

漢方資源応用学教室の歩みと研究



薬学部 漢方資源応用学教室 教授 三巻 祥浩 (大学 32 回)

はじめに

漢方資源応用学教室の前身は薬用植物学教室で、筆者が薬用植物学教室に配属されたとき（今から40年近く前のことですが）の教授は下村裕子先生、助教授は指田豊先生でした。下村先生のご専門は植物形態学で、当時同分野の第一人者でした。また、指田豊先生は植物分類学に深い見識をもち、その知識を応用して、生薬の品質評価のための指標成分、ケモタキソノミー、植物の苦味成分や精油成分などの研究に従事されていました。以下、筆者を中心とした当該教室の研究について述べていきます。

1. ユリ属植物の成分

筆者は植物の苦味成分の研究に興味を持ち、ユリ科ユリ属 (*Lilium*) 鱗茎に含まれる苦味成分を探索するとともに、入手可能なユリ科植物の成分研究に傾注しました。ご存知のとおり、ユリ属植物の鱗茎は「ゆり根」と称し、和食の素材としても利用されています。研究を始めた当初は、果してユリ属植物の鱗茎に研究の対象となるような二次代謝産物は含まれているのだろうか、という不安もありましたが、研究を進めれば進めるほど、新しい成分が見つかり、ユリ属植物の化学成分に関する研究で学位を取得することができました。しかしながら、ユリ属植物鱗茎の成分は配糖体が主で、高極性のため単離・精製はもとより、構造決定に苦勞しました。たとえば、ユリ属植物鱗茎に普遍的に含まれている 3,6'-di-*O*-feruloylsucrose (**1**) の構造は、現在

では高分解能の NMR スペクトルを解析すれば難なく決定できますが、当時は構造決定に大変苦勞しました。誘導体の合成による方法ではうまくいかず、最後は、C₅D₅N/CD₃OD (4:1) という変則的な測定溶媒を用いて、外部機関の導入間もない 400 MHz ¹H-NMR で、スピンドカップリング実験を行うことでその構造を決定することができました。しかし、筆者が構造決定したときには既に他の研究グループが **1** の構造決定を論文発表していたという、苦味成分の苦い思い出があります。

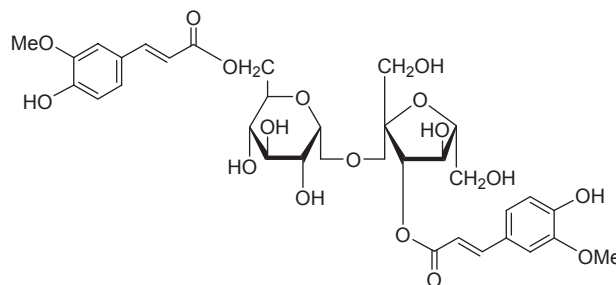


図1 3,6'-di-*O*-Feruloylsucrose (**1**) の構造

2. 複雑な糖鎖構造を有する配糖体の構造研究

筆者の学位取得に前後して、本学でも高分解能の FT-NMR の測定装置が導入されたことを契機に、配糖体の構造研究が飛躍的に進展し、複雑な糖鎖を有する配糖体の化学構造を数 mg で決定できる時代となりました。たとえば、**2** は観賞用植物として広く栽培されてクリスマスローズの一種 *Helleborus orientalis* から単離された spirostanol 型のステロイド配糖体です。アグリコン部の 1 位、3 位、21 位、23 位、24 位に水酸基を有し、1 位、21 位、24 位に単糖あるいは糖鎖が結合

した trisdesmoside 型の配糖体で、糖の数は合計で7個、そして糖の種類がすべて異なるというユニークな構造のステロイド配糖体です。通常の ^1H -、 ^{13}C -NMR スペクトルのほか、1D-TOCSY、HSQC-TOCSY、HSQC、HMBC、NOESY スペクトルを丁寧に解析することにより、**2** の構造を正確に決定することができました¹⁾。

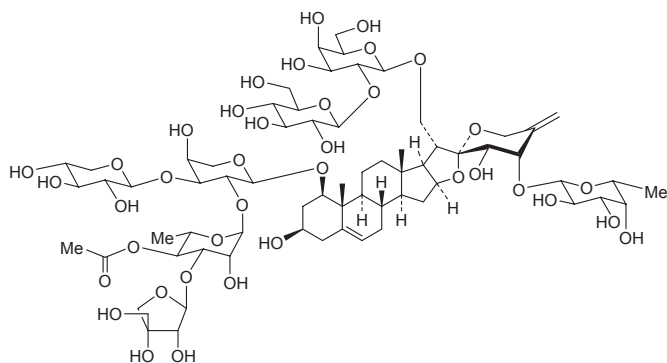


図2 化合物**2**の構造

3. OSW-1 の発見—セレンディピティ

1990年の半ば過ぎ、南アフリカ原産のユリ科植物 *Ornithogalum saundersiae* 鱗茎より、非常に強力な腫瘍細胞毒性を示すアシル化コレスタン配糖体 (OSW-1:**3**) を見出しました。

発見の経緯は省略しますが、セレンディピティと言ってよいと思います。OSW-1は、シスプラチン (CDDP)、アドリアマイシン (ADM) 耐性腫瘍を含む各種悪性腫瘍細胞に対して、既存の抗がん剤である ADM、CDDP、カンプトテシン (CPT)、タキソール (TAX) に比べ、10倍から100倍の極めて強い細胞毒性を示しました。一方、正常細胞に対する細胞毒性は弱く、顕著な腫瘍選択性が認められました²⁾。NCIの60 cell line assayでは、OSW-1の細胞毒性スペクトル (finger print) はデータベース上にある抗がん剤、抗腫瘍活性物質のいずれとも相関が認められず、新しい作用機序を有する抗腫瘍活性物質と推定されました。さらに、



図3 ユリ科 *Ornithogalum saundersiae*

表1 OSW-1 (**3**)、CPT、TAXの細胞毒性

Cells	IC ₅₀ (μg/mL)		
	OSW-1 (3)	CPT	TAX
CCD-19Lu	1.5	2.0	2.0
P388	0.00013	0.0050	0.010
P388/ADM	0.00077	—	—
P388/CPT	0.00010	—	—
FM3A	0.00016	—	—
A549	0.00068	—	—
Lu-65	0.00020	—	—
Lu-99	0.00020	0.0010	0.0020
RERF-LC-AI	0.00026	—	—
CCRF-CEM	0.00016	0.0050	0.0010

CCD-19Lu: ヒト正常肺線維芽細胞
 P388: マウス白血病細胞
 P388/ADM: アドリアマイシン耐性マウス白血病細胞
 P388/CPT: カンプトテシン耐性マウス白血病細胞
 FM3A: マウス乳がん細胞
 A549: ヒト肺腺がん細胞
 Lu-65: ヒト肺大細胞がん細胞
 Lu-99: ヒト肺大細胞がん細胞
 RERF-LC-AI: ヒト肺扁平上皮がん細胞
 CCRF-CEM: ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞

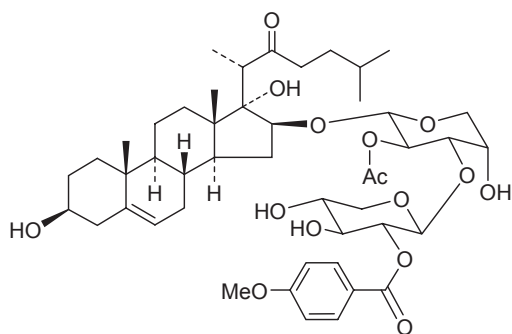


図4 OSW-1 (3) の構造

in vivo 試験において、P388 マウス白血病に対して 0.01 mg/kg の単回投与で顕著な延命効果 (ILS 59%) を示し、ヌードマウスに移植した肝細胞がんに対しても良好な増殖抑制効果を示しました。本研究結果をシカゴで開催された 210th National Meeting of ACS で発表したところ、Chemical & Engineering News 誌に掲載され、さらに英国の Chemistry in Britain 誌では、「Gardening for new drug」というタイトルで紹介されました。

当教室の井口助教は、OSW-1 は SBC-3 ヒト小細胞肺癌細胞を、非ミトコンドリア経路によりアポトーシスに誘導することを明らかにし³⁾、また米国ハーバード大学 Shair 教授との共同研究により、オキシステロール結合タンパクを分子標的としていることを見出していますが⁴⁾、OSW-1 の作用メカニズムについては今なお全容は解明されていません。

4. 製品化に繋がった研究

大手化学メーカーである株式会社カネカとの共同研究により、リコリス (ウラルカンゾウ *Glycyrrhiza uralensis* およびスペインカンゾウ *G. glabra*) のエタノール抽出物について、PPAR γ アゴニスト活性を指標に成分探索を行いました。その結果、グリチルリチン酸を含まない、低極性画分より単離された glycyrin (4) をはじめとする多数のフェノール性化合物が PPAR γ アゴニスト活性を示し、*in vivo* での活性評価により、高血糖の低下作用、内臓脂肪減少作用、血圧降下作用があることを明らかにしました⁵⁻⁷⁾。本研究結果は、機能性表示食品「グラボノイド®」の製

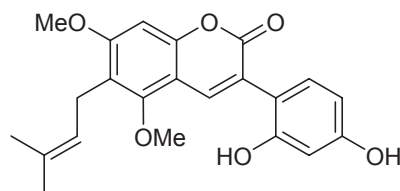


図5 化合物 4 の構造

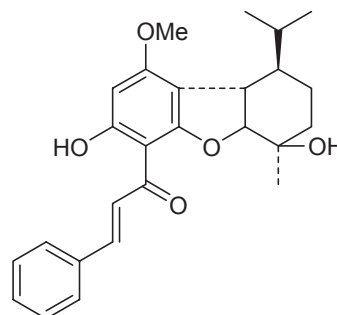


図6 化合物 5 の構造

品化に繋がりました。上記のほか、クロモジ *Lindera umbellata* 樹皮より美白作用を有するヘキサヒドロジベンゾフラン誘導体 linderol A (5)⁸⁾、ブラックコホシュ (シミシフーガ) *Cimicifuga racemosa* の根茎より抗ストレス活性を有するシクロアルタン型トリテルペン配糖体 actein⁹⁾ などを見出しましたが、残念ながら製品化までには至りませんでした。

5. 沖縄特産柑橘シークワサーを世に広める

農林水産省の新需要創出第二期成果報告会にて、沖縄県の大宜味村特産の柑橘シークワサー *Citrus depressa* に、ポリメトキシフラボノイドの nobiletin (6) が温州ミカンなどと比べ、100 倍多く含まれていること、そして 6 は、発がん抑制効果¹⁰⁾ をはじめとする多彩な生物活性を示すことを発表しました。その結果、シークワサーの名が全国に広がり、シークワサー果汁を含む飲料が多くのメーカーから発売されるに至りました。その後、東北大学の研究グループとの共同研究により、6 がアルツハイマー型認知症に有効であることが *in vitro*、*in vivo* の実験で強く示唆され¹¹⁻¹³⁾、さらに脚光を浴びました。今後、6 が新規医薬品として展開していくことを期待しています。

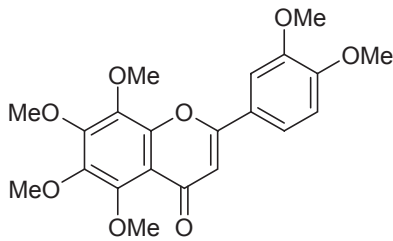


図7 Nobiletin (6) の構造

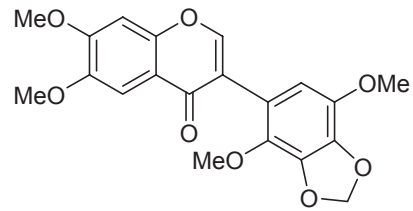
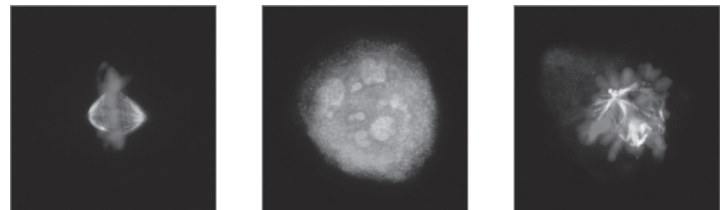


図9 Glaziovianin A (7) の構造



図8 大宜味村役場企画財政課編集「シークワーサーの里」より



control colchicine 7

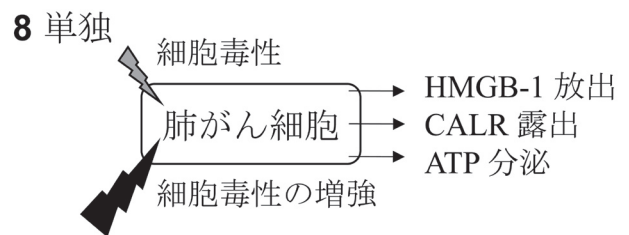
図10 チューブリンに対する作用の解析

6. 最近の研究成果

現在の当教室職員の横須賀准教授、松尾講師、井口助教の代表的な研究成果を紹介します。

マメ科植物 *Ateleia glazioviana* の葉部より、HL-60 ヒト骨髄性白血病細胞に対して強い細胞毒性を有する新規イソフラボノイド glaziovianin A (7) を単離しました。本化合物は、がん研究会のヒトがん細胞パネルスクリーニングにおいて、がん細胞に対する感受性の差が認められ、細胞毒性スペクトルの解析から標的分子はチューブリンであることが示唆されました¹⁴⁾。ラット 3Y1 細胞を 7 で処理すると多極紡錘体が形成されたことから、コルヒチン colchicine とは異なる作用機序で細胞周期を G₂/M 期で停止させ、細胞死に誘導していることが示されました¹⁵⁾。(横須賀准教授と筑波大学白井健朗教授との共同研究)

ジギタリス *Digitalis purpurea* 種子の成分探索を行ったところ、多数の新規プレグナン配糖体、ステロイド配糖体、トリテルペン配糖体が単離されました。Gitonin (8) は既知のステロイド配糖体ですが、エトポシド (ETP) と併用すると、SBC-3 ヒト小細胞肺癌細胞に対する細胞毒性が相乗的に増強しました。さらに、SBC-3 細胞を 8 で処理すると、非ヒストン性クロマチン結合タンパク質 (HMGB-1) の放出、カルレチキュリン (CALR) の細胞膜表面への露出、ATP の分泌が認められ、8 はダメージ関連分子パターン (DAMPs) の放出を誘導することが示されました。これらの現象は、TIG-3 ヒト肺正常細胞に対して毒性を示さない濃度で認められ、8 は免疫原性細胞死 (ICD) を誘導する新規抗がん剤シーズとして期待されます¹⁶⁾。(松尾講師の研究)



8 と ETP の併用

図11 Gitonin (8) および 8 と ETP の併用による ICD の誘導



サボンソウ *Saponaria officinalis* 種子から、新規 7 種を含む 17 種のトリテルペン配糖体が単離されました。それらのうち、**9** は、8 個の単糖から構成される bisdesmoside 型の新規トリテルペン配糖体で、HL-60 細胞、A549 ヒト肺腺がん細胞、および SBC-3 細胞に対して強力な細胞毒性を示しました。化合物 **9** で処理した SBC-3 細胞では、Annexin V/propidium iodide 染色陽性、核クロマチンの凝集、カスパーゼ類の活性化、PARP の切断、ミトコンドリア膜電位の脱分極、活性酸素種の産生量増加、G₂/M 期での細胞周期停止が認められたことから、**9** はミトコンドリアの機能障害を伴って、アポトーシスを誘導することが明らかとなりました¹⁷⁾。さらに、**9** で処理した SBC-3 細胞のミトコンドリアの形態を観察したところ、未処理の場合と比較して大きく、長く、さらに凹凸が粗いことが確認されました。これは、シスプラチンで処理した SBC-3 細胞のミトコンドリアとは逆の傾向です。今後は、この傾向の違いをもたらす要因などを追求していく予定です。(井口助教の研究)

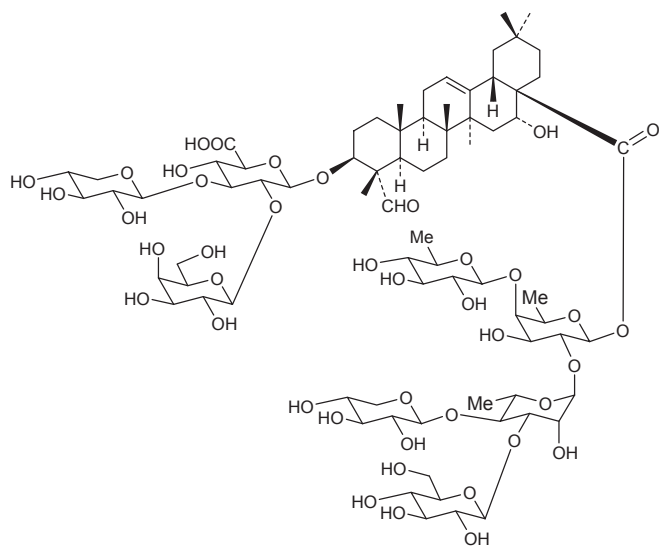


図 6 化合物 **9** の構造

おわりに

ユリ属植物の苦味成分の研究に始まり、天然物が作り出す無尽蔵な化合物のなかから、医薬品資源となる化合物の探索を中心に研究を展開してきました。今後は、活性メカニズムの解明にも力を入れ、研究を進めていき

たいと考えています。一方、漢方薬の薬効や品質評価に繋がる研究にも、ここ数年新たに取り組んでいます。大柴胡湯の脂質代謝改善作用の一作用機序の解明を目的に、大柴胡湯および構成生薬のリパーゼ阻害活性の評価¹⁸⁾や、新型コロナウイルスの感染抑制や重症化を予防する漢方エキス製剤の探索を目的として、漢方薬のセリンプロテアーゼ阻害活性の評価を行ってきました。また、カンゾウ（甘草）配合漢方薬中のグリチルリチン酸の定量分析、オウゴン（黄芩）配合漢方薬中のバイカリンやバイカレインの定量分析、コウイ（膠飴）が配合されている漢方薬の血糖値に及ぼす影響などにも取り組んできました。

今後も、植物資源、生薬、漢方薬をキーワードとし、職員、大学院生、卒論生とともに、楽しく、時には厳しく、研究を進めていきたいと思っています。

参考文献

- 1) Watanabe, K. *et al.*, *Chem. Lett.*, **31**, 772-773 (2002).
- 2) Mimaki, Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2635-2638 (1996).
- 3) Iguchi, T. *et al.*, *J. Nat. Med.*, **73**, 131-145 (2019).
- 4) Burgett, A. W. *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, **7**, 639-647 (2011).
- 5) Kuroda, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 4267-4272 (2003).
- 6) Mae, T. *et al.*, *J. Nutr.*, **133**, 3369-3377 (2003).
- 7) Kuroda, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 962-970 (2010).
- 8) Mimaki, Y. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 893-895 (1995).
- 9) Nadaoka, I. *et al.*, *Nat. Prod. Commun.*, **7**, 15-18 (2012).
- 10) Murakami, A. *et al.*, *Cancer Res.*, **60**, 5059-5066 (2000).
- 11) Nagase, H. *et al.*, *Biochemistry*, **44**, 13683-13691 (2005).
- 12) Nakajima, A. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **321**, 784-790 (2007).
- 13) Yamamoto, Y. *et al.*, *Brain Res.*, **1295**, 218-229 (2009).
- 14) Yokosuka, A. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3091-3094 (2007).
- 15) Chinen, T. *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 884-889 (2013).
- 16) Matsuo, Y. *et al.*, *Bioorg. Chem.*, **122**, 105697 (2022).
- 17) Takahashi, N. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, e2047 (2022).
- 18) Matsuo, Y. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1485-1488 (2018).