

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06727

研究課題名(和文) モレキュラーネットワーキングを活用した神経幹細胞分化誘導調節リード化合物の開発

研究課題名(英文) Development for neuronal stem cells control compounds using molecular networking

研究代表者

久保 美和 (Kubo, Miwa)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：00330754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経栄養因子様活性物質探索の1次スクリーニングとして、BS試験(BST)を適用し、約600種類のミャンマー産植物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、シソ科に属する*Gmelina arborea*を含む数種の植物がBST活性を示し、それらがPC12細胞に対して神経栄養因子様活性を示すことを見いだした。誰もが簡単にできるBSTが神経栄養因子様活性物質探索の1次スクリーニングとして有用であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬の初期を担う1次スクリーニングは、安価で、簡便且つ迅速であることが望ましい。本研究では、誰もができるブラインシュリンプアッセイを用いて、世界が渴望するアルツハイマー型認知症の根本的治療予防薬開発を指向した、神経可塑性賦活化剤である神経栄養因子様活性物質探索のための簡便なフェノタイプ型ハイスループットスクリーニングを構築し、天然物メタボロミクスを活用した高効率な化合物精製法と統合した次世代型天然物創薬の発展へ繋がる結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：As a primary screening for the discovery of neurotrophic factor-like active substances, the BS test (BST) was applied to screen a library of about 600 plants from Myanmar. As a result, I found that several plant species including *Gmelina arborea* belonging to the Perillaceae family showed BST activity and they exhibited neurotrophic factor-like activity against PC12 cells. I found that BST, which can be easily performed by anyone, is useful as a primary screening tool to search for neurotrophic factor-like active substances.

研究分野：天然物化学

キーワード：神経栄養因子様活性物質

1. 研究開始当初の背景

世界で市販されている医薬品の 80 % 以上は、何らかの形で天然物の骨格および情報が反映されていると言われている。有用な植物から活性成分を明らかにする場合、複数の精製方法を組合せ、活性を指標にして活性成分を単離し、構造決定する戦略が従来の一般的な戦略である。この手法は、確実に構造を決定出来るという長所はあるものの、膨大な時間と労力が必要であることから、しだいに天然化合物からの医薬品リード化合物探索はコンビナトリアル合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングへシフトするようになってきた。しかし、合成化合物ライブラリーの構造の多様性に限界があることから、天然物に再び注目が集まっており、人智を超えた多様な構造と強力な生理活性を有する天然化合物の探索とその活用研究の重要性は明らかである。近年、生理活性評価におけるハイスループット化は急速に進んでいるものの、有用植物から活性物質を探索する過程のハイスループット化はほとんどなされておらず、新規生理活性化合物の取得が徐々に困難になってきている。多様性であるがゆえ、精製過程が律速段階となっていることが大きな要因ある。効率良く新規骨格、構造を有するリード化合物を見つけ出すために生まれたのが、近年急速に発展している天然物メタボロミクスである。天然物メタボロミクスはゲノム関連科学で発展してきたメタボロミクスと天然物化学が統合した新しい分野で、新規化合物の探索、生合成機能解明に革命的な変化をもたらしつつある。特に MS/MS データを利用したモレキュラーネットワーキングは、試料中の各 MS/MS スペクトルを node、node 間の質量差 (ΔMZ) などの情報を edge として表し、MS/MS スペクトルの類似性に基づき各 node を cluster としてグループ化させ、試料中の類似構造化合物群をネットワークとして可視化することができる画期的手法である。各 node の化学構造は、実測 MS/MS データベースから検出され、node に情報として付加される。さらに、様々な情報を node に組み込むことができ、例えば生理活性情報を組み込めば、試料中の活性物質が可視化され、標的分子が一目瞭然となる。最大の欠点は、データベースに収載されている化合物数が少ないため、同定できる既知物質数に限界があることである。

一方 iPS 細胞の登場により、これまで未解明であった疾患のメカニズムが解明されつつある。特に不可能であったヒトの神経発達異常やその後の分化過程異常を観察できるようになり、多くの中枢神経系疾患において、神経幹細胞から神経細胞やグリア細胞への分化効率が、その病因に関わっている可能性が示されている。例えば、国内総患者数が 72 万人にも及ぶ統合失調症患者由来の神経幹細胞では、健常者の場合と比べて神経細胞への分化効率が低く、グリア細胞の 1 種であるアストロサイトへの分化効率が高く、分化した神経細胞では神経突起が短い、移動能が低いといった異常がみられることがわかっている。このような背景から、神経幹細胞から効率的な神経細胞の産生を促す技術を確立することで、損傷や疾患などにより失われた神経機能の回復に繋げていく試みが行われているが、課題が山積しており、神経幹細胞の利用は未だ臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、天然物メタボロミクスを駆使し、これまで培ってきたノウハウをハイスループット型天然物化学へと発展させ、植物抽出物ライブラリーのモレキュラーネットワーキングと生理活性評価を組み合わせた創薬指向型モレキュラーネットワークプロファイリングを構築し、高効率的に神経幹細胞の特異的分化促進作用、および、神経幹細胞分化誘導最適化を調節できる物質を開発することである。

3. 研究の方法

所有する植物抽出物ライブラリーの LC-MSMS 解析を網羅的に行うため、LC-MS の条件検討を行った。植物抽出物には多種多様な化合物が含まれているため、全ての化合物の良好な MS データを得るための最適な分析条件を検討する必要がある。まずは、申請者が開発した 5 種類の植物抽出物からなるクオリティーコントロール (QC) を用いて分析条件を検討した。以前から、神経栄養因子様活性成分の探索研究を行っており、様々な植物資源から PC12 細胞を用いた神経栄養因子様活性を指標に、活性成分を探索してきた。この方法の有用性は、これまでの研究において実証済みではあるが、膨大なライブラリーを評価するにはあまり効率の良い方法とはいえない。一方、節足動物門に属するブラインシュリンプ (BS) (*Artemia salina*) は、分類学的にダニや

昆虫と近い関係にあり、またこれらの動物と生態学的にも類似点が多いことから、合成殺虫剤や合成殺ダニ剤の残留分析の試験動物として用いられてきた。1982年、BSを用いた Brine shrimp test (BST) が、McLaughlin らにより天然物由来の生理活性物質探索のために提唱された。殺 BS 活性を示す物質が抗腫瘍活性や抗菌活性など他の生理活性を示すことも報告されており、BS が生理活性物質の検索のための優れた供試動物として注目されていた。さらに BS は、熱帯魚の餌として安価に購入でき、乾燥卵として数年間保存可能であること、海中でのみ生存可能なことから、外環境への汚染の心配がないなど検定生物としての利点を多く備えている。そこで、神経栄養因子様活性物質探索の 1 次スクリーニングとして、BS 試験 (BST) を適用し、約 600 種類のミャンマー産植物ライブラリーのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

様々な濃度に調整した QC をサンプルとし、サンプル中に含まれる化合物群が分離分析できる LC 条件を探した。その結果、10 min 以内でほぼ全てのピークが分離できる LC 条件を見つけることができた。続いて、MS 部の条件検討を行なった。ガス流量や電圧などを微調整したが、 m/z 800 付近は精密質量が得られるものの、 m/z 300 付近では 7 ppm ほどのズレが生じた。サンプル濃度を希釈することにより解消できたが、マイナー成分のピーク検出が難しくなった。最適条件を検討したが、最適化に至らなかった。研究開始 1 年後、新規に大学共通機器として購入した LC-MS 装置を用いて同様の方法で最適化を行ったところ、最適条件を見出すことができた。McLaughlin らの方法を一部改良し、BS の卵を、空気を激しく注入している海水の中に加え、48 時間後、個体差をなくすため光感受性をもつ BS のみを、海水 5 mL が入ったシャーレに 10 匹ずつ入れて、各濃度に調整した植物抽出物を添加した。24 時間後、致死数だけでなく痙攣数もカウントし、致死活性%を算出して殺 BS 活性として評価した。約 600 種類のミャンマー植物ライブラリーの BST を行った結果、数種類の植物抽出物に顕著な殺 BS 活性が認められた。中でも、*Zingiber montanum* と *Gmelina arborea* は、200 ppm の濃度で致死数より痙攣数の方が多く、致死活性 73 % であった。また、これらの PC12 細胞に対する分化誘導活性および突起進展促進活性を調べた結果、両植物抽出物に活性が認められた。BST で最も顕著な活性が認められた *Z. montanum* の HPLC 分析の結果、この植物は当研究室ですでに神経栄養因子様活性研究が進められているジャワショウガ *Z. purpureum* と同じであることがわかった。この結果は、BST と PC12 活性にある程度の相関性が認められたことを示唆している。本植物茎部のメタノール抽出物を EtOAc-H₂O にて溶媒分配し、EtOAc 移行部および水層を得た。EtOAc 移行部をシリカゲルクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc = 1/1) で 9 個のフラクションに分画した。各フラクションに対して BST を行い、活性を示したフラクションを中心に精製を進めたところ、10 個のプレニル型クマリン 1-8、11-12、2 個のクマリン 13-14、3 個のアルカロイド 9、10、15 を単離できた。そのうち、1-8 は新規化合物であった。これら化合物の化学構造は、NMR および MS スペクトルなどの詳細な解析により構造決定した (Figure 1)。単離化合物のうち、活性試験に供試するのに十分なサンプル 1-11、15 について、各化合物を 0.3 ~ 30 μ M の濃度で調整し、BST と PC12 細胞に対する活性評価を実施した。いずれの濃度においても顕著な活性は認められなかったため、60、120 μ M と高濃度で調整し、BST で再評価したところ、化合物 5、7、8、10 に顕著な殺 BS 活性が認められた。特に 10 の殺 BS 活性は文献でも報告例がある³⁾。そこで、顕著な殺 BS 活性を示した 5、7、8、10 と類似化合物 2 と 6、および BST のポジティブコントロールであるベルベリンと類似構造を有する 9 の 7 種類を PC12 細胞を用いた活性試験に供試した。その結果、8 と 10 に NGF 非存在下における分化誘導活性および NGF 存在下における突起伸展促進活性が認められた。

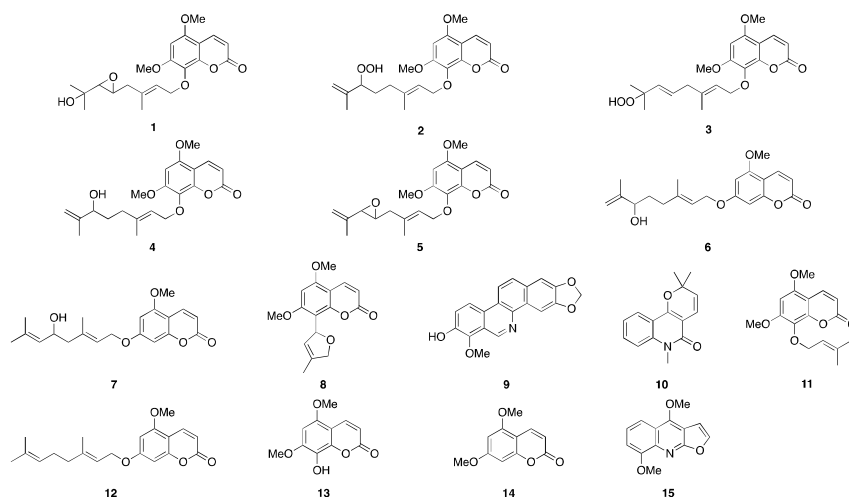


Figure 1. Compounds isolated from *G. arborea*

一方、*G. arborea* の MeOH 抽出物のモレキュラーネットワークプロファイルを作成し、今回得られた単離化合物のマッピングを行い、LC-MS/MS データを利用した *G. arborea* のメタボロミ

クス解析を進めた。*G. arborea* の分子ネットワーク解析 (Figure 2) と単離化合物の結果から、*G. arborea* に含まれる化合物はミカン科由来のものが多いことがわかった。また、BSTの結果を合わせた分子ネットワーク解析から、活性の有無により、異なるクラスターを形成していることが明らかとなった。さらなる解析が必要ではあるがこれら、メタボロミクスプロファイリングは、活性物質の予測や類似化合物の効率的な探索に有用なツールとなると考えている。

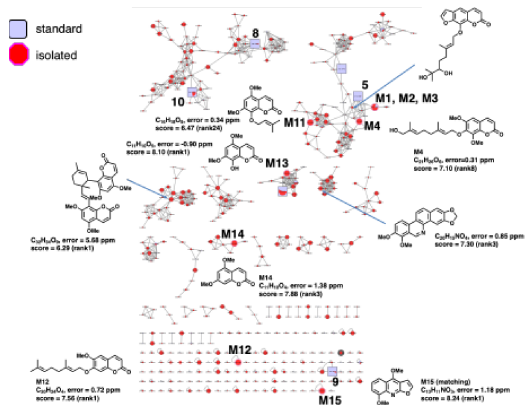


Figure 2.

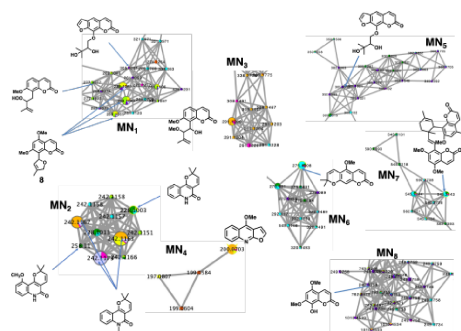


Figure 3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 A. Rutz, M. Dounoue-Kubo, S. Ollivier, J. Bission, M. Saesong, S. N. Ebrahimi, K. Ingkaninan, J.-L. Wolfender, P.-M. Allard.	4. 巻 10
2. 論文標題 Taxonomically Informed Scoring Enhances Confidence in Natural Products Annotation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Plant. Sci	6. 最初と最後の頁 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 J.-L. Wolfender, P.-M. Allard, M. Kubo, E. F. Queiroz	4. 巻 6
2. 論文標題 Metabolomics strategies for the dereplication of polyphenols and other metabolites in complex natural extracts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Recent Advances in Polyphenol Research	6. 最初と最後の頁 183-205
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 該当する
1. 著者名 K. Harada, K. Zaha, R. Bando, R. Irimaziri, M. Kubo, Y. Koriyama, Y. Fukuyama	4. 巻 148
2. 論文標題 Structure-activity relationships of talaumidin derivatives: Their neurite-outgrowth promotion in vitro and optic nerve regeneration in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur. J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 86-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2018.02.014	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 Y. Koriyama, A. Furukawa, K. Sugitani, M. Kubo, K. Harada, Y. Fukuyama	4. 巻 1074
2. 論文標題 Talaumidin promotes neurite outgrowth of staurosporine-differentiated RGC-5 cells through PI3K/Akt-dependent pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol	6. 最初と最後の頁 649-653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-75402-4_79	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 E. Kato, M. Kubo, Y. Okamoto, Y. Matsunaga, H. Kyo, N. Suzuki, K. Uebara, Y. Fukuyama	4. 巻 3
2. 論文標題 Safety assessment of Bangle (<i>Zingiber purpureum</i> Rosc.) rhizome extract: Acute and chronic studies in rats and clinical studies in human	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 15879-15889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.8b02485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 入交諒, 川田美都紀, 松野倫代, 幾井康仁, 原田研一, 久保美和, 水上元, 福山愛保
2. 発表標題 殺ブラインシュリンブ活性を有するミャンマー産植物 <i>Gmelina arborea</i> の化学成分研究
3. 学会等名 第63回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Luis Quiros-Guerrero, Arnaud Gaudry, Adriano Rutz, Miwa Dounoue, Marcel Kaiser, Emerson Ferreira Queiroz, Laurence Marcourt, Bruno David, Jean-Luc Wolfender, Pierre-Marie Allard
2. 発表標題 PRIORITIZATION OF HIGH-VALUE NATURAL PRODUCTS FROM A LARGE CHEMO-DIVERSE PLANT EXTRACTS COLLECTION: A FOCUS ON STRUCTURAL NOVELTY
3. 学会等名 GA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adriano Rutz, Miwa Dounoue-Kubo, Simon Ollivier, Jonathan Bisson, Mohsen Bagheri, Tongchai Saesong, Samad Nejad Ebrahimi, Kornkanok Ingkaninan, Jean-Luc Wolfender, Pierre-Marie Allard
2. 発表標題 Taxonomically informed metabolite annotation
3. 学会等名 GA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Arnaud Gaudry, Luis Manuel Quiros Guerrero, Adriano Rutz, Miwa Dounoue, Marcel Kaiser, Bruno David, Emerson Ferreira Queiroz, Laurence Marcourt, Jean-Luc Wolfender, Pierre-Marie Allard
2. 発表標題	MULTI-INFORMATIVE BIOACTIVITY-BASED MOLECULAR NETWORKING OF A LARGE CHEMODIVERSE PLANT COLLECTION ALLOWS EFFICIENT IDENTIFICATION OF TRYPANOCIDAL NATURAL PRODUCTS
3. 学会等名	GA2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Jean-Luc Wolfender, Miwa Dounoue Kubo, Emerson Ferreira Queiroz, Pierre-Marie Allard
2. 発表標題	Contextualized Metabolomics Transforms Pharmacognosy; A Paradigm Shift in Natural Product Research
3. 学会等名	GA2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	川田美都紀、入交諒、松野倫代、原田研一、久保美和、水上元、福山愛保
2. 発表標題	ミャンマー産植物に関する研究 (2) ;クマツヅラ科植物 <i>Gmelina arborea</i> 茎の成分研究
3. 学会等名	第57回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Y. Fukuyama, M. Kubo, M. Nakai, K. Harada, N. Matsui, M. Suenaga, Y. Matsunaga, M. Miyamura, E. Kato
2. 発表標題	Neurotrophic Compounds from Javanese Ginger Bangle, <i>Zingiber purpureum</i>
3. 学会等名	ISCP30-ICOB10 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 久保美和, Theo Brillatz, Emerson Ferreira Queiroz, Pierre-Marie Allard, 原田研一, 加藤栄信, 細田真也, Jean-Luc Wolfender, 福山愛保
2. 発表標題 ゼブラフィッシュアッセイを基盤としたジャワショウガBanglaleに含まれる抗痙攣作用物質の同定とモレキュラーネットワークプロファイリング
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島文理大学薬学部薬品物理化学教室 http://p.bunri-u.ac.jp/lab02/fukuyama/index.htm
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------