

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06734

研究課題名(和文)フラボノイド混合物の抗炎症作用メカニズムの解析とその応用

研究課題名(英文) Mechanistic study of anti-inflammatory activity of flavonoid mixtures and its application

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生薬オウゴンに含まれるbaicalein (1), wogonin (2), oroxylin A (3), 6-methoxywogonin (4)の4種のフラボノイドの等量混合物の抗炎症作用を、培養細胞に対するリポポリ多糖刺激によるプロスタグランジンE2 (PGE2)並びに一酸化窒素(NO)産生抑制を用いて解析し、1～3の混合物(3mix)は個々の化合物の作用の和より強力(相乗的)にPGE2産生を抑制し、これに4を加えても作用の増強が見られなかった。一方、NO産生では3mixに相乗作用は見られなかったものの、これに4を加えると相乗的に効果が増強されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生薬に含まれる構造類似の複数の成分を混合することにより、各成分単独よりも強い抗炎症作用を持つことを示した本研究の成果は、漢方処方に代表される複合医薬品の有効性の裏付けとなるとともに、少量の成分を組み合わせることで各成分単独よりも強い効果を引き出す新たな医薬品の開発の可能性を示したものである。この研究を進展させることにより、複数の生薬成分を組み合わせることによって、漢方処方の特定の薬効を化合物として規格化できる医薬品で再現できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Anti-inflammatory effect of an equimolar mixture of four flavonoids, baicalein (1), wogonin (2), oroxylin A (3), 6-methoxywogonin (4) contained in Scutellaria root, was analyzed using inhibition of the lipopolysaccharide-induced production of prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO) in cultured cells. A mixture of 1~3 (3-mix) inhibited the production of PGE2 stronger (synergistic effect) than that of a sum of each compound and addition of 4 to the 3-mix did not enhance the activity. On the contrary, the 3-mix did not show synergism in the inhibition of NO production, but addition of 4 exerted synergistic effect.

研究分野：生薬学・天然物化学

キーワード：フラボノイド 抗炎症作用 一酸化窒素(NO)産生抑制 プロスタグランジン(PG)産生抑制 オウゴン

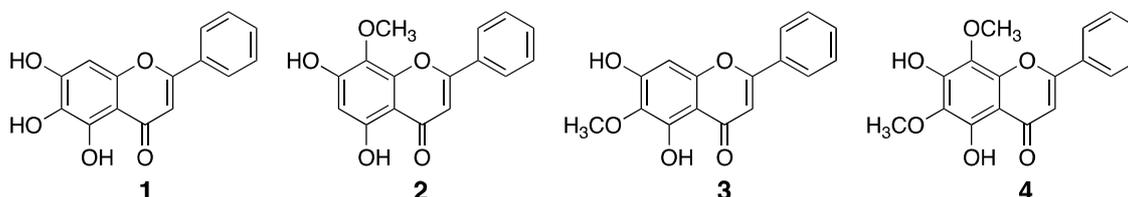
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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33処方のエキスが収載されている。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は、漢方処方においてはほとんど解明されていない。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、漢方処方を構成する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、実際に医薬品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。本研究課題の核心は、複数の化合物による共同作用が漢方薬の有効性の本質的基盤を成していること具体的な例の提示並びにこれを利用した新たな医薬品の開発の可能性の提示である。

2. 研究の目的

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り、様々な化合物が多様な作用点に働くことによってもたらされる総合的な効果が、漢方処方の穏やかな作用と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。先に研究代表者等は、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 E₂ (PGE₂) に着目し、培養細胞系を用いて漢方薬の抗炎症活性を検討し、抗炎症作用を持つとされる生薬の一つであるオウゴンの PGE₂ 産生抑制活性は、オウゴンの成分として知られている baicalein (1)、wogonin (2)、oroxylin A (3) などのフラボノイドの混合物によるものとして定量的に説明できることを明らかにした [Oshima *et al.*, Quantitative analysis of anti-inflammatory activity of orengedokuto: Importance of combination of flavonoids in inhibition of PGE₂ production in mouse macrophage-like cell line J774.1, *J. Nat. Med.*, **67** (2013), 281-288]。さらにこの混合による作用の増強のメカニズムを化合物 1、2、3 を用いて検討し、これらの化合物は構造が類似しているにも関わらず PGE₂ 産生過程における主要作用点が異なっており、各化合物がシグナル伝達経路の異なるステップに作用することによって、相乗的な効果が生まれていることを明らかにした [Shimizu *et al.*, Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin A mixture: Multistep inhibition of the NF-κB signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of Scutellaria root flavonoids, *J. Nat. Med.*, **72** (2018), 181-191]。本研究では、オウゴンに含まれる代表的フラボノイドである B 環に置換基を持たないフラボノイド並びに抗炎症作用のみならずアルツハイマー症に対する効果でも近年注目を集めているチンピなどに含まれるポリメトキシフラボン類の抗炎症作用について、個々の化合物の作用点を明らかにし、異なる作用点を有する化合物を組み合わせた際の抗炎症作用の増強を定量的に解析する。これらの解析により、個々の含有量は多くないフラボノイドが漢方薬の成分としてどのように抗炎症作用に寄与しているかを明らかにする。個々のフラボノイドの抗炎症作用はこれまでも多数報告があるが、生薬エキス中の含有量を含めた定量的な解析で生薬エキスの抗炎症作用を解析した報告は研究代表者らの報告の他に例がなく、独自性の高い研究である。さらに、類似構造を有する合成フラボノイドを含めてフラボノイド混合物の抗炎症作用を検討することにより、単一の合成医薬品より少量で有効性を発揮するフラボノイドの混合物の開発の可能性を示すことを目的とした。これは、作用点の異なる化合物を少量ずつ混合することにより、個々の化合物について副作用の出ない量で有効性を発揮する混合物医



薬品を開発しようとするものであり、化合物を用いて漢方薬の作用を部分的に再現する今までに例のない創造的な試みである。

3. 研究の方法

(1) オウゴンのフラボノイド混合物の抗炎症作用の解析

オウゴンのフラボノイド混合物の PGE₂ 産生阻害作用の解析の過程で、一酸化窒素 (NO) 産生抑制作用が 2 次的に PGE₂ の産生抑制に作用している可能性が考えられたことから、培養細胞を用いてフラボノイド単独並びにその混合物の lipopolysaccharide(LPS) 誘導性 NO 産生に関するシグナル伝達経路への影響を解析する。オウゴンのフラボノイドの NO 産生抑制活性については既に多くの報告があるが (Huang *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, **7** (2007) 1054-1063; Chen *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **61** (2001) 1417-1427; Chen *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **59** (2000) 1445-1457; Kim *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **58** (1999) 759-765 等)、いずれも baicalein や wogonin といった単一化合物に関するもので、それらを混合した場合の効果に関する報告は見当たらない。そこで、まず baicalein (1)、wogonin (2)、oroxylin A (3) 単独とこれらを混合した場合の効果、LPS 刺激によって直接誘導される iNOS の mRNA 並びに酵素タンパク質の発現について比較する。また、LPS 刺激による IFN- β の産生によって誘導される 2 次的な iNOS の誘導過程に対する効果を、NO 産生に関するシグナル伝達系に対する影響を調べることにより検討し、これらのフラボノイドの作用部位並びにこれらを混合することで NO 産生に対する影響がどのように変化するかを明らかにする。また、6-methoxywogonin (4) を合成し、上記 3 種の混合物とこれに 4 を加えた 4 種のフラボノイドの混合物の作用を PGE₂ 並びに NO 産生系において比較する。

(2) オウゴンのフラボノイドと類似構造を有するフラボン類の合成とその抗炎症作用の解析

研究代表者は、先行研究 (基盤研究 (C) 課題番号 26460130、平成 26~28 年度、「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」) において、5 位にヒドロキシ基を持たないフラボノイドを合成し、それらの中に wogonin (2) を上回る PGE₂ 産生抑制活性を持つ化合物を見出している。そこで、その作用メカニズムを解析するとともに、この構造を基にさらに強い活性を持つ化合物を目指して B 環に置換基を持たない各種フラボノイド類縁体を合成し、その抗炎症作用を評価する。さらに、こうして得た化合物とオウゴンのフラボノイドを、各化合物の作用メカニズムを考慮して組合せ、このフラボノイド混合物の効果を培養細胞系を用いて評価することにより、より少量で強い抗炎症作用を示すフラボノイド混合物の開発を目指す。

(3) ポリメトキシフラボン類の抗炎症作用の解析

ミカン科植物の果皮に多く含まれていることが知られているポリメトキシフラボン類は NO 産生抑制活性を持つことが報告されている (Eom *et al.*, *Agric. Food Chem.* (2015) **64**, 7171-7178 等)。しかし、ポリメトキシフラボン類について化合物の混合による活性の変化の観点での研究は行われていない。そこで、チンピに含まれるポリメトキシフラボン類を単離するとともに必要に応じて市販のフラボノイドの化学変換などでメトキシ基を 5~7 個有するフラボノイドを調製し、これらの化合物の NO 産生抑制作用を解析する。また、チンピエキスとそこに含まれるメトキシフラボノイドの活性を、エキス中の各フラボノイドの含量を考慮して比較することにより、メトキシフラボノイド類の組成とエキスの NO 産生抑制活性の関係を考察する。

4. 研究成果

(1) オウゴンのフラボノイドと類似構造を有する B 環に置換基を持たないフラボノイド類のうち、6-methoxywogonin (6MW) を含む A 環に酸素置換基を 3 つまたは 4 つ持つメトキシフラボン類を化学合成し、培養細胞 (J774.1 細胞) をリポ多糖 (LPS) で刺激した際の一酸化窒素 (NO) 産生に対する抑制作用を検討した。これらのメトキシフラボン類は、chrysin を出発原料として、そのブロム化によって得た 6,8-dibromo-5,7-dihydroxyflavone から 6MW を得て、これをメチル化或いは脱メチル化して得た。合成した化合物並びに baicalein を部分メチル化した化合物にオウゴンのフラボノイドを加えた 10 種のフラボンについて、リポ多糖誘導性 NO 産生抑制活性を評価した結果、6MW はオウゴンのフラボノイド 1~4 のの中では単独での活性は弱く、wogonin の 4 分の 1 程度で、oroxylin A と同程度の活性を示した。一方、オウゴンのフラボノイド 1~3 の 3 種の等量混合物は、各フラボノイドの活性を平均した程度の活性を示し、NO 産生抑制に対する阻害作用は相乗的ではなく相加的であったが、これに 6MW を加えた 4-mix は 4 種の化合物の活性より強い活性を示し、4 種の化合物を混合することによって活性が相乗的に増強されることが明らかとなった。また、既にオウゴンの 3 種のフラボノイド 1~3 (baicalein, wogonin, oroxylin A) による相乗的効果を報告しているプロスタグランジン (PG) 産生について、6MW を加えた 4 種のフラボノイドの混合物による阻害活性を検討した。まず、COX-2 に対する直接阻害を検討したところ、wogonin が弱い阻害を示すのみなのに対し、6MW は比較的強い阻害を示した。次に、リポ多糖 (LPS) で刺激した J774.1 細胞における PGE₂ 産生抑制活性を評価した結果、6MW は、単独で wogonin に次ぐ活性を示した。しかし、baicalein、wogonin、oroxylin A の 3 種に 6MW を加えた 4 種のフラボノイドの等量混合物 (4-mix) の阻害活性と 6MW を含まない 3 種の等量混合物 (3-mix) の阻害活性には差は見られなかった。

次に、6MW が PG 産生に関するシグナル伝達経路に対しどのように影響にしているかを検討した結果、6MW は NF- κ B の核内への移行を阻害することにより、COX-2 タンパク質の発現を抑制しているものと考えられた。この結果は、wogonin が NF- κ B の核内移行を阻害しなかったのと対照的である。

(2) オウゴンのフラボノイドと類似構造を有する B 環に置換基を持たないフラボノイドを化学

合成し、培養細胞（J774.1 細胞）を用いた一酸化窒素（NO）産生抑制作用を検討した。A 環に酸素置換基を一つ有するメトキシフラボン類は、ヒドロキシフラボンのメチル化あるいは 2,3-dimethoxybenzotrile を出発原料とした 7 ステップの反応により得た。酸素置換基を二つあるいは三つ有するメトキシフラボン類は、chrysin あるいは baicalein のメチル化およびエルブス過硫酸酸化により合成した。市販品をあわせて計 22 種のフラボン類について、リポ多糖誘導性 NO 産生抑制活性を評価し構造活性相関を解析したところ、①メトキシ基を一つ以上有するフラボン類、②6 位にメトキシ基を有するフラボン類、③5 位にヒドロキシ基および 7 位にメトキシ基を有するフラボン類には高い活性を示す傾向が認められた。さらに、A 環に酸素置換基を一つ有するフラボン類の細胞膜に対する親和性についてリン脂質カラムを備えた HPLC 分析により数値化したところ、リン脂質膜親和性と NO 産生抑制活性強度との間に正の相関が認められた。以上の結果から、酸素置換基を一つ有するフラボン類は、細胞内において同じ作用点に作用するのに対し、酸素置換基を多数有するフラボン類は、異なる様々な段階において抗炎症作用に関連する NO 産生シグナル伝達経路を阻害することが考えられた。しかし、A 環に 3 つ以上の酸素官能基を有するフラボンの活性には、置換パターンによる統一的な傾向は認められず、酸素置換基を多数有するフラボン類は、NO 産生に関連するシグナル伝達経路を異なる様々な段階において阻害することが考えられた。また、6MW の 6 位と 8 位のメトキシ基をメチル基に変えた化合物ならびにこの化合物と同一の A 環の置換パターンを有するホモイソフラボンである methyllophiopogonanone A を合成したが、これらの化合物には NO 産生抑制活性は見られなかった。

(3) 計 21 種類のチンピの抽出物について NO 産生抑制作用を評価した結果、抽出物ごとに活性強度が大きく異なっていた。抽出物の HPLC 分析と NO 産生抑制活性を用いたケモトリクス解析の結果、ポリメトキシフラボン類の含量割合が活性強度に強く関与していることが明らかとなった。また、ポリメトキシフラボン類以外の化合物（フラバノン配糖体）も重要な役割を担っている可能性が考えられ、これら化合物群が相加・相乗的に作用していることが示唆された。さらに、チンピに含まれる多置換フラボンについての分子ネットワーク解析を行い、含量が極めて少ない数種のポリメトキシフラボンを同定した。これらの結果から、抽出物間で異なる活性強度を示す理由として、ポリメトキシフラボンの含量パターンの違いが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kiuchi Fumiyuki, Katagiri Ryo, Uekusa Yoshinori, Narukawa Yuji	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis of Methylphopogonanone A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 803 ~ 808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-20-14231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshinori Uekusa, Riina Tsutsumi, Kenjiro Nakamoto, and Fumiyuki Kiuchi
2. 発表標題 Structural analysis of the complex of baicalin and berberine in aqueous solution
3. 学会等名 American Society of Pharmacognosy 2019 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八汐 祥恵, 鱈口 あおい, 二見 萌, 植草 義徳, 河野徳昭, 淵野 裕之, 川原 信夫, 木内 文之
2. 発表標題 メタボローム解析を用いたチンピの品質評価に関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植草 義徳 (Uekusa Yoshinori) (30753024)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------