

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：37604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15474

研究課題名(和文)メタボロミクスを基軸としたプロアントシアニジン含有植物の薬理活性予測法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method for predicting pharmacological activity of plants containing proanthocyanidins based on metabolomics

研究代表者

甲斐 久博 (Kai, Hisahiro)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：60533221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：プロアントシアニジンを含む植物の薬理活性(成人T細胞白血病の細胞増殖抑制)の予測モデルを確立することを目的に、ブルーベリー葉、マオウ地上部、ダイオウ葉・根の各植物エキスを用いた網羅的な代謝物解析(メタボロミクス)に供した。その結果、ブルーベリー葉では、実測値と予測値に強い相関関係を表す薬理活性予測モデルを確立できた。マオウでは、収穫年および抽出溶媒の判別、薬理活性を反映したモデルを構築できた。ダイオウでは、植物部位の判別はできたが、薬理活性予測モデルの確立には至らなかったため、今後改良する予定である。本研究成果から、メタボロミクスは薬理活性のある薬用資源を迅速に見出す手法の一つになりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した核磁気共鳴(NMR)および直接導入型電子イオン化質量分析(DI-EI-MS)を利用したメタボロミクス法は、分離精製を必要とせず、全ての含有成分を指紋のように総括的に評価できる。従来の研究では薬理活性物質を分離精製により同定できなかった生薬について、本法の活用により種の鑑別、部位の判別、薬理活性予測が容易となった。これにより、本手法は偽装品や異物汚染品などを排除し、良質な生薬、健康食品等が国民の手へ届くための有益な品質評価のツールとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish the plant metabolomics analysis predicting pharmacological activity by using NMR or direct-injection electron ionization-mass spectrometry (DI-EI-MS). An inhibitory activity on adult T-cell leukemia (ATL) cell-proliferation was applied to the pharmacological activity. Plant extracts containing proanthocyanidin (PAC) showed the activity in ATL-assay. In blueberry leaves, there was a strong correlation between the activity in ATL-assay and the predicted values obtained from metabolomics analysis. Ephedra plants were categorized into several groups by the harvest year, extracting solvents, and the activity. Although it was difficult to have the similar results to Ephedra plants, plant parts of the Rheum were differentiated by the analysis. Therefore, NMR or DI-EI-MS-based metabolomics analysis of plants with PAC could be a useful method to screen materials by pharmacological activity.

研究分野：生薬学、天然物化学

キーワード：DI-EI-MS NMR 成人T細胞白血病 プロアントシアニジン メタボロミクス 薬理活性予測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボロミクスとは、サンプルに含まれる全ての化合物 (全代謝産物) を多成分系としてそのままの状態で解析し、全体像を把握する手法である。例えば、尿や血液のメタボロミクスは疾病診断に、植物のメタボロミクスは生合成機構の解明や生薬・健康食品の品質評価に利用される有用なツールとなる。植物のメタボロミクスでは、抽出した植物エキスを分画、精製することなく、混合物のまま質量分析 (MS) または核磁気共鳴 (NMR) を測定し、エキスに含まれる全代謝産物の情報をひとまとめにする。その後、網羅的な解析を行うことで、種の鑑別、収穫時期や産地の区別、薬理活性の強弱を表現できる。メタボロミクスは一般的な薬理活性成分の探索手法と比較すると、時間や労力を大幅に削減できる。

(2) 従来のメタボロミクスでは、ガスクロマトグラフ (GC) や液体クロマトグラフ (LC) を MS に併結した装置が主に利用されてきた。しかし、我々は植物エキスを分離せず、混合物の状態 MS に直接導入し、電子イオン化法にて分析する「直接導入-電子イオン化-質量分析法 (Direct Injection-Electron Ionization-Mass Spectrometry (DI-EI-MS))」を新規に確立し、NMR と併用して、地衣の鑑別、クララ *Sophora flavescens* の産地分類および薬理活性の評価等に成功した。

(3) 我々は、成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞株を用いたランダムスクリーニングにより、60 種の植物エキスからブルーベリー葉に ATL 細胞増殖抑制活性があることを見出した。さらに、100 種のブルーベリー葉エキスをスクリーニングし、温暖地栽培に適したラビットアイ系品種が他の品種と比べて活性が強いこと、冬季に収穫した葉の活性が強いことを見出した。これらの活性に寄与する成分として、プロアントシアニジン (PAC) と推定したが、完全精製は物性上、極めて困難であり、厳密な分子式や構造式は不明である。また、PAC を含まないフラクションにも強い増殖抑制活性が存在することや、分画、精製後に増殖抑制活性を失うこともあり、PAC 以外の成分および PAC が、相乗的に増殖抑制活性を発揮させていることも考えられた。以上の背景から、ブルーベリー葉をはじめとする PAC を含有する植物エキスは、混合物のまま品質評価することが重要である。

2. 研究の目的

メタボロミクスの手法を用いた PAC 含有植物 (ブルーベリー、マオウ、ダイオウ) の薬理活性予測法を確立させ、品質評価のエビデンスを集積する。薬理活性は、治療薬開発が急務とされる、ATL 細胞の増殖抑制活性 (抗 ATL 活性) を指標とする。

(1) PAC 含有ブルーベリー葉を用いた抗 ATL 活性予測法の構築

既に、抗 ATL 活性試験を終えたブルーベリー葉をパイロットサンプルとして、DI-EI-MS または NMR のメタボロミクスにより 100 種のサンプルを網羅的に解析し、含有成分に基づく抗 ATL 活性予測法を構築する。

(2) PAC 含有植物 (マオウ、ダイオウ) を用いた抗 ATL 活性予測法の実用性の検証

(1) のブルーベリー葉の成果を応用し、他の PAC 含有植物における抗 ATL 活性予測法を構築し、その実用性を検証する。ブルーベリー葉の次に検討する PAC 含有植物として、漢方方剤にも繁用されているマオウ、ダイオウを扱う。これらの植物における DI-EI-MS または NMR のメタボロミクスにより、基原植物 (種) や採集時期の同定、含有成分に基づく抗 ATL 活性予測法を構築し、実用可能な品質評価法の確立を目指す。

3. 研究の方法

PAC 含有植物の抗 ATL 活性予測法を確立する目的で、DI-EI-MS 測定で得られる質量数 (m/z) または NMR で得られるバケット積分値を統計解析ソフトに入力し、メタボロミクス解析を実行する。この解析結果に基づき、抗 ATL 活性の予測値が得られる。これを細胞実験で得た実測値との相関関係を表現した「予測モデル」を作成する。

まず、抗 ATL 活性が明らかなブルーベリー葉をパイロットサンプルとし、メタボロミクスによる抗 ATL 活性予測モデルを構築する。次に、この予測モデルを PAC 含有植物にも適用できるか、マオウまたはダイオウを用い、同様に ATL アッセイ、DI-EI-MS または NMR のメタボロミクスを行い、予測モデルの実用性を検証する。

(1) 試料の収集、エキスの作製

ブルーベリーの 20 系統の葉を 5 ヶ月間に渡って採集し、80% エタノールエキスを作製した (研究協力者: 宮崎大学農学部 國武久登 教授)。マオウは 16 系統の地上部を 2 ヶ年に渡って採集し、アセトンまたはメタノールでエキスを作製した (研究協力者: 武田薬品工業京都薬用植物園 松岡史郎氏、野崎香樹氏、明治薬科大学 岡田嘉仁 名誉教授、馬場正樹 准教授)。ダイオウは 45 系統の葉または根を 2 ヶ年に渡って採集し、メタノールでエキスを作製した (研究協力者: 武田

(2)抗 ATL 活性試験

ヒト由来の ATL 細胞 3 種、HTLV-1 感染細胞 2 種、非 ATL 白血病細胞 2 種を用いて各種エキスの細胞増殖抑制活性を評価した。96 ウェルプレートに細胞を播種し、24 時間後サンプルを添加、サンプル添加 72 時間後に WST-8 試薬を添加し、マイクロプレートリーダー (450 nm) を用いた吸光度測定により抗 ATL 活性を評価した (研究協力者: 宮崎大学医学部 森下和広 教授)。

(3) DI-EI-MS または NMR 測定

DI-EI-MS について、各種乾燥エキスを dimethyl sulfoxide(DMSO) で 5 mg/mL になるよう調製し、1 μ L をガラスキャピラリーに入れて測定した。得られたマスキロマトグラムの後半部を積算し、各フラグメントピークの質量数を整数値刻みで (m/z 50~500) イオン強度を算出し、これらのデータを JMP Pro 14.2 (SAS Institute) にて主成分分析 (Principal Component Analysis (PCA)) 等のデータ処理を行った。一方、NMR について、各種乾燥エキスを DMSO- d_6 に溶解し、 1 H-NMR を測定した。得られたスペクトルは Alice 2 for metabolome (日本電子) にてバケット積分し、本ソフトおよび JMP Pro 14.2 にて主成分分析等のデータ処理を行った。(研究協力者: 九州保健福祉大学 松野康二 教授、明治薬科大学 植沢芳広 教授、城西大学薬学部 鈴木龍一郎 准教授)

4. 研究成果

(1) PAC 含有ブルーベリー葉を用いた抗 ATL 活性予測法の構築

ブルーベリー葉の系統 20 種の 80% エタノールエキスにおける DI-EI-MS スペクトルデータを主成分分析したところ、score plot 上で 4 系統 (学名) ごとに分類することができた。さらにこの結果は、抗 ATL 活性を反映する結果となった (図 1)。NMR スペクトルデータの主成分分析においては、DI-EI-MS の様な 5 ヶ月分全ての明確なカテゴリズは困難であったが、4 月、6 月、12 月採集分は系統および抗 ATL 活性を反映した結果が得られた。また、部分的最小二乗 (PLS) 回帰を用いた抗 ATL 活性予測モデルを作成した結果、実測値データとの相関は $R^2=0.901$ となり良好な結果が示された (図 2) (研究成果 [雑誌論文] [学会発表] 参照)。

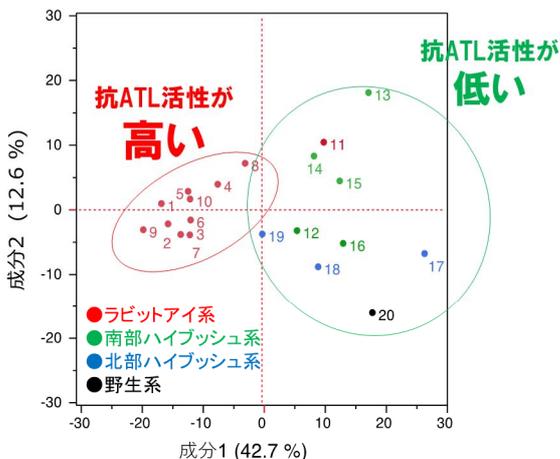


図1. ブルーベリー葉のDI-EI-MSメタボロミクス主成分分析
栽培品種20種を4つの系統および抗ATL活性の強弱にて大別することができた。

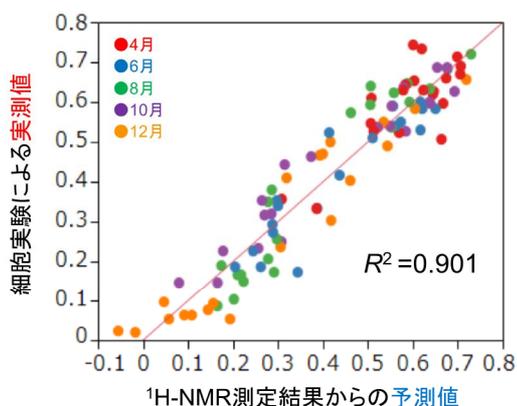


図2. ブルーベリー葉のNMRメタボロミクスPLS回帰分析～抗ATL活性予測モデル

予測値の算出法: 目的変数に細胞実験による実測値、説明変数に 1 H-NMRにおける0.04 ppm刻みの積分値をそれぞれあてはめ算出した。NMRによる抗ATL活性予測結果と細胞実験による実測結果は、良好な相関関係が示された。

(2) PAC 含有植物 (マオウ、ダイオウ) を用いた抗 ATL 活性予測法の実用性の検証

マオウ

マオウ 16 系統の地上部におけるアセトンまたはメタノールエキスについて、抗 ATL 活性において、同一個体であっても収穫年が違くと活性の違いがみられた。また、アセトンエキスはメタノールエキスより活性が強い傾向が認められた。DI-EI-MS スペクトルデータを主成分分析したところ、学名および抗 ATL 活性を明確に反映する結果は得られなかったものの、 m/z の強度および細胞増殖抑制試験の二変量解析の結果から、抗 ATL 活性に寄与する成分の分子量が明らかになった。一方、NMR スペクトルデータの主成分分析においては、収穫年度で明確に 2 分割された (図 3、L1)。さらに、アセトンエキス群とメタノールエキス群で明確に 2 分割され (図 3、L2)、強い抗 ATL 活性を示すエキス (% of Control で 40%未満のエキス: 図 3 赤マーク) が集約する結果が示された。これらの結果から、収穫時期の違いで含有成分が変化する天然物に対しても、NMR メタボロミクスは薬理活性試験結果を反映するものと考えられる (研究成果 [学会発表] 参照)。

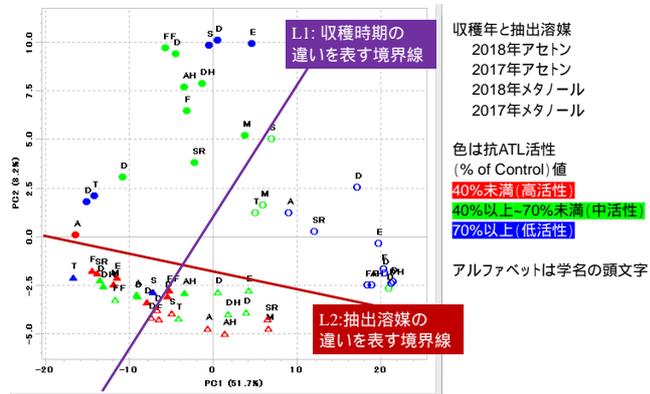


図3. マオウのNMRメタボロミクス主成分分析

収穫年度(L1)、抽出溶媒(L2)それぞれの違いを反映する結果が示された。また、抗ATL活性の強いサンプルは下の方に集約した。

ダイオウ

ダイオウ 45 系統の葉または根におけるメタノールエキスについて、抗 ATL 活性において同一個体であっても収穫年が違くと活性の違いがみられたが、葉または根 (部位) 間に活性の差はあまり見られなかった。DI-EI-MS スペクトルデータを主成分分析したところ、部位または抗 ATL 活性に寄与する成分の質量が明らかになった。一方、NMR スペクトルデータの主成分分析においては、葉または根が明確に 2 分割され、再現性も良好であった。しかし、抗 ATL 活性の強弱を反映した予測モデルの構築は困難であった。(研究成果 [学会発表] 参照) 今後、様々な溶媒や固相抽出カラムにより抽出したサンプルについて、抗 ATL 活性試験、DI-EI-MS 測定、NMR 測定を行い、主成分分析や PLS 回帰分析により抗 ATL 活性予測モデルを構築する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kai Hisahiro, Uesawa Yoshihiro, Kunitake Hisato, Morishita Kazuhiro, Okada Yoshihito, Matsuno Koji	4. 巻 85
2. 論文標題 Direct-Injection Electron Ionization-Mass Spectrometry Metabolomics Method for Analyzing Blueberry Leaf Metabolites That Inhibit Adult T-cell Leukemia Proliferation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta Medica	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-0725-8295	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 緒方翔子, 眞玉優里奈, 甲斐久博, 植沢芳広, 鈴木龍一郎, 野崎香樹, 西尾基之, 森下和広, 岡田嘉仁, 木村博昭, 松野康二
2. 発表標題 1H-NMRメタボロミクスを用いたダイオウの成人T細胞白血病細胞増殖抑制活性予測モデルの検証
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞玉優里奈, 緒方翔子, 甲斐久博, 中良弘, 植沢芳広, 野崎香樹, 西尾基之, 森下和広, 岡田嘉仁, 木村博昭, 松野康二
2. 発表標題 DI-EI-MSメタボロミクスを活用したマオウの成人T細胞白血病細胞増殖抑制活性予測モデルの検証
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 甲斐久博
2. 発表標題 メタボロミクスを基軸とした天然素材の薬理活性予測
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会（令和元年度日本薬学会九州支部学術奨励賞 受賞講演）（長崎）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲斐久博, 眞玉優里奈, 緒方翔子, 植沢芳広, 鈴木龍一郎, 野崎香樹, 松岡史郎, 森下和広, 岡田嘉仁, 木村博昭, 松野康二
2. 発表標題 NMRメタボロミクスを活用したマオウの成人T細胞白血病細胞増殖抑制活性予測モデルの検証
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kai Hisahiro, Inohara Misaki, Furusato Takumi, Kashima Yuya, Naka Yoshihiro, Uesawa Yoshihiro, Nozaki Koju, Matsuoka Shiro, Morishita Kazuhiro, Okada Yoshihito, Kimura Hiroaki, Matsuno Koji
2. 発表標題 Direct Injection-Electron Ionization-Mass Spectrometry and NMR Metabolomics Method for Analyzing Rhubarb Species That Inhibit Adult T-cell Leukemia Proliferation
3. 学会等名 The 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (インスブルック、オーストリア)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪原美咲, 古里巧, 甲斐久博, 植沢芳広, 鈴木龍一郎, 野崎香樹, 松岡史郎, 森下和広, 岡田嘉仁, 松野康二
2. 発表標題 1H-NMRメタボロミクスを用いたダイオウの成人T細胞白血病(ATL)細胞増殖阻害活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古里巧, 猪原美咲, 甲斐久博, 植沢芳広, 鈴木龍一郎, 野崎香樹, 松岡史郎, 森下和広, 岡田嘉仁, 松野康二
2. 発表標題 NMRメタボロミクスを活用した成人T細胞白血病(ATL)細胞増殖抑制活性を持つマオウの種の判別
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kai Hisahiro, Kinoshita Kaoru, Harada Hiroshi, Uesawa Yoshihiro, Maeda Akihiro, Suzuki Ryuichiro, Okada Yoshihito, Takahashi Kunio, Matsuno Koji
2. 発表標題 Establishment of a Direct-Injection Electron Ionization-Mass Spectrometry Metabolomics Method and Its Application to Lichen Profiling
3. 学会等名 The 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12) (アンカラ、トルコ) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐久博, 長友志帆, 植沢芳広, 鈴木龍一郎, 國武久登, 森下和広, 岡田嘉仁, 松野康二
2. 発表標題 NMRメタボロミクスを活用した成人T細胞白血病(ATL)細胞増殖抑制活性の予測モデル
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐久博, 長友志帆, 鈴木龍一郎, 植沢芳広, 國武久登, 森下和広, 岡田嘉仁, 松野康二
2. 発表標題 NMRメタボロミクスを用いたブルーベリー葉の種の判別
3. 学会等名 日本生薬学会第64回年会(千葉)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州保健福祉大学薬学部薬学科衛生薬学講座 https://eisei.pharm.phoenix.ac.jp/ (アドレス変更予定) research map https://researchmap.jp/kai_1107hisahiro/

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
研究協力者	松野 康二 (MATSUNO Koji)		
研究協力者	岡田 嘉仁 (OKADA Yoshihito)		
研究協力者	植沢 芳広 (UESAWA Yoshihiro)		
研究協力者	森下 和広 (MORISHITA Kazuhiro)		
研究協力者	國武 久登 (KUNITAKE Hisato)		
研究協力者	松岡 史郎 (MATSUOKA SHIRO)		
研究協力者	野崎 香樹 (NOZAKI Koji)		
研究協力者	馬場 正樹 (BABA Masaki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	鈴木 龍一郎 (SUZUKI Ryuichi ro)		