

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450170

研究課題名(和文) 植物性食品および生薬中の抗腫瘍物質としての高分子ポリフェノール研究の展開

研究課題名(英文) Polyphenols with higher molecular weights as antitumor substances in botanical foods and crude drugs

研究代表者

波多野 力 (Hatano, Tsutomu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50127578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ギョリュウ科のTamarix属の組織、および組織培養によって得られたシュートなどから、新規な高分子ポリフェノールを得て、それらの構造を確立した。また、ギョリュウ科植物とともに、フトモモ科植物、ダビディア科植物、マンサク科植物などから得たタンニンおよび関連ポリフェノールを得てそれらの抗腫瘍効果について検討し、選択的な細胞毒性を有するものがあることを認めた。さらにタンニンミミックの合成法をも確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Investigation of polyphenols with high-molecule structures isolated from plant organs and cultured shoots of Tamarix species of the family Tamaricaceae led to the isolation and structure elucidation of several new tannins. Antitumor effects of tannins and related polyphenols obtained from plants including those of Tamaricaceae, Myrtaceae, Davidiaceae, and Hamamelidaceae were examined, and several ones among them showed selective cytotoxic effects. Synthetic methods of tannin mimics were also established.

研究分野：生薬学・天然物化学

キーワード：ポリフェノール タンニン 加水分解性タンニンオリゴマー ギョリュウ科 Tamarix nilotica Tamarix aphylla Tamarix tetrandra 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

天然ポリフェノールの中でも比較的高分子の化合物群は、構造の類似した化合物が同一植物中に共存して分離が困難であるばかりでなく、化学変化を受けやすく、また種々のクロマト担体とも非可逆的な吸着をしやすいため、構造解明の遅れた化合物群であったが、この4半世紀の間に分離精製および構造決定の技術的進歩を基礎として化学的な研究が進展し、特に近年、抗酸化作用を基礎とした多くの作用が明らかにされつつある。また特に、抗腫瘍作用に関連した研究については、変異原性抑制作用、発がんプロモーション抑制作用、移植腫瘍に対する *in vivo* での抗腫瘍作用を有するものがあることが示されてきた。

培養がん細胞を対象とした天然からの細胞毒性物質の検討は数多くあるが、共同研究者の坂上らは、数系統の培養ヒト口腔扁平上皮がん細胞およびヒト間葉系正常細胞（歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髓細胞）を維持しており、これらの細胞を用いて *in vitro* において腫瘍選択性を評価できるシステムを開発してきた。

これまでに、エジプトの乾燥地帯に生育するギョリュウ科植物 *Tamarix nilotica* の葉から、分子内に一つのグルコース核のみを有する加水分解性タンニン単量体の nilotin M2, M3, M4 や、2つのグルコース核を有する2量体 nilotin D4, D5, D7, D8, D9 などを新規化合物として単離し、それぞれの構造を確立してきた。また、この過程で得た共存する単量体およびオリゴマーも併せて、坂上らの培養細胞を使用した実験系で検討を進めた結果、それらの中に抗腫瘍効果を示すものがあることを認めてきている。

2. 研究の目的

上述の背景のもと、本課題では、次のよう

な内容を直接的な目的として設定し検討を行った。

本研究では、高分子ポリフェノールの中心的な化合物群であるタンニンについて、これまでの成果を基礎に新規な物質開発を進め、それらを口腔扁平上皮がん細胞に対する選択毒性を指標にして、植物由来の新規な抗腫瘍物質の開発を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 高分子ポリフェノール・タンニン含有植物資源からの物質開発

ギョリュウ科、特に *Tamarix* 属植物には、これまでに単離したタンニンの他に構造未解明の種々のタンニンが存在することを認めているので、これらについて精製および同定、構造解明を進める。さらに植物分類・系統とそれらの中での加水分解性タンニンの分布との間には、密接な関係があることが近年明らかになってきているので、そうした情報をも参考にしながら、フトモモ科、マンサク科などの植物の加水分解性タンニンおよびそのオリゴマーを中心に、比較的高分子のポリフェノールの期待できる植物を中心に新規物質の開発を進める。

加水分解性タンニンなどの高分子ポリフェノールは、同一植物中に類似の構造のものが多数共存して相互の分離が困難な場合が多く、またクロマトグラフィーで使用される担体の種類によっては、吸着や化学変化・分解が起こることも少なくない。ポリフェノールの中には、周囲のpHによっては塩を形成してその性質が変化したり、酸化的な変化を受けたりする場合も見られることをこれまでに見いだしている。そこで、これらに配慮しながら精製単離を進める必要があり、また生物活性試験についてもその条件での安定性を考慮してポリフェノールを選択し、条件をも考慮して実施する必要がある。

さらに、植物体それ自体からのポリフェノールの単離構造解明のみならず、組織培養技術を応用して、ポリフェノール含有植物の培養組織からの高分子ポリフェノールの精製単離を実施し、その技術的な適用の可能性を探る。一方、タンニンミミックについて合成的な検討をも進める。

(2) 抗腫瘍作用についての高分子ポリフェノールの作用の口腔がん由来細胞に対する特異性・選択性の検討

口腔がん由来培養細胞に対する作用を、他の培養細胞系に対する作用と比較することにより、その作用の特異性・選択性を検討する。一般に低濃度で細胞毒性を示すことが抗腫瘍作用のスクリーニングにおいては重視される傾向があるが、実際には正常細胞に対する細胞毒性との比較についても検討することが重要であると考えられる。

4. 研究成果

(1) ギョリュウ科植物からのタンニンの単離・同定、構造決定

エジプト産のギョリュウ科植物の *Tamarix nilotica* の葉のタンニンについて、これまでの検討に加えてさらに精査を進め、新規な 3 量体構造を持つエラジタンニン nilotin T2、同じく 4 量体構造を持つ nilotin Q1 をもってそれらの構造を確立した。

また、*Tamarix tetrandra* から誘導した培養シュートからは新規 3 量体の nilotin T3 を得てその構造をも確立した。共存する既知タンニンの同定も行い、このように培養植物組織についても加水分解性タンニンオリゴマーが得られることを改めて示すことができた。

さらに、*Tamarix aphylla* の虫エイ（虫こぶ）のタンニンについて精査を進めた結果、

新規加水分解性タンニンとして、エラジタンニンモノマーの phyllagallin M1、ガロタンニンモノマーの phyllagallin M2、ガロタンニンダイマーの phyllagallin D2, D3, D4、ガロタンニンモノマーとエラジタンニンモノマーから構成されるガロ・エラジタンニン 2 量体の phyllagallin D1 を単離し、それらの構造を確立するとともに、既知のタンニンをも得て同定した。また、*Tamarix aphylla* の虫エイからは gallic acid の 3 量体構造を有するフラボガロン酸をも見いだした。このような結合様式のアシル基（フェノールカルボン酸）をギョリュウ科植物から見いだしたのは、これが初めてであった。

こうした過程で得た各種タンニンについて抗腫瘍効果を検討した結果、加水分解性タンニン 3 量体の hirtellin T1、tamarixinin B などに口腔がん細胞に対し、正常細胞と比較して強い細胞毒性を示すことを見いだした。

(2) フトモモ科植物、ダビディア科植物、マンサク科植物等のタンニンの精製・単離と構造解明

フトモモ科に属するフェイジョア *Feijoa sellowiana* が多量の高分子ポリフェノールを含有することを見出した。フェイジョアは南米原産の常緑低木で、果実が食用とされ、ニュージーランドやロシアなどで栽培される。本来は熱帯性植物であるが、寒冷や乾燥にも強く、本邦でも栽培可能であり、資源植物としての開発が期待できる。そこで本植物の葉、果実など各部位の成分について検討を進め、加水分解性タンニン、エラグ酸関連物質、フラボノイドなどを単離同定した。さらに PAOF-1 と仮称するプロアントシアニジンオリゴマーを得てこれについて構造の検討を進めるとともに、本物質は口腔

がん由来の培養細胞に顕著な細胞毒性を示すことを見出した。

また、中国四川省原産のダビディア科の *Davidia involucreta* の葉から新規な加水分解性タンニンを得るとともに、比較的多量含まれる *dauidiin* に抗腫瘍効果を認めた。また、マンサク科の *Hamamelis X intermedia* からタンニン画分を得て、細胞毒性を認めた。

(3) タンニンミミックの合成的検討

これまでの検討によって、オリゴ糖の gallic acid ester 類の合成方法が確立できたこと、それらに抗腫瘍作用を認めたことから、gallic acid 以外の関連のフェノールカルボン酸について、糖のエステル化の検討を進めた結果、多段階の精製過程を要せず、より簡便に合成エステルが得られる方法を確立することができた。こうして合成した化合物のうち、*octa-O-(4-hydroxybenzoyl)-melibiose* に抗腫瘍作用を認めた。

(4) 成果の意義と今後の展望

植物性食品や生薬として利用されてきた植物のポリフェノールのヒトの健康に対する効果の検討は、それらの植物が経験的にヒトに対して低毒性であると考えられることから、今後の発展が期待されるが、そうした研究は、植物エキスレベルか、または市販の試薬による検討によるものがほとんどである。

こうした中で、以上示してきたように本研究によって高分子ポリフェノールの化学構造を新たに解明するとともに、それらの細胞毒性との関係を示す新たなデータを得ることができた。高分子ポリフェノール、特に加水分解性タンニンオリゴマーについての検討は、国際的にも限られたグループのみに

よって進められている状態であり、他方、合成化学のグループによる検討はまだ端緒についたばかりである。今後、この領域の化学的な検討を基礎にした研究の発展がさらに重要と思われる。

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2件)

1. Orabi MA, Taniguchi S, Sakagami H, Yoshimura M, Amakura Y, Hatano T. (2016) Hydrolyzable tannins of tamaricaceous plants. 7. Structures and cytotoxic properties of oligomeric ellagitannins from leaves of *Tamarix nilotica* and cultured tissues of *Tamarix tetrandra*. Journal of Natural Products, 79, 984-995, 査読有り. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01065.
2. Orabi MA, Yoshimura M, Amakura Y, Hatano T (2015) Ellagitannins, gallotannins, and gallo-ellagitannins from the galls of *Tamarix aphylla* Fitoterapia, 104, 55-63, 査読有り. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.05.008.

[学会発表](計10件)

1. 加藤沙友里、山崎真菜、下津祐樹、青山弘枝、黒田照夫、坂上 宏、波多野 力、未利用植物資源由来タンニンの化学構造と生物活性、第6回食品薬学シンポジウム、岡山大学(岡山市)、2015年10月30日~10月31日。
2. Orabi MA, 谷口抄子、坂上 宏、好村守生、天倉吉章、波多野 力、Chemistry, cytotoxicity, and *in vitro* production of hydrolyzable tannins of *Tamarix*

- species、第6回食品薬学シンポジウム、岡山大学(岡山市) 2015年10月30日~10月31日.
- 木村優里子、青山弘枝、下津祐樹、坂上宏、波多野 力、ハンカチノキの成分(第2報)、日本生薬学会第62回年会、長良川国際会議場(岐阜市) 2015年9月11日~9月12日.
 - 木村優里子、青山弘枝、下津祐樹、黒田照夫、坂上 宏、波多野 力、ハンカチノキの成分(第1報)、日本薬学会第135年会、神戸学院大学等(神戸市)、2015年3月25日~3月28日.
 - 西岡弘美、渡邊聡子、小川卓也、黒田照夫、坂上 宏、波多野 力、竹内靖雄、抗菌作用及び抗腫瘍作用を有するタンニン類縁体の合成、日本薬学会第135年会、デザイン・クリエイティブセンター神戸等(神戸市) 2015年3月25日~28日.
 - Aoyama H, Kuroda T, Sakagami H, Hatano T, Phenolic constituents of *Feijoa sellowiana*、27th International Conference on Polyphenols、名古屋大学(名古屋) 2014年9月2日~9月6日.
 - 青山弘枝、黒田照夫、波多野 力、*Feijoa sellowiana* の成分研究(第2報)、日本生薬学会第60回年会、北海道医療大学(北海道当別町) 2013年9月7日~9月8日.

[図書](計1件)

- 波多野 力、総論：ポリフェノールの化学構造の多様性とタンニン(波多野 力、下田博司編「ポリフェノール(仮題)」)、2016、約14ページ(総ページ数約250ページ)(シーエムシー出版)、発行確定.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 力 (HATANO, Tsutomu)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50127578

(2) 研究分担者

竹内靖雄 (TAKEUCHI, Yasuo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00163387

坂上 宏 (SAKAGAMI, Hiroshi)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：50138484