

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19688009
 研究課題名（和文） 霊芝の性ホルモン疾患改善効果に着目した多機能性生理活性発現機構

研究課題名（英文） The mechanism of multifunctional biological activity of *Ganoderma lucidum* with preventive effects of sex-hormone related disease

研究代表者 清水 邦義 (SHIMIZU KUNIYOSHI)
 九州大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：20346836

研究成果の概要（和文）：霊芝はマンネンタケ科のキノコで、一般的に万年茸（マンネンタケ）と呼ばれている。霊芝から特徴的な成分としてさまざまな多糖類やトリテルペノイドが単離されている。我々は、これまでに、高齢性疾患である前立腺肥大症、前立腺ガンおよび骨粗鬆症の改善・予防に有効な天然素材をキノコに求め、霊芝に当該機能を有することを見いだした。霊芝に含有されるトリテルペノイド類のいくつかは、抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制活性があることが明らかとなった。特に活性成分の一つとして見いだされた、**ganoderic acid DM** は高い抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制活性を示した。

研究成果の概要（英文）：The fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi, Mannentake, or Lingzhi) has been used for centuries in East Asia to treat various human diseases. We investigated anti-androgen effect and the inhibitory effects of osteoclastic differentiation of triterpenoids isolated from *G. lucidum* *in vitro*. Ganoderic acid DM showed the strongest 5 α -reductase inhibiting effect among the other ten triterpenoids. Also, ganoderic acid DM inhibited the osteoclastic differentiation, which responding to receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and a tumor necrosis factor α (TNF- α). Ganoderic acid DM showed the dual functions such as anti-androgenic and anti-osteoclastic differentiation activities, which can be used to explain the multifunction of *G. lucidum*. The accumulation of the knowledge of biological activities of these kinds of triterpenoids leads us to give some hints in elucidating the unsolved function of *G. lucidum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	18,900,000	5,670,000	24,570,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学・木質工学

キーワード：マンネンタケ、霊芝、キノコ、前立腺肥大症、骨粗鬆症、トリテルペノイド、**ganoderic acid DM**

1. 研究開始当初の背景

日本は、超高齢化社会の到来とともに、医療費自己負担率増、日本経済状態の悪化に加えて高価な医薬品による医療経済の崩壊が懸念されている。さらに、新型インフルエンザの流行のみならず、精神疾患・ガン・HIV・感染症等複雑かつ難病の増大に加えて、合成医薬品の副作用が問題となっている。現在ほど、安価で安全な効果を有する天然素材による治療・予防法（セルフメディケーション）の開発が望まれている時代は過去にはないように思える。

霊芝（レイシ）（*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst）はマンネンタケ科の



図1 霊芝の子実体

キノコである（図1）。霊芝は一般的にマンネンタケ科の万年茸（マンネンタケ）を指し、他に門出茸、仙草、吉祥茸、赤芝、紫芝、黒芝、青芝、白芝、黄芝などと呼ばれている。中国の後漢の時代（25-220）にまとめられた『神農本草経』に命を養う延命の霊薬として記載されて以来、中国ではさまざまな目的で薬用に用いられてきた。その効能を裏付けようと多くの基礎研究が実施されており、世界中で霊芝の薬理活性に関する研究は、近年、劇的に増大している（Web of Science 検索では、2000年時点では、年間僅か20報であるが、2008年は年間140報）。薬理活性について、培養細胞や実験動物を用いた研究では抗癌作用、免疫賦活作用、血小板抗凝固作用などが報告されている。まさに、名実共に、多機能性天然素材としての地位を確立しつつある。しかしながら、「なぜかくも様々な効能があるのだろうか」という問いについては、誰も、明確に答えることができない。その疑問への問いかけこそが、本プロジェクトの出発点となった。本プロジェクトでは、その霊芝機能性研究解明に、特に、抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制効果を切り

口として迫りたい。

2. 研究の目的

霊芝を化学成分的に見ると特徴的な成分としてさまざまな多糖類（ β -グルカンなど）やトリテルペノイドが単離されている。霊芝の子実体から単離されたトリテルペノイドは120種を超え、薬理研究から肝臓保護、解毒、抗酸化、抗菌、血糖降下、抗HIVとヘルペスウイルス、腫瘍細胞抑制などの作用があることが示されている。

我々は、特に、高齢性疾患である前立腺肥大症、前立腺ガンおよび骨粗鬆症の改善・予防に有効な天然素材をキノコに求め、スクリーニングならびに伝承情報を駆使し、霊芝に当該機能を有することを見いだした。本プロジェクトでは、霊芝トリテルペノイドの抗男性ホルモン活性、破骨細胞分化抑制効果について、その効果、メカニズムについて解明し、霊芝の多機能性生理活性発現機構に迫る。

3. 研究の方法

（1）霊芝トリテルペノイドの単離

霊芝（15kg）からエタノール抽出物（571g）を得、得られた抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより粗分画した。各分画成分はTLCによってグルーピングし（TLC、*n*-ヘキサン：酢酸エチル70：30、ヨウ素発色）、Fr. A（Rf：0.48-0.97）、Fr. B（Rf：0.03-0.62）とFr. C（Rf：0.0-0.04）画分とした。その中で、Fr. Bに霊芝トリテルペノイドの含有が示唆され、Fr. Bに着目し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー並びに分取逆相HPLCを繰り返すことにより含有成分の単離し、NMRならびにMS測定を行い、構造を解明した。

（2）5 α -リダクターゼ阻害活性評価

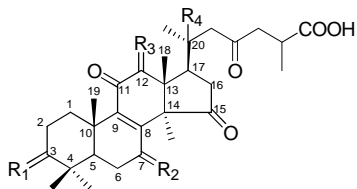
雌ラット由来肝臓ミクロソームを用いて5 α -リダクターゼの粗酵素とした。基質として、放射ラベルされたテストステロン（T）を用いて、ジヒドロテストステロン（DHT）への変換を指標に評価した。

（3）破骨細胞分化抑制活性

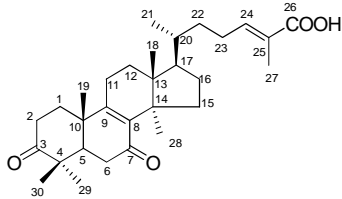
前破骨細胞株RAW細胞の破骨細胞分化因子（receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL）刺激により誘導される成熟破骨細胞への分化を指標に破骨細胞分化活性評価系とした。

4. 研究成果

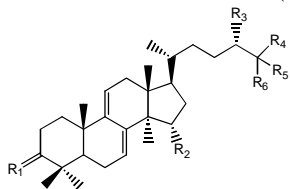
(1) 霊芝トリテルペノイドの単離
 霊芝子実体抽出物を各種クロマトグラフィーを行うことにより、ganoderic acid D (1)、ganoderic acid F (2)、ganoderic acid G (3)、ganoderic acid I (4)、ganoderic acid DM (5)、 5α -lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one (6)、ganoderol B (7)、lucidumol B (8)、ganodermanontriol (9)、及び ganoderiol A (10)が単離、同定された (図2)。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ganoderic acid D (1)	O		H ₂	H
Ganoderic acid F (2)	O	O		H
Ganoderic acid G (3)				H
Ganoderic acid I (4)			H ₂	OH



Ganoderic acid DM (5)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
5α -lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one (6)	O	OH	$\Delta^{24(25)}$	CH ₂ OH	CH ₃	
ganoderadiol (7)		H	$\Delta^{24(25)}$	CH ₂ OH	CH ₃	
lucidumol B (8)		H	OH	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
ganodermanontriol (9)	O	H	OH	CH ₂ OH	OH	CH ₃
ganoderiol A (10)		H	OH	CH ₂ OH	OH	CH ₃

図2 霊芝トリテルペノイドの化学構造

(2) 霊芝トリテルペノイドの 5α -リダクターゼ阻害活性

加齢に従い、男性では、男性ホルモンバランスの乱れから、前立腺肥大症、前立腺ガンなどの男性ホルモン亢進に由来する疾患が増加する。特に、加齢と共に、前立腺は肥大し、70歳以上の男性の70%以上は、病理学的観

点から前立腺肥大症であると考えられている。

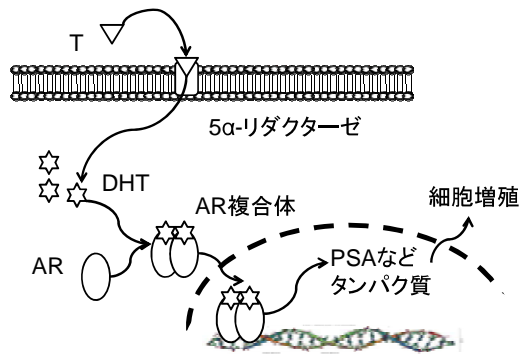


図3 男性ホルモンの代謝と作用

前立腺肥大症および前立腺ガンの発症には、男性ホルモンが深く関与していることを知られている。男性ホルモンには、主にテストステロンとジヒドロテストステロンがある。血中のテストステロンは前立腺細胞内に入り、一部は 5α -リダクターゼの働きによって活性型の男性ホルモンであるジヒドロテストステロンへ変換される。ジヒドロテストステロンは、標的器官である男性ホルモンレセプター (AR) と結合し、転写を介して性の分化、性徴の発現および細胞の増殖といった生理作用を及ぼす (図3)。前立腺肥大症および前立腺ガンの初期段階は男性ホルモンに依存的に細胞を増殖することが知られている。よって、細胞の増殖を抑制するために、男性ホルモン作用の緩和、つまり、男性ホルモン活性化酵素 (5α -リダクターゼ) を抑制する物質が予防や治療のために有効であると考えられている。

現在、男性ホルモン依存性疾患には、前立腺肥大症、前立腺ガン、男性型脱毛症、ニキビ、多毛症などがある。末梢で働いている男性ホルモンはテストステロンよりも相対的にジヒドロテストステロンの方が多く、ホルモン作用も強力である。ジヒドロテストステロンの過剰な産生はこれらの疾患を引き起こすことを分かっている。そこで、 5α -リダクターゼを阻害し、ジヒドロテストステロン量を制限する薬剤が求められるようになってきた。このような男性ホルモン性疾患に対する従来の治療薬は、ステロイド系薬剤が主流であり、勃起障害や性欲減退などの副作用が指摘されている。そこで、これらの前立腺肥大症、前立腺ガン、男性型脱毛症の改善・治療効果が期待される抗男性ホルモン活性を有する素材を、特に食用・薬用キノコに求め、その効果を霊芝が有することを見出したのである (データ未掲載)。

霊芝から単離された化合物の雌ラット肝

臓ミクロソームを用いた5 α -リダクター

表1 霊芝から単離された化合物の5 α -リダクターゼ活性に及ぼす影響

	5 α -リダクターゼ阻害活性	
	667 μ M(%)	IC ₅₀ (μ M)
ganoderic acid D (1)	23	>667
ganoderic acid F (2)	18	>667
ganoderic acid G (3)	13	>667
ganoderic acid I (4)	2	>667
ganoderic acid DM (5)	99	10.6
5 α -lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one (6)	99	41.9
ganoderol B (7)	39	>453
lucidumol B (8)	31	>436
ganodermanontriol (9)	32	>423
ganoderiol A (10)	6	>387

ゼ活性測定系における5 α -リダクターゼ活性に及ぼす影響を検討した(表1)。Ganoderic acid DM (5)は、最も高い阻害活性(IC₅₀=10.6 μ M)を示し、次いで、5 α -lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one (6) (IC₅₀ = 41.9 μ M)が高い阻害活性を示した。その他の化合物は、低い阻害活性を示したことを分かった。構造活性相関については、現在検討中であるが、ganoderic acid DM(5)に関しては、そのメチル化誘導体は、阻害活性が消失し(図4)たことから、側鎖のカルボキシル基が活性発現

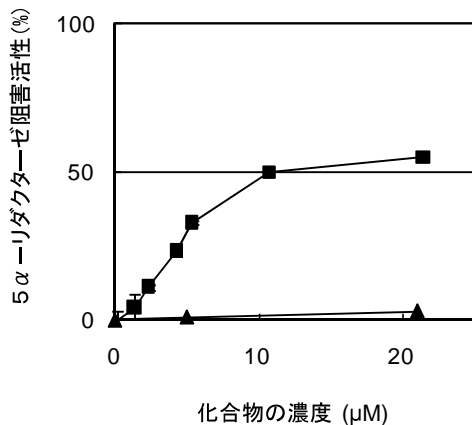


図4 Ganoderic acid DM (■)ならびにそのメチルエステル体(▲)の5 α -リダクターゼ活性に及ぼす影響

に關与していることが示唆されている。しかしながら、5 α -lanosta-7,9(11),24-triene-15 α ,26-dihydroxy-3-one (6)の阻害活性発現に関しては、さらなる検討が必要である。

(3) 破骨細胞分化抑制活性

骨粗鬆症とは、骨密度が低下し、骨折のリスクが増加する病気であり、骨粗鬆症による骨折のため、寝たきりの生活を余儀なくされる人も少なくない。骨粗鬆症は、加齢に因る加齢性骨粗鬆症と、閉経に伴う卵巣機能の低下によるホルモンバランスの崩れが引き金となる閉経後骨粗鬆症が知られている。閉経後骨粗鬆症は、女性にとっては健康を大きく損ない、生活の快適さを奪うおそれのある重大な疾患である。閉経は女性にとって避けようもなく、閉経後の女性には健康上の変化が訪れる。閉経後の骨粗鬆症は卵巣機能の低下に伴うエストロゲンの急激な減少に関連して引き起こされるため、ホルモン補充療法(HRT)による治療が取り入れられている。しかしながらHRTの長期的治療に関するリスク評価は十分ではない。そこで我々はより安全かつ優れた骨粗鬆症予防効果を有する素材を求め、長期服用・食経験を有する天然素材に着目した。中国では古来より、医薬の学を本草と称し、薬のもととなる多数の植物、動物、鉱物に関する知識が蓄積している。『本草綱目』は、明の李時珍(1518~1593)によって書かれたもので、約1900種の薬用植物、動物、鉱物などを16部60類に分けて、その産地、性質、製薬方、効能などを解説し、現在でも非常に有益の情報を残している医学書である。この本草綱目の一節に霊芝の更年期障害に対する治療効果について示唆されていたのであった。骨粗鬆症は、更年期障害の症状の一つであることから、我々は、霊芝抽出物に骨粗鬆症予防効果を期待し、関連するin vitro及びin vivoでの検討(エストロゲン様活性、卵巣摘出ラットを用いた骨密度低下抑制活性、破骨細胞分化抑制活性)を行い、伝承的知見の妥当性を科学的に検証するとともに、そのメカニズム解析を行うこととした。その結果、霊芝エタノール抽出物にはエストロゲン類似的作用があることが明らかとなった。さらに、卵巣摘出ラットの骨粗鬆症の症状軽減効果を示した。このことからエストロゲンが欠乏することによって引き起こされる疾病に対して霊芝は軽減作用を示すことが期待された。また、エストロゲンとの関連が深い、破骨細胞に着目し、研究を進展させたところ、霊芝エタノール抽出物は破骨細胞の分化を破骨細胞に直接影響することで抑制することが明らかとなった。

霊芝エタノール抽出物から単離されたトリテルペン類を用いて、破骨細胞の分化への影響を検討した。ganoderic acid D (1)、G (3)、I (4)では、分化抑制活性は400 μ Mの高濃度においても観察されなかった。一方で、ganoderic acid F (2)、DM (5)、ganoderol B (7)、ganodermanontriol (9)、ganoderiol A

(10)では、50 μM 以下で分化抑制効果が見られた。従って、破骨細胞分化抑制効果は、ラノスタン型トリテルペノイド化合物全てが持っている活性ではなく、一部の化合物が持つ特徴的な活性であることが示された。

霊芝特有のラノスタン型トリテルペノイドは、側鎖にカルボキシル基を持つ ganoderic acid 化合物と側鎖にアルコール性水酸基を持つ ganoderma alcohols に大別できる。今回検討を行った、ganoderma alcohols の化合物である ganoderol B (7)、

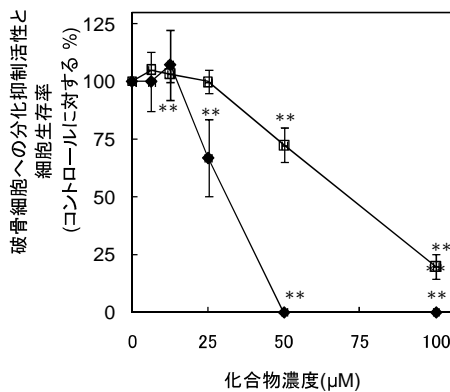


図5 Ganoderic acid DM の破骨細胞への分化抑制活性と細胞毒性 ◆: 破骨細胞への分化抑制活性; □: 破骨細胞への細胞毒性

ganodermanontriol (9)、ganoderiol A (10)では、分化抑制効果が見られた。しかし、これらの化合物は分化抑制 IC_{50} と細胞毒性 IC_{50} の値が同等であり、分化細胞数比および生細胞数比も検討を行った各濃度において近い値を示した。Ganoderma alcohol 化合物の細胞毒性はよく知られており、これらの化合物の分化抑制効果の発現は細胞毒性に起因しているとも考えられる。一方、ganoderic acid 化合物では活性を持つ ganoderic acid F (2)、DM (5) と活性を示さない ganoderic acid D (1)、G (3)、I (4) で大きく効果が分かれた。特に ganoderic acid DM (5) は 50% 分化抑制を示した濃度においては、80% 以上の細胞生存率であったことから (図5)、細胞毒性以外の起因で破骨細胞の分化を抑制していることを示唆された。Ganoderic acid DM (5) を用いて、破骨細胞の分化抑制機構の解明を行った。

骨吸収を結びつける因子として注目を集めているサイトカインが、破骨細胞分化因子 (receptor activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ligand, RANKL) である。RANKL が破骨細胞の分化において必要の因子であることが明らかにされている。RANKL はレセプター RANK と結合すると、主として TRAF ファミリー (TNF receptor associated factor) のアダプター

分子を活性化し、下流にシグナルを伝える。RANKL は転写因子複合体 AP-1 の構成分子である c-Fos を誘導し、AP-1 を活性化する。これらの転写因子は、協調して酒石酸耐性酸ファスファターゼ (TRAP) や cathepsin K 遺伝子などの破骨細胞特異的遺伝子のプロモータを制御する。NFATc1 (nuclear factor of activated T cells) は、RANKL による破骨細胞の分化の過程において特異的に誘導されることが知られている。

破骨細胞に特異的な遺伝子発現に及ぼす影響を観察するため、破骨細胞の分化の後期段階のマーカーとして知られる TRAP や cathepsin K に対して発現解析を行った。Ganoderic acid DM (5) 添加によって破骨細胞に特異的な遺伝子の発現が抑制されることが観察された。また、特に cathepsin K は骨代謝に重要な働きを有しており、ノックアウトマウスにおいては大理石病を呈することが知られている。このような遺伝子の発現を抑制することから、ganoderic acid DM (5) による *in vivo* の骨吸収の抑制効果が期待される。また、破骨細胞の分化の際に、RANKL の刺激によって発現が誘導される c-Fos の発現量に及ぼす影響を検討した。このとき ganoderic acid DM (5) による発現量の抑制は観察された。さらに破骨細胞の分化に特異的な転写因子である NFATc1 の発現量の抑制も観察された。一方で細胞の融合に重要なレセプターとして知られる DC-STAMP と MFR に対しても発現解析を行った。これらは細胞膜上に発現しており DC-STAMP のリガンドは不明である。DC-STAMP の発現量が ganoderic acid DM (5) によって特異的に発現を抑制されていることがわかる。このことから DC-STAMP の発現を特異的に抑制することによって ganoderic acid DM が破骨細胞の融合を阻害している可能性が考えられる。上記検討結果より図6のようなメカニズムが示唆された。

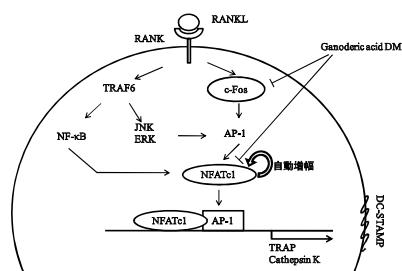


図6 Ganoderic acid DM の破骨細胞への分化抑制活性の阻害機構

霊芝のエタノール抽出物から単離されたトリテルペン類の抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制活性に関して検討を行った。その結果、本研究において、霊芝に含有されるトリテルペノイド類のいくつ

は、抗男性ホルモン活性ならびに（もしくは）破骨細胞分化抑制活性があることが明らかとなった。特に活性成分の一つとして見いだされた、ganoderic acid DM(5)は高い抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制活性を示した。興味深い点は、単一の化合物でありながら、極めて強力な、かつ全く作用点異なる「抗男性ホルモン活性」ならびに「破骨細胞分化抑制活性」を示したことである。多機能性分子 ganoderic acid DM (5) のようなトリテルペノイド類の分子レベルでのメカニズム解析は霊芝のまだまだ不明な点、特に、「なぜかくも多機能性を発揮しているのか」を解明するヒントを与えてくれるかもしれない。もちろん、霊芝中には、百種以上のトリテルペノイド類が含まれており、相互作用しているが故、すなわちコンビネーション効果も考えねばならないが、まずは、一つ一つの手がかりをきっかけに研究を進展させ、その隠された謎を明らかにしたい。霊芝については、近年様々な薬理活性が報告されてきており、未だに、その全貌は見えてこない。この古くて新しい素材、霊芝の機能解明に引き続き挑戦し、様々な疾患の予防・治療への有効性の科学的検証を成し遂げていきたい。

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 24 件)

(査読あり)

1. S. Fatmawati, K. Shimizu, R. Kondo, Inhibition of aldose reductase in vitro by constituents of *Ganoderma lucidum*, *Planta Med.*, in press
2. J. Liu, J. Shiono, Y. Tsuji, K. Shimizu, R. Kondo, Methyl ganoderic acid DM: a selective potent osteoclastogenesis inhibitor, *The Open Bioactive Compounds Journal*, 2, 37-42 (2009)
3. J. Liu, J. Shiono, K. Shimizu, R. Kondo, Ganoderic acids from *Ganoderma lucidum*. Inhibitory activity of osteoclastic differentiation and structural criteria, *Planta Med.* 76, 137-139 (2010)
4. J. Liu, J. Shiono, K. Shimizu, A. Kukita, T. Kukita, R. Kondo, Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 2154-2157 (2009)
5. I. Miyamoto, J. Liu, K. Shimizu, A. Kukita, T. Kukita, M. Sato, R. Kondo, Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*, *Eur. J. Pharmacol.* 602 (1), 1-7 (2009)
6. J. Liu, K. Shimizu, R. Kondo, Anti-androgenic activity of fatty acids, *Chem. Biodiversity*, 6, 503-512 (2009)
7. K. Shimizu, I. Miyamoto, J. Liu, F. Konishi, S. Kumamoto, R. Kondo, Estrogen-like activity of ethanol extract of *Ganoderma lucidum*, *J. Wood Sci.*, 55, 53-39 (2009)
8. J. Liu, S. Tamura, K. Kurashiki, K. Shimizu, K. Noda, F. Konishi, S. Kumamoto, R. Kondo, Anti-androgen effects of extracts and compounds from *Ganoderma lucidum*, *Chem. Biodiversity*, 6, 231-243 (2009)
9. M. Noguchi, K. Tomiyasu, M. Nakiri, K. Matsuoka, T. Kakuma, F. Konishi, S. Kumamoto, K. Shimizu, R. Kondo, An extract of *Ganoderma lucidum* in men with lower urinary tract symptoms: A double-blind, placebo-controlled randomized and dose-ranging study, *Nishinohon Journal of Urology* 70(9), 466-472 (2008)
10. M. Noguchi, T. Kakuma, K. Tomiyasu, A. Yamada, K. Itoh, F. Konishi, S. Kumamoto, K. Shimizu, R. Kondo, K. Matsuoka, A randomized clinical trial of an ethanol extract of *Ganoderma lucidum* in men with lower urinary tract symptoms, *Asian J. Androl.* 10 (5), 777-785 (2008)
11. S. Fatmawatia, K. Kurashiki, S. Takeno, Y. Kim, K. Shimizu, M. Sato, K. Imaizumi, K. Takahashi, S. Kamiya, S. Kaneko, R. Kondo, The inhibitory effect on aldose reductase by an extract of *Ganoderma lucidum*, *Phytother. Res.*, 23, 28-32 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：マンネンタケ処理物のアンドロゲン受容体結合活性

発明者：近藤隆一郎、清水邦義、劉潔、隈本正一郎、小西史子、金子周平、水海吉太郎

種類：特願 2007-555012

出願年月日：2007年1月17日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/sffps/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 邦義 (SHIMIZU KUNIYOSHI)

研究者番号：20346836