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　15 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究（Ａ）
研究期間：2008～2010
課題番号：20681021
研究課題名（和文）　脳神経再生医薬を目指した天然物基盤ケミカルバイオロジー研究

研究課題名（英文）　Natural Products based Chemical Biology for Regenerative Medicine

研究代表者
荒井　緑（ARAI A. MIDORI）
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：40373261

研究成果の概要（和文）：本研究では神経幹細胞を活性化し種々の神経細胞に分化させる化合物を天然物を基盤として見いだすことを目標とした。神経幹細胞で働く転写因子を標的とする独自に開発した細胞アッセイ、タンパク質アッセイを用い、活性な天然物を得ることに成功した。また、天然物骨格を基盤とする合成化合物ライブラリーの構築を行い、これらの中からも神経再生医薬のリードと期待できる化合物を見いだすことに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have developed “protein- and cell-based screen methods” to find regenerative medicine of neuron. Several active natural products were isolated, which act on transcriptional factors in neural stem cells. Moreover, from synthetic compound library based on natural products several new active compounds were found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総　計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：天然物化学、生物有機化学
科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学
キーワード：ケミカルバイオロジー、天然物、有機化学、再生医療、神経幹細胞

１．研究開始当初の背景

1992 年に成人脳で神経幹細胞が発見されてから，脳梗塞，アルツハイマー，パーキンソンなどの脳疾患に対し，神経幹細胞を用いた再生医療が期待されているが，神経幹細胞を活性化し種々の神経細胞に分化させる化合物の報告は非常に少なかった．ヒト脳内の内在性神経幹細胞を賦活化させ，神経損傷あるいは神経疾患の医療に応用し得る化合物が神経再生医薬として望まれていた．

２．研究の目的

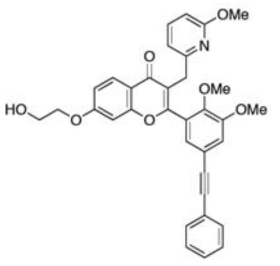
本研究ではヒト脳内の内在性神経幹細胞を賦活化させ，神経損傷あるいは神経疾患の医療に応用し得る天然物基盤の低分子医薬リードを探索することを目的とする．また，神経幹細胞の生体内シグナルは未解明な部分が多く，本研究で見いだされた化合物は生化学的な分子ツールとして有用と考えられる．

３．研究の方法

本研究では，当研究室保有の天然資源ライブラリー（タイ，バングラデシュの熱帯植物，放線菌，変形菌，海草類）とすでに当研究室で単離精製した天然化合物，及び天然物骨格を基盤とした天然物様合成ライブラリーを用い，神経幹細胞の分化を活性化する化合物を見いだす．具体的な分子標的は，神経幹細胞の増殖・分化の制御に関わるbasic-helix-loop-helix（bHLH）型転写因子群として独自に構築した細胞アッセイ系とタンパク質ベースのアッセイ系を用いて，単離，構造決定，生物活性やメカニズムを明らかにする．

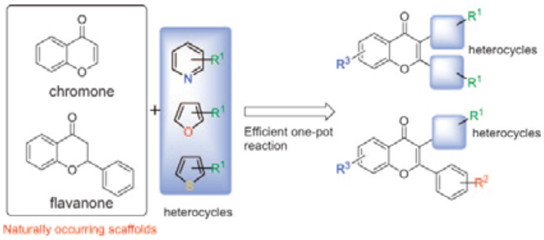
４．研究成果

（１） Hes1 プロモーター活性を阻害する天然物様化合物の探索とその神経幹細胞分化への影響：神経幹細胞の分化を阻害する bHLH 因子の一つ Hes1 に着目し，そのプロモーター阻害剤の探索を行う細胞アッセイ系を構築した．Hes1 プロモーター部を有し下流にルシフェラーゼ発現部位を有するコンストラクトを安定導入した細胞を作成した．本アッセイ系を用いて，当研究室で開発した方法により作成に成功したヘテロ環を有するクロモン・フラボノイドライブラリーより，数種の Hes1 プロモーター阻害剤を見いだすことに成功した（特願 2010-167577）．Hes1 プロモーター阻害剤の報告例は世界でもほとんど無い．Hes1 の発現を阻害すれば神経幹細胞の分化を促進すると考えられることから，本成果は神経再生医薬に繋がる波及効果は非常に高いものである．

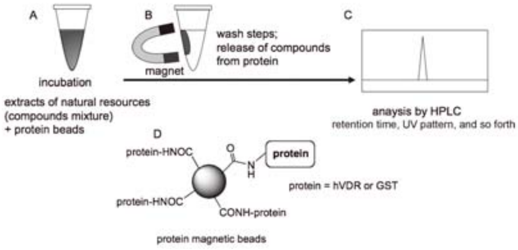


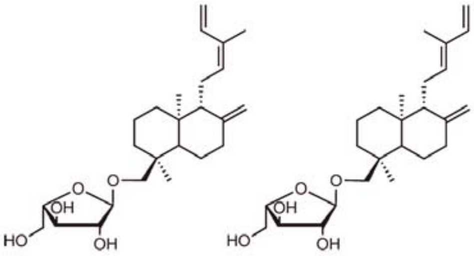
活性化合物の一つ

（２）ヘテロ環置換基を有するクロモン・フラボノイドの効率的合成法の開発：上記（１）に記述したライブラリーの合成に先立ち，それまで達成されていなかったヘテロ環置換基を有するクロモン・フラボノイドの効率的合成法の開発に成功した（*Chem. Asian. J.* 2008，特願）．

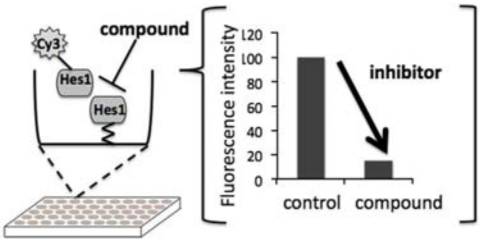


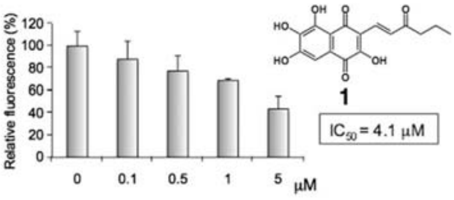
（３）タンパク質担持磁気ビーズを用いる迅速的天然物探索法の開発：磁気ビーズにタンパク質を担持させ，天然物エキスから新規天然物を迅速に単離することに初めて成功した（*Chem. Asian J.* 2009）．



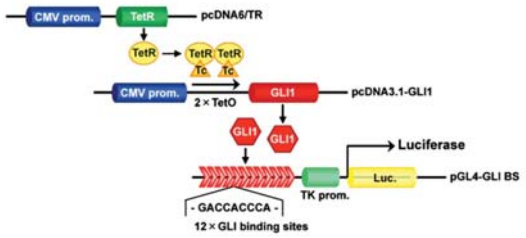


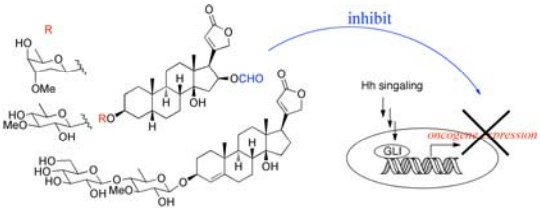
（４）Hes1 二量体形成阻害剤の発見： 蛍光化タンパク質を用いる蛍光プレートアッセイを開発し，天然物より初の Hes1 二量体阻害剤を見いだした（*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010）．これらは細胞内でも活性を有することを見いだした． Hes1 二量体形成阻害により神経幹細胞の分化活性化に働く転写因子の発現増加が期待されることから，本メカニズムを有する神経再生医薬リードとなる可能性がある．





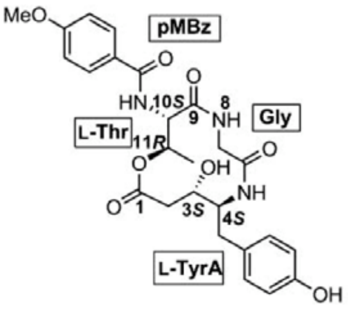
（５）発生に関わる重要シグナルの天然由来阻害剤の発見：幹細胞の分化・増殖にも関わる Wnt およびヘッジホッグシグナルの阻害剤を，天然物より単離・構造決定に成功した．特にヘッジホッグシグナルのアッセイ系は独自に構築したものである(*Org. Biomol. Chem.*, 2011 他)．単離した天然物は，Hh 関連タンパク質，mRNA の発現を阻害した．



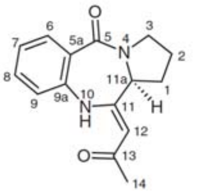


（６）天然物の全合成研究：天然物骨格を有するライブラリー合成に先立ち，２種の天然物の全合成を達成し，未決定であった絶対立体配置を決定した．また，それらの誘導体を合成し，活性評価を行った．Melleumin A，B とその誘導体には Wnt シグナル阻害活性を見いだした(*Org. Biomol. Chem.*, 2011).

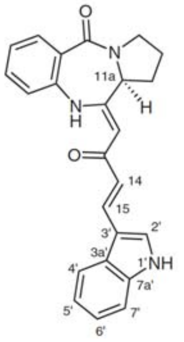
Fuligocandin A，B の誘導体ではがん細胞をアポトーシスに導くデスリガンドである TRAIL 耐性がん細胞に対し, TRAIL との併用によって細胞毒性を引き起こすことを見いだした(*Synlett*, 2010).



Melleumin A



Fuligocandin A



Fuligocandin B

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 28 件）

① Arai, M. A., Approaches to Neural Stem Cells and Cancer Cells based on Natural Products, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 59, 2011, 417-426

② Arai, M. A.; Tateno, C.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Kawabe, S.; Ishibashi, M., New Hedgehog/GLI-signaling inhibitors from *Adenium obesum*, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 9, 2011, 1133-1139

③ Arai, M. A.; Hanazawa, S.; Uchino, Y.; Li, X.; Ishibashi, M., Total synthesis and evaluation of Wnt signal inhibition of melleumin A, B and their derivatives, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 8, 2011, 5285-5293

④ Ippongi, Y.; Ohtsuki, T.; Toume, K.; Arai, M. A.; Yamamoto, Y.; Ishibashi, M., Tubiferic acid, a new 9,10-secocycloartane triterpenoid acid isolated from the myxomycete *Tubulifera arachnoidea*, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 59, 2011, 279-281

⑤ Rifai, Y.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M., New Hedgehog/GLI signaling inhibitors from Excoecaria agallocha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 21, 2010, 718-722

⑥ Arai, M. A.; Seto, J.; Ahmed, F.; Uchiyama, K.; Ishibashi, M., Practical Total Synthesis of Fuligocandins A, B, *Synlett*, 査読有, 16, 2010, 2498-2502

⑦ Ahmed, F.; Toume, K.; Sadhu, S. K.; Ohtsuki, T.; Arai, M. A.; Ishibashi, M., Constituents of *Amoora cucullata* with TRAIL resistance overcoming activity, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 8, 2010, 3696-3703

⑧ Rifai, Y.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M., Terpenoids and flavonoid glycoside from *Acacia pennata* as Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors, *J. Nat. Prod.*, 査

読有, 73, 2010, 995-997

⑨ Arai, M. A., Kobatake, E., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Kato, S., Ishibashi, M., A Method for the Rapid Discovery of Naturally Occurring Products using Proteins Immobilized on Magnetic Beads and Reverse Affinity Chromatography, *Chem. Asian J.*, 査読有, 4, 2009, 1802-1808

⑩ Arai, M. A., Masada, A., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Ishibashi, M., The first Hes1 dimer inhibitors from natural products, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 19, 2009, 5778-5781

⑪ Ishibashi, M., Arai, M. A., Search for Bioactive Natural Products Targeting Cancer-Related Signaling Pathways, *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, 査読無, 67, 2009, 1094-1104

⑫ 荒井　緑, 石橋正己, 天然物を基盤とするWntおよびHedgehogシグナル阻害剤の探索, *ファルマシア*, 査読無, 45, 2009, 197-202

⑬ Hosoya, T., Arai, M. A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M., Naturally Occurring Small-molecule Inhibitors of Hedgehog/GLI-mediated Transcription, *ChemBioChem*, 査読有, 9, 2008, 1082-1092

⑭ Arai, M. A., Tateno, C., Hosoya, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M., Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors from *Zizyphus cambodiana*, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 16, 2008, 9420-9424

⑮ Arai, M. A., Sato, M., Sawada, K., Hosoya, T., Masami Ishibashi, M., Efficient Synthesis of Chromone and Flavonoid Derivatives with Diverse Heterocyclic Units, *Chem. Asian J.*, 査読有, 3, 2008, 2056-2064

⑯ Arai, M. A., Uchino, Y., Hanazawa, S. Li, X., Kimura, N., Ishibashi, M., Synthesis and Evaluation of Isomers of Melleumin B from the Myxomycete Physarum melleum; An Approach for Wnt Signal Inhibitor Trusted in Nature, *Heterocycles*, 査読有, 76, 2008, 1425-1438

⑰ Hanazawa, S., Arai, M. A., Li, X., Ishibashi, M., Determination of absolute stereochemistry, total synthesis, and evaluation of peptides from the myxomycete *Physarum melleum*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 18, 2008, 95-98

〔学会発表〕（計 40 件）

① （招待講演）荒井緑，天然物を基盤とした神経幹細胞，癌細胞へのアプローチ，第 27 回「ケミカルバイオロジー研究領域」勉強会（理研セミナー），2011 年 2 月 23 日，理化学研究所和光本所

② M. A. Arai, N. Yanase, K. Koryudzu, Y. Maekawa, M. Ishibashi, Chromone and flavonoid library with diverse heterocyclic units and their bioactivity on neural stem cells, Pacifichem 2010, December 18, 2010, Honolulu, U.S.A.

③ Y. Rifai, M. A. Arai, S. K. Sadhu, T. Koyano, T. Kowithayakorn, M. Ishibashi, Hedgehog/GLI Signaling Inhibitors from *Acacia pennata* and *Excoecaria agallocha*, 第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2010 年 11 月 12 日，東京

④ 荒井緑，柳瀬なつき，小柳津和音，石橋正己，神経再生医薬を目指した「フラボノイド＋ヘテロ環」ライブラリーの構築，第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム，2010 年 11 月 1 日，名古屋

⑤ 石井健祐，荒井緑，一本木之人，石橋正己，変形菌*Tubulifera arachnoidea* 由来新規トリテルペンTA1 の立体化学の決定，36 回反応と合成の進歩シンポジウム，2010 年 11 月 2 日，名古屋

⑥ 荒井緑，瀬戸淳也，柳瀬なつき，小柳津和音，前川雄一，内山健人，石橋正己，天然物骨格＋複素環化合物の創製と生物活性，第 40 回複素環化学討論会，2010 年 10 月 14 日，仙台

⑦ 荒井緑，森實孟生，石橋正己，チャームブレスレット型Hes1 阻害剤の設計と合成，第 54 回日本薬学会関東支部大会，2010 年 10 月 2 日，八王子

⑧ 當銘一文，Firoj Ahmed，中澤孝文，大槻崇，荒井緑，石橋正己，TRAILシグナルを介してがん選択的にアポトーシスを誘導する天然物の探索，第 52 回天然有機化合物討論会，2010 年 9 月 30 日，静岡

⑨ 荒井緑，小柳津和音，石橋正己，大塚俊之，影山龍一郎，小谷野喬，T. Kowithayakorn，*Butea superba*からの神経幹細胞で働く転写因子Ngn2 誘導作用を指標とした天然物の探索，日本生薬学会第 57 年会，2010 年 9 月 25 日，徳島

⑩ (招待講演) M. A. Arai, Approaches to neural stem cells based on natural products, The 1st Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences between College of Pharmacy, Seoul National University and Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, August 27, 2010, Chiba

⑪ (招待講演) 荒井緑，天然物様化合物を軸とした 癌細胞へのアプローチ，日本薬学会第 130 年会　シンポジウム，2010, 3, 28, 岡山

⑫ (招待講演) 荒井緑，天然物様化合物を軸とした神経幹細胞，癌細胞へのアプローチ，日本薬学会第 130 年会　奨励賞受賞

講演，2010, 3, 29，岡山大学

⑬ (招待講演) 荒井緑，天然物様化合物を軸とした癌細胞へのアプローチ，日本薬学会第 130 年会　シンポジウム, 2010, 3, 28, 岡山大学

⑭ (招待講演) 荒井緑，天然物様化合物を軸とした神経幹細胞，癌細胞へのアプローチ，理化学研究所　理研シンポジウム，2010, 1, 29，理化学研究所和光本所

⑮ (招待講演) 荒井緑，神経幹細胞を標的とする有用低分子の探索〜天然物を基盤として〜, 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム　若手研究者シンポジウム「次世代創薬」2009, 11, 27,　東京

⑯ 荒井緑　(代表)，Approaches for discovery of naturally occurring products using immobilized proteins，The 11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry，2009, 11, 13, Nagoya

⑰ 荒井緑　(代表)，Fuligocandin A, Bの合成と癌細胞のTRAIL耐性克服を目指した誘導体の合成，第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2009, 11, 15，金沢

⑱ 荒井緑　(代表)，脊髄損傷後の神経再生を目指した化合物の合成と活性評価，第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム，2009, 11, 15，金沢

⑲ 荒井緑　(代表)，標的タンパク質相互作用を指標とした天然物探索，第 51 回天然有機化合物討論会，2009, 10, 7，名古屋

⑳ 荒井緑，天然物骨格を基盤とする多様性化合物の効率的合成法と活性評価，第 38 回複素環化学討論会，2008, 11, 21，福山

㉑ 荒井緑　(代表)，変形菌由来天然物メレウミン類の全合成研究とそのWntシグナル阻害活性，第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム，2008, 11, 4，京都

㉒ 荒井緑　(代表)，タンデム型マイケルアルドール反応を利用した固相合成によるクロモン､フラボノイド誘導体のライブラリー構築研究，第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム，2008, 11, 5，京都

㉓ 荒井緑，Wntシグナル阻害剤の天然物を基盤とする開発研究，第 50 回天然有機化合物討論会，2008，2008, 10, 2，福岡

㉔ 荒井緑, Wnt, Hedgehogシグナル阻害剤の探索と合成，モレキュラー・キラリティー2008，2008, 5, 23，岡山

〔図書〕（計 2 件）

① 荒井緑，千葉日報社，千葉学ブックレット, 千葉の健康６, 薬学の世界をのぞく，2011，50-51

② 村田道雄，石橋正己，木越英夫，佐々木誠 (監訳), 荒井孝義, 荒井緑, 有本博一, 石橋正己, 及川雅人, 大石徹, 木越英夫, 北将樹, 此木敬一, 佐竹真幸, 佐々木誠, 末永聖武, 早川一郎, 松岡茂, 松森信明, 村田道雄（共訳），東京化学同人，ソレル有機化学（下）p.645-675，p.759-785, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計１件）

名称：フラボノイト由来 Hes1 プロモーター阻害剤

発明者：荒井緑・柳瀬なつき・小柳津和音・石橋正己

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特願 2010-167577

出願年月日：2010.7.26

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/kouzou/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者

荒井　緑（MIDORI A. ARAI）

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40373261