

アロエシンやアロエマンナンなどの抗炎症作用^aとタンシノン VI の心臓に及ぼす作用^b八木 晟,^{*,a} 竹尾 聡^b**Anti-inflammatory Constituents, Aloesin and Aloemmannan in *Aloe* Species and Effects of Tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on Heart**Akira YAGI^{*,a} and Satoshi TAKEO^b

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University,^a 985 Gakuen-cho, Fukuyama 729-0292, Japan, and Department of Pharmacology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,^b 1432-1 Horinouchi, Hachioji 192-0392, Japan

(Received March 17, 2003)

Cinnamoyl, *p*-coumaroyl, feruloyl, caffeoyl aloesin, and related compounds were isolated from *Aloe* species. The antiinflammatory and antioxidative activities of these compounds were examined based on the structure-activity relationship. It was suggested that the bioactivities may link to acyl ester groups in aloesin, together with those of aloesin-related compounds. However, investigations using the contact hypersensitivity response indicated a preventive effect of aloesin on the UV-B-induced immune suppression. Furthermore, aloesin inhibited tyrosine hydroxylase and dihydroxyphenylalanine (DOPA) oxidase activities of tyrosinase from normal human melanocyte cell lysates. These results show that aloesin prevents not only UV-B-induced immune suppression, but also could be a positive pigment-altering agent for cosmetic application. In preclinical study, aloe extract was investigated using phagocytosis and nitroblue tetrazolium chloride (NBT) reduction in adult bronchial asthma, and high molecular-weight materials, such as polysaccharide and glycoprotein fractions, were identified as active ingredients. The neutral polysaccharides, aloemmannan and acemannan showed antitumor, antiinflammatory and immunosuppressive activities, and glycoprotein fractions with bradykinin-degrading and cell proliferation-stimulating activities were identified from the nondialysate fraction of the gel part of *Aloe* species. Verectin fractionated from *Aloe vera* gel was examined biochemically and immunochemically, and verectin antibody was used in the appraisal of commercial *Aloe vera* gel products. It was reported that aloesin stimulates the proliferation of cultured human hepatoma SK-Hep 1 cells. Thus aloesin, related compounds, and high molecular-weight materials, such as aloemmannan and verectin, may act in concert to exert therapeutic properties for wounds, burns and inflammation. The biodisposition of fluoresceinylisothiocyanate (FITC)-labeled aloemmannan (FITC-AM) with the homogenate from some organs in mice was demonstrated, and FITC-AM was metabolized to a smaller molecule (MW 3000) by the large intestinal microflora in feces. The modified aloe polysaccharide (MW: 80000) with cellulase under restricted conditions, immunologically stimulated the recovery of UV-B-induced tissue injury. Thus the modified polysaccharides of aloemmannan, together with acemannan (MW: about 600000), are expected to participate in biological activity following oral administration. The effects of tanshinone VI, a diterpenoid isolated from *Salvia miltiorrhiza*, on the heart are reviewed. First, the effects on the posthypoxic recovery of contractile function of perfused rat hearts were examined. Hypoxia/reoxygenation induced a release of purine nucleosides and bases (ATP metabolites) and resulted in little recovery of contractile force of reoxygenated hearts. Pretreatment of the perfused heart with 42 nM tanshinone VI under hypoxic conditions attenuated the release of ATP metabolites during hypoxia/reoxygenation. Treatment with tanshinone VI enhanced the posthypoxic recovery of myocardial contractility. These results show that tanshinone VI may protect the heart against hypoxia/reoxygenation injury and improve the posthypoxic cardiac function. Second, the effects of tanshinone VI on *in vitro* myocardial remodeling were examined. Cardiomyocytes and cardiac fibroblasts were isolated from neonatal rat hearts, and simultaneously prepared insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induced the hypertrophy of cardiomyocytes. IGF-1 increased the collagen synthesis of cardiac fibroblasts, that is, *in vitro* fibrosis. The hypertrophy of cardiomyocytes was attenuated in the presence of tanshinone VI in the culture medium. The fibrosis of cardiac fibroblasts was decreased by treatment with tanshinone VI. When tanshinone VI was added to cardiac fibroblast-conditioned medium, the medium-mediated hypertrophy of cardiomyocytes was also attenuated. These

^a福山大学薬学部生薬学教室 (〒729-0292 福山市学園町 985), ^b東京薬科大学薬学部第一薬理学教室 (〒192-0392 八王子市堀の内 1432-1)

e-mail: yagi@fupharm.fukuyama-u.ac.jp

*本総説は平成 14 年度退官にあたり、在職中の業績を中心に記述されたものである。

results show that tanshinone VI may attenuate *in vitro* cardiac remodeling. The series of studies has shown that tanshinone VI protects the myocardium against hypoxia/reoxygenation injury and attenuates progression of *in vitro* myocardial remodeling, suggesting that tanshinone VI is a possible agent for the treatment of cardiac disease with contractile failure.

Key words—aloesin; antiinflammation; aloemannan; verectin; cell proliferation-stimulating activity; hypoxia/reoxygenation injury; myocardial remodeling; tanshinone VI

はじめに

健康補助食品としてのアロエベラ・ゲルの有用性と含有有効成分については、最新の総説^{1,2)}で述べた。本論文ではアロエの活性成分のうち低分子化合物としてアロエシンとその関連化合物、及び高分子画分としてアロエマンナンと糖蛋白について、著者(八木)が在籍していた九大薬学部(西岡五夫教授)で1970年から現在(福山大学薬学部, 2002年)まで継続して行った研究成果を述べる。また、心筋梗塞や狭心症など虚血性心疾患病態モデルに対する活性天然物の検索から選出された、中国で広く駆瘀血薬の1つとして用いられている丹参(漢方処方名: 冠心2号方や冠元顆粒)について、その含有タンシノン化合物の構造・活性相関は総説³⁾で述べた。本論文では東京薬大・第一薬理学教室(竹尾聰教授)との共同研究で、現在継続中のタンシノン VI の心臓に及ぼす作用を述べる。

1. 低分子化合物, アロエシンとその関連化合物について

アロエシンの構造解析はアロエ属植物から下剤活性を示す黄色粉末アロインが分離された時に始まる。アロインに混在する樹脂物質アロエレシン(aloesin)の構造は、アロインから単離されたバルバロインの構造が当時としては新規のC-配糖体であることが判明したことに続いて、C-配糖体構造を持つクロモン化合物であると決定された。私どもはキダチアロエの新鮮葉からアロエシンの糖のC₂位に *p*-coumaroyl と feruloyl 基を持つエステル類を単離し、エステル結合位を決定した。⁴⁾

キダチアロエ葉エキスが育毛や美白効果を示すことは古くから知られていて、頭髮シャンプーや美白料の原料として用いられ、その主たる有効成分はバルバロインとされていた。私どもはメラニン(Eumelanin や Pheo-melanin) がチロシンからチロシナーゼにより、DOPA を経て皮膚メラノサイトで形成される過程でアロエシンとその関連化合物が、

バルバロインと同様チロシナーゼ活性を阻害することを見出した。⁵⁾ アロエベラ葉についても同様の研究を行い、アロエシンのフェノール基がメチル化され、糖のC₂位が *p*-coumaroyl 基でエステル化されかつ、側鎖のカルボニル基が還元された isoaloesin D (S-配位をC₁₀位に持つ)を単離し、一連の isoaloesin D 関連化合物のチロシナーゼ阻害活性を検討した(Figs. 1, 2)。⁶⁻⁸⁾

Lee K. らはアロエベラ葉からC₁₀位の配位不明の aloeresin D について、ラット脳ホモゲネートを用いた脂質過酸化反応やラット肝マイクロソームを用いた free radical assay を行い、この化合物に α -tocopherol と同等の抗酸化活性を認めた。⁹⁾ さらに、Hutter らはアロエシンのC₁₀位がR配位で、糖の2'位に cinnamoyl 基がエステル結合し、かつフェノール基がメチル化された化合物を単離し、この化合物の200 μ g/mouse ear でのマウス耳介部への経皮吸収で、ハイドロコチゾンの200 μ g/mouse ear と同等の抗炎症効果を得た。¹⁰⁾

以上のアロエシン関連化合物の抗酸化・抗炎症活性はアロエシンの cinnamoyl, feruloyl, *p*-coumaroyl 基による寄与と推定されるかもしれない。しかしながら、アロエシン自体にも以下に示すような直接メラニン形成を阻止したり、紫外線によって誘導される免疫抑制の予防効果があることが証明された。

無色粉末のアロエシンは主にアロエ・ゲル部に存在し、メラニン形成を阻害する水溶性成分である。黄色のフラボノイドやアルブチン、コウジ酸などのメラニン形成阻害剤と違ってアロエシンは毒性(2 g/kg 濃度)がなく、変異原性(アルブチンやコウジ酸の例)や皮膚刺激性(コウジ酸の例)も全くないチロシナーゼ阻害剤(IC₅₀ 193 μ M)でL-dihydroxyphenylalanine に対し非競合的な阻害形式を示す(Tables 1, 2)。

マウス B₁₆F1 メラノーマ細胞を用いた *in vitro* 実験で、アロエシンは酵素反応の過程で着色物質に変

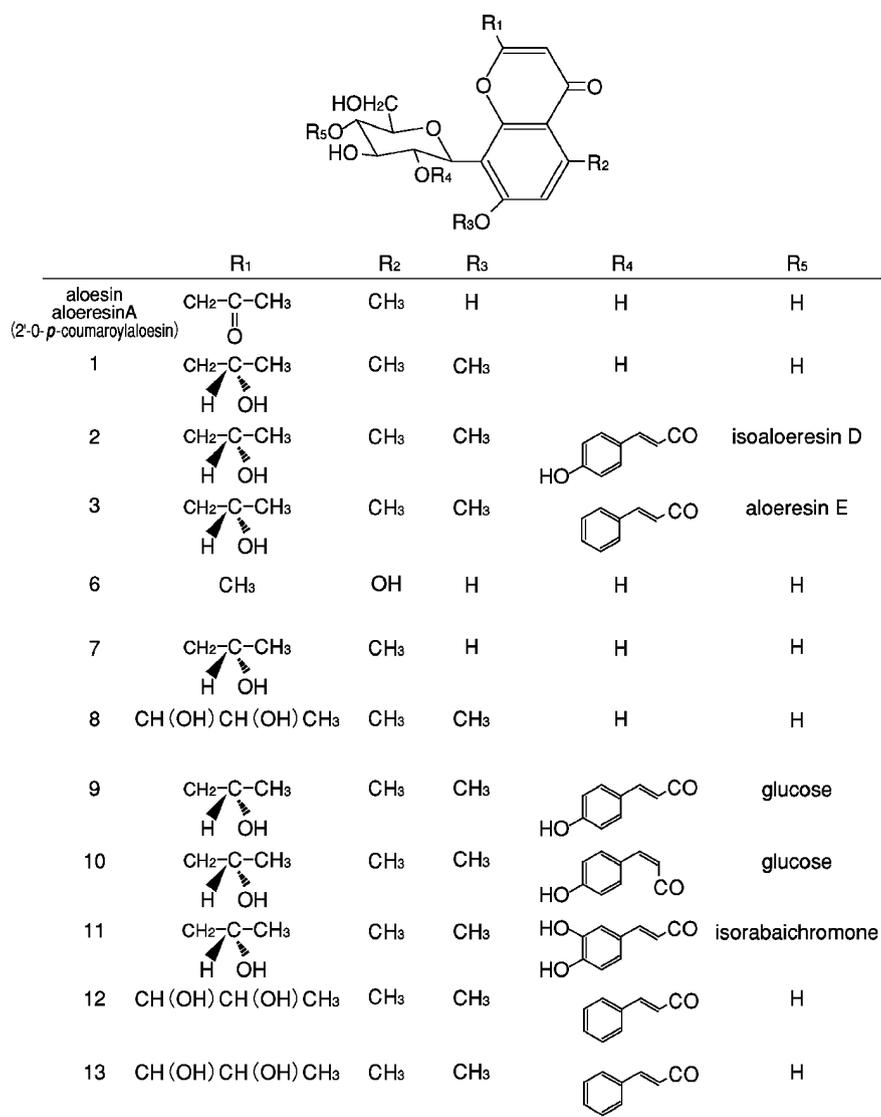


Fig. 1. Structure of Aloesin and the Related Compounds

Table 1. *In vitro* Inhibition of Various Tyrosinase Enzymes by Aloesin and Other Putative Pigment Modulators

| IG ₅₀ (mM) | | | |
|-----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|
| Inhibitor | Mushroom ^{a)} | Murine ^{b)} | Human ^{c)} |
| Arbutin | 11.13 | 0.205 | 3.02 |
| Aloesin | 0.193 | 0.167 | 0.71 |
| Kojic acid | 0.010 | 0.131 | 0.41 |

A summary of results from *in vitro* (mushroom), cell lysate (human melanocytes) and *in situ* (murine) assays.

^{a)} Mushroom: One unit tyrosinase activity = ΔA_{280} of 0.001 per min at pH 6.5 at 25° in 3 ml reaction mix containing L-tyrosine (Sigma Chemical Co.), ^{b)} Murine B16 melanoma cells (ATCC # CRL 6323), ^{c)} Human primary melanocytes (lysate), African-American donor (University of Cincinnati).

Table 2. Percutaneous Absorption of Aloesin by Human Cadaver Skin and Franz Diffusion Cells

| Absorption and mass balance (% of dose) | |
|---|---------------|
| Total absorbed | 0.021 ± 0.027 |
| Dermis | 0.086 ± 0.047 |
| Epidermis | 1.480 ± 0.393 |
| Surface wash | 88.56 ± 14.47 |
| Total recovery | 90.15 ± 14.15 |

Aloesin applied in a finite dose to human cadaver skin. Results for cumulative penetration in 32 h are shown.

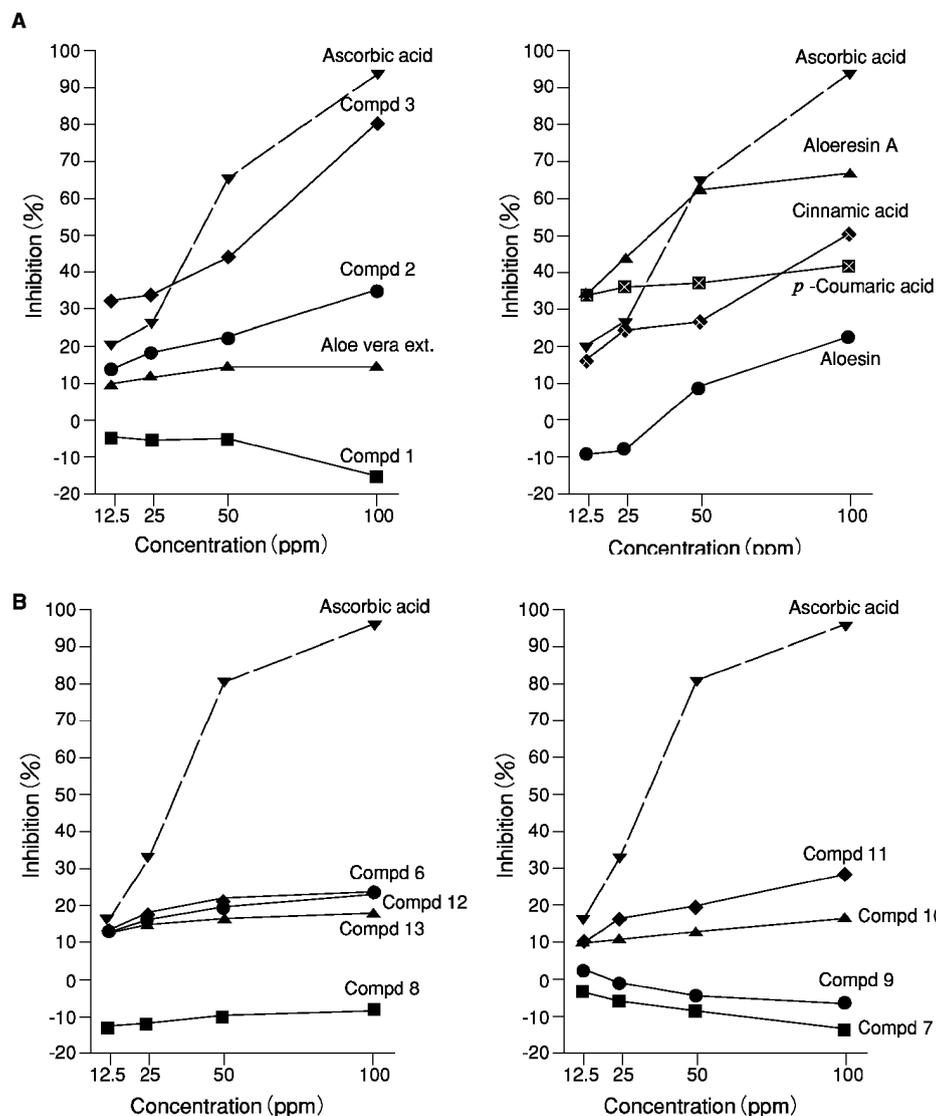


Fig. 2. Anti-tyrosinase Activity

A: Inhibitory action of compounds 1–3, aloesin, *p*-coumaroylaloesin and ascorbic acids against tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase. B: Inhibitory action of compounds 6–13 and ascorbic acid against tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase.

化して、吸光度測定を妨害した。そこで、 ^{14}C -チオウラシルを用いたメラニン形成阻害測定を行い、有意な活性が認められた (Fig. 3)。

そして、アロエシンは B_{16} 細胞を用いた実験でメラニンの生成を減量し、かつ呈色透明度も増加して、結果としてメラニンの重合を阻止することが証明された。アロエシンは水溶性であるので皮膚での透過性に乏しい。したがって、リポゾームを形成することでアロエシンの皮膚からの透過は増加した。このことはアロエシンを誘導体化した化合物の B_{16} 細胞を用いた *in situ* 実験でも証明された。さらに、アジア系のヒトの皮膚を用いた臨床実験は、ア

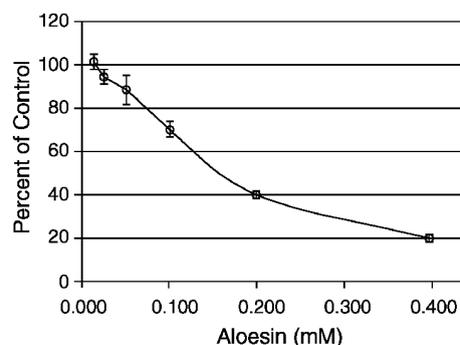


Fig. 3. Effect of Aloesin on Melanin Formation *In Situ*
Murine melanoma cells were treated with aloesin for five days. Melanin production was stimulated with α -MSH.

ロエシンとそのリポゾーム体がメラニン形成を阻害した。アロエシン 1 mg のアルコール溶液はヒト死体の足表皮組織（厚さ 0.25 mm）を用いた実験で、32 時間内に外皮へ 1.48%、内皮へ 0.086% 侵入した。同様な吸収実験は 1% アロエシンを含む親水パッチを作製し、スキン III 型（アジア系人々）での皮膚（内腕上皮）を用いた臨床テストでも試みられ、処置 3 週目から有意差が認められた。アロエシンの美白効果が期待される（Table 2）。¹¹⁾

ところで、抗炎症効果を示すアロエベラゲル部に、紫外線（UV-B）によって誘導される接触過敏反応の抑制を示す予防効果があることは既に認められていた。¹²⁾ そこで、福安らはアロエベラ近縁の *A. androgenesis* 葉エキスについて C57BL/6Cr マウスで、アレルギーに fluoresceinylisothiocyanate (FITC) 溶液を用い、UV-B によって誘導される皮膚接触過敏症の抑制効果を検討した。その結果、ホモナタロインとアロエシンに濃度依存的に有意なマウス耳介部の炎症（膨張：接触過敏症反応）の回復効果が認められた。そして、UV-B によって誘導される接触過敏反応の全身抑制メカニズムについて、マウスケラチノサイト由来細胞株である PAM212 細胞を用いた検討で、ホモナタロインやアロエシンはランゲルハンス細胞や Thy-1⁺ 樹状表皮細胞（Thy-1⁺ DETC）などの皮膚免疫機能に関わる細胞の変化を抑制するという免疫機能維持作用をして

いると考えられた。¹³⁾

アロエ葉特に、アロエベラ・ゲル部が創傷（外傷、火傷、凍傷など）治癒促進効果を示すことは広く知られていて、その活性画分にレクチン様蛋白が大きく寄与している。私どもはアロエベラ・ゲル部に含まれるアロエシン関連化合物の antioxidant, free radical scavenging 効果と抗炎症作用の検討を行った。その結果、一連のアロエシンや isoaloeresin E 関連化合物についての構造活性相関の検討から、caffeoyl エステルを持つ isorabaichromone に強い抗酸化作用を認めた。さらに、アロエシンの *p*-coumaroyl 及び feruloyl エステルが、トロンボキサン (Tx) A₂ 酵素阻害を示し、かつアロエシンにも弱いサイクロオキシゲナーゼ (Cox-2) 阻害活性が認められたことから、アロエベラ・ゲル部の創傷治癒効果は、以下に述べる高分子画分の主たる作用に、その一部はアロエシン関連の低分子化合物が関与していることを示した (Table 3, 4)。¹⁴⁾

2. 高分子画分—多糖体（アロエマンナンやアセマンナン）と糖蛋白（アロエレクチンやベレクチン）—について

キダチアロエに期待される薬効の 1 つに抗腫瘍・抗炎症作用がある。キダチアロエは 90% 以上の水分を含み、かつ新鮮葉には多量の無機塩類（キダチアロエは温暖な海岸地方に自生している）が含まれる。無色のジェリー部から得たジュースを透析

Table 3. Antioxidative and Radical Scavenging Activity of Aloesin Derivatives

| Compound ^{a)} | IC ₅₀ ^{b)} | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| | Microsome | | Lipid peroxidation | | Radical scavenging | |
| | NADPH- dependent | ASA- dependent | Mitochondria NADH- dependent | ASA- dependent | DPPH radical | Superoxide anion |
| 1 | >100 | >100 | >100 | >100 | 20 ± 0.3 | >100 |
| 2 | >100 | >100 | >100 | >100 | 26 ± 0.9 | >100 |
| 3 | >100 | 85 ± 1.0 | >100 | 95 ± 2.8 | 26 ± 0.2 | >100 |
| 4 | 23.0 ± 0.5 | >100 | >100 | 20 ± 0.2 | 4.0 ± 0.1 | 7.0 ± 0.2 |
| 5 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 6 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 7 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| Barbaloin | >100 | 64 ± 1.0 | 51 ± 1.7 | 65 ± 0.1 | 68 ± 0.9 | >100 |
| α-Tocoph. | >100 | 98 ± 1.3 | >100 | >100 | 14 ± 0.2 | >100 |
| Quercetin | 21.8 ± 1.9 | 19.0 ± 0.2 | >100 | 13.4 ± 1.6 | 3.0 ± 0.2 | 53.8 ± 4.2 |
| Catechin | 14.5 ± 1.6 | 29.3 ± 3.1 | 48.6 ± 3.4 | 12.7 ± 1.8 | 4.3 ± 0.3 | 0.8 ± 0.1 |

a) The test samples and positive controls were used at a maximum concentration of 100 μM in DMSO. b) Inhibitory activity is expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration-inhibition curves.

(MW10000 cut off) し、得られた透析内液を凍結乾燥する。粉末を各種ゲル濾過を繰り返して、1→4 β -D-mannan (一部アセチル化されたアロエマンナン) を得た。アロエマンナンは MW 15000, $S_{20,w}$ 1.55S (0.1N NaCl) の単一ピークを示した。アロエマンナンのマウスにおける抗腫瘍活性について最初の例である (Table 5).¹⁵⁾

シャボンロカイ (*A. saponaria*) はハワイ・フロリダ州に自生する大型のアロエで、その名が示すようにその葉の水エキスは発泡性で、その根茎には抗菌性を示すアンスロン関連化合物が含まれる。キダチアロエと同様の薬効が期待されたので、私どもは起炎物質カラゲニンを用いた浮腫の抑制効果を指標に検定を行い、活性画分 As-mannan (MW15000, $S_{20,w}$ = 1.29S) を分画した。As-mannan 1 はその物理化学的性質から D-mannose の一部がアセチル化 (6×mannose 当り 1×Ac 基が mannose の 6 位と結合) した 1→4 β -D-mannan と決定した。As-mannan 2 は MW66KD, $S_{20,w}$ = 1.21S で、D-Man と D-Glc とが 19 : 1 の割合で、1→2 と 1→4 結合し、一部アセチル化 (12×mannose 当り 1×Ac 基が mannose の 6 位と結合) した、 β -D-mannan と決定し

Table 4. Cyclooxygenase-2 and Thromboxane A₂ Synthase Inhibition by Aloesin Derivatives

| Compound ^{a)} | Cyclooxygenase-2 | Thromboxane A ₂ synthase |
|----------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| 1 | >100 | >100 |
| 2 | >100 | 58.0±5.0 |
| 3 | >100 | 13.6±0.42 |
| 4 | >100 | >100 |
| Nimesulide | 2.5±0.4 | |
| 1-(7-Carboxyheptyl)-imidazol HCl | | 9.0±0.7 |

a) The compounds were tested at a maximum concentration of 100 μ M and DMSO was used as a solvent for the assay.

Table 5. Anti-tumor Effect of Aloemannan

| Sample dose mg/kg/day | Inhibition ratio (%) | Complete regression | Mortality (died/total) | Average body wt. change (g) | Av. wt. of tumor (g) |
|-----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Aloemannan | | | | | |
| 5×10 | 38.1 | 2/10 | 1/10 | +4.68 | 7.75 |
| 100×10 | 48.1 | 1/10 | 0/10 | +7.60 | 6.50 |
| Control | | 1/10 | 1/10 | +3.57 | 12.53 |

(a) Tumor: Salcoma 180, Animal: mouse (ICR), Route: i. p. vehicle, aq. dest.

た。As-mannan 1 のカラゲニン浮腫抑制効果は、腹腔内注射では indomethacin と同程度の活性を示したが、経口投与では無効であった。As-mannan 1 は経口投与では吸収が少ないと考えられた。¹⁶⁾

キダチアロエエキスが上気道感染により惹起された喘息に対し感染防御作用を示す (この臨床検査はインフォームドコンセントを得た上で行われた)。そして、このエキスは喘息の背景因子からみて、高齢 (51 才以上) 者の感染し易い内因性の、そして、その喘息の治療にステロイド剤を使用したことのない患者に著効を示した。そこで、これら患者の末梢白血球の示す貪食能 (phagocytosis) と nitro blue tetrazolium (NTB) 還元能を指標とした検査を行って、アロエエキスを精製して得た画分—多糖体と糖蛋白—に活性を認めた (Table 6).¹⁷⁾

そこで、キダチアロエより多糖体、A, B, C と糖蛋白を分画した。

A : 1→6-0- β -D-glucan

B : C₂ と C₆ で分岐した Gal に (1→2)-0-arabinose と (1→2)-0-galactose が結合した分岐型

C : 18% の Ac 基を C₂ と C₆ に持つ (1→4)-0- β -D-mannan の直鎖型

糖蛋白画分 : 糖 : アミノ糖 : 蛋白 (34 : 4 : 57) からなる。

これら化合物の喘息患者末梢血・白血球・好中球の貪食能と NTB 還元能に対する効果から、多糖体 C と糖蛋白画分に、用量依存的に有意な亢進が認められた。¹⁸⁾ 一方、この糖蛋白画分はハムスター幼腎細胞、(BHK) 21 細胞の DNA 合成を促進するレクチン様物質でもあり、キダチアロエの抗炎症効果を示す分画の 1 つである。¹⁹⁾

キダチアロエの抗炎症効果の 1 つに鎮痛作用がある。その起炎物質の 1 つと考えられる Bradykinin (Bdy, nanopeptide) の分解活性を指標に guinea pig

回腸 (*in vitro*) を用いた検定 (Magnus 法) を行い、活性な糖蛋白画分を得た。すなわち、キダチアロエの透析内液について抗 Bdy 活性を指標に分画し、透析内液に対し 10.7 倍の抗 Bdy を示す糖蛋白画分 1 を得た。糖蛋白画分 1 は MW40000, $S_{20,w}=3.34S$, 10% SDS PAGE 上単一バンドを示し、糖:蛋白 (28.5:50.7) で、その組成は Man:Gal:Glc:N-Glc:N-Gal:N-Acetyl Glc (2:2:1:1:4:1), hexosamine 含量 5% を示した。糖蛋白画分 1 と Bdy を培養して培養液を精製後、HPLC で代謝物を検討した結果、糖蛋白画分 1 は Bdy (Arg¹-Pro-Pro-Gly-⁵Phe-Ser-⁷Pro-⁸Phe-⁹Arg) の ¹Arg 又は ⁹Arg を切断 (des-Arg-Bdy) し、かつ ⁷Pro-⁸Phe を切断する protease (carboxypeptidase N-又は P-様)

と推定された (Table 7).²⁰⁾

アロエベラ・ゲルについての研究は 1994 年、著者 (八木) が国際アロエ科学協議会 (International Aloe Science Council, IASC) で招聘講演を行った時に始まる。その際、市販のアロエベラゲルを入手し、ヒト上皮細胞と BHK-21 細胞の増殖活性を指標とした活性成分の検索を行った。アロエベラゲルの透析内液に活性を認め、ついで分画精製を行った。その結果、活性を示す糖蛋白画分は MW29000, 等電点 pI6.8, 15% SDS PAGE 上単一ゾーンを示す糖蛋白 (verectin, 糖:蛋白, 10.7:80.0) であった。Verectin 画分は SDS-PAGE 後の immunoblotting で、MW14000 の subunit 2 個から構成されていることが判明した。そして、verectin 画分は酵素分解で糖を遊離して MW13000 の蛋白画分を与えた。²¹⁾ Verectin の subunit (MW14000) は、radical scavenger として作用すると同時に、Cox-2 や Tx A₂ 合成酵素を阻害し抗炎症効果を示した。²²⁾

Verectin 画分はヒト上皮細胞の増殖活性を示すが、一方、低分子化合物のアロエシンに、Lee K. Y. らはヒト肝 SK Hep-1 細胞を用いた研究で、DNA 合成を濃度依存的に増殖することを認めた。アロエシンは SK Hep-1 細胞での cyclin E, CDK2 と CDC 25A の蛋白レベルを増加させ、cyclin E/CDK2 キナーゼ活性を up-regulate することを認めた。さらに、アロエシン誘導での DNA 合成が促進され、この作用は cycloheximide で抑制された。アロエシン誘導で、cyclin E / CDK2 混合体と

Table 6. Response of Aloe Extract for Chronic Asthmatics

| | | No. of subject | No. of effective case (%) |
|---------------------------|-------------|----------------|---------------------------|
| Age | 11—30 | 11 | 3(27.3) |
| | 31—50 | 14 | 4(28.6) |
| | 51— | 8 | 5(62.5) |
| Type | Exogeneous | 12 | 2(16.7) |
| | Endogeneous | 21 | 9(42.9) |
| Corticosteroid dependence | no | 27 | 11 |
| | yes | 6 | 0 |
| Total | | 33 | 11(33.3) |

* Five ml of the solution in which aloe extract was dissolved at a concentration of 20% with saline, was administered twice a day for six months.

Table 7. Bradykinin-Degrading Activity of Fractions on an Isolated Guinea Pig Ileum

| Sample | Carbohydrate (%) | Protein | Unit/g ^{a)} | Ratio | Yield (%) |
|--|--------------------|---------|----------------------|-------|----------------------|
| Crude extract (Nondialyzable material) | 50.0 ^{b)} | 23.6 | 130.4 | 1.00 | 10 ⁻¹ |
| 20% Ammonium sulfate precipitate | | | | | |
| 0.02 M NH ₄ HCO ₃ eluate | 78.0 | 0.2 | 16.0 | 0.12 | 3 × 10 ⁻³ |
| 0.3 M NaCl eluate | 24.7 | 40.8 | 1148.0 | 8.8 | 6 × 10 ⁻⁴ |
| 20 to 60% Ammonium sulfate precipitate | | | | | |
| 0.02 M NH ₄ HCO ₃ eluate | 94.7 | 3.0 | 131.0 | 1.01 | 10 ⁻² |
| 0.3 M NaCl eluate | 34.0 | 47.4 | 1020.0 | 7.85 | 2 × 10 ⁻² |
| Glycoprotein fraction 1 (aloe glycoprotein) | 28.5 | 50.7 | 1400.0 | 10.7 | 4 × 10 ⁻⁴ |
| fraction 2 | 20.3 | 51.8 | 87.0 | 0.66 | 6 × 10 ⁻⁴ |
| Bromelain | | | 1180.0 | 9.05 | |

^{a)} One kininase unit is defined as the amount of enzyme necessary to degrade 1 μg of bradykinin in 1 min at 30°C at pH 7.4. For statistical purposes, 4—5 guinea pigs were used for each assay. ^{b)} The content of carbohydrate and protein does not account for 100% of the material. This may be due to water, since this polymer is extremely hygroscopic.

CDC25A の蛋白レベルがコントロールされていることを示した (Fig. 4).²³⁾ アロエシンにヒト肝 SK Hep-1 細胞増殖活性を認めた最初の例である。

Verectin を抗原として兔に抗体を惹起させ、verectin antibody を得た。免疫沈降反応により *A. arborescens* (キダチアロエ), *A. chinensis*, *A. vera* の各透析内液中の verectin を定量し、かつ市販の *A. vera* gel 製品の鑑定を行った。*A. chinensis* が *A. vera* の変種であることが証明された。²⁴⁾

ついで、verectin 抗体を用いて、*A. vera* 葉に含まれる verectin 量を、季節ごと (繁殖期の 12—1 月と栄養・生育期の 5—6 月) や各部位ごと (外側葉や葉の先端部など) に定量した。その結果、アロエベラの栄養期の外側先端部に最大の verectin 量が認められた。Verectin 抗体を用いた免疫化学的定量法で、1. *A. chinensis* は *A. vera* の変種であること 2. *A. vera* 葉は圃場栽培では 5 年周期で外側葉を採集するが、栄養期が繁殖期より verectin 量は多いこと 3. アロエベラのクローン植物 (カルスを経て再生された植物や micropropagation によって培養された植物) —いずれも植物ホルモンによってストレスを受けている—では verectin 量が減少していることが判明した。²⁵⁾ Verectin の分画と一連の免疫化学反応の成果が、第 1 回 IASC 科学賞受賞 (1997 年) の対象となった。

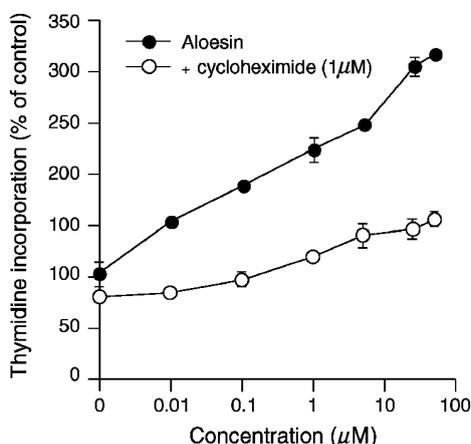


Fig. 4. Inhibitory Effects of Cycloheximide on the Aloesin-Induced DNA Synthesis

SK-HEP-1 cells were seeded in DMEM in the presence of 5% CS for 24 h and then incubated in serum-free medium containing 1.5 mM hydroxyurea. Increasing concentrations of aloesin and 1 μM cycloheximide were added and incubated for 24 h. [³H] thymidine was added to each well for 8 h and [³H] thymidine incorporation was assayed as a measure of DNA synthesis. Data are expressed as percentage changes.

アロエベラ含有の多糖体—アセマンナン (AM, 一般名)—の臨床応用例は多く報告されて、多数の有効性が証明されている。^{26,27)} しかし、アセマンナンの体内動態についての研究報告はなく、かつアセマンナンそのものが、あるいは代謝物のいずれが有効性を示すのか、についての詳細な報告はない。

私どもは予試験的に FITC で標識したアセマンナン (FITC-AM, MW500000) のマウスにおける代謝を検討した。その結果、FITC-AM は各臓器で代謝を受けず、特に腎に貯留し、その大部分は大腸内の腸内細菌で代謝を受けることを証明した。そこで、ヒト糞便微生物との培養で、アセマンナンがどのように代謝 (カタボリズム) されるかを検討した。その結果 catabolite 1 と 2 (MW 30000 と 10000) が分離された。²⁸⁾ ついで、FITC-AM のマウス糞便の 10% ホモゲネートとの培養で、腸内細菌により効率良く代謝 (カタボリズム) を受けた。この catabolites は MW800 (24 h, 培養) と MW3000 (6 h, 培養) であることが、TOF-MS 分析の結果から判明した。これら catabolism の結果から、アセマンナン (MW500000 以上) は腸内細菌で catabolism を受けて低分子化されると証明された (Fig. 5).²⁹⁾

アセマンナンのセルラーゼ制限酵素分解で得られた分解産物—modified *Aloe vera* polysaccharide (MW 80000, 水溶性)—が、皮膚免疫系に作用して、UV-B で損傷を受けた組織の修復を促進するという報告があるが、³⁰⁾ アセマンナンの経口投与 (摂取) の場合、アセマンナンと同様その分解産物も、活性発現に関与することが示唆された。以上アロエが示す健康食品としての共通成分、多糖体の初期生体防御能と医薬品候補としてのアロエシン関連化合物の抗酸化・抗炎症・細胞増殖作用について述べた。

3. タンシノン VI の心臓に及ぼす作用

心臓は全身の各組織に血液を供給する生体内の循環ポンプであり、その機能低下は各臓器の機能障害を誘発する。心機能が低下する原因の 1 つに虚血性心疾患がある。この虚血性心疾患の重篤なものが心筋梗塞であり、循環器疾患の最終病態像である心不全の原因となる。わが国は生活様式、特に食生活の欧米化により循環器疾患の患者数及び発症する恐れのある高い危険度を有する潜在患者数は徐々に増加すると危惧されている。そのため、この循環器疾患

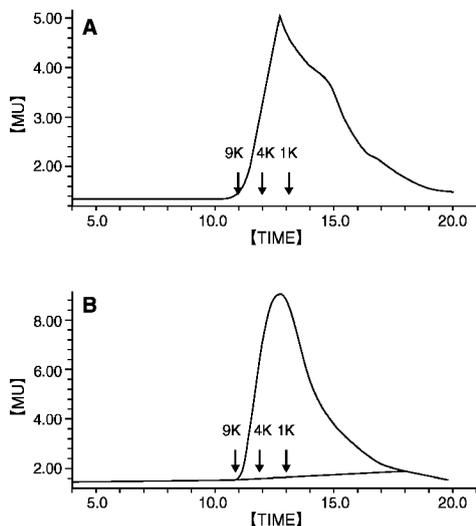


Fig. 5. Chromatogram of Feces Sample after Administration of F-AM *In Vivo* (A) and Incubated Sample of F-AM with 10% Feces Homogenate *In Vitro* (B)

A: The feces sample 24 h after oral administration of F-AM at a dose of 1200 mg/mouse. B: The incubated sample of F-AM with 10% feces homogenate at 37°C.

に対する薬物の開発は、生活の質 (QOL) を維持するためにも重要な課題となっている。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) は、漢方処方では狭心症すなわち虚血性心疾患治療に用いられる生薬である。この丹参は、diterpene の一種である abietane 系色素を含み、これら色素群の中に生薬としての有効成分があると考えられてきた。色素中、最も含有量の高い tanshinone IIA には、low density lipoprotein (LDL) の酸化を抑制することが、³¹⁾ cryptotanshinone には虚血障害から臓器を保護することが示唆されている。³²⁾ Dihydratanshinone と tanshinone I 及び cryptotanshinone には lipopolysaccharide で活性化された macrophage からの interleukin 12 の遊離を、limph node cell からの interferon- γ 遊離をそれぞれ抑制する作用が報告されている。³³⁾ このように丹参に含まれる diterpene 類は様々な生理活性を有することが報告されており、新たな薬物資源として注目されるべき生薬の 1 つである。本稿では tanshinone 類の心臓及びそれを構成する細胞に及ぼす効果について注目し、tanshinone VI の 1) 虚血/再灌流障害に対する心筋保護効果と 2) 心不全病態進展時の心筋リモデリングに及ぼす作用について解説する (Fig. 6)。

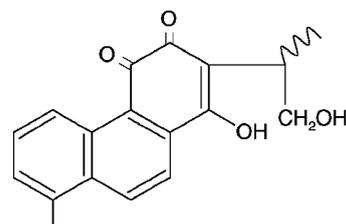


Fig. 6. Chemical Structure of Tanshinone VI

4. 心筋組織の虚血/再灌流障害

前述したように、虚血時の心筋組織では心筋組織への酸素及びエネルギー産生の基質供給が停止するため、ミトコンドリア機能が低下し、心収縮不全に陥る。^{34,35)} この虚血時間が短時間で解除され、再灌流が行われると心機能は速やかに回復する。その一方、虚血時間がある一定時間以上持続すると、再灌流を行ったにもかかわらず心筋細胞の壊死が誘発され、心機能は非可逆的な障害を受ける。^{36,37)} これを虚血/再灌流障害あるいは単に再灌流障害と呼ぶ (Fig. 7)。

5. Tanshinone 類の虚血心筋保護作用

丹参は、凝血を防止し微小循環を改善する目的で活血化瘀に有効とされている。そこで、抽出液中の abietane 化合物を単離・精製し、ラット摘出灌流心臓の hypoxia/reoxygenation モデルを用い、虚血後の心機能回復に及ぼす abietane 化合物の効果を評価した。まず、ラット摘出心臓を Langendorff 法で灌流し hypoxia/reoxygenation を行った。抽出精製された tanshinone 類を hypoxia 期間中心臓に作用させると、tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone VI は、reoxygenation 時の心収縮力回復を促進させた。³²⁾ Tanshindiol B, tanshindiol C を比較的高濃度作用させるとわずかな収縮力回復促進が観察された。^{38,39)}

一方、tanshindiol A, tanshinone IIB, dihydratanshinone, methylenetanshinone, tanshinone VI は、reoxygenation 時の心収縮力回復は促進されなかった。^{38,39)} Tanshinone VI は、42 nM という低濃度でも reoxygenation 時の心収縮力回復を促進した。³⁸⁾ この結果を踏まえて tanshinone VI の心臓に対する作用について詳細に解説する (Table 8)。

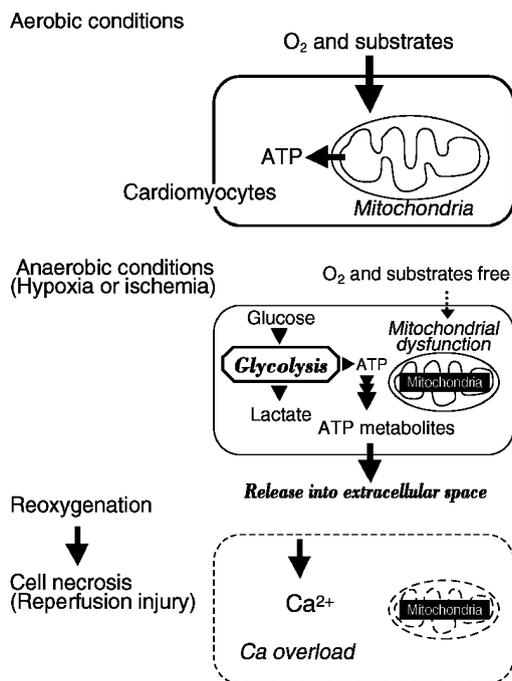


Fig. 7. Schema of Ischemia/Reperfusion (Hypoxia/Reoxygenation) Injury of Cardiomyocytes

6. Tanshinone VI の虚血/再灌流時のエネルギー代謝に及ぼす効果

ラット摘出灌流心臓を glucose-free かつ $N_2 + CO_2$ 通気した嫌氣的条件下で灌流し, hypoxia を行うと心筋組織への酸素供給が途絶える. この時, ミトコンドリアでのエネルギー産生が停止し, 心筋細胞はエネルギー不足に陥り心収縮運動は速やかに停止する (Fig. 8).⁴⁰⁾

Hypoxia 期間中, 心筋細胞内ではミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応が停止するので, ADP から ATP への再生産は行われない. そのため, ATP は ADP 及び AMP を経て adenosine, inosine, hypoxanthine すなわち ATP metabolites へと代謝される.⁴¹⁾ ATP metabolites は好氣的条件下では salvage synthesis を経て, ATP へと再生産されるが, hypoxia 期間中は上記のような理由で ATP への再生産は行われない.⁴²⁾ これら代謝物は極性が低いので細胞膜を容易に通過し passive diffusion により細胞外へと放出される (Fig. 9).^{41,43)} Hypoxia 20 分後, この心臓に reoxygenation を行い, glucose 及び O_2 を供給しても, reoxygenation 後の心収縮力回復率は hypoxia 前の約 20% の回復に留まり, 心筋拡張の指標の静止張力は約 2 倍に上昇し, 心筋収縮

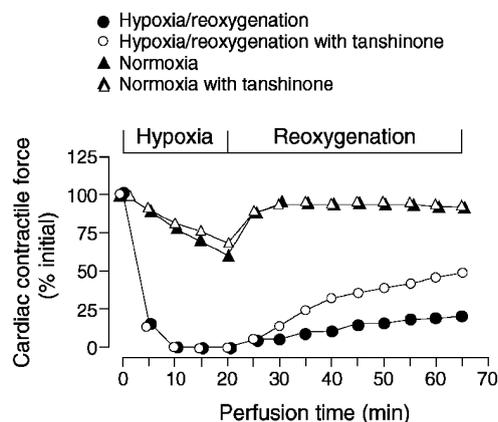


Fig. 8. Effect of Tanshinone VI on Changes in Contractile Force of Hypoxic/Reoxygenated Hearts

Perfused rat hearts treated with (○) and without 42 nM tanshinone VI (●) were subjected to 20-min hypoxia/45-min reoxygenation. For the purpose of comparison, hearts treated with (△) and without (▲) tanshinone VI were perfused under normoxic conditions.

Table 8. Effects of Tanshinone Derivatives on Post-Hypoxic Contractility of Isolated, Perfused Rat hearts

| Compounds | Concentration | Post-hypoxic recovery of contractile force (% initial) |
|-------------------------|---------------|--|
| Untreated | | 15.3 ± 3.8 |
| Tanshindiol A | 25 μM | 24.4 ± 1.9 |
| Tanshindiol B | 25 μM | 34.3 ± 0.5* |
| Tanshindiol C | 25 μM | 27.5 ± 0.3* |
| Tanshinone I | 9 nM | 42.5 ± 3.6* |
| Cryptotanshinone | 30 nM | 40.5 ± 2.4* |
| Tanshinone VI | 42 nM | 49.4 ± 3.5* |
| Tanshinone IIB | 42 μM | 14.5 ± 1.5 |
| Dihydro-tanshinone | 42 μM | 15.2 ± 2.7 |
| 3-α-Methylenetanshinone | 500 μM | 16.2 ± 1.9 |
| Tanshinonal | 500 μM | 7.0 ± 0.8 |
| Methyltanshinonate | 500 μM | 6.1 ± 1.2 |

Each concentration means the concentration that exerts the maximum post-hypoxic contractile recovery of the reoxygenated heart pre-treated with various concentrations of tanshinone derivatives. Each value represents the mean ± SEM of 3 to 6 experiments. * Significantly different from untreated group ($p < 0.05$).

及び拡張機能の両方が障害された (Figs. 8, 10).⁴⁴⁾ Hypoxia 期間中には心筋組織の Ca^{2+} 含量が増加し, reoxygenation を行うとさらに増加し, いわゆる Ca overload が観察された (Fig. 11).^{45,46)} 42 nM tanshinone VI を hypoxia 期間中, 心筋組織に作用させると, hypoxia 時の心収縮力低下及び心筋 ATP 含量低下には影響しなかったものの, 灌流液への ATP metabolites の遊離を抑制した (Figs. 8, 12).

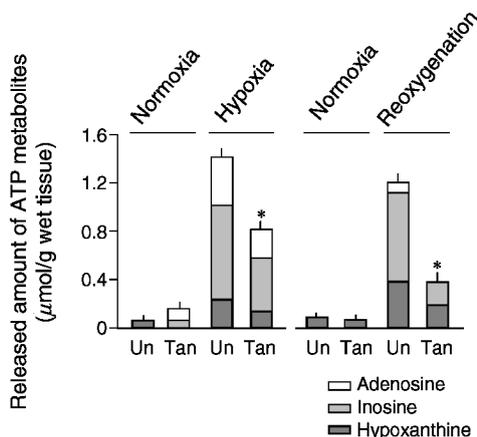


Fig. 9. Effect of Tanshinone VI on Release of Purines and Bases (ATP Metabolites) from Hypoxic/Reoxygenated Hearts.

Perfused rat hearts treated with (Tan) and without 42 nM tanshinone VI (Un) were subjected to 20-min hypoxia/45-min reoxygenation (hatched columns). For purpose of comparison, hearts treated with (Tan) and without (Un) tanshinone VI were perfused under normoxic conditions (open columns). Each value represents the mean \pm SEM of 10 experiments. *Significantly different from the value of the heart treated without tanshinone VI ($p < 0.05$).

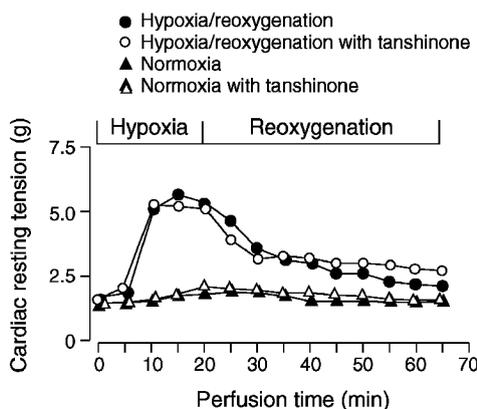


Fig. 10. Effect of Tanshinone VI on Changes in Resting Tension of Hypoxic/Reoxygenated Hearts

Perfused rat hearts treated with (○) and without 42 nM tanshinone VI (●) were subjected to 20-min hypoxia/45-min reoxygenation. For the purpose of comparison, hearts treated with (△) and without (▲) tanshinone VI were perfused under normoxic conditions. The initial value for the resting tension of perfused hearts was adjusted to 1.5 g ($n=40$). Each value represents the mean \pm SEM of 10 experiments. Statistical significance was calculated at the end of hypoxia/reoxygenation. There were no significant differences in the resting tension between tanshinone VI-treated and untreated groups.

Tanshinone VI 処置群の心臓に reoxygenation を行うと、心筋組織の Ca overload が軽減され、心収縮力は hypoxia 前の約 50% まで回復した (Figs. 8, 11).⁴⁴⁾

Hypoxia 期間中の tanshinone VI による ATP metabolites 遊離抑制は ATP metabolites が心筋細胞内に保持されることを示す (Fig. 9). この心筋細胞

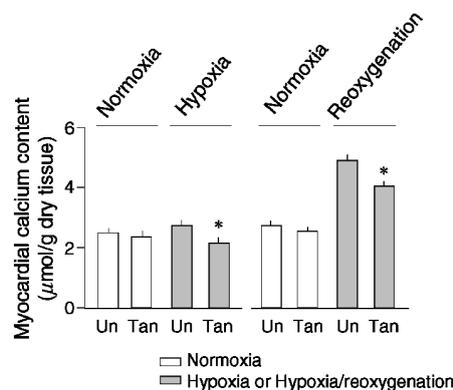


Fig. 11. Effect of Tanshinone VI on Myocardial Ca^{2+} Content at the Ends of Hypoxia and Hypoxia/Reoxygenation

Perfused rat hearts treated with (Tan) and without 42 nM tanshinone VI (Un) were subjected to 20-min hypoxia/45-min reoxygenation (hatched columns). For the purpose of comparison, hearts treated with (Tan) and without (Un) tanshinone VI were perfused under normoxic conditions (open columns). Each value represents the mean \pm SEM of 5 experiments. *Significantly different from the value of the heart treated without tanshinone VI ($p < 0.05$).

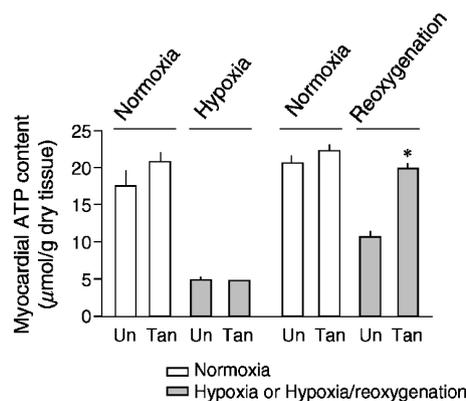


Fig. 12. Effect of Tanshinone VI on Myocardial ATP Content at the End of Hypoxia and Hypoxia/Reoxygenation

Perfused rat hearts treated with (Tan) and without 42 nM tanshinone VI (Un) were subjected to 20-min hypoxia/45-min reoxygenation (hatched columns). For the purpose of comparison, hearts treated with (Tan) and without (Un) tanshinone VI were perfused under normoxic conditions (open columns). Each value represents the mean \pm SEM of 5 experiments. *Significantly different from the value of the heart treated without tanshinone VI ($p < 0.05$).

に再度 O_2 が供給されるとミトコンドリアにより ATP metabolites はエネルギー基質として利用されると考えられる (Fig. 12).^{41,47)} 事実、reoxigenation 時に tanshinone VI 処置群の灌流液への ATP metabolites 遊離が抑制された (Fig. 9). これらの結果は tanshinone VI が hypoxia 時の心筋細胞膜の透過性亢進を抑制することを示唆する。

7. Tanshinone VI の虚血心筋保護の機序

ミトコンドリアは細胞内でエネルギー産生を行う

だけでなく、細胞質での free Ca^{2+} 濃度の調節に重要な役割を演ずると考えられている。つまり、ミトコンドリアは細胞質の Ca^{2+} を取り込む能力が高いことが知られている。⁴⁸⁾ 心筋細胞ではミトコンドリアは細胞容積の少なくとも 35% を占める。⁴⁹⁾ したがって、ミトコンドリアによる Ca^{2+} 取り込みはカルシウム過負荷を抑制し、細胞壊死から心筋細胞を保護すると推測される。Tanshinone VI 処置心臓での reoxygenation 時の ATP 含量回復はミトコンドリア機能が保持されていることを示している (Fig. 12)。この心筋保護作用には tanshinone VI による膜構造の保護(細胞膜透過性亢進抑制)だけでなく、ミトコンドリア機能(エネルギー産生能及び細胞内 Ca^{2+} 恒常性維持) 保持も関与すると考えられる。

8. Tanshinone VI の Free Radical Scavenging 作用

Hypoxia/reoxygenation 実験を含めた心臓の虚血/再灌流実験では、再灌流時に free radical の発生が知られている。⁵⁰⁻⁵²⁾ 一般に free radical を消去する radical scavenger に虚血心筋保護作用があることは多くの研究者により報告されており、^{53,54)} Tanshinone VI もその化学構造から見ると radical scavenger として機能する可能性はある。⁵⁵⁾ しかしながら、本研究のような実験系で radical scavenger による虚血心筋保護作用を発揮させるにはほぼ mM オーダーの作用量が要求される。⁵⁶⁾ 前述したように tanshinone VI は 42 nM で心筋保護作用を発揮している。この濃度は free radical を消去するにはあまりにも少量であるため、tanshinone VI の虚血心筋保護作用は radical scavenging というよりむしろそれ以外の機序を介することを本研究結果は示唆する。

9. 心不全と *In Vitro* 心筋リモデリング

心不全とは何らかの原因により心臓のポンプ機能が低下し、全身の各組織へ十分な血液を供給できなくなった状態の総称で、循環器疾患の最終病態像のことである。心不全には肥大型心筋症、拡張型心筋症及びそれらの組合せなど様々な症状がある。これら心不全病態の進展時には心筋リモデリングと呼ばれる組織学的変化が心筋組織で誘発される (Fig. 13)。⁵⁷⁾ 心筋リモデリングの指標は 2 つあり、1 つは心肥大であり、他方、心繊維化である。心肥大は文字通り心臓サイズが大きくなる症状である。一般に動物では出生後、心臓を構成する心筋細胞は細胞周

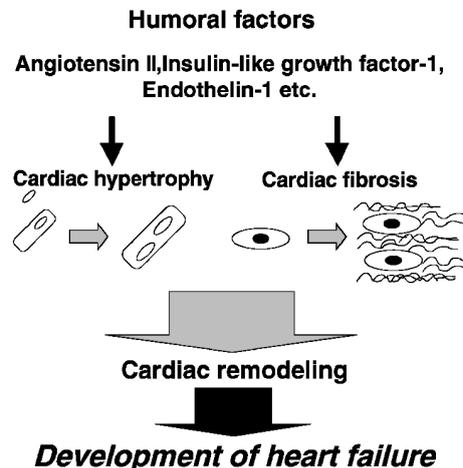


Fig. 13. Schema of Cardiac Remodeling and Development of Heart Failure

期を停止し、再び分裂増殖を行うことはないとされている。⁵⁸⁾ 心臓サイズが大きくなるには細胞増殖を介する細胞数の増加と細胞サイズが大きくなる肥大の 2 つの経路が考えられる。前述したように、心筋細胞は分裂増殖しないので心臓のサイズが大きくなるには心筋細胞の肥大がその主要な機序であることが容易に理解される。一方、心繊維化は心筋組織中の繊維芽細胞すなわち心線維芽細胞により誘発される。通常、心肥大により心室筋への力学的な負荷がかかるので、力学的負荷の増加に適応するため心線維芽細胞がコラーゲンを産生し心筋細胞間の結合強度を上昇させる。⁵⁹⁾ 肥大初期にはこの反応により心機能が代償され、血液ポンプの機能を果たすことができるが、心線維芽細胞によるコラーゲン合成が過度となると産生されたコラーゲンによる心筋細胞間の強固な結合が心筋細胞の収縮弛緩運動の障害となり心機能を低下させると考えられている。^{60,61)} したがって、心筋細胞肥大及び心繊維化を抑制することは心筋リモデリング進行を抑制し、心不全の進展の阻止あるいは進展速度の低下が期待される。^{61,62)} 通常、様々な体液性因子に対する反応性が高くかつ心筋細胞肥大を起こしやすいラット新生仔単離心筋細胞は心筋リモデリング時の心肥大の *in vitro* 実験系として汎用される。^{63,64)} このラット新生仔からの心筋細胞単離過程で心線維芽細胞も単離することが可能である。⁶⁴⁾ そこで、心筋細胞及び心線維芽細胞の両者を単離し、tanshinone VI の心肥大及び心繊維化に及ぼす作用について検討した。

10. 体液性因子と心筋リモデリング

近年、心筋リモデリングの進行に体液性因子が重要な役割を果たすと考えられるようになった。心不全では血液中の angiotensin II, noradrenaline 及び natriuretic peptide に属する atrial natriuretic peptide (ANP) や brain natriuretic peptide (BNP) の濃度が上昇することが数多く報告されている (Fig. 13).^{65,66)} 心不全時の心機能障害が重篤になると tumor necrosis factor (TNF)- α の濃度も上昇する。^{67,68)} これら体液性因子の変動は、心不全病態進展の初期には心機能を代償する方向に作用するが、これら因子の分泌過剰の状態が持続すると代償機序を破綻させ心収縮不全に陥る。したがって、心筋リモデリングを抑制することは代償期から心不全期への移行を阻止し、心機能を保持するために重要な意味を持つ (Fig. 13)。

11. Insulin-like Growth Factor-1 と心筋リモデリング

Maki *et al.*⁶²⁾ により insulin-like growth factor (IGF)-1 は心筋細胞肥大を誘発するだけでなく、心線維芽細胞のコラーゲン合成を促進する作用を有することが明らかにされた。さらに、IGF-1 は心線維芽細胞で合成され、paracrine 作用で心筋細胞肥大を誘発及び促進させるだけでなく、autocrine 作用で心線維芽細胞の繊維化作用を促進する (Fig. 14).^{62,63)} すなわち、IGF-1 は心筋組織内で心不全病態進展時に心筋細胞及び心線維芽細胞に同時に作用し、心筋リモデリングを進行させる体液性因子であることが示唆された。そこで、tanshinone VI の IGF-1 による心筋細胞肥大及び心線維芽細胞繊維化に及ぼす作用について検討を行った。

12. In Vitro 心筋リモデリングに及ぼす Tanshinone VI の効果

心筋細胞肥大時には細胞を構成する蛋白量が増加するので、蛋白合成を指標に細胞肥大が評価できる。⁶⁴⁾ Tanshinone VI を正常心筋細胞に作用させても、その蛋白合成は変化しなかった。すなわち、tanshinone VI は、心筋細胞の蛋白合成を直接抑制しなかった (Fig. 15)。心筋細胞に IGF-1 を処置すると蛋白合成が刺激され、必須アミノ酸の leucine の蛋白への取り込みが増加した (Fig. 16)。この IGF-1 による心筋細胞の蛋白合成促進作用は 10 μ M tanshinone VI により抑制された。一方、tanshi-

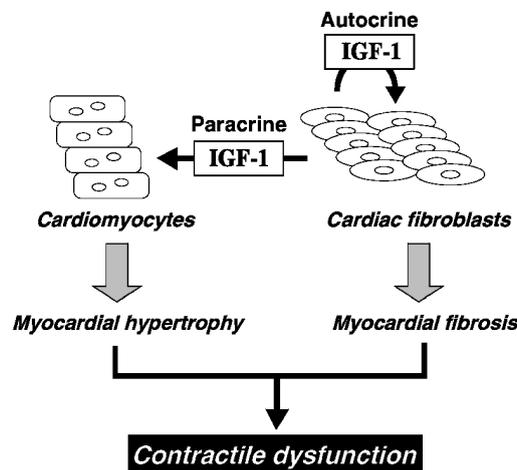


Fig. 14. Schema of Autocrine and Paracrine of Insulin-like Growth Factor-1 on Hypertrophy of Cardiomyocytes and Fibrosis of Cardiac Fibroblasts

none VI を心線維芽細胞に作用させると、10 μ M 未満ではコラーゲン合成速度は変化しなかったが、10 μ M tanshinone VI を作用させると、コラーゲン合成が抑制された (Fig. 15)。心線維芽細胞に IGF-1 を作用させると、コラーゲン合成活性化による繊維化が観察された (Fig. 16)。Tanshinone VI は IGF-1 による心筋細胞肥大及び心線維芽細胞のコラーゲン合成促進作用をキャンセルした。心筋細胞は IGF-1 を合成・分泌しないので、心筋細胞に作用する IGF-1 は心筋細胞以外の細胞に由来する paracrine 機構を介すると推測される。^{62,63)} そこで、IGF-1 を介する心筋細胞と心線維芽細胞の cross talk について検討した。心線維芽細胞の culture medium を回収し (fibroblast-conditioned medium)、これを心筋細胞の culture medium と置換すると心筋細胞肥大が誘発された。Fibroblast-conditioned medium に IGF-1 中和抗体を添加すると心筋細胞肥大効果が減弱することから、この medium 中には IGF-1 が存在し、心筋細胞に paracrine 機構を介して作用したと考えられる。⁶³⁾

Tanshinone VI は fibroblast-conditioned medium による心筋細胞肥大を抑制したことより、IGF-1 の心筋細胞肥大効果を減弱させたと推測された。Tanshinone VI による IGF-1 作用の減弱には 1) IGF-1 の心線維芽細胞からの分泌抑制、2) IGF-1 受容体への結合抑制、3) IGF-1 受容体以外の細胞内情報伝達系への作用が考えられる。本研究では、

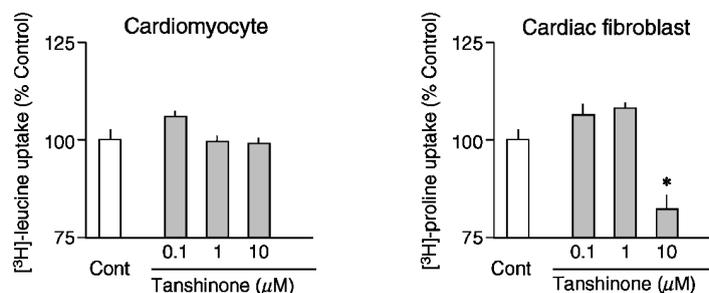


Fig. 15. Effects of Tanshinone VI on Protein Synthesis of Cardiomyocytes and Collagen Synthesis of Cardiac Fibroblasts

Protein synthesis of cardiomyocytes and collagen synthesis of cardiac fibroblasts were estimated by $[^3\text{H}]$ -leucine and $[^3\text{H}]$ -proline intakes into the acid-insoluble fraction in the presence (Tan) and absence (Un) of 10 μM tanshinone VI, respectively. Each value represents the mean \pm SEM of 5 experiments. *Significantly different from tanshinone VI-untreated group ($p < 0.05$).

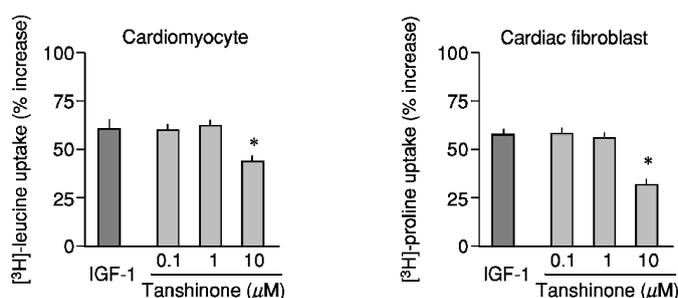


Fig. 16. Effects of Tanshinone VI on Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Hypertrophy of Cardiomyocytes and Fibrosis of Cardiac Fibroblasts

Protein synthesis of cardiomyocytes and collagen synthesis of cardiac fibroblasts were estimated by $[^3\text{H}]$ -leucine and $[^3\text{H}]$ -proline intakes into the acid-insoluble fraction in the presence (Tan) and absence (Un) of 10 μM tanshinone VI, respectively. Each value represents the mean \pm SEM of 5 experiments. *Significantly different from tanshinone VI-untreated group ($p < 0.05$).

culture medium に IGF-1 を添加した状態でも tanshinone VI が心線維芽細胞のコラーゲン合成上昇を抑制したことより、tanshinone VI が IGF-1 の分泌抑制を起こす可能性は低いと考えられる。⁶⁹⁾

Sodium tanshinone IIA sulfate が angiotensin II によるラット新生仔単離心筋細胞の肥大を抑制することが報告された。⁷⁰⁾ 一方、tanshinone IIA は、心線維芽細胞の増殖を抑制しなかったことと、増殖刺激により核内で誘導される oncogene の c-jun 発現に影響を与えなかった。心線維芽細胞のコラーゲン合成が活性化される前に c-jun m-RNA の発現が上昇するとの報告もあり、⁷¹⁾ tanshinone IIA の心臓に対する作用は tanshinone VI のそれよりも弱いかもしれない。少なくとも tanshinone VI と tanshinone IIA の心臓に及ぼす効果は異なった経路を介して発揮されると考えられる。

まとめ

以上、一連の研究により tanshinone VI は、1)

虚血/再灌流障害から心筋組織を保護する能力を有するだけでなく、2) 心不全病態進展時に心筋リモデリング進行を阻止する可能性が示された。前述したように、心不全は循環器疾患の最終病態像であり、虚血性心疾患は心筋梗塞後心不全の基礎疾患となることから、tanshinone VI は虚血性心疾患から心筋組織を保護し、かつ体液性因子、特に IGF-1 を介する心筋リモデリングを抑制することにより、心不全病態の進展を阻止あるいは症状進行速度を鈍化させる循環器疾患治療薬への応用の可能性が示された。その一方で tanshinone VI が IGF-1 受容体に結合するか否か及び tanshinone VI の細胞内での標的蛋白は依然不明である。Tanshinone VI は、calcium antagonist や β -adrenoceptor blocking agent のように今まで報告された薬物よりも極めて少量で虚血心筋保護作用を発揮することから、その作用点は細胞内情報伝達系に作用し、細胞内の環境を制御する機序を介すると推測される。この tanshinone

VIの細胞内受容体つまり標的蛋白が解明されることにより、虚血性心疾患及び心不全の病態生理が明らかにされ、新たな治療薬の開発に寄与できると期待される。

REFERENCES

- 1) Yagi A., *Annual report of the Faculty of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University* **20**, 37–63 (2002).
- 2) Yagi A., “Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, Aloe,” ed. by Reynolds, T., Harwood Academic Publishers, Netherlands 2003, pp. 333–351.
- 3) Yagi A., *The journal of traditional Sino-Japanese medicine* **13**, 429–436 (1992).
- 4) Makino K., Yagi A., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1565–1570 (1974).
- 5) Yagi A., Kanbara T., Morinobu N., *Planta Med.*, **53**, 515–517 (1987).
- 6) Okamura N., Hine N., Harada S., Fujioka T., Mihashi K., Yagi A., *Phytochemistry*, **43**, 495–498 (1996).
- 7) Okamura N., Hine N., Tateyama Y., Nakazawa M., Fujioka T., Mihashi K., Yagi A., *Phytochemistry*, **45**, 1511–1513 (1997).
- 8) Okamura N., Hine N., Tateyama Y., Nakazawa M., Fujioka T., Mihashi K., Yagi A., *Phytochemistry*, **49**, 219–223 (1998).
- 9) Lee K., Weintraub S., Yu B. P., *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 261–265 (2000).
- 10) Hutter J. A., Salman M., Stavinoha W. B., Satsangi N., Williams R. F., Steeper R. T., Weintraub S. T., *J. Nat. Prod.*, **59**, 541–543 (1996).
- 11) Jones K., Hughes J., Hong M., Jia Q., Orndorff S., *Pigment Cell Res.*, **15**, 335–340 (2002).
- 12) Strickland F. M., Pelley R. P., Kripke M. L., *J. Invest. Dermatol.*, **102**, 197–204 (1994).
- 13) Fukuyasu K., Hiramoto K., Tnanka H., Hirose O., Katada T., Konishi H., *J. Japanese Cosmetic Science Society* **20**, 80–85 (1996).
- 14) Yagi A., Kabbash A., Okamura N., Haraguchi H., Moustafa S. M., Khalifa T. I., *Planta Med.*, **68**, 957–960 (2002).
- 15) Yagi A., Makino K., Nishioka I., Kuchino Y., *Planta Med.*, **31**, 17–20 (1977).
- 16) Yagi A., Hamada K., Mihashi K., Harada N., Nishioka I., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 62–65 (1984).
- 17) Shida T., Yagi A., Nishimura H., Nishioka I., *Planta Med.*, **51**, 273–275 (1985).
- 18) Yagi A., Nishimura H., Shida T., Nishioka I., *Planta Med.*, **52**, 213–218 (1986).
- 19) Yagi A., Machii K., Nishimura H., Shida T., Nishioka I., *Experientia*, **41**, 669–671 (1985).
- 20) Yagi A., Harada N., Shimomura K., Nishioka I., *Planta Med.*, **53**, 19–21 (1987).
- 21) Yagi A., Egusa T., Arase M., Tanabe M., Tsuji H., *Planta Med.*, **63**, 18–27 (1997).
- 22) Yagi A., Kabbash A., Mizuno K., Tsuji H., Moustafa S. M., Khalifa T. I., *Planta Med.*, **69**, 957–960 (2003).
- 23) Lee K. Y., Park J. H., Chung M. H., Park Y. I., Kim K. W., Lee Y. J., Lee S. K., *Biochem. Mol. Biol. Int. J.*, **41**, 285–292 (1997).
- 24) Yagi A., Tsunoda M., Egusa T., Akasaki K., Tsuji H., *Planta Med.*, **64**, 277–278 (1998).
- 25) Yagi A., Sato Y., Akasaki K., Tsuji H., *Planta Med.*, **66**, 180–182 (2000).
- 26) Yagi A., *Annual report of the Faculty of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University* **17**, 27–51 (1999).
- 27) Yagi A., Kabbash A., *The Scientific Report Jpn. Res. Inst. Indust. Sci.*, **10**, 83–101 (2000).
- 28) Yagi A., Nakamori J., Yamada T., Iwase H., Tanaka T., Kaneo Y., Qiu J., Orndorff S., *Planta Med.*, **65**, 417–420 (1999).
- 29) Yagi A., Hamano S., Tanaka T., Kaneo Y., Fujioka T., Mihashi K., *Planta Med.*, **67**, 297–300 (2001).
- 30) Qiu J., Jones K., Wylie M., Jia Q., Orndorff S., *Planta Med.*, **66**, 152–156 (1999).
- 31) Niu X. L., Ichimori K., Yang X., Hirota Y., Hoshiai K., Li M., Nakazawa H., *Free Rad. Res.*, **33**, 305–312 (2000).
- 32) Yagi A., Fujimoto K., Tanonaka K., Hirai K., Takeo S., *Planta Med.*, **55**, 51–54 (1989).
- 33) Kang B. Y., Chung S. W., Kim S. H., Ryu S. Y., Kim T. S., *Immunopharmacol.*, **49**, 355–361 (2000).
- 34) Jarmakani J. M., Nagatomo T., Nakazawa M., Langer G. A., *Am. J. Physiol.*, **235**, H475–H481 (1978).
- 35) Takeo S., Sakanashi M., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **15**, 577–594 (1983).
- 36) Ganote C. E., Seabra-Gomez R., Nayler W.

- G., Jennings R. B., *Am. J. Pathol.*, **80**, 419–450 (1975).
- 37) Ganote C. E., Kaltentbach J. P., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **11**, 389–406 (1979).
- 38) Yagi A., Fujimoto K., Niwa T., Tanonaka K., Takeo S., *Planta Med.*, **57**, 288–289 (1991).
- 39) Okamura N., Sato M., Yagi A., Tanonaka K., Takeo S., *Planta Med.*, **58**, 571–573 (1991).
- 40) Takeo S., Tanonaka K., Shimizu K., Hirai K., Miyake K., Minematsu R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 306–314 (1989).
- 41) Takeo S., Tanonaka K., Miyake K., Fukumoto T., *Can. J. Cardiol.*, **4**, 193–200 (1988).
- 42) Takeo S., Tanonaka K., Miyake K., Imago M., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **20**, 187–199 (1988).
- 43) Tanonaka K., Niwa T., Takeo S., *Jpn. Heart J.*, **37**, 105–117 (1996).
- 44) Takeo S., Tanonaka K., Hirai K., Kawaguchi K., Ogawa M., Yagi A., Fujimoto K., *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1137–1143 (1990).
- 45) Nayler W. G., *Am. J. Pathol.*, **102**, 262–270 (1981).
- 46) Steenbergen C., Murphy E., Watts J. A., London R. E., *Circ. Res.*, **66**, 135–146 (1990).
- 47) Vary T. C., Angerakos E. T., Schaffer S. W., *Circ. Res.*, **45**, 218–224 (1979).
- 48) Lisa F. D., Bernardi P., *Mol. Cell Biochem.*, **184**, 379–391 (1998).
- 49) Katz A. M., “Physiology of the Heart,” eds. by Katz A. M, Raven Press, New York, 1997, pp. 1–24.
- 50) Becker L. C., Ambrosio G., *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **30**, 23–44 (1987).
- 51) Simpson P. J., Lucchesi B. R., *J. Lab. Clin. Med.*, **110**, 13–30 (1987).
- 52) Ambrosio G., Flaherty J. T., Duilio C., Tritto I., Santoro G., Elia P. P., Condorelli M., Chiariello M., *J. Clin. Invest.*, **87**, 2056–2066 (1991).
- 53) Zimmer G., Evers J., *Basic. Res. Cardiol.*, **83**, 445–451 (1988).
- 54) Tanaka M., Fujiwara H., Yamazaki K., Sasayama S., *Cardiovasc. Res.*, **28**, 980–986 (1994).
- 55) Yagi A., Haraguchi H., *Recent Res. Devel. Phytochem.*, **1**, 11–24 (1997).
- 56) Tanonaka K., Yoneda M., Kamiyama T., Liu J.-X., Takeo S., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **330**, 1–12 (1995).
- 57) Pfeffer J. M., Pfeffer M. A., Brounwald E., *Circ. Res.*, **57**, 84–95 (1985).
- 58) MacLean W. R., Schneider M. D., *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 289–320 (2000).
- 59) Brilla C. G., Maisch B., Weber K. T., *Eur. Heart J.*, **13**, 24–32 (1992).
- 60) Yoshida H., Tanonaka K., Miyamoto Y., Abe T., Takahashi M., Anand-Srivastava M. B., Takeo S., *Cardiovasc. Res.*, **50**, 34–45 (2001).
- 61) Yoshida H., Takahashi M., Tanonaka K., Maki T., Nasa Y., Takeo S., *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 150–160 (2001).
- 62) Maki T., Nasa Y., Yamaguchi F., Yoshida H., Mori M., Takada T., Horikawa E., Okano K., Takeo S., *Cardiovasc. Res.*, **51**, 608–617 (2001).
- 63) Maki T., Horio T., Yoshihara F., Suga S., Takeo S., Matsuo H., Kangawa K., *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 1204–1210 (2000).
- 64) Horio T., Nishikimi T., Yoshihara F., Nagaya N., Matsuo H., Takishita S., Kangawa K., *Endocrinology*, **139**, 4576–4580 (1998).
- 65) Pedersen E. B., Danielsen H., Jensen T., Madsen M., Sorensen S. S., Thomsen O. O., *Eur. J. Clin. Invest.*, **16**, 56–60 (1986).
- 66) Tsutamoto T., Wada A., Maeda K., Mabuchi N., Hayashi M., Tsutsui T., Ohnishi M., Sawaki M., Fujii M., Matsumoto T., Kinoshita M., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **35**, 714–721 (2001).
- 67) Dutka D. P., Elborn J. S., Delamere F., Shale D. J., Morris G. K., *Br. Heart J.*, **70**, 141–143 (1993).
- 68) Cicoria M., Bolger A. P., Doehner W., Rauchhaus M., Davos C., Sharma R., Al-Nasser F. O., Coats A. I., Anker S. D., *Cytokine*, **15**, 80–86 (2001).
- 69) Maki T., Kawahara Y., Tanonaka K., Yagi A., Takeo S., *Planta Med.*, **68**, 1103–1107 (2002).
- 70) Takahashi K., Ouyang X., Komatsu K., Nakamura N., Hattori M., Baba A., Azuma J., *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 745–749 (2002).
- 71) Rosenfeldt H., Lee D. J., Grinnell F., *Mol. Cell Biol.*, **18**, 2659–2667 (1998).