

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08358

研究課題名(和文) マクロファージを標的としたがん治療及びがん予防に有効な新規含硫黄環状化合物の創製

研究課題名(英文) Novel Sulfur-Containing Cyclization Compounds Effective for Cancer Therapy and Cancer Prevention Targeting Macrophages

研究代表者

池田 剛 (IKEDA, TSUYOSHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80295138

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)：抗腫瘍活性を確認したonionin A1の関連化合物にもがん予防効果が期待される。また、化合物の安定供給の方法を確立するために新たな安定した含硫黄化合物の発見も望まれる。そこで、onionin A1を単離したタマネギと関連するAllium属植物の成分検索を行った。研究素材として、ネギ、ニンニク、ニンニクの芽の検討を行った。その結果、ニンニクの芽よりニンニク本体に含まれるgarlicnin B1とajoeneが良好な収量で得られた。ニンニクの芽は大量に増やすことも可能で、garlicnin B1を選択的に生成することから分離も容易であるので、がん予防の優れた素材であることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん予防効果が報告されているタマネギより、新規含硫黄環状化合物 onionin A1と関連する環状化合物を単離構造決定した。さらに、onionin A1の類縁体を同族のAllium属に由来する食品(ネギ、ニンニク、ニンニクの芽)から探索した。調査した素材全てからonionin A1類縁化合物を単離構造決定することが出来た。収量と精製の容易さを総合すると、ニンニク由来のgarlicnin B1をニンニクの芽より精製することが効果的であるという結論に至った。今後、garlicnin B1について、マクロファージを標的としたがん予防法の開発の化学的基礎データの蓄積が期待される。

研究成果の概要(英文)：Onionin A1 related compounds that have been confirmed to have antitumor activity are also expected to have cancer-preventing effects. In addition, the discovery of new stable sulfur-containing compounds is also desired in order to establish a method of stable supply of compounds. Therefore, we performed a component search for Allium species related to onions from which onionin A1 was isolated. As research materials, we examined leeks, garlic, and garlic sprouts. As a result, garlicnin B1 and ajoene contained in the garlic itself were obtained in good yield from the garlic shoots. Garlic buds can be increased in large quantities, and garlicnin B1 is selectively produced, which facilitates isolation and is therefore expected to be an excellent material for cancer prevention.

研究分野：天然薬物学

キーワード：含硫黄化合物 タマネギ 抗腫瘍活性 マクロファージ ニンニク garlicnin B1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アメリカ NCI (国立がん研究所) のデザイナーフーズプログラム「植物性食品によるがん予防計画」の疫学調査より、がん予防効果の高い食品の頂点はニンニクで、関連する *Allium* 属のタマネギも高いランキングにある。しかし、ニンニク、タマネギのがん予防効果の関与成分は不明であった。そこで、まず、タマネギの関与成分探索を行った。その結果、アリシン由来の含硫黄化合物群が候補化合物として挙げられた。なかでも、収量が多く特異な環状構造を有する onionin A と命名した新規化合物は、ヒト単球から分化させたマクロファージを用いた実験において、マクロファージの M2 活性化を強く抑制することを明らかにした (*J. Nat. Prod.*, **73**, 1306-1308 (2010))。また、詳細な成分研究を行ったところ、既報の onionin A を onionin A₁ と再命名し、他に 2 種のマイナー成分 onionin A₂, A₃ が得られた (*Chem. Pharm. Bull.*, **62**, 1141-1145 (2014)) (図 1)。

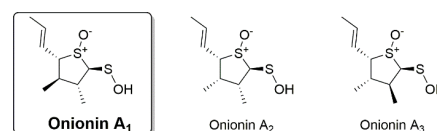


図 1. Onionin A₁~A₃ の化学構造

(2) これまでの詳細な活性試験より、onionin A₁ は、転写因子 (STAT3) と M2 マクロファージの両方の活性化を抑制し顕著な抗腫瘍効果を示し (*Scientific Reports*, **6**, 29588 (2016))、担癌マウスにおいて腫瘍本体の縮小効果と肺転移の抑制効果を観測した (*Mol. Nutri. Food Res.*, **60**, 2467-2480 (2016))。このことから、著者らの発見した onionin A₁ は、新たながん治療への応用が期待されていた。

2. 研究の目的

担癌マウスを用いた動物実験において、単離精製した onionin A₁ は、顕著な抗腫瘍効果が確認された。今後、非臨床試験で行う薬効薬理・薬物動態試験、さらに、GLP 基準に基づいて実施する安全性薬理、一般毒性、特殊毒性などの各試験の実施を可能にするためにはサンプル量を確保する必要がある。本研究では、(1) onionin A₁ の安定供給法の確立、(2) onionin A₁ の絶対立体化学の解明を行う。同時に、(3) onionin A₁ をリード化合物とした各種誘導体の簡易合成と、(4) M2 マクロファージ分化抑制効果の測定を行うことを当初の研究目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) タマネギ由来の含硫黄環状化合物 onionin A₁ の安定供給法の確立・・・これまでの研究により、onionin A₁ はタマネギをアセトン抽出後、3 日間室温で静置することにより得られている。しかしながら、同じように操作しても含有成分や収率にバラツキが見られる。そこで、再現性ならびに収率良く onionin A₁ を得るための条件検討を行う。

(2) Onionin A₁ の絶対立体化学の解明・・・Onionin A 類の化学構造の決定は、NMR による相対配置のみである。これまでに X 線構造解析の検討を試みたが、良好な単結晶を得ることが出来なかった。その原因として、onionin A₁ は、低分子化合物であることから、微量でも立体異性体や硫黄の酸化状態の異なる類縁体の混入が再結晶に大きく影響したと推測している。この改善策として、これまでの最終精製に用いていたオープンカラムのシリカゲルに代わって、示差屈折率検出器にて、逆相を含めた各種 HPLC カラムで分取法を検討する。

(3) Onionin A₁ をリード化合物とした各種誘導体の合成・・・Onionin A₁ は、3,4-dimethyl-5-(1'-E-propenyl)-tetrahydrothiophen-2-sulfoxide-S-oxide で、テトラヒドロチオフェン環と側鎖のプロペニル基、スルホキシド基が特徴的である。そこで、簡便に onionin A₁ 誘導体を合成するために、市販のチオフェン類など、環状 5 員環含硫黄化合物を出発原料として、プロペニル基などの置換基の導入を行い短工程で誘導体を完成させる。また、市販のチオールとチオフェン類を出発原料として、チオールおよびアルケン間の結合形成反応を行う。この反応は、化学選択性・官能基許容性が高くかつ副反応を生じにくいことから、クリックケミストリーを体現する反応の一つと捉えられている (*C. E. Hoyle, et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 1540-1573 (2010))。さらに、不斉炭素の制御を容易にするために、既存の方法で合成された市販のチオ糖を出発原料とした onionin A₁ の合成法の検討も行う。

(4) M2 マクロファージ分化抑制効果の検討・・・得られた化合物は、ヒト単球から分化させたマクロファージを用いて、M2 マクロファージのマーカー分子の CD163 の発現量を、抗 CD163 抗体で定量する ELISA 法で測定する。M2 マクロファージ分化抑制活性の強い化合物はさらに類似化合物を調製し構造活性相関の検討を行う。

4. 研究成果

(1) Onionin A₁ の安定供給法の確立・・・まず、onionin A₁ の定量分析系の確立を行った。各種条件検討を繰り返し行った結果、HPLC にて、ODS カラム (Cosmosil AR-II)、水-アセトンニトリル系の溶媒を用いて示差屈折計で検出する方向を確立した。次に、抽出溶媒の検討を行った。アセトン抽出を基本として、アセトンニトリル、エタノール、ブタノール、ジオキサン、テトラヒドロフランなどの各種溶媒を用いて生成量の比較を行ったが、アセトン以外の溶媒では onionin A₁ の生成は確認されなかった。

(2) Onionin A₁ の絶対立体化学の解明・・・X 線構造解析の検討を行うためには高純度の onionin A₁ を得る必要がある。そこで、従来のオープンカラムで精製して得られる onionin A₁ の HPLC

による分取法を検討した。Onionin A₁ の HPLC による定量分析系と同様に、ODS のカラム、水-メタノールの溶出溶媒で高純度の onionin A₁ を得ることが出来た。得られた高純度の onionin A₁ は、分解しないように細心の注意を払い、各種溶媒に溶解し再結晶を試みたものの、良好な単結晶は得られなかった。さらに、onionin A₁ そのものの結晶化が出来なかったため、関連化合物の onionin A₂, A₃ 等を用いて結晶化を試みたが達成できなかった。化合物の安定性が悪いために結晶化の過程が分解の過程となっている状況である。そこで、ニンニクより大量に精製することができ、サンプル調製容易な garlicnin B₁ について、onionin A₁ の経験を活かして、結晶化の検討を行っている。現在までのサンプルではまだ結晶化は成功していない。

(3) Onionin A₁ をリード化合物とした各種誘導体の合成・・・まず、onionin A₁ 誘導体を簡単に合成する方法として、市販のチオフェン類など環状 5 員環含硫黄化合物を出発原料として、側鎖にプロペニル基などの脂溶性の置換基とハロゲンなどの極性基の導入を行い、短工程で誘導体を合成することを検討した。3,4-ジメチルチオフェンを出発原料にすると、メチル基が既に導入されているので、チオフェン環の 2 位と 5 位の置換基の効果を種々比較するのに適している。アリルブロマイドと反応させてアリル基の導入を試みたが、収率良く誘導体を得ることが出来なかった。そこで、3-メチルチオフェンを用いたチオール-エンクリックケミストリーでチオフェン環に置換基の導入を試みたが、収率良く誘導体を得ることが出来なかった。最後に、onionin A₁ に含まれる不斉炭素の合成制御を容易にするために、市販のチオ糖を出発原料とした合成法の検討を行ったが、残念ながら、当初、市販として購入予定の D-Xylose 由来のチオ糖 (L-Arabinitol) が入手出来なかった。その為、これ以上の検討は時間の関係上、断念せねばならなかった。

(4) マクロファージの M2 分化抑制効果の検討・・・ヒト単球から分化させたマクロファージを用いて、M2 マクロファージの分子マーカー CD163 の発現抑制活性を試験する。残念ながら、合成したサンプルの供給が出来なかったことから、新たな活性化合物のデータは得られなかった。現在、ニンニク由来のサンプルについて、活性試験を検討している。

(5) Onionin A₁ 類縁化合物の探索・・・抗腫瘍活性を確認した onionin A₁ の関連化合物にもがん予防効果が期待される。また、化合物の安定供給の方法を確立するために新たな安定した含硫黄化合物の発見も望まれる。そこで、onionin A₁ を単離したタマネギ (Onion; *Allium cepa*) と関連する *Allium* 属植物の成分検索を行った。研究素材として、ネギ (Welsh onion; *Allium fistulosum*)、ニンニク (Garlic; *Allium sativum*)、ニンニクの芽 (Garlic sprout) の検討を行った。その結果、ネギより、ジメチルチオラン型スルフォキサイドである onionin A₁-A₃ (3 種) と共に、チアビスクロ型の welsonin A₁, A₂ の 2 種の新規化合物を単離した (図 2)。

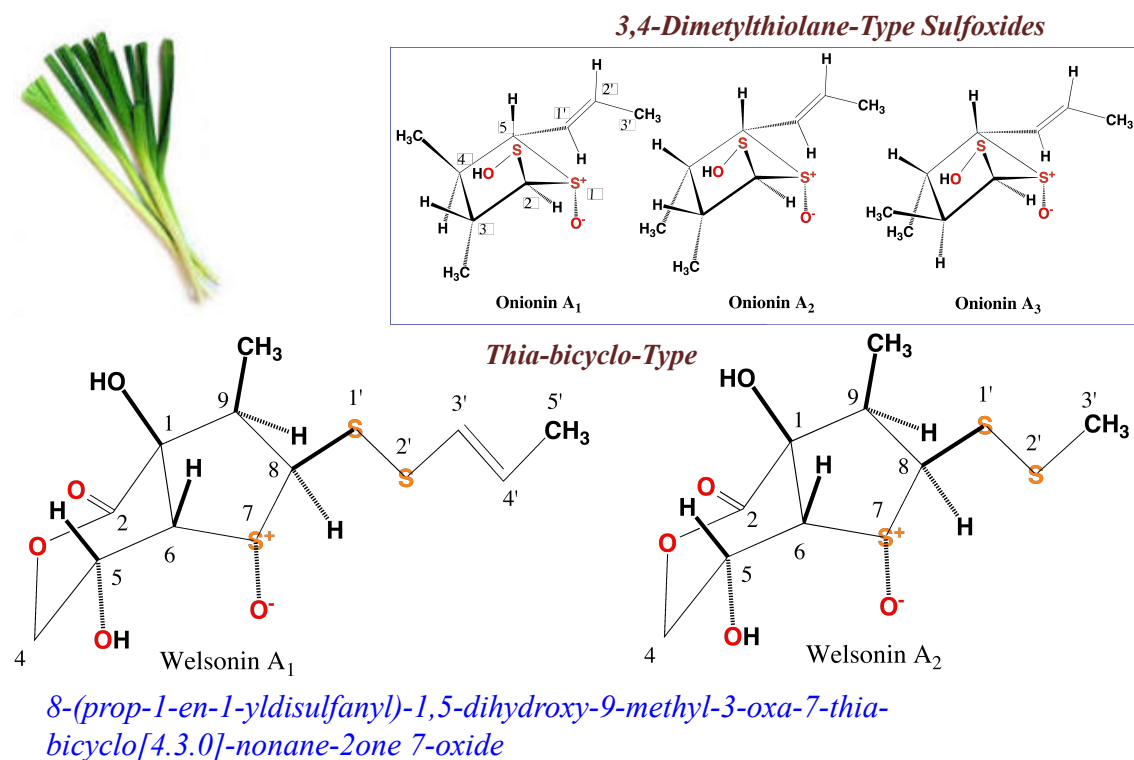


図 2 ネギ由来の含硫黄化合物

また、ニンニクより既知化合物の allicin, ajoene と共に、新たにジメチルチオラン型スルフォキサイドを 7 種 (garlicnins B₁-B₄, C₁-C₃) を単離・構造決定した (図 3)。

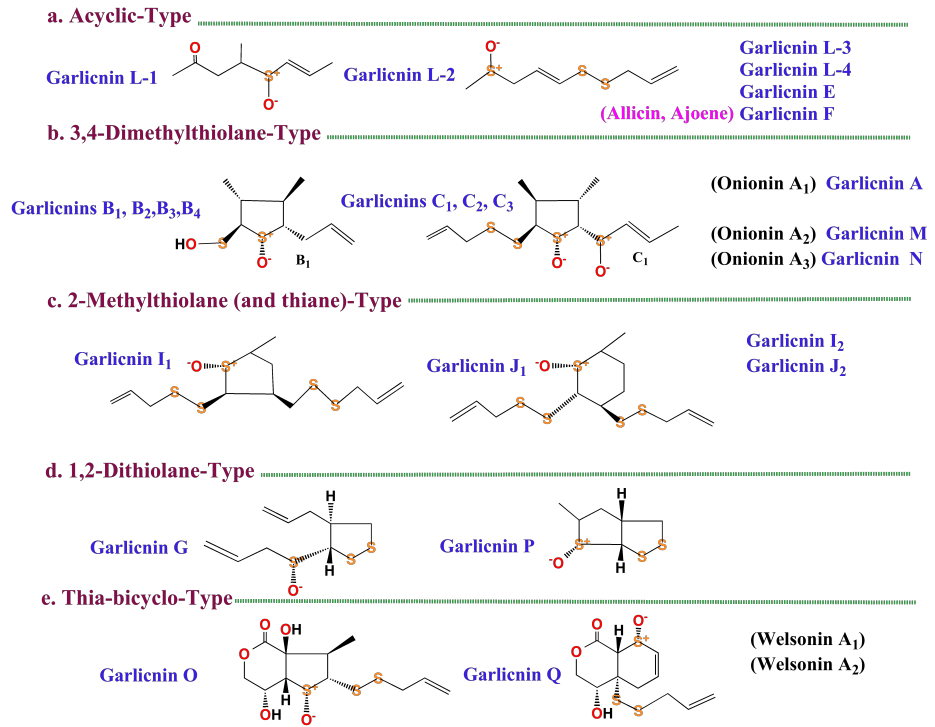
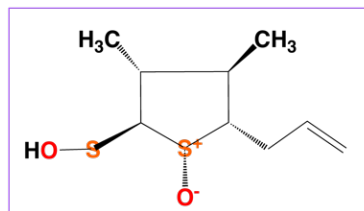


図2 ニンニク由来の含硫黄化合物

さらに、ニンニクの芽の成分検索を行い、ニンニク本体に含まれる garlicnin B₁ (図4) と ajoene が得られた。さらに、新規のγ-ヒドロキシブテノライドを結晶として得ることが出来た。これはニンニク本体では検出できない化合物である。ニンニクの芽は大量に増やすことも可能で、garlicnin B₁ を選択的に生成することから分離も容易であるので、がん予防の優れた素材であることが期待される。



Garlicnin B₁

図4 ニンニクの芽の主要成分 Garlicnin B₁ の化学構造

今後、garlicnin B₁ について、マクロファージを標的としたがん予防法開発の化学的基礎データの蓄積を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kariu Toru, Ikeda Tsuyoshi, Nakashima Keisuke, Potempa Jan, Imamura Takahisa	4. 巻 83
2. 論文標題 A natural anti-periodontitis agent, epimedokoreanin B, inhibits virulence activities of gingipains from Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1597615	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 -
1. 著者名 Yoshimasu Y., Ikeda T., Sakai N., Yagi A., Hirayama S., Morinaga Y., Furukawa S., Nakao R.	4. 巻 97
2. 論文標題 Rapid Bactericidal Action of Propolis against Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 928~936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518758034	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 -
1. 著者名 Toohara Souta, Tanaka Yasuaki, Sakurai Shinichi, Ikeda Tsuyoshi, Tanaka Kazuo, Gon Masayuki, Chujo Yoshiki, Kuroiwa Keita	4. 巻 47
2. 論文標題 Self-assembly of [Au(CN) ₂] ⁻ Complexes with Tomato (Solanum lycopersicum) Steroidal Alkaloid Glycosides to Form Sheet or Tubular Structures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1010~1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.180320	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 -
1. 著者名 Yukio Fujiwara, Yoichi Saito, Takuya Shiota, Pan Cheng, Koji Ohnishi, Motohiro Takeya, Yoshihiro Komohara, Tsuyoshi Ikeda	4. 巻 58
2. 論文標題 Natural compounds that regulate lymph node sinus macrophages: Inducing an anti-tumor effect by regulating macrophage activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Clin. Exp. Hematop.	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Nohara Toshihiro, Ono Masateru, Nishioka Naho, Masuda Fuka, Fujiwara Yukio, Ikeda Tsuyoshi, Nakano Daisuke, Kinjo Junei	4. 巻 72
2. 論文標題 New cyclic sulfides extracted from <i>Allium sativum</i> : garlicnins P, J2, and Q	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 335 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1151-0	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 -

1. 著者名 Nohara Toshihiro, Ono Masateru, Nishioka Naho, Masuda Fuka, Fujiwara Yukio, Ikeda Tsuyoshi, Nakano Daisuke, Kinjo Junei	4. 巻 72
2. 論文標題 New cyclic sulfides, garlicnins I2, M, N, and O, from <i>Allium sativum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 326 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1133-2	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 -

1. 著者名 Toshihiro Nohara, Masateru Ono, Koki Yamaguchi, Naoki Sakamoto, Yukio Fujiwara, Tsuyoshi Ikeda, Hiroshi Nakane, Daisuke Nakano, Junei Kinjyo	4. 巻 14
2. 論文標題 On the constituents of garlic sprouts grown in water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics Phytochem.	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Toshihiro Nohara, Masateru Ono, Yukio Fujiwara, Tsuyoshi Ikeda, Daisuke Nakano, Junei Kinjyo	4. 巻 14
2. 論文標題 Two new cyclic sulfides, onionins B1 and B2, from onion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics Phytochem.	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Toshihiro Nohara, Masateru Ono, Yukio Fujiwara, Tsuyoshi Ikeda, Mona El-Aasr, Daisuke Nakano, Junei Kinjyo	4. 巻 14
2. 論文標題 Major constituents of garlic: antitumor thiolane-type sulfoxides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics Phytochem.	6. 最初と最後の頁 87-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野原稔弘、藤原章雄、小野政輝、池田 剛、中野大輔、金城順英
2. 発表標題 Antitumor Allium Sulfoxides
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田 剛、田中泰彬、遠原颯太、藤塚菜由子、祝 和貴、草野裕貴、高木郁加、黒岩敬太
2. 発表標題 トマト未利用資源のステロイドアルカロイド配糖体と機能性金属錯体の複合化と特異的ナノ構造の創成
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原 稔弘、小野 政輝、阪本 直貴、池田 剛、山口 幸輝、藤原 章雄、中根 寛、中野 大輔、金城 順英
2. 発表標題 Antitumor Allium Sulfoxidesの研究 Garlic Sproutの成分について
3. 学会等名 第35回 日本薬学会九州支部大会 (福岡)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakashima Keisuke, Miyashita Hiroyuki, Yoshimitsu Hitoshi, Fujiwara Yukio, Nagai Ryoji, Ikeda Tsuyoshi
2. 発表標題 New Prenylflavonoids from Epimedii Herba and Their Inhibitory Effects on Advanced Glycation End Products
3. 学会等名 The 7th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野原稔弘、小野政輝、西岡奈保、増田風佳、藤原章雄、池田 剛、中野大輔、金城順英
2. 発表標題 抗腫瘍性Allium Sulfidesの研究 (35報)
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮下裕幸、池田 剛、吉満 斉
2. 発表標題 ウルシ科マンゴー (Mangifera indica) 果実の成分研究
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤塚菜由子、池田 剛、黒岩敬太
2. 発表標題 トマト由来のステロイドアルカロイド配糖体と金属錯体の複合化によるナノ構造創成
3. 学会等名 第68回 高分子学会年次大会 (大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 剛、浦 更紗、百武基樹、馬場結子、由比理紗子、宮下裕幸、吉満 斉、八田泰三、平賀靖英
2. 発表標題 ヤハズハハコ (<i>Anaphalis sinica</i> Hance) の機能性成分の探索研究
3. 学会等名 日本生薬学会第 66 回年会 (東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野原稔弘、藤原章雄、小野政輝、池田 剛、中野大輔、金城順英
2. 発表標題 Garlic の主要 Sulfides の抗腫瘍作用と Onion, および黒ニンニク中の新規 Sulfides について
3. 学会等名 日本生薬学会第 66 回年会 (東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒岩敬太、藤塚茉由子、庵原大輔、安楽 誠、池田 剛、平山文俊
2. 発表標題 トマトの葉茎由来のステロイドアルカロイド配糖体/金属錯体複合体の創成と光線力学療法を指向したナノ構造体形成
3. 学会等名 第68回 高分子討論会 (福井)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高塚絢巳、池田 剛、平山 悟、泉福英信、成澤直規、中尾龍馬
2. 発表標題 抹茶による <i>Porphyromonas gingivalis</i> に対する阻害活性のメカニズム
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会 (東京)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----