

論文内容要旨

人類は、古くから自然界の草根木皮等を、“くすり”として用いてきた。現代においても、特に民間医療として生薬は、多くの人に対し使用されている。東洋においては漢方医学として体系化され、西洋では *Materia media* として医学の一分野として発展してきた。マンゴスティーンは、学名 *Garcinia mangostana* と呼ばれ、特に果皮の部分は、抗炎症及び抗アレルギー作用を示す生薬の代表的なものとして、東南アジアにおいて長年にわたり使用されてきた。しかし、その科学的根拠については、殆ど不明のままであった。本研究は、生薬からの有用な医薬品開発のため、マンゴスティーンの抗炎症及び抗アレルギー作用に着目し、その作用メカニズムを解明することを目的とした。

始めに、マンゴスティーン果皮抽出物を用い、その薬理作用と作用メカニズムを検討した。乾燥させたマンゴスティーン果皮を、water, 40% ethanol, 70% ethanol, 100% ethanol 溶媒を用いて抽出した。各抽出物について、次の薬理作用を検討した。鎮痛作用は、酢酸 writhing 法を用いて検討した。また、抗炎症作用は、ラット carrageenan 足浮腫法を用い、抗アレルギー作用は、passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 法を用いた。マンゴスティーン果皮抽出物の内、40% ethanol 抽出物が、鎮痛活性を示した。抗炎症及び抗アレルギー作用においても、40% ethanol 抽出物が、特に強い作用を示した。その作用メカニズムを調べるため、炎症時の chemical mediator である histamine の遊離及び prostaglandin E_2 (PGE_2) の生合成に対する各抽出物の作用を検討した。抗原抗体反応による histamine の遊離を濃度依存的に抑制し、 Ca^{2+} イオノフォアである A23187 刺激による PGE_2 の生合成も同様に抑制した。日本国内で抗炎症作用を示す代表的生薬である甜茶抽出物を対照薬として検討した。甜茶抽出物は、抗炎症及び抗アレルギー作用を示し、また histamine の遊離を濃度依存的に抑制したが、 PGE_2 の生合成に対して、全く影響を与えなかった。マンゴスティーン果皮抽出物の有効成分が、40% ethanol 抽出物に含まれており、甜茶抽出物とは異なり、histamine の遊離抑制だけでなく、 PGE_2 の生合成抑制も示すことを明らかにした。

次に、マンゴスティーン果皮抽出物に多く含まれている γ -mangostin に着目し、 PGE_2 の生合成に対する作用メカニズムに関する検討を行った。 γ -Mangostin は、C6 ラットグリオーマ細胞において、A23187 による PGE_2 遊離を濃度依存的に抑制した。 PGE_2 の生合成に関与する代表的な酵素には、① phospholipid から arachidonic acid (AA) を遊離する cytosolic phospholipase A_2 (cPLA $_2$)、② cPLA $_2$ の活性を制御する p42/p44 extracellular signal regulated kinase (ERK)、③ AA から prostanoid を合成する cyclooxygenase (COX) がある。そこで、これら酵素に対する γ -mangostin の作用を検討した。C6 細胞において、 γ -mangostin は、cPLA $_2$ による AA 遊離に対し抑制作用を示さず、逆に弱い促進作用を示した。cPLA $_2$ をリン酸化する ERK の活性が A23187 刺激により促進されたが、 γ -mangostin は、このリン酸化の促進作用を抑制しなかった。一方、COX に対しては、 γ -mangostin は濃度依存的に酵素活性を抑制したので、リコンビナントの COX-1 及び COX-2 に対する直接作用を検討した。その結果、 γ -mangostin は COX-1 及び COX-2 の活性を濃度依存的に抑制し、両者の IC $_{50}$ 値はそれぞれ 1.1 μ M 及び 1.3 μ M であることが明らかとなった。この γ -mangostin による COX-1 及び COX-2 の抑制メカニズムについて、反

応速度論的解析を行った。その結果、いずれにおいても γ -mangostin は可逆的でしかも AA に対し、競合的なメカニズムで抑制作用を示すことが判明した。以上の結果から、マンゴスチーン果皮抽出物における PGE₂ 生合成抑制作用の有効成分は、 γ -mangostin であり、COX-1 及び COX-2 に対する作用メカニズムが、AA に対し競合的な抑制であることが明らかにされた。

更に、COX-2 遺伝子の転写に対する γ -mangostin の作用を検討した。COX-2 は、定常状態では殆ど発現しておらず、刺激に対しその発現が誘導されるため、炎症時の PGE₂ の生合成に対し、重要な役割を果たすと考えられている。 γ -Mangostin は、lipopolysaccharide (LPS) 刺激により誘導された COX-2 タンパク質の発現上昇を濃度依存的に抑制した。RT-PCR 法を用いて、COX-2 mRNA の発現について検討したところ、 γ -mangostin は、LPS により誘導された COX-2 mRNA の転写活性を濃度依存的に抑制することが示された。近年、炎症性サイトカインによる COX-2 mRNA の発現誘導に、nuclear factor κ B (NF- κ B) の活性化が関わっていること、また inhibitor κ B kinase (IKK) による inhibitor κ B (I κ B) のリン酸化、引き続いて起こる分解が、NF- κ B の活性化に関与していることが知られている。 γ -Mangostin の作用を検討したところ、 γ -mangostin は、I κ B のリン酸化及び分解を共に、濃度依存的に抑制することが明らかとなった。また、NF- κ B の転写活性に対する γ -mangostin の作用を reporter gene assay により検討したところ、それに対する抑制作用が認められた。従って、 γ -mangostin は、COX 阻害活性を示すだけでなく、IKK を抑制し、NF- κ B/I κ B の安定性を維持することによる COX-2 転写抑制作用も併せ持つことが明らかとなった。

医薬品開発のための天然生理活性物質の作用メカニズムの検討は、製薬企業においても活発に行われている。企業の創薬研究では、疾患に関わる遺伝子を特定し、その標的分子に対し、選択的に強く作用する薬剤を探索する研究が活発に行われている。しかし、強い作用を示す薬剤は、副作用も強い傾向がある。動物実験では優れた活性を示す薬剤であっても、臨床試験では有効性を示さない場合も多い。また、ヒトゲノムが全て解読され、創薬の標的となる分子が有限であり、新規のターゲット分子がなくなりつつあることも明らかとなってきている。

生薬は、新薬開発には必須の臨床試験が行われていない場合が多いが、長年の経験から、広く使用されている。しかし、近年、evidence based medicine の基本理念が広く受け入れられ、科学的根拠に基づき、新しい治療ガイドラインが作成されるようになると、たとえ生薬であっても、経験だけでなく、その結果の科学的根拠を明らかにすることが求められている。今回のマンゴスチーン的作用メカニズムの解析では、この生薬の薬理作用には複数の成分が必要なことや、主成分が複数のターゲットに作用することを見出しており、人に使いやすい有用な医薬品開発につながる可能性を示したといえる。新薬開発が困難な状況になってきている今日、汎用されている生薬について、その薬理作用を詳細に検討することの重要性が増加している。

本研究では、抗炎症及び抗アレルギー作用を示す生薬として用いられているマンゴスチーンの抽出物には、histamine 遊離抑制作用及び PGE₂ 生合成抑制作用を示すことを明らかにし、マンゴスチーンの主成分である γ -mangostin が PGE₂ 生合成抑制作用を有することを示した。また、この γ -mangostin の

作用は、COX 阻害活性だけでなく、IKK のリン酸化抑制作用による COX-2 の転写活性抑制作用にも起因することを明らかにし、生薬マンゴスティーンの、特に抗炎症作用メカニズムを解明することに成功した。

審査結果の要旨

本研究は、マンゴスチーン果皮抽出物の抗炎症作用に着目し、その薬効と作用メカニズムを解明することをめざし、開始された。

始めに、マンゴスチーン果皮抽出物を用い、その薬理作用と作用メカニズムを検討した。その結果、マンゴスチーン果皮抽出物は、強い鎮痛活性、抗炎症及び抗アレルギー作用を有することが明らかとなった。作用メカニズムを調べるため、ヒスタミンの遊離及びプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の生合成に対する作用を検討した。マンゴスチーン果皮抽出物は、抗原抗体反応によるヒスタミンの遊離及び A23187 による PGE_2 の生合成を濃度依存的に抑制した。次に、マンゴスチーン果皮抽出物に含まれている γ -mangostin に着目し、 PGE_2 の生合成に対する作用メカニズムに関する検討を行った。その結果、 γ -mangostin は、A23187 による PGE_2 の生合成を濃度依存的に抑制した。また、 γ -mangostin は、AA 遊離及び $cPLA_2$ をリン酸化する ERK の活性を抑制することなく、COX-1 及び COX-2 活性を濃度依存的に抑制した。以上の結果から、マンゴスチーン果皮抽出物における PGE_2 生合成抑制作用の有効成分は γ -mangostin であり、COX-1 及び COX-2 を抑制することが作用メカニズムとして重要であることが明らかにされた。

更に、COX-2 遺伝子発現に対する γ -mangostin の作用を検討した結果、 γ -mangostin は、リポポリサッカライドにより誘導された COX-2 タンパク質及び mRNA の発現を濃度依存的に抑制した。その作用を詳細に検討したところ、 γ -mangostin が、 $I\kappa B$ のリン酸化及び分解を抑制すること、また、 $NF-\kappa B$ の転写活性に対し抑制作用を示すことが明らかとなった。従って、 γ -mangostin は、IKK 活性を抑制し、 $NF-\kappa B/I\kappa B$ の安定性を維持することにより、COX-2 転写抑制作用も併せ持つことが明らかとなった。

本研究により、まず、抗炎症作用を有する生薬であるマンゴスチーンの抽出物が、ヒスタミン遊離抑制作用及び PGE_2 生合成抑制作用を有することが明らかにされた。また、マンゴスチーンの主成分である γ -mangostin が、 PGE_2 生合成抑制作用を示すことに加え、IKK のリン酸化抑制作用による COX-2 の転写活性抑制作用を示すことを明らかにすることにより、 γ -mangostin の抗炎症作用メカニズムを解明することに成功した。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。