

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460140

研究課題名(和文) TRPCチャネル抑制アルカロイドを用いた創薬シードの創製

研究課題名(英文) Research for natural products including alkaloids that inhibit TRP channels

研究代表者

金田 利夫 (Kaneda, Toshio)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70339521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TRPC6/ TRPC3とアドレナリン 1受容体遺伝子を導入した細胞を用いた評価系により、活性化合物および活性を含む植物エキスを探索したが、直接的にTRPC6/3に阻害作用を示す化合物は見出せなかった。

血管弛緩作用を示したdecipic acid (DA)についてその作用機序を解析した。ラット平滑筋初代培養細胞において、DAは血管収縮に関与するMLCとMYPT1のリン酸化に変化を与えた。また、DA処理はAKTのリン酸化抑制を介した間接的なcAMP上昇とPKAの活性化を誘導することが示されたことから、DAはAKT-PKA-MYPT1-MLCシグナルに関与し血管弛緩作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to isolate natural compounds that inhibit TRP channel, which possibly act as vasorelaxant. Isolated natural products and various plant extracts were evaluated using TRPC6/3/adrenergic alpha1 receptor expressing cells. However, we could not find the active compounds that directly inhibit TRPC6/3. (2R, 3S, 15R)-Decipic acid (DA) isolated from *Calophyllum scriblitifolium* bark showed vasodilation activity.

Thus, we examined the mechanism by which DA induces vasorelaxation on rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). The phosphorylation levels of MLC and MYPT1 were modulated by DA treatment. DA increased the phosphorylation of MYPT1 Ser695 and MYPT1 Ser668, which is reportedly phosphorylated by PKA. DA increases PKA substrates phosphorylation in concentration-dependent manner. Furthermore, DA decreased AKT phosphorylation at Thr308 and Ser473. Taken together, this study indicates that DA induces vasorelaxation through AKT-PKA-MYPT1-MLC pathway.

研究分野：生薬・天然物化学

キーワード：alkaloid decipic acid TRP channel vasodilation

1. 研究開始当初の背景

(1)

我々は、これまでアルカロイドを含む多くの天然由来化合物の生物活性について、ラット血管平滑筋標本を用いて解析してきた。これらの化合物の中には、血管内皮の存在に影響を受けず、ニフェジピンで電位依存性チャンネルをブロックした後も弛緩作用（収縮抑制）を示す化合物が複数存在した。つまり、これらは ROC への関与を示唆する化合物である。

ごく最近の例では、vincosaman タイプに属す naucline と amalindan タイプの cadamine といったインドールアルカロイドに ROC に対する活性を認めた (J Nat Med 2013; 67: 399-403)。また、sarpagine 骨格の 10-methoxyaffinisine、akuammiline 骨格の cathafoleline、macrolinoxindole 骨格の alstonisine にも同活性を認めており、10-methoxyaffinisine についてはラットを用いた *in vivo* 試験において降圧作用が認められている (J Nat Med. 2013; 67: 9-16)。

さらに、7つの新規 ajmaline タイプのアルカロイドである alstiphyllanines I-O にも血管弛緩活性を認めた。Alstiphyllanines と類似の既知化合物である vincamedine について詳細な解析をした結果、ajmaline タイプの vincamedine についても ROC に対する阻害活性を認めた (Bioorg Med Chem. 2012; 20: 3454-3459)。同様に corynanthe タイプの新規アルカロイドである villocarine A についても ROC への関与を明らかにした (Bioorg Med Chem. 2011;19:4075-4079)。

(2)

細胞内カルシウム濃度の調節は生体の恒常性と生命維持に必須の機構であり、この調節を司るカルシウムチャンネルは長らく重要な創薬のターゲットとされてきた。降圧薬や狭心症薬として用いられるニフェジピンやベラパミルは L 型の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤であり、既に十分な臨床応用がなされている。その一方で、新しい Ca^{2+} チャンネル群として明らかになってきた TRP チャンネルファミリーについては、生物学的知見も乏しく、さらには特異的な阻害剤/促進剤の開発も十分ではない。これまでの知見から TRP チャンネルファミリーの中で受容体刺激後のカルシウム応答に関わる分子としては、TRPC3、TRPC6、TRPC7 が重要視されている。

このような状況の中、SK&F365、LOE908、2-APB といった阻害剤が研究レベルで使用されてきたが、いずれも特異性が不十分である。近年ピラゾール型 TRP チャンネル阻害剤が注目され、TRPC3 については、比較的特異性の高い化合物が報告されているが、これらの構造はこれまで申請者が報告した ROC を阻害するアルカロイド群とは大きく異なるものである。

2. 研究の目的

(1)

本研究では既に活性を認めたアルカロイドの作用解析と並行し、当研究室が既に保有する数百種の未利用資源植物の抽出物ライブラリーを用いて、TRPC 特異的な新しい多環性天然物の探索を行う。

(2)

血管内皮の存在に影響を受けず、ニフェジピンで電位依存性チャンネルをブロックした後も弛緩作用（収縮抑制）を示す化合物、すなわち ROC の機能に関与する可能性のある化合物について、その詳細な作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)

TRPC6 と TRPC3 発現細胞を作製し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を指標として、アルカロイドの活性評価を行った。樹立した TRPC 発現細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化から、ROC への抑制作用を定量的に評価できるアッセイ系を確立した。

また、既に単離/報告したアルカロイド化合物に加えて、本研究室が所有する植物エキス/天然化合物ライブラリーを利用し、特異性および抑制活性の高いアルカロイド他を探索した。

(2)

フェニレフリン誘導血管収縮作用を抑制する天然物の中で、*Calophyllum scriblitifolium* から得られたクロマノン類である decipic acid (DA) はニフェジピン処理後も弛緩作用を示した。そこで詳細な作用機序を解明する為、ラット平滑筋初代培養細胞 (SMC) を単離し、血管収縮/弛緩シグナルにおける DA の作用を検討した。

4. 研究成果

(1)

TRPC6/アドレナリン 1 受容体遺伝子の導入細胞を作製し、新しい評価系を構築した。これらの評価系を用いて、これまでに我々が単離した各種天然物、およびマレーシア/インドネシアで採取された植物のエキス/部分精製品を用いて、候補化合物が含まれる天然素材を探したが、直接的に TRPC6 阻害作用を示す化合物は見出せなかった。TRPC3 についても TRPC6 と同様の評価系を構築したが、現在までのところ TRPC3 に作用する候補物質も見つかっていない。

(2)

Calophyllum scriblitifolium から単離され、ラット胸部大動脈リング標本において血管弛緩作用を示した (2R, 3S, 15R)-Decipic acid

(DA)について詳細な解析を行った結果、DAはフェニレフリン、セロトニン、エンドセリンによる血管収縮作用を濃度依存的に抑制し、さらにはTPA誘導血管収縮作用も抑制した。

そこで、詳細な作用機序を検討する為に、ラット平滑筋初代培養細胞(SMC)を単離し、血管収縮/弛緩シグナルにおけるDAの作用を主にウェスタンブロッティングにより解析した。

SMCにおいて、DAは血管収縮に關与するMLCのリン酸化(pMLC Ser19)を抑制した。また、MLCのリン酸化を制御するMYPT1のリン酸化(pMYPT1 Thr696 and Thr853)を抑制した。一方DAは、PKAによってリン酸化されることが報告されているMYPT1 Ser695とMYPT1 Ser668を促進した。

以上の結果からPKAの活性化が示唆された為、PKA基質のリン酸化を検討したところ、複数の基質タンパクのリン酸化がDA処理によって亢進しており、細胞内cAMP量の増加も認められた。

AKTはPDEを介してPKAシグナルを抑制する事が報告されている。DAはAKTのThr308とSer473のリン酸化を抑制した。PI3K inhibitorであるLY294002を処理するとDAと類似したAKTのリン酸化の抑制とPKA基質のリン酸化が認められた。

以上の結果から、DAはAKT-PKA-MYPT1-MLCシグナルに關与し、血管弛緩作用を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Mineri Ishizuka, Ikumi Koga, Kazumasa Zaima, Toshio Kaneda, Yusuke Hirasawa, A. Hamid A. Hadi, Hiroshi Morita
Vasorelaxant effects on rat aortic artery by two types of indole alkaloids, naucline and cadamine. J. Nat. Med: 67 (2013) 399-403
査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

F. Ifadotunnikmah, T. Sasaki, A. E. Nugroho, Y. Hirasawa, T. Kaneda, A. H. A. Hadi, H. Morita
Vasorelaxant Activity of Chromanones from *Calophyllum scriblitifolium* Bark on Rat Aortic Artery
Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015
2015-08-30 – 2015-09-3 徳島文理大学

Alfarius Eco Nagroho, 馬上未帆, 金田利夫, A. Hamid A Hadi, 森田博史
Indole alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*
日本生薬学会 2014-09-13 – 2014-09-14
福岡大学

佐々木忠裕, Alfarius Eco Nagroho, 平澤祐介, 金田利夫, A. Hamid A Hadi, 森田博史
Calophyllum scriblitifolium より単離したクロマノン類の絶対立体配置
日本生薬学会 2014-09-13 – 2014-09-14
福岡大学

佐々木忠裕, Alfarius Eco Nugroho, 石塚美練里, 光田恵里香, 房梁, 平澤祐介, 金田利夫, 森田博史, A. Hamid A. Hadi
オトギリソウ科 *Calophyllum scriblitifolium* より単離したクロマノン類の血管平滑筋弛緩作用
日本生薬学会 2013-09-07 – 2013-09-08
北海道医療大学

〔図書〕(計 0件)

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshi_tsu/shouyaku/shouyaku.html

6. 研究組織
(1)研究代表者
金田 利夫(KANEDA, Toshio)
星薬科大学・生薬学教室・准教授
研究者番号: 70339521

(2)研究分担者
()
研究者番号:

(3)連携研究者

森田 博史 (MORITA, Hiroshi)

星薬科大学・生薬学教室・教授

研究者番号：70220069