

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08348
研究課題名(和文) ジンチョウゲ科及びトウダイグサ科薬用植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究

研究課題名(英文) Study on bioactive diterpenoids from medicinal plants of Thymelaeaceae and Euphorbiaceae families

研究代表者
李 巍 (LI, Wei)
東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：90328633
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)：ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科植物由来のジテルペノイドは、化学構造と生物活性多様性に富んでいる。本研究では、日本産および中国産のジンチョウゲ科またはトウダイグサ科植物を収集、植物抽出物ライブラリーの構築、系統的な化学成分研究により、強力な抗HIV活性をもつ新規ジテルペノイドを多数単離・構造決定した。さらに、天然物からの半合成により化学誘導体を作製し、これらジテルペノイドの抗HIV活性の構造活性相関を明らかにしたと共に、新規抗HIV薬の創製のための構造最適化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗HIV薬による多剤併用療法はHIV増殖を抑制するが根絶することはできず、新規抗HIV薬創製は社会から求められている。本研究は、多様性に富む化学構造と生物活性を有する、ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科由来のジテルペノイドを着目して、新規生物活性成分の探索、構造活性相関の解析と構造最適化により、新しい天然由来創薬シーズの発見を通じた革新的な難治疾患治療薬創製に貢献できたと考える。

研究成果の概要(英文)：The diterpenoids distributed in the plants of Thymelaeaceae and Euphorbiaceae families are rich in the chemical and biological diversity. In the present study, we collected plants belonging to Thymelaeaceae and Euphorbiaceae families from Japan and China, and constructed a plant extract library. Further chemical investigations were carried out. As a result, a number of novel diterpenoids with potent anti-HIV activities were isolated. Their structures were established by extensive physicochemical and spectroscopic analyses. Furthermore, semisynthesis of the derivatives of the natural diterpenoids disclosed the structure-activity relationship and provided optimized lead compounds towards novel anti-HIV drug discovery.

研究分野：天然物化学

キーワード：ジンチョウゲ科 トウダイグサ科 ジテルペノイド 抗HIV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科には数千種の植物が含まれ、主に熱帯あるいは亜熱帯地区に分布する。ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科植物に含まれるジテルペノイドは多環性あるいはマクロ環構造を持つ骨格に、高度酸化された官能基またはアシル基を有する化学構造に非常に多様に富む一方、さらに抗がん、抗 HIV、抗炎症、抗マラリア原虫活性など多彩な生物活性が報告されており、天然物創薬の分野に大いに注目されてきた。それ故、これまでジンチョウゲ科あるいはトウダイグサ科植物に関する化学成分研究が国内外の多数の研究グループにより精力的に行われており、多くの新規生物活性ジテルペノイドが報告されている。

その中、矮鶏大戟 (*Euphorbia peplus*) 由来のインゲナン型ジテルペノイド ingenol の化学誘導体 ingenol 3-angelate は 2012 年に日光角化症治療薬として米国 FDA より承認された。ほかに、ハッカクキリン (*Euphorbia resinifera*) 由来のダフナン型ジテルペノイド resiniferatoxin は強力な TRPV1 アゴニストであり、鎮痛薬として臨床試験が進められている。また、ママラ (*Homalanthus nutans*) からのチグリアン型ジテルペノイド prostratin は潜伏期 HIV の活性化作用を有し、HIV 根治薬として注目されている。

HIV 感染症は、現在の多剤併用療法においては患者が終生に抗ウイルス薬を服用しなければならない問題点があり、HIV が宿主細胞に数年間も渡り潜伏することは根治できない根本的な原因と考えられる。本研究グループは中国伝統薬物「狼毒」の基原植物である瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* (ジンチョウゲ科) から極めて強力な抗 HIV 活性を有する新規ダフナン型およびチグリアン型ジテルペノイドを見いだした。さらに、主成分の gnidimacrin は選択的 PKC β 活性化を介して潜伏期 HIV を活性化し、同様な作用機序を有する抗 HIV 治療薬 prostratin より 1000 倍も強い抗 HIV 活性を有することを明らかにした。このような研究結果を踏まえて、本研究ではジンチョウゲ科およびトウダイグサ科薬用植物由来の生物活性ジテルペノイド成分に着目した。

2. 研究の目的

ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科植物由来のジテルペノイドは、化学構造と生物活性多様に富み、天然物創薬の研究領域で大いに注目されている。本研究は、ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科薬用植物から難治疾患である HIV 感染症の創薬シーズになりうる新規生物活性ジテルペノイドの発見を研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究はジンチョウゲ科およびトウダイグサ科薬用植物から新規生物活性ジテルペノイドの発見を研究目的として、以下の研究項目を実施した。

(1) 植物材料

伝統薬物としての使用経験を考慮したジンチョウゲ科およびトウダイグサ科薬用植物の収集およびメタノール抽出物ライブラリーの構築をした。

(2) 抽出単離

生物活性評価の結果を踏まえて、強い活性を示す抽出エキスあるいは分画を優先して単離を行った。メタノール抽出物に対して酢酸エチルと水にて分配操作を行い、酢酸エチル画分はさらに Diaion HP-20、順相および ODS カラムクロマトグラフィーにより順次分画した。各画分は順相および逆相分取 HPLC により単離精製を行い、目的ジテルペノイドを単離した。

(3) 構造決定

単離化合物について、HR-ESI-MS、CD および各種 NMR (^1H , ^{13}C -NMR, DEPT, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC, NOESY など) スペクトルの測定により構造解析を行った。

(4) 抗 HIV 活性測定

成分研究により得られたジテルペノイドに対して、NL4-3 ウイルスを感染させた MT4 リンパ球を用いて抗 HIV-1 複製活性を評価した。

(5) 化学誘導体の作成

上記研究により得られた活性化合物を用いて、アシル官能基の再構築あるいは新規官能基の導入などにより新規化学誘導体を合成した。

4. 研究成果

(1) 植物抽出物ライブラリーの作成およびその抗 HIV 活性評価

植物収集は中国伝統薬物辞書「中薬大辞典」および「中華本草」に記載のあるものを優先して行い、中国産の植物材料および本学薬用植物園の栽培品種を取集し、メタノール抽出物ライブラリーを構築した。植物抽出物の抗 HIV 活性を評価した結果、トウダイグサ科甘遂 (*Euphorbia kansui*)、ジンチョウゲ科瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme*)、瑞香 (*Daphne odora*)、結香 (*Edgeworthia chrysantha*) の抽出物は強い抗 HIV 活性を示した ($\text{EC}_{50} = 0.056\text{-}4.5 \text{ ng/mL}$)。さらに、中国雲南省にて 5 種のジンチョウゲ科アオガンビ属植物 (*Wikstroemia scytophylla*, *W. dolichantha*, *W. ligustrina*, *W. paniculate*, *W. lamatsoensis*) を採取し、それぞれ 95% エタノールにより抽出した。

(2) 甘遂由来の抗 HIV 活性成分の探索および化学誘導体の抗 HIV 活性

甘遂抽出物を Bioassay-guided Fractionation 法により分画し、強力な抗 HIV 活性(EC_{50} 0.53-420 ng/mL)を示したインゲナン型ジテルペノイドを 5 種単離した。さらに活性画分に対して弱アルカリを用いた加水分解反応を行い、得られた脱アシル化ジテルペノイド 20-deoxyingenol および ingenol を出発物質として、14 種の化学誘導体を合成した。中でも新規化合物 3-(2-naphthoyl)ingenol は最も強い抗 HIV 活性 (EC_{50} 1.3 nM) を示した一方、強力な HIV-1 潜伏感染された U1 細胞の活性化作用(EC_{50} 2.4 nM)も示した。

(3) Gnidimacrin の化学誘導体の作成および構造活性相関の検討

瑞香狼毒より単離したダフナン型ジテルペノイド gnidimacrin(GM)は強力な抗 HIV 活性(EC_{90} 0.41nM)を示す新規抗 HIV 根治薬創製のリード化合物である。GM の重要な官能基である 3 位および 18 位-ベンゾイル基、4 位、5 位、20 位および 2'位-水酸基、15(16)位二重結合に対して、弱アルカリ条件下の脱アシル化反応、有機酸無水物を利用したエステル化反応、Pd/C 還元および OsO₄ 酸化反応を行った。GM 誘導体の抗 HIV 活性を評価し、構造活性相関を解析した結果、3 位-ベンゾイル基は抗 HIV 活性発現に必要であること、および 2'位-水酸基のエステル化は抗 HIV 活性を増加させることを明らかにした。

(4) ジンチョウゲ(瑞香)のダフナン型ジテルペノイドに関する成分研究

本学薬用植物園にて採取したジンチョウゲの枝および葉より得られたメタノール抽出物を各種カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いて単離精製を行い、新規化合物 9 種を含む計 17 種のダフナン型ジテルペノイドを単離した。そのうち 16 種の化合物について抗 HIV 活性を評価した結果、13 種が強い抗 HIV 活性(EC_{50} < 5 nM)を示した一方、有効濃度を遥かに超えた高濃度(25 nM)において細胞毒性を示さなかった。中でも今までにない高度酸化修飾された大環状構造を有する新規ダフナン型ジテルペノイド daphneodorin A, B は強力な抗 HIV 活性 (EC_{50} 0.16, 0.25 nM) を示した。さらに、ダフナン骨格にオルトエステル結合している脂肪族鎖にさらにクマリン(Daphnetin)が結合したこれまでにないユニークな化学構造を有する新規化合物を単離した。

(5) ミツマタ(結香)のダフナン型ジテルペノイドに関する成分研究

中国湖南省にて採取したミツマタの花蕾より得られたメタノール抽出物を各種カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いて単離精製を行い、5 種の新規抗 HIV 活性ダフナン型ジテルペノイドを単離した。これら化合物は、*cis*-5-tetradecenoic acid がダフナン骨格の 9 位、13 位、14 位水酸基とオルトエステル結合し、さらに 1 位と 11 位間で大環状構造を形成している特徴を有する。大環状部分が *cis*-5-tetradecenoic acid に由来するダフナン型ジテルペノイドは今までにほとんど単離されておらず、今回初めてその抗 HIV 活性を明らかにした。その結果、2 種の化合物は強い抗 HIV 活性 (EC_{50} 2.9, 8.4 nM) を示した。

(6) アオガンピ属植物のチグリアン型およびダフナン型ジテルペノイドに関する成分研究

アオガンピ属植物の得られた 95%エタノール抽出物について、各種カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いて単離精製を行った。その結果、*W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* から新規化合物 5 種を含む計 9 種のチグリアン型ジテルペノイド、*W. ligustrina* からは新規化合物 1 種を含む計 5 種のダフナン型ジテルペノイドを単離し構造決定した。一方、単離した化合物について抗 HIV 活性を評価したところ、チグリアン型ジテルペノイド dapholosericin A は強い抗 HIV 活性(EC_{50} 3.8nM)を示した。

本研究により日本産および中国産のジンチョウゲ科またはトウダイグサ科植物より、強力な抗 HIV 活性をもつ新規活性ジテルペノイドを単離した。また、インゲナン型、ダフナン型およびチグリアン型ジテルペノイドと抗 HIV 活性の構造活性相関を明らかにした。今後は更なる創薬研究により、新規抗 HIV 治療薬の創製が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Qingbo, Cheng Yung-Yi, Li Wei, Huang Li, Asada Yoshihisa, Hsieh Min-Tsang, Morris-Natschke Susan L., Chen Chin-Ho, Koike Kazuo, Lee Kuo-Hsiung	4. 巻 62
2. 論文標題 Synthesis and Structure?Activity Relationship Correlations of Gnidimacrin Derivatives as Potent HIV-1 Inhibitors and HIV Latency Reversing Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 6958 ~ 6971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b00339	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 Liu Qingbo, Li Wei, Huang Li, Asada Yoshihisa, Morris-Natschke Susan L., Chen Chin-Ho, Lee Kuo-Hsiung, Koike Kazuo	4. 巻 156
2. 論文標題 Identification, structural modification, and dichotomous effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication of ingenane esters from Euphorbia kansui	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 618 ~ 627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2018.07.020	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 Otsuki Kouharu, Li Wei, Asada Yoshihisa, Chen Chin-Ho, Lee Kuo-Hsiung, Koike Kazuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Daphneodorins A?C, Anti-HIV Gnidimacrin Related Macrocyclic Daphnane Orthoesters from Daphne odora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 11 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03539	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13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Wei Li
2. 発表標題 Discovery of anti-HIV diterpenoids from medicinal plants of Thymelaeaceae and Euphorbiaceae families
3. 学会等名 11th Joint Seminar on Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mi Zhang、Asuka Yamamoto、Kouharu Otsuki、Wei Li、Kazuo Koike
2. 発表標題 Tigliane diterpenoids from <i>Wikstroemia scytophylla</i>
3. 学会等名 11th Joint Seminar on Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大月 興春、李 巍、浅田 善久、Chen Chin-Ho、Lee Kuo-Hsiung、小池 一男
2. 発表標題 沈丁花由来の抗HIV活性を有する大環状daphnane型ジテルペノイドに関する研究
3. 学会等名 第56回植物化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wei Li
2. 発表標題 Gnidimacrin and its derivatives against HIV-1 latency
3. 学会等名 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 明日香、大月 興春、李 寧、李 巍、小池 一男
2. 発表標題 ジンチョウゲ科植物 <i>Wikstroemia scytophylla</i> の化学成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大月 興春、三浦 香純、李 巍、竹元 裕明、 浅田 善久、小池 一男
2. 発表標題 ジンチョウゲ科薬用植物ジンチョウゲの成分研究
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 巍、劉 慶博、浅田善久、Chen Chin-Ho、Lee Kuo-Hsiung、小池 一男
2. 発表標題 トウダイグサ科およびジンチョウゲ科薬用植物由来の潜伏HIVを活性化する抗HIV活性天然物の探索研究
3. 学会等名 第20回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 巍、劉 慶博、浅田 善久、小池 一男
2. 発表標題 ジンチョウゲ科およびトウダイグサ科薬用植物 から抗HIVジテルペノイドの探索研究
3. 学会等名 第22回天然薬物の応用と開発シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wei Li
2. 発表標題 Discovery of anti-HIV diterpenoids from medicinal plants of Thymelaeaceae and Euphorbiaceae
3. 学会等名 The Fifth World Education Congress of Chinese Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大月 興春、三浦 香純、李 巍、浅田 善久、小池 一男
2. 発表標題 ジンチョウゲ科薬用植物ジンチョウゲのダフナン型ジテルペンに関する成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 師岡 美喜、大月 興春、李 巍、浅田 善久、小池 一男
2. 発表標題 ジンチョウゲ科薬用植物ミツマタのダフナン型ジテルペンに関する成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 慶博、李 巍、Chen Chin-Ho、Lee Kuo-Hsiung、小池 一男
2. 発表標題 抗HIV天然物gnidimacrinの化学誘導体合成と構造活性相関
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 巍、劉 慶博、Chen Chin-Ho、Lee Kuo-Hsiung、小池 一男
2. 発表標題 生薬甘遂由来の抗HIV活性成分の探索研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----