

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590023
 研究課題名（和文） ファーマコフォア検索を用いた新たながん標的分子の探索研究
 研究課題名（英文） Serach for New Targeted Molecules of Cancer Using Pharmacophore Method.

研究代表者

井藤 千裕 (ITO CHIHIRO)
 名城大学・薬学部・准教授
 研究者番号：60193497

研究成果の概要（和文）：

植物資源から単離したイソフラボノイドの内、最も強い活性を示した化合物をモデルとし、ファーマコフォア 3 次元モデルを構築した。次に、データベース検索および活性試験で得られた結果よりファーマコフォアモデルの検証と改善を行い、モデルを再構築した。再構築モデルでのファーマコフォア探索の結果、得られた化合物は期待どおりの活性を認めた。以上のことから、再構築モデルは、より精度を増した有効なモデルへと改良することができた。また、従来の天然資源より生物活性物質の探索研究についても同時進行し、いくらかの新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

The pharmacophore three-dimensional model was constructed on the basis of the most active flavonoid obtained from plant resources. The database searches using this model and the assay on the biological active compounds were repeated. Based on these experimental results, the better pharmacophore three-dimensional model was reconstructed. Some new information was obtained from the searches for bioactive compounds, too.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：天然資源、がん標的分子、ファーマコフォア検索、アポトーシス誘導活性、発がんプロモーション抑制活性、ヒスタミン放出抑制活性、抗酸化活性、抗炎症活性

1. 研究開始当初の背景

これまでに、植物資源よりがん標的分子の探索を目的として、主にミカン科、オトギリソウ科、マメ科植物から多くの新規化合物を単離・構造決定するとともに、それらを含む天然有機化合物について、がん細胞に対する

増殖抑制活性、NO 産生抑制活性、および発がんプロモーション抑制活性などの生物活性を検討してきている。

また、近年、コンピュータによる新規医薬品の合理的なデザインというものが不可欠なものになってきている。Computer-aided

drug design (CADD)は、新しいリード化合物のデザインや開発のために、企業、研究機関、大学研究室間において時間や資源といった戦略的コストを減らす手助けになることが期待されている。

これらの背景の下、細胞受容体が特定できていないことから、CADD の内、Ligand based drug design (LBDD) が有効であると判断し、これによるファーマコフォア検索で新規がん標的シズ分子を見出すこととした。このような試みについての研究報告例は少ない。

2. 研究の目的

今回の研究では、がん細胞に対する増殖抑制活性試験において、天然有機化合物の活性試験の結果を基に、コンピュータシミュレーションにより、ファーマコフォア 3次元モデルを構築、さらにそのモデルに重なる化合物をデータベースから検索し、新規がん標的シズ分子を見出すことを目的とする。

また、天然資源より新規化合物の単離・構造決定、含有成分の生物活性評価、および生物活性試験において活性の認められた化合物についての作用機序の解明等、従来の生物活性物質の探索研究も同時に進行し、新たなシズ分子を見出す。

3. 研究の方法

(1) ファーマコフォア 3次元モデルの構築とデータベース検索

- ①現在使用されている抗癌剤の中には、植物資源から単離された化合物を基に創られた医薬品が多く存在する。まずはシズ分子を探す目的で、マメ科植物から単離した数種のイソフラボノイドについて、各種がん細胞に対する増殖抑制活性試験を行い、強い活性を示すもの、あるいは特異性を示すものを探索し、それらの化学的特性について検討する。
- ②これらの結果を基に、コンピュータシミュレーションにより、薬理作用団の抽出を行い、ファーマコフォア 3次元モデルを構築する。
- ③構築したモデルを用い、イソフラボノイドのデータベースから、ヒット化合物を検索する。
- ④ヒット化合物の合成などを行い、得られた化合物について、同活性試験を行い、構築したモデルの検証を行う。
- ⑤検証後、修正を加え精度を増したファーマコフォア 3次元モデルを用い、骨格の異なる化合物のデータベースへ検索範囲を広め、ヒット化合物の検索を行う。

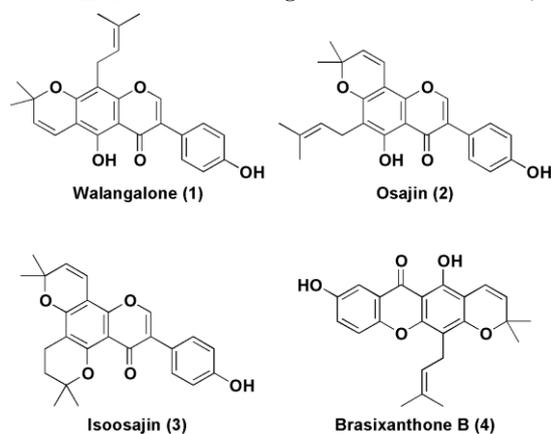
(2) 生物活性物質の探索研究

天然資源より新規化合物の単離・構造決定および含有成分の生物活性評価等、従来の生物活性物質の探索研究を行う。

4. 研究成果

(1) ファーマコフォア 3次元モデルの構築とデータベース検索

マメ科植物から単離したイソフラボノイド 21 種、ロテノイド 4 種について、7 種のがん細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。使用した癌細胞株の全てに対して最も強い活性を示した warangalone (1) に注目し、



その薬理作用基を抽出しモデルを構築した。

次いで、自ら構築したイソフラボノイドのデータベース (約 3700 個) について、ファーマコフォア探索を行った結果、2 種のヒット化合物、Osajin (2) および isoosajin (3) を得た。すでに単離した既知イソフラボノイドからそれぞれ誘導合成し、同活性試験を行ったところ、osajin (2) は warangalone (1) とほぼ同じ活性を認めたが、isoosajin (3) はがん細胞株全てに対してほとんど活性を示さなかった。この結果より、構築したモデルは、活性に必要な原子団を含んではいるが、ファーマコフォア 3次元モデルとしてはまだ不完全であることが示唆された。

Warangalone (1) と isoosajin (3) を比較、検討することで、モデルの再構築を行い、Fig. 1 に示すファーマコフォア 3次元モデルを得ることができた。

再構築したモデルを用い、今回準備したすべてのデータベース (約 23 万個) に対して、ファーマコフォア探索を行った。その結果、

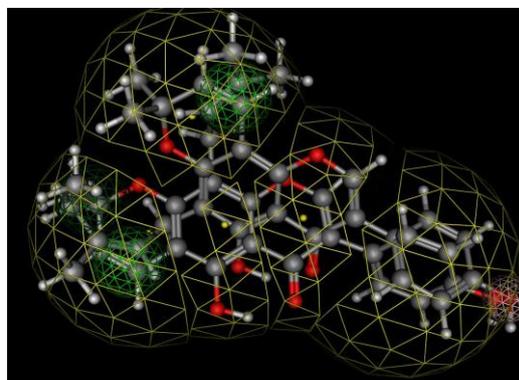


Fig. 1. ファーマコフォア 3次元モデル

キサントン1種[brasixanthone B(4)]と合成化合物3種の計4種のヒット化合物を得ることができた。これらの中、brasixanthone B(4)については、植物から単離、同活性試験を行ったところ、7種のがん細胞株の全てに対し、期待どおりの活性を認めた。

以上の結果より、再構築したモデルはより精度を増し、より有効なモデルへと改良することができたものと考えられる。

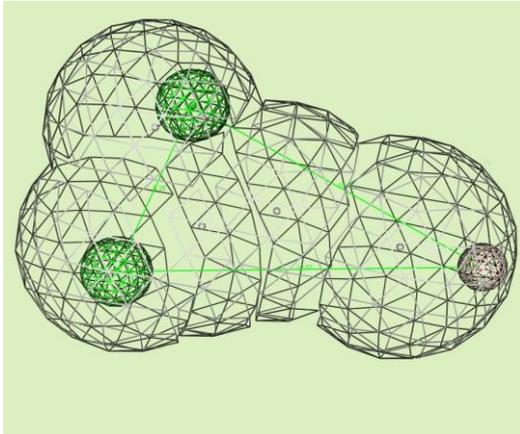


Fig. 2

最終的なモデル条件は以下の通りである。

- i) 水素結合ドナー・アクセプターとなり得る官能基が存在すること
- ii) 上記官能基から 10~11 Å および 12~13 Å の2点の位置に平面疎水性基が存在していること
- iii) 平面疎水性領域の2点は6~7 Å の位置にあること
- iv) 以上述べた3点を含む空間的拘束領域があること (Fig. 2)

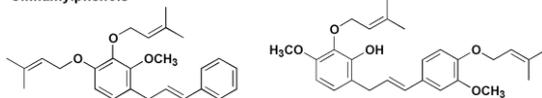
今回のファーマコフォア検索はまだ初期の段階であり、検証と改善を繰り返して行くことで、より精度を増やすことが必要があると考えている。

(2) 生物活性物質の探索研究

① シンナミルフェノール類の合成と発がんプロモーション抑制活性

数種のシンナミルフェノール類を合成し、これらに対する発がんプロモーション抑制活性試験を実施した。プレニル基を有するシンナミルフェノール類は強い活性を認め、さら

Cinnamylphenols

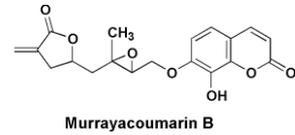


にマウス皮膚2段階発がん抑制活性試験においても強い活性が認められたため、発がんプロモーション抑制試薬として有用である。

② フラノンクマリン類のアポトーシス誘導活性

ミカン科 *Murraya siamensis* の葉部から単離した5種のフラノンクマリン類について、ヒト前骨髄性白血病由来細胞株HL60に対する成長阻害活性試験を実施した。

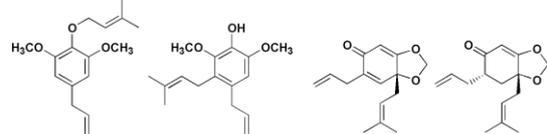
その結果、murrayacoumarin Bで処理した細胞では顕著な細胞死が認められ、その効果は処理時間に依存することを認めた。また、核染色による観察では核の断片を有するアポトーシス細胞の割合が時間依存的に増加した。さらにmurrayacoumarin Bは caspase-9/caspase-3 経路を経てアポトーシスを誘導することも証明した。



③ フェニルプロパノイド類およびフィトキノイド類のヒスタミン放出抑制活性

Phenylpropanoids

Phytoquinoids

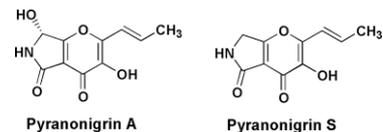


シキミ科シキミ属植物から単離した6種のフェニルプロパノイド類と6種のフィトキノイド類について、Ca イオノフォアで刺激したラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞からのヒスタミン放出抑制活性試験を実施した。その結果、それぞれ2種の化合物に著しいヒスタミン放出抑制活性が認められた。さらに、これらの化合物について TNF- α 産生抑制活性試験を実施したところ、いずれの化合物もマスト細胞からの TNF- α 産生抑制活性が認められた。

④ 醸造食品の米種麴に含まれる抗酸化物質と血管接着分子の発現抑制効果

焼酎に広く使用されている *Aspergillus saitoi*, *A. kawachii*, *A. awamori* の米種麴抽出液に高いDPPHラジカル捕捉能が認められた。抽出液から抗酸化物質を単離、各種スペクトルデータからpyranonigrin-A (PG-A) およびpyranonigrin-S (PG-S) であると同定した。これらのpyranonigrin類は、*A. saitoi*, *A. kawachii*,

A. awamori の米種麴抽出液に存在し、PG-Sは

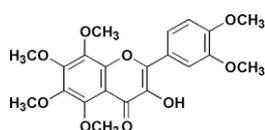


PG-Aより高い抗酸化活性を示した。また、PG-Aは、TNF- α で誘導されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞において血管接着分子の発現を有意に抑制した。

⑤ RBL-2H3細胞のTNF- α 、cyclooxygenase-2発

現に関するnatsudaidainの効果

Citrus 属植物から単離した natsudaidain



Natsudaidain

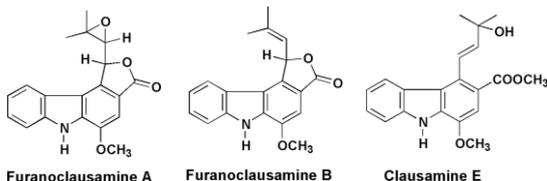
の rat mast cell 株 RBL-2H3 細胞に対する効果を検討した。

Natsudaidain は、100、200 μ M の濃度で僅かにヒスタミン放出を

阻害した。TNF- α に関しては投与量依存的にタンパクレベルと遺伝子レベルともに抑制した。更に cyclooxygenase-2 のタンパク発現と遺伝子発現も投与量依存的に減少させた。以上のことから、natsudaidain は、抗炎症作用を示すことが期待される。

⑥ミカン科 *Clausena anisata* より γ -ラクトンカルバゾールアルカロイド

タイで採集したミカン科 *Clausena anisata* の枝部のアセトンエキスから、新しいカルバゾールアルカロイド furanoclausamine A および B を単離、構造決定した。また、含有成分について HL-60 に対する成長阻害活性試験を行ったところ、clausamine E に顕著な活性が認められた。



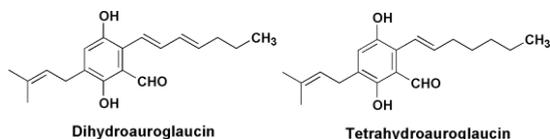
Furanoclausamine A

Furanoclausamine B

Clausamine E

⑦かつお節・枯節の製造時に使用される糸状菌が生産する抗酸化物質

高い DPPH ラジカル消去能活性を有する糸状菌 *Eurotium herbariorum* NE-1 と NE-4 から 5 種の auroglaucin 類を単離、構造決定した。これらは、 α -トコフェロールより、DPPH およびスーパーオキシドのラジカル捕捉能が高かったが、DHA の自動酸化における阻害性は低かった。



Dihydroauroglaucin

Tetrahydroauroglaucin

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 9 件)

(1) Yoshiaki Miyake, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, and Toshihiko Osawa: Antioxidants Produced by *Eurotium*

herbariorum of Filamentous Fungi Used for the Manufacture of Karebushi, Dried Bonito (Katsuobushi). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 (2009) 73(6): 1323-1327.

(2) Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Kie Aizawa, Keisuke Yoshida, Nijisiri Ruangrungsi and Hiroshi Furukawa: γ -Lactone Carbazoles from *Clausena anisata*. *J. Nat. Prod.*, 査読有 (2009) 72: 1202-1204.

(3) Takuya Matsui, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Tadashi Okada, and Hiroshi Furukawa: Effect of natsudaidain isolated from *Citrus* plants on TNF- α and cyclooxygenase-2 expression in RBL-2H3 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 査読有 (2009) 61: 109-114.

(4) Yoshiaki Miyake, Mika Mochizuki, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, and Toshihiko Osawa: Antioxidative Pyranonigrins in Rice Mold Starters and Their Suppressive Effect on the Expression of Blood Adhesion Molecules. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 (2008) 72: 1580-1585.

(5) Mehrdad Iranshahi, Farhad Kalategi, Ramin Rezaee, Ahmad Reza Shahverdi, Chihiro Ito, Hiroshi Furukawa, Harukuni Tokuda, and Masataka Itoigawa: Cancer Chemopreventive Activity of Terpenoid Coumarins from *Ferula* Species. *Planta Med.* 査読有 (2008) 74: 147-150.

(6) Tomiyasu Murata, Masataka Itoigawa, Chihiro Ito, Keisuke Nakao, Masaru Tsuboi, Norio Kaneda, Hirishi Furukawa: Induction of apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by furanone-coumarins from *Murraya siamensis*. *J. Pharm. Pharmacol.* 査読有 (2008) 60(3): 385-389.

(7) Yoshiaki Miyake, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, and Toshihiko Osawa: Isolation of the Antioxidant Pyranonigrin-A from Rice Mold Starters

Used in the Manufacturing Process of Fermented Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 (2007) 71: 2515-2521.

- (8) Takuya Matsui, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Tadashi Okada, and Hiroshi Furukawa: Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids and Phytoquinoids from *Illicium* Species in RBL-2H3 Cells. *Planta Med.* 査読有 (2007) 73: 662-665.
- (9) Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Tetsufumi Kanematsu, Yuuki Imamura, Harukuni Tokuda, Hoyoku Nishino, and Hiroshi Furukawa: Synthetic cinnamylphenol derivatives as cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Med. Chem.* 査読有 (2007) 42: 902-909.

[学会発表] (計 27 件)

- (1) 杉本賢政、糸魚川政孝、Choudhury M. Hasan, Mohammad A. Rashid, 井藤千裕: マメ科 *Tephrosia candida* より単離した新規フラボノイドの構造及び含有成分の生物活性: 日本薬学会第130年会 平成22年3月29日 (岡山)
- (2) 坂好朗、森 絢子、Sivabalan Shanmugam, 井藤千裕: ミカン科 *Clausena dentata* の成分研究: 日本薬学会第130年会 平成22年3月29日 (岡山)
- (3) 波多野智子、小野絵梨子、栗山枝理子、十一元晴、松下寿昭、三亀真理子、中尾祥代、藤川隆彦、井藤千裕: エリンギ (*Pleurotus eryngii*) の成分: 日本薬学会第130年会 平成22年3月29日 (岡山)
- (4) 杉浦あゆみ、井藤千裕、村田富保、河野晋、疋田清美、糸魚川政孝、古川 宏、金田典雄: 誘導型NO合成酵素によるNO産生を抑制する植物由来天然化合物の探索: 日本薬学会第130年会 平成22年3月30日 (岡山)
- (5) 松井卓哉、岡田 忠、井藤千裕、古川 宏、糸魚川政孝: マスト細胞株RBL-2H3に対する polymethoxyflavonoid “natsudaidain” の効果: 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成21年10月31日 (秋田)
- (6) 坂好朗、大倉寛子、坂井亜紀奈、Hugh

T.-W. Tan, 井藤千裕: ミカン科 *Melicope lunu-ankenda* の成分研究: 日本生薬学会第56回年会 平成21年10月3日 (京都)

- (7) 杉本賢政、大久保美咲、糸魚川政孝、Choudhury M. Hasan, Mohammad A. Rashid, 井藤千裕: マメ科 *Tephrosia candida* より単離した新規化合物の構造及び含有成分の生物活性: 日本生薬学会第56回年会 平成21年10月3日 (京都)
- (8) 安藤基純、西田博之、牧野令奈、西野義彦、植田康次、戸田千登世、岡本誉士典、井藤千裕、古川 宏、小嶋仲夫: ポリフェノール類による遺伝子の安定性および発現への作用とその制御: 第15回日本食品化学学会総会・学術大会 平成21年5月22日 (東京)
- (9) 牧野令奈、伊藤浩晃、鈴木健司、岡本誉士典、西田博之、植田康次、戸田千登世、井藤千裕、古川 宏、小嶋仲夫: 遺伝子損傷活性のないエストロゲン様活性化化合物の探索: 日本薬学会第129年会 平成21年3月27日 (京都)
- (10) 川崎理美、井藤千裕、村田富保、金田典雄、古川 宏、Sivabalan Shanmugam: ミカン科 *Clausena dentata* より単離した新規クマリン二量体の構造及び単離成分の生物活性: 日本薬学会第129年会 平成21年3月27日 (京都)
- (11) 杉本賢政、井藤千裕、村田富保、金田典雄、糸魚川政孝、古川 宏: マメ科 *Tephrosia purpurea* より単離した新規フラボノイドの構造及び単離成分の生物活性: 日本薬学会第129年会 平成21年3月27日 (京都)
- (12) Hiroshi Furukawa, Keisuke Yoshida, Satomi Kawasaki, Chihiro Ito, and Nijisiri Ruangrungsi: First Isolation of Naturally-Occurring Carbazole-Coumarin Dimers from *Micromelum minutum*----- Structure and Biological Activity -----: Vth CIPAM International Symposium on Medicinal, Aromatic, Ornamental and Tinctorial Plants 平成20年11月3-6日 (ニューカレドニア)
- (13) 川崎理美、井藤千裕、古川 宏、Sivabalan Shanmugam: ミカン科 *Clausena dentata* の成分研究: 日本生薬学会第55回年会 平成20年9月20日 (長崎)

- (14) 杉本賢政、井藤千裕、村田富保、金田典雄、古川 宏、糸魚川政孝：マメ科植物より単離したフラボノイドのアポトーチン誘導活性：日本生薬学会第55回年会 平成20年9月19日（長崎）
- (15) Hiroshi Furukawa, Midori Kato, Chihiro Ito, and Motoharu Ju-ichi : Structure and Biological Activity of Coumaquinoline A from *Toddalia asiatica*. First Isolation of a Naturally-Occurring Quinolone-Coumarin Dimer. : 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF NATURAL PRODUCTS with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic, and Agrochemical Interest 平成20年8月3-8日（ギリシャ）
- (16) Motoharu Ju-ichi, Chihiro Ito, and Hiroshi Furukawa : Chemopreventive Flavonoids from *Citrus* Plants. : The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Drug Design and Development 平成20年5月15日（仙台）
- (17) 三宅義明、望月美佳、井藤千裕、糸魚川政孝、大澤俊彦：醸造食品の米種麴に含まれる抗酸化物質と血管内皮接着分子への影響：第62回日本栄養・食料学会大会 平成20年5月4日（埼玉）
- (18) 吉田圭佑、川崎理美、井藤千裕、古川 宏、Nijsiri Ruangrungsi : ミカン科 *Micromelum minutum* より単離した新カルバゾール・クマリン二量体の構造および合成：日本薬学会第128年会 平成20年3月26日（横浜）
- (19) 川崎理美、古川 宏、井藤千裕、Nijsiri Ruangrungsi : ミカン科 *Micromelum minutum* より単離した新規クマリンの構造および生物活性：日本薬学会第128年会 平成20年3月26日（横浜）
- (20) 加藤 緑、吉田圭佑、井藤千裕、古川 宏、十一元晴、Sivabalan Shanmugam : ミカン科 *Toddalia asiatica* より単離した新規クマリン・キノリン二量体の訂正構造：日本薬学会第128年会 平成20年3月26日（横浜）
- (21) 小野絵梨子、山田裕美、十一元晴、後藤勝実、月岡淳子、井藤千裕、古川 宏：タチバナ果皮の成分研究：第57回日本薬学会近畿支部大会 平成19年10月27日（大阪）
- (22) 吉田圭佑、井藤千裕、古川 宏、Choudhury M. Hasan, Mohammad A. Rashid : ミカン科 *Murraya koenigii* より単離した新規カルバゾールアルカロイドの構造決定：日本生薬学会第54回年会 平成19年9月15日（名古屋）
- (23) 川崎理美、井藤千裕、古川 宏、Nijsiri Ruangrungsi : タイ産ミカン科 *Micromelum minutum* 根部の成分研究：日本生薬学会第54回年会 平成19年9月14日（名古屋）
- (24) 加藤 緑、井藤千裕、古川 宏、Sivabalan Shanmugam : ミカン科 *Toddalia asiatica* より単離した新規クマリン-キノリン二量体の構造及び生物活性：日本生薬学会第54回年会 平成19年9月14日（名古屋）
- (25) 三宅義明、井藤千裕、糸魚川政孝、大澤俊彦：米糠、ゴマ粕の麴発酵による抗酸化性の向上と抗酸化物質の生成について：日本食品科学工学会第54回大会 平成19年9月8日（福岡）
- (26) 三宅義明、井藤千裕、糸魚川政孝、和久豊、大澤俊彦：種麴から単離された抗酸化物質Pyranonigrin-Aについて：平成19年度日本醸造学会 平成19年9月4日（東京）
- (27) Hiroshi Furukawa, Takuya Matsui, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, and Tadashi Okada : Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids and Phytoquinoids from *Illicium* Plants in RBL-2H3 Cells. : 48th Annual Meeting of American Society of Pharmacognosy---Natural Products -Research, Development, and Use 平成19年7月15日（Portland, Maine, USA）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 千裕 (ITO CHIHIRO)
名城大学・薬学部・准教授
研究者番号：60193497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし