

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580128

研究課題名（和文）

機能性食品中の腫瘍細胞への作用物質としてのポリフェノールの研究

研究課題名（英文）Polyphenols of functional foods as materials effective on tumor cells

研究代表者

波多野 力 (TSUTOMU HATANO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50127578

研究成果の概要（和文）：

機能性食品として使用される植物を中心にタンニンの探索を進め、エジプト産ギョリュウ科植物から新規化合物を含む多様なタンニンを単離し、それらの中に、培養口腔がん細胞に対する選択的な毒性を示すものを見出した。また、*Tamarix tetrandra* 由来の培養細胞でのそれらのタンニンの生産に成功した。さらに、オリゴ糖をベースにした、抗腫瘍作用を示す人工タンニンをも新規に合成した。

研究成果の概要（英文）：

Tannins of several plant resources including those used for functional foods were investigated, and various tannins including new ones were isolated from a tamaricaceous plant grown in Egypt. Several tannins among them showed selective cytotoxicity against human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines. Those tannins were produced in cultured tissues induced from *Tamarix tetrandra* successfully. Artificial tannins based on oligosaccharide cores were newly synthesized, and they also showed selective cytotoxicity against OSCC cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：機能性食品、ポリフェノール、タンニン、抗腫瘍作用、植物組織培養、人工タンニン、ギョリュウ科、バラ科

### 1. 研究開始当初の背景

タンニンは、天然ポリフェノールの中でも分子量が500以上の化合物群で、化学変化を受けやすく構造解明の遅れた化合物群であったが、この4半世紀の間に分離精製および構造決定の技術的進歩を基礎として化学的な研究が進展し、特に近年、本課題の代表者である波多野らの研究を含めて、

抗酸化作用や抗ウイルス作用、抗生物質耐性抑制作用など多くの活性が明らかにされつつあった [Yoshida T, Hatano T, Ito H (2005) “Chemical Ecology and Phytochemistry of Forest Ecosystems” (ed. by Romeo JT), Elsevier, pp. 163-190]。中でも抗腫瘍作用に関連した研究については、変異原性抑制作用、発がんプロモーション

抑制作用、移植腫瘍に対する *in vivo* での抗腫瘍作用の検討が行われ、また培養がん細胞に対する細胞毒性に対しても、本課題の共同研究者のうち坂上を中心にタンニンなど各種ポリフェノールの作用の検討が進められ、強い抗腫瘍活性を有するタンニンがあることが明らかにされてきた [Sakagami H, 他 22 名 (2005) “Functional Polyphenols and Carotenes with Antioxidative Action” (ed. by Motohashi N), Research Signpost, pp. 133-176].

タンニンの抗腫瘍作用については、より高分子のタンニンに正常細胞に対する選択毒性が高い傾向が見られたが、構造類似のものでも作用に差があるなど、構造活性相関やその機構を含めて未解明な部分が多く残されている状態が続いていた。

このような背景のもとに本研究では、高分子タンニン関連物質について、天然および合成面からの抗腫瘍作用物質としての開発を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究は、新たなタイプの抗腫瘍作用物質として期待される、植物中の機能性物質としてのポリフェノールについて、高分子タンニンを中心に、化合物群としての開拓を目指すこととした。そのため本研究では、1) 機能性食品や生薬として使用される植物にとどまらず、これらと植物分類上関連のある未利用植物資源由来の高分子タンニンの探索を進めるとともに、2) 合成的な人工タンニンの生成の検討をも進め、さらに、3) 植物培養組織における高分子タンニンの効率的生産の検討をも併せて行うことによって、抗腫瘍物質としての高分子タンニンの研究を展開した。

特に、植物由来の機能性物質としてのタンニンの化学的研究に新局面を開くものとなることに重点を置いて研究を進めることとした。天然ポリフェノールのうち比較的高分子で、タンパク質等と強い結合力を有するものがタンニンと呼ばれる。タンニンは一般に不安定で、クロマトグラフィーに使用される各種担体に非可逆的に吸着され、扱いにくい物質と考えられ、長い間、放置されてきた歴史がある。しかし 1970 年代後半以来、分離・構造決定の技術的進歩を背景としながら、日英の研究グループによって化学的研究が進展し、多くのタンニンが精製・単離され、その構造解明が進められてきた。その結果、加水分解性タンニンについては、これまでに波多野らによって rugosin D、cornusiin A、coriariin A、oenothein B など多くの 2 量体類の存在が明らかになり、タンニンとしてひとくくり

の大雑把な議論でなく、化学構造を基礎とした生物活性の検討が可能となってきた。これらはほとんどが分子量 1500~2000 の化合物群であるが、さらに大きな分子量のタンニンを含めてそれらの一部分が解明されてきた段階であった。ただし、それらは比較的扱いやすい、NMR スペクトルなども解析が比較的容易なものに限られており、種々の平衡混合物を形成したり、分子内に回転障害を有したりする化合物の場合は、未だに取扱いが困難であった。むしろより高分子の化合物群に強い抗腫瘍活性やその他の活性(抗ウイルス活性など)が見られ、こうした化合物群の構造解明にはさらなる技術的展開が必要ではあるが、より効果的な作用が期待され、こうした化学構造研究を積極的に進めることとした。

## 3. 研究の方法

抗腫瘍作用物質としてのポリフェノールについて、高分子タンニンを中心に、以下のように検討を進めた。

(1) 天然由来の高分子タンニンの開発：  
機能性食品として使用される植物については、未利用部分や、植物分類上関連のある植物群をも含めてタンニンの探索を進めた。特にギョリュウ科植物には、他科の植物群には見られない、特異な構造のタンニンが期待できるので、重点的に検討を進めることとした。

(2) 人工タンニンの合成研究の展開：  
タンニンに多くの生物活性が見出されてきたことを基礎に、加水分解性タンニンの合成的研究もオリゴマーの合成をも目指して各国で積極的に行われてきていたが、その対象は天然物として波多野らが見出してきたものなどのごく一部にすぎなかった。天然の加水分解性タンニンオリゴマーは糖間の架橋が基本的にアシル基によるものであったが、本研究では、高分子である点を重視して発想を変え、オリゴ糖にポリフェノーリックなアシル基を導入することによって人工タンニンの合成的展開を進めることとした。本課題の共同研究者の竹内らはすでにタンニンの合成的アプローチをはじめており、成果を上げていたので [Abe H, Takeuchi Y, 他 3 名 (2008) *Tetrahedron Letters*, 49, 605-609.], こうした成果を基礎に研究を展開することとした。

(3) 植物培養組織における高分子タンニンの効率的生産：

本研究の開始以前には、波多野らによる 2 量体などの生産に関する研究 [Taniguchi S, Imayoshi Y, Hatano T, 他 2 名 (2002)

Plant Biotechnology, 19, 357-363.] 以外には、植物組織培養によるタンニン生産の研究はほとんど見当たらない状態であったので、本研究によって、効率的な高分子タンニン産生条件の確立を目指した。ギョリュウ科植物は乾燥および高塩濃度ストレス環境下で生育しているものが多く、他方、これらは他科の植物には見られないタイプの加水分解性タンニンオリゴマーを生産しており、2量体について見ると、このタイプのタンニンは高分子でありながら安定性が高い。そこで、本科植物由来の組織培養を使用し、タンニンの安定的生産の環境について検討を進めることとした。

#### (4) タンニンの抗腫瘍作用の検討：

(1) ~ (3) に示すようにして得た各種タンニン群について腫瘍細胞への効果を検討し、より強力で選択性の高い抗腫瘍作用物質の開拓を進めることとした。坂上が維持してきたヒト口腔扁平上皮がん、ヒト口腔組織由来正常細胞（歯肉線維芽細胞、歯髓細胞、歯根膜線維芽細胞等）を使用することによって、選択性を持った抗腫瘍性物質の選抜が可能であった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 天然由来の高分子タンニンの開発：

エジプト産のギョリュウ科植物 *Tamarix nilotica* から、nilotin M4, D7, D8, D9 などの新規物質を含めて、種々の加水分解性タンニンを単離し、それらの同定・構造解明を進めた。これらはエラジタンニン単量体ないし二量体、三量体であって、それらのグルコース核に galloyl 基、hexahydroxydiphenoyl 基、dehydrodigalloyl 基、isodehydrodigalloyl 基、および hellinoyl 基がアシル基として結合した構造を有している。既知のタンニンについても、本植物からの単離は初めてであるものが多数、明らかになった。

また、それらのタンニンの多くに、口腔扁平上皮がん細胞に対する強い細胞毒性を示すものがあることを認めた。これらは正常細胞に対する毒性が相対的に低く、腫瘍選択性の高いことを見出した。本科植物の多くは砂漠の過酷な条件でも生育し、植物資源としての有効利用が期待される。

一方、食品や薬用植物・生薬として使用される植物を中心に、抗腫瘍作用が期待される高分子タンニンについて探索を進めた結果、バラ科のオランダイチゴ *Fragaria ananassa* の未利用部分である果蒂に、抗腫瘍性を有するエラジタンニン二量体を含んでおり、これらが腸炎起因性細菌に対する抗菌作用をも示すことを見出した。

茶葉の主ポリフェノール成分で、顕著な

細胞毒性を示す (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) の安定性についても検討を進めた結果、その産物についても新たな知見が得られ、それらの二量体構造を確立した。これは、EGCG の作用と考えられているもののうち、少なくともその一部は、こうした変化産物が実際に作用していることを意味する。

タンパク質を中心とし、これにタンニンがその周囲に結合した、一種の超分子体の形成についても検討を進め、弱い会合体を形成している初期過程からの時間的経過により質的な転換が起こっていること、こうした超分子構造の形成時に、その構成要素となるポリフェノール単体の場合と比較して腫瘍細胞に対する細胞毒性の変化が見られる場合のあることを見出した。

##### (2) 人工タンニンの合成研究の展開：

多糖を基礎とし、これに保護した galloyl 基を結合させたのち、脱保護することによって、人工タンニンを合成し、さらにこれらの簡便な精製方法をも確立することができた。そうして得た人工タンニンにも抗腫瘍作用を認めた。また、その基礎となる多糖の構造により、作用や腫瘍選択性に差異があることを見出した。

##### (3) 植物培養組織における高分子タンニンの効率的生産：

日本国内で入手可能なギョリュウ科植物のうち *Tamarix tetrandra* から、インドール酢酸およびベンジルアデニンを含有する培地によってシュート培養を誘導・確立し、このシュート培養から 14 種のエラジタンニンを単離し、この手法によるタンニンの確保が可能であることを確かめた。さらに、ホルモン無添加培地によって、このシュート培養から根の分化の促進が可能となり、この過程を通じて再生した植物は、通常の土壌および天候下での馴化・生育が可能となることを見出した。すなわち、このような再生植物を大量増殖させることによって、その成分としてのタンニンの安定的な供給が可能であることが示された。

##### (4) 成果の意義と今後の展望：

本研究は、未利用植物資源であったギョリュウ科植物から、培養腫瘍細胞に対する選択毒性を示す物質として各種のタンニンを見出し、その構造を解明した点に主要な意義がある。これらは植物組織培養によって安定的に生産できることも実証できた。

本研究によって確立された、これらタンニンおよび関連ポリフェノールに関する構造的研究の手法は、植物由来の機能性物質としての新たなタンニンの構造決定に有用

であり、さらに培養腫瘍細胞における作用物質の機構研究のツールとしてポリフェノールが利用可能であることを示唆するものである。また、抗腫瘍作用のみならず腸炎起因性細菌に対する抗菌作用を示したことは、これらの機能性について新たな可能性を示したものと考えられる。

さらに、本研究によって人工タンニンの基本的な合成および精製方法が確立され、それらの抗腫瘍作用が明らかになった。これによって機能性物質群としてのタンニンについても、抗腫瘍作用の検討をはじめとする、各種の生物活性、薬理活性の検討の可能性が大きく拡大されたことを意味する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Orabi MAA, Taniguchi S, Yoshimura M, Yoshida T, Kishino K, Sakagami H, Hatano T, Hydrolyzable Tannins of Tamaricaceous Plants. III. Hellinoyl- and Macrocyclic-type Ellagitannins from *Tamarix nilotica*, Journal of Natural Products, 査読有, Vol. 73, 2010, 870-879.
- ② Ohyabu T, Taniguchi S, Ito H, Hatano T, New Oxidation Products from (-)-Epigallocatechin Gallate in Neutral Solution, Heterocycles, 査読有, Vol. 82, 2011, 1685-1692.
- ③ Orabi MA, Taniguchi S, Terabayashi S, Hatano T, Hydrolyzable Tannins of Tamaricaceous Plants. IV: Micropropagation and Ellagitannin Production in Shoot Cultures of *Tamarix tetrandra*, Phytochemistry, 査読有, Vol. 72, 2011, 1978-1989.

[学会発表] (計3件)

- ① Hatano T 他, Tannins of Tamarix Plants: Structures of New Ellagitannins, Cytotoxicity of Tamarix Tannins, and Accumulation of Tannins in Cultures Shoots, 第52回天然有機化合物討論会, 2010年9月29日-10月1日, 静岡県コンベンションアーツセンター(グランシップ)(静岡市)
- ② 竹内 靖雄 他, 抗腫瘍作用を有する人工タンニンの合成, 日本薬学会第131年会, 2010年3月5日(震災のため講演要旨集誌上開催とされた).
- ③ 波多野 力 他, 薬用植物および食品中のタンニン及び関連ポリフェノールによるAeromonas科およびVibrio科細菌に

対する影響, 第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2012年11月1日~11月2日, 大阪大学会館(大阪府豊中市).

[図書] (計2件)

- ① Sakagami H, Kushida T, Makino T, Hatano T, Shirataki Y, Matsuta T, Matsuo Y, Mimaki Y, In Tech (Rijeka, Croatia), A Compendium of Essays on Alternative Therapy (edited by Bhattacharya A) (Chapter 13, Functional Analysis of Natural Polyphenols and Saponins as Alternative Medicines), 2012, pp. 269-302.
- ② 波多野 力, シーエムシー出版, ポリフェノール:薬用植物および食品の機能性成分(波多野 力監修)(序章 ポリフェノールの化学構造の多様性および第9章 高分子ポリフェノールの構造とタンパク質分子との相互作用), 2012, pp. 1-11, 138-152.

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称:新規タンニン誘導体

発明者:波多野 力、竹内 靖雄、坂上 宏  
権利者:同上

種類:特許

番号:特許公開2012-153676(特許出願特願2011-016195)

出願年月日:平成23年1月28日

国内外の別:国内

[その他] 該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

波多野 力 (TSUTOMU HATANO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:50127578

(2)研究分担者

竹内 靖雄 (YASUO TAKEUCHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:00163387

坂上 宏 (HIROSHI SAKAGAMI)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号:50138484