 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin を含む D-MEM 培地で 37°C, 5% CO₂ 環境下で培養し、2~3 日に 1 度継代した。6 ウェルプレートにウェル当たり 3 x 10⁵ 個の細胞を播種後 24 時間培養した。

化合物処理

2 mL D-MEM 培地に d6-DMSO 濃度 0.1% で化合物を各濃度となるように混合し細胞に添加し、37°C, 5% CO₂ 環境下で 48 時間培養した。

細胞抽出

培養後、FBS, 抗生物質を含まない D-MEM 培地で 2 回洗浄し、100 μL の SDS-sample buffer を添加してセルスクレイパーで細胞を回収した。回収した細胞を Bioruptor で超音波破碎し、細胞抽出サンプルとした。

ウェスタンブロッティング

回収した細胞抽出サンプルを 15% SDS-PAGE にて電気泳動し、PVDF 膜に転写した。膜をブロッキング溶液で処理後、一次抗体溶液、二次抗体溶液に浸し、Chemi-Lumi One Super をかけてタンパク質を検出した。

RNA 精製、逆転写、qPCR

RNeasy PlusMini Kit, ReverTra Ace シリーズ、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて、RNA 精製、逆転写、qPCR を行った。

結果

100 μM 曝露時の各フラボノイドの TJ に対する影響

前述のモデル上皮細胞を、桜皮とヤーバサンタ

に含まれている代表的なフラボノイドを 100 μM を含む培地に曝露し、48 時間後に免疫染色蛍光顕微鏡で細胞を観察したのが図 2 である。当初、著者らは、これらのフラボノイドが、既に TJ 強化作用を認めた naringenin と僅かしか化学構造が違わないことから、TJ 強化作用を示すと予想していた。予想に反して、sakuranetin、isosakuranetin、eriodictyol で処理した MDCK II 細胞では、明確な TJ 緩和と CLDN2 の抑制作用が認められた。また、sakuranetin、eriodictyol では、アクチン細胞骨格に、顕著なストレスファイバーの増加とそれに伴う上皮細胞の変形（細長くなる）が見られた。この変形は、筆者らが既に報告している、baicalein および quercetin を投与した細胞に見られたものと似ていた。次に桜皮・ヤーバサンタ由来フラボノイドの TJ 緩和機構の詳細をタンパク質レベルと遺伝子発現レベルでそれぞれ調べたところ、CLDN2 のタンパク質量、mRNA 量とも、いずれも減少していた（図 3）。

希薄濃度で曝露した時の各フラボノイドの TJ に対する影響

前述の実験を進める過程で、予備実験として著者らはより薄い濃度での細胞毒性やその他の影響

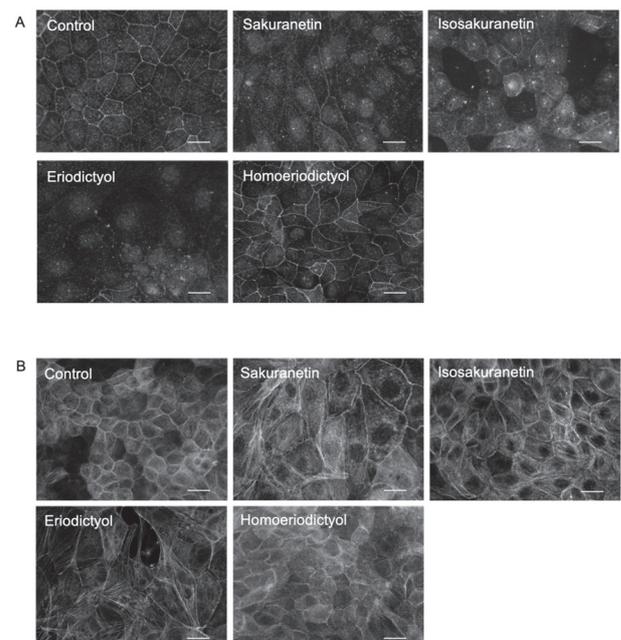


図2. 各フラボノイド 100 M で処理した MDCK II 細胞の免疫蛍光顕微鏡像。上段は CLDN2 抗体、下段は actin 抗体による染色像を示した。

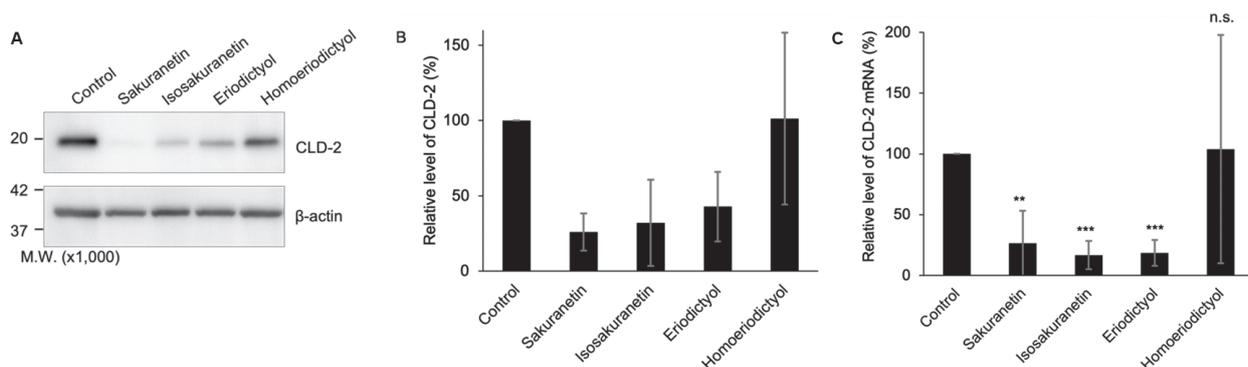


図3. 各フラボノイド100 μ Mで処理したMDCK II細胞におけるCLDN2のタンパク質量ならびに遺伝子発現量の変化。A ウェスタンブロットティング、B actinを基準とした際のCLDN2タンパク質量、C qPCRによるGAPDHを基準としたCLDN2のmRNA相対量。

を調べた。その結果、桜皮・ヤーバサンタ由来フラボノイドの一部には、薄い濃度ではTJに対する逆の活性が見られることを偶然見出した。そこでフラボノイドの曝露量を振って精査したところ、sakuranetin、isosakuranetinはおよそ50 μ M濃度以下では、むしろTJ強化作用を示すことがわかった(図4)。特に10 μ Mで強いTJ強化作用を示し、これは、100 μ M naringeninが示したTJ強化作用とほぼ同程

度であった (data not shown)。他方、eriodictyolではそのような二相性のTJ調節活性は見られず、50 μ M以上の濃度で単調にTJ緩和作用を示すことがわかった。

考察

本研究では、当初予測していた sakuranetin と isosakuranetin について、予想よりも 1/10 の濃度で発揮される TJ 強化作用と、50 μ M 以上で発現される TJ 緩和作用という、二相性の TJ 制御作用を発見することができた。この予想外の発見について精査していたため、TJ 研究によく用いられるモデル上皮細胞である MDCK II 細胞での桜皮・ヤーバサンタ含有のフラボノイドの TJ に対する理解は深まった。しかし、健康上の課題解決の前段階ともいえるヒト腸上皮のモデル細胞である Caco-2 細胞に対する効果については、今後の研究が待たれることとなった。

sakuranetin と isosakuranetin が、基準となるフラバノンである naringenin よりも低い濃度で TJ 強化作用を示したことは、図1の各フラボノイドの化学構造からある程度説明できる。すなわち、おそらく naringenin、sakuranetin、isosakuranetin は共通の細胞内標的に対して、類似の結合モードで結合して薬理活性を発現すると考えられる。ここで、sakuranetin、isosakuranetin はいずれも naringenin のヒドロキシル基のメチル化体であり、分子の脂溶性が高まっている一方、水素結合ドナーの数は一つ減っている。そのため、培養細胞を用いた実験系に

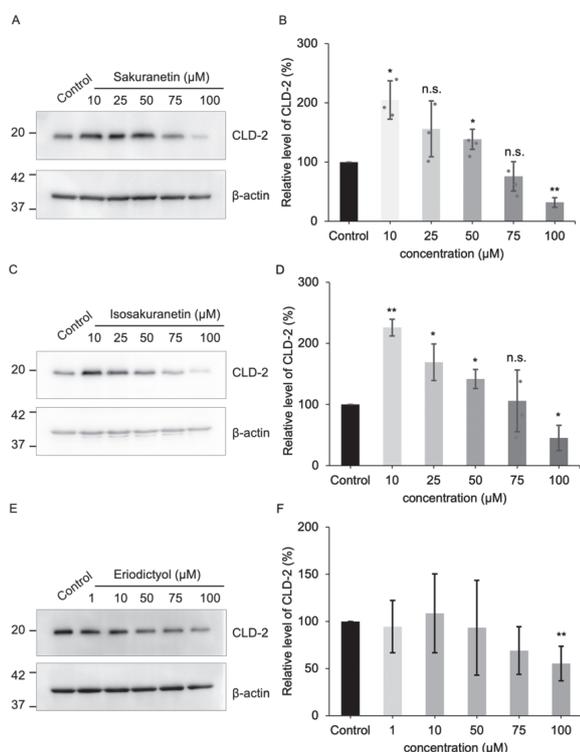


図4. より低い濃度のフラボノイドで処理したMDCK II細胞におけるCLDN2のタンパク質量の変化。A, C, E, ウェスタンブロットティング、B, D, F actinを基準とした際のCLDN2タンパク質量、A, B: sakuranetin、C, D: isosakuranetin、E, F: eriodictyol。

おいては細胞内移行性がより高い可能性がある。この仮説によるならば、逆に naringenin について更に高濃度の条件で処理した場合は、TJ 緩和作用が観察されるはずである。実際、予備実験の段階ではあるが、高濃度 naringenin により部分的に TJ 緩和が観察された (data not shown)。今後、この単一分子で二相性の TJ 制御作用を示すという特徴的なメカニズムの分子機構の解明へと進めていきたい。

結 論

漢方薬の原材料である桜皮のエキスに含まれる sakuranetin と isosakuranetin について、適切な濃度で使用することで、バリア強化剤として利用可能であることが示された。ただし、健康上の課題解決に応用するにあたり、例えばリーキーガット予防を想定した Caco-2 細胞での実験など、更なる基礎研究が重要であると考えている。

謝 辞

本研究に多大なご支援をいただきました、東洋医学研究財団に感謝申し上げます。

文 献

- [1] Otani T, et al. (2020) Tight Junction Structure and Function Revisited. Trends Cell Biol., 30(10):805-817.
- [2] Takahashi S, Furuse M. (2009) The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. J Cell Sci. 122(7):985-994.
- [3] Tang W, et al. (2004) Flavonoids from Radix Scutellariae as potential stroke therapeutic agents by targeting the second postsynaptic density 95 (PSD-95)/disc large/zonula occludens-1 (PDZ) domain of PSD-95. Phytomedicine. 11(4):277-84.
- [4] Nakashima M, et al. (2023) Pharmacologic Comparison of High-Dose Hesperetin and Quercetin on MDCK II Cell Viability, Tight Junction Integrity, and Cell Shape. Antioxidants (Basel). 12(4):952.
- [5] Nakashima M, et al. (2020). Opposing effect of naringenin and quercetin on the junctional compartment of MDCK II cells to modulate the tight junction. Nutrients. 12(11):3285.
- [6] Hisada M, et al. (2020) High dose of baicalin or baicalein can reduce tight junction integrity by partly targeting the first PDZ domain of zonula occludens-1 (ZO-1). Eur J Pharmacol. 887:173436.

〔助成金対象研究報告〕 ④

題目：生薬ハンゲの咽頭刺激痛の原因となる因子を低減したカラスビシャクの開発

研究代表者：名古屋市立大学 大学院薬学研究科 生薬学分野

講師 寺坂 和祥

【背景と研究目的】

生薬ハンゲはカラスビシャク (*Pinellia ternata*) の塊茎を基原とし、化痰、止咳などを目的として多くの漢方方剤に配合されている。ハンゲには、シュウ酸カルシウムとタンパク質を構成成分とする微細な針状結晶 (raphides) が含まれている。ハンゲの粉末あるいは加熱不十分な煎液を服用すると、これによって咽喉部に強烈な刺激痛を生じる¹⁾。当研究室では、この刺激痛の原因となる因子の探索を行っており、ハンゲの針状結晶から高親油性タンパク質を分離精製し、構成するタンパク質がレクチン (糖鎖結合性タンパク質) であることが明らかとなった²⁾。咽頭刺激痛を低減するため、生薬ハンゲの修治方法などについて当研究室で研究を進めているが、一方で、材料としてのカラスビシャクの塊茎において、咽頭刺激痛の原因と推定されるレクチンを低減することができれば、修治を行わなくても、より利用が容易なハンゲを供給できるのではないかと考えられる。

カラスビシャクの植物学的研究においては、これまでハンゲの安定的な供給や生産性の向上を目指した研究が知られている^{3, 4)}。それらにおいては、カラスビシャクの組織培養によるクローン増殖による安定的な苗の供給や、コルヒチン処理による染色体の倍数化を利用した塊茎の増大について報告されている。しかしながら、カラスビシャクの遺伝子操作等についての報告はほとんどない⁵⁾。また、ハンゲ由来のレクチンの性質に関する研究はあるものの、レクチンのカラスビシャクにおける役割を明らかにした報告もない。

そこで、本研究では、分子生物学的な手法と植物

細胞組織培養の技術を利用して、カラスビシャクにおける遺伝子工学技術を確立し、レクチンを低減したカラスビシャクを開発することを目的とした。

【実験方法】

1. 培養細胞の誘導と再分化

植物材料には、本学薬用植物園で栽培しているカラスビシャクを移植し、室内の培養棚で明期14時間、暗期10時間で栽培したものを使用した。栽培したカラスビシャク植物体を水道水でよく洗浄した後、メスで葉と茎と塊茎に切り分けて70%エタノールに30秒浸漬した。続いて0.25%オスバン溶液、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液にそれぞれ10~20分浸漬した。その後、滅菌水で10分の洗浄を3回行い、植物体の表面殺菌とした。その後、それぞれ約1 cmのサイズになるように切り分けて外植片とした。植物ホルモン (1-naphthaleneacetic acid (NAA), 0.1~100 μ M; 6-benzylaminopurine (BA), 0.01~10 μ M) を添加したMS (Murashige and Skoog) 寒天培地 (スクロース, 1.0~3.0%; pH 5.6~5.7; 寒天, 1.0%) に、外食片を植え、培養棚 (光照射下) または25 $^{\circ}$ Cのインキュベーター (暗黒下) で培養した。植物体再分化の際は、誘導したカルスをMS寒天培地 (NAA, 0.0~1.0 μ Mを含む) に移植し、光照射下で培養した。

2. 植物体およびカルスからの針状結晶の抽出

カラスビシャク植物体の葉、再分化植物体の葉と塊茎を細かく刻み、純水を加えてホモジナイズした。カルスについては、刻まずに同様の操作を行った。その後、1,000rpmで5分遠心し、上清を光学顕微鏡で観察した。カラスビシャク再分化植物体の葉は、

乳鉢ですりつぶして純水に懸濁し、300rpmで遠心して得られた上清を3,000rpmで遠心して得られた沈殿を純水に懸濁して光学顕微鏡で観察した。カラスビシャク植物体の塊茎については、皮をむいたあと乳鉢ですりつぶし、全体量が10mLになるよう純水を加え1時間静置した。静置後、500rpmで10分遠心し、上清を回収して2,800rpmで10分遠心した。得られた沈殿を純水で再懸濁し、2,800rpmで10分遠心した。得られた沈殿を純水で再懸濁し、光学顕微鏡で観察した。

3. シュウ酸の抽出とHPLCによる定量

カラスビシャク植物体の葉、再分化植物体の葉と塊茎を細かく刻み、4 mLの100%エタノールを加えてホモジナイズした。続いて、全体量が10mLになるまで100mLエタノールを加え24時間浸漬した。カルスについては、刻まずに同様の操作を行った。その後、吸引ろ過を行い、残渣を50~60℃で22~24時間乾燥させ、抽出用植物サンプルを作成した。植物サンプル（カルスは2 mg、その他は4 mg）にそれぞれ3 M HCl（カラスビシャク植物体の葉は500 μ L、その他は250 μ L）を加え、30分超音波処理を行ったのち、3,000rpmで10分遠心した。得られた上清から100 μ Lをとり、等量の500mM EDTA-NH₄を加えた。ボルテックスした後、800 μ Lのエタノールを加え、さらにボルテックスした後、15,000rpmで10分遠心した。上清から800 μ Lをとり、40℃または50℃で風乾した。残渣を0.6M HClに再溶解し、HPLCで分析した。

・HPLC分析条件

システム, LC10AVPシリーズ（島津製作所）；カラム, Cosmosil HILIC（250mm×4.6mm）；流速, 1.0mL/min; 測定波長, 203nm; カラム温度, 40℃; 移動相, 10mM リン酸緩衝液（pH 6.8）：アセトニトリル=70：30

4. カラスビシャクの形質転換

pBI121を保持するアグロバクテリウムGV3101株をカナマイシン含有YEB培地で、28℃、180

rpmで44時間培養した。培養液を5,000 rpmで5分遠心し、培養液と同量のYEB培地に再懸濁した。表面殺菌した植物体、または無菌植物体を菌懸濁液に1~2分浸した。滅菌したキムタオルで余分な菌懸濁液を拭き取り、MS寒天培地上で42時間共存培養した。培養後、MS液体培地で2回~4回洗浄し、水分を拭き取ったのち100 μ MのNAA、1 μ MのBAを含むMS寒天培地で4日間培養した。培養後、100 μ M NAAおよび1 μ M BA、50 μ g/mLカナマイシンを含むMS寒天培地に移植し、培養した。

【研究成果と考察】

1. カラスビシャクにおける細胞培養系の確立

カラスビシャク植物体からのカルス誘導の条件、カルスからの植物体再分化の条件を決定することにした。培養細胞の誘導に一般的なオーキシンであるNAA、サイトカイニンであるBAを用いた。土壌で生育したカラスビシャク植物体の葉を表面殺菌し、0.1~100 μ MのNAA、0.1~10 μ MのBAを含むMS培地に植え、光照射下または暗黒下で培養した。その結果、100 μ MのNAAと1 μ MのNAAを含む培地において、光照射に関わらず、カルスが誘導された（図1 A, C）。一方、カルス誘導条件を検討した際に、カラスビシャクの葉を1 μ MのNAA、10 μ MのBAを含むMS培地に植え、光照射下で培養すると新たに葉が生えてきたため、これを使用して同様にカルス誘導を試みたところ、100 μ MのNAAと1 μ Mまたは0.1 μ MのBAを含む培地において、カルスが誘導された（図1 B, D）。

続いて、カルスからの植物体再分化について検討した。植物ホルモンを添加しないMS培地、あるいは0.1~1 μ MのNAAを含むMS培地に前節で誘導したカルスを移植し、光照射下で培養した。その結果、植物ホルモンを添加しない条件で最も効率的な植物体再分化が観察された（図2 A, C）。再分化した植物体は、塊茎様の器官も形成していた。しかし、継代を繰り返したカルスでは、植物体が再生しにくく、再生した個体のサイズも小さくなった（図2 B, D）。

カラスビシャクと同じくサトイモ科の植物である

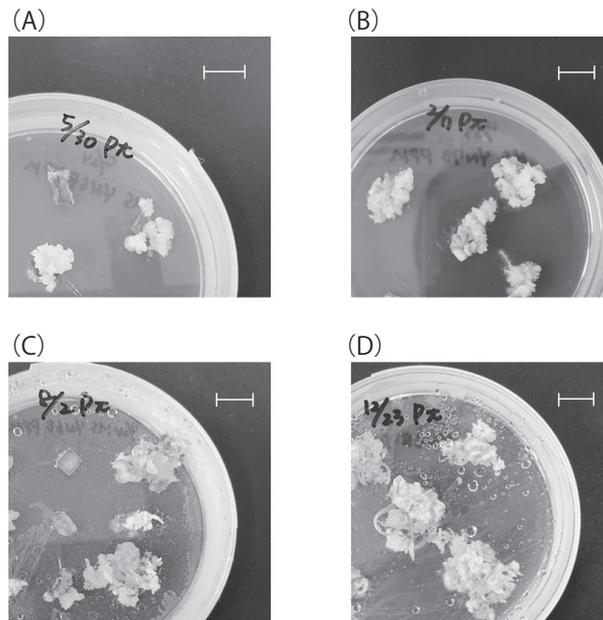


図1. カラスビシャクの葉からのカルス誘導

植物ホルモンを含むMS培地上において光照射下（明暗周期14時間/10時間）、または暗黒下で培養した。スケールバーは、1 cmを示す。

(A) 表面殺菌した葉を用いて、100 μ M NAA、1 μ M BA、暗黒下、118日間培養した。

(B) カルス誘導時に生えた葉を用いて、100 μ M NAA、0.1 μ M BA、暗黒下、60日間培養した。

(C) 表面殺菌した葉を用いて、100 μ M NAA、1 μ M BA、光照射下、54日間培養した。

(D) カルス誘導時に生えた葉を用いて、100 μ M NAA、1 μ M BA、光照射下、74日間培養した。

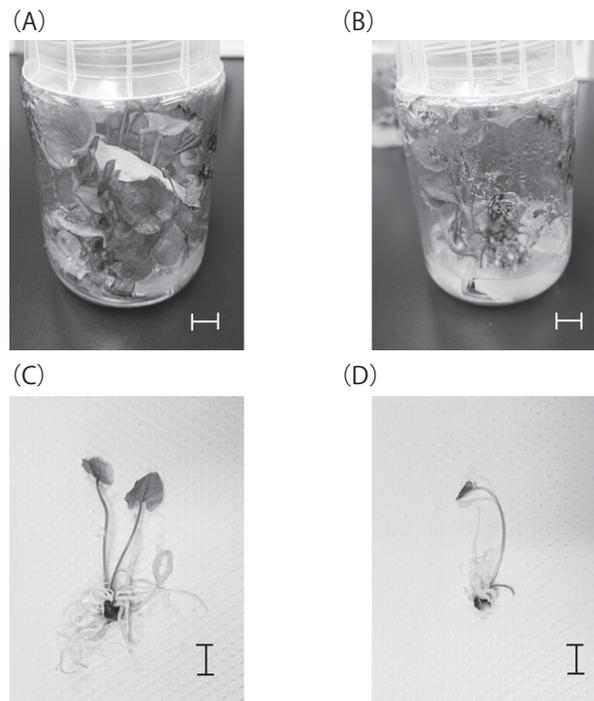


図2. カラスビシャク植物体再分化条件の検討

誘導したカルスを0~1 μ MのNAAを含むMS培地に移植し、光照射下で培養した。いずれも植物ホルモンを含まない培地で培養したものである。スケールバーは、1 cmを示す。また、(A)と(B)は培養した容器中の再分化植物体を撮影したもの、(C)と(D)は個体を撮影したものである。

(A) 91日間培養した再分化個体。

(B) 105日間培養した再分化個体。(A)より継代数の多いカルスから再分化させたもの。

(C) 105日間培養し、培養容器から取り出した再分化個体。

(D) 97日間培養し、培養容器から取り出した再分化個体。(C)より継代数の多いカルスから再分化させたもの。

サトイモ (*Colocasia esculenta*) において、長期間培養したカルスから再生した植物で収量が低下し、再生した植物にも変異がみられたという報告があり、カラスビシャクも同様である可能性がある。今後は、カルスの継代数または誘導からの日数の違いにより、再分化の効率が変化するのか、再分化した植物に変異が生じていないかを調べる必要がある。

2. カラスビシャク植物体、カルス、再分化植物体における針状結晶、シュウ酸の検出

前節で確立したカラスビシャク植物体からカルスへの誘導、カルスから植物体への再分化の過程で、カラスビシャク細胞の針状結晶形成能力とシュウ酸産生能力の変化を調べた。まず、針状結晶の分析を行った。カラスビシャク葉由来カルス（光照射下で培養したもの）、カラスビシャク植物体と再分化植物体の葉と塊茎から純水を用いて針状結晶の抽出を行い、上清を光学顕微鏡で観察した。その結果、カラスビシャク植物体と再分化植物体の葉と塊茎では確認できたものの（図3A, B）、カラスビシャク葉由来カルスでは確認できなかった（図3C）。

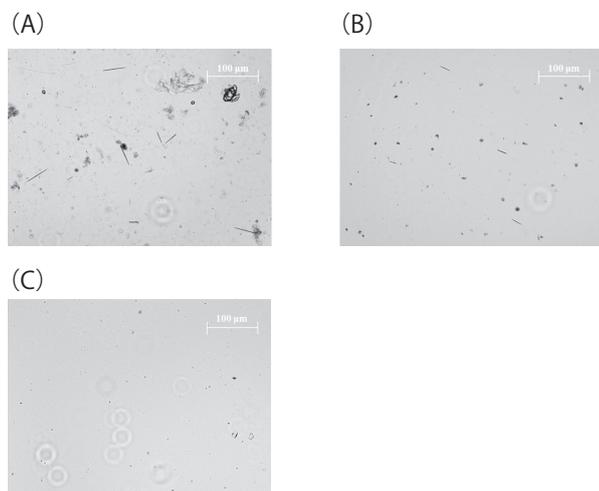


図3. カラスビシャクの針状結晶の分析
カラスビシャク植物体、再分化植物体の葉と塊茎、カラスビシャク葉由来カルスを純水とホモジナイズして針状結晶を抽出した。スケールバーは、100 µmを示す。
(A) カラスビシャク植物体の葉
(B) 再分化植物体の葉
(C) カラスビシャクの葉由来カルス

続いて、カラスビシャクに含まれるシュウ酸の全体量を分析した。カラスビシャク葉由来カルス、カラスビシャク植物体と再分化植物体の葉から塩酸を用いてシュウ酸を抽出し、HPLCで定量した。その結果、カラスビシャクの葉由来カルスではシュウ酸含量が減少し、植物体再分化で回復することが明らかになった。シュウ酸の平均含量はカラスビシャク植物体の葉で2.25mg/g、再分化植物体の葉で9.83 mg/g（いずれも乾燥重量あたり）であった。

これらの結果から、野生型カラスビシャクの細胞が、脱分化と再分化の過程で針状結晶形成能力を失っていないと考えられる。調べたかぎり、植物細胞の脱分化と再分化によってシュウ酸産生能力、針状結晶形成能力がどのように変化するかを調べた先行研究は存在しない。今後、シュウ酸生合成遺伝子の発現なども調べることで、植物細胞の分化能力とシュウ酸産生能力の関連性が明らかになるかもしれない。

3. カラスビシャク植物体への遺伝子導入

まず、コントロールベクターの導入を目指すこととし、 β -glucuronidase (GUS) 強制発現ベクター pBI121を用いた。pBI121を保持したアグロバクテリウムを用いて、カラスビシャク植物体の葉、再分化植物体の葉にリーフディスク法を用いた形質転換実験を行った。その結果、カラスビシャク植物体の葉、再分化植物体の葉どちらを用いた場合においても遺伝子組換え細胞が成長する前にアグロバクテリウムが成長し、遺伝子組換え細胞を得ることはできなかった。共培養後の洗浄の回数を増やして再実験したものの、同様の結果になった。その原因としては、アグロバクテリウムが植物体に感染せず、植物体の表面で増殖していることが考えられる。また、本研究ではアグロバクテリウム懸濁液の濁度を測定せず感染させていたため、懸濁液の濃度が高すぎたということも考えられる。これらのことを踏まえ、今後はアグロバクテリウム株の変更を行うほか、濁度を測定してから感染させるなど共培養条件の再検討を行う必要がある。

【まとめ】

本研究により、カラスビシャク葉からのカルス誘導と植物体再分化に最適な植物ホルモンの濃度を決定できた。ただし、カラスビシャク葉由来カルスは、継代を繰り返すと再分化能力が低下した。また、カラスビシャク細胞はカルス誘導と植物体再分化の過程で針状結晶形成能力、シュウ酸産生能力が変化した。一方、遺伝子組換えカラスビシャクを得ることはできなかった。

今後、カラスビシャクにおける遺伝子導入法を確立できれば、カラスビシャクの遺伝子操作により、レクチンを低減し、新規な付加価値の高い生薬の供給源となるだけでなく、カラスビシャクにおけるレクチンの役割も明らかにできると考えられる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、公益財団法人東洋医学研究財団より助成を賜りましたことを心より感謝いたします。

【参考文献】

- 1) 笛木司, 田中耕一郎, 並木隆雄, 松岡尚則, 牧野利明. ハンゲの刺激 (イガイガ) 原因物質—最近

の研究動向—漢方の臨床 62, 14204--14209 (2015).

- 2) Liu Y, Nose I, Terasaka K, Tsukasa F, Makino T. Heating or ginger extract reduces the content of *Pinellia ternata* lectin in the raphides of *Pinellia* tuber. *Journal of Natural Medicines* 77, 761-773 (2023).
- 3) Xue T, Zhang H, Zhang Y, Wei S, Chao Q, Zhu Y, Teng J, Zhang A, Sheng W, Duan Y, Xue J. Full-length transcriptome analysis of shade-induced promotion of tuber production in *Pinellia ternata*. *BMC Plant Biol.* 19, 565 (2019)
- 4) Lu J, Liu JN, Sarsaiya S, Duns GJ, Han J, Jin L, Chen J. Phenotypic and transcriptomic analysis of two *Pinellia ternata* varieties T2 line and T2Plus line. *Sci Rep.* 10, 4614 (2020)
- 5) Duan Y, Zhao F, Li Q, Shen S, Li Z, Teng, J, Sheng W, Zhang A, Xue, J. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinellia ternata* using petiole explants from submerged cultures. *Biologia* 70, 1351-1358 (2015)

〔助成金対象研究報告〕 ⑤

題目：漢方方剤投与後の血中メタボローム解析を介した血中動態プロファイルの構築

研究代表者：名城大学薬学部薬学科

助教 日 坂 真 輔

研究協力者：名城大学薬学部薬学科

教授 能 勢 充 彦

緒 言

複数の生薬が組み合わさることで調製される漢方方剤は、構成生薬由来の数多くの成分が様々な生体成分と相互作用し、それらが統合された結果として処方薬の薬効を示していると考えられる。これまでの研究では、構成生薬に含まれる特異あるいは主要な成分に焦点があてられ、その漢方方剤の薬理作用の一旦を担う分子として解明されてきた。当研究室においても、Passive Cutaneous Anaphylaxis 反応を利用したマウスアレルギー性鼻炎モデルに対して、麻黄附子細辛湯 (MBST) を経口投与後1時間に抗原暴露で誘導される「くしゃみ行動」の回数を有意に抑制し、この薬効を担う構成生薬の一つとして麻黄を同定している。さらにその成分レベルでの解析ではエフェドリン系アルカロイドが薬効を示すことを推定している。このように漢方方剤では、構成生薬において特徴的な成分が薬効を担う成分として認められる場合があるものの、このような特徴的な成分だけでなく、共存する他の微量成分も含めて相加・相乗的に関わる可能性にも着目する必要があるのではと考えた。このような多成分系の薬剤において薬効のメカニズムを分子レベルで深く理解していくためには、薬効発現に関わる成分を網羅的に解析する必要性が考えられる。そこで、本研究では、漢方方剤の薬効発現に関わる成分の網羅的解析法を樹立し、多変量解析を通して漢方方剤の薬効発現に関わる分子を同定することで、漢方処方の科学的理解につなげることを目的としている。

漢方方剤由来の成分を網羅的に分析するツール

として、令和4年度において高速液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC/MS/MS) を用いたノンターゲット分析へと供する諸条件を確定させた。すなわち、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードの両方において検出可能な内部標準物質としてニフルム酸 (Niflumic acid: NFA) を選定し、前処理方法及び質量分析へと供する分析条件を確定させた。また、目的の成分を抽出する解析方法として多変量解析が有効な解析方法であるのかどうか検証するため、MBST投与後の血清をノンターゲット分析することで得られたMSプロファイルをもとに主成分分析を実施した。本分析を通してMBSTの薬効発現時間である1時間前後において血中濃度が高くなるMSスペクトルを解析したところ、エフェドリン系アルカロイドが候補として絞り込むことができた。さらに、内部標準であるNFAを活用した相対定量解析からエフェドリン系アルカロイドの血中濃度推移が、MBST投与後0.25時間においてTmaxとなることが示唆された。この点において、ターゲット分析による定量解析からエフェドリンおよびブソイドエフェドリンは、共にMBST投与後0.25時間においてTmaxとなることが明らかとなった (data not shown)。これらのことからノンターゲット分析—多変量解析へと連なる本解析法の妥当性が示唆された。そこで、令和6年度においては、MBST及び構成生薬の単身エキスそのものの分析に加え、単身エキス投与後の血中メタボローム解析 (ノンターゲット分析) を行うことで、各構成生薬に由来する血中成分のMSプロファイルを取得し、この情報を

もとにMBST投与後の血清MSスペクトルを構成生薬毎に絞り込むことが可能となるのではと考えた。これにより、MBST投与後の血中MSプロファイルが構成生薬毎に抽出され、麻黄において薬効を担う可能性を持った成分のスペクトルを絞り込むのに有用であると考え、解析（絞り込み）を進めてきたので報告する。本解析の一連の流れを図1に示す。

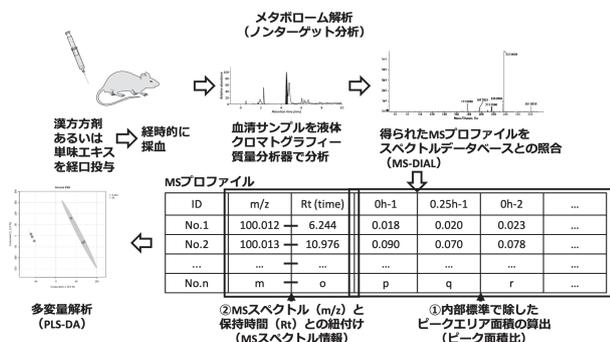


図1. 漢方方剤、単味エキス、血清サンプルのノンターゲット分析—多変量解析までの一連の流れ

方法

1) 実験動物

6週齢の雌性BALB/cを用いた。動物は温度（23±1℃）、湿度（50±5%）にて制御された環境下で、飼料および水は自由摂取させて飼育した。搬入後、少なくとも7日間は順化のための予備飼育を行った。

2) 麻黄、附子、細辛の単味エキスの作製

MBSTの各構成生薬（以下に記載）をそれぞれ秤量し、紙パックに入れ、これと600mLの蒸留水をマイコン煎じ器に入れ、1時間熱水抽出を行った。この抽出液を凍結乾燥することにより粉末の単味エキスを得た。MBSTは、令和4年度に作製したものをを用いた。

麻黄 4g ー収量：0.807±0.006 g

附子 1g ー収量：0.413±0.015 g

細辛 3g ー収量：0.343±0.006 g

麻黄附子細辛湯：麻黄 4g、附子 1g、細辛 3g
収量：1.52 g（令和4年度作製済み）

3) MBSTあるいは単味エキス経口投与及び採血

18時間絶食条件下において、雌性BALB/cマウス

（7週齢）にヒト10倍量のMBSTエキス（0.253 g/kg, n=6）あるいは単味エキス（麻黄エキス：0.135 g/kg, n=3）を経口投与し、投与後各時間（0、0.25、0.5、1、2、4 h）に1.5%イソフルラン麻酔下で下大静脈より採血した。血液は、室温で30分以上放置し、3,000 rpm、15分間の遠心処理を行い、血清とした。前処理及び分析までは-35℃下にて保存した。

4) 前処理法

血清100μLにNFA（内部標準）5 ngを添加したのち、アセトニトリル（900μL）を加えて除タンパク処理を行った。遠心分離（4℃、10,000rpm、10分間）を行い、上清（900μL）を減圧乾固し、残渣を50μLの50%メタノールで溶解した。遠心分離（4℃、10,000rpm、10分間）を行い、上清15μLをLC/MS/MS分析に供した。

5) 分析条件および解析

MSスペクトルの取得は、LC-MS/MSシステム（LC：Shimazu Nexera, MS：SCIEX QTOFシステムTT6600）を用いて実施した。ネガティブイオンモードにて取得したMSスペクトルのプロファイル（以下、MSプロファイル）の解析には、MassBank¹のデータベースを参照し、MS-DIAL²及びMetaboAnalyst³を用いて実施した。解析に供した相対定量値は、MSクロマトグラムのピーク面積を内部標準であるNFAの面積で除した値（ピーク面積比）とした（図1-①）。このピーク面積比と紐づく項目軸としては、m/zとLCの保持時間（Rt）を組み合わせたものをを用いた（図1-②）。すなわち、m/zの値において少数第2位以下を切り捨てた少数第1位までの値とし、さらに、LCのRtにおいて少数第2位を切り捨てた少数第1位までの値とし、これら2点の数字を組み合わせたものをピーク面積比と紐づいた項目として解析へと供した（解析時に用いた項目の事例：MSスペクトルとしてm/zの値が100.12であれば、m/z 100.1とし、Rtが5.513であれば、Rt 5.5とし、この2つの数字を組み合わせた100.1-5.5とする、以下、

これをMSスペクトル情報と称する)。また、MBST及び構成生薬の単味エキス（麻黄エキス20 μ g/ml）を用いて得られたMSプロファイルも解析へと供した。

LC条件：A 0.1% ギ酸、B 100% CH₃CN

0-3分 A : B=95 : 5

3-10分 A : B=0 : 100

10-12分 A : B=0 : 100

12-15分 A : B=95 : 5

カラム： Sunshell C18
(2.6 μ m, 3.0i.d. \times 100mm)

流速： 0.3mL/min

カラムオープン：40 $^{\circ}$ C

結果・考察

2024年3月現在、MBSTおよび麻黄エキスを中心に解析を進めており、現時点で得られているものをここに報告する。

1) MSプロファイルにおけるMBST由来成分中の麻黄由来成分の抽出

MBSTエキス自体をノンターゲット分析に供したMSプロファイルにおいて麻黄由来成分を抽出することで、MSスペクトル情報の分類を試みた。このようにして分類されたMSスペクトル情報は、MBST経口投与後の血清MSプロファイルと比較することで麻黄由来成分として比較・検証することができると考えた。そこで、MBSTに使用した麻黄の単味エキスを作製し、そのエキスそのものをノンターゲット分析することで、腸管内での代謝を受けず、そのまま吸収された成分として参照できるMSプロファイルを取得した。麻黄単味エキス由来のMSスペクトル情報としては、533得られた。一方のMBSTエキスでは、337得られた（図2）。これらMSスペクトル情報から共通するものを抽出することで麻黄由来成分のMSスペクトル情報が絞り込める。その結果、共通するMSスペクトル情報としては230となった（図2）。これらエキスを基盤としたMSスペクトル情報は血中成分の解析に際して参照に用いることにした。

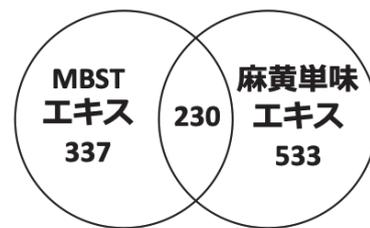


図2. MBSTおよび麻黄単味エキス成分由来のスペクトル数の比較

2) 血清中のMBST由来成分における麻黄由来成分の抽出

2)-1 MBST投与後の血清MSプロファイルにおける薬効発現に関わると予想される成分の抽出

MBSTのうち、くしゃみ行動を抑制する構成生薬の一つとして麻黄を、そして、その成分としてエフェドリン系アルカロイドを推定している。エフェドリン系アルカロイドの血中濃度は、1時間以内（0.25h）にTmaxとなることを明らかにしている。そのため、エフェドリン系アルカロイドと同様に血中濃度推移を辿る成分の中に薬効発現に関わる成分が含まれている可能性を考え、MBST経口投与後、0.25hにおいて水投与群（0h）と比較して増加する成分を抽出した。解析方法としては、部分的最小二乗判別分析（PLS-DA）により、これら2群（0h及び0.25h）の違いに寄与するMSスペクトル情報を分類し、0.25hにおいてピーク面積比が増加するMSスペクトル情報を抽出した。0hと0.25hのPLS-DA解析を行った結果を図3に示す。本解析に用いた結果、2群間の比較に供するMSスペクトル情報は8145となり、0.25hにおいてピーク面積が増加するMSスペクトル情報としては3050となった。

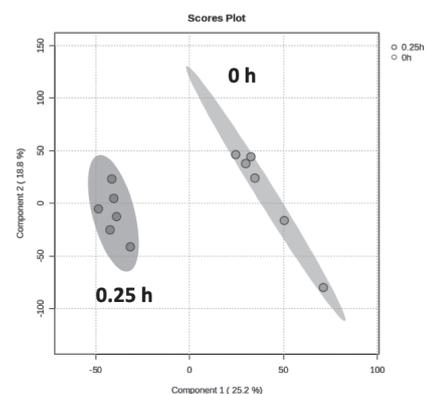


図3. 水（0h）とMBST経口投与後0.25hの血中MSプロファイル間におけるPLS-DA解析

2)-2 麻黄エキス投与後の血清MSプロファイルにおける薬効発現に関わると予想される成分の抽出
 麻黄エキス経口投与後の血清MSプロファイルにおいても、2)-1と同様に薬効発現に関わると予想される成分の絞り込みを行った。PLS-DA解析を行った結果を図4に示す。0hと0.25h間で比較に供したMSスペクトル情報は11188あり、0.25hにおいてピーク面積が増加するものとしては4452とMSスペクトル情報が絞り込まれた。

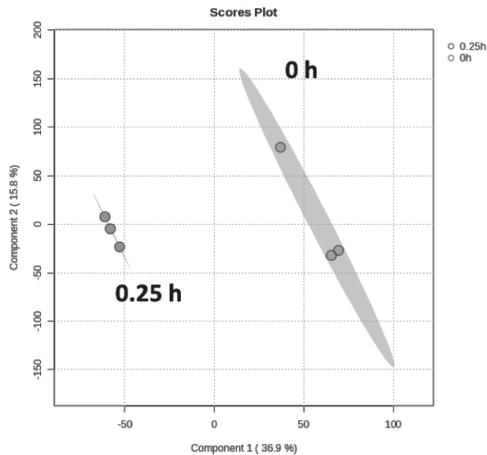


図4. 水(0h)と麻黄エキス経口投与後0.25hの血中MSプロファイル間におけるPLS-DA解析

2)-3 MBST投与後あるいは麻黄エキス投与後0.25hに増加する各血中MSプロファイルにおいて共通する成分の抽出

2)-1においてMBST投与後に血中で増加することが示唆されるMSスペクトル情報と、2)-2において麻黄エキス投与後に血中で増加することが示唆されるMSスペクトル情報を得た。したがって、このMSスペクトル情報間で共通するものが、麻黄由来の成分と考えられ、かつエフェドリン系アルカロイドと同様に速やかに吸収され、薬効発現に関わると予想される成分由来のものと考えられる。そこで、この共通するMSスペクトル情報をカウントしたところ、図5に示すように878のMSスペクトル情報まで絞り込まれた。このようにして絞り込まれたMSスペクトル情報は、MassBankや麻黄に含まれる成分や分子量などの情報がまとめられたKNAPsACK⁴における情報を用いて比較・検証することで成分の帰属を併行して進めた。

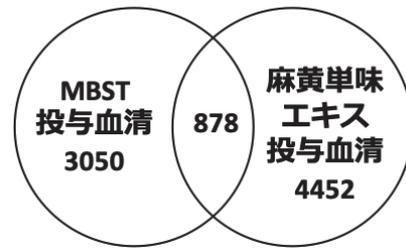


図5. MBSTおよび麻黄エキス投与後の血清含有成分におけるMSスペクトル情報の比較

3) MBSTあるいは麻黄エキス由来の候補成分の抽出

図2に示したMBSTエキス及び麻黄エキスそのものに共通する成分(MSスペクトル情報)は230であり、図5に示したMBSTあるいは麻黄エキス投与後0.25hの血中に認められた共通の成分(MSスペクトル情報)は878あると認められた。これらMSスペクトル情報にさらに共通する成分がMBST投与後に血中に認められた麻黄由来の成分で、抗アレルギー作用を担う可能性を持った成分と考えられる。この成分候補(共通の成分)を抽出すると33となった。この成分候補33のうち、ある程度の帰属が進んだものに、「m/z 577.1」を示す化合物Aが挙げられる。この化合物Aの血清中の濃度推移を図6に示す。この血中濃度推移は、MBST投与におけるエフェドリン系アルカロイドの推移と類似し、0.25hで速やかに上昇し、その後減少する傾向として確認された。この候補成分の同定としては、現時点においてプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの情報から、2候補まで絞り込めている。残念ながら確定まで至っていないものの、2種の標品を入手後に確定する予定である。また、残り32種のMSスペク

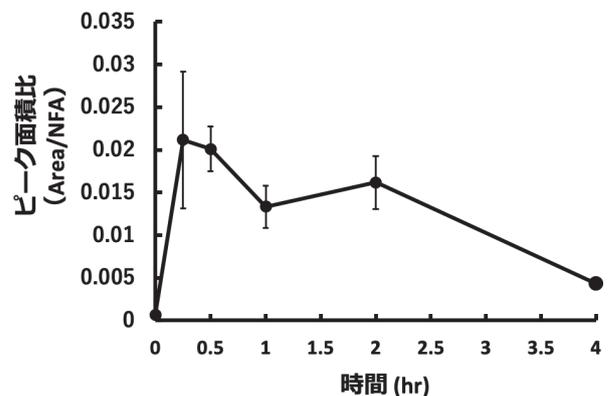


図6. 化合物Aの血中濃度推移

トル情報の解析も進め、エフェドリン系アルカロイド以外で薬効を担う可能性を持った成分の同定へと進めていく予定である。

結 論

- 漢方方剤エキスとその構成生薬単味エキスをノターゲット分析により得られる各MSプロファイル間で共通するものを抽出することで、代謝を経ずに（構造変換を受けずに）吸収された成分（MSスペクトル情報）を絞り込んだ。
- エキス成分の共通成分の抽出と同様に血清中におけるMBST由来の成分と麻黄エキス由来の成分をそれぞれのMSプロファイルにおいて共通するMSスペクトル情報を抽出することで、絞り込みを行った。
- エキス成分のMSスペクトル情報を基軸として血清中のMSスペクトル情報を絞り込むことで、構成生薬（今回であれば麻黄）毎にMSスペクトル情報を抽出することが可能であり、本研究においては薬効発現の時間軸を含めた成分の絞り込みと合わせて有効であると考えられた。
- このようにして抽出された成分の一つである化合物Aは、その同定候補として2種まで絞り込んでおり、標準品を用いた検証から化合物Aの同定を進める予定である。また、マウスアレルギー性鼻炎モデルに対するMBSTの抗アレルギー作用を示す成分としての確認も実施していく予定である。
- 網羅的に得られたMSプロファイルをどのように目的のものとして絞り込みをかけるかが、本研究においては要となっている。令和4年度においては多変量解析が目的とする成分（薬効発現に関

わる可能性を持った成分：薬効発現の時間に血中に存在し、増加する成分）を絞り込む解析として有用であることを示した。本年度（令和5年度）においては、薬効発現時間などで絞り込みをかけたMSスペクトル情報を、可能な限り、他のMSスペクトル情報（単味エキスのMSプロファイルや単味エキスを投与した血清MSプロファイルなど）を基軸としてさらに抽出を行うことで、目的と合致し得るMSスペクトル情報を抽出してきた。実際にはMBST投与後0.25hの血清から得られた8000を超える血清MSスペクトル情報から麻黄由来の成分候補として30程度まで絞り込むことが可能であった。薬効発現に関わる成分の同定作業が残っているものの、本解析方法は、多成分系である漢方方剤の理解において必要な成分レベルの情報を提供するのにも有用であると考えている。

謝 辞

本研究を実施するにあたり公益財団法人東洋医学研究財団より令和4年度から引き続き助成いただき、ここに改めて深謝いたします。

用いたデータベース情報等

1. MassBank: <https://massbank.jp>
2. MS-DIAL: <http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>
3. MetaboAnalyst: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>
4. KNApSAcK: http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK_Family/