

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 4月28日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590015

研究課題名(和文) ニーム(インドセンダン)成分の機能性評価と高度利用に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the Bioactivity and Intensive Use of the Constituents of *Azadirachta indica* (Neem)

研究代表者 秋久 俊博

(AKIHISA TOSHIHIRO)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号：30060213

研究成果の概要(和文)：ニーム種子メタノール抽出物から31種のリモノイドと1種のジテルペノイドを、一方、ヘキサン抽出物から17種のリモノイドを単離した。これらのうち7種は新規化合物であり、構造決定を行った。これらの化合物についてB16メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制活性、マウス耳殻における抗炎症活性、Epstein-Barr ウィルス早期抗原(EBV-EA)発現抑制活性、及び細胞傷害活性を評価し、幾つかの化合物が顕著なメラニン産生抑制活性、抗炎症活性、EBV-EA抑制活性、及びアポトーシス誘導による細胞傷害活性を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Thirty-one limonoids and one diterpenoid, and seventeen limonoids were isolated from the methanol and hexane extracts, respectively, of neem seeds. Among these compounds, seven were new compounds, and their structures were determined spectroscopically. These compounds were evaluated for their melanogenesis-inhibitory, anti-inflammatory, Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) activation inhibitory, and cytotoxic activities. Some of these compounds have been revealed to possess potent melanogenesis-inhibitory, anti-inflammatory, EBV-EA activation inhibitory, and cytotoxic activities with apoptosis induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ニーム、リモノイド、メラニン産生抑制、抗腫瘍活性、発がん予防効果

1. 研究開始当初の背景

ニーム樹はインド原産の常緑樹であり、この樹の葉、樹皮、種子、根などの様々な部位の抽出物は抗炎症、抗腫瘍、免疫賦活、抗高血糖、抗菌や、とりわけ殺虫効果などの生物活性を持つとされ、インドでは様々な疾病の民族薬として、また、農業関連害虫の制御に古くから用いられている。主要な活性成分としてはリモノイド、フラボノイドやポリサッカライドなどが知られている。ニーム種子の生物活性成分に関する最近の研究で、研究代表者らは nimolicinol, nimbin や α -nimolactone などのリモノイド類やノルトリテルペン類化合物に、マウス B16 melanoma 細胞において arbutin を上回る顕著なメラニン産生抑制活性を見出した。また、これらの B16 細胞に対する毒性は arbutin 同様極めて弱く、安全性の高い美白剤素材になり得る可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ニーム成分のメラニン産生抑制活性については他には報告例がなく、ニーム樹が天然生物活性分子の重要な宝庫であることを考えると、ニーム樹にはさらに優れた生物活性を持つ多数の成分の存在が予想される。従って本研究では、ニーム樹の更なる高度利用を図るためにニーム成分の探索と生物活性機能（メラニン産生抑制活性、発がん予防効果、抗腫瘍活性、抗炎症活性、抗酸化活性など）の評価を通して、ニーム樹成分を素材とした新規な優れた機能性分子を創製し、ニーム樹の高度利用を図る。

3. 研究の方法

本研究では、ニーム樹の各部位の抽出物から成分の単離・構造決定を行い、単離化合物及び化学構造修飾物について下記の機能を評価し、新規なメラニン産生抑制剤、発がん予防・抗腫瘍剤を創製する。これによりニーム樹の更なる高度利用を図る。

(1) 新規なメラニン産生抑制剤の開発：マウス B16 melanoma 細胞を用いたメラニン産生抑制活性及び MTT 法による細胞傷害活性を指標として、主にリモノイド類化合物を中心に評価を行い、安全性の高い美白剤の創製を目指し、優れた活性分子を見出す。

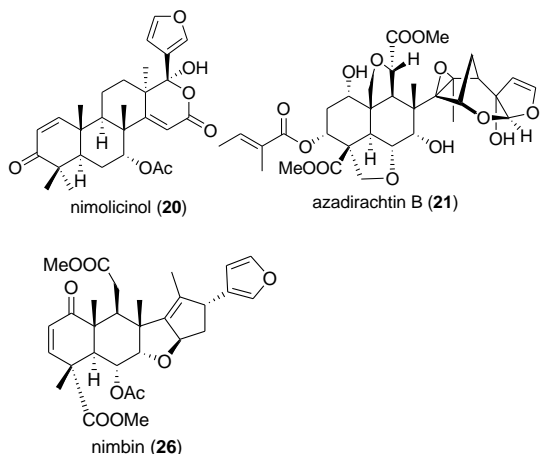
(2) 新規な発がん予防剤及び抗腫瘍剤の開発：発がん予防機能には、腫瘍細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、細胞分化誘導、血管新生抑制、抗炎症、抗酸化や DNA 合成酵素阻害活性などの因子が関与しているが、本研究ではこれらの機能を一次スクリーニング試験で

評価し、優れた活性を示した分子はさらにモデル動物を用いた *in vivo* 系試験で評価する。また、アポトーシス、シグナル伝達系、細胞周期などの解明を行い、細胞内のシグナル伝達機構の修復を行い、悪性腫瘍の良性腫瘍への転換、腫瘍自体を消失へと導く新規な分子標的型の発がん予防剤及び抗腫瘍剤の創製を行う。

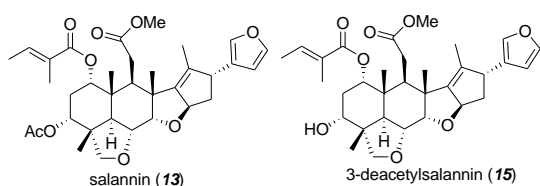
(3) 新規な抗炎症剤の開発：マウスの耳殻に 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を塗布すると発赤炎症が誘発される。この TPA 誘発炎症に対する抑制活性を指標として、被検物質の抗炎症活性を評価する。この方法で強い抑制効果を示す物質は、マウス皮膚二段階発がん試験でもプロモーション過程を強く抑制し、これらには密接な相関関係があることが確認されている。

4. 研究成果

(1) ニーム種子のメタノール抽出物から 31 種のリモノイド (1-31) 及び 1 種のジテルペノイド (32) を単離した。これらのうち 6 種は新規化合物で、それらは 15-hydroxyazadiradione (3), 7-benzoyl-17-hydroxynimbinol (5), 23-deoxy-azadiradione (12), limocin E (13), 23-epilimocin E (14), 及び 7α -acetoxy-3-oxoisocopalanga-1,13-dien-15-oic acid (32) の構造を持つことを明らかにした。これら 32 種の化合物 (1-32) についてマウス B16 melanoma 細胞上でのメラニン産生抑制活性を評価し、nimolicinol (20) や nimbin (26) など 5 種の化合物は殆ど細胞毒性を示さず、顕著な抑制活性 (検体濃度 25 μ g/mL で抑制率 74-91%) を持つことを明らかにした。また、7 種の化合物について TPA (1 μ g/耳殻) 誘発マウス耳殻炎症における抗炎症活性を評価し、nimolicinol (20) など 6 種の化合物に顕著な活性 (ID_{50} 値 0.09-0.26 mg/耳殻) を見出した。一方、全 32 種の化合物について EBV-EA 発現抑制活性を評価し、全ての化合物に中程度の抑制活性 (IC_{50} 値 230-501 mol 比/32 pmol TPA) を確認した。さらに、azadirachtin B (21) はマウスを用いた peroxynitrite (ONOO-) 誘発二段階発がん試験において優れた抗イニシエーター効果を示すことを確認した。以上の結果から、nimolicinol (20) と nimbin (26) は新規な美白剤として、また、nimolicinol (20) は新規な抗炎症剤として有望であるとみなされる。また、azadirachtin B (21) は新規な発がん予防剤として有用と考えられる (下記雑誌論文③)。

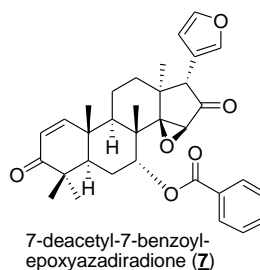


(2) ニーム種子のヘキサン抽出物から 17 種のリモノイド(1-17)を単離した。これらのうち化合物 6 は新規化合物で、17-defurano-17-oxosalannin の構造を持つことを明らかにした。6 種の化合物(6, 11-15)についてマウス B16 melanoma 細胞上でのメラニン産生抑制活性を評価し、salannin (13)及び 3-deacetylsalannin (15)は、殆ど細胞毒性を示さずに顕著な抑制活性(検体濃度 25 µg/mL で抑制率 79-85%)を持つことを明らかにした。11 種の化合物(2, 3, 5, 6, 9-15)について TPA (1 µg/耳殻)誘発マウス耳殻炎症における抗炎症活性を評価し、これらの何れもが優れた抗炎症活性 (ID₅₀ 値 0.22-0.57 mg/耳殻)を示すことを明らかにした。さらに、7 種の化合物(6, 11-16)について EBV-EA 発現抑制活性を評価し、これらが中程度の抑制活性 (IC₅₀ 値 410-471 mol 比/32 pmol TPA)を示すことを見出した。以上、salannin (13)及び 3-deacetylsalannin (15)は新規美白剤として有望な化合物である(下記雑誌論文②)。ニーム樹皮及び葉部成分とそれらの生物活性については現在引き続き研究中である。



(3) 15 種の azadiradione 型 (1-15), 5 種の gedunin 型 (16-20), 4 種の azadirachtin 型 (21-24), 9 種の nimbin 型 (25-33), 及び 2 種の分解型 (34, 35) の計 35 種のニーム種子から単離を行ったリモノイドについて、5 種のヒトがん細胞における細胞傷害活性を評価した。7 種の化合物(3, 6, 7, 16, 18, 28, 29)は 1 種あるいは 2 種以上の細胞において細胞傷害活性を示した。これらのうち、7-deacetyl-7-benzoyl-epoxyazadiradione

(7), 7-deacetyl-7-benzoylgeduin (18), 及び 28-deoxonimbolide (28)は HL60 白血病細胞に対して顕著な活性を示した (IC₅₀ 値 2.7-3.1 µM). 化合物 7, 18, 及び 28 は HL60 細胞において初期アポトーシスを誘起することを flow cytometry により明らかにした。Western blot 分析により、これらの化合物は HL60 細胞において caspase-3, -8, 及び -9 を活性化することが示された。この事実は、化合物 7, 18, 及び 28 が HL60 細胞において mitochondria 及び death receptor 経路の両経路でアポトーシスを誘導することを示唆するものである。さらに、化合物 7 は正常白血球細胞 (RPMI 1788) に対しては弱い傷害活性を示すにすぎない事を確認した。従って、化合物 7 は白血病細胞に対して高い選択的毒性を持ち、白血病に対する抗腫瘍剤リード化合物として有望であることが示唆された(下記雑誌論文①)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Takashi Kikuchi, Koichi Ishii, Taisuke Noto, Akitomo Takahashi, Keiichi Tabata, Takashi Suzuki, Toshihiro Akihisa, Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem). *Journal of Natural Products*, 査読有, 74 巻, 2011 年, 866-870.
- ② Toshihiro Akihisa, Akitomo Takahashi, Takashi Kikuchi, Mio Takagi, Kensuke Watanabe, Makoto Fukatsu, Yukiko Fujita, Norihiro Banno, Harukuni Tokuda, Ken Yasukawa, The melanogenesis-inhibitory, anti-inflammatory, and chemopreventive effects of limonoids from *n*-hexane extract of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) seeds. *Journal of Oleo Science*, 査読有, 60 巻, 2011 年, 53-59.
- ③ Toshihiro Akihisa, Taisuke Noto, Akitomo Takahashi, Yukiko Fujita,

Norihiro Banno, Harukuni Tokuda, Kazuo Koike, Takashi Suzuki, Ken Yasukawa, Yumimko Kimura, Melanogenesis inhibitory, anti-inflammatory, and chemopreventive effects of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem). Journal of Oleo Science, 査読有, 58 巻, 2009 年, 581-594.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① Takashi Kikuchi, Koichi Ishii, Taisuke Noto, Akitomo Takahashi, Keiichi Tabata, Takashi Suzuki, Toshihiro Akihisa, Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seed extract of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem), The 3rd International Conference on Natural Products for Health and Beauty (3rd NATPRO), 平成 23 年 3 月 18 日, The Emerald Hotel Bangkok.
- ② 渡邊賢介, 高橋章友, 菊地崇, 高木美緒, 秋久俊博, 深津誠, 藤田幸子, 伴野規博, 徳田春邦, 安川憲, ニーム種子ヘキサノ抽出物由来リモノイド成分の生物活性, 日本生薬学会第 57 回年会, 平成 22 年 9 月 26 日, 徳島文理大学.
- ③ 高木美緒, 高橋章友, 石井孝一, 菊地崇, 伴野規博, 鈴木孝, 秋久俊博, ニーム葉部リモノイド成分の細胞傷害活性, 第 53 回日本大学理工学部学術講演会, 平成 21 年 11 月 28 日, 日本大学理工学部.
- ④ 高橋章友, 菊地崇, 渡邊賢介, 伴野規博, 深津 誠, 田畑恵市, 鈴木孝, 秋久俊博, ニーム種子由来リモノイド類化合物の細胞傷害活性及びメラニン産生抑制活性, 第 53 回日本大学理工学部学術講演会, 平成 21 年 11 月 28 日, 日本大学理工学部.
- ⑤ 石井孝一, 能登泰輔, 二瓶雅俊, 高橋章友, 高木美緒, 秋久俊博, 田畑恵市, 鈴木孝, ニーム種子由来リモノイド化合物のアポトーシス誘導活性, 日本生薬学会第 56 回年会, 平成 21 年 10 月 4 日, 京都薬科大学.
- ⑥ 高木美緒, 秋久俊博, 高橋章友, 石井孝一, 菊地崇, 伴野規博, 安川憲, 徳田春邦, ニーム葉部リモノイド成分の細胞傷害および抗炎症活性, ならびに EBV 活性化抑制効果, 日本薬学会第 129 年会, 平成 21 年 3 月 28 日, 国立京都国際会館.
- ⑦ 高橋章友, 秋久俊博, 能登泰輔, 菊地 崇, 伴野規博, 藤田幸子, 鈴木孝, 安川憲, 木村由美子, ニーム種子抽出物不ケン化脂質の新規ノルトリテルペノイド成分, 第 52 回日本大学理工学部学術講演会, 平成 20 年 11 月 29 日, 日本大学理工学部.

- ⑧ 高木美緒, 秋久俊博, 高橋章友, 石井孝一, 菊地崇, 伴野規博, 孫奕, 安川憲, 木村由美子, ニーム葉部リモノイド成分の単離および細胞傷害活性, 第 52 回日本大学理工学部学術講演会, 平成 20 年 11 月 29 日, 日本大学理工学部.
- ⑨ 高木美緒, 高橋章友, 能登泰輔, 秋久俊博, 孫奕, 安川憲, 木村由美子, ニーム葉部のリモノイド成分, 日本油化学会第 47 回年会, 平成 20 年 9 月 17 日, 日本大学理工学部.
- ⑩ 高橋章友, 秋久俊博, 能登泰輔, 伴野規博, 藤田幸子, 鈴木孝, 木村由美子, ニーム種子由来成分のメラニン産生抑制活性, 日本油化学会第 47 回年会, 平成 20 年 9 月 17 日, 日本大学理工学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋久 俊博 (AKIHISA TOSHIHIRO)
日本大学・理工学部・教授
研究者番号: 30060213

(2) 連携研究者

鈴木 孝 (SUZUKI TAKASHI)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号: 40318457
安川 憲 (YASUKAWA KEN)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号: 00130625