

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460122

研究課題名(和文) マダガスカル伝承薬に由来する生物活性化合物の探索

研究課題名(英文) Phytochemical research on Malagasy medicinal plants

研究代表者

松浪 勝義 (Matsunami, Katsuyoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：70379890

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)：マダガスカルは Gondwana 大陸の遺産などと言われ動植物固有種の宝庫である。これまでにビンカアルカロイドなどの臨床抗がん剤がマダガスカル原産の植物から単離され実用化されてきた。しかし、いまだ化学的解析が十分でない植物が多数あり、また、産業やインフラなどの近代化などにより貴重な植物資源が失われつつある。本研究課題では現地のマダガスカル人研究者との共同研究により多数の植物抽出物入手し、抗がん剤や、原虫、ウイルス感染症に関する治療薬候補の探索を目的に化学的解析を行った。その結果、活性を見出した植物から、活性本体の精製および化学構造の解明に成功し、医薬品シード化合物として有用な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Madagascar is one of the most important area for pharmaceutical research because of richness of attractive endemic species. The successful clinical usage of vinca alkaloids proves the importance of further phytochemical research on Malagasy plants. However, the industrial growth and expansion of infrastructure building make this area in crisis. In this study, we successfully achieved several research outcomes, such as collection of various plant materials and evaluation of bioactivities including anti-tumor, anti-Leishmania and vector insects control activities. Finally, we successfully isolated active principles from one of the material and clearly determined the chemical structures of them. These compounds have a potential to be a seed for further pharmaceutical research.

研究分野：天然物化学

キーワード：マダガスカル リーシュマニア ベクター昆虫

## 1. 研究開始当初の背景

マダガスカルは、東 Gondwana 大陸から分離後、悠久の年月をかけて、現在の位置に到達したと考えられている。この間、孤立した島であり続けたことから、植物相は非常に独自性が高く (13,000 種の植物が存在し、固有種が 80%以上とされる) 世界的に最も重要な植物資源を保有する地域の一つである。また、約 3,500 種は何らかの薬効があるとされており、実際に、マダガスカル原産のニチニチソウから抗がん剤ピンカアルカロイドの発見によって多くのガン患者に恩恵をもたらした。しかし、現在では "生物多様性ホットスポット (地球規模での高い生物多様性があるにも関わらず絶滅の危機に瀕している地域)" に指定されているなど、有用植物資源の損失が著しい。そのため、マダガスカル伝統医学の知見を参考に医薬品資源として利用可能性のある植物をいち早く、また、可能な限り多く見出し薬学的見地から詳細に解析することは喫緊の課題である。一方、有用化合物の探索過程で酵素や培養細胞など様々な *in vitro* 活性評価系が利用されているが、ヒト個体とのギャップが大きく、期待通りの結果が出ないことが多い。マウスでは大きな飼育スペースや比較的大量の化合物が必要であるため、1 次スクリーニングには適当でない。そこで、近年、96 well plate でアッセイ可能な脊椎動物 *in vivo* モデルとしてゼブラフィッシュが注目されている。少量の化合物で実施可能で、薬物の活性発現に大きく関与する ADME (吸収、分布、代謝、排泄) を兼ね備えており、これまで *in vitro* の系では見出されていなかった活性化合物を発見できる可能性がある。

我々の研究室では、これまでに沖縄亜熱帯植物を中心に研究を行い、国際誌にて多くの成果を報告してきた (ホームページ参照)。沖縄は小笠原に次いで我が国における固有種の宝庫と言われているが、それでも固有種率は 5%程度とされており、80%を超えるマダガスカルは驚きである。この驚異的な固有種率を誇るマダガスカル産植物に加え、研究効率をあげるため、研究室に保有するエジプト産や沖縄亜熱帯植物抽出物を研究対象にし、ゼブラフィッシュや細胞培養などを用いたアッセイ法を加えて探索研究を行い、これまでにない新規医薬リード化合物を得ることは重要である。

## 2. 研究の目的

マダガスカルはアフリカ大陸の東に位置する島であり、" Gondwana 大陸の遺産 " などと言われ、世界でも類を見ない貴重な固有植物の宝庫である。マダガスカルの伝統医療は " Ombiasa " と呼ばれる治療家などによって伝承されてきた。一方、ゼブラフィッシュなどを用いた "whole animal drug

screening " という手法が近年注目されている。そこで、本研究では、マダガスカル伝統医療に用いられている植物を新たに研究対象とし、これまで当研究室に保有するエジプト産植物や沖縄亜熱帯植物抽出物を対象に、培養細胞、トランスジェニックゼブラフィッシュなどを用いたユニークな活性試験法により、新規医薬品候補化合物を探索し、活性本体の単離精製、詳細な活性の評価、化学構造などを明らかにすることで創薬研究に展開することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Ombiasa 伝承医療で使用される薬用植物の調査、採集。

マダガスカル島には約 5,000 人の伝統治療家 (Ombiasa) が存在すると見積もられている。しかし、外国人である我々に容易に彼らの知識は提供されず、また面会することもしばしば困難である。そこで、当研究室出身のマダガスカル人研究者 (Harinantenaina Liva 博士、オハイオ州立大学 Assistant Professor) および現地の研究者の協力を得てマダガスカル産の植物の採集を行い、活性評価に必要な少量多種の抽出物を調製した。

培養細胞、リーシュマニア原虫、遺伝子導入ゼブラフィッシュなどを用いたアッセイ系などによる活性評価。

現在でもガンは日本人の死因のトップであることから、新たな抗ガン剤候補の探索研究は最重要課題であり続けている。これまでに我々の研究室では DNA の傷害に関係するとされる活性酸素除去活性、ガン細胞の増殖抑制活性、多剤耐性抑制活性 (抗ガン剤が細胞外へ排出され効果を失う現象)、さらに "neglected tropical diseases\*" の一つであるリーシュマニア原虫活性試験を指標に活性化合物の探索研究を行った。貴重な植物サンプルの有用性を幅広く評価し効率よく成果につなげることに留意した。

\*neglected tropical diseases とは顧みられない熱帯病、見捨てられた病気などと邦訳。欧米先進国の患者が少なくこれまで注目されてこなかった。感染地域は熱帯の貧しい国が多く、製薬企業にとって膨大な開発費の回収が見込めないことから積極的に開発対象とされないことが問題となっている。

新規医薬候補化合物の分離、精製、化学構造決定、メカニズム解析。

活性試験の結果に基づき分離精製を行い活性本体の単離を行う。得られた化合物の化学構造は NMR, MS などのスペクトルデータ解析や改良 Mosher 法などの化学的方法により決定する。

## 4. 研究成果

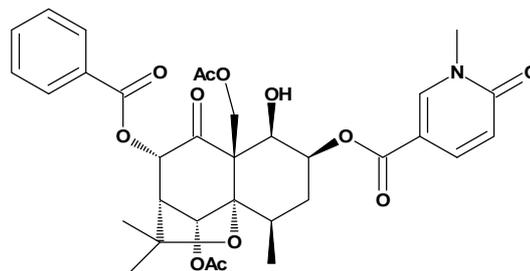
本研究ではマダガスカル産植物サンプルの入手と MeOH による抽出、得られた MeOH 抽出

物のシリカゲルカラムによるフラクションライブラリーの作成、A549 ヒト癌細胞に対するがん細胞増殖抑制効果、リーシュマニア症の原因原虫の一種である *Leishmania major* に対する増殖抑制活性試験、種々の生活習慣病の原因になるとされるラジカル除去活性試験などを行い有用性を評価した。

研究対象とする植物サンプルについては、Ohio State University, Medicinal Chemistry and Pharmacognosy との共同研究でマダガスカル産植物サンプル 61 種を入手した。これらのマダガスカル植物サンプルについてシリカゲル担体によるガラス細管サイズのカラムクロマトグラフィーによるフラクションライブラリーの調製と TLC による分析、活性評価の検討をおこなった。フラクションの作成ではいたずらに分画数を多くすることは後の活性評価や TLC 分析などに多大な労力が必要となるため、粗精製として 4 分画に分画することにした。これは、これまでの経験から、多くの植物抽出物はクロロフィルや脂肪酸類を多く含む疎水性に富んだフラクションと最も極性の高い MeOH 溶出部は活性が低く、含有成分が普遍的なものであることが多いことから、除去したほうが効率的であると考えられたからである。また、その間の中間の溶出条件では、程度の差こそあれ、植物成分の場合、比較的活性成分が広範囲にわたって分布する傾向が見られること、ガラス管を用いたミニカラムであり分離能力に限られることなどを考慮し、フラクションライブラリーの調製については  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH=5:1,  $\text{CHCl}_3$ : MeOH=2:1, MeOH で分画することにした。その結果、スクリーニング規模を無駄に大きくせず活性評価を行うことができ、複数の候補植物サンプルを選定できた。61 種の植物抽出物から調製したフラクションライブラリー 244 種をスクリーニングした結果 11 種の植物種に興味ある結果を得た。これらについては順次、化学的解析に必要な量の入手を行い、検討を加える予定である。本研究期間では、そのうち、比較的早期に追加材料が入手できたサンプル *Mystroxydon aethiopicum* の葉部、*Neobeguea mahafalensis* の材部について含有成分の化学的解析を行った。

*Mystroxydon aethiopicum* はニシキギ科植物で家畜の寄生虫駆除などに用いられてきた植物である。フラクションライブラリーで  $\text{CHCl}_3$  画分には活性がなく C:M=5:1 の画分に活性が集中して見られた。追加で入手した乾燥葉 80g を抽出して得られた 5.5g の MeOH エキスについて、フラクションライブラリーでの結果をもとにシリカゲル、ODS、HPLC で分離精製を行ったところ、メガステイグマン類を 2 種、ステロール配糖体、benzoic acid 類を単離同定したほか、5-carboxy-N-methyl-2-pyridone をエステル官能基として結合している新規ジヒドロアガロフラン型セステルペンを 2 種単離した。

その化学構造は COSY, HSQC, HMBC, PS-NOESY などの 2 次元 NMR などのデータを詳細に解析することで以下のように決定した。



(2 つの化合物のうち一つを示す)

ここで得られた研究成果については 2017 年 9 月の日本生薬学会で発表予定である。

また、*Neobeguea mahafalensis* の材部もフラクションライブラリーにて C:M=5:1 溶出画分に活性がみられた。先ほどの *Mystroxydon aethiopicum* とともに MeOH 抽出物の段階ではほとんど活性がみられず、見逃される可能性があったが、フラクションライブラリー化によって活性が見出されたものである。追加試料として乾燥材 80g について同様に抽出を行い、抽出物 10.6g を得た。シリカゲル、ODS、HPLC で精製を行うことで 3 種の新規リモノイド類を得、そのうち 2 種は新規化合物であることが明らかとなった。これらは立体化学を詳細に検討し、今後、学会や国際学術論文で発表する予定である。

その他、当研究室に保有する沖縄亜熱帯植物やエジプト産植物について共通のアッセイ系や試薬類などを用いることで成果が上がったものについて以下の雑誌論文リストに列挙した。

#### 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 6 件)

Chemical structures of constituents from the leaves of *Polyscias balfouriana* Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Hany Ezzat Khalil, Hideaki Otsuka, Mohamed Salah Kamel, Ahmed Gomaa Gomaa Darwish and Katsuyoshi Matsunami: *Journal of Natural Medicines* 71(03) 000-000 (2017) in press 査読有

New isolinariins C, D and E, flavonoid glycosides from *Linaria japonica* Retno Widjowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Skardiman Harjotaruno, Hideaki Otsuka and Katsuyoshi Matsunami: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 64(05)

517-521 (2016) 査読有

Officinalioside, a new lignan glucoside from *Borago officinalis* L.

Mamdouh Samy Nabil, Ashraf Nageeb El-Sayed hamed, Sachiko Sugimoto, Hideaki Otsuka Mohamed, Salah Kamel and Katsuyoshi Matsunami: Natural Product Research, 30(08), 967-973 (2016) 査読有

Effect of hepatoprotective compounds from the leaves of *Lumnitzera racemosa* against acetaminophen-induced liver damage in vitro

Ahmed Gomaa Gomaa Darwish, Mamdouh Nabil Samy, Sachiko Sugimoto, Hideaki Otsuka, Hosni Abdel-Salam and Katsuyoshi Matsunami: Chemical and Pharmaceutical Bulletin 64(04) 360-365 (2016) 査読有

Amphipaniculosides A-D, triterpenoid glycosides, and amphipaniculoside E, an aliphatic alcohol glycoside from the leaves of *Amphilophium paniculatum*

Mamdouh Samy Nabil, Hany Ezzat Khalil, Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka and Mohamed Salah Kamel: Phytochemistry, 115, 261-268 (2015) 査読有

New cis-ent-clerodanes from *Linaria japonica*

Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Skardiman Harjotaruno, Hideaki Otsuka and Katsuyoshi Matsunami: Phytochemistry Letters 14, 56-62 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

*Polyscias balfouriana* 葉部の成分研究, 杉本幸子、山野喜、Hany Ezzat Khalil、Mohamed Salah Kamel、大塚英昭、松浪勝義, 日本生薬学会 第63回年会, 2016年09月24日, 通常, 日本語, 富山

Bioactive Compounds From the Leaves of *Lumnitzera racemosa* Against Acetaminophen-induced Liver Damage In Vitro., Ahmed Gomaa Darwish, Mamdouh Nabil Samy, Sachiko Sugimoto, Hideaki Otsuka, Hosni Abdel-Salam, Mohammady Abdel-Hamid Issa, Emad Sabry Shaker, Katsuyoshi Matsunami, The 12th International Conference Desert Technology (DT 12), 2015年11月16日, 通常, 英語, Cairo, Egypt

Hepatoprotective activity of isolated compounds from *Lumnitzera racemosa*, Ahmed

Darwish, Mamdouh Samy, 杉本幸子、山野喜、大塚英昭、Hosni Abdel-Salam, 松浪勝義, 日本薬学会 第135年会, 2015年03月25日, 通常, 英語, 神戸

エジプト産 *Amphilophium paniculatum* 由来の新規トリテルペン配糖体, Samy Mamdouh, Khalil Hany, 杉本幸子, 山野喜, 松浪勝義, 大塚英昭, Kamel Mohamed, 第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2014年11月08日, 通常, 日本語, 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部, 広島

NEW FLAVONOID GLYCOSIDES FROM *LINARIA JAPONICA*, Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami, 第8回日中韓生薬学合同シンポジウム, 2014年09月13日, 通常, 英語, The Japanese Society of Pharmacognosy, Chinese Committee of Traditional Chinese Natural Medicines, and The Korean Society of Pharmacognosy, Fukuoka

New Diterpenes from *Linaria japonica* New Diterpenes from *Linaria japonica*, WIDYOWATI Retno, SUGIMOTO Sachiko, YAMANO Yoshi, OTSUKA Hideaki, MATSUNAMI Katsuyoshi, 日本薬学会 第134年会, 2014年03月27日, 通常, 英語, 熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/~shoyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浪 勝義 (MATSUNAMI, Katsuyoshi)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号: 70379890

(2) 研究分担者

大塚 英昭 (OTSUKA, Hideaki)  
安田女子大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00107385

杉本 幸子 (SUGIMOTO, Sachiko)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授  
研究者番号: 60549012

山野 喜 (YAMANO, Yoshi)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 70650597