

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07134

研究課題名(和文)炎症性脂質メディエーターに働きかける天然資源の選抜と有効成分の高選択的分離

研究課題名(英文) Discovery of new anti-inflammatory natural compounds through a highly selective isolation method

研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA, HIROYUKI)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：30253470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの炎症部位における脂質の変動を網羅的に解析した結果、炎症反応に関わりがある脂質メディエーターを特定することに成功した。特定した脂質メディエーターは、各種脂質の酸化体で、これらの化合物等が直接的あるいは間接的に炎症制御反応に関与している可能性が示唆された。また、様々な薬用資源を国内外から調達し、これらの試料についてエキスの調製を行った。標的受容体を固定した磁気ビーズを用いたプルダウンアッセイは、選択的に活性成分を見出しうる有効な手段であり、炎症性メディエーターに類似した構造を有する脂溶性天然物に焦点を当て、慎重な取り扱いが必要な天然化合物を単離し、その抗炎症作用を検証する計画を立てている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果として、炎症時に産生される炎症性メディエーターを特定することができ、慢性炎症を制御する経路を推測することができた。天然化合物は多種多様な構造を有しており、今回特定して炎症性メディエーターを制御する成分が含まれている可能性は極めて高い。今回の研究の成果として、国内外から極めて多数の有用資源を調達し、創薬資源として活用する材料を準備することができた。今後、プルダウンアッセイを組み合わせた効率的な天然物化学研究を展開することで、天然物化学研究の新たな潮流を生み出すことができると考えている。また、今後の成果は、慢性炎症が起因する様々な疾患に有用な資源の発見を促すものとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：The lipid mediators are key factors which are related with a variety of serious diseases such as cancer, diabetes, and dementia. The aim of this study is to find the compounds from natural resources around the world which are useful to suppress chronic inflammation. Firstly, the change of lipid in the inflamed site of a rat was analyzed by LC/MS/MS and identified lipid mediators in chronic inflammation. The amounts of oxidized lipids in the samples were changed significantly. These lipids must be indices for screening natural products which control chronic inflammation. In this research, valuable extracts of natural resources were extracted and prepared for the screenings, as well. A pull-down assay using receptors which regulate the expression of lipid mediators will be designed for isolation of active compounds in the future studies.

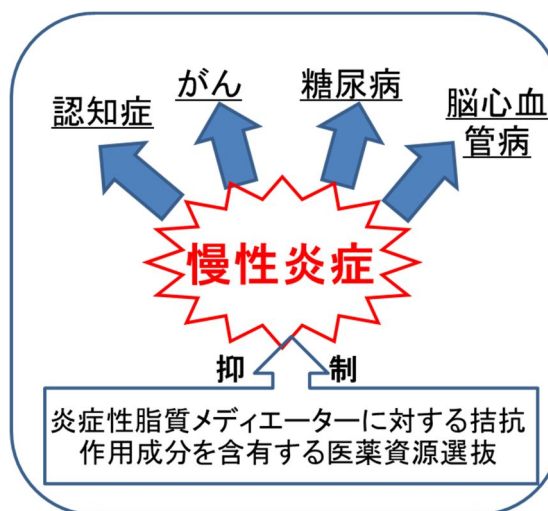
研究分野：生薬学、天然物化学、薬用植物学

キーワード：脂質メディエーター 天然化合物 プルダウンアッセイ 天然医薬資源

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は老化や難治性疾患を引き起こすことが指摘されており、本研究では炎症を抑える医薬シードの発見を目指した効果的な資源探索研究を企図した。薬用植物からはサリシン、パクリタキセル、ピンカアルカロイド、アルテミシニンに代表される様々な医薬品シードや医薬品が発見され、医療現場で活用されている。天然資源に目を向けると大村智教授らによって発見されたアベルメクチンは抗寄生虫薬のシードとして広く知られており、また、藤田哲朗教授らにより冬虫夏草から発見されたマイリオシンを医薬シードとして開発されたフィンゴリモドは多発性硬化症の有効な治療薬として世界で使用されている。天然資源からフィンゴリモドのようなブロックバスターのシードを見出すことは容易ではないが、薬効評価システムの進歩は目覚ましく、すでに詳細に解析したと考えられていた薬用資源からも新規に活性成分を発見できる可能性は十分に考えられた。また、世界には未だ精査されていない天然資源が数多く存在することから、先端的なスクリーニングシステムを構築し、詳細に解析することは、興味深い抗炎症作用を示す二次代謝産物の発見につながる方策として期待が持たれた。

また、近年分子標的薬のような選択的に標的分子と相互作用する医薬品の開発が主流となっている。申請者は、選択性の高い医薬品シードを天然資源から見出す手法としてプルダウンアッセイに着目し、本法を適用した選択的な抗炎症作用を有する有用成分の発見を企図し、本研究課題の「問い」の一つは、プルダウンアッセイを応用することで効率的な医薬シードの探索が実行できるかどうかであり、本研究課題の成果は様々な疾患を対象とした効率的な医薬資源探索法の構築に役立つものと考えた。

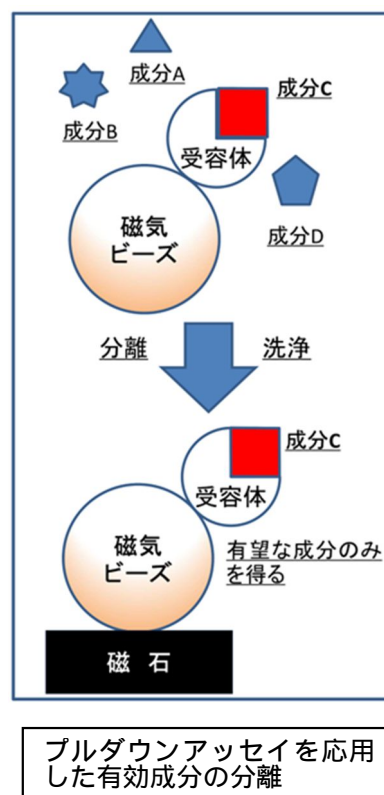


2. 研究の目的

現在、平均寿命と健康寿命の差が注目されている。その差は9~12年といわれており、この間、多くの国民が何らかの形で介助の必要な生活を余儀なくされている。この現実には、本人は勿論のこと、近親者にとっても由々しき現実であり、健康寿命を少しでも延ばすことができれば、大きな社会的波及効果が期待できる。一方、慢性炎症は老化や難治性疾患を引き起こすことが指摘されていることから、炎症の制御は正に健康寿命の延長をもたらすと考えられる。炎症は様々な要因による複雑な病態であるが、中でも炎症性脂質メディエーターとの関連が近年注目されていることから、我々は種々の薬用植物資源から脂質メディエーターを介した炎症応答を制御する天然由来成分を網羅的に探索し、新規医薬シードを発見することを本研究テーマとして企図した。

多種多様な成分を含んだ天然資源から有効成分を効率よく見出すことは容易ではなく、様々な手法を駆使した天然物化学研究が進められている。申請者は、プルダウンアッセイを活用した選択的な薬効成分の探索手法を有効な手段として着目し、炎症に深く関わるタンパク質を担体に固定化したプルダウンアッセイによる簡便・効果的な有用成分の精製を実現できると考えて本研究を着想した。

本研究は、世界各国の様々な薬用資源から慢性炎症を制御しうる新規医薬資源の発見を目指したもので、申請者はこれまでの研究活動を通して国際的ネットワークを構築しており、十分な研究基盤を整えて研究を開始した。



3. 研究の方法

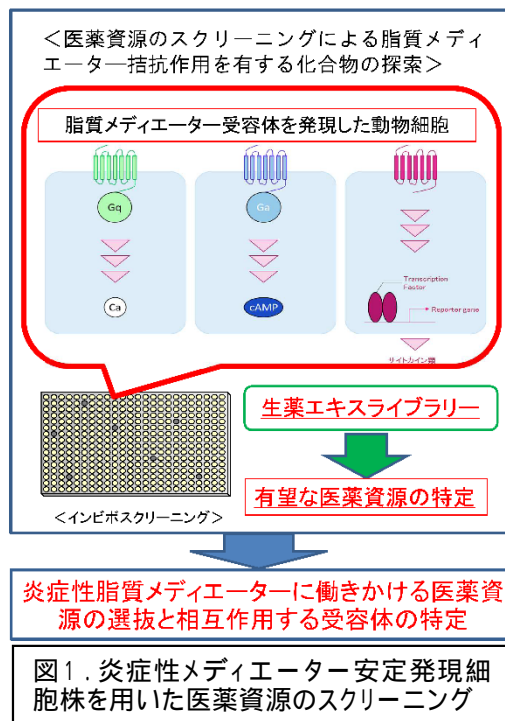
(1) 炎症性脂質メディエーターの特定 (参照: 図1)

プロスタグランジン類をはじめとする脂質メディエーターは炎症反応の実行因子として古く

から注目されている。カラギナンを投与した各種炎症モデルラットを対象として炎症部位における脂質の変動を LC/MS/MS 脂質メディエーターメソッドパッケージ Ver. 2(島津製作所)を用いて網羅的に解析することで、炎症時に最も顕著に変動する、すなわち最も炎症反応に寄与する可能性が高い脂質メディエーターを特定した。

(2) 迅速スクリーニングシステムの構築

特定した炎症性脂質メディエーターの受容体について調査を行い、インビトロでの薬効評価系として最適で効果的なシステムを構築する。具体的には、炎症モデルマウスにおいて変化する候補受容体の下流のシグナル経路 (Ca²⁺や cAMP など) を特定する。さらに、候補受容体の発現ベクターを用いた過剰発現系、または siRNA を用いた発現抑制系にて特定したシグナル経路が変動するか否かインビトロにて検討する。次項の一次スクリーニングシステムの構築を目的として、
 の条件を満たした候補受容体の安定発現細胞株を作成し、炎症状態を模倣した条件下にて特定したシグナル経路が期待通りの変動を示すことを確認する。



(3) 各種エキスの調製と一次スクリーニング

山口東京理科大学薬学部収蔵の生薬エキストラライブラリー、マヒドン大学薬学部(タイ王国)とベトナム薬用植物研究所の天然資源ライブラリーから各種サンプルエキスを調製し、確立した迅速抗炎症作用評価システムに供する

4. 研究成果

炎症反応は、がん、認知症、生活習慣病など様々な疾患に関与する複雑な生体反応である。我々は、国内外の多種多様な薬用資源が産生する代謝産物の中から上記疾患の治療、予防に役立つ生理活性成分の発見を目指した研究を遂行している。

2019年度は、完全フロイントアジュバントやホルマリンを投与した各種炎症モデルマウスを対象として炎症部位における脂質の変動を LC/MS/MS 脂質メディエーターメソッドパッケージ Ver. 2(島津製作所)を用いて網羅的に解析することで、炎症時に最も顕著に変動する、すなわち最も炎症反応に寄与する可能性が高い脂質メディエーターを特定する実験を予定していた。しかしながら、本学部が設置されて間もないことから、動物実験施設の利用開始が予定より1年遅れることとなった。したがって、以上の研究は、予定より遅れて実施することに変更した。2019年度は、様々な薬用資源、生薬を収集し、エキスの調製を中心に行った。活性成分のスクリーニング系に供試する薬用植物エキスの調製については順調に遂行でき、多種多様なサンプルを得ることができた。このことは、これまで培ってきた共同研究を通じた国際交流の賜物といえる。また、以上の脂質メディエーターを分析する LC/MS/MS の分析手法を各種脂質メディエーターの予備的な検討に用い、その実効性を評価した。その結果、高感度な分析が可能であることを明らかにすることができた。

2020年度は、カラギナンにより炎症を惹起したラットの炎症部位における脂質の変動を LC/MS/MS 脂質メディエーターメソッドパッケージ Ver. 2(島津製作所)を用いて網羅的に解析した。また、様々な薬用資源を国内外から調達し、これらの試料についてエキスの調製を行った。まず、脂質メディエーターの解析結果については、炎症時に顕著に変動する、すなわち炎症反応に関わりがある脂質メディエーターを特定することに成功した。特定した脂質メディエーターは、各種脂質の酸化体であり、これらの化合物等が直接的あるいは間接的に炎症制御反応に関与している可能性が示唆された。この結果は、炎症反応を制御する化合物が働きかける受容体等を特定する上で重要な結果を得た。

2021年度は、特定した炎症性脂質メディエーターの受容体について調査を行い、インビトロでの薬効評価系として炎症モデルラットにおいて変化する候補受容体の下流のシグナル経路を特定し、さらに、候補受容体の発現ベクターを用いた過剰発現系の構築を試みた。しかしながら、受容体遺伝子の増幅が困難であり、現時点では候補受容体の過剰発現系が達成できていない現状にある。そこで、多種多様な資源を活用した生薬エキストラライブラリーの構築を継続して行った。さらに、炎症性メディエーターに類似した構造を有する天然化合物に焦点を当て、慎重な取り扱いが必要な天然化合物を数種類単離し、その抗炎症作用を検証する計画を立てている。

標的受容体を固定した磁気ビーズを用いたプルダウンアッセイは、極めて多数の成分を含むサンプルの中から活性が期待できる成分を効率的かつ選択的に見出しうる有効な手段と考えており、今後、新規な医薬シードの発見を目指して新世代の天然物化学を展開していく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	楠瀬 直喜 (KUSUNOSE NAOKI) (10725964)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教 (25503)	

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