

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659002

研究課題名（和文）創薬を指向したメダカを利用する in vivo スクリーニング法の構築

研究課題名（英文）Establishment of in vivo screening system using Medaka fish toward to the drug discovery

研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI MOTOMASA)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40116033

研究成果の概要（和文）：魚類メダカを使用して、生体内でも有効性が期待できる医薬リードを選択する手法の確立に成功した。具体的には、血管およびリンパ管の形成過程を間接的に反映する尾ひれの再生に着目して、これを促進または抑制する活性天然物のスクリーニング系を構築した。また構築した評価系を利用して、底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを探索した結果、インドネシア産海綿のメタノール抽出エキスから、尾ひれの再生を阻害する化合物として manzamine A を単離・同定した。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in establishing the screening system using Medaka fish to search new medicinal leads that are effective to the animal models. Specifically, we established screening system for searching the bioactive natural products that is able to regulate the re-production of the tail and fins, which reflects the forming of blood and lymphatic vessels. In addition, we have re-discovered marine spongian alkaloid, manzamine A, from our extract library as an inhibitor of re-production of the tail and fins by using established bioassay-guided separation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：メダカ、抗がん剤、再生医療、生物活性物質、スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの創薬を目指した活性天然物の探索研究では、多くの検体を迅速に評価するため、主に各種酵素や受容体、微生物、培養細胞等を用いる in vitro の活性評価によるスクリーニングが行なわれ、活性物質の単離と化学構造の決定の後、さらにマウスなどに

対する有効性や毒性等の in vivo での活性評価を行い、医薬リードの創製を図ってきた。特に天然薬物資源からの探索研究では、活性物質が微量成分である場合が多く、マウスなどを利用しての毒性試験や有効性評価を実施するには、全合成などの大量供給法を確立する必要があった。小魚類であるメダカは、

呼吸器官を除き、ほぼ哺乳類と同じ臓器を有しており、飼育や個体の供給も非常に容易である。さらに遺伝子改変技術が確立されており、実際に多くのトランスジェニックや遺伝子欠損メダカが、器官の発生や再生、代謝やシグナル伝達の解析に汎用されている。しかしながら、活性天然物の探索研究に実験動物としてメダカを利用した例はこれまでほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、小魚類のメダカを活性天然物の探索研究に利用することにより、*in vivo*でも有効性が期待できる医薬リードを少量のサンプルでかつ短期間に選択する手法を確立することを目的とする。具体的には、がんなどの病態や器官の再生において重要な役割を担う、血管およびリンパ管形成に着目した評価系の構築に挑戦する。そして、構築した評価系を用いて、独自に保有する底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象にスクリーニングを行うことにより、メダカを利用する*in vivo*スクリーニング系の有用性を検証し、医薬リードに直結する新規活性物質の取得を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究の目的達成に向けて、以下の3点について検討した。

(1) スクリーニングの評価系として、血管およびリンパ管の形成過程を間接的に反映し、簡便に観察可能と予想される尾ひれの再生をモデルとして、これを促進または抑制する活性天然物のスクリーニング系の構築を検討した。

(2) 構築した評価系を用いて、血管およびリンパ管形成を阻害または促進することが予想される活性天然物を用いて、その活性の有無を評価した。

(3) 研究代表者が独自に保有する、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスライブラリーおよび海洋由来微生物の培養物ラ

イブラリーを対象にスクリーニングを実施し、活性を示したサンプルについて、活性試験の結果を指標とする、精製と活性成分の化学構造の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) スクリーニングには、多産で個体の供給維持が比較的容易な、Cab系の野生型メダカを選択した。また、使用するメダカの週令、観察期間等、各種条件検討を行った結果、以下の方法を構築した。

1週令のCab系メダカをトリカイン麻酔後、実体顕微鏡観察下で尾ひれの切断を行い、その個体を撮影した。そして、各メダカを、被検サンプルを含む0.3% NaCl水溶液(250 μL)中で、3日間飼育した。また飼育温度は27度とした。3日後、実体顕微鏡下で尾ひれの撮影を再度行い、画像解析ソフトで尾ひれの再生面積を定量した。(図1)

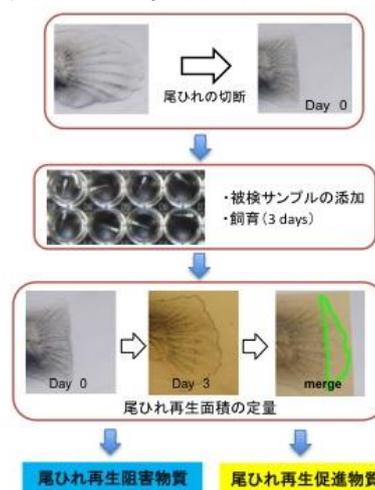
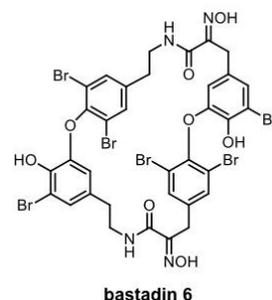


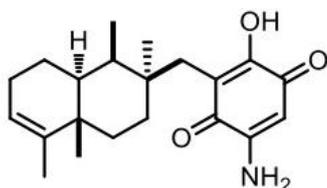
図1 構築した評価系の概略

(2) (1)で構築した方法を用いて、研究代表者が保有する、メダカ尾ひれの再生に影響を与えると予想される以下の化合物の効果を検討した。

### ① bastadin 6: 血管新生阻害物質

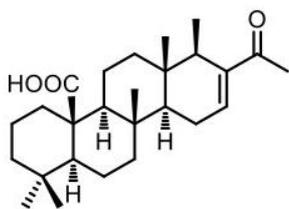


- ② dysideamine:神経細胞の保護と神経突起の伸長作用を有する化合物



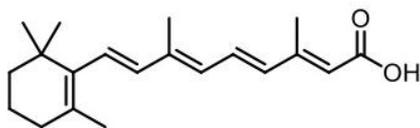
Dysideamine

- ③ PHC-1:細胞の分化誘導物質



PHC-1

- ④ all-trans retinoic acid: 細胞の分化誘導物質

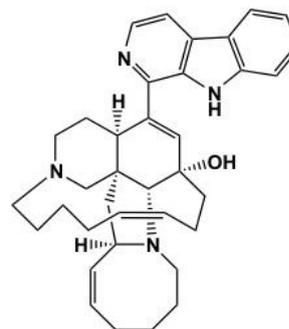


All-trans retinoic acid

その結果、dysideamine および PHC-1 については、メダカに対して毒性を示さない最大濃度である 10  $\mu\text{M}$  および 100  $\mu\text{M}$  においても、活性は見られなかった。一方、研究代表者が、*in vitro* および *in vivo* で血管新生阻害作用を示すことを明らかにしている bastadin 6 は、構築した本評価系においても、100  $\mu\text{M}$  で約 40% 尾ひれの再生を阻害した。また、急性前骨髄性白血病細胞を成熟好中球に分化誘導させる効果が知られている all-trans retinoic acid については、10  $\mu\text{M}$  で 80% と、強力に尾ひれの再生を阻害した。またこのことは、ゼブラフィッシュの尾ひれ再生において、all-trans retinoic acid が特定の再生部位と特定の再生時期に必要であり、そのバランスが崩れた場合に、細胞の増殖阻害や細胞死が誘導されるという知見を支持するものと考えられた。

(4) 次に構築した評価系を利用して、研究

代表者が保有する、底生海洋生物の抽出エキス (約 500 サンプル) および海洋由来微生物の培養抽出物 (約 500 サンプル) を対象にスクリーニングを行った。その結果、あるインドネシア産海綿のメタノール抽出エキスに尾ひれの再生を阻害する活性を見出した。そこで、本抽出エキスを活性試験の結果を指標に、溶媒間分配、HPLC を含む各種クロマトグラフィーで活性物質の分画、精製を行った。そして、その化学構造を解析した結果、抗菌活性や抗マラリア活性など、非常に多彩な生物活性が報告されているアルカロイド manzamine A と同定した。本化合物はメダカの尾ひれ再生を 0.3  $\mu\text{g/mL}$  で 70% 阻害する強力な活性を示した。現在、リンパ管または血管を特異的に観察できる、トランスジェニックメダカを用いて、詳細な作用の解析を進めている。



manzamine A

一方、今回のスクリーニングでは、尾ひれの再生を促進するサンプルは見出されなかった。現在、継続して尾ひれの再生を阻害または促進するサンプルのスクリーニングを実施している。

## 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 1 件)

- ① Arai M., Hayashi A., Sobou M., Ishida S., Kawachi T., Kotoku N., Kobayashi M. Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. *J. Nat. Med.* (2011) 65(1), 149-156. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 住井裕司、古徳直之、林 剛史、田村理、河内崇志、森本 薫、荒井雅吉、小林資

正 海綿由来血管新生阻害物質cortistatin  
A およびanalog化合物の合成研究 第53  
回天然有機化合物討論会 2011年9月28日  
大阪

② 小林資正 海洋天然物由来の医薬シ  
ーズの探索 第27回和漢医薬学会学術大会(招  
待講演) 2010年8月28日 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI MOTOMASA)  
大阪大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：40116033

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤堂 剛 (TODO TAKASHI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90163948

弓場 俊輔 (YUBA SHUNSUKE)  
産業技術総合研究所・セルエンジニアリング  
研究部門・主任研究員  
研究者番号：40263248