

神経細胞死抑制作用 一生姜(ショウキョウ)ー

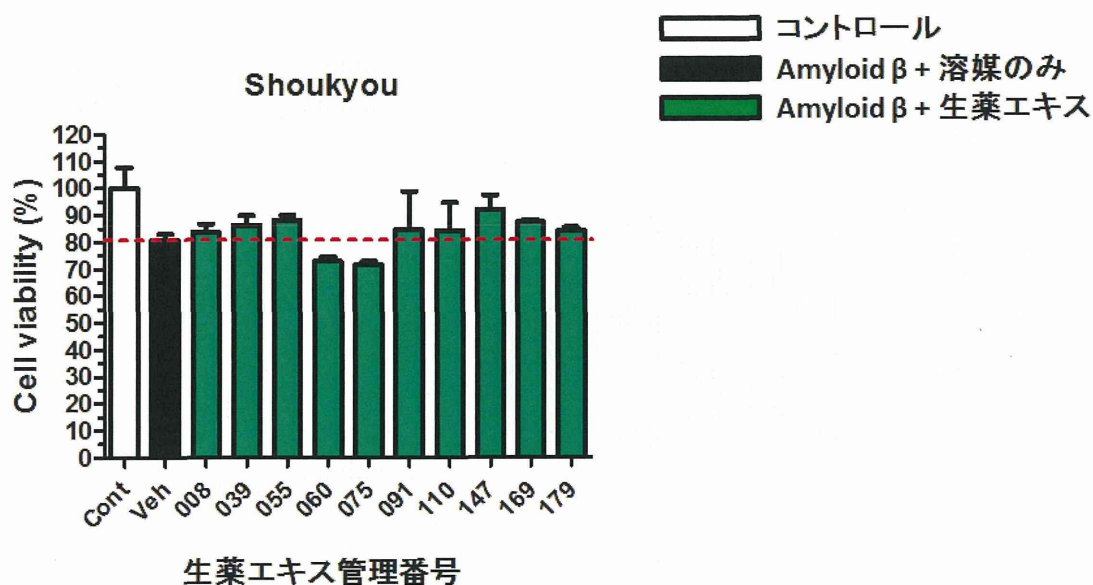


Fig. 19

神経細胞死抑制作用 一車前子(シャゼンシ)ー

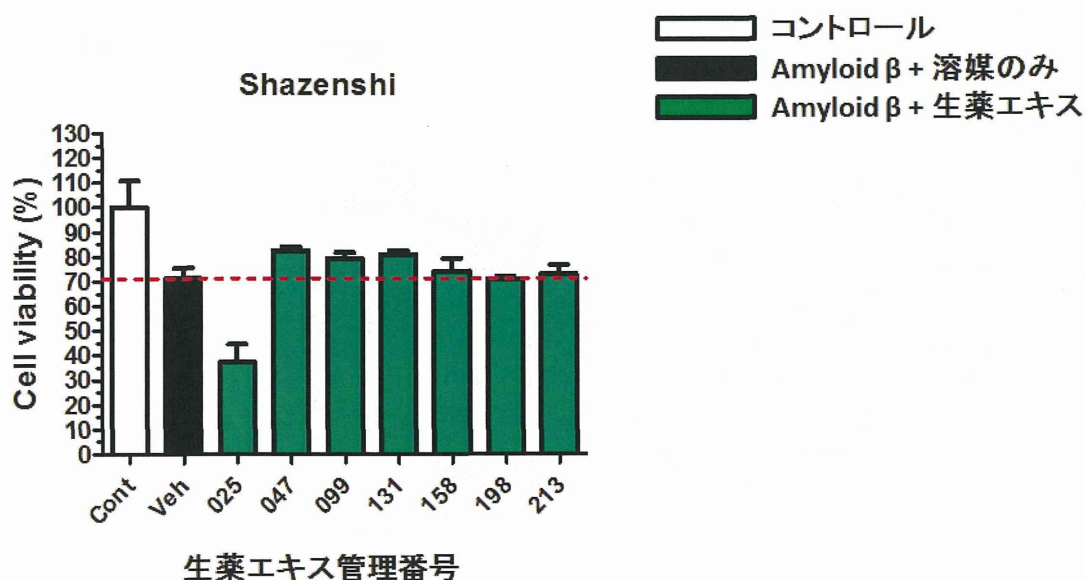


Fig. 20

神経細胞死抑制作用　一蘇葉(ソヨウ)一

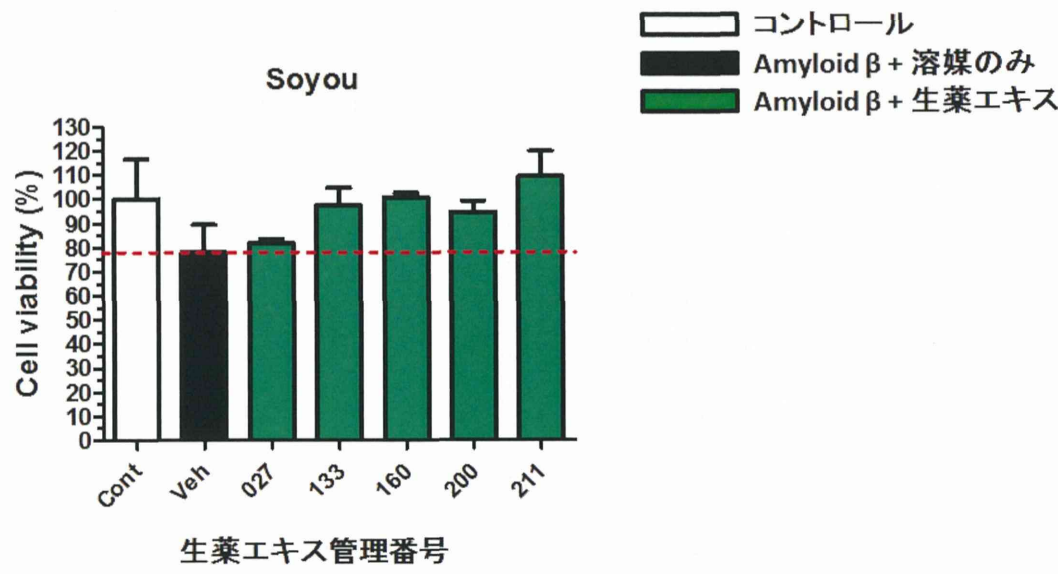


Fig. 21

神経細胞死抑制作用　一沢瀉(タクシャ)一

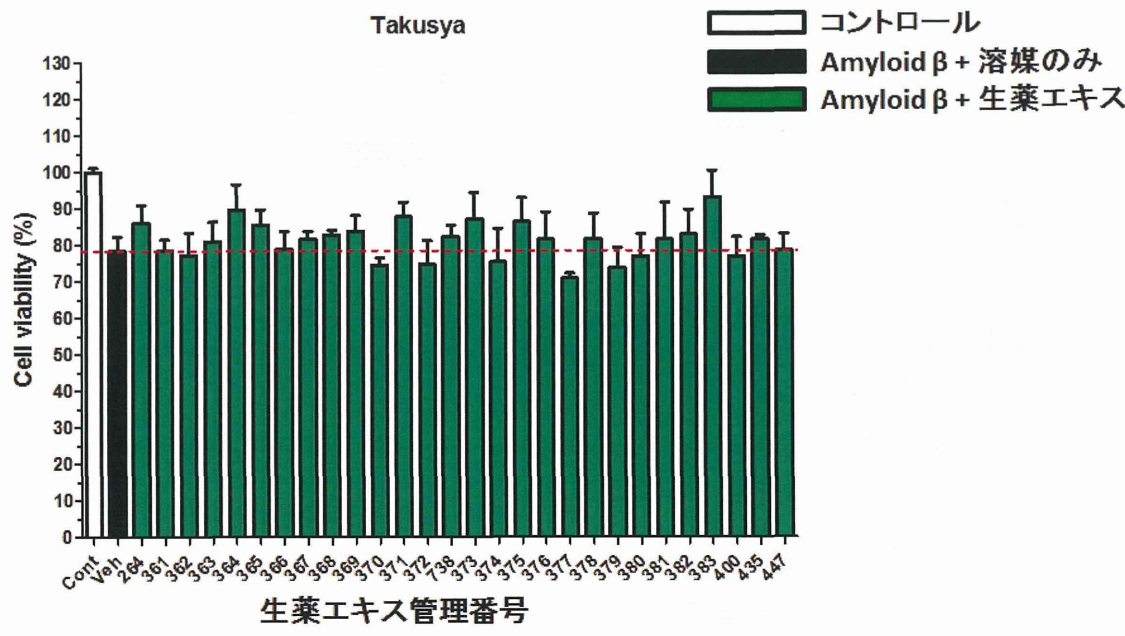


Fig. 22

神経細胞死抑制作用　一芍薬(シャクヤク)ー

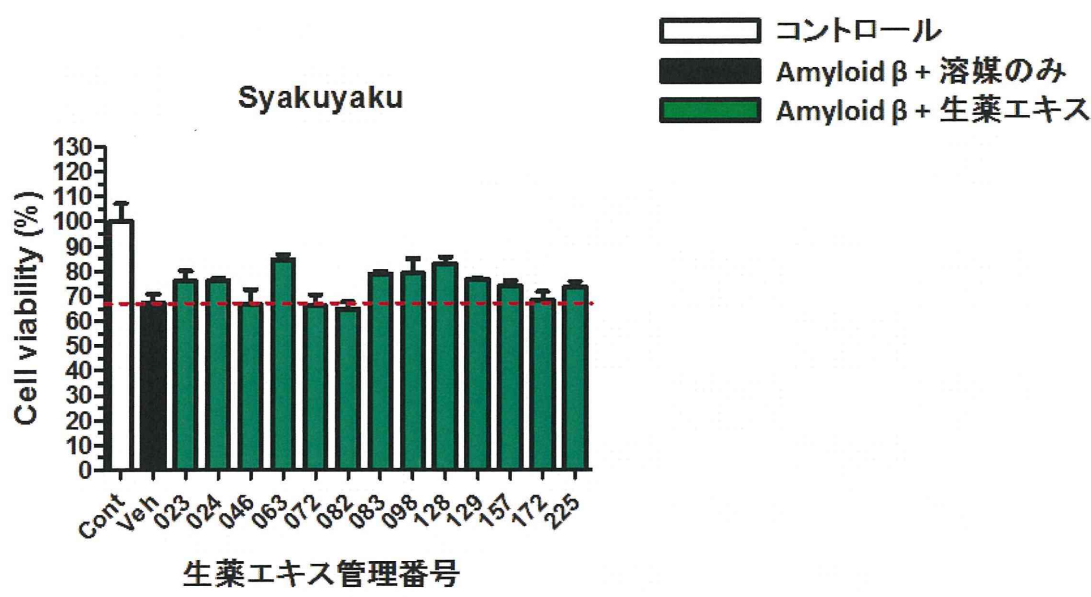


Fig. 23

神経細胞死抑制作用　一蒼朮(ソウジュツ)ー

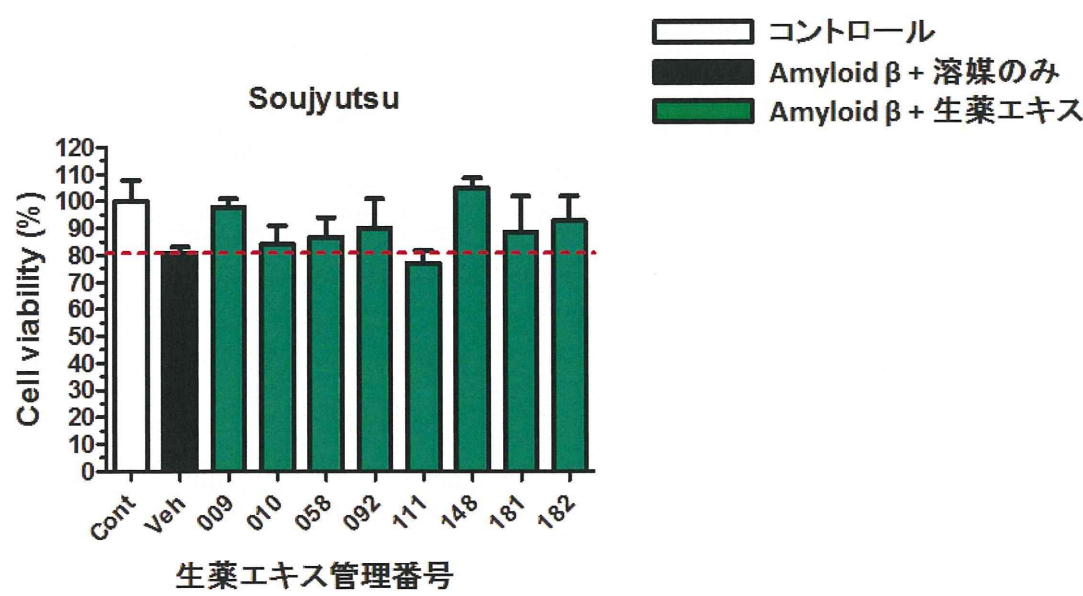


Fig. 24

神経細胞死抑制作用　一川芎(センキュウ)ー

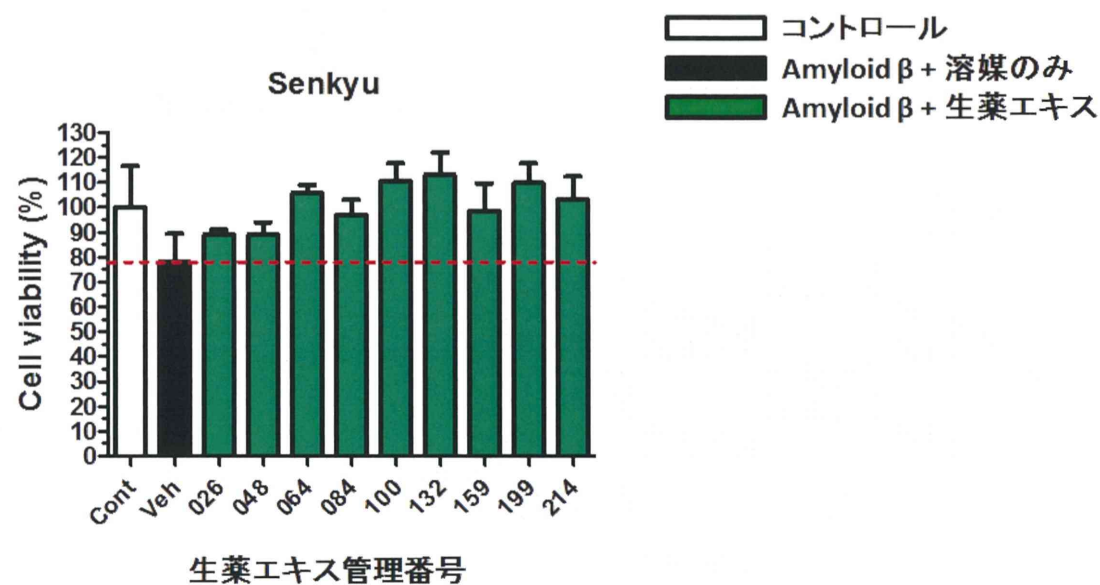


Fig. 25

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 生物活性情報に関する研究

研究分担者 柴原 直利 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

低酸素応答による HIF-1 α の活性化に対する抑制効果

研究協力者 横山 悟 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 助教

提供された各生薬について、それぞれ各ロットの試験を実施することになっている。本年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハング、サイシン、キョウニン、タクシャ、およびボウイの各ロットを用いて、HIF-1 α の転写活性化に対する効果について、検討した。その結果、オウゴン、ダイオウにおいてロット差が観察されるものの、HIF-1 α の活性を増強する傾向が示された。またソウジュツもロット差は観察されないものの HIF-1 α の活性を増強する傾向が示された。一方、オウレン、ボウイは、HIF-1 α の活性化を抑制した。その他の生薬については、多少のロット差は存在するが、HIF-1 α の転写活性化に対する効果はほとんど観察されなかった。

A. 研究目的

本研究は、「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース」構築プロジェクトの一環として、生薬エキスのロット差を生物活性を指標に検出することを目的とする。

低酸素状態は、エネルギー代謝、鉄代謝、血管新生等に関与するストレスであり、その低酸素状態を認識シグナル伝達を行なう HIF-1 α は重要な転写因子である。特に腫瘍組織において、がん細胞は TNF- α などのサイトカインや様々な外的刺激に暴露されている。その中でも低酸素状態は、腫瘍の悪性化進展、あるいは血管新生の亢進などに関わっていることが知られている。また細胞が低酸素状態に暴露されると、HIF-1 α

の分解に関わる prolyl hydroxylase の活性が抑制され、HIF-1 α の蓄積が起こる。その HIF-1 α を介した下流遺伝子の転写活性化が誘導される。この下流遺伝子 VEGF や DEC1 などの転写活性化が腫瘍悪性化進展等に関与している。そこで今回の研究では、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa における HIF-1 α の転写活性化能に対する各生薬エキスの活性を測定し、生薬エキ스가腫瘍悪性化進展を抑制する可能性について、さらにはその抑制における生薬のロット差について検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料である。被検生薬が各アッセイ系で活性を示すのかを検証する目的で、各ロットのアッセイを行い、ロット差を検討することにした。

本年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニン、タクシャ、およびボウイの25種の生薬について検討を行った。

2. 実験方法

細胞培養

レポータープラスミド pGL4.26-HRE を安定発現する HeLa/HRE-Luc2 細胞を DMEM+10% FCS 培地で培養した。

HIF-1 α 転写活性化能の比較試験

HeLa/HRE-Luc2 細胞を 96 ウェルプレートに播種し（ 1×10^4 cells/well）、翌日に最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ で生薬エキスを添加した。その 30 分後に CoCl_2 を最終濃度 200 μM となるように添加し、さらに 8 時間培養した。培養上清を取り除き、One-Glo（プロメガ社製）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

HIF-1 α 活性化試験

HeLa/HRE-Luc2 細胞を CoCl_2 で刺激することにより、発現するルシフェラーゼ活性が約 2 倍上昇した。相対的転写活性の差異が各ロット間において 1.0 以上であったものを「ロット差あり」と判定した。その結果、オウゴン、ダイオウにおいてロット差が観察され、すべてのロットにおいて HIF-1 α

の活性を増強する傾向が示された。またソウジュツもロット差は観察されないものの HIF-1 α の活性を増強する傾向が示された。一方、オウレン、ボウイは、HIF-1 α の活性化を抑制した。その他の生薬については、多少のロット差は存在するが、HIF-1 α の転写活性化に対する効果はほとんどみられなかった。（図 1-13）。

D. 考察

今回、各ロットを用いて生薬の HIF-1 α の転写活性化能への効果を検討した。ロットの差が大きい生薬と差が小さい生薬が存在すると考えられた。したがって、来年度以降もできるだけ多くの生薬エキスの生物活性を効率的に検討していく予定である。

今回、オウゴン、ダイオウで観察された HIF-1 α の活性の増強は、腫瘍悪性化進展を促進する可能性がある。また、HIF-1 α の活性で観察された生薬によるロット差の違いが、他のアッセイ系でも同様に観察できるのか、もしくは HIF-1 α に対する特異的な傾向であるのかについて、考察を加えていく必要があると考えられた。

E. 結論

それぞれ各ロットの効果を検討した結果、少なくともロット差を観察できる生薬とロット差のほとんど無い生薬が存在した。

F. 研究発表

なし

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

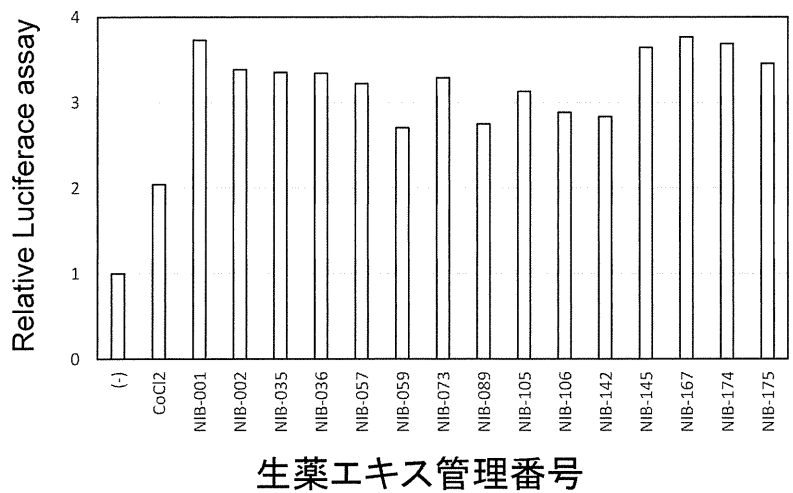


図1. オウゴンの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

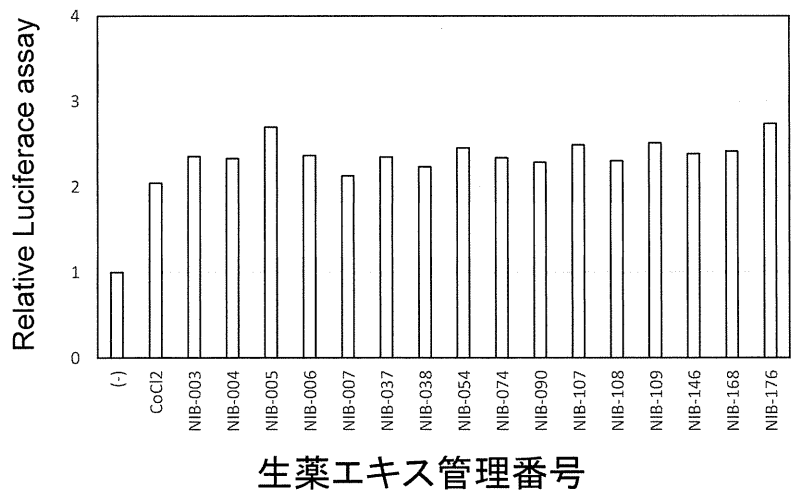


図2. カンゾウの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

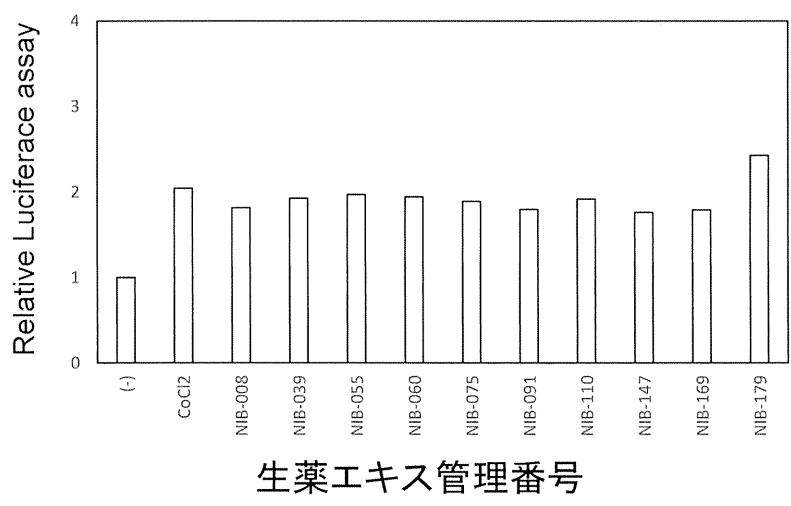


図3. ショウキョウの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

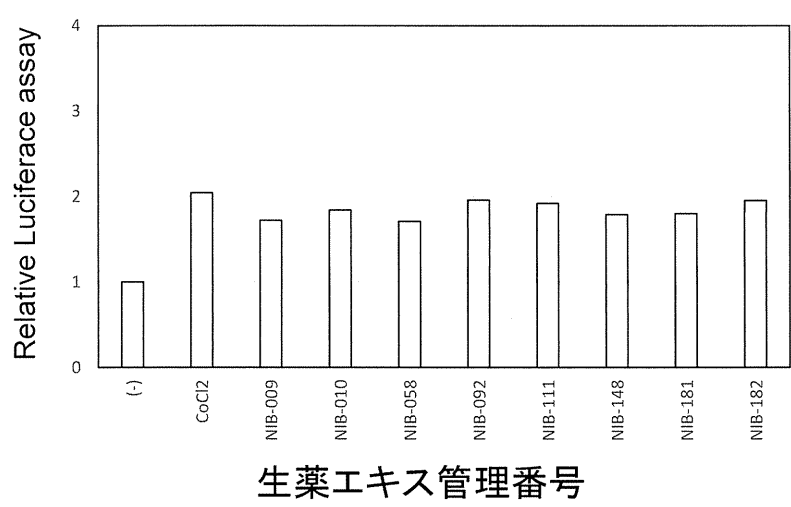


図4. ソウジュツの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

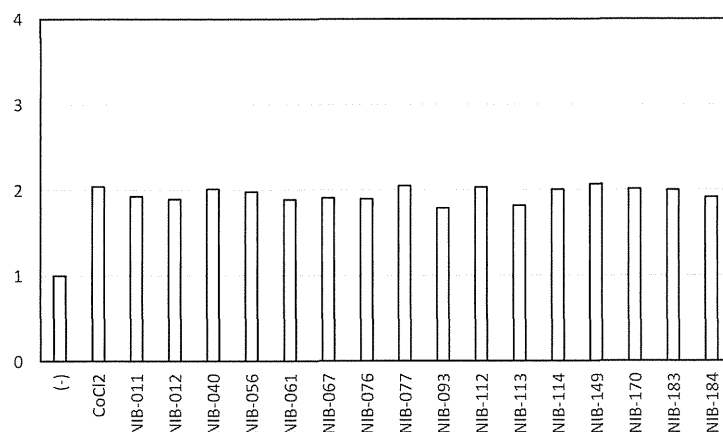


図5. ニンジンの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

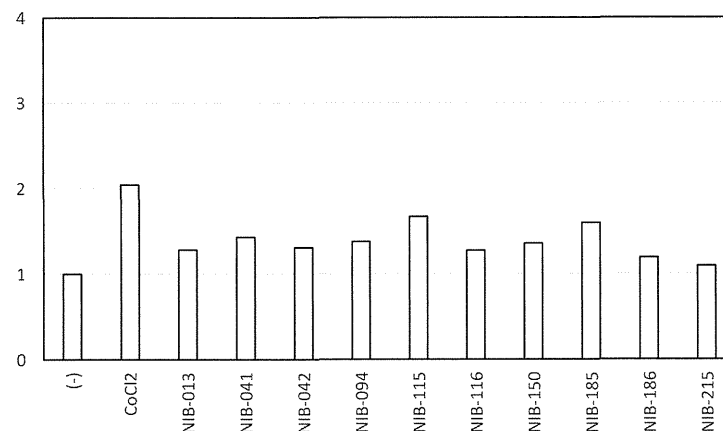


図6. オウレンの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

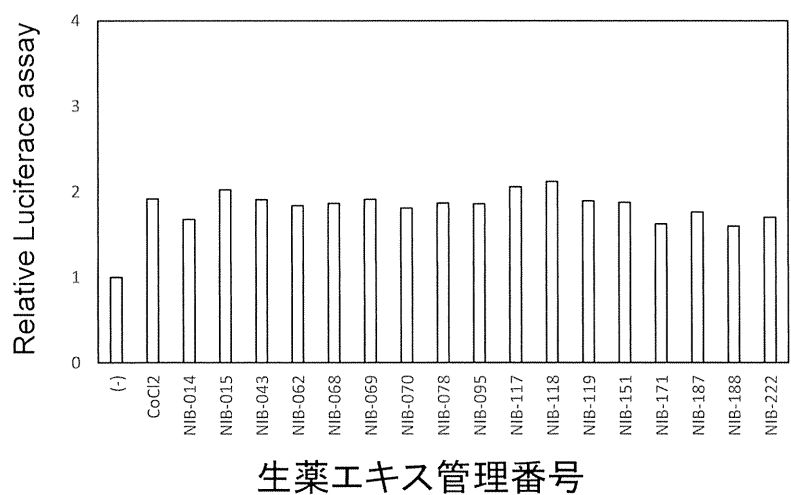


図7. ケイヒの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

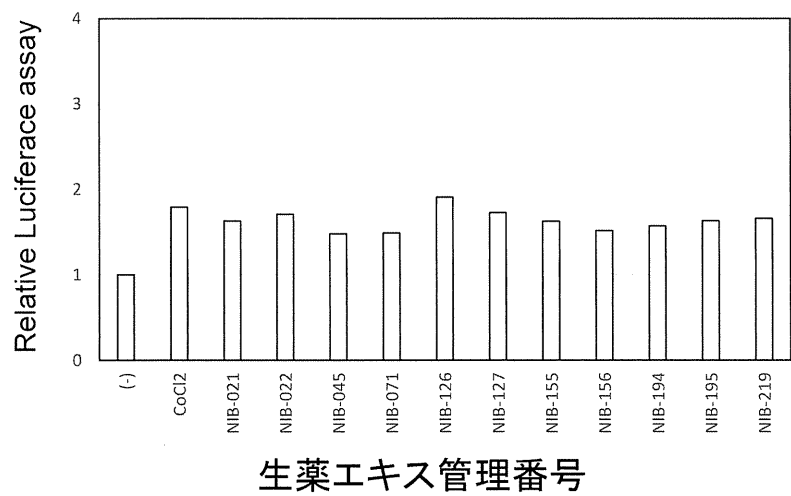


図8. ジオウの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

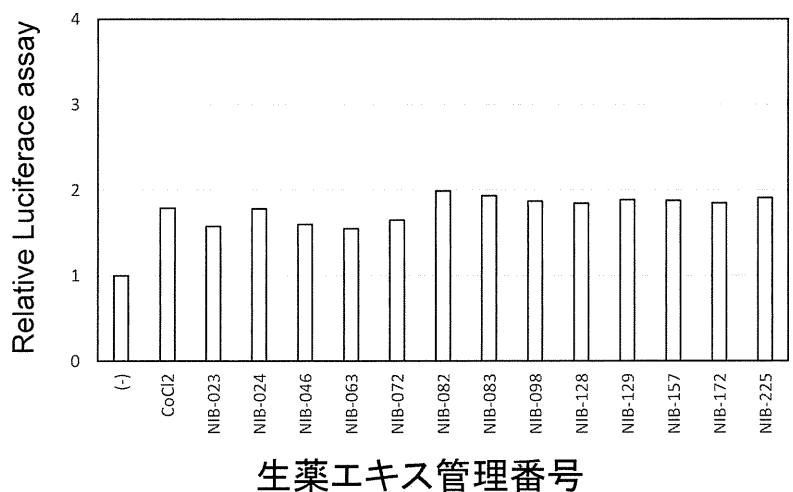


図9. シャクヤクの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

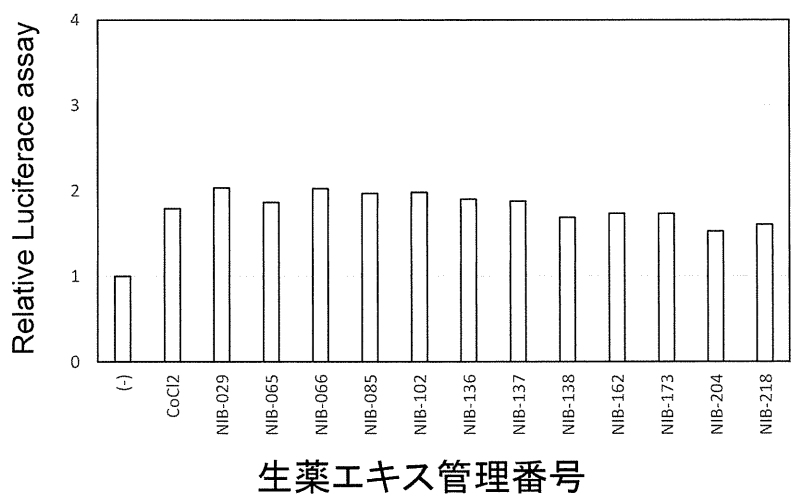


図10. トウキの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

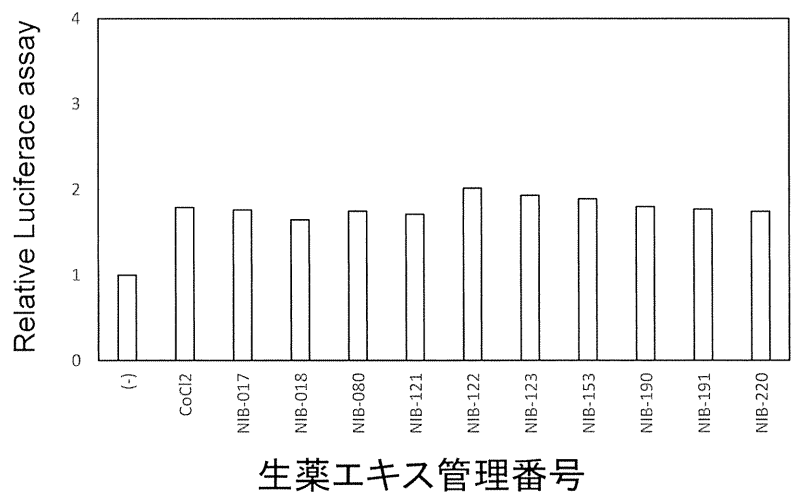


図11. サイコ各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

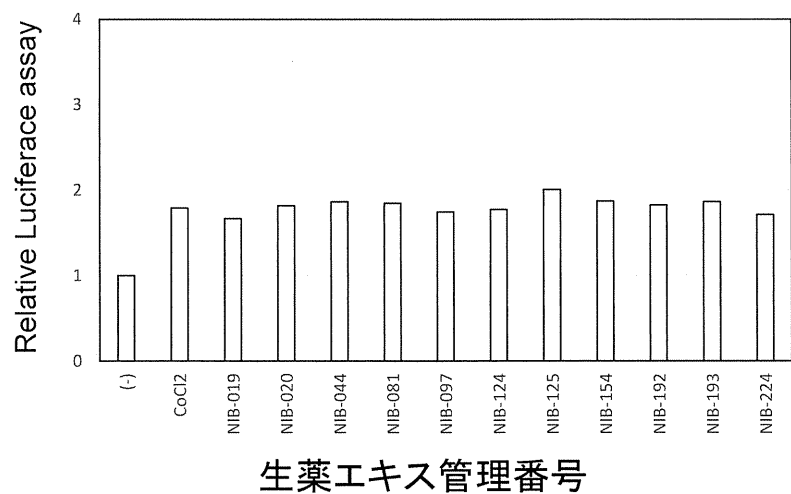


図12. サンシ各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

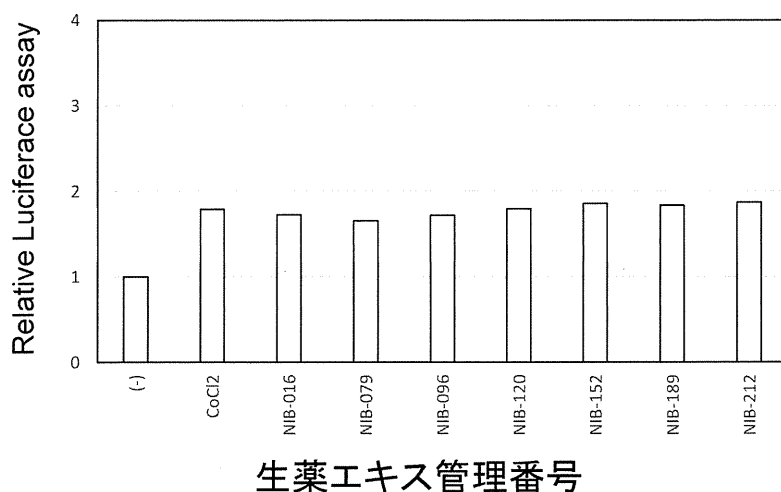


図13. ゴシツの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

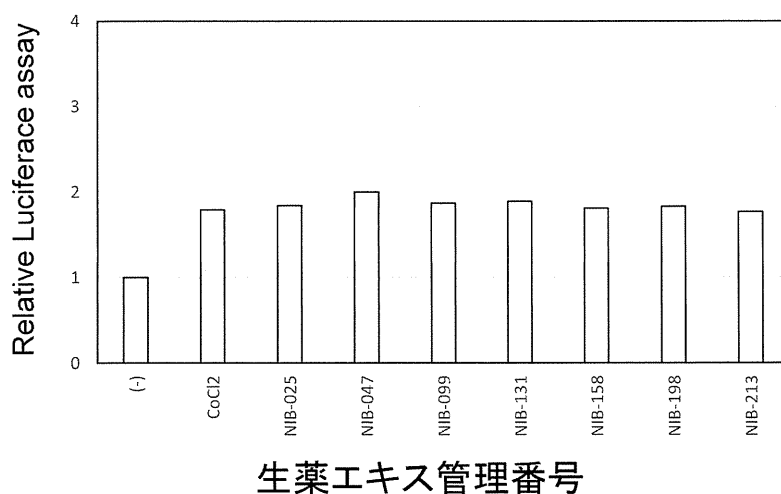


図14. シャゼンシの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

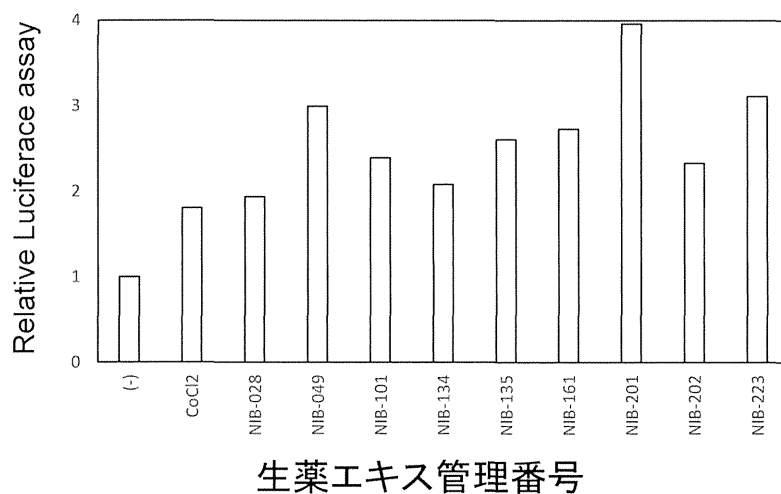


図15. ダイオウの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

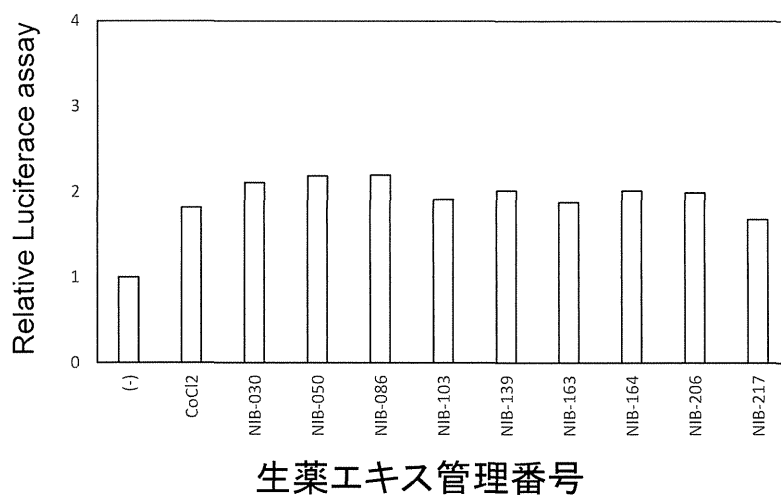


図16. ビャクジュツの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

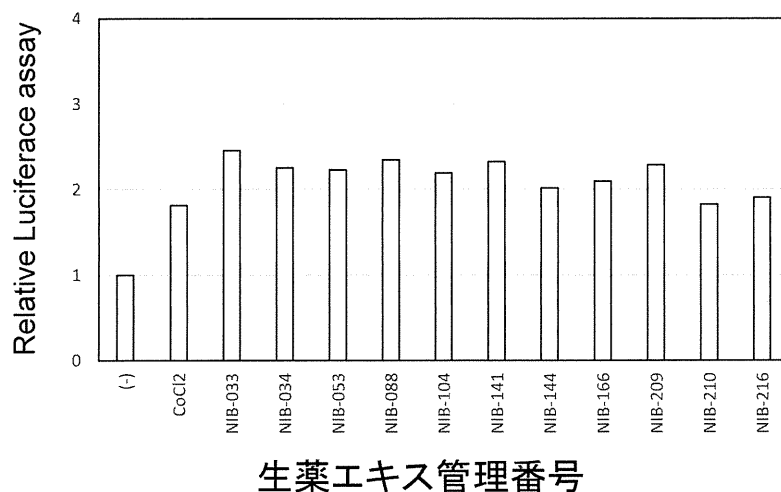


図17. マオウの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

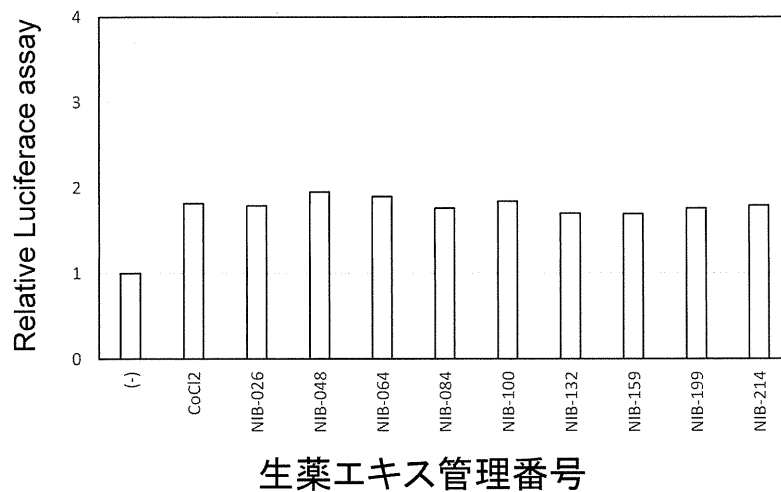


図18. センキュウの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

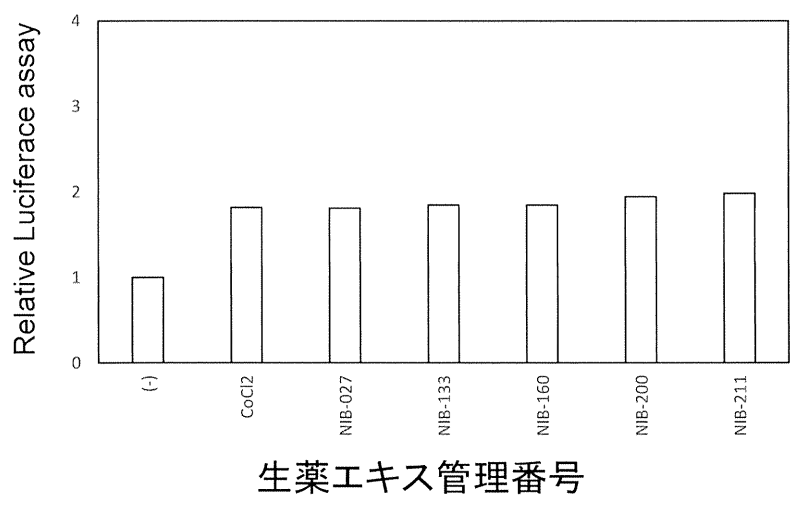


図19. ソヨウの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

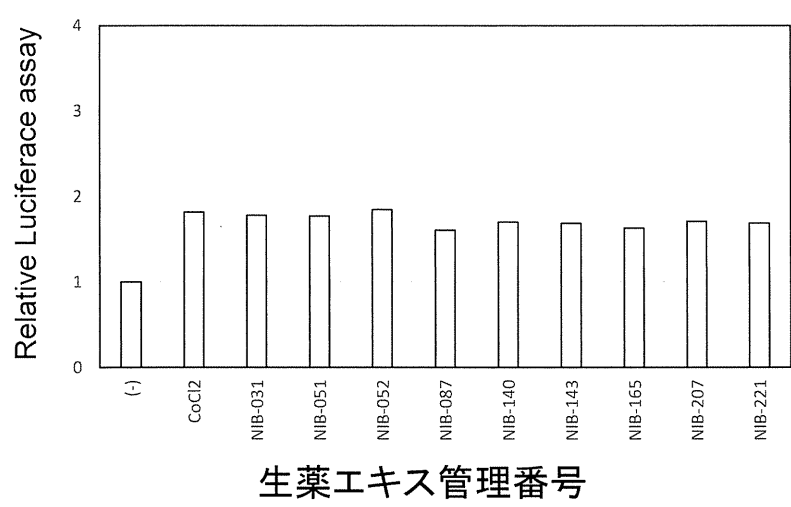


図20. ブクリョウの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

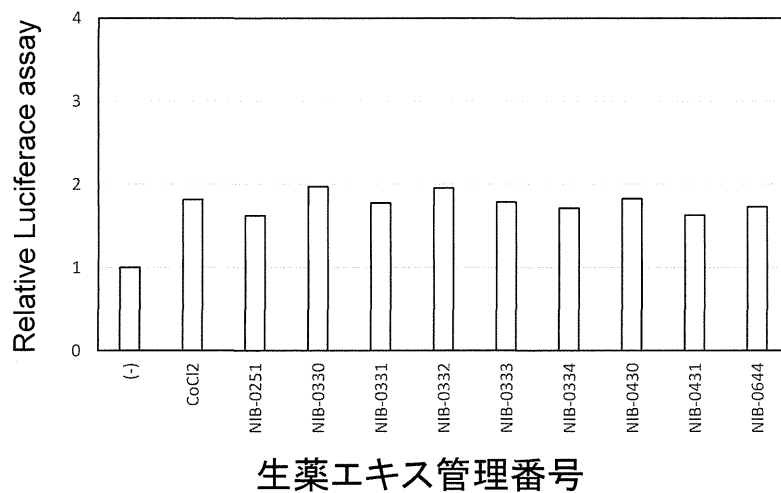


図21. ハンゲの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

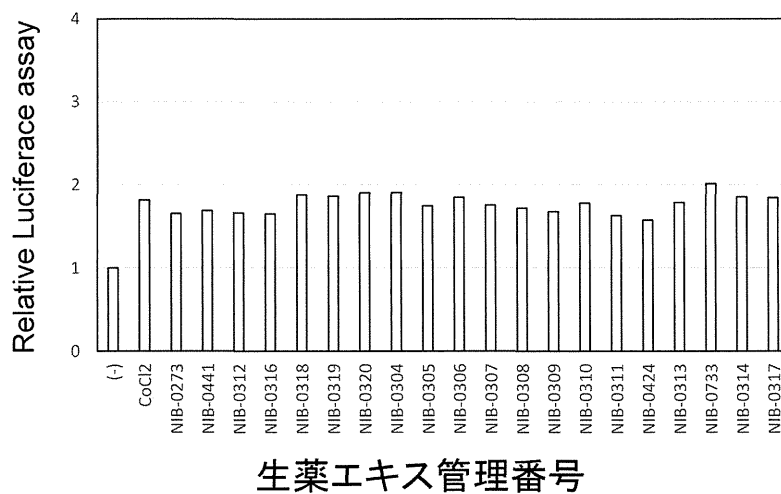


図22. サイシンの各ロットにおけるHIF-1αの転写活性化能への効果

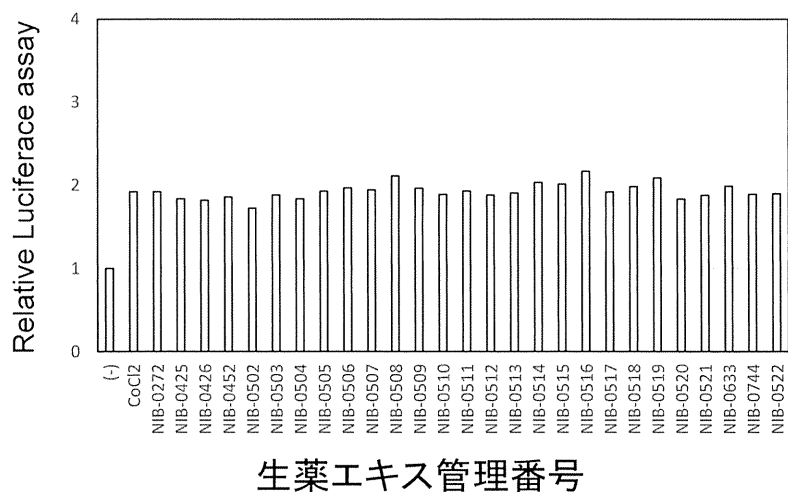


図23. キョウニンの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

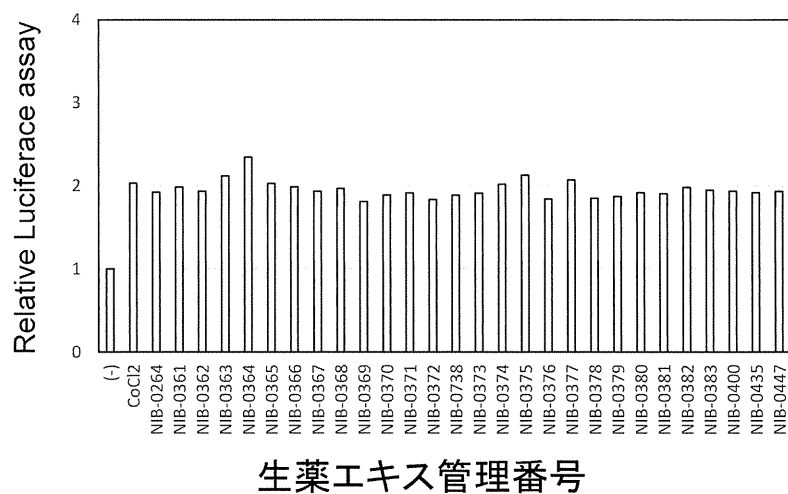


図24. タクシャの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

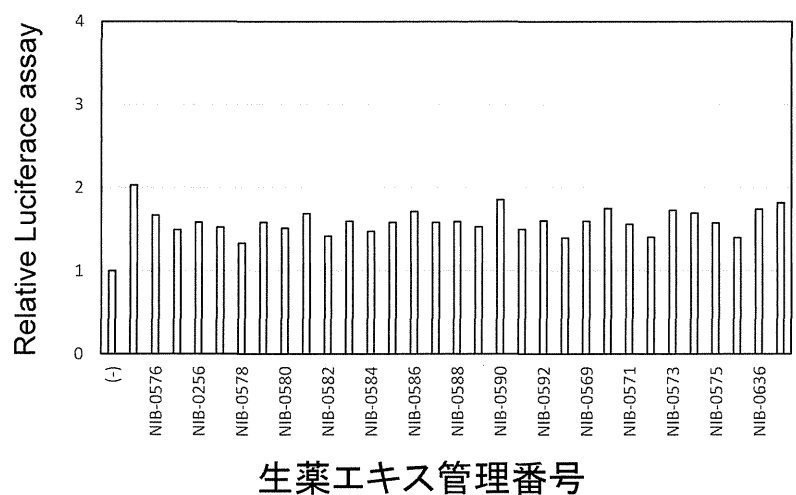


図25. ボウイの各ロットにおけるHIF-1 α の転写活性化能への効果

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 生物活性情報に関する研究
－生薬抽出エキスの抗酸化機能に関する研究－

研究分担者 大谷 克城 旭川医科大学 医学部 微生物学講座 准教授
研究協力者 菱田 敦之 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
北海道研究サブリーダー
研究協力者 渕野 裕之 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 室長

モデル試料生薬の熱水抽出エキス 6 種 118 サンプル（オウギ、チンピ、ボタンピ、ハンゲ、サイシン、キョウニン）について、抗酸化能の評価を ORAC 分析により行った。乾燥エキスの ORAC 分析の結果、今年度分析したサンプルも、抽出エキスおよびその原材料である生薬は、食素材に比べると抗酸化力が高い傾向にあった。さらに、局方品として流通している同一生薬における抗酸化力のサンプル間差が大きいことが認められた。また、特定の産地のサンプルで極端に高値を示す場合があった。今後、多変量解析をはじめ様々な解析結果との比較により活性化合物の予測や生薬の品質評価への有用性が示唆された。

A. 研究目的

薬用植物総合情報データベースの生物活性情報として、生薬の抗酸化機能を収載し、さらに、他のデータと比較解析を行うことにより、活性化合物の予測や生薬の品質評価を行うことを目的として、モデル試料生薬の抽出エキスについて抗酸化機能分析を行った。抗酸化機能の評価項目として活性酸素吸収能力 ORAC（Oxygen Radical Absorbance Capacity）について分析を行った。

B. 研究方法

1) ORAC 分析方法の概要

ラジカル発生剤である AAPH（2,2'-Azobis（2-amidinopropane）dihydrochloride：活性酸

素源）より発生したペルオキシラジカルによって、標識物質である Fluorescein が分解される過程を、Fluorescein の蛍光強度を経時的に測定し、減少する蛍光強度の曲線を描いた場合、この反応系に抗酸化物質が共存すると蛍光物質の蛍光強度の減少速度が遅延する。この原理に基づき、試料（もしくは標準物質）存在下での蛍光強度の曲線下面積（AUC: Area Under the Curve）と、非存在下（ブランク）での AUC との差（net AUC）を算出する。検体の net AUC について、濃度既知の標準物質 Trolox（ $(\pm)$ -6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid）の net AUC に対する相対値を求める。その相対値を基に Trolox 濃度に換算して検体の抗酸化