

論 文 要 旨

Japanese herbal medicine, inchinkoto, inhibits inducible nitric oxide synthase

induction in interleukin-1 β -stimulated hepatocytes

(漢方薬茵陳蒿湯の interleukin-1 β による障害肝細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素阻害)

関西医科大学医化学講座
(指導：伊藤誠二 教授)

松浦 節

【目的】私達は肝障害動物モデルを用いて、「肝保護効果」を持つ様々な薬剤が炎症性メディエーターの産生を抑制し、同時に肝臓の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を阻害することを報告した。iNOS 由来の過剰な一酸化窒素 (NO) 産生は肝障害因子の一つと考えられている。従って、iNOS 遺伝子の発現誘導を阻害する薬剤には「肝保護効果」を持つ可能性が示唆された。動物モデルの代わりに、ラット初代培養肝細胞を炎症性サイトカインで刺激して iNOS 誘導を促進した *in vitro* 系においても、上述の薬剤は iNOS 誘導を強く阻害した。近年、漢方薬の有効性が再認識され、消化器外科領域でも補完代替医療としての利用度が急速に高まっている。しかし、その効果は科学的エビデンスに乏しいのが現状である。茵陳蒿湯 (inchinkoto, TJ-135) はインチンコウ (*A. capillaris*)、サンシシ (*G. fructus*)、ダイオウ (*R. rhizome*) の 3 種類の生薬からなる漢方薬で、従来黄疸の改善に使用されてきたが、利胆作用だけでなく抗炎症作用や解熱作用、利尿作用など様々な効用をもつ薬剤である。実際の臨床では肝機能改善、肝細胞保護にも働くと推察される症例報告が散見される。本研究では、*in vitro* 系を用い、iNOS 誘導に対する阻害を指標にして、TJ-135 の「肝保護効果」を検討し、さらにそのメカニズムを解析した。

【方法】肝細胞はラット肝臓 (Wistar 系雄性、200-250 g) よりコラゲナーゼ灌流と低速遠心にて分離し、5% CO₂ インキュベーター (37°C) にて培養した。初代培養肝細胞 (10⁶ cells/35 mm dish) を茵陳蒿湯 (TJ-135、(株) ツムラ) の存在、非存在化に炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 β (1 nM) で刺激し、iNOS 誘導と NO 産生、さらにその誘導経路におよぼす影響を解析した。

【結果】肝細胞を IL-1 β で刺激すると iNOS の誘導を促進し NO 産生を増加させた。IL-1 β と TJ-135 (0.5-3 mg/ml) を同時に添加すると、NO の産生が濃度および時間依存性に減少した (最大効果; >90% 阻害、3 mg/ml)。TJ-135 は iNOS タンパク質および iNOS mRNA の発現を抑制した。培養液中の LDH 遊離を測定したが、TJ-135 は使用した濃度下では細胞障害を示さなかった。IkB kinase を介した IkB/NF- κ B 活性化経路において、TJ-135 は IkB 分解には影響をおよぼさなかったが、NF- κ B subunit p65 の mRNA およびタンパク質の発現を抑制した。核抽出物を用いた western blotting/gel shift assay 実験より、TJ-135 は転写因子 NF- κ B の核移行を抑制しその DNA 結合を阻害することが明らかとなった。iNOS 誘導のもう一方の重要なシグナル経路である phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt を介した I 型 IL-1 receptor (IL-1R I) の upregulation では、Akt のリン酸化 (活性化) を抑制し IL-1RI の mRNA・タンパク質レベルの増加を阻害した。iNOS promoter-luciferase construct を用いた transfection 実験より、TJ-135 は iNOS promoter 活性化と iNOS mRNA 安定化をいずれも阻害した。さらに、後者の mRNA 安定化に関与する iNOS gene antisense 転写物の発現を抑制した。TJ-135 は IL-1 β 刺激の後 (1-4 h) に加えても、また途中で除去しても iNOS 誘導を阻害した。最後に TJ-135 を構成する 3 種の生薬 *A. capillaris*、*G. fructus*、*R. rhizome* がそれぞれ iNOS/NO 産生に及ぼす効果を検討した。*R. rhizome* は濃度を上げると細胞障害をきたし、阻害効果も認めなかった。*A. capillaris*、*G. fructus* はいずれ

れも iNOS/NO 産生を濃度依存性に阻害し、*A. capillaris* がより高い効果を示した。

【結論】 TJ-135 は iNOS 誘導を転写 (mRNA 合成) と転写後調節 (mRNA 安定化) の両段階で抑制し、NO 産生を阻害した。TJ-135 は iNOS 誘導を介した様々な肝障害の軽減治療に貢献する可能性が高い。