

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870985

研究課題名(和文) 熱帯産植物資源からの抗リーシュマニア活性物質の探索及び作用メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Leishmanicidal constituents from tropical plants and biochemical mechanism of the activity

研究代表者

安元 加奈未 (Mori-Yasumoto, Kanami)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：70412393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、熱帯植物から抗リーシュマニア活性物質を探索し、活性化化合物の薬理活性機構解明の一助となるべく新たなスクリーニング系開発を目的として研究を行うものである。一次スクリーニングにて活性の見られた植物エキスの中から、パパイヤ科、クマツヅラ科、およびショウガ科植物の各エキスより活性化化合物の単離構造決定を実施した。これらの *Leishmania* 原虫に対する抗リーシュマニア活性と、宿主細胞モデルとして RAW264.7 細胞に対する影響を検討した。次に、原虫ミトコンドリア系呼吸鎖酵素群に対する阻害活性を検討する為、ルシフェラーゼ発光による原虫内 ATP の定量試験を行い、スクリーニング系を構築した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the leishmanicidal constituents from tropical plants and attempted to build a new screening system to elucidate the biochemical mechanism of the leishmanicidal activity. Several extracts from the plants belonging to Caricaceae, Verbenaceae, and Zingiberaceae, were found to inhibit the activity in the first screening. Twenty-eight compounds were isolated, and their activity as well as cytotoxicity against RAW 264.7 was examined. Additionally, the active compounds were subjected to an ATP-bioluminescence assay for measuring intracellular ATP level of promastigotes.

研究分野：天然物化学，生薬学，構造解析学

キーワード：リーシュマニア症 熱帯植物 ミャンマー 構造決定 抗リーシュマニア活性

1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア症は、WHO が世界六大熱帯病に指定する、重篤な昆虫媒介性原虫症である。病態は皮膚型・粘膜皮膚型・内蔵型に分類され、感染者数はマラリア・トリパノソーマに並ぶほどである。現在の第一選択薬はアンチモン製剤であるが副作用が強く、治療は高価で近年耐性原虫も報告されている。最近認可の下りた内臓型治療薬ミルテホシンも妊娠中の患者には適応できないなどの問題がある。すなわち、明確な特効薬が未だになく、新薬・ワクチン開発の遅れから『顧みられない』感染症と言われている。このような背景のもと、我々は現在まで主に熱帯植物から昆虫寄生体原虫を用いて、抗リーシュマニア活性物質の探索に取り組んできた。その研究過程において、生薬である紫根(ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* の根)の成分である shikonin 類縁体に強力な抗リーシュマニア原虫活性を見出した()。この結果から、漢方薬「紫雲膏」を用いてペルーでパイロット臨床試験を行い、有効性が認められた()。現在の第一選択薬であるアンチモン製剤は非常に高価で、安全性にも問題がある。一方、紫雲膏の原材料はアジア産の生薬で供給量に限界がある。現地の人に安価で有効な治療薬を提供するには、患者の多い熱帯地方の薬用植物から有効な植物を見出すことが第一目的である。最近の研究成果では、ミャンマー産植物 *Diospyros burmanica* より3種の抗リーシュマニア活性物質(burmanin A-C)を単離構造決定し、報告した()。これらは新規ビスナフトキノン骨格を有しており、原虫および宿主細胞に対する選択性(IC₅₀ 比)が453 から 147 とこれまでに類を見ないほど非常に高く、今後リード化合物として十分に期待される結果が得られている。申請者がこれまで単離してきた強力な活性を有する化合物の多くは、キノン系化合物群であり、これらは宿主モデル細胞に対する影響も非常に低く医薬シーズとしての可能性が期待されている。また、キノン系化合物は、多くの寄生虫の特徴でありリーシュマニア原虫においても重要な ATP 産生の供給源である嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖(PEPCK-コハク酸回路)を阻害することが知られている。このような背景から、原虫および原虫ミトコンドリア系呼吸鎖酵素群に対する阻害活性試験の検討を着想するに至った。

<引用文献>

PCT 国際出願 PCT/JP2005/13268 国際公開番号 WO2006/011394 A1
 淵野裕之ら、薬用植物における抗リーシュマニア活性化合物の探索研究、第52回天然有機化合物討論会講演要旨集、2010
 Mori-Yasumoto, K., et al., Leishmanicidal activities and cytotoxicities of bisnaphthoquinone analogues and

naphthol derivatives from Burman *Diospyros burmanica*, Bioorg. Med. Chem., 20, 2012, 5215-5219

2. 研究の目的

熱帯に多いリーシュマニア症は、寄生虫の一種であるリーシュマニア原虫が引き起こす病気で、WHO により制圧すべき病気の1つとされているが特効薬は未だ存在しない。地球温暖化やグローバル化により、熱帯病の拡大も懸念されており、治療薬開発が望まれている。これまで我々は、患者の多い地域の植物資源から医薬品シーズの探索研究を行い、リーシュマニア原虫を選択的に阻害する化合物を得ている。本研究では、新たに熱帯域で入手した有望な薬用植物からさらなる抗リーシュマニア活性物質を探索するとともに、これまでに得られている化合物の薬理活性機構の解明と新たなスクリーニング系開発を目的として以下の3つの項目について研究を行う。

- (1) 熱帯産薬用植物エキスからの抗リーシュマニア活性化合物の探索
- (2) リーシュマニア原虫のミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害試験法の確立
- (3) 抗リーシュマニア活性とリーシュマニア原虫呼吸鎖阻害試験との関係評価

3. 研究の方法

- (1) 熱帯産薬用植物エキスからの抗リーシュマニア活性化合物の探索
 入手した熱帯産薬用植物エキスを用いて一次スクリーニングにより候補植物エキスの選定を行った。リーシュマニア原虫は、宿主体内にてマクロファージ内に寄生する形態(アマスチゴート体)と、媒介昆虫体内に寄生する形態(プロマスチゴート)の二形態を取るが、取り扱いの容易さと培養の安定性を考慮し、一次スクリーニングにはプロマスチゴートを用いた改良 MTT (WST-1) アッセイを行った。選定されたエキスについて、バイオアッセイガイドによる成分探索を行い、化合物の単離を行った。分離は常法に従い、有機溶媒/水系にて液液分配後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、オクタデシル化シリカゲルクロマトグラフィー、中圧カラムクロマトグラフィー、HPLC 分析・分取を用いて分画した。活性成分は単離後、IR, UV, CD, NMR, LC-QTOFMS および X 線結晶構造解析などの手法により構造解析を実施した。顕著な活性が見られた化合物については、宿主細胞への影響を検討するため マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 について XTT 試験を行い、検定サンプルの細胞傷害性を調べた。

(2) リーシュマニア原虫のミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害試験法の確立

抗リーシュマニア活性を有する化合物の原虫ミトコンドリア系呼吸鎖酵素群に対する阻害の有無を検討するため、原虫内 ATP の定量試験を検討した。これは、リーシュマニア原虫が嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖系 (PEPCK-コハク酸回路) により ATP を獲得し、生命を維持していることに起因する。細胞内 ATP はルシフェラーゼ発光機構を利用し化学発光強度の測定を行う方法が一般的である。この方法を原虫に応用した。最適な試薬と原虫数を検討し、リーシュマニア原虫ミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害試験法を確立した。

(3) 抗リーシュマニア活性とリーシュマニア原虫呼吸鎖阻害試験との関係評価

(1)で抗リーシュマニア活性を示したエキスや化合物について(2)で確立したリーシュマニア原虫ミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害試験法検討を行った。

4. 研究成果

(1) 熱帯産薬用植物エキスからの抗リーシュマニア活性化合物の探索

ミャンマー産クマツツラ科植物の葉部メタノールエキスより新規ジテルペン2種を含む16種の化合物を単離構造決定した。これらの *Leishmania major* および RAW264.7 に対する影響を検討した。その結果、新規ジテルペン2種および 5-hydroxy-7,4-dimethoxyflavone などのフラボノイド3種に抗リーシュマニア活性を見出した。これらは RAW264.7 に対して影響を及ぼさないことを明らかにした。ペルー産パイヤ科薬用植物の樹皮メタノールエキスより5種の化合物を単離構造決定した。その結果、ペペリジンアルカロイド1種と直鎖飽和脂肪酸に抗リーシュマニア活性を見出した。本サンプルは現在も活性成分の探索を行っている。ミャンマー産ショウガ科薬用植物よりケイヒ酸エステル類縁体を含む7種の化合物を単離構造決定し、抗リーシュマニア活性を評価した。本サンプルは現在も活性成分の探索を行っている。新たに入手したミャンマー産薬用植物17種について、温浸メタノール抽出エキスおよび水抽出エキスを作成し、一次スクリーニングを行った。その結果、11種のエキスに強い抗リーシュマニア活性を見出した (MIC 3.1-25 µg/mL)。

(2) リーシュマニア原虫のミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害試験法の確立

リーシュマニア原虫に対するミトコンドリア系呼吸鎖酵素群阻害を検討する方法のひとつとしてリーシュマニア原虫内

ATP の定量を行うこととし、条件検討を行った。文献調査の結果、リーシュマニアに関しては遺伝子組み替えされた原虫を用いて ATP を定量している論文が多く見られ、通常の前虫を用いている論文を用いて予備実験を行ったが定量する試薬が異なると再現性が得られないことが明らかになった。試薬により培地中に含まれる血清や pH 指示薬、細胞溶解などが影響を受けることが示唆された。そこで、3メーカーの ATP 定量キットを用いて、比較検討を行った。選定されたキットを用いて、最適原虫数と発光強度の調整を行い、アッセイ系を構築した。

(3) 抗リーシュマニア活性とリーシュマニア原虫呼吸鎖阻害試験との関係評価

(2)で構築した原虫用 ATP 定量アッセイを用いて、通常ポジティブコントロールに用いているアムホテリシン B と、すでに活性が確認されている *Diospyros burmanica* エキス、ミャンマー産薬用植物メタノールエキスの計3サンプルについて、経時測定 (1時間後から48時間後、6点観測)を行った。その結果、活性サンプルが原虫の ATP 産生にどの時点で影響を与えるのか知見を得ることができた。

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4件)

Morikawa, M., Kino, K., Asada, E., Katagiri, K., Mori-Yasumoto, K., Suzuki, M., Kobayashi, T., Miyazawa, H. N'-[2-(7,8-Dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzof[*g*]pteridin-10(2H)-yl)ethylidene]-4-nitrobenzohydrazide. *Molbank*, 査読有, 2014, M836. doi: 10.3390/M836.

Yasumoto, K., Yasumoto-Hirose, M., Yasumoto, J., Murata, R., Sato, S., Baba, M., Mori-Yasumoto, K., Jimbo, M., Oshima, Y., Kusumi, T., Watabe, S. Biogenic polyamines capture CO₂ and accelerate extracellular bacterial CaCO₃ formation. *Marine Biotechnology*, 査読有, 16(4), 2014, 465-474.

Fuchino, H., Kiuchi, F., Yamanaka, A., Obu, A., Wada, H., Mori-Yasumoto, K., Kawahara, N., Flores, D., Palacios, O., Sekita, S., Satake, M. New leishmanicidal stilbenes from a Peruvian folk medicine, *Lonchocarpus*, *Chem. Pharm. Bull.* 査読有, 61(9), 2013, 979-982.

Ishihara, Y., Itoh, K., Mitsuda, Y., Shimada, T., Kubota, T., Kato, C., Song, S., Kobayashi, Y., Mori-Yasumoto, K., Sekita, S., Kirino, Y.,

Yamazaki T., Shimamoto, N. Involvement of brain oxidation in the cognitive impairment in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Non-invasive measurement of the brain redox state by magnetic resonance imaging. *Free Radical Research*, 査読有, 47(9), 2013, 731-739.

〔学会発表〕(計 12 件)

安元(森)加奈未, 淵野裕之, Diana Flores, 佐竹元吉, 代田修, 関田節子. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その 27) - ペルー産植物 *Mito Carica candicans* Gray の成分について -, 日本薬学会第 135 回年会, 2015.03.29, 神戸学院大 他 (兵庫県神戸市).

安元(森)加奈未; 第 4 回薬用資源の現地調査, 第 14 回ミャンマーフォーラム, 2015.2.18, お茶の水女子大学 (東京都文京区).

Kaoru Umehara, Tomoko Abe, Kazuya Hidari, Takashi Suzuki, Kanami Mori-Yasumoto, Setsuko Sekita, Orawan Monthakantirat, Wanchai De-Eknankul, Hiroshi Noguchi. Anti Dengue and Leishmanicidal Activities of Flavonoids from Thai Medicinal Plant, The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference (ICP 2014), 2014.9.2, Nagoya University (Nagoya, Japan).

安元 剛, 馬場愛美, 金子結依, 神保充, 渡部終五, 安元(森)加奈未, 廣瀬(安元)美奈, 楠見武徳, NMR を用いた各種 Polyamine の CO₂ 吸収機構の解明, 平成 26 年度日本水産学会春期大会, 2014.3.30, (北海道).

原田志保, 栗田拓朗, 安元(森)加奈未, 代田修, 徳村忠一. フルチカゾンプロピオン酸エステルアルカリ溶液中分解物の化学構造, 日本薬学会第 134 回年会, 2014.03.29, 熊本大学 他 (熊本県熊本市).

安元(森)加奈未, 内藤小百合, 中津里花, 代田修, 我妻豊, 淵野裕之, 佐竹元吉, 関田節子. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その 26) - ミャンマー産植物 *Dahat Tectona hamiltoniana* Wall. の成分について -, 日本薬学会第 134 回年会, 2014.03.29, 熊本大学 他 (熊本県熊本市).

安元(森)加奈未; 第 3 回薬用資源の現地調査, 第 13 回ミャンマーフォーラム 2014.3.6, お茶の水女子大学 (東京都文京区).

黒柳正典, 代田修, 安元加奈未, 関田節子, 淵野裕之, 牧野正和, 藁科力. パキスタン産 *Artemisia scoparia* の抗リーシュマニア活性物質, 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学

に関する討論会 2013.10.16, 埼玉大学 (埼玉県さいたま市).

安元加奈未, 泉本頌子, 淵野裕之, 大井 高, 代田修, 我妻豊, 楠見武徳, 佐竹元吉, 関田節子. ミャンマー産植物の抗リーシュマニア活性物質の探索, 第 55 回天然有機化合物討論会 2013.9.19, 同志社大学 (京都府京都市).

安元 剛, 廣瀬(安元)美奈, 村田龍, 佐藤駿一, 馬場愛美, 安元純, 安元加奈未, 坂田剛, 神保充, 大島泰克, 楠見武徳, 渡部終五, Polyamine は CO₂ を捕捉し石灰化を促進する, 第 55 回天然有機化合物討論会 (京都) 2013.9.18, 同志社大学 (京都府京都市).

安元 剛, 廣瀬(安元)美奈, 村田龍, 安元純, 安元(森)加奈未, 神保充, 渡部終五, ポリアミンは CO₂ を捕捉し石灰化を促進する, 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013.6.1, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県那覇市).

廣瀬(安元)美奈, 長浜夏樹, 大城要平, 安元(森)加奈未, 安元純, 安元 剛, 沖縄産生物ライブラリーを活用した新規シデロフォアの単離・構造決定, 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013.6.1, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県那覇市).

〔その他〕
ホームページ等
<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph09/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
安元 加奈未
(MORI-YASUMOTO, Kanami)
徳島文理大学・薬学部・助教
研究者番号: 70412393