

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23794

研究課題名(和文) ミャンマー産植物と海綿からのHIV多機能性タンパク質阻害活性物質の探索

研究課題名(英文) Discovery of HIV multifunctional protein natural inhibitors from Myanmar plants and marine sponges

研究代表者

WIN NWET (WIN, NWET)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員

研究者番号：80843523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：新たな作用機序を有するHIV治療薬の開発に有用なリードを得ることを目的とし、ミャンマーの植物や海綿からHIVの多機能性タンパク質Vprに対して阻害活性を示す化合物の探索を試みた。その結果、ミャンマー産植物から8種の新規を含む計13種のイソピマラン型ジテルペノイドの単離に成功し、それらの中の4種がコントロールと同等のVpr阻害活性を有することを明らかにした。一方、ミャンマー産海綿からのVpr阻害活性化合物の探索においては、1種の新規を含む計5種のピロロラクタムを単離することに成功し、そのうちの1種がコントロールと同等のVpr阻害活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

科学技術が格段に進歩した今日であっても医薬品の60%は未だ天然物の化学構造由来である。悪性腫瘍や神経疾患、自己免疫疾患に対する治療薬の早期開発等が求められる現代にあって、未知の天然生物活性化合物を見出し、創薬へと展開していくことは、医薬品開発において未だ重要な位置を占める。今回我々は、新規HIV治療薬の開発を指向し、ミャンマー産天然資源から化合物の単離を行うことで、HIVの多機能性タンパク質Vprに対して阻害活性を示す天然阻害剤を複数見いだすに至った。今後、これらの情報が新規HIV治療薬の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to find HIV drug seeds with inhibitory activity against a HIV multifunctional protein, Vpr, we isolated natural compounds from Myanmar plants and marine sponges, and assessed the potency as the Vpr inhibitor of the isolated compounds. The phytochemical study of Myanmar plants led to isolation of total 13 isopimarane diterpenoids including eight new ones, and revealed that four compounds possessed the Vpr inhibitory activity at the level comparable with that of positive control. Furthermore, investigation of chemical components in Myanmar marine sponges resulted in isolating five pyrrololactams including one new compound, and the one of them was found to be the Vpr inhibitor with potency equivalent to that of the positive control.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物 海綿 生物活性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界のエイズによる死者の累計は、これまでに3,500万人を数え、さらに現在も3,670万人がHIV-1に感染していると推測される。最近では、エイズ治療薬の開発が進み、HIVの逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬等の多剤併用治療により、HIVの複製を抑制することも可能になってきた。しかし、この治療法では、HIVを体内から完全に排除することができない。さらに、現治療薬に対する耐性株も出現しており、新たな分子に作用する抗HIV薬の開発が依然として重要な課題となっている。そのため、新規抗HIV薬の標的分子として、種々の標的分子が候補として報告されている。これらの中で、HIV-1の感染初期に必須なアクセサリータンパク質であるVprは、宿主の細胞周期をG2期で停止させ、効率的な逆転写を誘導しつつ、サイトカイン合成阻害、アポトーシスの誘導にも関与する多機能性蛋白質である。さらに、このVprについては、HIV-1の感染初期に機能してウイルス粒子と宿主蛋白質から形成される感染性複合体の核移行に関わることやHIV-1患者が併発する悪性腫瘍の原因の一つになっている可能性が示される等、新たな抗HIV薬標的分子としての知見が急速に増加してきた。これらのことから、Vpr阻害剤の探索は、HIV増殖阻害と二次疾患誘発阻害の両作用を有する新たなエイズ治療薬の開発に繋がることが大いに期待される。しかし、Vprに対して阻害活性を示す化合物については未だ例が少なく、構造活性相関等をより詳細に解析し、創薬へと展開していくためには、抗Vpr活性化化合物のさらなる探索が必要であった。

### 2. 研究の目的

医薬品の開発は、科学技術が格段に進歩した今日にあっても天然物の化学構造に寄るところが大きく、伝統薬物の化学成分の解析は、医薬品の開発において未だ重要な位置を占める。また、海綿は強力な生物活性を有する二次代謝産物の宝庫として認識されており、それらに含まれる生物活性物質にも興味を持たれる。研究代表者らは、自ら開発したHeLa細胞を利用したVpr阻害活性評価系を用いて、ミャンマーの薬用植物からVpr阻害活性を有する多種多様な新規化合物を見いだしてきた。また、最近では、ミャンマー国内において、エイズに効果があるとされる薬用植物やミャンマー中南部ベイのカダン島や南部コータウンのザン島周辺海域に棲息する海綿の有機溶媒抽出にVpr阻害活性のあることを新たに見いだした。そこで、本研究では、臨床応用されているHIVの逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等とは異なった作用様式を有する新規抗HIV薬の開発を指向し、ミャンマー産植物やミャンマー産海綿等から、さらなるVpr阻害分子を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミャンマー産天然資源からの抽出エキスの調整

研究代表者が、母国ミャンマーにて採集もしくは購入し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存していた60種類のミャンマー産植物と5種類のミャンマー産海綿の乾燥品各々をメタノール等の有機溶媒に浸した後、超音波にて含有成分を抽出した。これを3回繰り返すことで抽出エキスを調整し、Vpr阻害活性評価に供した。

#### (2) 化合物の単離・構造決定

上記、抽出エキスを濃縮乾固した後、抽出物を酢酸エチルやブタノール等の有機溶媒と水で分配することで有機溶媒分画物を得た。続いて、これらの分画物をHPLC等の各種カラムクロマトグラフィーに供し、分画操作を繰り返すことで、化合物を精製・単離した。化合物の化学構造は、主としてNMRとHR-MSにより決定した。

#### (3) Vpr阻害活性及び他の生物活性評価

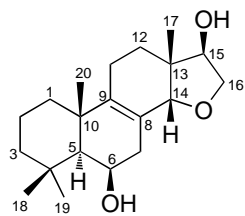
Vpr阻害活性評価は、研究代表者らが構築したTRX-Hela-Vpr細胞を利用したアッセイ系を用いた。TRX-Hela-Vpr細胞は、Vpr遺伝子が組み込まれたpcDNA6/TRプラスミドとそのプラスミドに導入された遺伝子の発現をテトラサイクリンの添加によって誘導するTRExプラスミドが導入されたHeLa細胞である。そのため、TRX-Hela-Vpr細胞は、Vprが発現しているとVprの細胞周期を停止させる機能のために細胞の増殖は妨げられるが、化合物等の添加により、Vprが阻害されると増殖することができ、本アッセイ系は、その増殖率の差を見ることでVpr阻害活性を評価することが可能である。また、本研究では、Vpr阻害活性評価に加え、(1)ヒト由来の各種がん細胞に対する細胞毒性試験と、(2)マウスマクロファージ由来RAW264.7細胞に対する抗炎症活性試験についても実施した。これらの各生物活性評価は、常法に従って行った。

### 4. 研究成果

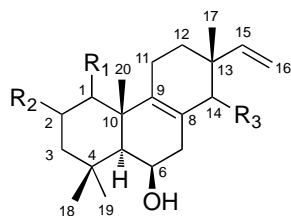
#### (1) ミャンマー産 *Kaempferia pulchra* 根茎からの Vpr 阻害活性化合物の探索

ショウガ科植物 *K. pulchra* は、ミャンマーにおいて、利尿や糖尿病治療の目的で処方される伝統薬の配合生薬である。その根茎の酢酸エチルエキスについて、Vpr阻害活性試験を行った結果、

このエキスに細胞増殖抑制活性のあることを見いだした。そこで、本エキスから化合物の単離を行った。その結果、8種の新規(1-6, 9, 10)を含む計13種のイソピマラン型ジテルペノイドを単離することができた。これらの化合物について Vpr 阻害活性試験を行った結果、shanpanootols C (3), E (5), shanpanootol H (10), (1R,2S,5S,7S,9R,10S,13R)-1,2-dihydroxypimara-8(14),15-diene-7-one (12)がコントロールとした damnacanthal と同等の Vpr 阻害活性を示すことを見いだした。研究代表者らは、先行研究において、*K. pulchra* 樹皮クロロホルム抽出エキスから30種類以上のイソピマラン型ジテルペノイドを得ている。新たに得られたこれらの結果は、*K. pulchra* 根茎の HIV 治療薬としての可能性とともに、Vpr 標的型新規抗 HIV 薬の開発に貢献したものと考えている。これらの研究成果については、現在、2報の論文として投稿中である。

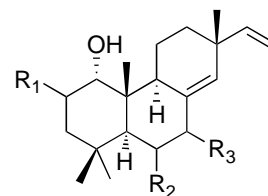


1



R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub>

2	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH	=O
3	$\alpha$ -OH	H	$\alpha$ -OMe
4	$\alpha$ -OH	H	$\beta$ -OH
5	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH	$\alpha$ -OH
6	H	$\alpha$ -OH	$\beta$ -OH
7	$\alpha$ -OH	H	$\alpha$ -OH
8	$\alpha$ -OH	H	$\beta$ -OMe

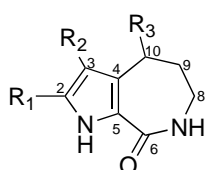


R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub>

9	H	$\beta$ -OH	$\alpha$ -OH
10	$\alpha$ -OH	H	$\alpha$ -OH
11	$\alpha$ -OH	H	$\beta$ -OH
12	$\alpha$ -OH	H	=O
13	$\alpha$ -OH	$\beta$ -OH	$\alpha$ -OH

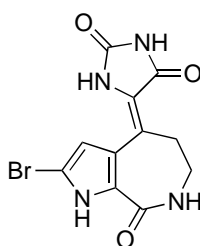
## (2) ミャンマー産海綿 *Stylissa massa* からの Vpr 阻害活性化合物の探索

ミャンマー産海綿 *S. massa* の酢酸エチル抽出エキスについて Vpr 阻害活性試験を行った結果、本抽出エキスが Vpr 阻害活性を示すことが確認された。そこで、本抽出エキスについて、各種クロマトグラフィーを用いて化合物の精製を繰り返した結果、1種の新規(14)を含む計5種のピロロラクタム(14-18)を単離することができた。これらの化合物について Vpr 阻害活性試験を行った結果、2-bromoaldisine (15)がコントロールとした damnacanthal と同等の Vpr 阻害活性を示すことを見いだした。ピロロラクタムに Vpr 阻害活性があることを示したのはこれが最初であり、類縁体の Vpr 阻害活性に興味を持たれるところである。この研究成果については、1報の論文として公表した。

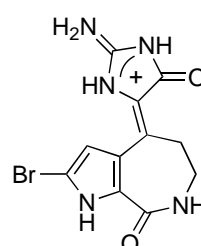


R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub>

14	H	Br	$\alpha$ -OH
15	Br	H	=O
16	H	H	=O



17

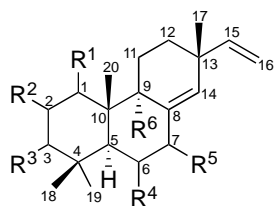


18

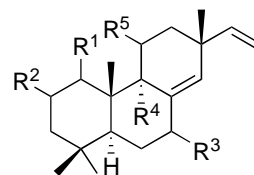
## (3) ミャンマー産 *K. pulchra* 樹皮クロロホルム抽出液から得たジテルペノイドの抗炎症活性

研究代表者らは、これまでにミャンマー産天然資源から100種類以上の天然化合物を得ているが、それらの多くについては、抗炎症活性評価を実施していない。そこで、これらの化合物の中で、抗炎症活性についての報告例が少ないイソピマラン型ジテルペノイドに着目し、*K. pulchra* 樹皮クロロホルム抽出液から先行研究において得た29種類のイソピマラン型ジテルペノイド(19-47)について、リポポリサッカロイドで炎症を誘発した RAW264.7 細胞の NO 産生阻害活性を評価した。その結果、報告者興味深いことに、11種類の isopimara-8(14),-15-dien 型ジテルペノイド(22, 25, 27-30, 32, 35, 38, 39)と3種類の isopimara-8(9),15-diene 型ジテルペノイド(41-43)が細胞毒性を示さずに、30  $\mu$ M から 100  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で抗炎症活性を示すことが判明した。炎症は多くの疾患において生じる症状であり、その阻害剤には汎用性に富むものが求められる。

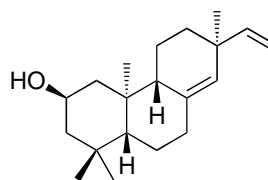
そこで、抗炎症活性を示した化合物の中でも特に強い活性を示した kaempulchraol P (**27**, IC<sub>50</sub> 39.88 μM), kaempulchraol Q (**28**, IC<sub>50</sub> 36.05 μM), kaempulchraol B (**41**, IC<sub>50</sub> 47.69 μM), kaempulchraol C (**42**, IC<sub>50</sub> 44.97 μM), kaempulchraol D (**43**, IC<sub>50</sub> 38.17 μM) を選択し、炎症において活性化が見られる NF-κB の発現に及ぼすこれらの化合物の影響について評価した。その結果、これらの化合物は、5-25 μM の濃度で NF-κB の発現を抑制することが示唆された。本結果は、これら 5 種の化合物が、サイトカインの産生を抑制することで抗炎症活性を発揮していることを示唆する。そこで、さらに、報告者らは、これらの化合物の RAW264.7 細胞におけるインターロイキン 6 (IL-6) とシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現に及ぼす影響について精査した結果、これらの化合物は、IL-6 と COX-2 の発現を優位に抑制することで抗炎症活性を示していることが明らかになった。これまでに、抗炎症活性を示すイソピマラン型ジテルペノイドの報告は若干あるものの、その詳細なメカニズムについて報告されているものは少ない。本研究で得られた成果は、イソピマラン型ジテルペノイドの構造を模倣した抗炎症剤の開発において有用な知見となると考えている。これらの研究成果については、2 報の論文として公表した。



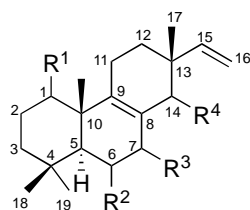
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
<b>19</b>	α-OH	H	H	β-OH	H	H
<b>20</b>	α-OH	H	α-OH	H	H	H
<b>21</b>	α-OH	H	α-OH	β-OH	H	H
<b>22</b>	α-OH	H	H	H	H	H
<b>23</b>	α-OH	H	H	H	=O	H
<b>24</b>	H	H	H	β-OAc	H	OH
<b>25</b>	H	H	H	β-OH	H	OMe
<b>26</b>	α-OH	α-OH	H	H	H	OH
<b>27</b>	H	H	H	β-OH	H	H
<b>28</b>	α-OAc	H	H	β-OH	H	H
<b>29</b>	H	H	H	H	α-OAc	OH
<b>30</b>	H	H	H	β-OH	α-OAc	H
<b>31</b>	H	H	H	β-OH	β-OAc	OH
<b>32</b>	H	H	H	β-OH	β-OH	OH



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
<b>33</b>	H	H	=O	OH	H
<b>34</b>	H	H	β-OH	OH	H
<b>35</b>	α-OH	H	H	H	α-OH
<b>36</b>	α-OH	α-OH	H	H	H
<b>37</b>	α-OH	α-OH	H	H	α-OH
<b>38</b>	H	H	α-OH	H	H



**40**



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<b>40</b>	H	β-OH	H	α-OMe
<b>41</b>	H	β-OH	H	β-OMe
<b>42</b>	H	β-OH	H	α-OH
<b>43</b>	H	β-OH	H	β-OH
<b>44</b>	H	β-OH	H	=O
<b>45</b>	α-OH	β-OH	H	α-OH
<b>46</b>	α-OH	β-OH	H	β-OMe
<b>47</b>	H	H	=O	α-OH

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 N.N. Win, B. Hardianti, S. Kasahara, H. Ngwe, Y. Hayakawa, H. Morita	4. 巻 30
2. 論文標題 Anti-inflammatory activities of isopimara-8(14),15-diene diterpenoids and mode of action of kaempulchraols P and Q from Kaempferia pulchra rhizomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett	6. 最初と最後の頁 126841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.12684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 N.N. Win, B. Hardianti, H. Ngwe, Y. Hayakawa, H. Morita	4. 巻 74
2. 論文標題 Anti-inflammatory activities of isopimara-8(9),15-diene diterpenoids and mode of action of kaempulchraols B-D from Kaempferia pulchra rhizomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 487-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-020-01389-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ミャンマー	ヤンゴン大学		