

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23404007

研究課題名(和文) バングラデシュ天然薬物資源調査

研究課題名(英文) Field Study on natural medicinal resources in Bangladesh

研究代表者

石橋 正己 (Ishibashi, Masami)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90212927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：平成23年から26年にかけて研究代表者は毎年バングラデシュを訪問し、熱帯植物を中心にバングラデシュ天然薬用資源の調査を行った。その結果、現地特有の植物種や現地で栽培された薬用植物を中心に100種以上の植物種を収集した。得られた植物エキスに対して種々のシグナル経路(ウイント、ヘッジホッグ、トレイルシグナル等)に対するスクリーニング試験を行い、活性を示した植物エキスについて活性成分の分離精製を行い、数多くの生物活性天然物を単離し、それらの作用メカニズムに関する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In 2011-2014 the representative of this research project (Masami Ishibashi) visited Bangladesh every year and investigated field-study on natural medicinal resources in Bangladesh mainly on tropical plants. As a result, more than 100 kinds of plant samples were collected. They are mostly characteristic kinds of plants in Bangladesh. Extracts of these plant materials were subjected to screening tests against signaling pathways such as Wnt, hedgehog, and TRAIL, and from extracts of hit samples, several new bioactive natural products were isolated, and their biological effects on signaling pathways were examined.

研究分野：天然物化学

キーワード：薬学 生理活性 植物 有機化学 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

バングラデシュは暑熱な気候と肥沃な土壌に恵まれ、熱帯植物を中心として多様な天然薬用資源に富んでいる。しかしながら、天然薬物探索材料として対象とされているものは比較的少ない。そこで当研究室では、平成20年より新しい天然物資源の開拓・展開、拡充・強化をめざして「バングラデシュ天然薬物資源調査」を開始した。これは同年に科学研究費補助金・基盤研究B(海外学術調査)(20404004)が採択されたことに基づく。本科研費は幸いにも平成23年度に継続して2期目が採択された(23404007)。さらに平成26年度には3期目も採択され、現在活発に研究が進行中である(26305001)。本研究成果報告書は2期目(23404007、平成23年度から26年度まで)に関するものである。

2. 研究の目的

本研究では、バングラデシュ・国立クルナ(Khulna)大学薬学部 Samir K. Sadhu 教授およびバングラデシュ・国立ダッカ(Dhaka)大学薬学部 Firoj Ahmed 教授との密接な共同研究により、現地で薬用植物として言い伝えられ、利用されている熱帯植物を中心にバングラデシュ天然薬物資源の調査を行い、さらにそのバングラデシュ天然薬物資源からの有用な生物活性天然物を発見し、その有効利用を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 薬用資源調査：バングラデシュ国において、現地の薬用植物の専門家・クルナ大学薬学部 Samir K. Sadhu 教授およびダッカ大学薬学部 Firoj Ahmed 教授の指導のもと、系統な現地産薬用植物資源調査を行う。首都ダッカ市、Sadhu博士の拠点であるクルナ市、およびその他のバングラデシュのいくつかの地方都市の周辺を中心に、これまでに未採取・未利用の植物種を中心に調査・採取を行う。当初採取する薬用植物材料は、予備的スクリーニングに最低限必要な量にとどめ、その予備的スケールでの植物等の抽出エキスを作製する。
- (2) 植物エキスコレクション構築とスクリーニング試験：上記の調査に基づき、薬用資源植物等の抽出エキスコレクションを構築する(千葉大学および日本大学において行う)。得られた抽出エキスをを用いて、疾患に関連するシグナル経路(ウイント、ヘッジホッグ、およびトレイルシグナル)阻害活性試験等のスクリーニング試験を行う。これらスクリーニングは主に千葉大学において中心に担当する。スクリーニングによって得られたデータは随時バングラデシュ側に情報を開示し、良好な活性を示した植物種について、原材料植物の量的確保を行う。
- (3) 生物活性物質の分離・精製・化学構造の決定：(2)で選別された植物種について

アルコール等の有機溶媒で抽出後、溶媒分画により数種の画分に分配し、各画分について生物活性試験を行う。良好な活性を示した植物エキスについて、活性成分の分離・精製を行う。得られた活性物質に対して、各種スペクトル解析や化学的手法に基づき、化学構造を解明する。さらに、活性成分の細胞への効果、タンパク質・mRNAの発現への影響などを調べることにより作用機構の解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 薬用資源調査(バングラデシュにおける植物現地調査):研究代表者・石橋は、平成23年度から26年度までの間に4回バングラデシュ国を訪問し、クルナ大学薬学部 Samir K. Sadhu 教授およびダッカ大学薬学部 Firoj Ahmed 教授の指導のもと、現地の薬用植物の専門家の協力を得て、バングラデシュ天然薬物調査を行った。
平成23年12月12日から12月19日：バングラデシュ西北部(ボグラ地区およびジョイプルハット地区)
平成24年11月21日から11月27日：バングラデシュ南部(ポリシャル地区およびバゲルハット地区)
平成26年3月18日から3月23日：バングラデシュ西北部(シャトキラ地区)
平成26年12月16日から12月23日：バングラデシュ西北部(シレット地区)
これら各地区において各地区特有の植物種や現地で栽培される薬用植物を中心に幅広く植物資源の調査・採取を行った。採取した薬用植物等は約150種以上にのぼった。
- (2) 抽出エキスコレクションの作製およびスクリーニング：上記の調査によって採取した植物サンプルについて、有機溶媒による抽出を行い、抽出エキスコレクションを作製した。得られた抽出エキスをを用いて種々のシグナル経路(ウイント、ヘッジホッグ、トレイルシグナルおよびbHLH転写因子など)に対する阻害作用等に関するスクリーニング試験を行い、ヒットサンプルを選別した。
- (3) 活性成分探索：上記スクリーニングにより選別されたヒットサンプルについて次のような活性成分の探索を行った。
ウイントシグナルに作用する活性成分：トウダイグサ科 *Excoecaria indica* からウイントシグナル活性化作用をもつフォルボール型ジテルペン3種を単離した。一方、ガガイモ科 *Calotropis gigantea* 浸出物からはウイントシグナル阻害作用をもつ活性成分として6種のカルデノリド化合物を単離した。これらはTCF/カテニン転写活性を濃度依存的に阻害し、3種の大腸がん細胞(SW480, HCT116, DLD1)に細胞毒性

を示した。活性成分の一つのcalotropinはCK1タンパク質を増加させることによりWntシグナルを阻害することが明らかとなった。また、Wntシグナル阻害成分として、オオバコ科植物からジテルペン scopadulciol, センダン科植物からリモノイドtrichillin Hを単離し、これらの作用機構に関する知見を得た。また、ウイントシグナル活性化作用に関するスクリーニングの結果、バングラデシュ産ミカン科植物 *Zanthoxylum rhetsa* の抽出エキスは、ウイントシグナルの指標となるルフェラーゼ活性を約4倍上昇させた。本抽出エキスから活性成分を精製し、フラボノイド配糖体を単離した。一方、トウダイグサ科植物由来のピリドン型化合物ricininはCK1活性を阻害することによりWntシグナルを活性化させた。

ヘッジホッグシグナルに作用する活性成分：トウダイグサ科 *Excoecaria agallocha* からヘッジホッグシグナル阻害作用をもつ新規フラボノイド配糖体2種を単離した。ヘッジホッグシグナル阻害作用に関するスクリーニングを行い、活性の認められた *Vitex negundo* (クマツヅラ科) について活性成分の探索を行い、新規化合物 nishindanol を含む9種のジテルペンやフラボノイド化合物を単離した。現地名「シャタバリ」として市販されている生薬サンプルの化学成分分析を行った結果、ヘッジホッグ阻害作用をもつ *Stemona* アルカロイド類を単離した。現地において本植物は *Asparagus* 属と同定されていたが、本化学成分研究の結果、*Stemona* 属植物であることが示唆され、国立医薬品食品衛生研究所との共同研究に基づく塩基配列解析の結果と一致した。ナス科植物からヘッジホッグシグナル阻害作用をもつ高度に酸化されたステロイド誘導体 physarin H を単離した。

トレイルシグナルに作用する活性成分：センダン科 *Amoora cucullata* からは、トレイル耐性克服作用に関するスクリーニングにより4種の新規化合物を含む11種の化合物を単離した。キク科 *Saussurea hypoleuca* の葉部抽出物より TRAIL耐性克服作用をもつ4種のセスキテルペンラクトンを単離した。このうち santamarin は 15 μ M において40%、mokkolactone は 40 μ M において45%、TRAIL併用時に TRAIL耐性胃がん細胞 AGS の細胞生存率を低下させた。

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12件)

Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.;

Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Scopadulciol, isolated from *Scoparia dulcis*, induces β -catenin degradation and overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis ligand resistance in AGS human gastric adenocarcinoma cells" *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 864-872 (査読有)

Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Limonoids with Wnt signal inhibitory activity isolated from the fruits of *Azadirachta excelsa*" *Phytochem. Lett.* **2015**, 11, 280-285 (査読有)

Tahmina, H.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Isolation of alkamides with death receptor-enhancing activities from *Piper chaba*" *Heterocycles* **2015**, 90, 1317-1322 (査読有)

Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. "Ricinine: a pyridone alkaloid from *Ricinus communis* that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1 α " *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4597-4601 (査読有)

Park, H.-Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Calotropin: a cardenolide from *Calotropis gigantea* that inhibits Wnt signaling by increasing casein kinase 1 α in colon cancer cells" *ChemBioChem* **2014**, 15, 872-878 (査読有)

Arai, M. A.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Physalin H from *Solanum nigrum* as Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA complex formation" *Beil. J. Org. Chem.* **2014**, 10, 134-140 (査読有)

Shimada M.; Ozawa, M.; Iwamoto, K.; Fukuyama, Y.; Kishida, A.; Ohsaki, A. "A lanostane triterpenoid and three cholestane sterols from *Tilia kiusiana*" *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, 62, 937-941 (査読有)

Toume, K.; Kamiya, K.; Arai, M. A.; Mori, N.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Xylogranin B: a potent Wnt signal inhibitory limonoid from *Xylocarpus granatum*" *Org. Lett.* **2013**, 15, 6106-6109 (査読有)

Arai, M. A.; Fujimatsu, T.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Hh signaling inhibitors from *Vitex negundo*, naturally occurring inhibitor of GLI1-DNA complex" *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 1012-1018 (査読有)

Etoh, T.; Kim, Y-P.; Ohsaki, A.; Komiyama, K.; Hayashi, M. "Inhibitory effect of erythraline on Toll-like receptor signaling pathway in Raw264.7 cells" *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, 36, 1363-1369 (査読有)

Minakawa, T.; Toume, K.; Arai, M. A.;

Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Eudesmane-type sesquiterpenoid and guaianolides from *Kandelia candeli* in a screening program for compounds to overcome TRAIL-resistance" *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1431-1435 (査読有)
Ohsaki, A.; Ozawa, M.; Komiyama, K.; Isobe T. "The cytotoxic activity of diterpenoids from *Isodon* species" *Nat. Prod. Commun.* **2012**, 7, 977-978. (査読有)

〔学会発表〕(計 31 件)

- 1 U. K. Karmakar, 石川直樹, 當銘一文, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 荒井緑, 石橋正己, "Xanthium strumarium からの TRAIL 耐性克服作用をもつセスキテルペンラクトン", 日本薬学会第 135 年会 (2015), 2015 年 3 月 27 日, 神戸
- 2 F. Ahmed, S. K. Sadhu, 石橋正己, "Entada scandens からの TRAIL 耐性克服作用をもつ天然物の探索", 日本薬学会第 135 年会 (2015), 2015 年 3 月 27 日, 神戸
- 3 M. Ishibashi, "Natural products screening studies on disease and development signaling pathways", The 4th Annual Conference of the Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS2015), February 10, 2015, Washington, DC, U.S.A.
- 4 K. Toume, "Search for bioactive natural products that affect on WNT signaling pathway", 2014 Joint Symposium of the Natural Products Research Institute at Seoul National University and the Institute of Natural Medicine at University of Toyama, December 10, 2014, Seoul, Korea
- 5 M. Ishibashi, "Calotropin, a cardenolide from *Calotropis gigantea*, with Wnt signal inhibition activity through increase of casein kinase 1 α ", The 9th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, Abstract p. 163, December 3, 2014, Kuala Lumpur, Malaysia
- 6 M. Ishibashi "Natural products screening studies targeting Wnt, Hedgehog, and TRAIL signaling pathways", The 14th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama 2014, Abstract p. 33-36, October 28, 2014, Toyama
- 7 M. Ishibashi "Natural products screening studies on Wnt and Hedgehog signaling pathways", The 28th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 8th International Conference on Biodiversity (ISCNP-28 & ICOB-8), Abstract p. 171-172, October 20-24, 2014, Shanghai, China
- 8 當銘一文, 朴賢英, 神谷謙太郎, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea および *Xylocarpus granatum* からのウイントシグナル阻害成分の探索", 第 56 回天然有機化合物討論会講演要旨集 187-192, 2014 年 10 月 17 日, 高知
- 9 R. G. Fuentes, 荒井緑, 小谷野喬, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Limonoids from *Azadirachta excelsa* inhibit Wnt/ β -catenin signal", 日本生薬学会第 61 年会講演要旨集 114 (2014), 2014 年 9 月 14 日, 福岡
- 10 T. Habu, K. Toume, M. A. Arai, S. K. Sadhu, F. Ahmed, M. Ishibashi, "Isolation of sesquiterpene lactones with TRAIL-resistance overcoming activity from *Saussurea hypoleuca*", 日本生薬学会第 61 年会講演要旨集 202 (2014), 2014 年 9 月 14 日, 福岡
- 11 U. K. Karmakar, K. Toume, M. A. Arai, S. K. Sadhu, F. Ahmed, M. Ishibashi, "Sesquiterpene lactones from *Xanthium strumarium* by bioassay guided isolation for TRAIL-resistance overcoming activity", 日本生薬学会第 61 年会講演要旨集 203 (2014), 2014 年 9 月 14 日, 福岡
- 12 石橋正己, "バングラデシュ天然薬物資源調査", 第 4 回天然物パワーシンポジウム, 2014 年 7 月 19 日, 東京
- 13 當銘一文, "メラニン生成に関わるウイントシグナルを制御する天然物の探索", 第 159 回フレグランスジャーナルセミナー, 2014 年 6 月 20 日, 東京
- 14 荒井緑, "天然物を基盤とした神経幹細胞分化活性化剤の探索と創成", 新規素材探索研究会第 13 回セミナー, 2014 年 6 月 6 日, 横浜
- 15 當銘一文, "ウイントシグナルに作用する生物活性天然物の探索", 第 5 回ケミカルバイオロジー若手研究者ワークショップ, 2014 年 5 月 29 日, 名古屋
- 16 R. G. Fuentes, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Screening of Wnt Signal Inhibitors from *Scoparia dulcis*", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 29 日, 熊本
- 17 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea 由来カルデノリド calotropin のウイントシグナル阻害作用", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 29 日, 熊本
- 18 大石健介, 當銘一文, 荒井緑, 溝口貴正, 伊藤素行, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "*Ricinus communis* などからの Wnt シグナルに作用する天然物の探索", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 29 日, 熊本
- 19 大石健介, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化作用をもつ天然物の探索", 第 5 回食品薬学シンポジウム講演要旨集 151-153 (2013), 2013 年 11

- 月 1-2 日, 大阪
- 20 R. G. Fuentes, K. Toume, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn, S. K. Sadhu, F. Ahmed, and M. Ishibashi, "Curcuma comosa and Scoparia dulcis: Potential sources of active compounds with Wnt signal inhibitory activity", 13th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other bioactive compounds, September 25, 2013, Kawaguchiko, Abstract p. 108
- 21 R. G. Fuentes, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "Activity-guided isolation and identification of Wnt signal inhibitors from Scoparia dulcis", 日本生薬学会第 60 年会講演要旨集 249 (2013), 2013 年 9 月 8 日, 北海道
- 22 U. K. Karmakar, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Bioassay guided isolation of anticancer compounds with TRAIL-resistance overcoming activity from Datura stramonium", 日本生薬学会第 60 年会講演要旨集 159 (2013), 2013 年 9 月 7 日, 北海道
- 23 H. Tahmina, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Isolation of a series of alkaloids from Piper chaba with death-receptor enhancing activity", 日本生薬学会第 60 年会講演要旨集 158 (2013), 2013 年 9 月 7 日, 北海道
- 24 神谷謙太郎, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Xylocarpus granatum の新規リモノイドの Wnt シグナル阻害作用", 日本薬学会第 133 年会 (2013), 2013 年 3 月 29 日, 横浜
- 25 大石健介, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Zanthoxylum rhetsa からの Wnt シグナルを活性化する天然物の探索", 日本薬学会第 133 年会 (2013), 2013 年 3 月 29 日, 横浜
- 26 大崎愛弓, 小宮山哲平, 小沢正晃, Smir K SADHU, Ahmed FIROJ, 桑田幸恵, 袴塚高志, 石橋正己, "シャタバリの成分と関連に関する検討", 日本薬学会 133 回年会, 横浜, 2013 年 3 月 28 日, 横浜
- 27 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea からの Wnt シグナル阻害作用をもつカルデノリド" 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム講演要旨集 88-90 (2012), 2012 年 11 月 2 日, 大阪
- 28 神谷謙太郎, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Xylocarpus granatum からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然化合物の探索" 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム講演要旨集 85-87 (2012), 2012 年 11 月 2 日, 大阪
- 29 神谷謙太郎, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Xylocarpus granatum 由来の Wnt シグナル阻害作用をもつ新規リモノイド", 日本生薬学会第

- 59 年会講演要旨集 222 (2012), 2012 年 9 月 18 日, 千葉
- 30 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea 由来の Wnt シグナル阻害するカルデノリド", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 220 (2012), 2012 年 9 月 18 日, 千葉
- 31 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Cardenolides Isolated from Calotropis gigantea with Wnt Signaling Inhibitory Activity", The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy, Abstract p.330, August 24-25, 2012, Seoul, Korea

〔図書〕(計 4 件)

野依良治, 奥山格, 柴崎正勝, 檜山為次郎 (監訳), 石橋正己, 岩澤伸治, 大嶋孝志, 金井求, 木越英夫, 忍久保洋, 白川英二, 橋本俊一, 吉田潤一 (共訳), "ウォーレン有機化学第 2 版 (上)" 東京化学同人, **2015**, p. 41-76, 273-306, 415-436

M. Ishibashi, "Bioactive heterocyclic natural products from actinomycetes having effects on cancer-related signaling pathways" *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Kobayashi, J. (Eds.); Springer; Wien, **2014**, 99, 147-198

石橋正己 (翻訳), 有機スペクトル解析ワークブック, 東京化学同人, **2014**, 251

石橋正己, "生体における化学反応", 生体有機化学, 橋本祐一・村田道雄編, 東京化学同人, **2012**, 53-68

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/kassei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 正己 (ISHIBASHI MASAMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90212927

(2) 研究分担者

大崎 愛弓 (OHSAKI AYUMI)
日本大学・文理学部・准教授
研究者番号：50161360

(3) 連携研究者

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

當銘 一文 (TOUME KAZUFUMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：80563981