

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460130

研究課題名(和文)フラボノイドの組合せによる抗炎症作用増強メカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanism of anti-inflammatory activity of flavonoid mixture

研究代表者

木内 文之 (KIUCHI, FUMIYUKI)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：60161402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生薬オウゴンに含まれる3種のフラボノイド成分が、単独では弱い抗炎症作用しか示さないのに混合すると強い活性を示すメカニズムを解析した。炎症の原因物質であるプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の産生を誘導するリポ多糖(LPS)で刺激した培養細胞における、PGE<sub>2</sub>の産生量を測定することによって抗炎症作用を評価し、その過程を解析した結果、3種のフラボノイドは構造が似ているにも関わらず、PGE<sub>2</sub>の産生過程の異なる場所に作用することにより、相乗的な作用を示していることが判明した。複数の物質が少量でも異なる場所に作用することにより、強い作用を示すのが、生薬の有効性の要因の一つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Three flavonoids contained in Scutellaria Root show synergistic effect on production of prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, a mediator of inflammation, in lipopolysaccharide-stimulated cells. In this study, the mechanism of this synergistic effect was investigated. Although the structures of the flavonoids are similar, they inhibited different processes leading to the production of PGE<sub>2</sub>: i. e. translocation of NF- $\kappa$ B to nucleus, NF- $\kappa$ B dependent transcription, and COX-2 enzyme activity. As the mixture of the flavonoids did not show synergistic effect on each step, the synergistic effect of the mixture is due to multi-step effects by different compounds in the LPS-initiated signal transduction processes. A crude drug contains many constituents. Although the amount of each constituent is not so large, the result obtained in this project indicates that synergistic effect of many constituents to different targets lead to the effectiveness of the crude drug.

研究分野：生薬学・天然物化学

キーワード：オウゴン 抗炎症作用 プロスタグランジン フラボノイド 混合物 相乗作用

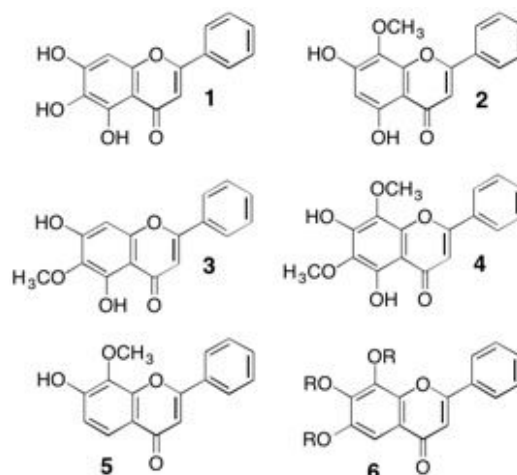
## 1. 研究開始当初の背景

漢方は、現在の日本の医療の中で活用されており、日本薬局方には漢方処方 22 処方のエキスが記載されている。漢方治療の中で重要な役割を担う漢方処方は、長い使用経験に基づいて医薬品として使用されており、臨床現場で幅広く利用され、その効果が確認されている。しかし、単一化合物をベースにした新薬では当然のことのように解明されている作用メカニズムに関しては、漢方処方の場合ほとんど解明されていない。漢方処方は、一般的には複数の生薬から構成されており、各生薬は多数の成分を含んでいることから、漢方処方の作用は複数の成分による複合的な効果であるものと漠然と理解されているが、実際に複数の成分による複合的な作用が化合物のレベルで明らかにされているのは、芍薬甘草湯におけるペオニフロリンとグリチルリチン酸の作用 (Kimura *et al.*, *Jpn. J. Pharmacol.*, **36** (1984) 275-282) など、限られたものに過ぎない。

漢方処方を構成する個々の生薬に関する成分研究は多数行なわれており、個々の成分の様々な生物活性も明らかにされてきている。そして、漢方処方構成生薬の成分であるエフェドリン、ベルベリン、センノシド、グリチルリチン酸などが医薬品として用いられている。しかし、実際に薬として使われている漢方処方に於いて、単離されている様々な成分がどのように、また、どの程度働いているかは不明のままである。

漢方処方の有効性は、そこに含まれる様々な化合物の総合的な作用であることは疑いのないところである。様々な化合物が多様な作用点に働くことによる総合的な効果が、漢方処方の応用力の広さの要因になっているものと思われる。漢方薬の有効性を科学的に裏付けるためには、このような複雑多岐にわたる作用のネットワークを、一つずつ解きほぐして行く必要がある。

我々は、炎症性疾患に用いられる漢方処方である黄連解毒湯の抗炎症作用に参与する成分を明らかにするために、炎症性メディエーターの一つであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) に着目し、培養細胞系を用いて lipopolysaccharide (LPS) 刺激による PGE<sub>2</sub> の産生に対する抑制活性を指標として、黄連解毒湯並びにその 4 種の構成生薬すべてのエキスの活性を比較した。その結果、PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性は、構成生薬の一つである黄芩の作用として説明できることを見出した。さらに、黄芩中の活性成分を明らかにするために成分の分離を行い、活性フラクションから黄芩の成分として知られている baicalein (**1**)、wogonin (**2**)、oroxylin A (**3**)、6-methoxywogonin (**4**) の 4 種のフラボノイドを単離した。しかし、これらの化合物は単独ではさほど強い活性を示さず、エキス中の含量を勘案すると、これらの化合物の活性ではエキスの活性を説明できなかった。



このように、生物活性を指標として活性物質の単離を進めると、活性が分散して活性本体が得られなかったり、活性物質が得られても、その含量を勘案すると、それだけでは元のエキスの活性を説明できない場合が多い。このような現象は、複数の成分の相乗的な作用の存在を示すものである。そこで、活性を示したフラクションから得られた 4 種のフラボノイドをエキス中に存在する量比で混合したところ、これら 4 種のフラボノイドのエキス中の濃度と同程度の濃度で、エキスと同等の活性を示し、これら 4 種のフラボノイドの組合せが、活性の本体であることが明らかとなった (Oshima *et al.*, *J. Nat. Med.* **67** (2013) 281-288)。

ここで得られたフラボノイドのうち主要フラボノイドである **1** - **3** 各々については、既に PGE<sub>2</sub> や一酸化窒素 (NO) の産生抑制作用が報告されているが (Chen *et al.*, *ACS Symposium Series*, **859** (2003) 113-120; Park *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **40** (2005) 943-948; Watabayashi & Yasui, *Eur. J. Pharmacol.*, **406** (2000) 477-481; Kaneko *et al.*, *in vivo*, **24** (2010) 55-58 & **23** (2009) 577-582; Jang *et al.*, *Phytother. Res.*, **24** (2010) 964-968; Pham *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22** (2012) 2534-2535) 、これらのフラボノイドを混合した場合の作用については、全く報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述のフラボノイドの組合せが、培養細胞系で PGE<sub>2</sub> の産生を抑制するメカニズムを明らかにするために、PGE<sub>2</sub> の産生に参与する酵素に対する直接的な作用並びに酵素遺伝子の発現に対する作用を、個々のフラボノイド並びにその組合せについて解析することを目的とした。

本研究は、オウゴンに含まれるフラボノイドの混合物が PGE<sub>2</sub> 産生を抑制するメカニズムを明らかにしようとするものであるが、単独では強い効果を示さない成分が混合物として十分な効果を発揮するようになる

いう、生薬ならではの有効性のメカニズムの一端を明らかにすることに繋がるものと考えられる。生薬並びにその組合せである漢方処方の有効性のメカニズムの解明は、そこに含有される成分の多様性のゆえに非常に困難であるが、本研究のように、PGE2の産生抑制のような個々の効果に対する化合物レベルでのメカニズム解析の積み重ねによって、複雑な漢方処方の作用メカニズムを解き明かしていくことが可能である。漢方を現代の医療に有効に活用し、新たな適用の道を拓いていくためには、薬としての有効性のメカニズムの解析は必須であり、本研究はその一端を担うものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) COX-2 に対する直接的阻害活性の検討

COX inhibitor screening assay kit を用いて、まず baicalein (1)、wogonin (2)、oroxylin A (3) 各々単独での cyclooxygenase 2 (COX-2) に対する IC<sub>50</sub> 値を求めたうえで、これらのフラボノイドを組合せることによって COX-2 に対する直接的な阻害効果が変わるかを解析した。

#### (2) COX-2 並びに iNOS の mRNA 発現に対する影響の解析

黄芩のフラボノイド 1-3 については、COX-2 や iNOS の誘導を抑制することが個別に報告されているが、これらの組合せについての報告はない。そこで、我々がこれまで用いてきたマウス由来 J774.1 細胞を用い、化合物 1-3 単独とこれらの化合物の組合せについて、LPS 刺激に対する COX-2 並びに iNOS の mRNA 並びに酵素タンパクの発現への影響を調べ、化合物を組合せることによる PGE2 産生抑制活性の増強との関連を解析した。J774.1 細胞を 24 時間前培養した後、培地を LPS 並びに検体を含むものに置き換えて一定時間培養後、細胞を回収して mRNA を抽出し、これを用いてワンステップリアルタイム PCR にて COX-2 並びに iNOS の発現遺伝子量を評価した。

#### (3) フラボン誘導体の合成

オウゴンのフラボノイドと構造の類似したフラボノイドの PGE2 産生抑制作用の検討が行われており、5 位に水酸基を持たない化合物 5 に wogonin (2) と同等の活性が見出されている (Gurung *et al.*, *Biomol. Therapeutics*, **17** (2009) 418-421)。化合物 1-3 の中で単独での活性が最も強いのは 3 であることから、化合物 6 のような A 環の 5 位にのみ置換基のない化合物の活性に興味を持たれる。しかし、このタイプの化合物は天然物としては極めてめずらしく、A 環の 6、7、8 位のみならず、酸素官能基を持つフラボンの合成品について骨粗鬆症の治療薬としての特許 (公開特許公報昭 63 - 201124) が申請されているに過ぎない。そこで本研究では、化

合物 5 や 6 の誘導体を合成し、その活性を検討した。まず適切に保護されたピロガロールを出発原料とし、文献既知の方法 (Hansen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 3799-3800; *Organic Syntheses Collective Vol. IV*, 478-481) を参考にして、フラボン骨格の構築を目指したが、ピロガロール誘導体のアシル化の段階が進行しなかったため、市販のアセトフェノン誘導体を原料として、A 環の 5 位に酸素官能基を持たないフラボンの合成を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) フラボノイド混合物の COX-2 に対する直接阻害作用の解析

オウゴンの主要フラボノイドである baicalein (1)、wogonin (2)、oroxylin A (3) について COX-2 への直接阻害作用を検討した。単一化合物としては 3 の阻害率が最も高く、続いて 1、2 の順であったが、この 3 種を混合しても、細胞で観察された PGE2 産生抑制の増強作用は見られなかった。

#### (2) フラボノイド混合物の mRNA 発現に対する影響

次に、COX-2 並びに iNOS の mRNA の発現に対する影響を調べた。まず、LPS 刺激による mRNA の発現量の経時変化を検討し、最初のピークが見られた時間でのフラボノイドの作用を検討した。COX-2 については wogonin (2) に最も強い活性が見られたが、3 種のフラボノイドの混合による活性の増強は見られなかった。また、iNOS については、やはり 2 に最も強い活性が見られ、3 種のフラボノイドを混合すると活性が上昇する傾向が見られた。

#### (3) フラボノイド混合物の NF-κB シグナル伝達経路に対する影響

LPS 誘導性 PGE2 の産生には NF-κB シグナル伝達経路の活性化が必須との報告があることから、J774.1 細胞を用いて NF-κB の核内への移行に対する影響を調べた。その結果、baicalein (1) に強い抑制が見られた。また、RAW264.7 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイを用いて、NF-κB による転写活性化を調べた結果、wogonin (2) に強い抑制が見られた。しかし、いずれの過程についてもフラボノイドの混合による明らかな活性上昇は見られなかった。

以上の結果から、フラボノイド混合物による LPS 刺激による PGE2 産生に対する抑制作用の増強は、COX-2 への直接阻害、NF-κB の核内への移行、NF-κB による転写の 3 つの過程を、3 種の異なるフラボノイドが阻害することによる共同的な作用であるものと考えられた。

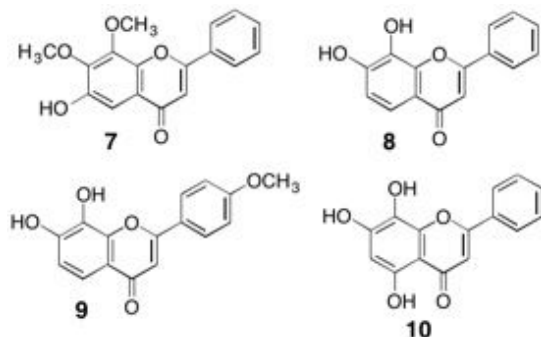
#### (4) 細胞におけるフラボノイド混合物の

## PGE2 産生抑制作用の再評価

前述の誘導型のシクロオキシゲナーゼ (COX-2) 並びに一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA 並びにタンパク質発現への影響の評価は、これらの発現のピークとなる時間で行っていたが、プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub> 産生抑制活性は LPS 刺激後 24 時間で評価していたため、フラボノイドの組み合わせによる PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性を、LPS 刺激後 mRNA の発現がピークとなる時間で改めて評価した。なお、3種のフラボノイド混合物による活性の上昇が、これらのフラボノイドが主として異なる過程に作用しているためであることがわかったため、当初予定していた混合比が活性に与える影響の評価は行わず、等量混合物のみの活性を評価した。その結果、baicalein (1)、wogonin (2)、oroxylin A (3) の3種のフラボノイドの等量混合物は、LPS 刺激後 24 時間の場合とほぼ同様の活性増強効果を示した。

### (5) フラボン誘導体の合成とその PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性

市販の 2',3',4'-trihydroxyacetophenone を出発物質として、CH<sub>3</sub>I/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxyacetophenone とした後、エルブス酸化によって 5'位に水酸基を導入した後、塩化ベンゾイルを用いて 2',5'-dibenzoyl 体とした。これをナトリウムアミド/ピリジンで処理してジベンゾイルメタン誘導体とした後、酢酸ナトリウム/酢酸を用いて環化してフラボンとし、アルカリ加水分解でベンゾイル基を除くことにより、6-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone (7) を合成した。また、同じ出発原料をまずベンジル化し、エルブス酸化を経ずにフラボンに導くことにより、7,8-dihydroxyflavone (8) と 4'-methoxy-7,8-dihydroxyflavone (9) を合成した。これらの化合物の J774.1 細胞における PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性を調べたところ、7 と 9 は baicalein (1) や oroxylin A (3) よりやや強い活性を示したのに対し、8 はこれらの 5 倍程度の活性を示した。なお、8 の 5 位に水酸基を導入した化合物 10 はほとんど活性を示さなかった。これらの結果から、類似の置換基を持つ単純なフラボノイドでも、置換基の位置や数の違いにより活性に大きな差が出るようになった。これらの合成フラボノイドに関しては、シグナル伝達経路のどのステップに作用するかを明らかにする必要がある。



## 結論

本研究ではオウゴンのフラボノイド 1、2、3 の混合物が LPS で刺激した培養細胞において各々単独よりも強く PGE<sub>2</sub> や NO の産生を抑制するメカニズムを検討した。COX-2 に対する直接的な阻害は、3 が最も強く、続いて 1、2 の順であったが、この3種を混合しても細胞で観察された増強作用は見られなかった。COX-2 の mRNA 並びにタンパク質の発現は、2 が最も強く阻害したが、混合による活性増強は見られなかった。次に、LPS 刺激による COX-2 遺伝子の発現過程に対する影響を調べた。LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> の産生には NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性化が必須との報告があることから、J774.1 細胞を用いて NF- $\kappa$ B の核内への移行に対する影響を調べた結果、2 に強い抑制が見られた。また、RAW264.7 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイで、NF- $\kappa$ B による転写活性化を調べた結果、やはり 2 に強い抑制が見られた。しかし、いずれの過程についてもフラボノイドの混合による明らかな活性上昇は見られなかった。以上の結果から、3種のフラボノイドは構造的に類似しているにもかかわらず、炎症のメディエーター産生の異なる過程を阻害するために、それらを混合することにより相乗的な作用を示すと考えられた。

漢方処方やそれを構成する生薬には多数の成分が含まれており、多数の成分が異なる過程に作用することが、漢方薬が穏やかに有効性を発揮する理由であると考えられる。漢方処方は複雑な混合物であるがゆえに様々な症状に応用が可能であるが、漢方処方の特定の症状に対する効果の薬効分子レベルでのメカニズムの解析ができれば、漢方に基づいた化合物の組合せによる新しい医薬品の開発に繋がる可能性がある。本研究では、オウゴンの3種のフラボノイドが共奏的に働いて抗炎症作用を示すメカニズムを明らかにしたが、このような複数成分の相乗効果をうまく利用できれば、単独よりはるかに少量の化合物の組合せによる安全で経済的な薬の開発が可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3件)

Fumiyuki Kiuchi et al., Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> production by a combination of flavonoids from *Scutellaria baicalensis*, 9th Joint Natural Products Conference 2016, 25 July, 2016, Copenhagen (Denmark)

木内文之 他、オウゴンのフラボノイドによる抗炎症作用メカニズムの解析 2、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、

デザイン・クリエイティブセンター神戸  
(兵庫県・神戸市)

木内文之 他、オウゴンのフラボノイドによる抗炎症作用メカニズムの解析、第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2014 年 11 月 6 日、東京大学弥生講堂(東京都・文京区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木内 文之 (KIUCHI, Fumiyuki)  
慶應義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号：6 0 1 6 1 4 0 2

### (2) 研究協力者

清水 智史 (SHIMIZU, Tomofumi)  
成川 佑次 (YUJI, Narukawa)  
羽田 紀康 (HADA, Noriyasu)