

化学応用分野

Division of Natural Products Chemistry

教授	門田 重利	Professor	Shigetoshi Kadota (Ph.D.)
准教授	手塚 康弘	Associate Professor	Yasuhiro Tezuka (Ph.D.)
助教	Awale Suresh	Assistant Professor	Suresh Awale (Ph.D.)

◇研究目的

和漢薬や天然薬物（特にアジアの伝統薬物）から、膵臓癌、糖尿病、抗マラリア、骨粗鬆症、痛風などに有用な医薬シーズを探索すること、ならびに、和漢薬や天然薬物が薬物代謝酵素に及ぼす影響を解明することを目的とする。

◇研究概要

I) 伝統薬物から栄養飢餓状態で殺細胞作用を有する物質の探索

国立がんセンターとの共同研究で、膵臓癌 PANC-1 細胞株を用い、低栄養状態 (IMEM) で PANC-1 に対する殺細胞活性を示し、通常培地 (DMEM) では細胞の成育に活性を示さないような薬物を天然資源より探索している。その結果、ミャンマー産薬用植物 *Boesenbergia pandurata* より PANC-1 細胞株に対して選択的な細胞毒性を有する新化合物を見出し、報告した。

II) 天然薬物から酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の探索と医薬への応用

広島大学で開発したポジティブスクリーニング法を用いて、新規医薬シーズ開発を目的に研究を行っている。中国及び東南アジア産生薬によるスクリーニングを行い、これまで約 1000 サンプルの試験を終え、25 検体に阻害活性を見い出している。その中で、ベトナム産薬用植物 *Eurycoma longifolia* の成分を検討中である。

III) 東南アジア産薬用植物から抗マラリア活性物質の探索

現代のマラリア流行地は、ほぼ熱帯・亜熱帯に限定され、それら地域では多剤耐性マラリアに有効な新しい抗マラリア薬が必要とされている。我々は東南アジア等で抗マラリア薬として用いられている薬用植物エキスについて多剤耐性マラリアに対する活性のスクリーニングを行い、活性を示した薬用植物中の活性物質を単離・構造解析を行っている。現在、インドネシア産薬用植物 *Artocarpus champeden* について抗マラリア作用を検討し、その活性物質を構造解析した。

IV) 天然薬物の薬物代謝酵素阻害に関する研究

通常、和漢薬を始めとする天然薬物は合成医薬品と併用されていることから、天然薬物が“薬物代謝酵素 (シトクローム P450, CYP)”に及ぼす影響 (薬物間相互作用) を系統的に検証しておく事が、天然薬物の有効利用の上で必要とされる。我々は、漢方生薬及びインドネシア・ジャムウ生薬について CYP3A4 及び CYP2D6 阻害活性を検索し、強い阻害活性を示した生薬について、その活性成分の解明を行っている。本年は、CYP3A4 に対する mechanism-based inhibition を示したジャムウ生薬 "*Foeniculum vulgare*" 及び "*Cinnamomum burmani*" の活性成分について検討した。

V) 骨粗鬆症に有効な天然薬物成分の開発研究

紅豆杉の含有リグナン isotaxiresinol が抗骨粗鬆活性を有することを pQCT を用いた *in vivo* 動物実験で証明し報告した。また、中国で臨床的に骨粗鬆症の治療薬に用いられている 19 種の方剤

について、破骨細胞類似の細胞を用いたアッセイ系等で科学的評価を行い Bu-Shen-Jian-Gu-Tang (補腎健骨湯) に活性を見出し報告した。

VI) ブラジル産プロポリスの生物活性成分の研究

ブラジル産プロポリスの生物活性成分研究の一環として、レッドプロポリスが膵臓癌 PANC-1 細胞株に対して低栄養状態で選択的殺細胞活性を示す事を見だし、その活性成分の研究を行っている。なお、1998 年発表のブラジル産プロポリスの細胞毒性成分に関する原著論文

「Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S.: Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *J. Nat. Prod.*, **61**: 896–900, 1998」が、*Journal of Natural Products* 誌の Highly Cited Papers (過去 10 年間の引用回数上位 1% の文献) に選ばれた (http://pubs.acs.org/journals/jnprdf/promo/most/highly_cited/2007/oct.html)。

VII) フィールド調査

ミャンマーの伝統医師との聞き取り調査ならびにベトナムのプーコック島、ニントン省の少数民族チャンパ族の伝統薬や使用生薬や処方等を調べ調査記録として報告した。

上記の研究課題によって得られた本年度の成果 (原著及び学会報告) は下記の通りである。

◇原著論文

- 1) Shi L., Tezuka Y., Miyahara T., Yin J., Nobukawa T., and Kadota S.: Inhibitory effect of constituents of Bu-Shen-Jian-Gu-Tang on osteoclast-like cell formation. *J. Trad. Med.*, **24**: 19–23, 2007.

Abstract: The constituents of Bu-Shen-Jian-Gu-Tang and their inhibitory activities on osteoclast-like cell formation were investigated. Bu-Shen-Jian-Gu-Tang was fractionated by a Diaion HP-20 column with EtOH–H₂O, and the 60% and 90% EtOH–H₂O fractions showed more potent inhibitory activities on osteoclast-like cell formation and bone resorption. Chemical investigation of these two fractions resulted in the isolation of 11 compounds, for which the structures were elucidated based on spectroscopic analysis and chemical reactions. The inhibitory activities of the isolated compounds on osteoclast-like cell formation were evaluated. Among the eleven compounds, icariin (1), icarisid II (2), 2"-O-rhamnosylcarisid II (3), kaempferol (8), chikusetsusaponin IVa (10) and chikusetsusaponin V (11) showed potent inhibitory activities at a concentration of 2 μ M without toxic effects. The preventive effect of Bu-Shen-Jian-Gu-Tang on bone loss may be due to the inhibitory activities of these compounds.

- 2) Li J. X., Liu J., He C. C., Yu Z. Y., Du Y., Kadota S., and Seto H.: Triterpenoids from *Cimicifugae rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. *Maturitas*, **58**: 59–69, 2007.

- 3) Widyawaruyanti A., Subehan, Kalauni S. K., Awale S., Nindatu M., Zaini N. C., Syafruddin D., Asih P. B. S., Tezuka Y., and Kadota S.: New prenylated flavones from *Artocarpus champeden*, and their antimalarial activity in vitro. *J. Nat. Med.*, **61**: 410–413, 2007.

Abstract: Two new prenylated flavones, artocarpones A and B (1 and 2), and seven known isoprenylated flavonoids, artonin A (3), cycloheterophyllin (4), artoindonesianin E (5), artoindonesianin R (6), heterophyllin (7), heteroflavanone C (8), and artoindonesianin A-2 (9), have been isolated from the stem bark of *Artocarpus champeden*. Their structures were determined by spectroscopic analysis. Among the compounds isolated, 8 had the most potent inhibitory activity against the growth of *Plasmodium falciparum* 3D7 clone, with an IC₅₀ value of 1 nmol L⁻¹.

- 4) Win N. N., Awale S., Esumi H., Tezuka Y., and Kadota S.: Bioactive Secondary Metabolites from *Boesenbergia pandurata* of Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cell Line in Nutrient-Deprived Medium. *J. Nat. Prod.*, **70**: 1582–1587, 2007.

Abstract: The chloroform extract of rhizomes of *Boesenbergia pandurata* demonstrated marked preferential cytotoxicity against human pancreatic PANC-1 cancer cells in nutrient-deprived medium. Bioactivity-directed investigation of this extract yielded four new secondary metabolites, geranyl-2,4-dihydroxy-6-phenethylbenzoate (1), 2',4'-dihydroxy-3'-(1"-geranyl)-6'-methoxychalcone (2), (1'R,2'S,6'R)-2-hydroxyisopanduratin A (3), and (2R)-8-geranylpinostrobin (4), and twenty known compounds (5–24). Among the known compounds, (2S)-6-geranylpinostrobin (5), (±)-6-methoxypanduratin A (6), and (2S)-7,8-dihydro-5-hydroxy-2-methyl-2-(4"-methyl-3"-pentenyl)-8-phenyl-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-6-one (7) were isolated for the first time from a natural source. The structures of these compounds were elucidated using extensive spectroscopic techniques including CD measurements. All the isolated compounds showed varying degrees of in vitro preferential cytotoxicity against PANC-1 cells. Nicolaoidesin B (11) and panduratin A (17) were most potent, each showing a PC_{100} at 2.5 μ M.

5) Subehan, Zaidi S. F. H., Kadota S., and Tezuka Y.: Inhibition on human liver cytochrome P450 3A4 by constituents of fennel (*Foeniculum vulgare*): identification and characterization of a mechanism-based inactivator. *J. Agr. Food Chem.*, 55: 10162–10167, 2007.

Abstract: Fennel, a seed of *Foeniculum vulgare*, is used as a culinary spice and traditional medicine. The methanolic extract of fennel showed a characteristic of mechanism-based inactivation on erythromycin *N*-demethylation mediated by human liver microsomal cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). The present study was conducted to identify the fennel constituent having the inhibition. Thirteen compounds have been isolated from a methanol extract of fennel and tested for their inhibition on CYP3A4. Among them, 5-methoxypsoralen (5-MOP) showed the strongest inhibition with an IC_{50} value of 18.3 μ M and a mixed type of inhibition. In addition, with the preincubation time of 20 min only 5-MOP showed preincubation time dependency; the IC_{50} value decreased from 18.3 μ M with a preincubation time of 0 min to 4.6 μ M with a preincubation time of 20 min. Further investigation on 5-MOP showed the characteristics of time-dependent inhibition, requirement of NADPH, lack of protecting effect of nucleophiles, and recovery of CYP3A4 activity by the competitive inhibitor. This result suggests that the inhibitory activity of CYP3A4 by 5-MOP was a mechanism-based inactivation. The kinetic parameter for mechanism-based inactivation was characterized by a K_I value of 15.0 μ M and a k_{inact} value of 0.098 min^{-1} .

◇学会報告 (*: 特別講演、シンポジウム、ワークショップ等)

- 1) Subehan, 門田重利, 手塚康弘 : New Quinoline-Type Alkaloids of *Lunasia amara* BLANCO from Indonesia. 日本薬学会第 127 年会, 2007, 3, 28–30, 富山.
- 2) Syed Faisal Haider Zaidi, Subehan, Khan Usmanghani, 門田重利, 手塚康弘 : Inhibition of CYP1 Family Enzymes by Unani Medicinal Plants from Pakistan. 日本薬学会第 127 年会, 2007, 3, 28–30, 富山.
- 3) 三宅克典, 岡田泰典, 手塚康弘, 宮川都吉, 門田重利 : ベトナム産 *Eurycoma longifolia* における酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の探索. 日本薬学会第 127 年会, 2007, 3, 28–30, 富山.
- 4) Nwet Nwet Win, Suresh Awale, Hiroyasu Esumi, Yasuhiro Tezuka, Shigetoshi Kadota: Constituents of *Boesenbergia pandurata* and Their Cytotoxicity against PANC-1 Cells under Nutrient Deprived Condition. 第 24 回和漢医薬学会大会, 2007, 9, 8–9, 富山.
- 5) 宮本竜也, Suresh Awale, 李 峰, Nwet Nwet Win, 手塚康弘, 門田重利 : ミャンマーの薬用植物 Dant-da-ku-ni の化学成分と種々の癌細胞に対する細胞増殖抑制活性. 第 24 回和漢医薬学会大会, 2007, 9, 8–9, 富山.
- 6) Subehan, 門田重利, 手塚康弘 : Constituents of *Cinnamomum burmani* and their CYP3A4 inhibitory activity. 日本生薬学会第 54 回年会, 2007, 9, 14–15, 名古屋.

◇その他

- 1) 門田重利 : 癌・悪性腫瘍と和漢生薬. 漢方と最新治療, 16: 189–195, 2007.

- 2) 手塚康弘：生薬による薬物代謝酵素シトクローム P450 阻害 —薬物相互作用の観点から—。富山漢方会講演会，2007，5，30，富山。
- * 3) Shigetoshi Kadota, Suresh Awale, Hiroyasu Esumi: Novel Strategies in Anti-cancer Drug Discovery. The 2007 International Symposium of Phytochemicals and Applied Microbiology-Bioactivities, Resources and Applications, 2007, 6, 22, Chiayi, Taiwan.
- 4) 手塚康弘, Subehan, Tepy Usia, 岩田 宏：天然薬物中の薬物代謝酵素シトクローム P450 阻害活性成分。“富山大学 21 世紀 COE プログラム” シンポジウム「東洋の知に立脚した個の医療の創生」，2007，11，16，富山。
- 5) 門田重利：伝統薬物から単離した化合物の栄養飢餓状態での殺細胞作用。第 28 回和漢医薬学総合研究所特別セミナー「天然薬物資源の新しいアプローチ —プラントミメティックスを中心に—」，2007，12，1，富山。

◇海外調査

- 1) 手塚康弘：国際協力機構（JICA）に係わるミャンマー-伝統医療プロジェクト，2007，7/13-7/26，ミャンマー。

◇共同研究

国内

- 1) 江角浩安：国立がんセンター研究所支所，「がん生物学に基づく新しい治療法に関する研究」，2003，4～
- 2) 宮川都吉：広島大学大学院・先端物質科学研究科，「酵母 Ca²⁺シグナルによる細胞周期制御に関する総合的研究」，2004，4～
- 3) 信川高寛：金沢医科大学，「紅豆杉の生物活性物質の探索」，2004，4～

海外

- 1) Dejair Message, Alfredo A. G. Fuertas：ブラジル・ヴィソサ大学，「プロポリスの品質評価に関する研究」，1996，10～
- 2) 殷 軍：中国・瀋陽薬科大学，「漢方方剤の抗骨粗鬆症活性成分に関する研究」，2004，10～
- 3) 李 建新：中国・南京大学化学工学院・薬物化学研究所，「抗骨粗鬆症に有効な薬物の開発研究」，2004，4～
- 4) Tran Le Quan：ベトナム・国立ホーチミン市大学，「ベトナム産薬用植物の科学的評価に関する研究」，2003，4～

◇研究費取得状況

- 1) 厚生労働省がん研究助成（分担：門田重利）「がん生物学に基づく新しい治療法の開発に関する研究」
- 2) 平成 19 年度研究拠点形成費補助金（COE）（フェロー：手塚康弘）「東洋の知に立脚した個の医療の創生」
- 3) 平成 19 年度和漢薬バイオテクノロジー研究「消化管をターゲットとした新しい和漢薬製剤の開発」（分担：手塚康弘）「消化管の薬物代謝に及ぼす生薬の作用の検討」

◇研究室在籍者

学部 3 年生：岡村侑香里

学部 4 年生：藤永祐子，藤本直也

大学院修士 1 年：宮本竜也，高橋直人，Retno Widyowati

大学院博士1年：李 峰，三宅克典，守川耕平（10月入学）

大学院博士3年：Subehan, Nwet Nwet Win（10月入学）

外国人研究生：張 紅燕（2007, 12/23～2008, 3/31）

◇学位（修士、博士）取得者

修士論文：

三宅克典：ベトナム、中国産生薬における酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の探索

李 峰：Constituents of Brazilian Red Propolis and Their Preferential Cytotoxic Activity against PANC-1 Cell Line under Nutrient-Deprived Condition

博士論文：

史 麗穎：Antiosteoporotic Activity of Chinese Herbal Formulation “Bu-Shen-Jian-Gu-Tang” and Its Active Constituents