インドネシア産薬用植物 *Kulur* 抽出物による 5-リポキシゲナーゼ阻害活性

腰原康子^{*1)}, 藤本康雄^{*2)}, 井上秀雄^{*3)}

Natural compounds isolated from the Indonesian plant, Artocarpus communis, inhibit 5-lipoxygenase of cultured mastocytoma cells One of five compounds, AC-5-1, strongly inhibits 5-lipoxygenase with a half-inhibition dose of $5 \pm 0.12 \times 10^{-8}$ M. However, prostaglandin synthesizing activity is not inhibited until 10^{-5} M. AC-5-1 is a highly selective inhibitor for 5-lipoxygenase. The AC-5-1 at 10^{-5} M inhibits 96% of leukotriene C₄ synthesis of mouse peritoneal cells facilitated by calcium-ionophore. Arachidonic acid induced ear edema of mice, an *in vivo* inflammatory model, involving leukotriene induction, is strongly inhibited by AC-5-1 in a dose-dependent manner. The inhibition is the strongest of any inhibitors of 5-lipoxygenase reported previously. Since the natural compound AC-5-1 can selectively inhibit 5-lipoxygenase and affect *in vivo* inflammation, it will be interesting to investigate the role of leukotrienes on inflammation and other physiological processes.

Yasuko Koshihara^{*1)}, Yasuo Fujimoto^{*2)}, Hideo Inoue^{*3)}

^{*1)} Department of Pharmacology Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

^{*2)} The Institute of Physical and Chemical Research

^{*3)} Research Laboratory, Minophagen Pharmaceutical Co.

key words: 5-lipoxygenase, inhibitor, allergy, leukotriene

ロイコトリエンは, I 型アレルギーや炎症のメディエーターと考えられている. ロイコトリエン生合成の最初の段階は, 5-リポキシゲナーゼによってアラキドン酸を 5-HPETE に変換することである. そこで, 5-リポキシゲナーゼの選択的阻害剤の発見は, ロイコトリエン生合成の調節機構を研究するうえで, また抗アレルギー剤としても重要である.

筆者らは, 最近インドネシア産の植物(*Artocarpus communis*)の花部の抽出物に強い5-リポキシゲナーゼ阻害活性があることをみつけ, 有効成分のうちもっとも5-リポキシゲナーゼ選択的阻害活性の強い AC-5-1 について, 種々の研究を行ったので報告する.

材料と方法

(1) 材料

実験に使用した試薬は, つぎのとおりである. ¹⁴C-アラキドン酸(比活性, 54.5 Ci/mol, NEN 社), ウシ胎児血清(ハイクローン研究所), 薄層シリカゲルプレート(60 F 254, 厚さ 0.25 mm, メルク社), アラキドン酸とカフェイン酸(シグマ化学社), イオノフォア A23187(カルビオケム社), AA861(武田薬品), TMK-688(テルモ社), 5-HETE, プロスタグランディン(PG)およびロイコトリエン(小野薬品).

Artocarpus communis (flower)

図 1 AC 化合物の単離

EtOH: ethanol, MeOH: methanol

(2) AC 化合物の調整

インドネシア産の植物 *Artocarpus communis* (AC) の乾燥花(900 g)から図 1 に示すような方法で抽出し, 最終的に10分画を得た. さらに, これらの分画からシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で精製し, 五つの化合物を単離した. それらは二つのフラボノン(AC-3-3 110 mg と AC-5-2 80 mg), および三つのカルコン(AC-3-1 100 mg, AC-3-2 30 mg, AC-5-1 1,300 mg)であった.

^{*1)} 東京都老人総合研究所薬理

^{*2)} 理化学研究所有機

^{*3)} ミノファゲン研究所

図2 AC 化合物の化学構造式

(3) 5-リポキシゲナーゼおよび PG エンドペルオキシド合成酵素活性の測定

両酵素のアッセイは前に報告¹⁾したように行われた。要約すると、n-酪酸処理した癌化肥満細胞をホモジナイズし、10,000 g 遠心の上清を使用した。5-リポキシゲナーゼ活性を測定する場合は、0.2 μCi ^{14}C -アラキドン酸、1.0 mM CaCl_2 、 $2 \times 10^{-5}\text{M}$ インドメタシンを加えて、 37°C で7分間振盪した。一方、PG エンドペルオキシド合成活性を測る場合は、カルシウムおよびインドメタシンを除いた反応系で 37°C で10分間振盪した。

反応は、pH 3.0 にすることで停止した。反応液の8倍量の酢酸エチルで生成物を抽出し、濃縮後薄層クロマトグラフィーで分離した。5-リポキシゲナーゼは、生成された 5-HETE と LTB_4 の放射活性を、また、PG エンドペルオキシド合成活性は、生成されたすべての PG の放射活性の総和で示した。

(4) LTC_4 合成の反応

マウス (ICR, ♀) の腹腔の細胞 (5×10^5 個) をインドメタシン ($2 \times 10^{-5}\text{M}$) の存在下で AC-5-1 と 37°C で5分間インキュベーションした後、L-システインと3分間インキュベーションし、 Ca^{2+} -イオノフォア A23187 (10 μg) を加えて、さらに20分間インキュベーションした。反応後細胞を遠心で除き、上清から80%エタノールでロイコトリエンを抽出し、Sep-Pak C_{18} カートリッジで部分精製した。 LTC_4 量は NEN 社のラジオイムノアッセイ (RIA) キットを使って測定した。

ここで使用した LTC_4 抗血清の交叉率は、(5S, 6R) LTC_4 100%, (5R, 6R) LTC_4 100%, LTD_4 55.3%, LTE_4 8.6%, LTB_4 0.006% である。

(5) アラキドン酸(AA)誘導耳浮腫

AA-誘導耳浮腫の系は Young ら^{2,3)}によって開発された。概略は、AA をアセトンに溶かし (100 mg/ml), 2 mg/ear になるようにマウスの耳に塗布した。阻害剤は AA 塗布の30分前に投与した。AA 塗布後60分に耳の厚さを測定した。

結 果

(1) 粗抽出物の5-リポキシゲナーゼ阻害活性

Artocarpus communis (AC) から最初に10の分画が得られた。各分画をさらに精製したところ、2ないし3の化合物からなっていた。最終的に五つの化合物が得られた。

図2にこれらの化学構造式を示した。 10^{-5}M と 10^{-4}M の濃度を使いどの粗分画に活性があるかを調べた (表1)。AC-1, 2, 3は、あまり強い阻害活性がみられなかった。AC-4, 6, 7 は中程度の阻害活性を持っていた。一方、AC-5は、もっとも強い阻害活性を持ち、5-リポキシゲナーゼ活性を完全に抑制した。各分画から得られた化合物のうち、AC-5-1は、もっとも強い阻害活性がみられた。そこで、この化合物について、以下に示すように詳しく検討した。

まず、5-リポキシゲナーゼに対する ID_{50} は、 $5 \pm 0.12 \times 10^{-8}\text{M}$ ($n=3$) であり、いまだ報告されている阻害剤

表 1 AC 化合物の 5-リポキシゲナーゼ活性に及ぼす影響

fraction	activity of 5-LOX (%)		compound	activity of 5-LOX (%)	
	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M		10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
AC-1	36.9	51.4	AC-2-1	—	—
AC-2	57.4	72.1	AC-2-2	—	—
			AC-2-3	—	—
AC-3	51.4	70.3	AC-3-1	25.7	59.8
			AC-3-2	2.0	13.9
			AC-3-3	1.5	16.5
AC-4	31.0	28.5	AC-5-1	—	—
AC-5	—	—	AC-5-1	0	0
			AC-5-2	0	2.9
AC-6	21.8	23.8			
AC-7	22.7	28.7

図 3 5-リポキシゲナーゼ (a) および PG エンドペルオキシド合成酵素に対する AC-5-1 の影響

の中で最強であった。一方、PG エンドペルオキシド合成酵素活性には、10⁻⁵M までなんの影響も及ぼさなかった。すなわち、AC-5-1 による阻害活性はかなり選択的であった(図 3)。

(2) LTC₄ 合成における AC-5-1 の影響

AC-5-1 は、無細胞系で強い 5-リポキシゲナーゼ阻害活性を示したが、この化合物が細胞の LTC₄ 合成を阻害

表 2 AA-誘導耳浮腫における種々化合物の影響

compound	dose (mg/ear)	ear thickness increased (mm × 10 ⁻²)		inhibition (%)
		untreated	treated	
AC-5-1	1	26.9 ± 1.4	9.2 ± 1.1	66 ^{*3)}
AA 861	1	29.5 ± 1.6	17.4 ± 2.4	42 ^{*2)}
caffeic acid	1	32.5 ± 1.4	33.8 ± 0.4	0
EN 105	1	31.6 ± 0.8	13.4 ± 2.3	58 ^{*2)}
TMK 688	1	33.0 ± 1.6	13.8 ± 2.2	58 ^{*2)}
aspirin	1	28.2 ± 1.2	29.5 ± 0.4	0

値は、平均値 ± SE (n=6) で示した。

*3) P < 0.001. *2) P < 0.01.

図 4 マウス腹腔細胞の LTC₄ 産生に及ぼす AC-5-1 の影響

するかどうか検討した。5-リポキシゲナーゼは、LTC₄ 合成の最初の酵素である。種々の濃度の AC-5-1 をマウス腹腔細胞と 5 分間プレインキュベーションし、Ca-イオノフォア刺激で LTC₄ を合成し、細胞外に遊離された LTC₄ を、RIA 法で測定した。10⁻⁶M の濃度で LTC₄ 産生を 50% 抑制した(図 4)。AC-5-1 は、おそらく細胞内に入り、5-リポキシゲナーゼ活性を阻害することによって、LTC₄ 合成を抑制すると思われる。

(3) AA-誘導耳浮腫に対する影響

AA-誘導耳浮腫の系は、最近開発された²⁾ 簡便な炎症モデル系であり、5-リポキシゲナーゼ代謝物が主なメディエーターであることが示唆されている⁴⁾。アセトンに阻害剤を溶かし AA 塗布前 30 分に耳 (1 mg/ear) に塗布した。

対照に用いた 5-リポキシゲナーゼ選択的阻害剤の AA 861, TMK 688, EN 105 のいずれも有意に浮腫を抑制した。しかし、PG エンドペルオキシド合成酵素阻害剤であるアスピリンは浮腫に全然影響を及ぼさなかった。5-リポキシゲナーゼの弱い阻害剤であるカフェイン酸は、浮腫の形成を抑制しなかった。一方、AC-5-1 (1 mg

図5 AA-誘導耳浮腫に及ぼす AC-5-1 の影響

a: 濃度依存阻害活性, b: 耳浮腫の経時変化

●—●: 対照, ○---○: AC-5-1 (1 mg/ml) 塗布

/ear) は耳浮腫の形成を強く抑制した(表2)。しかし、さらに高濃度の AC-5-1 を投与しても、完全な抑制はみられず、この耳浮腫のメディエーターとして AA 代謝物以外のヘパリン、セロトニン、ブラジキニンなどの他のメディエーターが作用していると思われる。

AC-5-1 による阻害活性は、0.05~1 mg まで直線的な濃度依存活性を示した(図5)。

考 察

インドネシア産植物の花から単離された AC-5-1 は、選択的5-リポキシゲナーゼ阻害剤であった。その強さは ID_{50} が $0.05 \times 10^{-6} M$ でいまで報告されている阻害剤、L-651,392 ($ID_{50} = 0.07 \times 10^{-6} M$)⁵⁾、AA 861 ($ID_{50} = 0.8 \times 10^{-6} M$)⁶⁾、および TMK-688 ($ID_{50} = 2.2 \times 10^{-6} M$)⁷⁾ のどれよりも強い阻害活性を示した。

さらに、この化合物は、最近、5-リポキシゲナーゼ阻害剤検索の *in vivo* 炎症モデルとして開発された AA-誘

導耳浮腫⁴⁾ を有意に抑制した。この耳浮腫のメディエーターが、5-リポキシゲナーゼ代謝物のみでなく、ヒスタミン、セロトニン、キニンも関与しており、インドメタシン投与によって38%の抑制が生じるなど、5-リポキシゲナーゼ代謝物のみが関与している炎症ではない。しかし、この代謝物が大きな役割を占めていることは確かである。他のシクロオキシゲナーゼ阻害剤が、この浮腫の形成に影響を及ぼさないにもかかわらず、インドメタシンが抑制効果を示すことについては、不明である。

阻害活性は塗布によってのみみられ、経口投与では100 mg/kg まで影響がみられなかった。AC-5-1 は、乾燥花の0.14%も含まれている。本来インドネシアでは、この乾燥花を燃して防虫剤としていた。防虫効果と抗炎症効果との関係は不明である。しかし、おそらく AC-5-1 は、虫刺されによって起こる皮膚の浮腫に効果を持つと思われる。

AC-5-1 による阻害機構について、さらに検討している。

文 献

- 1) Koshihara, Y., Murota, S., Petasis, N.A., Nicolaou, K.C.: FEBS Letter 143: 13, 1982.
- 2) Young, J.M., Spires, D.A., Bedord, C.J., Wagner, B., Ballaron, S.J., DeYoung, L.M.: J. Invest. Dermat. 82: 367, 1984.
- 3) Young, J.M., Wagner, B.M., Spires, D.A.: J. Invest. Dermat. 80: 48, 1983.
- 4) Chang, J., Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Lamb, B., Sharma, R.N., Lewis, A.L.: Inflammation 10: 205, 1986.
- 5) Guindon, Y., Girard, Y., Maycock, A., Ford-Hutchinson, A.W., Atkinson, J.G., Belanger, P.C., Dallob, A., Desousa, D., Dougherty, H., Eagan, R., Goldenberg, M.M., Ham, E., Fortin, R., Hamel, P., Hamel, R., Lau, C.K., Leblac, Y., McFarlane, C.S., Piechuta, H., Therien, M., Yoakim, C., Rokach, J.: Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res. 17A: 544, 1987.
- 6) Ashida, Y., Saijo, T., Kuriki, H., Makino, H., Terao, S., Maki, Y.: Prostaglandin 26: 955, 1983.
- 7) Wakabayashi, T., Ozawa, S., Arai, J., Takai, M., Koshihara, Y., Murota, S.: Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res. 17: 186, 1987.