

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590026

研究課題名(和文)天然資源由来のES・iPS細胞分化に作用する活性分子の探索研究

研究課題名(英文) Research on active compounds from natural resources affecting the differentiation of ES and iPS cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：天然資源から単離した新規化合物の構造を決定、数種の単離化合物に有用な生物活性(白血病由来細胞に対するアポトーシス誘導活性、ヒスタミン放出抑制活性、線維芽細胞に対する増殖抑制活性)を有することを明らかにしたが、ES・iPS細胞分化に有意に作用する活性分子は見つけられなかった。また、かつお節麹菌が生産する抗酸化物質に関しては、ベンズアルデヒド誘導体が抗酸化活性に大きく関与することが判明した。植物成分をリード化合物として合成したカルバゾールキノン誘導体は、NO産生を抑えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several new compounds were isolated from plant sources together with known compounds. The structures of the new compounds were elucidated by spectroscopic analyses. Several of the isolated compounds exhibited the following useful biological activities: severibuxine, murrayafoline-A, and murrayazoline significantly suppressed the growth of HL-60 leukemia cells by causing apoptosis; lansamide I, lansiamamide B, and SB-204900 significantly decreased histamine release from RBL-2H3 cells; and lapachol decreased the proliferation rate of hypertrophic scar fibroblasts. Aromatic compounds produced by Eurotium herbariorum from a karebushi were isolated; of these, several benzaldehyde derivatives exhibited high radical scavenging activity. Three carbazolequinone derivatives, synthesized using murrayaquinone-A as a lead compound, inhibited LPS/IFN-induced NO production. No seed compounds affecting the differentiation of ES and iPS cells have been found; however, future research is planned.

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 アポトーシス誘導活性 ヒスタミン放出抑制活性 がん細胞増殖抑制活性 抗酸化活性 NO産生抑制活性 ES・iPS細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

ES細胞およびヒトiPS細胞における体細胞リプログラミング技術の成功は再生医療を現実的のものに一步近付けたが、多能性幹細胞分化を正確にコントロールするには未だ多くの課題が残されている。最近の研究では、低分子化合物が幹細胞分化をコントロールできることが明らかにされ、特定の細胞分化を促進する化合物ライブラリーの構築および構造活性相関研究の重要性が高まってきている。最近になって、エストロゲンがマウスおよびヒトES細胞のドパミンニューロンへの分化に対して促進的に働いていることが明らかとなっており、このことが閉経後の女性が神経変性疾患に罹りやすいことと関係している可能性がある。これまでに、マメ科植物から単離した数種の化合物が、エストロゲン受容体(ER)に作用することを明らかにしており、これらの化合物が、多能性幹細胞のドパミンニューロン分化促進作用を有する可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、ES細胞およびヒトiPS細胞の分化コントロールに着目し、天然資源より単離した化合物群から、神経細胞分化(パーキンソン病やアルツハイマー病に代表される神経変性疾患に対する再生医療に必須の技術)を誘導する化合物を見出し、化合物ライブラリーの構築を目的とする。

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、新たなシーズ分子を見出す。

### 3. 研究の方法

新たな骨格を有する化合物の単離・構造決定を目的とした天然資源の成分検索と並行して、単離した天然有機化合物のエストロゲン活性を調べると共に、ES・iPS細胞分化への作用を調べる。

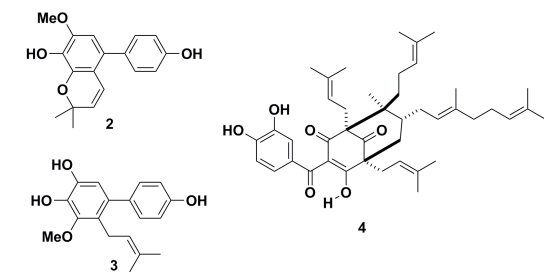
### 4. 研究成果

(1)ミカン科 *Severinia buxifolia* より単離した severibuxine のアポトーシス誘導活性  
ミカン科 *Severinia buxifolia*より単離した severibuxine (1) 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。

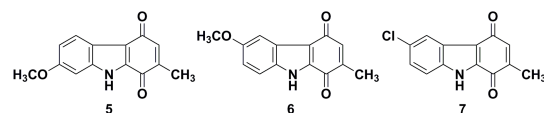
Severibuxine (1) で処理した細胞では、顕著な細胞死が認められ、その効果は処理時間に依存することを認めた。また、核染色による観察では核の断片を有するアポトーシス細胞の割合が時間依存的に増加した。さらに severibuxine (1) は caspase-9/caspase-3 経路を経てアポトーシスを誘導することを証明した。

(2) *Garcinia schomburgkiana* から単離した新規ビフェニル誘導体の構造と含有成分の細胞毒性



オトギリソウ科 *Garcinia schomburgkiana* から2種の新規ビフェニル誘導体(2, 3)を単離、各種スペクトルデータよりその構造を決定した。単離した化合物について、白血病細胞増殖抑制効果を検討したところ、ベンゾフェノン誘導体 oblongifolin C (4) に、全ての白血病細胞株において著しい増殖抑制効果が認められた。

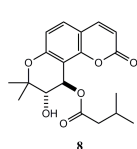
(3) 数種のカルバゾールキノン誘導体の合成とそれらの NO 産生抑制活性



iNOS を介する過剰な NO 産生や COX-2 を介する PGE<sub>2</sub> 産生を選択的に抑制する化合物の探索を目的として、植物資源より単離された murrayaquinone-A をリード化合物として合成したカルバゾールキノン誘導体の有用性について検討した。3種のカルバゾールキノン誘導体(5-7)は、LPS/IFN- 刺激にもとづく NO 産生および PGE<sub>2</sub> 産生を濃度依存的に抑制した。さらに、NO を産生する iNOS や PGE<sub>2</sub>

を産生する COX-2 の発現誘導も濃度依存的に抑制した。また、LPS/IFN- $\gamma$  処理時には、iNOS や COX-2 の発現誘導を引き起こす NF- $\kappa$ B の転写活性化が認められるが、カルバゾールキノン誘導体(5-7)を併用処理することで、LPS 誘導性の NF- $\kappa$ B の転写活性化が有意に抑制された。以上のことから、カルバゾールキノン誘導体(5-7)は、LPS/IFN- $\gamma$  刺激時に起こる NF- $\kappa$ B の転写活性化を抑制することで、iNOS や COX-2 の発現誘導を抑制し、ひいては NO や PGE2 などの炎症性メディエーターの産生を抑えることが示唆された。

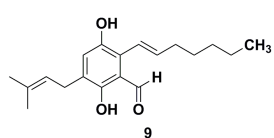
#### (4)西表にて採集した *Murraya paniculata* 葉部から単離した新規クマリンの構造



ミカン科 *Murraya paniculata* 葉部から、22種の既知クマリンとともに、新規クマリン(8)を単離、各種スペクトルデータよりその構造を決定した。

#### (5)かつお節麹菌 *Eurotium herbariorum* NU-2 が生産する芳香族化合物とその抗酸化作用

かつお節麹菌の *E. herbariorum* NU-2 が生産する芳香族化合物に着目し、その抗酸化性について比較検討した。かつお節麹菌 *E. herbariorum* NU-2 の抽出物からアントラキノン誘導体 6 種、ユーロチノン誘導体 2 種、インドール含有ジケトピペラジン誘導体 6 種、ベンズアルデヒド誘導体 3 種の計 17 種の芳香族化合物を単離、同定した。これらのうち、ベンズアルデヒド誘導体は、比較的高いラジカル捕捉活性を有していた。また、*E. herbariorum* NU-2 の抽出液は、他の糸状菌抽出液と比較して高いラジカル捕捉活性を示



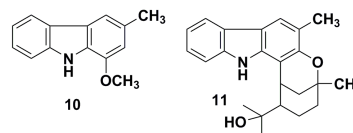
した。糸状菌抽出物の抗酸化活性とベンズアルデヒド誘導体

Tetrahydroauroglucin (9) の濃度には高い相関が示され、同物質が活性に大きく関与することが示された。

#### (6)カルバゾールアルカロイドのアポトーシス誘導活性

ミカン科 *Murraya euchrestifolia* から単離した13種のカルバゾールアルカロイドについて、ヒト前骨髄性白血病由来細胞株 HL60

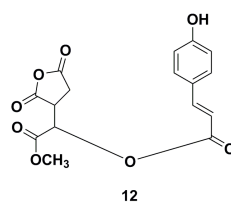
に対する成長阻害活性試験を実施した。



その結果、murrayafoline A (10) および murrayazolinine (11) 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。さらにこれらのアルカロイドは caspase-9/caspase-3 経路を経てアポトーシスを誘導することを証明した。

#### (7)新ケイヒ酸誘導体の単離と抗酸化活性

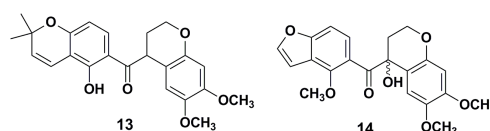
ミカン科 *Citrus meyeri* 果実から、新しい *trans*-4-ヒドロキシケイヒ酸誘導体(12)を単離、各種スペクトルデータからその構造



を決定した。この化合物は、分子内にコハク酸無水物の部分構造を有するケイヒ酸誘導体で、天然より単離されたのはこれが初めての例である。また、本化合物は、*trans*-4-ヒドロキシケイヒ酸よりも高い抗酸化活性を示した。

#### (8)新ロテノイド誘導体の単離と NO 産生抑制活性

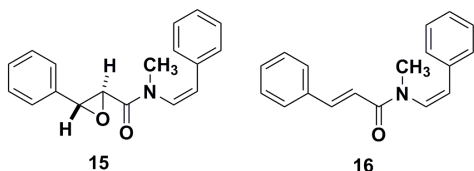
マメ科 *Derris trifoliata* から 2 種の新しいロテノイド誘導体 derrisfolin A (13) および B (14) を単離・構造決定、これらを含む 5 種のロテノイド誘導体について、NO 産生抑制活性試験を実施した。その結果、derrisfolin A (13) は、細胞生存率 90% 以上の条件下、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M の各濃度において NO 産生をそれぞれ 51.2 %、32.0 % 抑制することを見出した。したがって、この化合物は過剰な NO 産生を抑制することにより、抗炎症作用、さらにはがん予防作用を示すことが期待される。



(9)ミカン科 *Clausena lansium* より単離したシンナムアミドのヒスタミン放出抑制活性

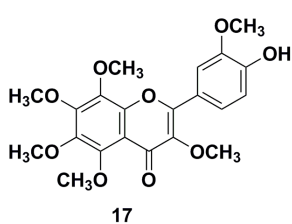
タイにて採集した *Clausena lansium* の乾燥樹皮について成分を検索し、6種のクマリンおよび4種のカルバゾールアルカロイドとともに、4種のシンナムアミドを単離した。単離した化合物については、各種スペクトルの解析より構造を決定した。

さらに、単離した天然有機化合物について、マスト細胞からのヒスタミン放出抑制試験を行った。4種のシンナムアミドの内、SB-204900 (15) および lansiumamide B (16) に、ヒスタミン放出抑制効果が認められた。Lansiumamide B (16) は、アレルギー性疾患治療剤であるトラニラストと同じ部分構造を有するが、実験に用いた濃度ではトラニラストがヒスタミン放出抑制効果を呈さないのに対し、Lansiumamide B (16) には抑制効果が認められたことが非常に興味深い結果であると考えている。これらの化合物の作用メカニズムについては、検討中である。



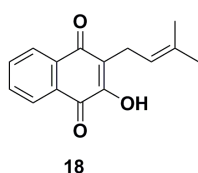
(10)ミカン科 *Citrus jabara* 果皮から単離したポリメトキシフラボンの構造

ミカン科 *Citrus jabara* 果皮から、10種の既知フラボン、5種の既知フラバノン、および1種の既知クマリンとともに、新規ポリメトキシフラボン(17)を単離、各種スペクトルデータよりその構造を決定した。



(11)肥厚性瘢痕由来線維芽細胞の細胞増殖、IL-6、PAI-1 に対する Lapchol の抑制効果

Lapchol (18) は肥厚性瘢痕由来線維芽細胞の増殖を抑制し、PAI-1 やコラーゲンの mRNA レベルを減少させた。さらに PAI-1 と IL-6 のタンパクレベルも低下させた。Lapchol (18) は、PAI-1 およびコ



ラーゲンの産生において転写の過程を抑制し、IL-6 は mRNA レベルの低下が見られなかったことから翻訳以降の過程を抑制すると考えられた。これらの結果から Lapchol (18) は肥厚性瘢痕の線維化形成を抑制する可能性を示した。

(12)ES・iPS 細胞分化に作用する活性分子に関する研究

連携研究者である小嶋らは、ゲニステインがマウスの胚性幹細胞において、分化を特異的に促進させることを明らかにしている。しかしながら、現時点で天然資源から単離した化合物群からは、ES・iPS 細胞分化に有意に作用する活性分子は見つけられていない。引き続き、活性評価を実施していく考えである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- (1) Naoko Teshima, Yoko Manabe, Tomomi Tada, Rei Arakawa, Shizue Ban, Fumi Okasyo, Motoharu Ju-ichi, Hiroshi Furukawa, Chihiro Ito : Coumarins from the Leaves of *Murraya paniculata* collected at Iriomote Island. *Shoyakugaku Zasshi* 査読有 (2014) 68: 25-26.
- (2) Yoshiaki Miyake, Chihiro Ito, Takuya Kimura, Ayaka Suzuki, Yoshio Nishida, Masataka Itoigawa : Isolation of aromatic compounds produced by *Eurotium herbariorum* NU-2 from karebushi, a Katsubushi, and their DPPH-radical scavenging activities. *Food Science and Technology Research* 査読有 (2014) 20(1): 139-146.
- (3) Tomiyasu Murata, Susumu Kohno, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Ayumi Sugiura, Kiyomi Hikita, Norio Kaneda : Inhibitory effect of carbazolequinone derivatives on lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 査読有 (2013) 65: 1204-1213.
- (4) Chihiro Ito, Takuya Matsui, Eri Noda, Nijisiri Ruangrunsi, Masataka Itoigawa : Biphenyl Derivatives from

- Garcinia schomburgkiana*, and the Cytotoxicity of the Isolated Compounds. *Nat. Prod. Commun.* 査読有(2013) 8(9) :1265-1267.
- (5) Chihiro Ito, Tomiyasu Murata, Midori Kato, Natsu Suzuki, Tian-Shung Wu, Norio Kaneda, Hiroshi Furukawa, Masataka Itoigawa : Severibuxine, Isolated from *Severinia buxifolia*, Induces Apoptosis in HL-60 Leukemia Cells. *Nat. Prod. Commun.* 査読有(2013) 8(6) : 775-777.
- (6) Takuya Matsui, Chihiro Ito, Hiroshi Furukawa, Tadashi Okada, Masataka Itoigawa : Lansiumamide B and SB-204900 isolated from *Clausena lansium* inhibit histamine and TNF- release from RBL-2H3 cells. *Inflamm. Res.* 査読有(2013) 62: 333-341.
- (7) Yoshiaki Miyake, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa : Flavonoid, Phenylpropanoid and Coumarins Characteristics in Lemons from the Bonin Islands (Kikuchi Lemons). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 査読有(2013) 60(1) : 38-42.
- (8) Chihiro Ito, Tomiyasu Murata, Hugh T.-W. Tan, Norio Kaneda, Hiroshi Furukawa, Masataka Itoigawa : Rotenoid Derivatives from *Derris trifoliata* with Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. *Nat. Prod. Commun.* 査読有(2012) 7(11) : 1479-1482.
- (9) Yoshiaki Miyake, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa : A novel *trans*-4-hydroxy-cinnamic acid derivative from Meyer lemon (*Citrus meyeri*). *Food Chem.* 査読有(2012) 135: 2235-2237.
- (10) Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Keisuke Nakao, Tomiyasu Murata, Norio Kaneda, Hiroshi Furukawa : Apoptosis of HL-60 leukemia cells induced by carbazole alkaloids isolated from *Murraya euchrestifolia*. *J. Nat. Med.* 査読有(2012) 66: 357-361.
- (11) Rie Matsubara, Hiromi Yamada, Motoharu Ju-ichi, Chihiro Ito, and Hiroshi Furukawa : Polymethoxyflavonoids from the Peel of *Citrus Jabara*. *Shoyakugaku Zasshi*. 査読有(2012) 66(1) : 23-25.
- (12) Takuya Matsui, Chihiro Ito, Makita Oda, Masataka Itoigawa, Kazuhisa Yokoo, Tadashi Okada, and Hiroshi Furukawa : Lapachol suppresses cell proliferation and secretion of interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 of fibroblasts derived from hypertrophic scars. *J. Pharm. Pharmacol.* 査読有(2011) 63: 960-966.
- (13) Eriko Ono, Hiromi Yamada, Katsumi Goto, Junko Tsukioka, Chihiro Ito, Hiroshi Furukawa, and Motoharu Ju-ichi : Secondary Metabolites in the Peel of *Citrus tachibana*. *Shoyakugaku Zasshi*. 査読有(2011) 65(2) : 139-140.
- (14) 三宅義明、井藤千裕、糸魚川政孝 : マイヤールモンに含まれるフラボノイドおよびクマリンの特徴. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 査読有(2011) 58(4) : 178-181.
- [学会発表](計 16 件)
- (1) 井藤千裕、野田恵理、松井卓哉、Nijsiri Ruangrunsi、糸魚川政孝 : オトギリソウ科 *Garcinia schomburgkiana* より単離した新規ピフェニル誘導体の構造および含有成分の細胞毒性 : 日本薬学会第134年会 平成26年3月29日 (熊本)
- (2) 松井卓哉、塩野裕之、井藤千裕、糸魚川政孝、増淵 悟 : ミカン科植物ワンピから精製した lansiumamide B と SB-204900 のマスト細胞株 RBL-2H3 細胞に対する効果 : 第91回日本生理学会 平成26年3月17日 (鹿児島)
- (3) 鈴木彩香、三宅義明、糸魚川政孝、井藤千裕、西田淑男 : かつお節菌が生産する物質の抗酸化作用について : 平成25年度日本食品科学工学会中部支部大会 平成25年11月16日 (三重)
- (4) Takuya Matsui, Hiroyuki Shiono, Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Tadashi Okada : Natsudaicin isolated from *Citrus* plants inhibits activation of mast cells in the late phase of immediate allergy : 37th Congress of

- the International Union of Physiological Sciences 平成25年7月22日(Birmingham, United Kingdom)
- (5) 三宅義明、平野義晃、井藤千裕、糸魚川政孝：国産香酸カンキツ果実に含まれるフェノール性物質の特徴：第67回日本栄養・食糧学会大会 平成25年5月26日（名古屋）
- (6) 野田実希、村田富保、井藤千裕、糸魚川政孝、足田清美、金田典雄：LPS/interferon- $\gamma$ 刺激したRAW264.7細胞における炎症性メディエーター産生に対する Derrisfolin-A の効果：日本薬学会第133年会 平成25年3月28日（横浜）
- (7) 井藤千裕、間宮 要、十一元晴、呉 天賞、松井卓哉、糸魚川政孝：ミカン科 *Glycosmis citrifolia* より単離した新規ホムアクリドン-フラバノン二量体の構造および生物活性：日本薬学会第133年会 平成25年3月28日（横浜）
- (8) 有田卓矢、岡本誉士典、岩田綾香、安井彩、山中彩歌、吉田将之、植田康次、井藤千裕、小嶋仲夫：植物由来ゲニステイン誘導体のプレニル基水酸化によるエストロゲン受容体転写調節の正負変動：日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2012 平成24年11月18日（岐阜）
- (9) 有田卓矢、岡本誉士典、岩田綾香、安井彩、山中彩歌、吉田将之、植田康次、井藤千裕、小嶋仲夫：植物由来プレニル化ゲニステインの構造変化によるエストロゲン受容体転写調節の正負変動：フォーラム2012：衛生薬学・環境トキシコロジー 平成24年10月25日（名古屋）
- (10) 井藤千裕、細井麻里、糸魚川政孝、呉 天賞：ミカン科 *Acronychia pedunculata* の成分研究：日本生薬学会第59回年会 平成24年9月17日（千葉）
- (11) 三宅義明、井藤千裕、糸魚川政孝、近藤 健：小笠原・島レモン（菊池レモン）に含まれるフラボノイド、クマリン、フェニルプロパノイドの特徴：日本食品科学工学会第59回大会 平成24年8月30日（仙台）
- (12) 岡本誉士典、岩田綾香、安井 彩、山中彩歌、植田康次、井藤千裕、小嶋仲夫：プレニル化イソフラボン類によるエストロゲン様活性とその構造的特徴：日本食品化学学会第18回総会・学術大会 平成24年6月22日（函館）
- (13) 井藤千裕、荒木智香子、徳田春邦、鈴木信孝、糸魚川政孝：ミカン科 *Toddalia asiatica* より単離した新クマリンの構造および含有成分の発がんプロモーション抑制活性：日本薬学会第132年会 平成24年3月30日（札幌）
- (14) 井藤千裕、加藤 緑、村田富保、金田典雄、糸魚川政孝、山田裕美、十一元晴：ミカン科 *Citrus* 属植物より単離したアクリドン二量体のアポトーシス誘導活性：日本生薬学会第58回年会 平成23年9月24日（東京）
- (15) 三宅義明、井藤千裕、糸魚川政孝：マイヤーレモンに含まれる機能性成分の特徴：日本食品科学工学会第58回大会 平成23年9月10日（仙台）
- (16) 岡本誉士典、森 大貴、木村優里、榊原布尚、岩田綾香、井藤千裕、古川 宏、小嶋仲夫：エストロゲン受容体転写調節作用を有する *Garcinia* 属植物由来化合物の構造的特徴：第56回日本薬学会東海支部大会 平成23年7月9日（名古屋）

## 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

小嶋 仲夫 (KOJIMA NAKAO)  
名城大学・薬学部・教授  
研究者番号：80333178

岡本 誉士典 (OKAMOTO YOSHINORI)  
名城大学・薬学部・助教  
研究者番号：50512323