

## 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.)
技術補佐員	岩白 円	Assistant	Madoka Iwashiro

## ◇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 *Soyimida febrifuga* 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) 天然薬物の薬物代謝酵素阻害に関する研究

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）を解明する目的で、インドネシア・ジャムウ生薬 *Lunasia amara*, *Averrhoa bilimbi* 及び中国民間薬“紅豆杉”の阻害活性成分について検討した。

## Ⅲ) プロポリスの生物活性成分の研究

プロポリスの生物活性成分研究の一環として、メキシコ産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、その活性成分を行った。また、得られた成分については、6 種のがん細胞に対する細胞毒性を検討した。

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) Miyake K., Tezuka Y., Awale S., Li F., and Kadota S.: Canthin-6-one alkaloids and a tirucallanoid from *Eurycoma longifolia* Jack. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 17–22, 2010.

**Abstract:** Phytochemical investigation of the stems of *Eurycoma longifolia* Jack led to the isolation of two new canthin-6-one alkaloids, 4,9-dimethoxycanthin-6-one (**1**) and 10-hydroxy-11-methoxycanthin-6-one (**2**), and a new tirucallane-type triterpenoid, 23,24,25-trihydroxytirucall-7-en-3,6-dione (**3**), along with 37 known compounds. Among these, an oxasqualenoid (**4**) was isolated as a natural product for the first time. The structures of the isolates were elucidated by spectroscopic and mass spectrometric means. All the isolates were evaluated for their cytotoxic activity against a HT-1080 human fibrosarcoma cell line. Among them, 9,10-dimethoxycanthin-6-one (**14**,  $IC_{50} = 5.0 \mu M$ ), 10-hydroxy-9-methoxycanthin-6-one (**15**,  $IC_{50} = 7.2 \mu M$ ), dihydroniloticin (**18**,  $IC_{50} = 8.2 \mu M$ ), and 14-deacetylaurylene (**34**,  $IC_{50} = 3.2 \mu M$ ) displayed stronger activity than the positive control 5-FU ( $IC_{50} = 9.2 \mu M$ ).

- 2) He C. C., Hui R. R., Tezuka Y., Kadota S., and Li J. X.: Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes bidentata* in ovariectomized rats. *J. Ethnopharmacol.*, 127: 229–234, 2010.
- 3) Yin J., Han N., Liu Z., Song S., and Kadota S.: The *in vitro* antiosteoporotic activity of some glycosides in *Dioscorea spongiosa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 33: 316–320, 2010.
- 4) Pham N. T., Tohda M., Tezuka Y., and Matsumoto K.: Influence of an adenosine deaminase inhibitor, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochloride, on 5-HT<sub>2</sub>CR mRNA editing in primary cultured cortical cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 33: 527–529, 2010.
- 5) Li F., Awale S., Tezuka Y., Esumi H., and Kadota S.: Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *J. Nat. Prod.*, 73: 623–627, 2010.

**Abstract:** Three new flavonoids, (2*R*,3*R*)-3,5-dihydroxy-7-methoxyflavanone 3-(2-methyl)butyrate (**1**), (7''*R*)-8-[1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)prop-2-en-1-yl]chrysin (**2**), and (7''*R*)-8-[1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)prop-2-en-1-yl]galangin (**3**), together with 41 known compounds (**4–44**) were isolated from a methanolic extract of Mexican propolis. Compounds **2** and **3** are unique natural flavones containing a 1-phenylallyl moiety. The *in vitro* preferential cytotoxicity of all the isolates was evaluated against a PANC-1 human pancreatic cell line. Compound **3** displayed the most potent preferential cytotoxicity (PC<sub>50</sub> 4.6  $\mu$ M) in the nutrient-deprived medium (NDM) and triggered apoptosis-like morphological changes in PANC-1 cells.

- 6) Miyake K., Li F., Tezuka Y., Awale S., and Kadota S.: Cytotoxic Activity of Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 1009–1012, 2010.

**Abstract:** Twenty-four quassinoids isolated from *Eurycoma longifolia* Jack were investigated for their cytotoxicity against a panel of four different cancer cell lines, which includes three murine cell lines [colon 26-L5 carcinoma (colon 26-L5), B16-BL6 melanoma (B16-BL6), Lewis lung carcinoma (LLC)] and a human lung A549 adenocarcinoma (A549) cell line. Among the tested compounds, eurycomalactone (**9**) displayed the most potent activity against all the tested cell lines; colon 26-L5 (IC<sub>50</sub> = 0.70  $\mu$ M), B16-BL6 (IC<sub>50</sub> = 0.59  $\mu$ M), LLC (IC<sub>50</sub> = 0.78  $\mu$ M), and A549 (IC<sub>50</sub> = 0.73  $\mu$ M). These activities were comparable to clinically used anticancer agent doxorubicin (colon 26-L5, IC<sub>50</sub> = 0.76  $\mu$ M; B16-BL6, IC<sub>50</sub> = 0.86  $\mu$ M; LLC, IC<sub>50</sub> = 0.80  $\mu$ M; A549, IC<sub>50</sub> = 0.66  $\mu$ M).

- 7) Morikawa K., Tanaka K., Li F., Awale S., Tezuka Y., Nobukawa T., and Kadota S.: Analysis of MS/MS fragmentation of taxoids. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 1551–1556, 2010.

**Abstract:** The fragmentation pathways of seven types of taxoids were investigated by using a LC-MS/MS method, namely: (1) neutral taxoids with a C-4(20) double bond; (2) taxoids with a C-4(20) double bond and oxygenation at C-14; (3) 5-cinnamoyl taxoids with a C-4(20) double bond; (4) a basic taxoid with a C-4(20) double bond; (5) a taxoid with a C-4(20) epoxide; (6) taxoids with an oxetane ring; and (7) taxoids with an oxetane ring and a phenylisoserine C-13 side chain. Depending on the class of core structure and the substitution pattern, each taxoid gave either the molecular adduct ion [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> or [M+H]<sup>+</sup>. In the MS/MS, the molecular adduct ion gave characteristic product ions corresponding to the loss of water, acetic acid, benzoic acid, and cinnamic acid or the phenylisoserine group. These could reflect the difference of the substitutions and structural modifications and should be utilized for the structure elucidation of taxoids by LC-MS.

- 8) Li F., Awale S., Tezuka Y., Esumi H., and Kadota S.: Cytotoxicity of Constituents from Mexican Propolis Against a Panel of Six Different Cancer Cell Lines. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 1601–1606, 2010.

**Abstract:** The cytotoxicity of 39 compounds, including eighteen flavonoids (flavanones, **1–10**; flavones, **11–17**; flavanol, **18**), sixteen phenolic acid derivatives (aromatic acids, **19–24**; aldehyde, **25**; esters, **26–34**) and five glycerides (**35–39**), isolated from Mexican propolis, were evaluated against a panel of six different cancer cell lines; murine colon 26-L5 carcinoma, murine B16-BL6 melanoma, murine Lewis lung carcinoma, human lung A549 adenocarcinoma, human cervix HeLa adenocarcinoma and human

HT-1080 fibrosarcoma. A phenylpropanoid-substituted flavanol, (2*R*,3*S*)-8-[4-phenylprop-2-en-1-one]-4',7-dihydroxy-3',5-dimethoxyflavan-3-ol (**18**), showed the most potent cytotoxicity against A549 cells (IC<sub>50</sub>, 6.2 μM) and HT-1080 cells (IC<sub>50</sub>, 3.9 μM), stronger than those of the clinically used anticancer drug, 5-fluorouracil (IC<sub>50</sub>, 7.5 μM and 5.4 μM, respectively). Based on the observed results, the structure-activity relationships are discussed.

9) **Widyowati R., Miyahara T., Tezuka Y., Awale S., Kadota S.: Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity by Indonesian medicinal plants and active constituents of *Barleria lupulina*. Nat. Prod. Commun., 5: 1711–1716, 2010.**

**Abstract:** In order to find out antiosteoporotic agents from natural resources, 32 Indonesian medicinal plants were screened for the effects on osteoblast differentiation by using the alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 osteoblast cells as a marker. From the extract of *Barleria lupulina*, which showed the most potent activity, 13 iridoid glucosides including three new ones [8-*O*-acetylpolamiidic acid (**1**), 8-*O*-acetyl-6-*O*-(*p*-methoxy-*cis*-cinnamoyl)shanzhiside (**2**), and 8-*O*-acetyl-6-*O*-(*p*-methoxy-*trans*-cinnamoyl)shanzhiside (**3**)] were identified. Among the 13 iridoid glucosides, ipolamiide (**4**) showed the most potent activity in a dose-dependent manner.

◇学会報告 (\*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) Lidyawati Auw, Suresh Awale, 門田重利, 手塚康弘: インドネシア産薬用植物 *Averrhoa bilimbi* L. の CYP2D6 および 3A4 に対する阻害活性. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3/28-30, 岡山.
- 2) 李 峰, Suresh Awale, 手塚康弘, 門田重利: ミャンマー産プロポリスの細胞毒性成分及び構造活性相関. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3/28-30, 岡山.
- 3) 守川耕平, 田中 謙, 李 峰, 手塚康弘, Suresh Awale, 信川高寛, 門田重利: 南方紅豆杉の栽培年数による成分変化解析. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3/28-30, 岡山.
- 4) 三宅克典, 李 峰, 手塚康弘, Suresh Awale, 門田重利: *Eurycoma longifolia* より単離したカシノイド類の細胞毒性. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3/28-30, 岡山.
- 5) 三宅克典, 手塚康弘, Suresh Awale, 李 峰, 門田重利: ベトナム生薬 *Eurycoma longifolia* Jack の成分研究. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3/28-30, 岡山.
- 6) 守川耕平, Lidyawati Auw, Subehan, 李峰, Suresh Awale, 信川高寛, 田中謙, 門田重利, 手塚康弘: 紅豆杉の薬物代謝酵素に対する阻害活性. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010, 8/28-29, 京都.
- 7) Lidyawati Auw, Suresh Awale, Shigetoshi Kadota, Yasuhiro Tezuka: Constituents of Indonesian medicinal plant *Averrhoa bilimbi* L. and their CYP3A4 inhibitory activity. 日本生薬学会第 57 回年会, 2010, 9/25-26, 徳島.
- 8) Dibwe Dya Fita, Suresh Awale, Yasuhiro Tezuka, Hiroyasu Esumi, Shigetoshi Kadota: Preferential cytotoxic constituents of *Garcinia huillensis* from D. R. Congo against PANC-1 human pancreatic cancer cell line in nutrient deprived conditions. 日本生薬学会第 57 回年会, 2010, 9/25-26, 徳島.
- 9) 李峰, Suresh Awale, 手塚康弘, 門田重利: Constituents of Mexican propolis and their preferential cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. 日本生薬学会第 57 回年会, 2010, 9/25-26, 徳島.
- 10) 岡村侑香里, 李峰, Suresh Awale, 手塚康弘, 門田重利: 羌活に含まれる抗癌活性物質の研究. 日本生薬学会第 57 回年会, 2010, 9/25-26, 徳島.

◇その他

- \* 1) Yasuhiro Tezuka, Suresh Awale, Shigetoshi Kadota: Antiausterity Strategy based Natural Anticancer Agents from the Medicinal Plants in Myanmar. 「共同利用・共同研究拠点」認定記念, 日本学術振興会先端学術研究人材養成事業, シンポジウム「異分野の視点から見た



和漢薬研究の独創的体系構築 社会科学的、分子生物学及びナノ構造分野から」(Innovative Ideas in Natural Medicine Research: Perspective Views Social Science, Molecular Biology, and Nano Materials), 2010, 2/18-19, 富山.

- 2) 手塚康弘：和漢薬を化学の目で見ると．第 15 回和漢医薬学総合研究所夏期セミナー「和漢薬ここがおもしろい」，2010，8/23-25，富山．
- \* 3) Shigetoshi Kadota：From "Kampo" to Clinic: Recent Developments. International Symposium on Herbal Medicine R&D (ISHM), 2010, 10/5, 堤川，韓国．

## ◇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) 富田章弘：癌研究会癌化学療法センター，「がん生物学に基づく新しい治療法に関する研究」，2003, 4～
- 3) 豊岡尚樹：富山大学工学部生命工学科，「和漢薬“牛蒡子”成分アルクチゲニンから新規膵臓がん治療薬の開発」，2009, 4～

### 海外

- 1) Dejour Message, Alfredo A. G. Fuertas：ブラジル・ヴィソーサ大学，「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～

## ◇国際交流

- 1) 手塚康弘：日本学術振興会による論博事業による派遣，2010, 3/1～3/10, ミャンマー，論博研究者 Thein Zaw Linn.
- 2) 門田重利：日本学術振興会による論博事業による研究者受入，2010, 9/4～12/2, ミャンマー，論博研究者 Thein Zaw Linn.

## ◇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）「がんの生物的特性に着目した治療法および診断法の評価系の確立に関わる研究」
- 2) 文部科学省科学研究費，基盤研究 C（代表：手塚康弘）「和漢薬“牛蒡子”成分アルクチゲニンから新規膵臓がん治療薬の開発」．
- 3) 厚生労働省科学研究費「薬用植物データベース構築事業」化学成分情報担当（分担：門田重利，協力：手塚康弘）
- 4) 平成 22 年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究，一般研究 I（分担：手塚康弘，Suresh Awale）「Arctigenin をリード化合物とした新規メカニズムに基づく膵臓がん治療薬の合成化学的アプローチ」．

## ◇研究室在籍者

学 部 4 年 生：岩下侑介，別宮 豪

学 部 5 年 生 : 高橋光生

大学院修士 1 年 : 加藤 護

大学院修士 2 年 : Lidyawati (2010 年 9 月修了) , 岡村侑香里, Dibwe Dya Fita Eddy

大学院博士 1 年 : Azis Saifudin

大学院博士 3 年 : 信川真智子 (社会人学生)

研 究 員 : 李 峰 (2010, 4~2010, 11)

外国人客員研究員 : Thein Zaw Linn (ミャンマー・マンダレー伝統医療大学・研究開発部長, JSPS  
論博研究者, 2010, 9/4~2010, 12/2) ,

A. Douglas Kinghorn (アメリカ・オハイオ州立大学・教授, 2010, 2/15~2010,  
2/24) ,

梁 逸曾 (中国・中南大学・教授, 2010, 2/15~2010, 2/24) ,

Subehan (インドネシア・ハサヌジン大学・講師, 2010, 2/1~2010, 4/29) ,

Tepy Usia (インドネシア・National Agency of Drug and Food Control・Assistant  
Director of Indonesian Indigenous Medicines, 2010, 2/3~2010, 2/27) ,

Surya Kant Kalauni (ネパール・トリブバン大学・講師, 2010, 2/6~2010, 5/3) ,

Robin Chiou (中華民国・嘉義大学・教授, 2010, 9/22~2011, 1/31)

#### ◇学位(修士, 博士)取得者

修士論文:

張 紅燕 : Anti-Alzheimer's Disease Drug Candidates: Synthesis of Long-chain Polyunsaturated  
Fatty Acid Derivatives and Their Protective Effects on A $\beta$ (25–35)-induced Neuritic  
Atrophy

Lidyawati : CYP3A4 inhibitory constituents of Indonesian medicinal plant *Averrhoa bilimbi* L.

博士論文:

三宅克典 : ベトナム産薬用植物 *Eurycoma longifolia* JACK の細胞毒性成分に関する研究

李 峰 : Cytotoxic Constituents of Propolis from Brazil, Myanmar and Mexico