

# フィロズルシンのラット心筋ホスホジエステラーゼ 抑制作用に関する研究

東京慈恵会医科大学薬理学講座第1

甲斐郁代 利田美幸 松本康訓  
山崎弘二

(受付 平成14年7月23日)

## STUDY ON THE INHIBITORY EFFECT OF PHYLLODULCIN ON PHOSPHODIESTERASE IN RAT HEART MUSCLE

Ikuyo KAI, Miyuki KAGATA, Yasunori MATSUMOTO,  
and Koji YAMAZAKI

*Department of Pharmacology (I), The Jikei University School of Medicine*

We examined the effects of phyllodulcin, a constituent of *amacha*, on phosphodiesterase activity in rat heart muscle. Phyllodulcin (25 to 800  $\mu\text{M}$ ) inhibited phosphodiesterase activity in a concentration-dependent manner. The apparent inhibitory concentration of 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) of phyllodulcin was 100  $\mu\text{M}$ . The well-established nonselective phosphodiesterase inhibitors theophylline and 3-isobutylmethoxathine also inhibited PDE activity in manner similar to that of phyllodulcin. The apparent  $\text{IC}_{50}$  of theophylline and 3-isobutylmethoxathine were 100  $\mu\text{M}$  and 6.25  $\mu\text{M}$ , respectively. We could detect the phosphodiesterase isozymes phosphodiesterase 3, 4, and 5 in rat heart muscle by using isozyme-specific inhibitors. However the closed phosphodiesterase inhibitory profiles of phyllodulcin, theophylline, and 3-isobutylmethoxathine suggest that phyllodulcin is a nonspecific phosphodiesterase inhibitor.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 399-404)

Key words: phosphodiesterase, phyllodulcin, *amacha*, heart, rat

### I. 緒 言

日本薬局方に記載されている甘茶(学名: *Hydrangea macrophylla* Seringe var *thunbergii* Makino)はユキノシタ科の植物であり, その葉を乾燥したのから抽出した成分は甘味剤として使用されているが, 経験的に防腐作用とも言われている。しかしながら, 近年我が国で甘茶含有成分の薬理作用が注目され, 抗真菌作用<sup>1)</sup>, 抗アレルギー作用<sup>2,3)</sup>, カルシウムチャネル抑制作用<sup>4)</sup>などが報告されている。甘茶抽出物の主な成分はフィロズルシンであり, この化学物質が甘味の本

体である<sup>5)</sup>。さて, 副腎皮質束状層細胞は糖質コルチコイドを合成分泌するが, その調節は脳下垂体前葉から分泌される副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)により行なわれていることは良く知られている。ACTHは副腎皮質束状層細胞の細胞膜に局在するGsタンパクと関連したACTHレセプターと結合した後, アデニル酸シクラーゼを活性化し, サイクリックAMP(cAMP)の産生を刺激する<sup>6)</sup>。cAMPはタンパクキナーゼAを活性化し糖質コルチコイド産生を促進する<sup>7)</sup>。また, 細胞外に添加したcAMPも高濃度では細胞膜を通過し, 糖質コルチコイド産生を刺激する<sup>8)</sup>。そして細

胞内の cAMP はホスホジエステラーゼ (PDE) により 5'-AMP に代謝され不活性化される<sup>9)</sup>。最近、我々はウシ副腎皮質束状層細胞において、フィロズルシンが細胞外に添加した cAMP による糖質コルチコイド産生を増強することを見出し、ウシ副腎皮質可溶性分画を用いて、その作用機序を検討した。その結果、フィロズルシンが PDE 活性を抑制することが判明したが、フィロズルシンの抑制作用のプロフィールが PDE 非特異的阻害薬であるテオフィリンや 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) に類似していることから、非特異的抑制作用を持つと推定した<sup>10)</sup>。そして、PDE には 7 つのアイソザイム (PDE1~7) が存在していることが報告されている<sup>9)</sup>。PDE 阻害薬のテオフィリンは軽度の心不全の症状改善に使用されることがあることから、今回、ラット心筋の PDE 含有分画を用いてフィロズルシンの PDE 活性に対する作用を検討すると共に、その分画に含まれる PDE アイソザイムの薬理学的同定を試みた。

## II. 方 法

### 1. ラット心筋 PDE 分画の採取

ウイスター系雄性ラット (体重 200 g 前後) にエーテル麻酔を行ない、断頭屠殺し心臓を摘出した。心臓を細切し、0.1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド含有の 25 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) と共にポリトロンでホモジネイトした後、700×g (4°C) で遠心した。そして、その上澄を 10,000×g (4°C) で遠心した。その結果得られた上澄を PDE 分画として -80°C で保存し、以下の実験に用いた。動物の取扱いについては、東京慈恵会医科大学動物実験指針に基づいて行なった。タンパク定量は Lowry 法<sup>11)</sup> を用いた。

### 2. PDE 活性の測定

PDE 活性は Elks らによる方法<sup>12)</sup> を用いて測定した。以下に方法を簡潔に述べる。PDE 含有分画 (蛋白量 10~11 μg/アッセイ) を 0.1 M BES 緩衝液 (8.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 0.5 μM [2, 8-<sup>3</sup>H] cAMP: pH 7.0) で 20 分 (30°C) インキュベートした。インキュベーション総量は 0.3 ml とした。フィロズルシンはジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、DMSO は総インキュベーション液量の 1% 以下にした。この

濃度の DMSO では PDE 活性に影響を与えなかった。また、フィロズルシンはそれ以上加えると沈澱するので 800 μM までしか添加できなかった。反応は 0.25 M HCl, 5 mM cAMP, 4 mM 5'-AMP を含む溶液を加えることにより停止し、0.25 M NaOH, 0.25 M トリス緩衝液で中和した。引き続きスネーク ベノム (0.18 mg/ml) 含有 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を加え 20 分 (30°C) インキュベーションした後、DEAE-セファデックス A-25 カラムにより [<sup>3</sup>H] cAMP から産生された [<sup>3</sup>H] アデノシンを分離し、液体シンチレーションカウンターで測定した。結果は picomoles adenosine production per mg protein per 20 min (pmol/mg/20 min) で表し、阻害薬を添加していない状態を 100% として示した。

### 3. 統計処理

ANOVA および t 検定法で行ない、P < 0.05 以下を統計的に有意差ありとした。

### 4. 試薬および器具

[2, 8-<sup>3</sup>H] cAMP (specific activity, 925 Gbq/mmol) はニューイングランドヌクレア社 (Boston, MA, USA) より、フィロズルシンは和光純薬工業社 (東京) より、cAMP, 5'-AMP, スネーク ベノム, テオフィリン, IBMX はシグマ社 (St. Louis, MO, USA) より、DEAE-セファデックス A-25 カラムはナカラ社 (東京) より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

## III. 結 果

### 1. ラット心筋 PDE に対するフィロズルシン、テオフィリン及び IBMX の効果

フィロズルシン (25~800 μM)、及び非特異的 PDE 阻害薬といわれているテオフィリン (25~800 μM) と IBMX (6.25~200 μM) のラット心筋 PDE 活性に対する抑制作用を検討した。Fig. 1 に示した様に、いずれも濃度依存的に PDE 活性を抑制した。見かけ上の IC<sub>50</sub> はフィロズルシン、テオフィリンともに 100 μM であり、IBMX は 6.25 μM であった。したがって、PDE 活性抑制作用の強さは IBMX >> テオフィリン = フィロズルシンとなる。フィロズルシン、テオフィリン、および IBMX 無添加時の PDE 活性は、1,032 ± 72.8 pmol/mg/20 min (mean ± SE, n = 11) であった。

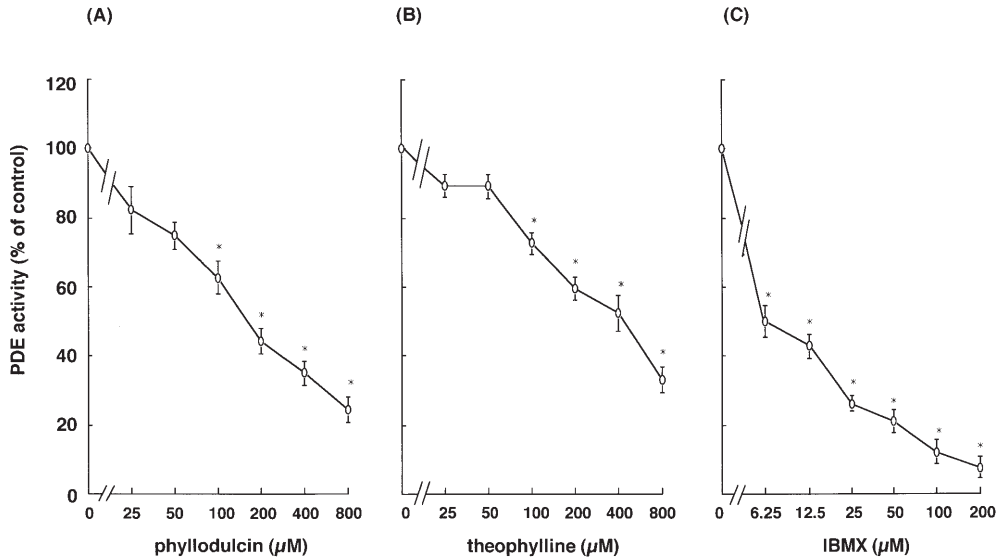


Fig. 1. Effects of phyllodulcin, theophylline and IBMX on the PDE activity in rat heart crude PDE fractions. (A) phyllodulcin, (B) theophylline, (C) IBMX. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. from 3 (phyllodulcin), 4 (theophylline) and 4 (IBMX) separate experiments.

## 2. ラット心筋 PDE アイソザイムの薬理的検討

PDEには1~7のアイソザイムが存在することが明らかにされており、各々の特異的阻害薬、および刺激物質が知られている<sup>9)</sup>。したがってこれら阻害薬を主に用いて、ラット心筋に存在するPDEのアイソザイムを薬理的に検討した。PDE1はカルシウム/カルモジュリン依存性PDEと言われていることから、カルモジュリン(0.1~100 U)の影響を検討したが、Fig. 2Aで示す様に、全く影響がみられなかった。また、サイクリックGMP(cGMP)依存性PDEであるPDE2の存在を調べるためにcGMP(0.2~25  $\mu$ M)を用いたが、cGMPはやや抑制的に作用した(Fig. 2B)。次に、PDE3, 4及び5と6特異的阻害薬を用いて、そのPDE活性に対する効果を調べた。PDE3阻害薬であるミルリノン(0.625~20  $\mu$ M)<sup>13)</sup>とPDE4阻害薬であるRo20-1724(5~80  $\mu$ M)<sup>14)</sup>はともに濃度依存的に抑制し、見かけ上の $IC_{50}$ はそれぞれ2.5  $\mu$ M, 5  $\mu$ Mであった(Fig. 3A, B)。さらに、PDE5とPDE6の阻害薬であるジピリダモール(1.25~40  $\mu$ M)<sup>15)16)</sup>は、Fig. 3Cに示す様に濃度依存的に抑制した。ジピリダモールの見かけ上の $IC_{50}$ は2.5  $\mu$ Mであった。

## IV. 考 察

我々はウシ副腎皮質束状層細胞において、フィロズルシンが細胞外に添加したcAMPによる糖質コルチコイド産生を増強することから、副腎皮質PDE分画におけるフィロズルシンの抑制効果を検討し、フィロズルシンが非特異的PDE阻害薬である可能性を示唆した<sup>10)</sup>。一方、心筋のcAMPが増加するとプロテインキナーゼA活性化、L型Caチャンネル及びホスホランパンのリン酸化を介して、陽性変力作用が発現することは良く知られている<sup>17)</sup>。細胞内cAMPはPDEにより代謝され不活性型の5'-AMPに変化し、作用は消失する。したがって、心筋内PDE活性の強さは心筋収縮力に大きな影響を与える。実際、非特異的PDE阻害薬であるテオフィリンは軽度の心不全状態の改善に使用されることがある。今回、ラット心筋PDE含有分画におけるフィロズルシンの効果を調べたところ、濃度依存的に抑制した。

PDEには7つのアイソザイムが認められており、PDE1はカルシウム/カルモジュリン活性型、PDE2はcGMP活性型、PDE3はcGMP抑制型、PDE4はcAMP特異的、PDE5はcGMP特異的、PDE6は網膜に局在するcGMP特異的なPDEと

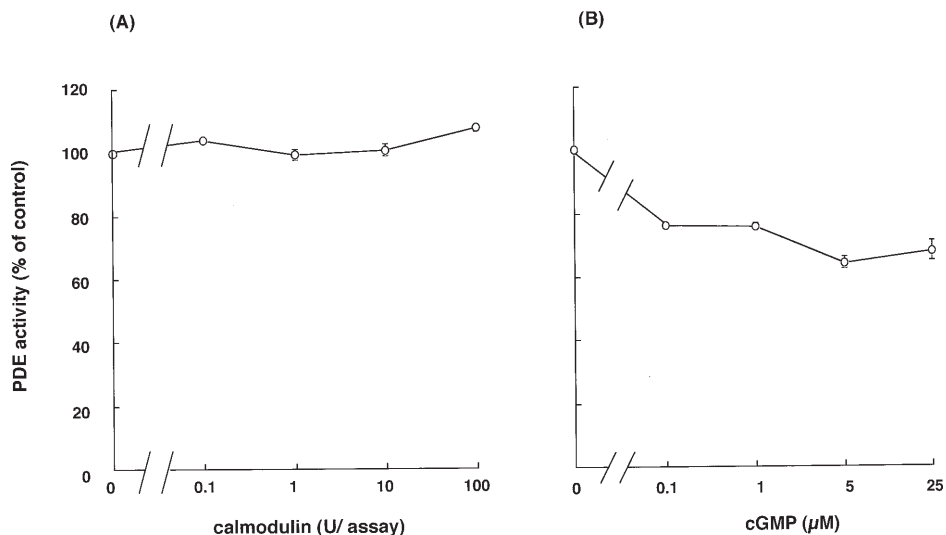


Fig. 2. Effects of calmodulin and cGMP on the PDE activity in rat heart crude PDE fraction. (A) calmodulin, (B) cGMP. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. from 3 separate experiments.

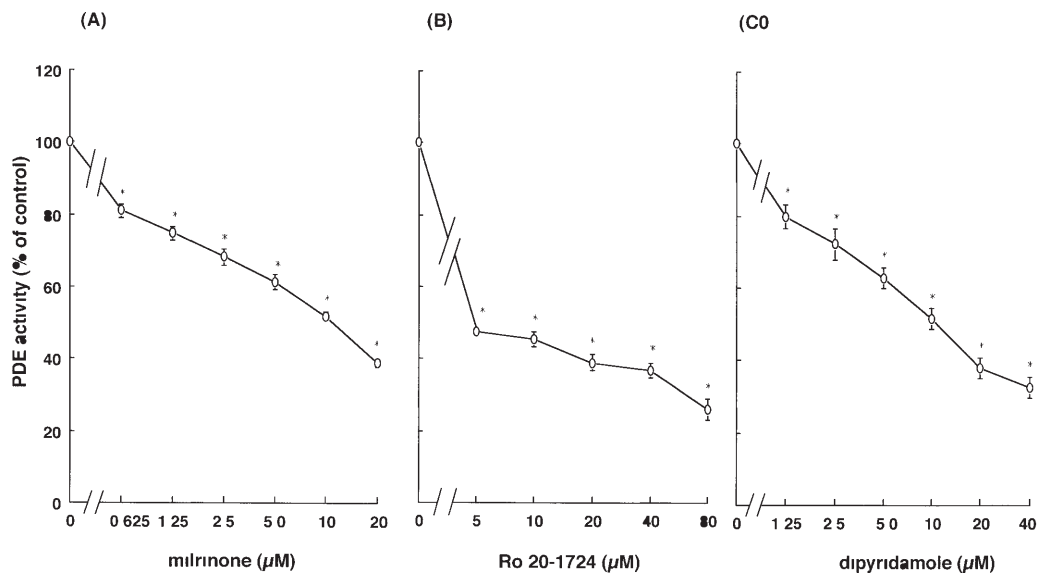


Fig. 3. Effects of PDE inhibitors on the PDE activity in rat heart crude PDE fractions. (A) milrinone, (B) Ro20-1724, (C) dipyridamole. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. from 4 (milrinone), 3 (Ro20-1724) and 3 (dipyridamole) separate experiments.

される。PDE7はcAMP特異的であるが、PDE4阻害薬であるロリプラムに対して非感受性のPDEであると言われている<sup>9)</sup>。そこで今回、ラット心筋に存在するアイソザイムを薬理的に検討した。まず、Ca<sup>2+</sup>存在下でカルモジュリンの影響を調べたところ、PDE活性には影響を与えなかつ

た。このことはPDE1が存在しない可能性を示している。実際、PDE1はラットの脳、精巣ではその存在が確認されている。ついで、cGMPの影響を調べたところ有意差はないが、やや抑制的な結果が得られた。PDE2はcGMPにより活性化され、PDE3はcGMPにより抑制される。この結果は

PDE2は存在せず、PDE3は弱い活性しか持たない可能性と、両アイソザイムが存在するためにcGMPの効果が打ち消された可能性が考えられる。そして、PDE3の特異的阻害薬といわれるミリリノンが濃度依存的にPDE活性を強く抑制したことから、ラット心筋にはPDE2は存在せずPDE3の存在が示唆されるが、ラット心筋にPDE2および3の両者の存在が報告されており<sup>18)</sup>、彼等はPDE2をラット心筋より純化していることより、後者の可能性が強い。PDE4の特異的阻害薬であるRo20-1724も濃度依存的に強い抑制作用を示したことから、PDE4の存在も示唆された。また、PDE5とPDE6の両者についてはcGMP特異的ではあるが、cAMPを基質に用いた今回の実験において、両酵素を特異的に阻害するといわれているジピリダモールが強い抑制を示した。このことから、基質としてcGMPを用いていないが、PDE5または6の存在も示唆されるが、これまでPDE6は網膜のみでその局在が報告されているので、ラット心筋に存在するアイソザイムはPDE5と考えられる。PDE7については特異的阻害薬が現在のところ報告されていないので、その存在の有無は不明である。以上の薬理的検討から、今回、ラット心筋において少なくともPDE3, 4, 5の3タイプのアイソザイムが存在する可能性が示された。しかしながら、ジピリダモールによるPDE5に対する $IC_{50}$ は $0.9 \mu M$ 、PDE6に対する $IC_{50}$ は $0.38 \mu M$ であることが報告されているが<sup>19)</sup>、今回の実験において得られた見かけ上の $IC_{50}$ は $2.5 \mu M$ で比較的高濃度を要した。したがって、ジピリダモールは非特異的にPDE3を抑制している可能性もあり、これらアイソザイムの存在については各抗体を用いた直接的な証明が今後必要である。

テオフィリン及びIBMXは代表的な非特異的PDE阻害薬であるので、ラット心筋PDE含有分画においては、少なくともPDE3, 4, 5を抑制していると考えられる。フィロズルシンはテオフィリンと同様の濃度範囲で抑制曲線を描き、その作用の強さは $IBMX \gg$ テオフィリン=フィロズルシンであること、及びウシ副腎皮質PDE含有分画において、非特異的阻害薬である可能性が指摘されている<sup>10)</sup>。したがって、フィロズルシンはテオ

フィリンと同程度の抑制作用を示す非特異的PDE阻害薬であることが示唆される。しかしながら、特異性の有無を決定するには、今後純化した各アイソザイムに対する抑制作用の比較検討が必要である。

## V. 結 語

1. 甘茶の主成分であるフィロズルシンのラット心筋のホスホジエステラーゼ(PDE)活性に対する影響を調べると共に、用いた試料に含まれるPDEアイソザイムについても薬理的な検討を行なった。

2. ラット摘出心臓ホモジネイトの $10,000 \times G$ 遠心上清をPDE分画として用いた。PDE分画を $[2, 8-^3H]$  cyclic AMP含有緩衝液で20分間、 $30^\circ C$ でインキュベーションした後、反応を停止しスネークベノムを加え、さらに20分インキュベーションした。DEAE-セファデックスA-25カラムにより、 $[^3H]$ アデノシンを分離測定しPDE活性とした。

3. フィロズルシン( $25 \sim 800 \mu M$ )は濃度依存的にPDE活性を抑制し、 $IC_{50}$ は $100 \mu M$ であった。一方、テオフィリン( $25 \sim 800 \mu M$ )及び、IBMX( $6.25 \sim 200 \mu M$ )も同様に著明な抑制作用を示した。各々の $IC_{50}$ は $100 \mu M$ 、 $6.25 \mu M$ であった。

4. 現在PDEにはPDE1~7の7タイプのアイソザイムの存在が報告されているが、テオフィリン及びIBMXは非特異的PDE阻害薬として良く知られており、フィロズルシンのPDE活性抑制プロフィールがテオフィリン及びIBMXのものと同様に類似していたことから、フィロズルシンはPDEの非特異的阻害薬である可能性が強く示唆された。

5. ラット心筋PDEのアイソザイムを薬理的に検討したところ、PDE3, 4, 5の少なくとも3タイプしか検出できなかった。従って、フィロズルシンが非特異的PDE阻害薬であると結論づけるためには、今後、他のアイソザイムを持つ臓器のPDE活性に対する作用について検討する必要がある。

本論文を作成するにあたり、御指導、御校閲を賜りました川村将弘教授に深甚なる感謝の意を捧げます。

また、本研究に御協力いただきました東京慈恵会医科大学薬理学講座第1の方々に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Nozawa K, Yamada M, Tsuda Y, Kawai K, Nakajima S. Antifungal activity of oosponol, oospolactone, phyllodulcin, hydrangenol, and some other related compounds. *Chem Pharma Bull* 1981; 29: 2689-91.
- 2) 山原條二, 松田久司, 下田博司, 割石紀子, 矢木信博, 村上啓寿, 吉川雅之. アマチャ成分ツンベルギノール A の I~IV 型アレルギーに対する作用. *日薬理誌* 1995; 105: 365-79.
- 3) 下田博司, 松田久司, 吉川雅之. 甘茶のイソクマリン thunberginol A 及び関連化合物の免疫調節作用. *和漢医薬誌* 1999; 15: 296-7.
- 4) 高村光行: 甘茶抽出物のウシ副腎皮質細胞におけるステロイドホルモン産生に対する影響. *慈恵医大誌* 1994; 112: 625-30.
- 5) 金子 肇, 藤森 嶺, 松下 肇, 野口正雄: 甘茶エキスの成分分析. *農化* 1973; 47: 605-9.
- 6) Penhoat A, Jaillard C, Saez JM. Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4978-81.
- 7) Schimmer BP. Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *Adv Nucleotide Rev* 1980; 13: 181-214.
- 8) Sharma RK, Ahmed NK, Shanker G. Metabolic regulation of steroidogenesis in isolated adrenal cells of rat. Relationship of adrenocorticotropin-, adenosine-3': 5'-monophosphate- and guanosine 3': 5'-monophosphate-stimulated steroidogenesis with the activation of protein kinase. *Eur J Pharm* 1976; 70: 427-33.
- 9) Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-48.
- 10) Kawamura M, Kagata M, Masaki E, Nishi H. Phyllodulcin, a constituent of "Amacha", inhibits phosphodiesterase in bovine adrenocortical cells. *Pharmacol Toxycol* 2002; 90: 106-8.
- 11) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Jarr AL, Rannald J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- 12) Elks ML, Manganiello VC, Vaughan M. Hormone-sensitive particular cAMP phosphodiesterase activity in 3T3-L1 adipocytes: regulation of responsiveness by dexamethazone. *J Biol Chem* 1983; 258: 8582-7.
- 13) Harrison SA, Reifsynder DH, Gallis B, Cadd GG, Beavo JA. Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotonic drugs. *Mol Pharmacol* 1986; 29: 506-14.
- 14) Sheppard H, Wiggan G, Tsien WH. Structure-activity relationship for inhibitors of phosphodiesterase from erythrocytes and other tissues. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1972; 1: 103-12.
- 15) Nemecek GM, Honeyman TW. The role of cyclic nucleotide phosphodiesterase in the inhibition of cyclic AMP accumulation by carbachol and phosphatidate. *J Cyclic Nucleotide Res* 1982; 8: 395-408.
- 16) Gillespie PG, Beavo JA. Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyrindamole and M & B 22948. *Mol Pharmacol* 1989; 36: 773-81.
- 17) Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198-205.
- 18) Schudt C, Winder S, Muller B, Ukena D. Zardaverine as a selective inhibitor of phosphodiesterase isozymes. *Biol Chem Pharmacol* 1991; 42: 153-62.