

令和元年6月19日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18894

研究課題名(和文) ミャンマー産薬用植物由来のリーシュマニア原虫に特異的なアポトーシス誘導物質の探索

研究課題名(英文) Leishmanicidal constituents from Myanmar plants and biochemical mechanism of apoptotic activity

研究代表者

安元 加奈未 (Mori-Yasumoto, Kanami)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：70412393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、明確な治療薬が無い皮膚型リーシュマニア症の治療薬を目指し、熱帯域であるミャンマーの薬用植物から、抗リーシュマニア活性成分の探索を目的として行った。リーシュマニア原虫を用いて以下を研究を行った。(1)ミャンマー産植物エキス2種から、各種クロマトグラフィーにより抗リーシュマニア活性物質を計39種単離し、NMRや質量分析等を検討し化学構造を決定した。(2)抗リーシュマニア活性指標として、現行の改良MTT法、宿主細胞モデルに対する細胞傷害性試験に加えて、アポトーシスに着目し、JC-1によるミトコンドリア膜電位差を検討する系を構築し、抗リーシュマニア活性植物抽出エキスについて試験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したリーシュマニア症は、WHOにより最も対策が困難なカテゴリ-1の熱帯感染症として位置づけられており、世界中で新薬の開発に向け研究が行われているが、原虫や媒介昆虫の多様性から、困難を極め未だ発見には至っておらず早急な化学療法による治療が期待されている。本研究は、「顧みられない病」の医薬品シーズを目指し、また発症国の天然資源を利用するため、基礎研究ではあるものの「発症国の患者が入手しやすい治療薬」に繋がると考えられる。本研究を通じて、合成薬だけでなく、申請者らが見出した紫雲膏のような薬を現地の資源を用いて検討したいという最終目標がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the leishmanicidal constituents from Myanmar plants and attempted to build a new screening system to elucidate the biochemical mechanism of the leishmanicidal activity. Several extracts from the plants belonging to Piperaceae and Myricaceae, were found to inhibit the activity in the first screening. Thirty-nine compounds were isolated, and their activity as well as cytotoxicity against RAW 264.7 was examined. Additionally, the active extracts and compounds were subjected to JC-1 mitochondrial assay for estimating of mitochondrial transmembrane electric potential.

研究分野：生薬学、天然物化学、薬用資源学

キーワード：リーシュマニア症 熱帯植物 ミャンマー 構造決定 抗リーシュマニア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア症は、WHO が世界六大熱帯病に指定する、重篤な昆虫媒介性原虫症である。病態は皮膚型・粘膜皮膚型・内蔵型に分類され、感染者数はマラリアやトリパノソーマに並ぶほどであるが、内蔵型以外には明確な特效薬が無く、顧みられない感染症(neglected disease)とされている。日本には現存しない病気とされているが、昨今流行の見られた Dengue 熱ウィルスのように気候変動による流行拡大や輸入感染症としても懸念されている。このような背景のもと、申請者らは、現在まで主に熱帯植物から皮膚型昆虫寄生体(前鞭毛体)原虫を用いて、抗リーシュマニア活性物質の探索に取り組んできた。(Mori et al, *J Nat Prod* 2008; Fuchino, Mori-Yasumoto et al, *Chem Pharm Bull* 2010; Mori-Yasumoto et al, *Bioorg Med Chem* 2012 他)

その研究過程において、申請者らの研究グループでは、生薬である紫根 (*Lithospermum erythrorhizon* の根) の成分である shikonin 類縁体に強力な抗リーシュマニア原虫活性を見出した。(PCT 国際出願 PCT/JP2005/13268 国際公開番号 WO2006/011394 A1) この結果から、紫根が主薬である漢方薬「紫雲膏」を用いてペルーでパイロット臨床試験を行い、有効性が認められた。(淵野、安元ら、日本薬学会第 129 回年会、2009) 現在の第一選択薬であるアンチモン製剤は非常に高価で、安全性にも問題がある。一方、紫雲膏の原材料はアジア産の生薬で供給量に限界があることから、現地の人に安価で有効な治療薬を提供するには、患者の多い熱帯地方の薬用植物から有効な植物を見出すことが必要である。

これまでの研究成果では、ミャンマー産植物 *Diospyros burmanica* より、顕著な抗リーシュマニア活性を有し、原虫に非常に選択性が高い 3 種の新規ビスナフトキノン化合物 (burmanin A-C) を単離構造決定し、報告した (Mori-Yasumoto et al, *Bioorg Med Chem* 2012)。また近年、原虫を BALB/c マウス腫に感染させたマウス皮膚型リーシュマニア症モデルを用いたスクリーニングにおいて有意な治療効果が認められたペルー産植物 (日本薬学会第 135 回年会、2015) 改良 MTT アッセイ法によるスクリーニングにおいて活性を示したミャンマー産植物から計 11 種の成分を単離 (日本薬学会第 139 回年会、2019) などの研究結果も報告、発表した。申請者がこれまで単離してきた強力な抗リーシュマニア活性を有する化合物は、キノン系化合物群が多く、これらは細胞毒性も低く医薬シーズとしての可能性が期待されている。キノン系化合物は、多くの寄生虫の特徴でありリーシュマニア原虫においても重要な ATP 産生の供給源である嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖 (PEPCK-コハク酸回路) を阻害することが知られている。また近年、ミトコンドリアの膜電位は、ATP を産生する呼吸鎖の働き、すなわちアポトーシスに関して重要な指標であるとされ、それを視覚化し、定量できる蛍光プローブ (JC-1) も広く知られるようになった。そこで、従来検討してきたアッセイ系に加えて、リーシュマニア原虫前鞭毛体のミトコンドリアの膜電位変化を検討することにより活性化合物のアポトーシス誘導能を調べ、原虫に特異的な影響を検討することとした。

2. 研究の目的

熱帯に多いリーシュマニア症は、寄生虫であるリーシュマニア原虫が引き起こす病気で、WHO により制圧すべき病気の 1 つとされているが特效薬は未だ存在しない。地球温暖化やグローバル化による熱帯病拡大も懸念されており、早期の治療薬開発が望まれている。これまで申請者らは、罹患患者の多い地域の植物資源から医薬品シーズの探索研究を行い、リーシュマニア原虫を選択的に阻害する有望な化合物を得ている。そこで本研究では、植物資源の豊富なミャンマー産薬用植物から抗リーシュマニア活性物質を探索する目的で、研究を行うこととした。

3. 研究の方法

申請者は、本研究において予備試験で活性の見られた植物エキスの分離精製を行い、新たな抗リーシュマニア活性化合物を見出すべく、従来の活性試験に加えて、薬理活性機構解明の一助となるべく、エキス・活性化合物について原虫のミトコンドリア膜電位差によるアポトーシス誘導能を調べ、原虫に特異的な影響を与える化合物を見出す方法を検討した。本研究では、以下の 2 つの内容を軸に実験を行い、結果を考察した。

- (1) ミャンマー産薬用植物エキスから新たな抗リーシュマニア活性化合物の単離・構造決定
- (2) リーシュマニア原虫へのアポトーシス誘導活性の検討

(1) ミャンマー産薬用植物エキスから新たな抗リーシュマニア活性化合物の単離・構造決定

予備試験にて活性の見られたミャンマー産植物エキス 4 種 (MIC 3.1, 3.1, 12.5, 12.5 µg/mL) から 2 種について、抗リーシュマニアアッセイ法 (WST-8 アッセイ) を用いてパイオアッセイガイドによる分離精製を行った。分離は常法に従い、有機溶媒 / 水系にて液液分配後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、オクタデシル化シリカゲルクロマトグラフィー、中圧カラムクロマトグラフィー、HPLC 分析・分取を用いて探索を行った。単離した活性物質は、核磁気共鳴スペクトル (NMR)、赤外分光スペクトル、紫外可視分光スペクトル、円二色性スペクトル、高分解能マススペクトルなどの機器分析により構造解析を実施した。顕著な活性が見られた化合物については、宿主細胞への影響を検討するため マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 について XTT 試験を行い、検定サンプルの細胞傷害性を調べた。これにより、宿主モデル細胞に対して影響の低い、即ち選択性の高い抗リーシュマニア活性物質を見出すことが可能である。

昆虫寄生型原虫の改良 MTT(WST-8)アッセイ: 濃度調整した原虫 (皮膚型リーシュマニア原虫

Leishmania major) に、検定するサンプルを添加し、27°C、5%CO₂下 48 時間培養後、WST-8 試薬 (同仁化学) を加えて反応させ、ELISA リーダーにて吸光度を測定した (450, 630 nm)。ポジティブコントロールはアムホテリシン B を用いた (IC₅₀ >0.1 µg/mL)。結果はコントロールとの比較を行い、原虫の生存率を算定した (Mori et al, *J Nat Prod*, 2008)。

宿主モデル細胞へ増殖抑制試験の影響 (XTT 試験): 宿主モデル細胞としてマウスマクロファージ用細胞 RAW264.7 をもちいて XTT 試験 (Roche) を行い、活性化合物の細胞傷害性を調べた。検定するサンプルを添加し、37°C、5%CO₂下で 48 時間培養後 XTT 試薬を用いて測定を行った (Mori-Yasumoto et al, *Bioorg Med Chem*, 2012)。

(2)原虫アポトーシス誘導活性の検討 JC-1 蛍光プローブによるミトコンドリア膜電位の変化

細胞のアポトーシス (プログラム細胞死) は、ミトコンドリア膜電位の低下により開始したと見なされることから、アポトーシス中に起こるミトコンドリアの脱分極の検出に広く指標として用いられている。脂溶性カチオン蛍光プローブである JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide) は低濃度ではモノマーで存在し 530 nm の緑色蛍光を発するが、濃度が高くなると凝集して 590 nm の赤色蛍光を発する。アポトーシスを起こした細胞には JC-1 は取り込まれないため、フローサイトメトリーおよび蛍光プレートリーダー等により効率的に膜電位をモニタリングできる。これはリーシュマニア原虫にも応用できる (*L. amazonensis*, Macedo-Silva, ST, *Mol Biol Int*, 2011)。

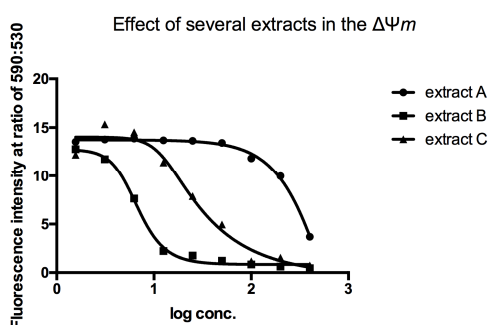
ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 測定によるリーシュマニア原虫のアポトーシス誘導能活性試験: コントロールおよびエキスと 48 時間 triplicate にて共培養した昆虫寄生型原虫は、JC-1 (Cayman Chemical Company) を添加後、アッセイバッファーで洗浄し、上清を蛍光プレートリーダーにて測定した (530 nm, 590 nm)。ポジティブコントロールは、株化細胞にもアポトーシスを誘導する F0, F1-ATP 合成酵素特異的阻害剤 Oligomycin、脱分極剤でプロトノフォアである carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP)を用いた。

4. 研究成果

(1) ミャンマー産薬用植物エキスから新たな抗リーシュマニア活性化合物の単離・構造決定

申請者が所有するミャンマー産薬用植物エキス (メタノール抽出エキスおよび水抽出エキス) から、リーシュマニア原虫を用いた改良 MTT 法による一次スクリーニングを行い、本研究ではコショウ科植物およびヤマモモ科植物を選定した。各種クロマトグラフィーによる分画の結果、コショウ科植物メタノールエキスより新規ベンゾフランネオリグナンを含む 18 種の化合物を、ヤマモモ科植物メタノールエキスからジアリルヘプタノイドおよびその配糖体を含む 21 種の化合物を単離し、核磁気共鳴スペクトル (NMR) および質量分析計などの機器分析により構造決定を行った。*Leishmania major* 前鞭毛体を用いた改良 MTT 法および RAW264.7 に対する影響を XTT 試験法にてそれぞれ検討した。その結果、コショウ科ネオリグナン類 5 種 (IC₅₀ 3.5~4.7 µg/mL) およびオレアナン型トリテルペン 2 種 (IC₅₀ 4.9, 5.1 µg/mL) に抗リーシュマニア活性を見出した (ポジティブコントロール/アムホテリシン B : IC₅₀ 0.04 µg/mL)。また、これらは宿主細胞モデルであるマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対して強い影響を及ぼさないことを明らかにした。

(2) 原虫アポトーシス誘導活性の検討: JC-1 蛍光プローブによるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の変化



活性化合物の薬理作用を見出す新規スクリーニングとして、蛍光プローブ JC-1 によるリーシュマニア原虫のミトコンドリア膜電位差を検討した。まず初めに、報告例のない皮膚型リーシュマニア原虫 *L. major* 前鞭毛体について、最適な原虫濃度および試薬添加量と蛍光強度の調節を検討し、条件を決定した。また、蛍光強度の安定性を調べるため、15 分後、30 分後に同一サンプルの測定を行ったが、著しい低下は認められなかった。次に植物エキスについて検討するため、抗リーシュマニア活性化合物を含む植物エキス 3 種 (extract A-C, 最大終濃度 400 µg/mL) およびポジティブコントロール 2 種 (オリゴマイシン complex およ

び FCCP) (最大終濃度 20 µM, 5 µM) を用いて実験を行い、ポジティブコントロール濃度の設定を行い、検討した。加えて、改良 MTT 試験法においてポジティブコントロールとして用いるアムホテリシン B についても同様に検討した (最大終濃度 3.1 µg/mL)。健康な細胞ではミトコンドリアの膜電位が高いため、カチオン性の蛍光色素である JC-1 は凝集して 590 nm の赤色蛍光を発し、機能不全を起こした細胞では、電位差が低下するためモノマーで存在し 530 nm の緑色蛍光を発する。膜電位差を調べるために、本実験で得られたそれぞれの蛍光強度の比を取り、結果を図に示した。グラフから求めた各エキス (extract A~C) の EC₅₀ 値はそれぞれ >400, 6.7, 28.8 µM であった。同時に測定したポジティブコントロール (FCCP, オリゴマイシン, アムホテリシン B) の EC₅₀ 値はそれぞれ 1.2, 8.7, 0.03 µM であった。結果について、蛍光度比 (590 nm/530 nm)

が大きいほど健康な細胞が多く存在し、小さいほどアポトーシス等の機能不全を起こしている細胞が多いと考えることができる。これらの結果から、extract B がミトコンドリア膜電位に大きな影響を低濃度で与えていることが確認された。また、extract C についても含有化合物が影響を与えることが推察された。また各エキス (extract A~C) について改良 MTT 法にて抗リーシュマニア活性を調べたところ、IC₅₀ 値はそれぞれ >400, 5.0, 20.4 μM であった。同時に測定したポジティブコントロール (FCCP, オリゴマイシン, アムホテリシン B) の IC₅₀ 値はそれぞれ 4.2, 0.34, 0.03 μM であった。この結果から、これらのエキスにおいては、増殖抑制活性とミトコンドリアの膜電位消失活性が類似した挙動を示していることが確認でき、特に extract B にミトコンドリア膜電位に強い影響を与える化合物が含まれていることが示唆された。

(3)まとめと今後の展望について

本研究により、ミャンマー産薬用植物 2 種から計 39 種の成分を単離・構造決定し、これらの抗リーシュマニア活性を調べたところ 7 種の化合物に活性を認め (IC₅₀ 3.5~5.1 μg/mL)、これらは宿主細胞モデル RAW264.7 細胞には強い影響を与えないことを明らかにした。また、アポトーシス誘導能を調べる方法として、ミトコンドリア膜電位に着目し、カチオン性蛍光プローブ JC-1 を *Leishmania major* 前鞭毛体に適応させたアッセイ系を構築し、抗リーシュマニア活性物質を含む植物エキス 3 種について試験を実施し、extract B に強い膜電位消失活性を見出した。今後、これらエキスに含まれる活性化合物や、今回得られた活性化合物にも適応し、ミトコンドリア膜電位に与える影響を検討する。また、これまで用いてきた改良 MTT アッセイ (WST-6) と JC-1 アッセイを組み合わせてエキス選定およびバイオアッセイガイドに用いることで、ミトコンドリア膜電位消失という薬理活性にフォーカスした化合物探索を行うことができると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Kazuma, K., Ando, K., Nihei, K., Wang, X., Rangel, M., Franzolin, M. R., Mori-Yasumoto, K., Sekita, S., Kadowaki, M., Satake, M., Konno, K. (2017). Peptidomic analysis of the venom of the solitary bee *Xylocopa appendiculata* circumvolans. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23:40. 査読有り
- (2) Muhit, Md. A., Umehara, K., Mori-Yasumoto, K., Noguchi, H. (2016). Furofuran Lignan Glucosides with Estrogen-Inhibitory Properties from the Bangladeshi Medicinal Plant *Terminalia citrina*, *J. Nat. Prod.*, 79, 1298-1307. 査読有り
- (3) 安元(森)加奈未. (2018). 原虫性熱帯感染症リーシュマニア症の治療薬開発を目指して, *アグリバイオ*, 2(1), p94-97.
- (4) 安元(森)加奈未. (2016). ニューージーランド産ハチミツに混入した神経毒-更なる成分の解明, *ファルマシア*, 52(4), 344.
- (5) 安元加奈未. (2015). 熱帯植物からの抗リーシュマニア活性物質の探索-ミャンマー薬用資源調査と成分研究-, *和漢薬*, 65(7), p3-6.

〔学会発表〕(計 5 件)

- [1]. 安元(森)加奈未, 岩本 恵梨子, 淵野 裕之, 佐竹 元吉, 関田 節子, 代田 修. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索(その 30)-ミャンマー産植物 *gamon Kaempferia galanga* の成分について-, 日本薬学会第 139 回年会 (千葉) 2019.3.
- [2]. 岡本昌樹, 下川美桜, 松嶋ゆかり, 榊原 巖, 安元加奈未, 菅沼 啓輔, Orawan MONTHAKANTIRAT, 梅原 薫 . タイ薬用植物 *Persicaria tomentosum* 中の有用成分研究, 日本薬学会第 139 回年会 (千葉) 2019.3.
- [3]. 安元 加奈未, 三島彩加, 淵野裕之, 佐竹元吉, 関田節子, 代田修. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その 29) ミャンマー産植物 *Piper chaba* の成分研究, 日本生薬学会第 65 回年会 (広島) 2018.9.16
- [4]. 安元(森)加奈未, 三島彩加, 淵野裕之, 佐竹元吉, 関田節子, 代田修. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その 28) - ミャンマー産植物 *Sayo Piper chaba* Hunter の成分について -, 第 56 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 (徳島) 2017.10.21
- [5]. 諏訪間宗治, 渡邊敬介, 梅原薫, 安元加奈未, Orawan MONTHAKANTIRAT, Prathan LUECHA,

野口博司, 抗リーシュマニア活性を有するタイ薬用植物 *Diospyros mollis* 中の成分研究, 日本薬学会第 136 回年会 (横浜) 2016.3.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph09/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。