

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06722

研究課題名(和文) 特定外来生物を活用した抗生活習慣病薬および抗悪性腫瘍薬のシーズ探索

研究課題名(英文) Search for seeds of anti-lifestyle-related disease drugs and antineoplastic drugs from invasive alien species

研究代表者

黒田 明平 (Kuroda, Minpei)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80266890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内において11種の特定外来生物(植物)を採集した。強いアルドースレダクターゼ阻害活性を示したオオキンケイギク(キク科)頭花のMeOHエキスから、14種の化合物を単離した。うち、1種の化合物は新規フラバノン二量体である。単離した5種の化合物は、強いアルドースレダクターゼ阻害活性を示した。また、2種の化合物は1mMの濃度において、HepG2ヒト肝がん細胞における強いAMPK活性化を示した。ナガエツルノゲイトウ(ヒユ科)根のMeOHエキスから2種の新規を含む14種のトリテルペン類を単離した。SBC-3小細胞がん細胞に対して、1種の30-ノルトリテルペン配糖体が強い細胞毒性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特定外来生物(植物)としてオオキンケイギク、ナガエツルノゲイトウ、オオフサモを含む11種を採集し、抗生活習慣病薬のシーズ探索としてアルドースレダクターゼ阻害活性とHepG2ヒト肝がん細胞におけるAMPK活性化作用を、抗悪性新生物薬シーズ探索としてSBC-3ヒト肺小細胞がんに対する細胞毒性を評価した。植物資源からの医薬品開発へとつながる新規二次代謝産物の発見が近年、減少傾向にあり、その一因として、海外の天然遺伝資源へのアクセス制限と利益配分(ABS)がある。本研究のように、容易にアクセス可能である特定外来生物(植物)を医薬品探索のソースとする研究手法は、有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Eleven invasive alien species (plants) were collected all over Japan. Fourteen compounds were isolated from the MeOH extract of flower heads of *Coreopsis lanceolata* (Asteraceae), which showed strong aldose reductase inhibitory activity. One of the compounds is a novel flavanone dimer. Furthermore, The five isolated compounds showed strong aldose reductase inhibitory activity. two compounds at 1 mM activated AMPK expression in HepG2 human hepatoma cells significantly compared to the control. Two new triterpenes, along with 12 known ones, were isolated from the MeOH extract of roots of *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae). A 30-nortriterpene glycoside showed strong cytotoxicity against SBC-3 human small-cell lung cancer cells.

研究分野：天然物化学

キーワード：特定外来生物 オオキンケイギク ナガエツルノゲイトウ アルドースレダクターゼ阻害 腫瘍細胞毒性 AMPK活性化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物(植物、微生物など)の生産する新規二次代謝産物は、医薬品の開発研究におけるバイオプローブとしてこれまで利用されてきた。しかしながら、天然物からの新規二次代謝産物の発見は近年、減少傾向にある。その一因として、遺伝資源へのアクセスの困難さや資源枯渇などが考えられる。一方近年、自然生態系に対する影響のみならず、経済被害など多岐にわたり、特定外来生物は世界的な問題となっている。そこで本研究では、医薬品探索ソースとしての特定外来生物(植物)に注目した。特定外来生物(植物)は日本に定着しているため、植物遺伝資源へのアクセスは容易であり、また、繁殖力が旺盛であるため医薬品探索ソースとして十分な量を確保できる。よって、特定外来生物(植物)に指定されている植物から調製したエキスを医薬品探索ソースとし、「生活習慣病」「悪性新生物」に関連する酵素や培養細胞を用いたスクリーニングにより医薬品の新規シーズ探索を行うこととした。特定外来生物(植物)に関する研究は、1)実態把握、2)生態系影響リスクの評価法の策定、3)種の同定技術の開発、4)駆除・防除法の開発が中心であり、文献を調査する限り、研究対象とする特定外来生物(植物)の系統的な化学成分探索および生物活性評価に関する研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の現在までの研究実績を基盤とし、特定外来生物(植物)からの抗生活習慣病薬および抗悪性腫瘍薬のシーズを探索する。特定外来生物(植物)は、枯渇の心配が無く、かつ、既に導入あるいは分布しているために ABS の問題が少ない。日本各地において採集した特定外来生物(植物)から調製したエキスを医薬品探索ソースとし、「生活習慣病」「悪性新生物」に関連する培養細胞や酵素などを用いたスクリーニングを実施する。抗生活習慣病薬のシーズの探索では、酵素(アルドースレダクターゼ、 α -グルコシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ等)に対する阻害活性や AMPK 活性化作用の評価を、抗悪性腫瘍薬のシーズ探索では培養腫瘍細胞(SBC-3 細胞、HepG2 細胞など)を用いた細胞毒性評価を、抽出エキスおよび単離した化合物に対して実施する。

3. 研究の方法

1) 特定外来植物の採集

各々の植物に対して関東地方環境事務所長宛に申請し、飼育など許可を受け、研究用に採集・移動させた。研究対象植物の繁殖力は高いため、kg 単位(乾燥重量)での確保を目標とする。

2) 活性評価

アルドースレダクターゼ(AR)阻害活性

ヒト組み換え体 AR を用い、DL-glyceraldehyde を基質として吸光度測定法により、抽出エキス、分離後の粗画分、単離した化合物などの AR 阻害活性を評価した。陽性対象として、エパルレストアット(IC₅₀: 0.28 ± 0.02 μM)を用いた。AR 阻害活性評価により糖尿病合併症治療薬のシーズ探索を行う。

AMPK 活性化の評価

1 次抗体として rabbit anti-phospho AMPK、2 次抗体として anti-rabbit IgG-HRP を用いた ELISA 法により評価した。陽性対象として、メトホルミンを用いた。AMPK 活性化評価により肝糖新生抑制を作用機序とする糖尿病治療薬のシーズ探索を行う。

細胞毒性

SBC-3 小細胞肺癌に対する細胞毒性は MTT アッセイ法により評価した。陽性対象として、エトポシド (IC_{50} : $1.6 \pm 0.15 \mu\text{M}$) を用いた。SBC-3 小細胞肺癌に対する細胞毒性の評価により、抗悪性腫瘍薬のシーズ探索を目指す。

3) 抽出・分離

メタノールで抽出し、その抽出物について、多孔質ポリスチレン樹脂 (Diaion HP-20)、シリカゲル、ODS を充填したカラムクロマト、分取 HPLC など、各種クロマトグラフィーを用いた常法により、活性成分を分離した。

4) 構造決定

高分解能 MS による分子式の決定、NMR (^1H NMR、 ^{13}C NMR、1D selective TOCSY、 ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC、HSQC-TOCSY、2D TOCSY、NOESY、ROESY など) の解析による平面構造と相対立体配置の決定、および、CD スペクトルによる絶対立体配置の決定を行った。

4. 研究成果

1) 特定外来生物 (植物) の採集

採集した特定外来生物 (植物) の植物名 (和名)、部位、採集地、採集量は以下の通りである。

Table 1

植物 (和名)	部位	採集地	採集量 (乾燥)
ナガエツルノゲイトウ	地上部	静岡県賀茂郡南伊豆町手石	2.5 kg
	根		1.8 kg
アレチウリ	地上部	東京都日野市南平	3.4 kg
	果実	茨城県稲敷郡河内町金江津	10 g
オオフサモ	茎葉	東京都日野市日野本町	5.0 kg
オオハンゴンソウ	頭花	長野県佐久市香坂	430 g
	茎葉		3.0 kg
	地下部		1.0 kg
オオカワヂシャ	全草	東京都日野市豊田	1.6 kg
	根		290 g
オオキンケイギク	頭花	東京都日野市東平山	270 g
	茎葉		2.6 kg
	地下部		690 g
ナルトサワギク	草部	徳島県板野郡松茂町	1.97 kg
	木部・根		435 g
ブラジルチドメグサ	全草	岡山県都窪郡早島町前潟	1.01 kg
ミズヒマワリ	全草	茨城県稲敷郡美浦村牛込	3.76 kg
ボタンウキクサ	全草	沖縄県うるま市赤野	1.39 kg
ツルヒヨドリ	全草	沖縄県うるま市宇堅	795 g

2) 特定外来生物 (植物) のアルドースレダクターゼ阻害活性

7 種の植物について AR 阻害活性を評価した結果、オオキンケイギク (茎葉 IC_{50} : $14.9 \pm 1.95 \mu\text{g/mL}$ 、頭花 8.36 ± 0.73)、オオフサモ (茎葉、 8.72 ± 1.32)、ナルトサワギク (草部、 18.7 ± 2.06) が強い活性を示した。一方、アレチウリ (地上部)、オオカワヂシャ (全草、根)、オオキンケイギク (地下部)、オオハンゴンソウ (頭花、茎葉、地下部)、ナガエツルノゲイトウ (地上部、根)、ナルトサワギク (木部・根) は活性を示さなかった (IC_{50} : $20 \mu\text{g/mL} <$)。

3) キク科オオキンケイギクの成分探索と活性評価

強い AR 阻害活性を示したオオキンケイギク頭花のメタノールエキスを Diaion HP-20 充填カ

ラムについて分画したところ、EtOH 溶出画分 (IC₅₀: 4.19 μg/mL) に活性が認められた。同画分について成分分離を行った結果、以下に示す化合物 1 - 14 を単離した。化合物 4、7、9、10、12 の本植物からの単離は本研究が初めてである。新規化合物 1 は、高分解能 MS よりフラボノイド二量体であることが推定された。¹H-NMR において、2 位と 3 位、2''位と 3''位は、スピン結合定数よりいずれもトランス配置であると決定された。HMBC スペクトル解析により、3 位プロトンから 3''位炭素への遠隔相関が観測された。NOESY スペクトル解析により、3 位から 2''位、3 位から 2''位、6'位から 2''位のプロトン間に遠隔相関が確認された。2 位、3 位、2''位、3''位の絶対配置は、立体が明らかになっている類似化合物との CD スペクトルの比較により、2*S*, 3*R*, 2''*S*, 3''*R* と決定された。

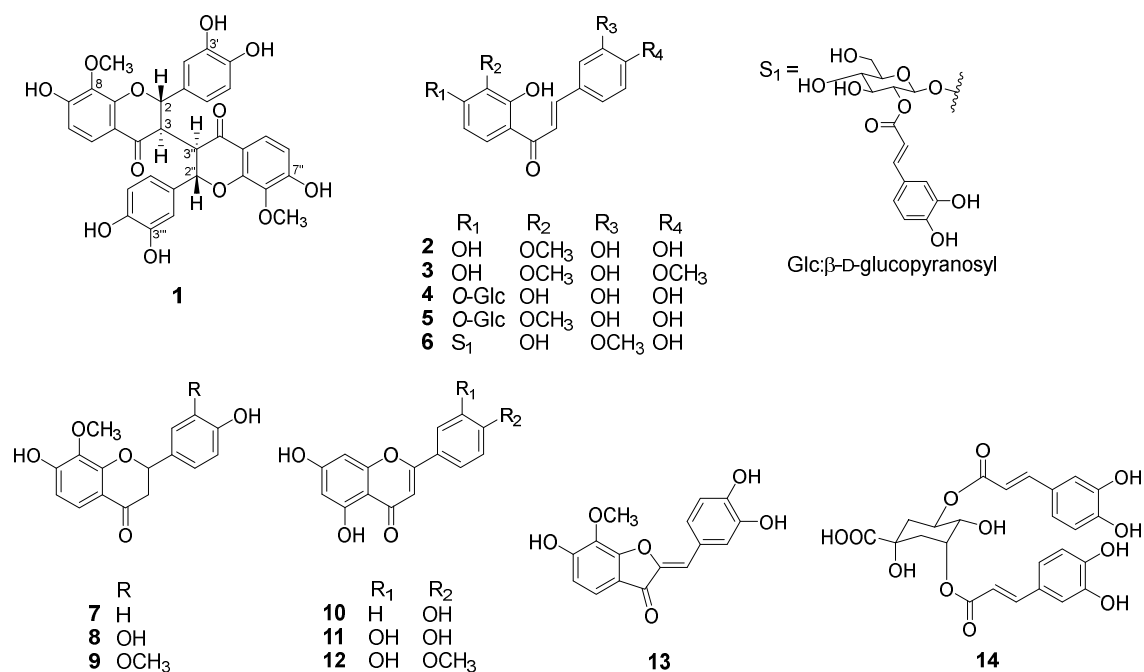


Fig. 1

Table 2. AR inhibitory activities of 1-14 and Epalrestat

Compounds	IC ₅₀ ¹⁾ (μM)	Compounds	IC ₅₀ ¹⁾ (μM)	Compounds	IC ₅₀ ¹⁾ (μM)
1	30.5 ± 4.37	6	12.8 ± 0.30	11	8.01 ± 0.76
2	4.39 ± 0.71	7	26.5 ± 2.53	12	19.5 ± 0.49
3	22.9 ± 0.34	8	31.5 ± 4.90	13	5.82 ± 0.88
4	9.99 ± 0.80	9	> 40	14	2.40 ± 0.59
5	20.6 ± 3.02	10	> 40	Epalrestat	0.28 ± 0.02

¹⁾ Each value is an average of three determinations.

化合物 1 - 14 の AR 阻害活性は Table 2 の通りである。化合物 2、4、11、13、14 は強い阻害活性が示した。カルコン類 (化合物 2 - 5) において、水酸基がメトキシ基、あるいは、グルコースに置換すると、阻害活性は減弱した。また、オオキンケイギク頭花のメタノールエキスおよび単離した化合物について、HepG2 肝がん細胞における AMPK 活性化を ELISA 法により評価した。その結果、メタノールエキス (1 mg/mL) と化合物 8 - 11、13 (いずれも 1mM) は、有意に HepG2 細胞に対して AMPK を活性化した。

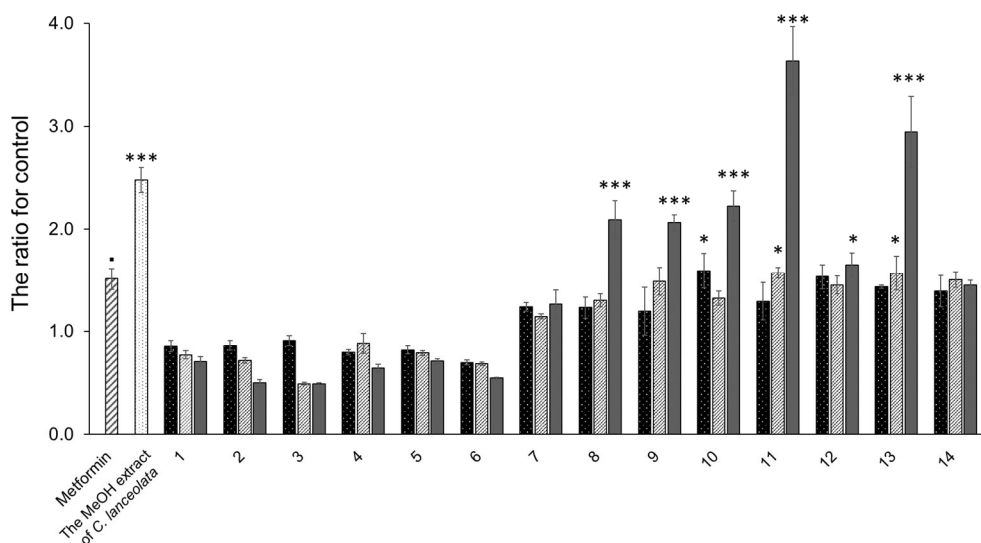


Fig. 2. Effect of **1–14** (0.01, 0.1, 1.0 mM), the MeOH extract of *C. lanceolata* (オオキンケイギク、1 mg/mL), and metformin (5.0 mM) on AMPK activity in HepG2 cells

AMPK activity was expressed as the fold induction compared with control treatment. Data are represented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). *** $p < 0.001$ vs. control, ** $p < 0.01$ vs. control, * $p < 0.1$ vs. control

4) ヒユ科ナガエツルノゲイトウの成分探索と活性評価

同植物の根のメタノール抽出物について成分分離を行った結果、以下に示す化合物を単離した。化合物 **8** および **9** は新規化合物である。化合物 **1 - 14** について、SBC-3 ヒト小細胞肺癌に対する細胞毒性を評価した結果、化合物 **11** (IC_{50} : 1.2 μ M) は強い細胞毒性を示した。

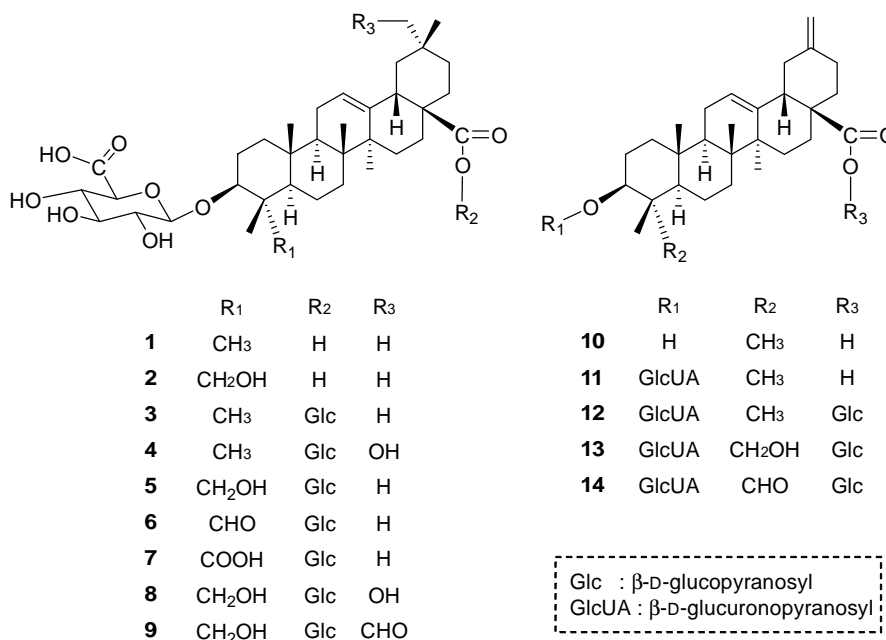


Fig. 3

5) アリノトウグサ科オオフサモの成分探索

同植物の茎葉のメタノール抽出物について成分分離を行った結果、4種の既知フラボノイド類を単離した。いずれの化合物も本植物からの単離報告は初めてである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井拓也、木村優花、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究(1) オオキンケイギク頭花の化学成分と aldose reductase 阻害活性について
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村優花、藤井拓也、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究(2) ナガエツルノゲイトウ地下部の化学成分と生物活性について
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤宏直、木村優花、藤井拓也、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、横須賀章人、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究(3) ナガエツルノゲイトウ地下部およびオオキンケイギク頭花の成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富澤一樹、加藤宏直、藤井拓也、松尾侑希子、深谷晴彦、三宅克典、黒田明平、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究(4) オオキンケイギク頭花の化学成分とAMPK活性化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分担者	三宅 克典 (Miyake Katsunori) (20597687)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	
研究 分担者	松尾 侑希子 (Matsuo Yukiko) (70434016)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------