

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790025

研究課題名(和文) プロテインチロシンホスファターゼ1B阻害作用を指標とする天然薬物シーズの探索研究

研究課題名(英文) Discovery of novel natural PTP1B inhibitors as antidiabetes drug seeds

研究代表者

李 巍(LI, Wei)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：90328633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインチロシンホスファターゼ1B(PTP1B)はインスリンシグナル伝達経路の負の制御因子であり、その阻害剤は新規糖尿病治療薬として期待される。本研究は薬用植物抽出物および天然化合物ライブラリーから新規PTP1B阻害剤を見出した。そのうち、生薬甘草由来のフラボノイドglycybenzofuranおよび生薬苦木由来のアルカロイドpicrasidine LはPTP1Bの競合型阻害剤であり、優れた酵素阻害選択性を示した。更に、glycybenzofuranとpicrasidine Lは細胞内インスリンシグナル伝達を促進する作用を示し、新しい糖尿病治療薬創製のリード化合物として期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a non-transmembrane protein tyrosine phosphatase and major negative regulator in insulin signaling cascades, and much attention has been paid to PTP1B inhibitors as potential therapies for diabetes. Screening of plant extracts and natural compounds libraries led to the discovery of novel PTP1B inhibitors originated from natural sources, exemplified by glycybenzofuran from *Glycyrrhiza uralensis*, and picrasidine L from *Picrasma quassioides*, which were demonstrated to be competitive PTP1B inhibitors by kinetic analyses, exhibited excellent inhibitory selectivities against homologous protein tyrosine phosphatases. Glycybenzofuran and picrasidine L also exhibited cellular activity in the insulin-signaling pathway by increasing the insulin-stimulated Akt phosphorylation level in human hepatocellular liver carcinoma HepG2 cells, suggesting their potential for new anti-insulin-resistant drug developments.

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：プロテインチロシンホスファターゼ1B阻害剤 糖尿病 天然物 創薬

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は著しく増加しており、平成 21 年 10 月に国際糖尿病連合は全世界の糖尿病患者数は 2.85 億人であると発表した。糖尿病はインスリンの供給不足及び抵抗性の亢進の低下を原因とした慢性的な高血糖を呈する疾患であり、発症原因はまだ完全には解明されていない。糖尿病治療薬として、スルホニルウレア系薬、ピグアナイド系薬、 α -グルコシダーゼ阻害薬およびインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン系薬が臨床に用いられているが、副作用と毒性、ノンレスポンスの存在等の課題が残され、新しい作用機序の糖尿病治療薬の創製が社会から求められている。

インスリンの標的器官である肝臓、骨格筋、および脂肪細胞に存在するプロテインチロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) は活性化インスリン受容体又はインスリン受容体基質の脱リン酸化反応を触媒し、インスリンシグナル伝達経路の負の制御因子である。PTP1B 阻害によるインスリン抵抗性の改善作用は PTP1B ノックアウトマウスにおいて証明され、PTP1B 阻害剤は新規糖尿病治療薬として大きく期待されている。

PTP1B 阻害剤の探索研究は PTP1B の基質であるリン酸化チロシンを先導化合物とした化学合成研究が先行に行われ、強力な PTP1B 阻害活性物質が作製されたものの、水溶性、阻害活性の選択性などの問題点を抱えており、実用化に至る化合物はまだ見出されていない。

2. 研究の目的

本研究は伝統医学に用いられている薬用植物から PTP1B 阻害作用を有する新規天然化合物の探索を行い、さらにこれら化合物の構造活性相関並びに阻害作用機序を解明することにより、新規糖尿病治療薬シーズの発見を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 200 種の生薬および 147 種の臨床用漢方製剤より抽出物ライブラリーを構築し、これら抽出物の PTP1B 阻害活性を評価した。

(2) PTP1B 阻害活性を示した生薬について、各種カラムクロマトグラフィーを用いて Bioassay - Directed Fractionation により活性成分の抽出、単離を行い、さらに NMR、MS など各種スペクトル解析により活性化化合物の構造決定を行った。

(3) PTP1B 阻害活性化合物の構造類似化合物および化学誘導体を用いて、PTP1B 阻害活性を測定し、構造活性相関の解析を行った。

(4) Lineweaver-Burk プロット法を用いて、酵素反応速度論における各活性成分の PTP1B 阻害様式を解析した。

(5) PTP1B の活性ドメインと高い相同性を有する TCPTP や VHR など各種 PTP に対する活性成分の阻害活性の選択性の評価を行った。

(6) 細胞レベルの活性評価において、ヒト肝癌由来細胞 (HepG2 細胞) におけるセリン/

スレオニンキナーゼ Akt のリン酸化を指標として、活性成分の細胞内インスリン伝達系に対する増強作用の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生薬ライブラリーを用いて PTP1B 阻害活性をスクリーニングした結果、中国伝統薬用植物血満草 (*Sambucus adnata*) のメタノール抽出物は優れた PTP1B 阻害活性を示した。この抽出物について、詳細な化学成分研究を行い、新規トリテルペン化合物 1 種を含む計 13 種の化合物を単離し、各種スペクトル解析により構造解析を行った。新規化合物の構造は 1 α -3 β -dihydroxy-urs-12-en-11-one-3-yl palmitate と決定した。単離した化合物のうち、2 種のトリテルペン化合物 ursolic acid と oleanolic acid、および 1 種のネオリクナン化合物 boehmenan は最も強い PTP1B 阻害活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 4.1、14.4 および 43.5 μ M であった。更に、酵素阻害速度論解析の結果、boehmenan は PTP1B の競合型阻害剤であることを明らかにした。Boehmenan はネオリクナン類 PTP1B 阻害剤として初めての報告例である。

(2) 優れた PTP1B 阻害活性を示した生薬甘草エキス成分研究により、2 種の甘草フラボノイド化合物 glycybenzofuran と glisoflavone を新規 PTP1B 阻害剤として見出し、IC₅₀ 値はそれぞれ 25.5 and 27.9 μ M であった。構造活性相関解析の結果、それら化学構造中のプレニル基およびオルソ水酸基の存在は活性発現に重要であることを示唆した。更に酵素阻害速度論解析の結果、glycybenzofuran は競合型、glisoflavone は混合型 PTP1B 阻害剤であることを明らかにした。これら結果に基づいて、更に甘草および甘草組織培養物由来の 42 種のフラボノイドから構成された化合物ライブラリーを用いて PTP1B 阻害活性を評価した。その結果、新たに 4 種のプレニルフラボノイド licoagrone、licoagroardin、licoagroaurone および isobavachalcone を新規 PTP1B 阻害剤として見出し、IC₅₀ 値はそれぞれ 6.0、11.5、23.9 および 27.3 μ M であった。Licoagroaurone はオーロン型フラボノイド由来の PTP1B 阻害剤として初めての報告例である。酵素阻害速度論解析においては licoagrone は非競合型、licoagroaurone は競合型、licoagroardin および isobavachalcone は混合型 PTP1B 阻害剤であることを明らかにした。酵素阻害の選択性においては、3 種の化合物 glycybenzofuran、licoagroardin および licoagroaurone は優れた酵素阻害選択性を示した。更に、pAKT の発現を指標とする細胞内インスリンシグナル伝達経路に対する影響を調べた結果、glycybenzofuran はインスリン刺激と類似した活性プロファイリングが認められた。

(3) 生薬ライブラリーを用いて PTP1B 阻害活性をスクリーニングした結果、バラ科植物 *Sorbus pohuashanensis* 果実の 70% エタノー

ル抽出物が顕著な PTP1B 阻害活性を示した。このエキスから単離した7種のトリテルペン化合物 3beta-acetoxy-urs-12-ene-28-oic acid, pomolic acid-3beta-acetate, pomolic acid, ursolaldehyde, euscaphic acid, 3beta-acetoxy-urs-11-en-28,13-olide および betulinic acid を新規 PTP1B 阻害剤として見出し、 IC_{50} 値は 3.5 ~ 54.8 μM に示した。そのうち、3beta-acetoxy-urs-12-ene-28-oic acid, pomolic acid-3beta-acetate および betulinic acid は最も強い PTP1B 阻害活性を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 4.8、6.1 および 3.5 μM であった。Lineweaver-Burk プロットを用いてこれら化合物の阻害様式を解析した結果、pomolic acid-3beta-acetate, pomolic acid および betulinic acid は非競合型、3beta-acetoxy-urs-12-ene-28-oic acid および 3beta-acetoxy-urs-11-en-28,13-olide は混合型 PTP1B 阻害剤であることを明らかにした。

(4) 天然化合物ライブラリーの PTP1B 阻害活性をスクリーニングしたところ、生薬苦参から単離された5種のラバンデュリルフラボノイド kuraridin, norkurarinone, kurarinone, 2'-methoxykurarinone および kusheanol T を新たな天然由来 PTP1B 阻害剤として見出した。これら化合物は IC_{50} 値が 5.3 ~ 49.6 μM に示す阻害活性が認められ、特にフラバノン化合物 2'-methoxykurarinone は最も強い阻害活性を示し、その IC_{50} 値が 5.26 μM であった。構造活性相関においては、その構造中の8位ラバンデュリル基および2'位メトキシ基が PTP1B 阻害活性の発現に重要であることが示唆された。Kuraridin, norkurarinone および 2'-methoxykurarinone の酵素阻害様式は Lineweaver-Burk プロットを用いて解析した結果、これら化合物はいずれも PTP1B の非競合的阻害剤であることを明らかにした。更に、各種 PTP 酵素に対する阻害選択性を評価した結果、これら化合物は PTP1B を完全阻害する濃度において、TCPTP、VHR、SHP-1 及び SHP-2 に対して弱い阻害活性しか認められず、優れた阻害活性選択性が認められた。細胞レベルの活性評価において、kuraridin、norkurarinone および 2'-methoxykurarinone は迅速で一時的な Akt のリン酸化を促進し、インスリン刺激と類似した活性プロファイリングが認められた。その中、2'-Methoxykurarinone は特に強い細胞内インスリン伝達系に対する増強作用を示した。

(5) ニガキ科植物由来の beta-carboline と canthinone 型アルカロイド及びこれらの化学誘導体からなる 80 種の化合物ライブラリーの PTP1B 阻害活性を評価した結果、6 種の canthinone アルカロイド picrasidine L、3,4-dimethyl-canthin-5,6-dione、4-ethyl-3-methyl-canthin-5,6-dione、5-methoxycanthin-6-one、5-acethoxycanthin-6-one 及び eurycomine E を新規 PTP1B 阻害剤として

見出した。これら化合物について、Lineweaver-Burk プロットを用いて阻害様式を解析した結果、picrasidine L は競合型、そのほかは非競合型 PTP1B 阻害剤であることを明らかにした。更に、PTP として PTP1B と最も相溶性が高い T 細胞 PTP を初め、VHR、SHP-1 及び SHP-2 など 4 種の PTP に対する阻害活性を測定した。その結果、canthin 5,6-one 型アルカロイドである picrasidine L は PTP1B を完全阻害する濃度において、4 種の PTP に対して 30%以下の阻害活性しか認められず、優れた PTP1B に対する阻害活性の選択性が認められた。Picrasidine L はヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞における Akt のリン酸化を指標として、活性成分の細胞内インスリン伝達経路に対する増強作用を調べた結果、picrasidine L は迅速で一時的なリン酸化促進作用が認められ、インスリン刺激と類似した活性プロファイリングが認められた。(6) 現在日本において保険適応上利用出来る全ての 147 種の内服用医療用漢方製剤の PTP1B 阻害活性を評価した。各漢方製剤の添付文書に定めた1日投与量を 1 Unit (U) とし、1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ の最終濃度において147種の医療用漢方薬の PTP1B 阻害活性のスクリーニングを行った結果、147 種の漢方薬の内に 22 処方が PTP1B 阻害活性を完全阻害した。更に、濃度 - 阻害活性依存性を検討し直線回帰式から IC_{50} を求めた。その中、大黃甘草湯、麻子仁丸、桃核承気湯、桂麻各半湯、調胃承気湯の順に高い阻害活性を示した。大黃甘草湯、麻子仁丸 および 桃核承気湯 について Lineweaver-Burk plot による PTP1B 阻害様式を検討したところ、これら漢方製剤は共に混合型の阻害様式を示したが、大黃甘草湯と桃核承気湯は非拮抗阻害型、そして麻子仁丸は拮抗阻害型に近い阻害様式を示した。PTPs の触媒ドメインは高い構造類似性を持つため、大黃甘草湯、麻子仁丸そして桃核承気湯の阻害選択性を4種の類似 PTPs (TCPTP、VHR、SHP-1、SHP-2) を用いて評価した。これらサンプルは PTP1B を完全に阻害した濃度にて他の PTPs も部分的に阻害し 73.6-82.4% (VHR)、57.0-62.4% (TC-PTP)、10.3-32.7% (SHP-1)、9.0-9.2% (SHP-2) の阻害率を示した。酵素阻害試験の結果に基づいて、大黃甘草湯、麻子仁丸、桃核承気湯、桂麻各半湯、調胃承気湯について、ヒト肝細胞癌 HepG2 における Akt のリン酸化作用を指標として各漢方製剤のインスリン-シグナル伝達経路に対する細胞活性を評価した。インスリンを細胞に刺激後、ウェスタンブロットにより 5 分後の pAkt レベルを解析したところ、麻子仁丸の投与により最も細胞活性が示された。漢方薬は複数の生薬の混合により作用を発揮する為、高 PTP1B 阻害活性の構成生薬の寄与度は統計学的手法の Partial Least Squares Regression (PLS) 法を用いた。得られた回帰モデルより、構成生薬の大黃がこれら漢方薬の PTP1B 阻害活性に最も高い寄与度を示した。この結果に基づ

き構成生薬のPTP1B阻害活性を測定したところ、大黃(IC₅₀=0.7μg/mL)は強いPTP1B阻害活性を示し、統計学の結果を支持した。

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5件)

Tatsunori Sasaki, Wei Li, Haruna Morimura, Songpei Li, Qin Li, Yoshihisa Asada, Kazuo Koike: Chemical constituents from *Sambucus adnata* and their protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 59, 1396-1399 (2011). 査読有.

DOI: 10.1248/cpb.59.1396

Wei Li, Songpei Li, Koji Higai, Tatsunori Sasaki, Yoshihisa Asada, Shigeru Ohshima, Kazuo Koike: Evaluation of licorice flavonoids as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 5836-5839 (2013). 査読有.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.08.102

Dongxia Li, Wei Li, Koji Higai, Kazuo Koike: Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities of ursane- and lupane-type triterpenes from *Sorbus pohuashanensis*. *Journal of Natural Medicines*, 68 (2), 427-431 (2014). 査読有.

DOI: 10.1007/s11418-013-0804-x

Toshihisa Onoda, Wei Li, Koji Higai, Kazuo Koike: Evaluation of 147 Kampo Prescriptions as novel protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 64 (2014). 査読有.

DOI: 10.1186/1472-6882-14-64

Tatsunori Sasaki, Wei Li, Koji Higai, Tran Hong Quang, Young Ho Kim, Kazuo Koike: Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of lavandulyl flavonoids from roots of *Sophora flavescens*. *Planta Medica*, 80, 557-560 (2014). 査読有.

DOI: 10.1055/s-0034-1368400

[学会発表](計8件)

Wei Li: Study on Natural Products for Treatment of Lifestyle Related Diseases. International Conference of Translation Herbal Medicine 2011. Hualien, Taiwan. 2011/05/17

Wei Li, Songpei Li, Koji Higai, Kazuo Koike: Licorice flavonoids as protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors with cellular activity.

The 6th CCTNM-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy. Shenyang, china. 2011/10/21

田井雅子, 李松沛, 寺尾美沙也, 李巍, 小池一男, 王英華: 中国原産薬用植物のPTP1B阻害活性について. 第55回日本薬学会関東支部大会. 船橋. 2011/10/08

森村春菜, 佐々木辰慶, 李巍, 李松沛, 小池一男: *Sambucus adnata* の化学成分研究及びPTP1B阻害活性について. 第55回日本薬学会関東支部大会. 船橋. 2011/10/08

李松沛, 李巍, 小池一男: 覆盆子のPTP1B阻害活性成分に関する研究: 日本薬学会第132年会. 札幌. 2012/03/31

佐々木辰憲, 李巍, 桧貝孝慈, 小池一男, Tran Hong Quang, Young Ho Kim: 苦参由来フラボノイドのPTP1B阻害活性について. 日本生薬学会第60回年会. 北海道. 2013/09/08

佐々木辰憲, 李巍, 桧貝孝慈, 小池一男: ニガキ科アルカロイドのプロテインチロシンホスファターゼ1B阻害活性. 日本薬学会第134年会. 熊本. 2014/03/28

小野田稔久, 李巍, 真坂互, 小池一男: 新しいプロテインチロシンホスファターゼ1B(PTP1B)阻害薬としての147医療用漢方製剤の評価. 日本薬学会第134年会. 熊本. 2014/03/30

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他] ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李巍 (LI, Wei)
東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：9 0 3 2 8 6 3 3

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：