

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08353

研究課題名(和文)天然資源由来のp38MAPK経路を抑制する活性分子の探索研究

研究課題名(英文) Research of active molecules from natural resources on the anti-allergic activity via p38MAPK pathways

研究代表者

井藤 千裕 (ITO, CHIHIRO)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：60193497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オトギリソウ科植物由来のビフェニル類4種および褐藻類の暖海性ホンダワラ類由来のフロロタンニン類3種について、抗アレルギー効果を検討した。これらの化合物はリン酸化p38MAPKやリン酸化p65NF- κ Bの発現を抑制することで、-hexosaminidase およびTNF- α などの産生や分泌を抑制する可能性を示した。更に細胞内標的分子の同定を目指しLC-MSを使ってプロテオミクス解析を実施、フロロタンニン類で処理した細胞では、27種のタンパク質が有意に増加し、35種のタンパク質が有意に減少することが明らかになった。また、従来の天然資源より生物活性物質の探索研究からいくらかの新知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p38MAPK経路はアレルギーや悪性腫瘍の制御に重要な細胞内シグナルの1つである。今回、オトギリソウ科植物から単離したビフェニル類、褐藻類から単離したフロロタンニン類がp38MAPK経路をはじめ様々な細胞内シグナルを制御することで抗アレルギー効果を示すことを明らかにしている。さらに網羅的タンパク質解析は、これら成分の標的分子解明の一助となり創薬研究の基礎となる情報である。本研究は標的分子薬の開発に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：We have isolated and structurally characterized four biphenyls from *Garcinia schomburgkiana* and three phlorotannins from *Sargassum carpophyllum*. And their compounds inhibited production and/or secretion of chemical mediators such as -hexosaminidase and TNF- α from antigen stimulated rat mast cells (RBL-2H3), suggesting the potential for anti-allergic effects. Furthermore, these compounds treated cells were reduced phosphorylated p38 MAPK and p65 NF- κ B expression compared with cells stimulated with antigen alone. In this study on phlorotannins, we comprehensively investigated for the fluctuated proteins by proteomics analysis using LC-MS. This analysis revealed that phlorotannins treatment up-regulated the expression of 27 proteins and down-regulated that of 35 proteins compared with that in cells stimulated with DNP-HSA alone. Some new information was obtained from the searches for bioactive compounds, too.

研究分野：天然物薬学

キーワード：天然資源 抗アレルギー効果 がん細胞増殖抑制効果 がん予防効果 アポトーシス誘導効果 神経細胞保護作用 成分研究 構造決定

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患、クローン病やリウマチ性滑膜炎などの難治性疾患の病巣部位に多数局在することが知られており、炎症の発症および進行過程に重要な役割を演じている。更にマスト細胞は細胞質の顆粒内にトリプターゼ、ヒスタミン、TNF- α など多種多様な化学伝達物質を合成、貯蔵し、急性炎症および慢性炎症でその化学伝達物質を放出し、様々な生理反応を引き起こすことが、*in vitro* および *in vivo* 実験から明らかになってきている。従来、種々の抗炎症薬や抗アレルギー薬はプロスタグランジンの合成阻害やヒスタミン受容体の阻害を標的とした薬剤が多く用いられている。一方、マスト細胞からのヒスタミン放出を抑制する薬剤は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

今回の研究では、天然資源より単離した化合物群から p38MAPK 経路を抑制する活性分子を見出し、化合物ライブラリーの構築を目的とする。また、天然資源より新規化合物の単離・構造決定、含有成分の生物活性評価、および生物活性試験において活性の認められた化合物についての作用機序の解明等、従来の生物活性物質の探索研究も同時に進行し、新たなシーズ分子を見出す。

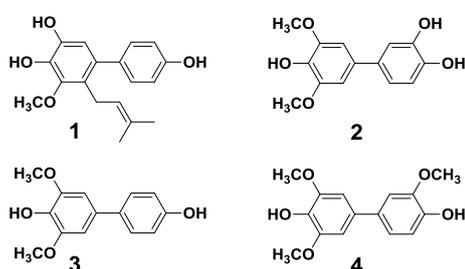
3. 研究の方法

新たな骨格を有する化合物の単離・構造決定を目的とした天然資源の成分検索と並行して、単離した天然有機化合物の抗原刺激によるマスト細胞内の p38MAPK 経路を抑制する活性分子について調べる。さらに、ヒット化合物によって影響を受けるリン酸化タンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) オトギリソウ科 *Garcinia* 属植物から単離したビフェニル類の抗アレルギー効果

オトギリソウ科 *G. schomburgkiana* から単離した 7 種のビフェニル誘導体について、抗原刺激したマスト細胞株 RBL-2H3 からのケミカルメディエーターの産生と放出について検討した。4 種のビフェニル類(1-4) は、ヒスタミン放出抑制効果は認められなかったが、 β -hexosaminidase および TNF- α の放出を容量依存的に抑制した。また、それらの内、2 種のビフェニル類が活性酸素放出を抑制したが、COX2 発現については抗原刺激のみの細胞と同程度の発現レベルであった。さらに、ビフェニル類 1 種が細胞内情報伝達分子であるリン酸化 p65NF κ B や p38MAPK の発現を抑制する傾向を示した。以上の結果から、これらの化合物が抗アレルギー薬開発のリード化合物となるものと期待される。

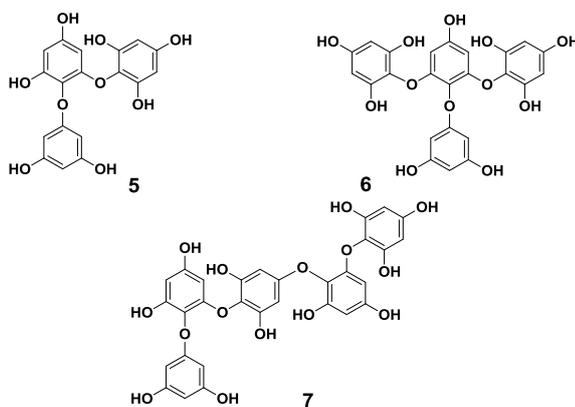


(2) 暖海性ホンダワラ類から単離したフロロタンニン類の抗アレルギー効果

褐藻類の暖海性ホンダワラ類 *Sargassum carpophyllum* の乾燥粉末から Folch 法に準じて抽出と分配を行い、得られた水溶性画分に対して酢酸エチルを用いて再度分配を行った。酢酸エチル層を回収し、減圧濃縮したものを分取 HPLC を用いて分離・精製し、3 種のフロロタンニン類(5-7)を単離・構造を決定した。これらの化合物は抗原刺激したマス

ト細胞株 RBL-2H3 細胞から β -hexosaminidase および TNF- α の放出を容量依存的に抑制した。また、COX2 の発現も緩やかな低下傾向を示し、これらのフロロタンニン類の抗アレルギー効果が明らかになった。

さらに、フロロタンニン類が影響を与える細胞内タンパク質を網羅的に解析するため、iTRAQ 試薬で細胞内タンパク質を標識し LC-MS で解析すると、27 種のタンパク質が有意に増加し、35 種のタンパク質が有意に減少することが明らかになった。以上の結果は、これらの化合物の標的分子解明の一助となり、標的分子薬の開発に繋がるものである。

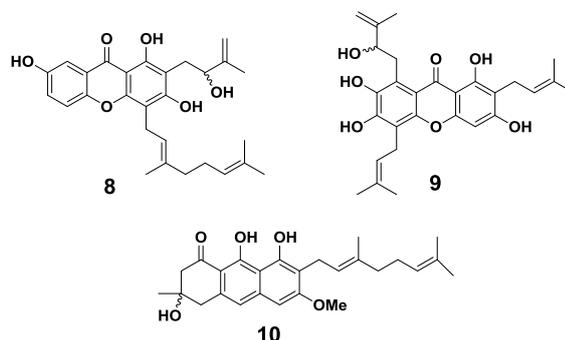


(3) オトギリソウ科 *Cratoxylum* 属植物より単離した 4 種の新規キサントン類の構造および含有成分のがん細胞増殖抑制効果

オトギリソウ科 *C. cochinchinense* より 4 種の新規キサントン類を単離、各種スペクトルデータの解析により、それらの構造を決定した。新規キサントン

cratoxanthone A (8)、B (9) はヒト急性リンパ性白血病細胞株 (NALM-6) 細胞に対して増殖抑制効果を示し、口腔類表皮癌 (KB) 細胞を用いたミトコンドリア膜電位

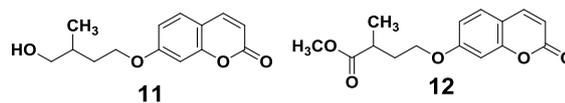
を約 70% 低下させた。また、ジヒドロアントラセノン visminone F (10) は肺腺癌細胞株 (A549) 細胞に対して唯一、細胞増殖抑制効果を示し、ミトコンドリア膜電位を著しく低下させた。以上の結果から、これらの化合物が抗腫瘍薬開発のリード化合物となるものと期待される。



(4) ミカン科 *Melicope* 属植物より単離した 2 種の新規クマリン類の構造および含有成分の発がんプロモーション抑制活性

シンガポール産 *M. lunu-ankenda* より 2 種の新規クマリン類 (11, 12) を単離、各種スペクトルデータの解析により、それ

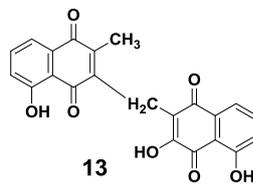
らの構造を決定した。単離した化合物について、発がんプロモーション抑制活性を検討したところ、melilunumarin A、6-deoxyhaplopinol および marmesin に著しい発がんプロモーション抑制効果が認められた。以上の結果から、これらの化合物ががん予防薬開発のリード化合物となるものと期待される。



(5) イソマツ科 *Plumbago* 属植物より単離した新規ナフトキノン二量体の構造および含有成分のがん細胞増殖抑制効果

イソマツ科 *P. zeylanica* より新規ナフトキノン二量体 (13) を単離、各種スペクトルデータの解析により、その構造を決定した。単離した 4 種のナフトキノン二量体について NALM-6、A549、KB、Colo205 に対する細胞増殖抑制試験を実施した。新規ナフトキノン二量体

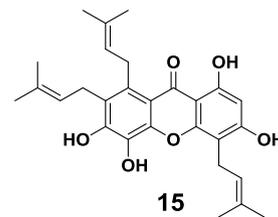
plumzeylanone (**13**) はNALM-6 に対してのみ細胞増殖抑制効果を示し、正常皮膚線維芽細胞には増殖抑制効果を示さなかった。また、増殖抑制効果が最も強かった maritinone (**14**)について Colo205 細胞で細胞周期の経時



変化を観察したところ、化合物処置 48 時間後に G0/G1 期の増加、72 時間後に subG1 期の増加が認められ、**14** による G0/G1 期の停止およびアポトーシスの誘導が示唆された。本研究は新たな抗がん剤開発に繋がるものである。

(6) オトギリソウ科 *Calophyllum* 属植物から単離したキサントンのがん予防効果

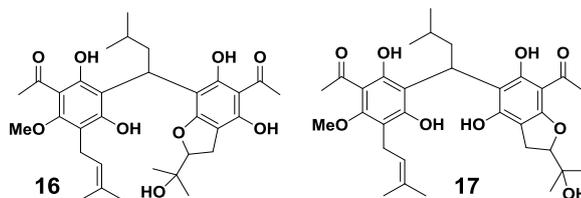
オトギリソウ科の *C. elatum* Bedd. から数種のキサントン類を単離、各種スペクトルデータの解析により、それらの構造を決定した。単離した 8 種類のキサントン類について発がんプロモーション抑制活性の短期、簡易検定法である Epstein-Barr virus (EBV) 活性化抑制試験を行った。Isogarciniaxanthone E (**15**) に最も強い抑制活性が認められ、さらにマウスを用いたマウス皮膚二段階



発がん試験を行ったところ、コントロール群に比べ、明らかに腫瘍の発生率、腫瘍の数の減少が見られた。以上のことから、**15** はがん予防に有効であることが明らかとなった。本研究はがん予防薬の開発に繋がるものである。

(7) ミカン科 *Acronychia* 属植物から単離した acrofolione A, B のヒトプレ B 細胞白血病細胞株 NALM-6 細胞に対するアポトーシス誘導効果

台湾産 *A. pedunculata* (L.) Miq. から単離した 2 種のアセトフェノン二量体 acrofolione A (**16**) および acrofolione B (**17**) のヒトプレ B 細胞白血病細胞株 NALM-6 細胞に対するアポトーシス誘導効果について検討した。

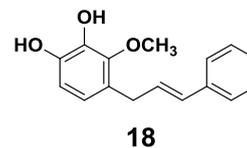


16 はヒト白血病細胞株において **17** より強い細胞増殖抑制効果を示し、その抑制効果は経時的な TUNEL 染色陽性細胞の増加やアネキシン発現細胞の増加、ミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ活性の増加からアポトーシスによることを明らかにした。また細胞周期の解析から **16** と **17** が G0/G1 期のアレストを誘導することも明らかにした。**16** と **17** が関わるアポトーシス関連のシグナル分子の探索するためプロテインアレイを実施し、**16** と **17** が survivin や HSP27 を抑制する可能性を示した。以上の結果は、これらの化合物の標的分子解明の一助となり、標的分子薬の開発に繋がるものである。

(8) マメ科 *Dalbergia* 属植物から単離したシンナミルフェノールのラット初代海馬ニューロンの保護作用

マメ科 *D. odorifera* から単離したシンナミルフェノール、hydroxyobtustyrene (**18**) のラット初代海馬ニューロンに与える影響を検討した。

神経突起数やその長さなど細胞形態を変化させることなく、**18** は初代ニューロンの培養維持が困難な低い培養密度状態の初代海馬ニューロンの生存率を有意に増加させた。また化学的虚血状態の初代海馬ニューロンにおいても **18** は化学的虚血で誘導されるアポトーシスや COX-2 発現を抑制した。本研究は神経細胞に対する保護作用薬の開発に繋がるものである。



今回、抗アレルギー効果を有することが明らかとなった天然有機化合物については、誘導体合成による構造活性相関の検討を行い、新たな抗アレルギー薬の開発へと繋げていきたい。

また、発がんプロモーション抑制活性、あるいは、がん細胞に対する細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなった天然物有機化合物については、生物活性試験の結果を基に構造活性相関の検討、新たながん予防薬、あるいは、抗がん剤の開発へと繋げていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chihiro Ito, Takuya Matsui, Takashi Kobayashi, Harukuni Tokuda, Sivabalan Shanmugam, Masataka Itoigawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Cancer chemopreventive activity of xanthenes from <i>Calophyllum elatum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Prod. Commun.	6. 最初と最後の頁 447-449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takashi Iwai, Kengo Obara, Chihiro Ito, Hiroshi Furukawa, Jun-Ichiro Oka	4. 巻 72
2. 論文標題 Hydroxyobtustylene protects neuronal cells from chemical hypoxia - induced cell death	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 915-921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s11418-018-1224-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takuya Matsui, Chihiro Ito, Ayumi Kato, Tian-Shung Wu, Masataka Itoigawa	4. 巻 71
2. 論文標題 Acrofolione A and B, acetophenone dimers from <i>Acronychia pedunculata</i> , induce an apoptotic effect on human NALM-6 pre-B cell leukaemia cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pharm. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 348-361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/jphp.13035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Chihiro, Matsui Takuya, Niimi Ai, Tan Hugh, Itoigawa Masataka	4. 巻 83
2. 論文標題 Four New Xanthenes from <i>Cratoxylum cochinchinense</i> and Their In Vitro Antiproliferative Effects	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Planta Medica	6. 最初と最後の頁 812~818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0043-102510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Chihiro, Matsui Takuya, Tokuda Harukuni, Tan Hugh T.W., Itoigawa Masataka	4. 巻 20
2. 論文標題 Cancer chemopreventive constituents from <i>Melicope lunu-ankenda</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 172 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Chihiro, Matsui Takuya, Takano Makiko, Wu Tian-Shung, Itoigawa Masataka	4. 巻 32
2. 論文標題 Anti-cell proliferation effect of naphthoquinone dimers isolated from <i>Plumbago zeylanica</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 2127 ~ 2132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/14786419.2017.1366476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中永裕香、岡本誉士典、青木 明、植田康次、鈴木智子、井藤千裕、神野透人
2. 発表標題 リゾホスファチジン酸によるヒト乳がん細胞増殖に対するプロボリス由来成分の抑制効果
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山貴都、山田泰平、井藤千裕、吉田圭佑、北垣伸治
2. 発表標題 次亜塩素酸五水和物を利用するカルバゾールアルカロイドの N-N カップリング反応の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Yoshida, Takato Nakayama, Taihei Yamada, Chihiro Ito, Shinji Kitagaki
2. 発表標題 Development of oxidative N-N coupling reaction of carbazole alkaloids by using NaOCl · 5H ₂ O
3. 学会等名 The 27th International Society of Heterocyclic Chemistry (ISHC) Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Matsui, Chihiro Ito, Toshiyuki Shibata, Masataka Itoigawa
2. 発表標題 Comparative proteomics analysis reveals the effect of phlorotannin from <i>Sargassum carpophyllum</i> on activation mast cells
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田圭佑、中山貴都、山田泰平、酒向里奈、井藤千裕、北垣伸治
2. 発表標題 NaOCl · 5H ₂ Oを用いる三環性ピアリアルアミン化合物のN-Nカップリング反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井卓哉、井藤千裕、柴田敏行、糸魚川政孝
2. 発表標題 暖海性ホンダワラ類マジリモク (<i>Sargassum carpophyllum</i>) から単離したフロロタンニンの活性化マスト細胞への効果についてプロテオーム解析の試み
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井藤千裕、後藤眞美、松井卓哉、糸魚川政孝、Sivabalan Shanmugam
2. 発表標題 ミカン科Glycosmis cochinchinensis より単離した新規キノロンおよび新規アクリドン二量体の構造および含有成分のがん細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧川和希、井藤千裕、糸魚川政孝、疋田清美、金田典雄、村田富保
2. 発表標題 レギュカルチン発現誘導化合物による炎症性メディエーターの産生抑制効果
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳田春邦、三宅義明、糸魚川政孝、井藤千裕
2. 発表標題 有用カンキツ類マイヤーレモン含有化合物の生物活性
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井藤千裕、三宅佑奈、松井卓哉、糸魚川政孝、Sivabalan Shanmugam
2. 発表標題 オトギリソウ科Calophyllum elatum より単離した新規キサントンの構造および含有成分によるマスト細胞の制御について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井卓哉、井藤千裕、糸魚川政孝
2. 発表標題 抗原刺激マスト細胞に対する「Licarin A」の薬理効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口凌佑、井藤千裕、村田直輝、松井卓哉、三宅義明、糸魚川政孝、植田充美、柴田敏行
2. 発表標題 暖海性ホンダワラ類から単離したフロロタンニン類の構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Matsui, Chihiro Ito, Tian-Shung Wu, Masataka Itoigawa
2. 発表標題 Acetophenone dimers from Acronychia pedunculata induce an apoptotic effect on human leukemia cells
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅義明、望月美佳、井藤千裕、數村公子、糸魚川政孝
2. 発表標題 熊野産カンキツ「新姫」に含まれる芳香族化合物の機能性評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会第64回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 徳田春邦、三宅義明、糸魚川政孝、井藤千裕
2. 発表標題 カツオ節菌産生化合物の抗酸化作用とがん予防作用
3. 学会等名 第20回日本補完代替医療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井藤千裕、佐藤愛美、松井卓哉、糸魚川政孝、Nijsiri RUANGRUNGS1
2. 発表標題 ミカン科Glycosmis montana より単離した新規アクリドンアルカロイドの構造および含有成分のがん細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井卓哉、井藤千裕、糸魚川政孝、呉 天賞
2. 発表標題 Acrofolione A、Bのヒト白血病細胞株に対するアポトーシス誘導効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名城大学 天然物化学研究室 http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/kenkyu/natural-products/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	松井 卓哉 (Matsui Takuya) (50238937)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	