

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

漢方医学 (1996.01) 20巻1号:12~16.

各種生薬,方剤の豚表皮DNA合成と β アデニル酸シクラーゼ反応性に与える影響(2)
—G蛋白への影響も含めて—

橋本喜夫, 田村俊哉, 飯塚 一

各種生薬、方剤の豚表皮DNA合成と β アデニル酸シクラーゼ反応性に与える影響(2)

—G蛋白への影響も含めて—

橋本 喜夫, 田村 俊哉, 飯塚 一

Key Words 乾癬, 豚表皮DNA合成, β アデニル酸シクラーゼ, G蛋白,
ADPリボシル化, G2 block, G1 arrest

要旨

柴胡, 連翹など尋常性乾癬に頻用される21種の生薬と10種の方剤が豚表皮DNA合成に与える影響を豚皮膚器官培養系を用いて検討した。黄連, 黄柏, 柴胡, 連翹についてはG蛋白(Gs, Gi)のADPリボシル化についても検討した。連翹は β アデニル酸シクラーゼ反応性を増強し, 細胞周期に対してはG2

blockをきたした。これはGsを介した作用であることが推定された。

また乾癬に頻用される黄連解毒湯, 温清飲, 桂枝茯苓丸が有意にDNA合成を抑制, G1 arrestをきたしており, 乾癬への作用機序の一端がうかがえた。

緒言

慢性難治性である尋常性乾癬においては漢方療法は補助療法として重要だが, その作用機序はまったくといっていいほどわかっていない。われわれは過去¹⁾に難治性乾癬58例に温清飲, 黄連解毒湯の併用療法を試み, 有効以上39%という結果を得た。また濱田ら²⁾は, 難治性乾癬患者に温清飲と桂枝茯苓丸の併用療法を試み, さらに難治な症例には強力な駆瘀血剤である通導散を追加して有効例を得ている。

今回われわれは, 従来から報告されていた³⁾黄連などの抗炎症作用のある生薬に加えて, 桃仁, 牡丹皮など駆瘀血作用のあるといわれる生薬計21種について, 表皮DNA合成に与える影響と β -アデニル酸シクラーゼ反応性に与える影響を豚皮膚器官培養系を用いて検討した。特に黄連, 黄柏, 連翹, 柴胡についてはG蛋白(Gs, Gi)のADPリボシル化を検討した。さらに黄連

解毒湯, 温清飲, 桂枝茯苓丸など頻用される10種類の方剤でもDNA合成と細胞周期に与える影響を検討してみた。

方法

1)材料: 豚背部からCastroviejo keratomeを用いて0.2mmの厚さの皮膚を採取し, 5mm角の皮膚片を多数作成し, 実験に供した。生薬は黄連, 黄柏, 黄芩, 柴胡, 人参, 連翹, 荊芥, 当帰, 山梔子, 桔梗, 川芎, 甘草, 芍薬, 蒼朮, 半夏, 麻黄, 桃仁, 茯苓, 牡丹皮, 桂枝の21種である。これらの生薬をRPMI1640培養液に500 μ g/mlの濃度になるように添加し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ in airの条件下で6時間浮遊培養し, 各種生薬の作用を検討した。使用した方剤は黄連解毒湯, 温清飲, 桂枝茯苓丸, 小柴胡湯, 葛根湯, 十味敗毒湯, 猪苓湯, 十全大補湯, 四物湯, 茵陳五苓散の10種である。これらの生薬, 方剤のエキス原末は(株)ツムラから供与されたものを使用した。

2)³H-thymidine取り込み: Taylorらの方法⁴⁾を用い

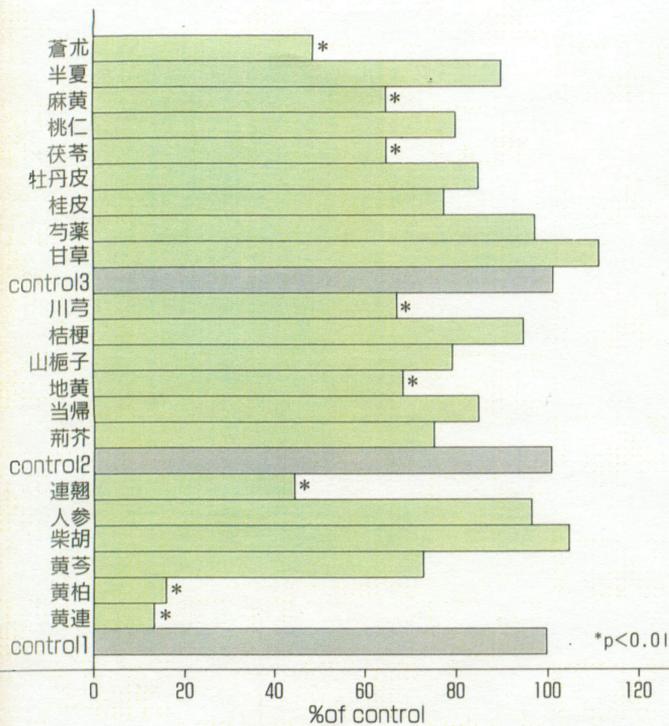


図1 各種生薬のサイミジン取り込みに与える影響

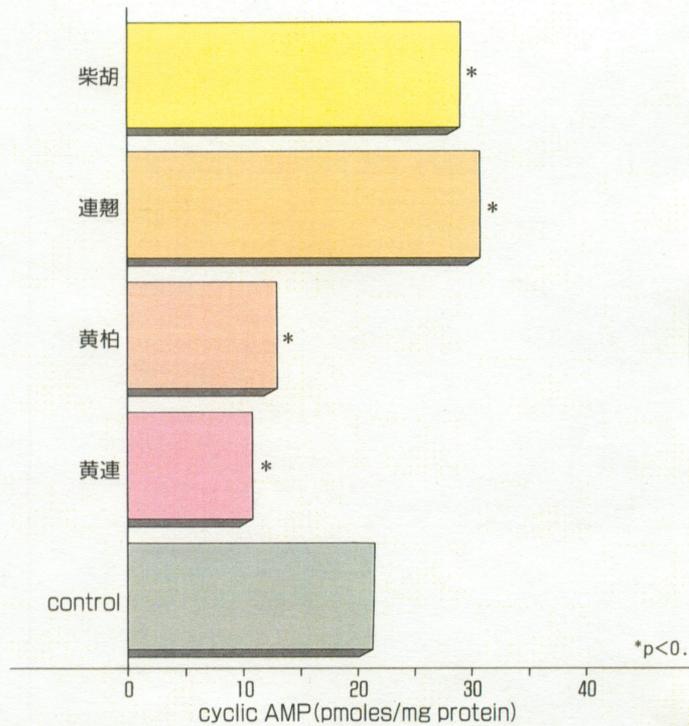


図2 各種生薬のβアデニル酸シクラーゼ反応性を与える影響

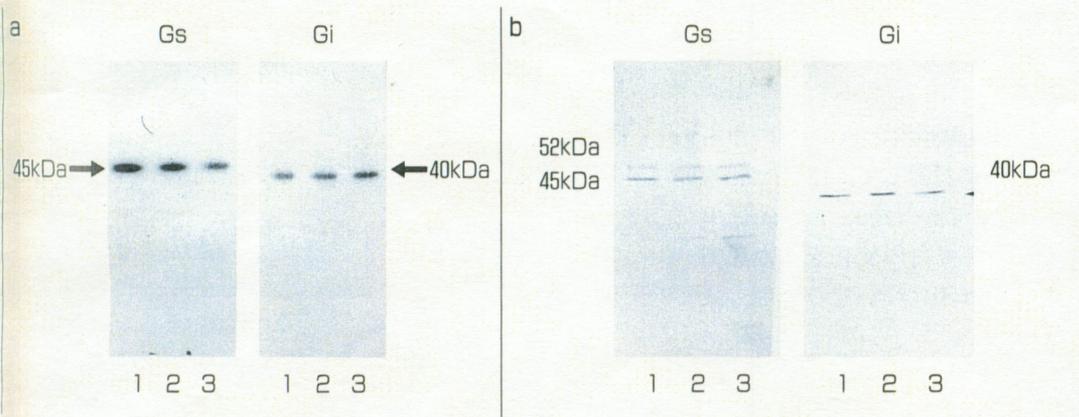


図3
a ADP-ribosylation
b Immunoblot

1: control
2: 黄連
3: 黄柏

た。

3) DNA-flow cytometry: 既報⁵⁾に従って, dispaseで純粋表皮にした後に主にペプシンで分散し, EPICS ELiteで 1×10^4 個測定した。

4) cAMP assay: Yoshikawaら⁶⁾の方法で, cAMPを抽出, 除蛋白後, YAMASAのcAMP kitを用い, radioimmunoassayにより定量した。

5) ADPリボシル化, Western blotting: それぞれ既報⁷⁾に従って行った。³²PでラベルしたNADを基質にしてGsについてはコレラ毒素, GiについてはIAP(百日咳毒素)を用いて, ADPリボシル化反応を検出した。

結果

豚表皮のthymidine取り込みに対する21種の生薬の影響を図1に示す。黄連, 黄柏, 連翹, 川芎, 地黄, 茯苓, 蒼朮, 麻黄の8生薬が有意に抑制作用を示した。特に黄連, 黄柏が対照の30%以下, 連翹が50%以下と著明な抑制効果がみられ, これらの反応は可逆的であり, 単純な細胞毒性ではないことはすでに報告³⁾した。しかしながら, 駆瘀血剤の代表である桃仁, 牡丹皮にはDNA合成抑制作用はみられなかった。

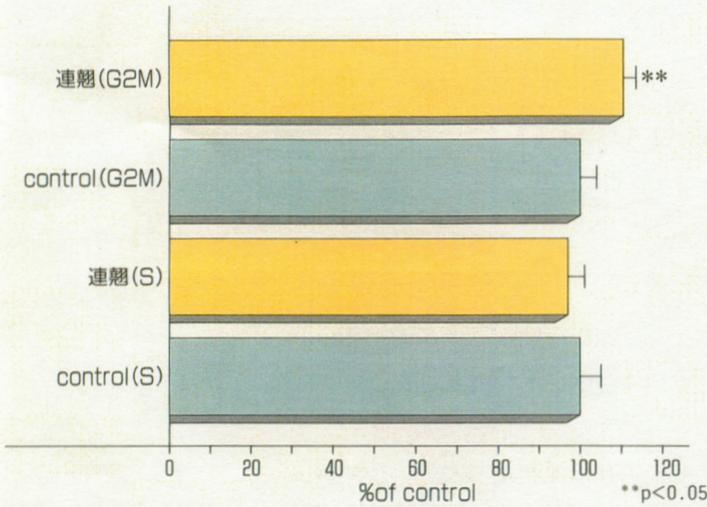


図4 連翹の豚表皮cell cycleに与える影響

図2はβアデニル酸シクラーゼ反応性に対し、黄連、黄柏、連翹、柴胡についてみたものだが、連翹、柴胡ではβアドレナリン反応性の増強(β-augmentation)がみられ、黄連、黄柏ではむしろ低下していた。黄連、黄柏の6時間処理ではいずれもG蛋白のADPリボシル化には変化がみられない(図3a)。同様にGsa, Giaに対する抗体を用いたimmunoblotでも変化はみられなかった(図3b)。

図4はDNA-FCMでみた連翹のcell cycleへの作用だが、黄連がG1集積だった³⁾のに対して、連翹はG2蓄積が認められた。そこで同じくβ-augmentation作用がみられた柴胡とともに、G蛋白の変化をみた(図5 a)。ADPリボシル化反応ではGiについては連翹、柴

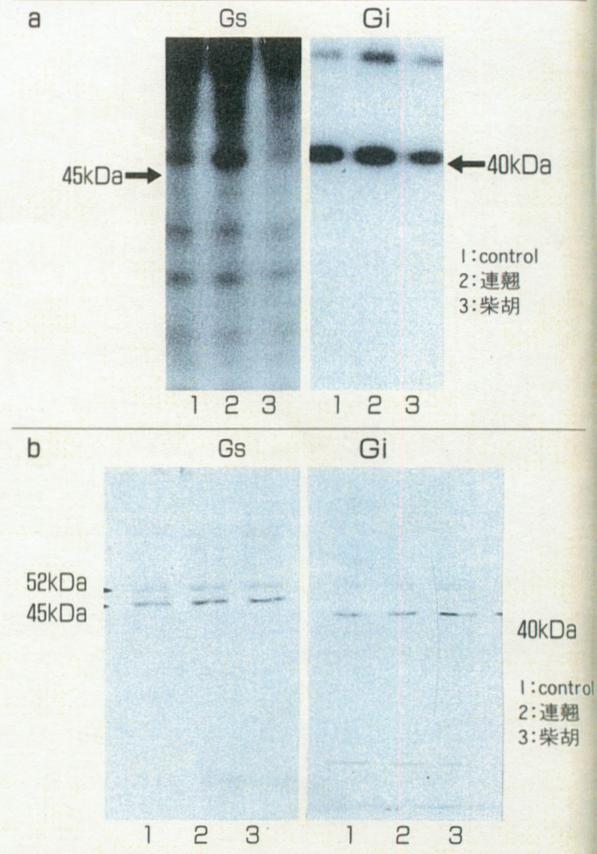


図5
a ADP-ribosylation
b Immunoblot

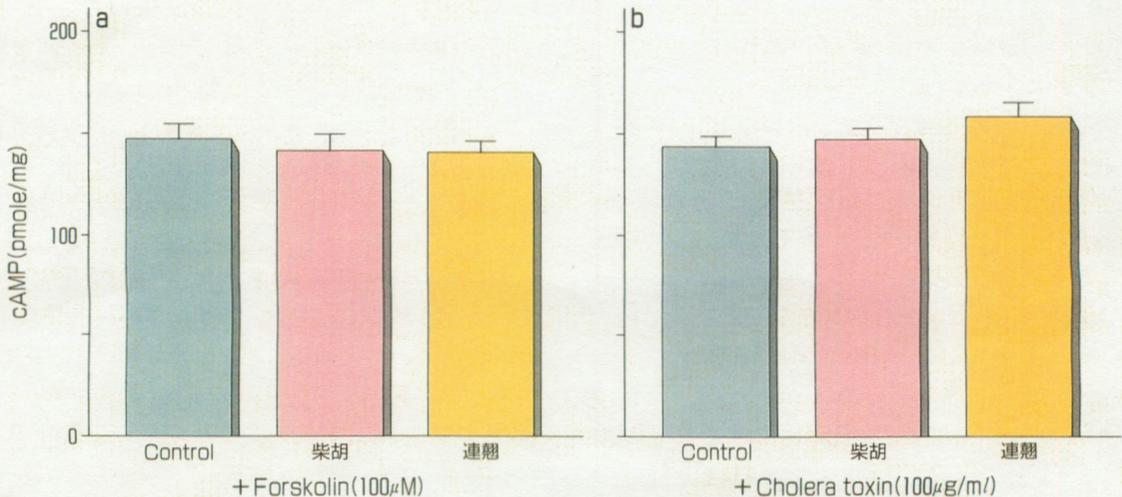


図6 柴胡、連翹のβ反応性に与える影響(a: フォルスコリン前処理, b: コレラトキシン前処理)

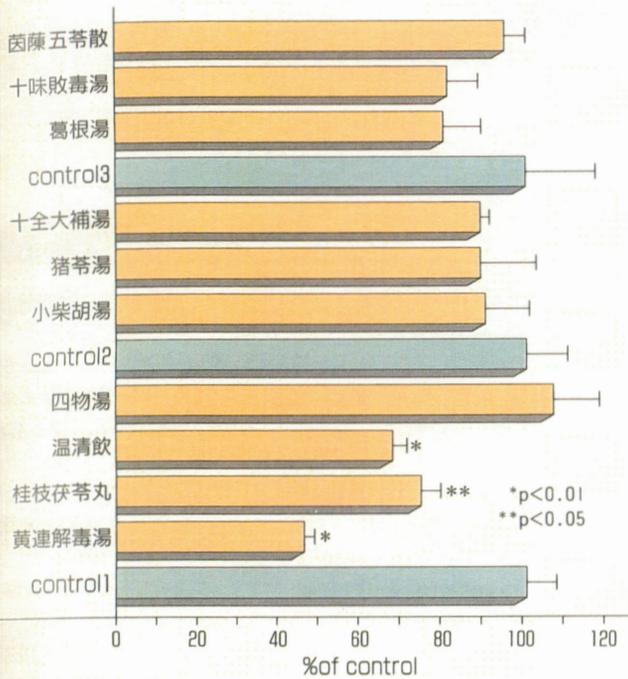


図7 各種方剤の豚表皮サイミジン取り込みに与える影響

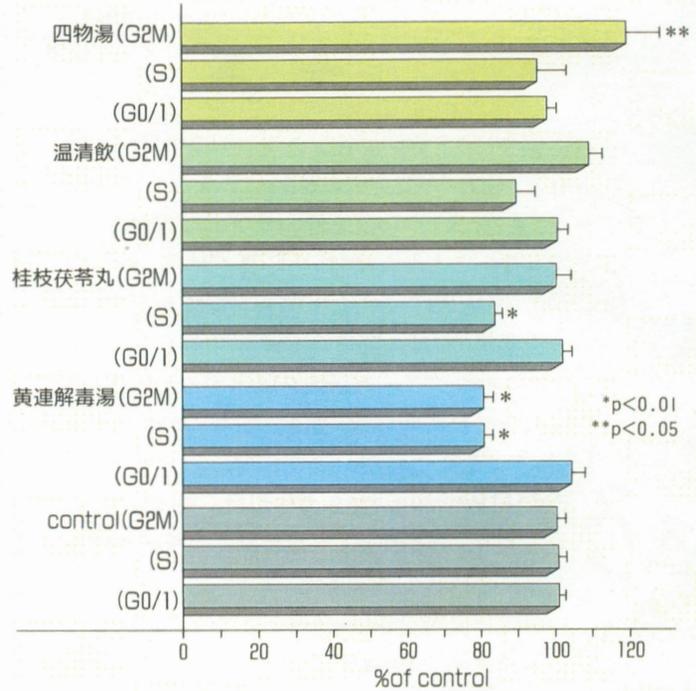


図8 各種方剤の豚表皮cell cycleに与える影響

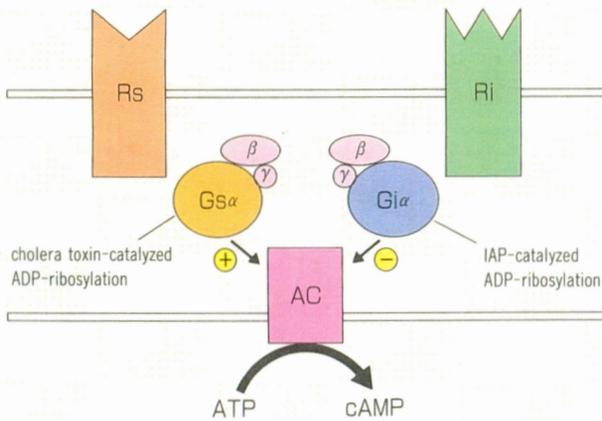


図9 表皮のβアデニル酸シクラーゼ系

胡, 対照ともに40kDに同程度のバンドが検出されたが, Gsでは連翹処理により, 45kDのバンドの増強がみられた。しかしながらimmunoblotによる検討では変化はみられなかった(図5b)。

促進性G蛋白(Gs)を直接刺激する薬剤にコレラ毒素があり, AC(アデニル酸シクラーゼ)を直接刺激する薬剤にフォルスコリンがある。従って, これらの薬剤によるcAMPの産生をみることで, βアデニル酸シクラーゼ系の後半部分(G-AC)をモニターできる。まず, 生薬を6時間処理した後, フォルスコリンを2時間処理してcAMP産生をみた(図6a)。対照, 柴胡, 連翹, い

ずれも有意差はなかった。Gsを直接刺激するコレラ毒素の影響は連翹処理した皮膚で幾分cAMPの産生増強がみられたが, 統計的有意差はみられなかった(図6b)。

次に方剤単位のthymidine取り込みに与える影響をみた(図7)。濃度は1000μg/mlで, 6時間処理した。乾癬に頻用される黄連解毒湯, 温清飲, 桂枝茯苓丸に抑制効果が著明であった。黄連解毒湯と四物湯の合方である温清飲がちょうど両者の中間の抑制作用がみられた。cell cycleに対する作用では黄連解毒湯のS期, G2M期分画の低下作用と, 桂枝茯苓丸のS期分画低下作

用に有意差がみられた(図8).

考 案

図9に β アデニル酸シクラーゼ系のR(receptor), G(Gs, Gi), AC(アデニル酸シクラーゼ)の関係を示した. 黄連, 黄柏の β 反応性の低下はG蛋白の変化を介していないことから(図3a, b), R-Gの間, もしくはACそのものに影響をきたしている可能性が示唆される.

上馬場⁸⁾らは, 黄連の1成分であるベルベリンがアデニル酸シクラーゼ活性を阻害すると報告している. また今回の結果から, 連翹のcell cycleへの影響はG2blockであることが示唆された. アドレナリンを介したcAMPのcell cycleへの作用は, 従来G2blockといわれており, 連翹が β アドレナリン反応性の増強を示した結果と合わせ興味深い.

連翹はphosphodiesteraseを阻害してcAMP濃度を上昇させると報告⁹⁾されているが, 今回の実験系はphosphodiesterase inhibitorであるIBMX存在下で行っており, β アデニル酸シクラーゼを直接介した機序も考えられた. そこでG蛋白の関与も検討したところ, 図5, 6で示したように連翹処理によりGsのADPリボシル化の軽度増強と, ACを直接刺激するコレラ毒素によってcAMP産生の増強が幾分みられたことから, 連翹の β アドレナリン反応性の増強はGsを介している可能性が示唆された. また連翹のDNA合成抑制作用はcAMPによるG2blockと推定される.

さらに今回の結果から乾癬に頻用される黄連解毒湯, 温清飲, 桂枝茯苓丸にのみDNA合成抑制効果がみら

れ, それぞれS期低下が確認され, G1 arrestと考えられる. このことは, これら方剤の乾癬における作用機序の一端を示すのかもしれない.

●文 献

- 1) 大河原 章: 皮膚科疾患における漢方治療の現況. 皮膚科における漢方治療の現況2, p3~14, 医学書院, 1991
- 2) 濱田稔夫, 石井正光, 高橋邦明: 乾癬の漢方治療. 漢方の最新治療, 4: 21~24, 1995
- 3) 橋本喜夫, 筒井真人, 松尾忍, 他: 各種生薬の豚表皮DNA合成とcyclicAMP β アドレナリン反応性に与える影響—特に黄連の作用を中心に—. 漢方医学, 17: 378~382, 1993
- 4) Taylor JR, Halprin KM, Levine V: Inhibitors of epidermal cell DNA synthesis in surviving pig skin *in vitro*. J Invest Dermatol, 74: 125~130, 1980
- 5) Hashimoto Y, Tsutsui M, Iizuka H: Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: Effects of tape stripping. J Dermatol Sci, 4: 193~201, 1992
- 6) Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, et al: The effects of catecholamine and related compounds on the adenylate cyclase system in the epidermis. Br J Dermatol, 93: 29~36, 1975
- 7) Tsutsui M, Iizuka H: Inhibitory guanine nucleotide binding protein in pig epidermis: regulation of epidermal adenylate cyclase. Arch Dermatol Res, 282: 469~474, 1990
- 8) 上馬場和夫, 丁 宗鐵, 荒川和男, 他: ベルベリンのアドレナリンシクラーゼ阻害活性. 現代東洋医学, 4: 88~90, 1983
- 9) Nikaido T, Ohmoto T, Kinoshita T, et al: Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by Lignans. Chem Pharm Bull, 29: 3586, 1981