

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07100

研究課題名（和文）トランスジェニック線虫を用いた生薬の機能性評価法の検証

研究課題名（英文）Validation of a functional evaluation method for herbal medicines using transgenic nematodes

研究代表者

杉本 幸子（SUGIMOTO, SACHIKO）

広島大学・医系科学研究科（薬）・准教授

研究者番号：60549012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生薬・漢方薬の有効性や可能性を正しく示し、有効活用に導くためには、その有効成分の解明や臨床の有効性を示すエビデンスをしっかりと構築していくことが重要である。複数の器官をもつ多細胞生物である*C. elegans*は生薬・漢方薬のような複数の化合物が複合的に作用するエキスの薬効評価に適しているのではないかと考えた。

そこで本研究において遺伝子組み換え*C. elegans*であるTJ356株とCL4176株を用いて、生薬抽出エキスの機能性評価と活性化合物の単離構造解析を行った。その結果、活性の見られた2種の生薬から、3つの活性化合物を単離・同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TJ356を用いた活性試験で得られた化合物(juncusol、juncuenin B)はいずれもイグサ科から単離されているdihydrophenanthrene骨格を有する化合物で、これまでにHeLa細胞やA2780細胞に対する抗腫瘍活性が報告されている。本研究において線虫のDAF-16の核移行を促進する作用が見いだされたが、そのような報告はこれまでになく、これら化合物の持つ新たな生物活性が明らかとした。CL4176を用いた活性評価を指標に十薬からSesamineを単離した。十薬の薬効としてアルツハイマー病予防などは知られていないが、今回の実験結果からそのような作用がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to properly demonstrate the effectiveness and potential of herbal and Kampo medicines, and to guide their effective use, it is crucial to establish solid evidence of their active components and clinical efficacy. As a multicellular organism with multiple organs, *C. elegans* may be suitable for evaluating the pharmacological effects of extracts like herbal and Kampo medicines, which involve complex interactions of multiple compounds. Therefore, in this study, we used genetically modified *C. elegans* strains, TJ356 and CL4176, to perform functional evaluations of herbal extracts and to isolate and structurally analyze the active compounds. As a result, we isolated and identified three active compounds from two herbal medicines that showed activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：線虫 *Caenorhabditis elegans* 抗老化

1. 研究開始当初の背景

本研究では生薬・漢方薬を含む天然物の抽出エキスや単離された生物活性物質が示す *in vitro* 試験の結果と、それらの「臨床的有効性」との間に存在する大きな隔たりを解消する試みの一つとして、線虫モデルを評価系に用いた生薬エキスの活性評価、化合物探索、作用機序解析、動物試験を行う。

まずトランスジェニック線虫を利用した機能性評価を通して、これまで経験的にその使用目的が決まっていた生薬の新たな機能性を見出すとともに、その有効性の科学的エビデンスを構築する。また、生物活性物質を単離し、動物実験における効果を確認することにより、本研究で用いる機能性評価法が化合物の臨床的有効性の評価法として適しているかを検証する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記した通り、トランスジェニック線虫を利用した活性評価法を通して、生薬の新たな機能性を発見することと、その生物活性物質を単離し、作用機序を解明し、動物実験における効果を確認することにより、本研究で用いる活性評価法が化合物の臨床的有効性の評価法として適しているかを検証することである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換え線虫株

【CL4176 株を用いた抗アルツハイマー機能評価系】

トランスジェニック線虫 CL4176 は通常 16 度で継代維持されるが、25 度で培養を行うと筋組織特異的にヒト A β ₁₋₄₂が蓄積・凝集し、体に麻痺が起こる特徴を有している。本研究ではその麻痺を改善する生薬を見出し、その生物活性物質を探索する。実験は独立に 3 回行い、各濃度条件につき計 90 匹の線虫で活性を評価した。

【TJ356 株を用いた抗老化機能評価系】

ヒトを含め生物の多くは生命活動の維持に伴い体内で活性酸素種 (ROS) が生成されタンパク質や脂質、DNA が損傷を受けている。ROS によるダメージが長期間持続 (酸化ストレス) すると細胞が老化し、様々な疾患を引き起こされる。つまり、細胞内の酸化ストレス状態を改善することが老化や疾患の発症・進展を遅らせ、健康寿命を延ばすことに繋がる。TJ356 株は抗老化作用を持つとされる遺伝子群の発現を制御しているヒト FOXO 遺伝子の線虫ホモログである *daf-16* に GFP が結合した遺伝子が導入されている線虫である。この線虫は抗老化遺伝子群の発現の指標である DAF-16 の核移行 (通常時 DAF-16 は細胞質に存在) を蛍光顕微鏡で確認できるようになっており、それを指標にすることで抗老化機能を持つと予想される生薬エキスや化合物の機能性を評価できる。実験は独立に 3 回行い、各濃度条件につき計 60 匹の線虫で活性を評価した。

活性が見られたエキスに対しては活性試験の結果を指標に、溶媒間分配、各種カラムクロマトグラフィー、HPLC 等の精製手法を通して化合物の単離を進める。化合物の構造は質量分析と NMR 測定を主とした各種スペクトルデータを基に決定する。

線虫の継代維持は NGM プレートを用い、16 度で培養した。線虫の餌は標準餌である大腸菌 OP50 を用いた。これらの遺伝子組み換え株および大腸菌株はすべて *Caenorhabditis Genetics Center* (Minnesota, USA) より購入した。

(2) スクリーニング試料

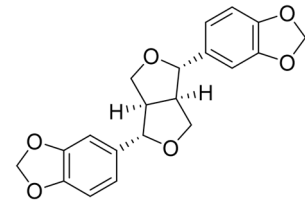
活性評価を行うサンプルには、健康長寿のために使用され、長期に連用しても問題がないとされている上品 (じょうほん) の生薬 72 種を用いた。各生薬をメタノールで抽出後、得られた抽出物は DMSO に溶解し終濃度 2 mg/mL となるよう調製しスクリーニングに用いた。

4. 研究成果

【CL4176 株を用いた抗アルツハイマー機能評価系】

抽出物 72 種について、CL4176 を用いたスクリーニングを実施した。高温培養後 Control (DMSO) の CL4176 がすべて麻痺した時間においても 20%以上麻痺していない個体が残ったサンプルをヒットサンプルとしたところ、2 種の生薬に活性が見られた。

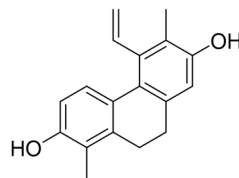
活性が見られた生薬の一つである十薬、植物和名ドクダミ (*Houttuynia cordata*) の成分探索を行うこととした。十薬 1.5 kg をメタノールで抽出し、99.7 g のエキスを得た。定法に従い抽出エキスを酢酸エチル、ブタノールおよび水を用いて溶媒分配したところ、酢酸エチル可溶画分に活性の集約が認められた。さらに活性を指標にシリカゲル、ODS カラムクロマトグラフィー、HPLC による分離を行い、活性化化合物 1 を 17.3 mg 単離した。単離した化合物は核磁気共鳴装置や質量分析装置を用いて各種物理化学データの測定を行い、その解析結果から化学構造を決定した。得られた化合物の CL4176 の麻痺抑制活性を評価したところ、1 mM (354 µg/mL) の添加で麻痺の有意な遅延が見られた。



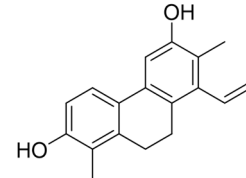
活性化化合物 1

【TJ356 株を用いた抗老化機能評価系】

抽出物 72 種について、TJ356 を用いたスクリーニングを実施した。2 mg/mL のサンプル濃度において 30%以上の線虫に核移行が見られたものをヒットサンプルとしたところ、3 種の生薬に活性が見られた。これらのエキスはいずれも *C. elegans* の寿命延長作用を示した。これらのうち最も強い寿命延長作用を示し、DAF-16 の核移行活性も強い生薬である燈心草、植物和名イグサ (*Juncus decipiens*) の活性成分探索を行うこととした。燈心草 1.5 kg をメタノールで抽出し、定法に従い酢酸エチル、ブタノールおよび水を用いて溶媒分配を行ったところ、酢酸エチル可溶画分に活性の集約 (2 mg/mL において 67%の核移行) が認められた。続いてその活性を指標にシリカゲル、ODS カラムクロマトグラフィー、HPLC による分離を行い、活性化化合物 2 を 56.8 mg、活性化化合物 3 を 16.7 mg 単離した。



活性化化合物 2



活性化化合物 3

本研究では遺伝子組み換え線虫である TJ356 および CL4176 を用いて生薬の機能性の評価を行い、活性のあった 2 つの生薬から計 3 つの活性化化合物を単離同定した。CL4176 を用いた活性評価を指標に十薬から Sesamine を単離した。十薬の薬効としてアルツハイマー病予防などは知られていないが、今回の実験結果からそのような作用がある可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Charinrat Saechan, Uyen Hoang Nguyen, Zhichao Wang, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Giang Minh Phan, Viet Hung Pham, Varomyalin Tipmanee, Jasadee Kaewsrichan	4. 巻 -
2. 論文標題 Potency of bisresorcinol from <i>Heliciopsis terminalis</i> on skin aging: in vitro bioactivities and molecular interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peerj	6. 最初と最後の頁 e11618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.11618	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 Sagara, Toshinori; Sugimoto, Sachiko; Yamano, Yoshi; Nehira, Tatsuo; Masuda, Kazuma; Otsuka, Hideaki; Matsunami, Katsuyoshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Isolation of three new diterpenes from <i>Dodonaea viscosa</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 40-47
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0件

〔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
研究分担者	山野 喜 (YAMANO YOSHI) (70650597)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	

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
---------	---------