

和漢医薬学総合研究所年報

富 山 大 学

第 48 卷 2021 年

Annual Report
Institute of Natural Medicine
University of Toyama
Vol. 48, 2021

和漢医薬学総合研究所年報

富 山 大 学

第 48 卷 2021 年

Annual Report of Institute of Natural Medicine

University of Toyama Vol. 48, 2021

富 山 大 学

和漢医薬学総合研究所

目次

巻頭言	1
総 説	
研究開発部門複雑系解析分野	
金 俊達.....	2
各部門・センターの活動と業績	
研究開発部門	
資源開発分野	
資源科学領域.....	8
天然物創薬学領域.....	15
病態制御分野	
神経機能学領域.....	25
生体防御学領域.....	31
複雑系解析分野.....	39
未病分野.....	44
国際共同研究分野.....	50
臨床応用部門.....	54
産官学連携部門.....	56
和漢医薬教育研修センター.....	58
民族薬物資料館.....	63
2021年度の活動記録.....	65

2021 年度 共同利用・共同研究活動

【特定研究】

高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの品質評価法に関する研究.....	66
<i>de novo</i> 発がんマウスモデルを用いたがん臨界点を規定する揺らぎ因子の同定	70
タンパク質メチル化に対する和漢薬作用の生化学的効果の検証と 代謝疾患への応用.....	74
ラマン分光・イメージング技術を駆使した未病状態の検出と 疾患予測システムへの応用	78
プレニル基転移酵素の機能的リデザインを基軸とする生合成工学	82
天然物医薬品開発のための和漢薬の遺伝子解析及び網羅的成分分析.....	87

【探索研究】

栄養代謝調節因子に作用する和漢薬のスクリーニング	91
HBV 排除化合物の探索 和漢薬エキブライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングと 活性成分の分析	92
タンパク質メチル化に対する和漢薬作用の生化学的効果の検証と 代謝疾患への応用.....	94
和漢薬ライブラリーを用いた新興ウイルスに対する感染阻害薬の探索研究	95
「漢方 COVID-19 薬探索 熱研・和漢研プロジェクト」 The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro	96

伝統医学は人類が自然の摂理と天然の恵みを巧みに利用し、疾病の予防、治療にあたってきた経験知の集積です。和漢医薬学総合研究所は、現代の先端科学技術を駆使して、和漢薬をはじめとする伝統医学や伝統薬物を科学的に研究し、東洋医薬学と西洋医薬学の融合を図り、新しい医薬学体系の構築と自然環境の保全を含めた全人的医療の確立に貢献することを使命として、①天然薬物資源の確保と保全、②和漢医薬学の基礎研究の推進と東西医薬学の融合、③漢方医学における診断治療体系の客観化と人材の育成、④伝統医薬学研究の中核的情報発信拠点の形成 の重点課題を設けて、研究を推進しております。

特に、世界的に問題になっている高齢化の進行、多因子性疾患の増加、及び天然資源の枯渇に鑑み、本研究所では令和 2 年度から重点研究プロジェクト（高齢者疾患対策研究、代謝・免疫疾患対策研究、未病医療・創薬研究及び資源開発研究[令和 4 年度現在]）を推進し、その成果を社会実装することを目指しています。これらの目標を達成するための組織として、研究開発部門として 5 分野（資源開発、病態制御、複雑系解析、未病、国際共同研究）が連携し、特に臨床研究への橋渡しを目指した基礎研究や新規メカニズムに基づく創薬基盤の構築を目指した研究を行っています。さらに、臨床応用、産官学連携の 2 部門では、附属病院や企業と協力して臨床試験や医薬品候補の発掘を推進しています。加えて、和漢医薬教育研修センターでは漢方医学教育を実践できる教員の育成とその教育研修システムの確立を目的とした教育研究活動を推進しています。これらの 3 部門 1 センターが互いに連携し、東西医薬学の融合を基盤とした次世代型医療科学を創生して、健康長寿社会の形成に貢献することです。

新型コロナウイルス感染症の拡大により、我々の日常生活が大きく変遷しており、大学での教育研究活動も同様に変化が必要になっています。この数年間の経験からも、今後も新たな感染症への対応や、長寿高齢化社会を背景とした疾患の多様化への対応が重要な課題であることは明白です。我々人類が健康長寿社会を実現するためには、これまでに長きにわたり持続して保健医療に用いられてきた歴史を持つ伝統医薬学を活用することが肝要と考えられます。その実現のため、重要先端の生命科学・自然科学や科学技術を駆使して科学的エビデンスに基づく研究を念頭に、和漢医薬学領域と異分野領域との融合型共同研究を行うことが重要です。この方針の下、教育研究を進める所存ですので、皆様方の一層のご支援とご協力を、よろしくお願い申し上げます。

令和 4 年 4 月 1 日

和漢医薬学総合研究所 所長 早川芳弘

総説

生命恒常性の維持におけるタンパク質アルギニンメチル化の役割

富山大学和漢医薬学総合研究所 研究開発部門 複雑系解析分野

金 俊達

はじめに

生体内のタンパク質は、細胞内外の環境変化に応答して、リン酸化やアセチル化、メチル化などの様々な翻訳後修飾を受けることで、分子機能の変化や動的ネットワークの形成を引き起こし、環境適応や恒常性の維持を可能にしている。多細胞生物のメチル基転移酵素は、ゲノム遺伝子の 1% 前後にコードされていると考えられており、約 200 個程度が想定されていることから、複雑な生命現象において生体分子のメチル化は重要であると考えられる。哺乳類におけるメチル化アルギニン誘導体は、50 年以上も前に同定・単離されていたものの、タンパク質アルギニンメチル化の生理学的役割については未だ不明な点が多い。現在、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (protein arginine methyltransferase, PRMT) の同定や、メチル化を検出する解析技術の進歩により、ヒストン及び非ヒストンタンパク質におけるアルギニン残基のメチル化が転写制御や RNA プロセッシング、DNA 修復、シグナル伝達、エピゲノム制御など、細胞機能を制御して多岐に渡る生命現象に関与していることが明らかになりつつある。本稿では哺乳類の PRMT や、生体における PRMT を介したアルギニンメチル化の役割について紹介する。

1. アルギニンメチル化の触媒反応

タンパク質アルギニンメチル化酵素 (PRMT) は、酵母からヒトまで高度に保存されており、PRMT が *S*-アデノシルメチオニン (*S*-adenosyl-L-methionine, SAM) をメチル基供与体として、アルギニン側鎖の δ -グアノジノ基に存在する ω -窒素原子にメチル基が転移される反応を触媒する¹⁾。哺乳類においては活性が報告された 9 種類の PRMTs が存在しており、酵素活性に必要な 4 つの特徴的なモチーフ (モチーフ I や post I, モチーフ II, モチーフ III) や THW ループ配列が保存されている²⁾ (図 1)。

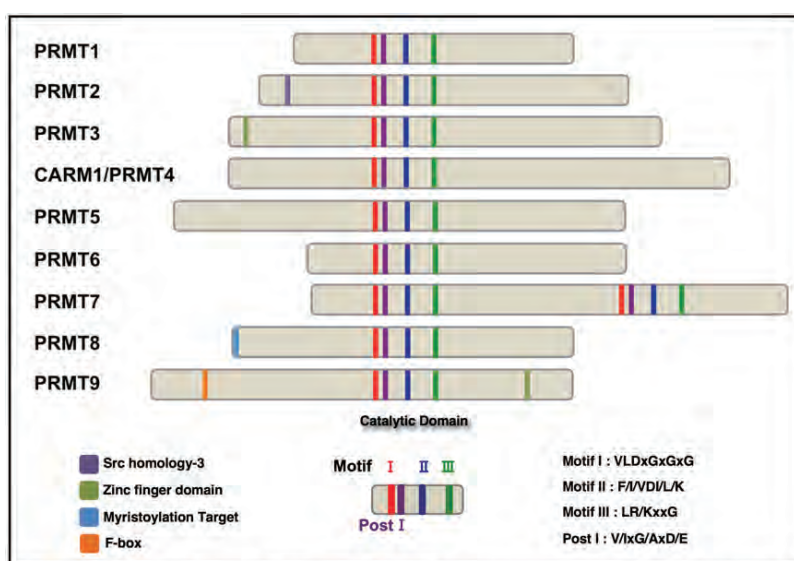


図1. タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMTs) の構造

PRMTは、メチル基転移様式の違いからモノメチル化を経て、非対称型 (Type I)、または対称型 (Type II) にジメチル化する、2つのメチル化触媒様式に大別される (図2)。また、モノメチル化反応のみを触媒する Type III の PRMT も存在する。現在までに、非対称型の反応は PRMT1 および PRMT 3, PRMT 4, PRMT 6, PRMT 8 が触媒し、対称型ジメチル化は PRMT5 や PRMT7, PRMT9 の酵素がその役割を果たす。さらに、PRMT7 は基質によってモノメチル化反応のみを触媒する場合があります、Type III 酵素としても知られている³⁾。

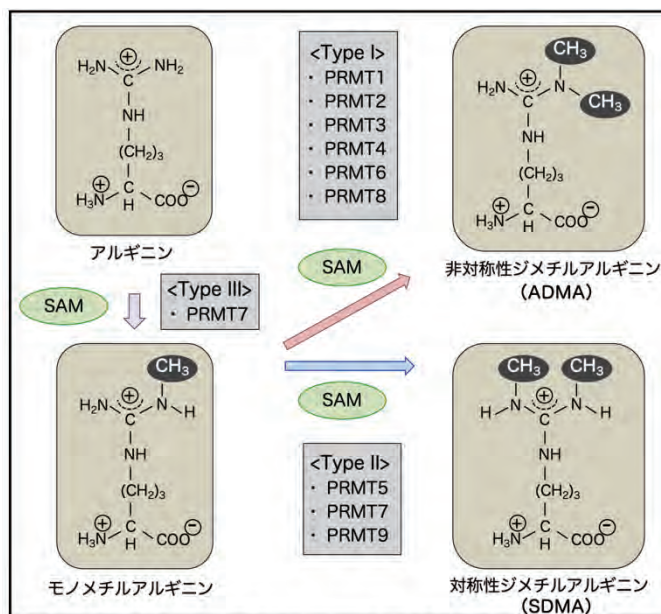


図2. PRMTによるアルギニン残基のメチル化反応

2. PRMT の標的配列

PRMT の基質となるタンパク質は、核内因子や細胞質タンパク質など、多彩なターゲットが知られている。その中でも、RNA 結合タンパク質によく見られるアルギニンとグリシンの繰り返し配列 (RG および RGG, RGR) 等がメチル化基質としての嗜好性が高く、*in vitro* の反応系では高度にメチル化される⁴⁾。一方、ヒストンのようにアルギニンとグリシンの繰り返し配列を持たないタンパク質も数多くメチル化されることが明らかにされており、標的配列のルールについては、未だはっきりとした結論は得られていない。近年、R_xR (x は任意のアミノ酸) も基質になり得ることが証明されており、幅広い基質特異性を有している。フォークヘッド転写因子・FOXO1 は、インスリンや増殖因子によって活性化される PKB/Akt によってリン酸化されることで核内から細胞質へ移行など重要な制御を受けている。この PKB/Akt によってリン酸化されるセリン残基またはスレオニン残基の配列が R_xR_xS/T であり、このコンセンサス配列中の R_xR に PRMT1 によってジメチル基が付加され、リン酸化が阻害されることが判明し⁵⁾、細胞生理機能にとって重要な PKB/Akt シグナルとアルギニンメチル化がクロストークする初めての例となっている。

3. アルギニンメチル化と細胞機能

(1) 転写共役因子とアルギニンメチル化

転写共役因子 EWS (Ewing sarcoma) は、核内で CBP (CREB binding protein) と協調して転写因子 HNF4 の活性を上昇させる⁶⁾。EWS の分子内にはアルギニンとグリシンの繰り返し配列が保存されており、PRMT1 によってメチル化された EWS は、その局在を核から細胞質に変化させることで機能が抑制される⁷⁾。また、PRMT1 は RGG ドメインを持つコアク

チベーター PGC-1 α をメチル化し、この反応が ER 依存的な PGC-1 α の転写活性化に必須であることが明らかになっている⁸⁾。さらには、転写共役因子 CBP/p300 が CARM1/PRMT4 によってメチル化され、それが転写制御に重要な役割を果たすことが知られている。CARM1/PRMT4 による p300 のアルギニンメチル化は、核内受容体アンドロゲンレセプター (AR) 依存的な転写を正に制御するのに対し、CREB (cAMP response element-binding protein) 依存的な転写は負に制御することで、アルギニンメチル化が転写共役因子による転写 On/Off のスイッチになる^{9),10)}。一方、コリプレッサーである RIP140 (receptor interacting protein 140) はメチル化修飾を受けることで、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC と相互作用の減弱が生じることや、核から細胞質への局在変化が誘導されることによってリプレッサーとしての機能が抑制される¹¹⁾。このように PRMT を介した転写共役因子のアルギニンメチル化は、遺伝子発現制御の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) エピゲノム制御とアルギニンメチル化

アルギニンメチル化が関与するエピゲノム制御としては、ヒストン修飾の研究が進展しており、PRMTs によるヒストンのメチル化 (writer) と、そのメチル化状態を転写装置に伝達するアダプター因子 (reader) が明確になっている。PRMT1 による H4R3 の非対称型のジメチル化がアセチル化を促進する¹²⁾。また、PRMT2 による H3R8, CARM1/PRMT4 が H3R17 を、PRMT6 は H4R3 をジメチル化して転写を活性化する^{13),14),15)}。一方、PRMT5 による H3R2, H3R8 と H4R3 の対称型のジメチル化や、PRMT6 による H3R2 の非対称型のジメチル化は、転写抑制に関与するヒストンのアルギニンメチル化である。しかし、ヒストンの非対称型と対称型のジメチル化がどのように転写調節を行なっているか分子機序の全容は明らかではない。上記の writer として PRMT1 や CARM1/PRMT4 が H4R3 および H3R17 をジメチル化して転写を活性化するが、ジメチル化の目印を認識するものがあるのかは長く不明であった。2010 年、Yang らによって Tudor ドメインを有する TDRD3 がヒストンのアルギニンメチル化を認識するタンパク質である可能性が示された¹⁶⁾。これらの発見によって、エピゲノム制御に関するアルギニンメチル化の新しい関与の議論が始まっている。

(3) DNA 損傷応答とアルギニンメチル化

様々なストレスによって DNA は損傷を受けており、細胞内には様々な形で DNA の損傷を修復する仕組みが備わっている。ストレスを受けた細胞では、p53 タンパク質が DNA 障害ストレスに応答し、転写因子として DNA 修復や細胞周期停止、アポトーシス関連遺伝子の発現を制御する¹⁷⁾。p53 タンパク質は PRMT5 によってメチル化され、アポトーシス誘導能を抑制すると報告がある一方、PRMT5 による p53 タンパク質のメチル化は標的遺伝子の一つである p21 タンパク質の発現を上昇させることで、細胞周期停止能を活性化させる¹⁸⁾。これは PRMT5 を介した p53 タンパク質のメチル化がアポトーシス誘導と細胞周期停止の機能におけるスイッチの役割を有することとして考えられる。また、相同組換え修復と非相

同末端結合修復反応の両方に関与する DNA 修復酵素 MRE1 の修復活性には PRMT1 によるメチル化が重要な役割を果たすことが明らかになっている¹⁹⁾。これに加え、塩基除去修復に関わる DNA ポリメラーゼβが PRMT1 及び PRMT6 によってアルギニンメチル化され、塩基除去修復を正に制御する^{20),21)}。

4. アルギニンメチル基転移酵素の生物学的意義

哺乳類の PRMT については、現在 PRMT1 から PRMT8 まで遺伝子欠損マウスが作製され、多くの研究成果により PRMT を介したタンパク質アルギニンメチル化の生物学的意義が明らかになりつつある³⁾。ADMA や SDMA を触媒する主要な酵素である PRMT1 や PRMT5 の遺伝子欠損マウスは胚性致死を示しており^{22),23)}、生命の発生段階からアルギニンメチル化が重要な翻訳後修飾であることが示唆されているもののアルギニンメチル化の生体機能の研究は長年滞っていた。このような中、細胞内の 85% のアルギニンメチル化反応に寄与すると考えられている PRMT1 は、世界に先駆けて組織特異的な PRMT1 KO マウスを作製・解析され、心筋細胞での PRMT1 遺伝子の欠損は若年性拡張性心不全が発症して生後 2 ヶ月までに死亡すること、また神経細胞での欠損は髄鞘形成不全によって正常な脳の発達ができなくなり生後 10 日前後に死亡することや、血管内皮細胞の欠損では胎生 14 日から致死になることが明らかになっている^{24),25),26)}。

PRMT1 と最も高いアミノ酸の相同性 (83%) をもつ PRMT8 は、翻訳中 N-末端の脂肪酸修飾を介して唯一細胞膜に局在し、その発現組織は脳神経系に限局されるという特徴を有する²⁷⁾。PRMT8 KO マウスは、小脳神経細胞であるプルキンエ細胞の樹状突起発達や運動機能に顕著な異常を示し、神経細胞の発達や、脳機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった²⁸⁾。全ての PRMTs は、メチル

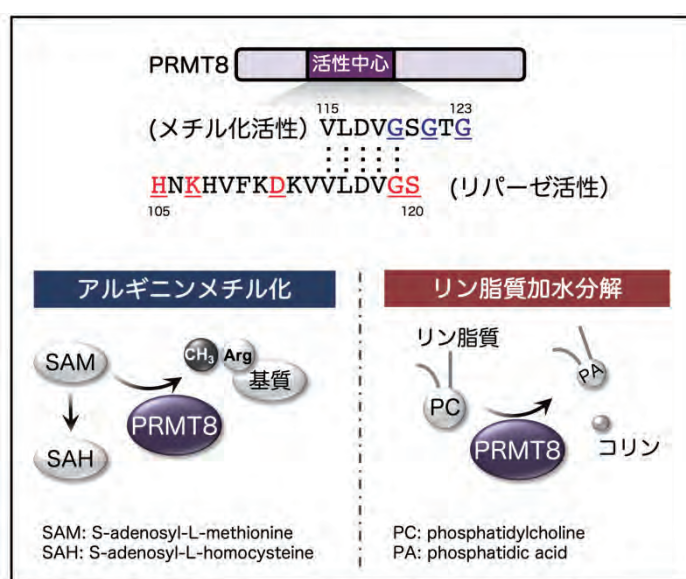


図3. PRMT8のメチル化活性とリパーゼ活性

基供与体 SAM と結合する「GxGxG モチーフ」を持ち、グリシンをアラニンに置換する点変異によって、その活性を失うことが知られている²⁹⁾。一方、リン脂質ホスファチジルコリンを分解するホスホリパーゼ D (PLD) ファミリーは、「HKD モチーフ」を活性中心とし、リジンがアルギニンに置換すると不活性になる³⁰⁾。興味深いことに、PRMT8 には、「GxGxG モチーフ」と「HKD モチーフ」が重複して保存されており (図 3)、PRMT1 と同様の基質特異性を持つアルギニンメチル化酵素であることに加え³¹⁾、リン脂質分解酵素活性を有する

ことで、細胞膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリンから、ホスファチジン酸とコリンを産生し、樹状突起の発達や神経伝達物質の代謝を介して運動機能を制御する²⁸⁾。

5. 非対称型ジメチルアルギニン (ADMA) の生理学的役割

メチル化されたタンパク質は、分解に伴って対称型ジメチルアルギニン (SDMA) と非対称型ジメチルアルギニン (ADMA) のメチル化アルギニン誘導体として血中を循環し、尿中で排出される。中でも ADMA は、血管の弛緩作用に働く一酸化窒素 (NO) の内皮型産生酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) の阻害分子として内皮細胞の機能障害や血管収縮を誘導することが知られている (図 4)。内皮細胞は、酸素や栄養素を全身へ循環させる血管の形成とその働きに必須であり、発生・発達中の哺乳類では内皮細胞が起点となって血管新生を進展させていく。血管内皮細胞の機能をつかさどる分子の一つとして、血管内皮型 eNOS が重要な働きをしていることが知られており、血管内皮細胞から分泌された NO は平滑筋を弛緩させ、これによって血圧や血流が調節される。一方、メチル化タンパク質の分解によって遊離する ADMA が eNOS に対して強力な阻害作用を示す³²⁾。さらに、血管内皮細胞の NO 産生の低下は、血管壁の炎症性増殖性変化を誘導や単球の血管壁への侵入を許し、血管内皮機能の障害が生じることによって炎症性疾患病変が発生する³³⁾。従って、メチルアルギニン産生の仕組みの理解は、体内における血圧制御機構や、その破綻による疾患発症の分子機序として創薬のターゲットの可能性を秘めてことから臨床的重要性を有する。

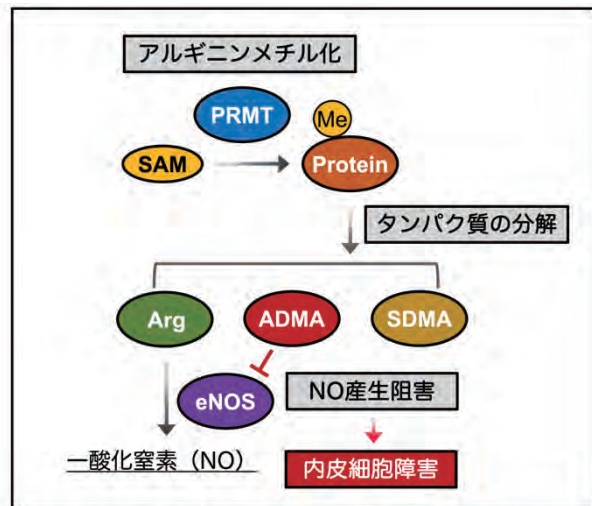


図4. 非対称型ジメチルアルギニンと内皮細胞の障害

おわりに

細胞内では、リン酸化が最もメジャーなタンパク質の翻訳後修飾である一方、アルギニンメチル化がそれに次ぐ修飾反応であることが報告された³⁴⁾。ヒストンを中心とするリジン残基のメチル化酵素の研究と比べるとその進展はゆっくりではあるが、PRMTs を介したアルギニンメチル化の細胞生物学的機能は、ヒストンおよび多くの非ヒストンタンパク質が PRMT の基質として明らかとなり、一定の理解が進んでいる。PRMT の新規基質に関する報告は日々更新されており、現在不明である PRMT10 と PRMT11 の酵素活性や基質特異性も同定されていくであろう。今後も PRMT 遺伝子の組織特異的なノックマウスや、CRISPR/Cas9 システムなどのゲノム編集技術を利用したマウスの作製や、個体機能の解析を通して、PRMT を介したアルギニンメチル化の役割解明に進展することが期待される。

文献

- 1) Paik, W.K., Paik, D.C., & Kim, S., *Trends Biochem. Sci.*, 32, 146-152, 2007.
- 2) Bedford, M.T. & Richard, S., *Mol. Cell*, 18, 263-272, 2005.
- 3) Blanc, R.S. & Richard, S., *Mol. Cell*, 65, 8-24, 2017.
- 4) Najbauer, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 15, 10501-10509, 1993.
- 5) Yamagata, K., et al., *Mol. Cell*, 32, 221-231, 2008
- 6) Araya, N., et al., *J. Biol. Chem.*, 14, 5427-5432, 2003.
- 7) Araya, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8, 653-660, 2005.
- 8) Teyssier, C., et al., *Genes Dev.*, 19, 1446-1473, 2005.
- 9) Xu, W., et al., *Science*, 21, 2507-2511, 2001.
- 10) Chevillard-Briet, M., et al., *EMBO J.*, 21, 5457-5466, 2002.
- 11) Huq, M.D.M., et al., *EMBO J.*, 25, 5094-55104, 2006.
- 12) Li, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 287, 40641-40651, 2012.
- 13) Blyth, S.A., et al., *Dev. Cell*, 19, 220-231, 2010.
- 14) Neault, M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 19, 9513-9521, 2012.
- 15) Ma, H., et al., *Curr. Biol.*, 11, 1981-1985, 2001.
- 16) Yang, Y., et al., *Mol. Cell*, 40, 1016-1023, 2010.
- 17) Toledo, F. & Wahl, G.M., *Nat. Rev. Cancer*, 6, 909-923, 2006.
- 18) Jansson, M., et al., *Nat. Cell Biol.*, 10, 1431-1439, 2008.
- 19) Boisvert, F-M., et al., *Mol. Cell Proteomics*, 2, 1319-1330, 2003.
- 20) El-Andaloussi, N., et al., *FASEB J.*, 21, 26-34, 2007.
- 21) El-Andaloussi, N., et al., *Mol. Cell*, 22, 51-62, 2006.
- 22) Pawlak, M.R., et al., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4859-4869, 2000.
- 23) Tee, W.W., et al., *Gens Dev.*, 24, 2772-2777, 2010.
- 24) Hashimoto, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 295, 2237-2245, 2016.
- 25) Ishimaru, T., et al., *J. Biochem.*, 161, 255-258, 2017.
- 26) Murata, K., et al., *iScience*, 26, 200-213, 2018.
- 27) Lee, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 280, 32890-32896, 2005.
- 28) Kim, J.D., et al., *Sci. Adv.*, 1, e1500615, 2015.
- 29) Kaga, R.M., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 417-427, 1994.
- 30) Xie, Z., et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 24962-24969, 2000.
- 31) Kim, J.D., et al., *Int. J. Mol. Med.*, 22, 309-315, 2008.
- 32) Karbach, S., et al., *Curr. Pharm. Des.*, 20, 3579-3594, 2014.
- 33) Ueda, S., et al., *J. Nephrol.*, 23, 377-386, 2010.
- 34) Larsen, S.C., et al., *Sci. Signal.*, 9: rs9., 23, 2016.

各部門・センターの活動と業績

研究開発部門

Department of Research and Development

資源開発分野

Division of Medicinal Resources

資源科学領域

Section of Pharmacognosy

教授	小松 かつ子	Prof. Katsuko Komatsu
准教授	當銘 一文	Assoc. Prof. Kazufumi Toume
助教	朱 姝	Assist. Prof. Shu Zhu
技術補佐員	バトソ ゴルホー	Research Assist. Zolboo Batsukh

◆研究目的

本領域では、生薬資源の永続的利用を目指して、アジア産薬用植物の遺伝学的、成分化学的、薬理学的多様性の解析を行い、代替生薬の開発、生薬の特徴を把握した効率的利用の促進、及び栽培薬用植物の選択に応用します。特に高齢者疾患や予防先制医療に応用可能な薬用植物を対象とし、それらを医薬品とするための品質保証の基盤を作るとともに、当該生薬の栽培化を図り国内での生薬生産に結びつける。

◆2021 年度研究概要

1. アジアにおける資源調査と薬用植物・生薬の多様性の解析

1) ウコン類：クルクミノイド合成に関与する酵素遺伝子の ILP パターン及び *trnK* 配列の解析から同定したアジア産 *Curcuma* 属 11 種の根茎の乾燥品及び生薬の粉末を固相マイクロ抽出 (SPME) し、GC-MS で分析した。その結果、同属植物は各種に特徴的な成分組成を示し、大きく 7 タイプ (*C. longa*; *C. phaeocaulis*, *C. aeruginosa* 及び *C. zedoaria*; *C. zanthorrhiza*; *C. aromatica* 及び *C. wenyujin*; *C. kwangsiensis*; *C. amada* 及び *C. mangga*; *C. comosa*) に分けられ、それぞれ bisabolane 型; elemene 型・germacrane 型; cedrane 型・bisabolane 型; germacrane 型; elemene 型・germacrane 型; caryophyllane 型; humulane 型または santalene 型・bisabolane 型のセスキテルペノイドを含有した。各タイプが示す成分組成は、ILP パターン及び *trnK* 配列が一致する生薬であれば、植物とほぼ同様であった。さらに、遺伝子解析で交配が示唆された生薬については、両親の植物種を反映したと思われる精油成分組成を示した。遺伝子情報に精油成分の情報を加えることにより、同属植物・生薬の同定が確実にできる可能性を示し、植物分類及び生薬の標準化に寄与できる結果が得られた (論文投稿中)。

2) 桂皮：ベトナム産、中国産の検体について SPME-GC-MS による精油成分分析を行い、得られたデータについて産地間差異を検討した。その結果、産地・系統の違いにより成分組成が異なりそれぞれの系統について特徴的な成分を明らかにした。とくに (*E*)-2-methoxycinnamaldehyde 及び coumarin はベトナム産の検体に多く HPLC による定量分析の結果からも裏付けられた。Coumarin は欧州食品安全機関などで肝障害を避けるための耐用一日摂取量が定められており、ベトナム産桂皮を漢方方剤の散剤や丸剤として用いる際には注意が必要であると示唆された。

3) 縮砂：*Amomum* 属 7 種 2 変種の特徴的 ITS 配列と比較することにより、日本のシュクシャ市場品を同定した結果、約 67% が現行の JP18 規定の基原植物 (グループ 1, *A. xanthioides*; 2, 中国産 *A. villosum* とその変種; 3, ラオス産 *A. villosum* var. *villosum* と *A. longiligulare*) に由来するもので、残りは主に *A. uliginosum* や *A. microcarpum* が混入するかまたはいずれかの単一品であった。GC-MS で 27 成分を同定し、その内 4 成分を定量したところ、camphor と bornyl acetate の比率により、前者が高いグループ 1, 3 と、後者が高いグループ 2, ほぼ同じ *A. uliginosum* に分けられた。また、*A. microcarpum* はこれら 2 成

分を含まず、高含量の(E)-nerolidol を含有した。各グループに特徴的な成分も見出され、精油成分による区別は ITS 配列による分子分類を支持した。以上、*Amomum* 属植物において分類学上の再編が必要であることを遺伝学的、成分化学的に示唆した (Sone et al., J. Nat. Med., 2022)。

2. 国内での薬用植物の栽培拡充を志向した研究

センブリ：栽培の効率化には、培地に播種し組織培養後、ロゼット苗の状態で圃場に移植して開花期まで生育させる「組織培養－圃場栽培」が有効で、本法では株当たりの乾燥重量が高くかつ swertiamarin を始めとする 11 成分の含量が市場流通生薬より高いかまたは同等であった。「組織培養－圃場栽培」で育てた高知県栽培種の開花時収穫物と高知県産市場品の LC-MS データを用いて判別分析を行った結果、前者の判別に isoorientin, swertisin, swertiamarin が寄与した。

3. 伝統薬物の活性成分の探索と構造解析

コンゴボロロから単離した抗トリパノソーマ作用を持つイリドイド配糖体：先行研究において抗マラリア作用を指標としたコンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉部の成分探索において、新規フェニルプロパノイド縮合型イリドイドを単離したが、さらなる探索を進め、新たに 3 種の新規フェニルプロパノイド縮合型イリドイド配糖体とともに、9 種の関連する既知イリドイド配糖体を含む 18 種の既知化合物を単離・構造決定した。このうち、既知イリドイドの molucidin 及び prismatomerin は強い抗トリパノソーマ作用を示した (IC₅₀ 4.67 及び 5.70 μM) (Hashim et al., J. Nat. Med. 2022)。

◆原著論文

- 1) Hashim Y, Toume K, Mizukami S, Ge YW, Taniguchi M, Teklemichael AA, Huy NT, Bodi JM, Hirayama K, Komatsu K. Phenylpropanoid conjugated iridoids with anti-malarial activity from the leaves of *Morinda morindoides*. J Nat Med. 2021 Sep;75(4):915-925. doi: 10.1007/s11418-021-01541-x.
- 2) Sone M, Zhu S, Cheng X, Ketphanh S, Swe S, Tun TL, Kawano N, Kawahara N, Komatsu K. Genetic diversity of *Amomum xanthioides* and its related species from Southeast Asia and China. J Nat Med. 2021 Sep;75(4):798-812. doi:10.1007/s11418-021-01512-2.
- 3) Komatsu K. [Current Status of Pharmaceutical Education for Self-medication and Quality Assurance: Based on Evaluation from the Questionnaire]. Yakugaku Zasshi. 2021 Jun;141(6):793-805. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.20-00217-3.
- 4) Araki R, Tachioka H, Kita A, Fujiwara H, Toume K, Matsumoto K, Yabe T. Kihito prevents corticosterone-induced brain dysfunctions in mice. J Tradit Complement Med. 2021 May;11(6), 513-519. doi: 10.1016/j.jtcme.2021.05.002.
- 5) Liu Q, Zhu S, Hayashi S, Iida O, Takano A, Miyake K, Sukrong S, Agil M, Balachandran I, Nakamura N, Kawahara N, Komatsu K. Discrimination of *Curcuma* species from Asia using intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase. J Nat Med. 2022 Jan;76(1):69-86. doi:10.1007/s11418-021-01558-2.
- 6) Liu Q, Zhu S, Hayashi S, Anjiki N, Takano A, Kawahara N, Komatsu K. Genetic analysis of *Curcuma* species from Asia based on intron regions of genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase. J Nat Med. 2022 Jan;76(1):276-280. doi:10.1007/s11418-021-01563-5.
- 7) Hashim Y, Toume K, Mizukami S, Kitami T, Taniguchi M, Teklemichael AA, Tayama Y, Huy NT, Lami JN, Bodi JM, Hirayama K, Komatsu K. Phenylpropanoid-conjugated iridoid glucosides from leaves of *Morinda morindoides*. J Nat Med. 2022 Jan;76(1):281-290. doi: 10.1007/s11418-021-01567-1.
- 8) Ngwe Tun MM, Toume K, Luvai E, Nwe KM, Mizukami S, Hirayama K, Komatsu K, Morita K. The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro. J Nat Med. 2022 Jan 10. doi:10.1007/s11418-021-01596-w.
- 9) Sone M, Komatsu K, Zhu S, Cheng X, Ketphanh S, Kawahara N. Essential oil components in the seed masses of *Amomum xanthioides* and its related species from Southeast Asia and China. J Nat Med. 2022 Mar;76(2):435-450. doi: 10.1007/s11418-021-01599-7.
- 10) Tatsimo SJN, Tamokou JDD, Toume K, Havyarimana L, Ekom S, Komatsu K. A new

megastigmane, known porphyrinic and galloylated bioactive derivatives from the leaves of *Gymnosporia senegalensis*. J Chem Res. 2021 Dec 22. doi: 10.1177/17475198211072498.

- 11) Wang Z, Okutsu K, Yoshizaki Y, Futagami T, Tamaki H, Maruyama T, Toume K, Komatsu K, Takamine K. Effects of microbial fermentation on the enzyme activities and volatile properties in *Massa Medica Fermentata*. Trad. & Kampo Med. 2021 Nov 30. doi: 10.1002/tkm2.1303.

◆著書

- 1) 小松かつ子. 品質保証に係るモノからの健康・医療へのアプローチ. 日本学術会議薬学委員会医療系薬学分科会発出. 東京: 日本学術会議; 2021 Nov. 2 セルフメディケーションと品質保証に関する薬学教育の現状と課題; p.5-7, 13-19.
- 2) 小松かつ子. 第2章生薬の歴史, 第3章生薬の基原植物の形態と分類. 木内文之, 小松かつ子, 三巻祥浩編. 東京: 南江堂; 2022 Feb. パートナー生薬学 改訂第4版; p.15-29, 31-50.

◆総説

- 1) 小松かつ子. 伝統薬のサステナビリティと標準化を志向した薬用植物・生薬の多様性解析研究. 和漢医薬学総合研究所年報. 2021 Apr; 47:2-13.

◆学会報告

(国際学会)

- 1) Hashim Y, Toume K, Mizukami S, Kitami T, Tayama Y, Huy NT, Lami JN, Bodi JM, Hirayama K, Komatsu K. Discovery of active components from *Morinda morindoides* toward the development of anti-malarial drug. 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021; 2021 Sep 15-17; 富山 (オンライン).
- 2) Dong YZ, Toume K, Zhu S, Tamura T, Yoshimatsu K, Komatsu K. Chemical profiling and multivariate analysis of peony root by NMR spectroscopy. 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021; 2021 Sep 15-17; 富山 (オンライン).
- 3) Liu QD, Komatsu K, Toume K, Zhu S, Hayashi S, Anjiki N, Kawahara N, Takano A, Miyake K., Nakamura N. Essential oil composition of medicinally used *Curcuma* species from Asia based on HS-SPME-GC-MS analysis. The 11th JCK Joint Symposium on Pharmacognosy; 2021 Sep 18-19; 東京 (オンライン).
- 4) Hashim Y, Toume K, Mizukami S, Kitami T, Tayama Y, Huy NT, Lami JN, Bodi JM, Hirayama K, Komatsu K. Phenylpropanoid conjugated iridoid glucosides from leaves of *Morinda morindoides* and their anti-trypanosomal activity. The 11th JCK Joint Symposium on Pharmacognosy; 2021 Sep 18-19; 東京 (オンライン).

(国内学会)

- 1) 小松かつ子. 薬用植物の多様性の解析と生薬の標準化. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台 (オンライン).
- 2) Batsukh Zolboo, 當銘一文, 奥津果優, 丸山卓郎, 白鳥誠, 近藤誠三, 山本豊, 横倉胤夫, 河野徳昭, 小松 かつ子. シンキクの標準化を目指したLC/MS分析法の開発(2). 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4-5; 金沢 (オンライン).
- 3) 仲光はるの, 王子泰, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 河野徳昭, 當銘一文, 小松かつ子, 高峯和則. 漢方用薬「神麴」の製造時における植物添加の影響. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4-5; 金沢 (オンライン).
- 4) 川崎亮平, 福田寛美, 朱姝, 當銘一文, 吉松嘉代, 河野徳昭, 山本和彦, 田村隆幸, 村上守一, 小松かつ子. センブリの人工水耕栽培法の開発と作出物の品質保証に関する研究(1). 日本生薬学会第67回年会; 2021 Sep 19-20; 東京 (オンライン).
- 5) 北見駿典, 當銘一文, 白焱晶, Pham Thanh Huyen, 林茂樹, 川原信夫, 山本豊, 小松かつ子. 桂皮の成分多様性の解析に基づく品質評価. 日本生薬学会第67回年会; 2021 Sep

- 19-20 ; 東京 (オンライン).
- 6) 久保山友晴, 堀田健一郎, 浅沼舞, 当銘一文, 山崎琢磨, 小松かつ子. マイクログリア M2 化活性に着目した長野県産大黃の品質評価. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).
 - 7) 吉松嘉代, 山本和彦, 河野徳昭, 熊谷健夫, 渊野裕之, 川原信夫, 川崎亮平, 小松かつ子, 由井秀紀, 金子倫久, 高田泰生. センブリのバイオナーサリーシステムの開発. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).
 - 8) 阪元清量, 蓮田知代, 深谷晴彦, 一柳幸生, Zhu Shu, 小松かつ子. タマビャクブ *Stemona tuberosa* より得られた新規アルカロイドについて. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).

◆その他

- 1) 小松かつ子. 「薬用植物の多様性の解析と生薬の標準化」NPO 法人富山のくすし, 令和 3 年度漢方医学と生薬講座 (第 2 回). 2021 Jun 5. 富山.
- 2) Komatsu K. Quality Evaluation of Crude Drugs (Herbal Drugs). PMDA-ATC Quality Control (Herbal Medicine) Webinar 2021. 2021 Jun 22. 富山 (オンライン).
- 3) 当銘一文. 「くすり・毒になる天然の成分」NPO 法人富山のくすし, 令和 3 年度漢方医学と生薬講座 (第 3 回). 2021 Jul 3. 富山.
- 4) 小松かつ子. 「アジアを舞台にした生薬研究の醍醐味」和漢医薬学総合研究所第 25 回夏期セミナー. 2021 Jul 10. 富山 (オンライン).
- 5) 小松かつ子. 「世界の民族薬物 和漢医薬学総合研究所附属民族薬物資料館の紹介」富山大学サマースクール〈創薬・製剤コース〉. 2021 on WEB. 2021 Sep 6. 富山 (オンライン).
- 6) Komatsu K. Comprehensive study on diversity of medicinal resources and the application for standardization and sustainable uses of herbal drugs. International Symposium on Access to Mongolian Bioresource. 2021 Sep 21. ウランバートル (オンライン).
- 7) 小松かつ子. 野外で薬草を観察する会, 富山県薬事総合研究開発センター. 2021 Oct 3. 富山市立山山麓自然遊歩道.
- 8) 小松かつ子. 「遺伝子から見た世界の薬用植物トピックス生薬」漢方薬・生薬認定薬剤師研修会. 2021 Oct 17. 東京.
- 9) 小松かつ子. 伝統薬のサステナビリティと標準化を志向した薬用植物の多様性解析研究. 薬用植物フォーラム 2021. 2021 Oct 27. 筑波 (オンライン).
- 10) 小松かつ子. 「民族薬物資料館アーカイブス with 私」和漢医薬学総合研究所第 35 回民族薬物資料館一般公開特別講演. 2021 Nov 7. 富山.
- 11) 小松かつ子. 「民族薬物資料館」日本漢方生薬ソムリエ協会第 3 回 Zoom 談話会. 2021 Nov 8. 金沢 (オンライン).
- 12) 小松かつ子. 「生薬資源科学研究の総括: 生薬の持続可能性と標準化を指向した薬用植物の多様性解析研究」富山薬窓会富山・石川合同支部総会講演会. 2021 Nov 13. 富山 (オンライン).
- 13) 当銘一文. 「くすり・毒になる天然の成分」令和 3 年度富山市民大学「生活医学薬学を学ぶ」. 2021 Dec 3. 富山.
- 14) 小松かつ子. 「民族薬物資料館現地学習」令和 3 年度富山市民大学「生活医学薬学を学ぶ」. 2021 Dec 15. 富山.
- 15) 小松かつ子. 「生薬は生きている～薬用植物・生薬の多様性を活かす」小松かつ子教授 定年退任記念シンポジウム. 2022 Mar 12. 富山 (対面・オンライン).
- 16) 当銘一文. 「牛車腎気丸の構成生薬「シャゼンシ」からの抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究」小松かつ子教授 定年退任記念シンポジウム. 2022 Mar 12. 富山 (対面・オンライン).

- 17) 小松かつ子. 「富山とアジアを繋ぐ生薬研究の醍醐味」NPO 法人富山のくすし, 令和3年度漢方医学と生薬講座 (第9回). 2022 Mar 26. 富山.

◆共同研究

(海外)

- 1) 蔡少青 (中国・北京大学薬学院): 中国の薬用植物資源と生薬の標準化に関する研究, 2018~2021
- 2) Dr. Khin Zaw (ミャンマー・保健省伝統医療局): Field Research, and Genetic and Chemical Analyses on Myanmar Medicinal Plant, 2016~2021
- 3) Galzad Javzan Batkhoo (モンゴル・モンゴル国立大学): Field Research, and Chemical Analysis on Mongolian Medicinal Plants, 2017~2021

(国内)

- 1) 丸山卓郎, 袴塚高志, 合田幸広 (国立医薬品食品衛生研究所): 次世代医薬品の効率的実用化推進のための品質評価技術基盤の開発, 2017~2021
- 2) 川原信夫 ((独)国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター): 薬用植物の国内栽培推進を指向した基盤技術及び創薬資源の開発に関する研究, 2016~
- 3) 吉松嘉代 ((独)国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター): 薬用植物種苗供給の実装化を指向した開発研究, 2018~
- 4) 田村隆幸 (富山県薬用植物指導センター): 早期生薬生産・成分評価システムの構築, 2018~
- 5) 大槻 崇 (日本大学生物資源科学部): 和漢薬の品質評価を目指した定量 NMR に関する研究, 2014~
- 6) 中村賢一, 岩島 誠 (鈴鹿医療科学大学薬学部): ヒト腸内細菌による C-配糖体代謝反応に関する研究, 2013~2021
- 7) 平山謙二, 水上修作 (長崎大学熱帯医学研究所): 伝統医薬を基盤とする抗マラリア薬の開発, 2016~2021
- 8) 平山謙二, 水上修作 (長崎大学熱帯医学研究所): 漢方方剤・和漢薬由来新規抗トリパノソーマ薬の探索, 2017~
- 9) 奥津果優 (鹿児島大学農学部), 丸山卓郎 (国立医薬品食品衛生研究所): 麹菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立, 2017~2021
- 10) 丸山卓郎 (国立医薬品食品衛生研究所): 植物性医薬品開発のための和漢薬の網羅的精密分析, 2019~
- 11) 高野昭人 (昭和薬科大学), 三宅克典 (東京薬科大学): 日本薬局方収載生薬の基原植物の学名に関する課題の検討, 2018~2021
- 12) 森田公一, Mya Myat Ngwe Tun, 平山謙二, 水上修作 (長崎大学熱帯医学研究所): COVID-19 感染症に有効な漢方方剤・和漢薬の探索, 2020~

(学内)

- 1) 東田千尋 (和漢医薬学総合研究所): 漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化, 2016~2021
- 2) 東田千尋 (和漢医薬学総合研究所): 高齢者疾患を制する和漢薬研究: 製品化に向けた臨床研究と品質研究, 2020~
- 3) 早川芳弘 (和漢医薬学総合研究所): 抗腫瘍エフェクター細胞の機能に作用する生薬成分の探索, 2019~
- 4) 久米利明 (大学院医学薬学研究部): 生体内抗酸化酵素を誘導する生薬成分に関する研究, 2019~

◆研究費取得状況

- 1) 日本学術振興会科学研究費助成事業，基盤研究(C)（第1年度）（代表：小松かつ子）「神経疾患に有効な高付加価値「大黃」の開発研究」
- 2) 日本学術振興会科学研究費助成事業，基盤研究(C)（第1年度）（代表：當銘一文）「和漢薬の品質評価を指向した網羅的成分プロファイリング」
- 3) 日本学術振興会科学研究費助成事業，基盤研究(C)（第4年度）（代表：當銘一文）「和漢薬複合成分の精密プロファイリング技術の確立」
- 4) 日本学術振興会科学研究費助成事業，基盤研究(C)（第4年度）（代表：朱 姝）「遺伝子解析を活用したサラシアの資源探索：中国産 *Salacia* 属の多様性解析」
- 5) 平成29年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構，創薬基盤推進研究事業「次世代医薬品の効率的実用化推進のための品質評価技術基盤の開発」（協力：小松かつ子，朱 姝，當銘一文）「原料生薬の遺伝子解析を利用した品質標準化と理化学試験に関する研究」
- 6) 平成30年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構，創薬基盤推進研究事業「薬用植物種苗供給の実装化を指向した開発研究」（分担：小松かつ子，協力：當銘一文，朱 姝）：「早期生薬生産・成分評価システムの構築」
- 7) 第8回（令和元年度）公益財団法人小林財団 研究助成（代表：當銘一文，分担：小松かつ子，朱 姝）「単味生薬製剤の開発を指向した有用生薬からの活性成分探索とその定量分析法の確立」
- 8) 富山大学運営費交付金機能強化費（分担：小松かつ子，當銘一文，朱 姝）「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
- 9) 令和2年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究，特定研究（総括：小松かつ子，分担：當銘一文，朱 姝）「高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析」
- 10) 富山県受託研究「アカデミア創薬支援事業（アンメットメディカルニーズ創薬・製剤研究）」（分担：小松かつ子，當銘一文，朱 姝）「高齢者疾患を制する和漢薬研究：製品化に向けた臨床研究と品質研究」

◆研究室在籍者

学部4年生：小菅智正，木本花音，堀田知里

大学院修士2年：川崎亮平

大学院博士2年：董 昱卓（10月入学）

大学院博士3年：Yasinjan Hashim（10月入学，12月まで），劉 群棟（10月入学，9月まで），今井美佳子

研究支援員：福田寛美

外国人客員研究員：Yasinjan Hashim（2022, 1-3月），劉 群棟（2021, 10-12月）

協力研究員：中村賢一（鈴鹿医療科学大学，2021, 4/1~2022, 3/31），

嶋舞（同志社女子大学，2021, 4/1~2022, 3/31）

◆学位（修士，博士）取得者

修士論文

川崎亮平：センブリの人工水耕栽培法の開発と作出物の品質保証に関する研究

博士論文

Yasinjan Hashim：

マラリア治療薬等の開発を指向した *Morinda morindoides* からの活性成分の探索

(Search of active components from *Morinda morindoides* toward malarial therapeutic drugs development)

劉 群棟：

Study on genetic polymorphism and essential oil composition of Asian *Curcuma* species and crude drugs for standardization

(アジア産 *Curcuma* 属植物・生薬の遺伝子多型と精油成分組成に基づく標準化研究)

今井美佳子：

薬用 *Amomum* 属植物の遺伝子多型と種子塊の精油成分組成に基づく生薬シュクシャの標準化研究 (Study on genetic polymorphism and essential oil composition of medicinally-used *Amomum* species and crude drugs for standardization of Amomi Semen)

研究開発部門

Department of Research and Development

資源開発分野

Division of Medicinal Resources

天然物創薬学領域

Section of Natural Products & Drug Discovery

【天然物化学ユニット】

教授	森田 洋行	Prof. Hiroyuki Morita
助 教	児玉 猛	Assist. Prof. Takeshi Kodama
助 教	中嶋 優	Assist. Prof. Yu Nakashima
研究員	ネット ネット ウィン	Postdoctoral Fellow Nwet Nwet Win (～7月)

【天然薬物開発ユニット】

准教授	スレス アワレ	Assoc. Prof. Suresh Awale
研究員	アシュラフ モハメド オマル	Postdoctoral Fellow Ashraf Mohammed Omar
研究員	チェン ジョアー	Postdoctoral Fellow Chen Zhuoer (～7月)
研究員	キム ミンジョ	Postdoctoral Fellow Kim Minjo (～9月)
研究員	マネエト ジュヤマルト	Postdoctoral Fellow Maneenet Juthamart (12月～)
研究員	ソン シカ	Postdoctoral Fellow 孫 思嘉 (10月～)

◆研究目的

2つの研究ユニットがそれぞれの視点に基づき、和漢薬をはじめとする世界の天然資源から有用天然物を探索し、医薬品等開発シードを世に提供することを主たる目的とする。さらに、それぞれのユニットが異なった研究手法を用いて、さらなる有用化合物の開発と作用機序の解明を図る。

天然物化学ユニット

- ・ 天然有機化合物の生合成経路の解明
- ・ 二次代謝酵素の立体構造基盤の確立
- ・ 新規医薬品開発を目指した酵素機能の改変
- ・ 植物、微生物、海洋生物からの生理活性物質の探索
- ・ アジアにおける未利用薬用資源の探索

天然薬物開発ユニット

- ・ ヒト膵臓がん細胞（例、PANC-1, MIA Paca2, KLM-1, NOR-P1, Capan-1, PSN-1など）を利用して、がん細胞の栄養飢餓耐性を標的とした (antiausterity strategy), 各地の伝統生薬（漢方生薬, アユルヴェーダ生薬など）の抗がん活性のスクリーニング
- ・ 活性を指標にして最先端のクロマトグラフ及び分光分析 (NMR, MS, UV, IR, CDなど) 技術を活用し、成分を分離・精製ならびに同定による天然薬物資源から栄養飢餓耐性を解除する活性物質 (antiausterity agent) の探索。有望な候補物質は、ヒト膵臓がんのマウスモデルを用いた *in vivo* での抗腫瘍活性効果の評価を行う
- ・ 活性天然化合物の構造活性相関研究ならびに栄養飢餓耐性を解除する機序の解明
- ・ Orbitrap-MS および FT-NMR 手法の活用による、活性物質 (antiausterity agent) の膵臓がん細胞の代謝に対する影響の解析

◆2021 年度研究概要

天然物化学ユニット

1. 沈香芳香成分フェノルクロモンの骨格形成を担う生合成酵素の同定と機能解析

沈香の基原植物 牙香樹 *Aquilaria sinensis* の培養細胞において、その芳香成分の蓄積と相関して発現量の高まる新規Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) にフェニルプロピオニル CoA とベンゾイル CoA 及びマロニル CoA を基質として作用させると、沈香の芳香成分の基本骨格を生成することを明らかにした。これにより、これまで不明であった沈香芳香成分の生合成がこれまで予想されていた経路とは全く異なった経路で生合成されることを明らかにした。さらに、本酵素の結晶構造を解明し、種々変異実験を行うことで、本酵素がファミリー酵素とは異なった反応経路で芳香成分への変換を触媒していることを明らかにした。今後、他の薬用植物が生産する有効成分の生合成に関わる酵素の解明を目指す。

2. カンナビノイドの生合成における 2 種の鍵酵素の機能改変

アサ *Oryza sativa* が生産するテトラヒドロカンナビノールは医薬品としても重要な天然物である。最近では、その 3 位アルキル側鎖アナログ体に新たな医薬品としての興味が持たれている。本研究では、アサのカンナビノイドの生合成において最初の基本骨格を構築する 2 種の鍵酵素、アサ由来テトラケタイド合成酵素 (TKS) とオリベトール酸閉環酵素 (OAC) について、各々の結晶構造に基づき変異を導入し、その共反応物について精査した。その結果、TKS については、190 番目のロイシンをグリシンに、OAC においては、24 番目のフェニルアラニンにイソロイシンに変換すると、炭素数 12 までのアルキル側鎖を有するオリベトール酸アナログまでの生産能力を獲得することを明らかにした。野生型を用いた場合では、炭素数 8 のアルキル側鎖を有するオリベトール酸アナログまでしか生産できなかったが、本機能改変により、そのアルキル側鎖を 4 炭素増やしたオリベトール酸アナログの生産を可能にしたことになる。今後、両酵素にさらなる変異を加えることで、さらに嵩高いアルキル側鎖を有するオリベトール酸アナログの生産を目指す。

天然薬物開発ユニット

Natural Drug Discovery Laboratory has extensively focused on the discovery of anti-austerity agents from medicinal plants of wide different origins, clarification of the molecular mechanism, and *in vivo* evaluation of selected agents. Aside from that, this laboratory has achieved broader national and international collaboration in anticancer drug discovery. Briefly, the research activities can be summarized as follows.

1. Guggulsterone derivatives (GSDs) were identified as new-generation anticancer agents in collaboration with the Faculty of Pharmaceutical Sciences (Prof. Matsuya). These agents can exert preferential cytotoxic activity only under nutrient-deprived conditions without toxicity under normal conditions. GSDs inhibits the activation of the Akt/mTOR signaling pathway.
2. In collaboration with Khon Kaen University, Kleeb Bua Daeng (KBD, a Thai Traditional Herbal Formula) has been investigated for its multitarget effect on unpredictable chronic mild stress-induced depression. KBD was found to promote neurogenesis by upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cyclic AMP-responsive element-binding (CREB) mRNA expression in the frontal cortex and hippocampus.
3. Panduratin A and GDP, the active constituent from *B. pandurata* have been found to induce PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway.
4. Phytochemical investigation of *Betula alnoides* extract led to the isolation of eleven compounds, including six new compounds, named betuphenones A-F. The absolute configuration of new compounds was established by computational ECD calculations using the density functional theory.
5. Phytochemical investigation of *Nelumbo nucifera* petals led to the isolation of nine benzyloquinoline alkaloids. Among these, (-)-lirinidine was found to be a potent cytotoxic agent against the HeLa cancer cell line. Benzyloquinoline alkaloids skeleton are the promising scaffold for the anticancer drug development against cervical cancer.
6. Phytochemical investigation of Thai *Piper ribesoides* led to the isolation of six compounds, including two

new polyoxygenated cyclohexane derivatives, named ribesoidones A and B.

7. A new anti-austerity agent, 4'-*O*-methylgrynullarin from *Derris scandens* has been discovered as a potent anticancer agent against PANC-1 human pancreatic cancer cell line under nutrition starvation via inhibition of Akt/mTOR pathway.

富山くすりコンソーシアム Project: We evaluated over 300 synthetic compounds (T-Series, N-Series) for their anti-austerity activity against human pancreatic cancer cells. The mode of action of the selected compounds has been confirmed. *In vivo* evaluation of selected investigational drugs including those for “Goboshi” extract against MIA PaCa-2 CDX model and orthotopic models have been completed.

Future direction: Natural Drug Discovery Laboratory will continue to expand the international collaboration and explore new natural anticancer agents, investigate the effect of newly discovered compounds against cancer cell metabolism using Orbitrap-MS and ZipChip technology, continue research under 富山くすりコンソーシアム project for the drug development against pancreatic cancer, and thus, contributing better health to the global human society.

◆原著論文

【天然物化学ユニット】

- 1) Brasnett A, Pfeffer I, Brewitz L, Chowdhury R, Nakashima Y, Tumber A, McDonough MA, Schofield CJ. Human Oxygenase Variants employing a Single Protein Fe^{II} Ligand Are Catalytically Active. *Angew Chem Int Ed*. 2021 Jun 21;60(26):14657-14663. doi: 10.1002/anie.202103711.
- 2) Prema, Kodama T, Nyunt HHW, Ngwe H, Abe I, Morita H. Anti-Vpr Activities of Sesqui- and Diterpenoids from the Roots and Rhizomes of *Kaempferia candida*. *J Nat Med*. 2021 Jun;75(3):489-498. doi: 10.1007/s11418-020-01480-z.
- 3) Brewitz L, Nakashima Y, Tumber A, Salah E, Schofield CJ. Fluorinated Derivatives of Pyridine-2,4-Dicarboxylate Are Potent Inhibitors of Human 2-Oxoglutarate Dependent Oxygenases. *J Fluor Chem*. 2021 Jul;247:109804. doi: 10.1016/j.jfluchem.2021.109804.
- 4) Figg Jr WD, McDonough MA, Chowdhury R, Nakashima Y, Zhang Z, Holt-Martyn JP, Krajnc A, Schofield CJ. Structural Basis of Prolyl Hydroxylase Domain Inhibition by Molidustat. *ChemMedChem*. 2021 Jul 6;16(13):2082-2088. doi: 10.1002/cmdc.202100133.
- 5) Abdellatef AA, Fathy M, Mohammed AEI, Bakr MSA, Ahmed AH, Abbass HS, El-Desoky AH, Morita H, Nikaido T, Hayakawa Y. Inhibition of Cell-intrinsic NF-κB Activity and Metastatic Abilities of Breast Cancer by Aloe-emodin and Emodic-acid Isolated from *Asphodelus microcarpus*. *J Nat Med*. 2021 Sep;75(4):840-853. doi: 10.1007/s11418-021-01526-w.
- 6) Win NN, Kodama T, Htoo ZP, Hnin SY, Ngwe H, Abe I, Morita H. Shanpanootols G and H, Diterpenoids from the Rhizomes of *Kaempferia pulchra* Collected in Myanmar and Their Vpr Inhibitory Activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2021;69(9):913-917. doi: 10.1248/cpb.c21-00326.
- 7) Choucry MA, Shalabi AA, El Halawany AM, El-Sakhawy FS, Zaiter A, Morita H, Chaimbault P, Abdel-Sattar E. New Pregnane Glycosides Isolated from *Caralluma hexagona* Lavranos as Inhibitors of α-Glucosidase, Pancreatic Lipase, and Advanced Glycation End Products Formation. *ACS Omega*. 2021 Jul 19;6(29):18881-18889. doi: 10.1021/acsomega.1c02056.
- 8) Shin MK, Sasaki F, Ki DW, Win NN, Morita H, Hayakawa Y. Identification of *Ophiocordyceps gracilioides* by Its Anti-tumor Effects through Targeting the NFκB-STAT3-IL-6 Inflammatory Pathway. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(5):686-690. doi:10.1248/bpb.b20-01032.
- 9) Shin MK, Sasaki F, Ki DW, Win NN, Morita H, Hayakawa Y. Anti-metastatic Effects of Ergosterol Peroxide from the Entomopathogenic Fungus *Ophiocordyceps gracilioides* on 4T1 Breast Cancer Cells. *J Nat Med*. 2021 Sep;75(4):824-832. doi:10.1007/s11418-021-01520-2.
- 10) Mori T, Wanibuchi K, Morita H, Abe I. Amide Bond Formation Using 4-Coumarate:CoA Ligase

- from *Arabidopsis thaliana*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2021 Aug 1;69(8):717-720. doi: 10.1248/cpb.c21-00404.
- 11) Tabakam GT, Kodama T, Donfack ARN, Nguekeu YMM, Nomin-Erdene B, Htoo ZP, Do KM, Ngouela SA, Tene M, Morita H, Awouafack MD. A New Caffeic Acid Ester and a New Ceramide from the Roots of *Eriosema glomeratum*. Phytochem Lett. 2021 Nov;45:82-87. doi: 10.1016/j.phytol.2021.07.019
 - 12) Bui HTB, Do KM, Nguyen HTD, Mau HV, Danh TLD, Tran DQ, Morita H. Efficient One-pot Tandem Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of 2,3-Disubstituted Quinazolin-4(3*H*)-one Derivatives. Tetrahedron. 2021 Nov;98:e132426. doi: 10.1016/j.tet.2021.132426.
 - 13) Hoang NN, Kodama T, Win NN, Prema, Do KM, Abe I, Morita H. A New Monoterpene from the Rhizomes of *Alpinia galanga* and Its Anti-Vpr Activity. Chem Biodivers. 2021 Aug 20:e2100401. doi: 10.1002/cbdv.202100401.
 - 14) Win NN, Kodama T, Aye AA, Lae KZW, Ngwe H, Han NM, Abe I, Morita H. Pyrrolactams from Marine Sponge *Stylissa massa* Collected from Myanmar and Their Anti-Vpr Activities. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2021;69(7):702-705. doi:10.1248/cpb.c21-00227.
 - 15) Mbopi PY, Fozeng HDS, Nguekeu YMM, Bitchagno GTM, Ngantchouko CBN, Awouafack MD, Opatzc T, Ngouela SereA, Morita H, Tenea M. Chemical Constituents, Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Bactericidal Effect of *Dicliptera verticillate* (Acanthaceae). S Afr J Bot. 2021 Nov;142:216-221. doi: 10.1016/j.sajb.2021.07.001.
 - 16) Nakashima Y, Brewitz L, Tumber A, Salah E, Schofield CJ. 2-Oxoglutarate Derivatives Can Selectively Enhance or Inhibit the Activity of Human Oxygenases. Nat Commun. 2021 Nov 10;12(1):6478. doi: 10.1038/s41467-021-26673-2.
 - 17) Okada T, Wu N, Takashima K, Ishimura J, Morita H, Ito T, Kodama T, Yamasaki Y, Akanuma SI, Kubo Y, Hosoya KI, Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T, Shimizu T, Sakai H, Dwoskin LP, Hussaini SR, Saporito RA, Toyooka N. Total Synthesis of Decahydroquinoline Poison Frog Alkaloids *ent-cis*-195A and *cis*-211A. Molecules. 2021 Dec 12;26(24):7529. doi:10.3390/molecules26247529.
 - 18) Jaisi A, Prema, Madla S, Lee YE, Septama A, Morita H. Investigation of HIV-1 Viral Protein R Inhibitory Activities of Twelve Thai Medicinal Plants and Their Commercially Available Major Constituents. Chem Biodivers. 2021 Dec;18(12):e2100540. doi: 10.1002/cbdv.202100540.
 - 19) Muslimin R, Nishiura N, Teshima A, Do KM, Kodama T, Morita H, Lewis CW, Chan G, Ayoub AT, Arakawa K. Chemoenzymatic Synthesis, Computational Investigation, and Antitumor Activity of Monocyclic Lankacidin Derivatives. Bioorg Med Chem. 2022 Jan 1;53:116551. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116551.
 - 20) Lee YE, Nakashima Y, Kodama T, Chen X, Morita H. Dual Engineering of Olivetolic Acid Cyclase and Tetraketide Synthase to Generate Longer Alkyl-Chain Olivetolic Acid Analogs. Org Lett. 2021 Dec 23. doi:10.1021/acs.orglett.1c04089.
 - 21) Wang XH, Gao BW, Nakashima Y, Mori T, Zhang ZX, Kodama T, Lee YE, Zhang ZK, Wong CP, Liu QQ, Qi BW, Wang J, Li J, Liu X, Abe I, Morita H, Tu PF, Shi SP. Identification of a Diarylpentanoid-producing Polyketide Synthase Revealing an Unusual Biosynthetic Pathway of 2-(2-Phenylethyl)chromones in Agarwood. Nat Commun. 2022 Jan 17;13(1):348. doi: 10.1038/s41467-022-27971-z.
 - 22) Do KM, Kodama T, Shin M-K, Nu LHT, Nguyen HM, Dang SV, Shiokawa K, Hayakawa Y, Morita H. Marginols A–H, unprecedented pimarane diterpenoids from *Kaempferia marginata* and their NO inhibitory activities. Phytochemistry. 2022 Apr 196:113109. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113109.
 - 23) Do KM, Shin MK, Kodama T, Win NN, Prema P, Nguyen HM, Hayakawa Y, Morita H. Flavanols and Flavanones from *Crinum asiaticum* and Their Effects on LPS Signaling Pathway Through the Inhibition of NF- κ B Activation. Planta Med. in press. doi:10.1055/a-1585-5877.

【天然薬物開発ユニット】

- 1) Umeyama L, Hardianti B, Kasahara S, Dibwe DF, Awale S, Yokoyama S, Hayakawa Y. Anti-inflammatory effects of *Morus alba* Linne bark on the activation of toll-like receptors and imiquimod-induced ear edema in mice. *BMC Complement Med Ther.* 2021 Apr 9;21:115. doi: 10.1186/s12906-021-03291-5.
- 2) Maneenet J, Monthakantirat O, Daodee S, Boonyarat C, Chotritthirong Y, Kwankhao P, Pitiporn S, Awale S, Chulikhit Y. Merging the Multi-Target Effects of Kleeb Bua Daeng, a Thai Traditional Herbal Formula in Unpredictable Chronic Mild Stress-Induced Depression. *Pharmaceuticals.* 2021 Jul 9;14(7):659. doi: 10.3390/ph14070659.
- 3) Sun S, Omar AM, Kim MJ, Phan ND, Chulikhit Y, Awale S. Chemical constituents of Thai *Piper ribesoides* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Fitoterapia.* 2021 Jun;151:104901. doi:10.1016/j.fitote.2021.104901.
- 4) Omar AM, Sun S, Kim MJ, Phan ND, Tawila AM, Awale S. Benzophenones from *Betula alnoides* with Antiausterity Activities against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J Nat Prod.* 2021 May 28;84(5):1607-1616. doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00150.
- 5) Sun S, Dibwe DF, Kim MJ, Omar AM, Phan ND, Fujino H, Pongterdsak N, Chaithatwatthana K, Phrutivorapongkul A, Awale S. A new anti-austerity agent, 4'-O-methylgrynullarin from *Derris scandens* induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death under nutrition starvation via inhibition of Akt/mTOR pathway. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021 May 15;40:127967. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127967.
- 6) Maneenet J, Omar AM, Sun S, Kim MJ, Daodee S, Monthakantirat O, Boonyarat C, Chulikhit Y, Awale S. Benzylisoquinoline alkaloids from *Nelumbo nucifera* Gaertn. petals with antiausterity activities against the HeLa human cervical cancer cell line. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2021 May 24;76(9-10). doi:10.1515/znc-2020-0304.
- 7) Sun S, Kim MJ, Omar AM, Duy Phan N, Aoike M, Awale S. GDP Induces PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Death Preferentially under Nutrient Starvation by Inhibiting PI3K/Akt/mTOR/Autophagy Signaling Pathway. *Chem Biodivers.* 2021 Sep;18(9):e2100389. doi: 10.1002/cbdv.202100389.
- 8) Sun S, Kim MJ, Omar AM, Phan ND, Awale S. (+)-Panduratin A induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway. *Phytomedicine Plus.* 2021 Nov; 1(4): 100101. DOI:10.1016/j.phyplu.2021.100101
- 9) Kohyama A, Kim MJ, Yokoyama R, Sun S, Omar AM, Phan ND, Meselhy MR, Tsuge K, Awale S, Matsuya Y. Structure-activity relationship and mechanistic study on guggulsterone derivatives; Discovery of new anti-pancreatic cancer candidate. *Bioorg Med Chem.* 2021 Dec 11;54:116563. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116563.

◆著書

【天然物化学ユニット】

- 1) Win NN, Morita H. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 114. Kinghorn A.D., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J., Asakawa Y., Liu J-K. eds. Singapore: Springer; 2021 May. Bioactive Compounds from Medicinal Plants in Myanmar; p.135-251.

◆学会報告

【天然物化学ユニット】

(国際学会)

- 1) Hoang NN, Kodama T, Win NN, Prema, Do KM, Abe I, Morita H. A new monoterpene isolated from the rhizomes of *Alpinia galanga* and its anti-Vpr activity. 第11回日中韓生薬学合同シンポジウム; 2021 Sep 18-19; 東京 (オンライン).

(国内学会)

- 1) 西浦菜摘, Muslimin R, Wong CP, Prema, 森田洋行, Ayoub AT, 荒川賢治. 計算機シミュレーションを用いたランカサイジンの抗腫瘍活性向上. 2021 年度 (第 35 回) 日本放線菌学会 ; 2021 Sep 18-19 ; オンライン.
- 2) 内山駿, 丸山千登勢, Hamdy SAMA, 中嶋優, 森田洋行, 濱野吉十. Streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の変異解析. 2021 年度 (第 35 回) 日本放線菌学会 ; 2021 Sep 18-19 ; オンライン.
- 3) Lee Y-E, Kodama T, Ki D, Dairi T, Morita H. Flavonoids from *Woodfordia fruticosa* as potential SmltD inhibitors in the alternative biosynthetic pathway of peptidoglycan. 日本生薬学会第 67 回年会 ; 2021 Sep 19-20 ; 東京 (オンライン).
- 4) Do KM, Shin M-K, Kodama T, Hayakawa Y, Morita H. Flavanols and flavanes from *Crinum asiaticum* and their effects on LPS signaling pathway through the inhibition of NF- κ B activation. 日本生薬学会第 67 回年会 ; 2021 Sep 19-20 ; 東京 (オンライン).
- 5) Lee Y-E, Nakashima Yu, Kodama T, Chen X, Morita H. Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase to generate longer alkyl-chain olivetolic acid analogs. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会 ; 2021 Nov 14 ; 金沢 (オンライン).
- 6) 中嶋優, Hamdy SAMA, 内山駿, 丸山千登勢, 濱野吉十, 森田洋行. X 線結晶構造解析に基づく抗生物質 glycyllthricin 生合成酵素に見られる基質特異性の解明. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会 ; 2021 Nov 14 ; 金沢 (オンライン).
- 7) 棚谷綾介, 児玉猛, 森田洋行, Awale S, 田浦太志. 大麻プレニル移酵素 CsPT4 が合成する非天然型新規カンナビノイド. 第 23 回天然薬物の開発と応用シンポジウム ; 2021 Nov 16-17 ; 札幌 (オンライン).
- 8) Lee Y-E, 児玉猛, Ki D, 大利徹, 森田洋行. 新奇ペプチドグリカン生合成経路中の SmltD に対する阻害剤としての可能性を秘めた *Woodfordia fruticosa* 由来フラボノイド. 第 23 回天然薬物の開発と応用シンポジウム ; 2021 Nov 16-17 ; 札幌 (オンライン).
- 9) 内山駿, 丸山千登勢, Hamdy SAMA, 中嶋優, 森田洋行, 濱野吉十. Streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見いだした aminoacyl-tRNA 依存型アミド合成酵素の変異解析. 第 73 回日本生物工学会大会 ; 2021 Nov 27-29 ; オンライン.

【天然薬物開発ユニット】

(国際学会)

- 1) Takuya Okada, Keita Yokoyama, Lanke Prudhvi, Yuri Chino, Suresh Awale, Naoki Toyooka. Synthesis of piperonaline derivatives as potential anti-austerity agents that eliminates cancer cells' tolerance to nutrition starvation. 13th AIMECS; 2021 Dec 2; オンライン.

(国内学会)

- 1) 横山慧太, Lanke Prudhvi, 千野友莉, 岡田卓哉, Sijia Sun, Min J. Kim, Ashraf M. Omar, Suresh Awale, 豊岡尚樹. がん微小環境に焦点を当てた新規膀胱がん治療薬候補化合物の創製: 新規 piperonaline 誘導体の合成と構造-活性相関研究. 創薬懇話会 2021 in 京都 ; ポスター発表, 2021 Jun 24-25 ; 京都 (オンライン).
- 2) 山岸美月, 西川裕也, 岡田卓哉, Suresh Awale, 豊岡尚樹. がん微小環境に焦点を当てた新規膀胱がん治療薬の開発研究 -新規 Nicolaoidesin C 誘導体の合成および活性評価-. 2021 年度 有機合成化学北陸セミナー ; 口頭発表, 2021 Sep 29 ; オンライン.
- 3) Lanke Prudhvi, Keita Yokoyama, Yuri Chino, Takuya Okada, Sijia Sun, Min J. Kim, Ashraf M. Omar, Suresh Awale, Naoki Toyooka. Synthesis and evaluation of piperonaline derivatives as anti-austerity agents under nutrient-deprived conditions. 2021 年度 有機合成化学北陸セミナー ; 口頭発表, 2021 Sep 29 ; オンライン.
- 4) 荒田瑠香, 児玉有理, 宮口萌, 岡田卓哉, Suresh Awale, 豊岡尚樹. 栄養飢餓選択的毒性が期待されるイソフラボン誘導体の合成. 2021 年度 有機合成化学北陸セミナー ; 口頭発表, 2021 Sep 29 ; オンライン.

◆その他

【天然物化学ユニット】

- 1) Lee Y-E, Kodama T, Ki D, Dairi T, Morita H. Flavonoids from *Woodfordia fruticosa* as potential SmltD inhibitors in the alternative biosynthetic pathway of peptidoglycan. 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021; 2021 Sep; Basel (オンライン).
- 2) Do KM, Shin M-K, Kodama T, Hayakawa Y, Morita H. Flavanols and flavanes from *Crinum asiaticum* and their effects on LPS signaling pathway through the inhibition of NF- κ B activation. 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021; 2021 Sep; Basel (オンライン).
- 3) 森田洋行. 植物ポリケタイド骨格生合成酵素鍵酵素の機能解析と改変. 第16回国際伝統医薬シンポジウム富山 2021 セッション4 (特別セミナー); 2021 Nov; 富山 (オンライン).

【天然薬物開発ユニット】

- 1) Sun S, Kim MJ, Omar AM, Phan ND, Awale S. Panduratin A induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway. 6th Toyama-Basel symposium; 2021 Sep 15-17; Basel (オンライン).
- 2) Omar AM, Sun S, Kim MJ, Phan ND, Tawila AM, Awale S. Benzophenones from *Betula alnoides* with antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. 6th Toyama-Basel symposium; 2021 Sep 15-17; Basel (オンライン).
- 3) Suresh Awale. すい臓がんの克服をめざした天然薬物研究最前線. 第一薬科大学講演, 2021 Jun 14; オンライン.
- 4) Suresh Awale. すい臓がんの克服をめざした漢方由来のゴボウシの研究. 2021 年度富山大学杉谷地区研究発表会; 2021 Jun 4; 富山.

◆受賞

【天然物化学ユニット】

- 1) Yuan-E Lee : 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム ショートプレゼンテーション 優秀発表賞「新奇ペプチドグリカン生合成経路中の SmltD に対する阻害剤としての可能性を秘めた *Woodfordia fruticosa* 由来フラボノイド」2021, 10.

【天然薬物開発ユニット】

- 1) Suresh Awale : 2021 年度富山大学杉谷地区研究発表会 (前期) 基礎研究部門 奨励賞「Investigation on Goboshi extract as a potential anti-pancreatic cancer agent」2021, 7.
- 2) Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Nguyen Duy Phan, Suresh Awale. : 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021 ポスター賞「(+)-Panduratin A induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway」2021, 9.

◆共同研究

【天然物化学ユニット】

(海外)

- 1) Subehan Ambo Lallo (インドネシア・ハサヌディン大学薬学部) : インドネシア産天然資源からの生物活性化合物の単離・構造決定, 2016~
- 2) Prema (ミャンマー・ヤンゴン大学化学部) : ミャンマー産薬用植物の生物活性化合物に関する研究, 2016~
- 3) Dan Hu (中国・暨南大学薬学部) : メチル基転移酵素の結晶構造解析と機能同定, 2019~
- 4) Shepo Shi (北京中医薬大学) : 新規III型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析, 2019~
- 5) Hoai Thi Nguyen (ベトナム・フエ大学医学薬学部) : ベトナム産天然資源中の化学成分の解析, 2016~
- 6) Bui Thi Buu Hue (ベトナム・カントー大学自然化学部) : 細胞毒性を有する新規アルカロ

イドの合成, 2019～

- 7) Christopher J Schofield (英国・オックスフォード大学化学部) : 2-オキソグルタル酸オキシゲナーゼ天然阻害剤の探索, 2021～
- 8) Maurice D. Awouafack (カメルーン・チャング大学) : カメルーン産薬用植物からの生物活性化合物の探索, 2021～

(国内)

- 1) 大利 徹 (北海道大学大学院工学研究院) : 新規ラセマーゼの触媒機構の解析, 2017～
- 2) 尾仲宏康 (東京大学大学院農学生命科学科) : ゴードスポリン耐性作用メカニズムの構造学的解析, 2018～
- 3) 荒川賢治 (広島大学大学院先端物質科学研究科) : 新規マクロライド環化酵素の触媒機構の解析, 2019～
- 4) 濱野吉十 (福井県立大学生物資源学科生物資源学研究科) : Streptothricin 類縁体生合成酵素の X 線結晶構造解析, 2020～

(学内)

- 1) 田浦太志 (薬学部) : 大麻カンナビノイド生合成の改変, 2018～

【天然薬物開発ユニット】

(海外)

- 1) Prof. Gerhard Bringmann (Institut fuer Organische Chemie, Universitat Wuerzburg, Germany) : Discovery of potential natural anticancer agents, 2016～
- 2) Prof. Heiko Ihmels (Universitaet Siegen, Germany): Synthesis of naphthylisoquinoline alkaloids as potential anticancer agent against pancreatic cancer, 2020～
- 3) Prof. Hermann Stuppner (Institute of Pharmacy/Pharmacognosy, University of Innsbruck, Austria): Discovery of novel secondary metabolites from higher plants with anticancer activities, 2017～
- 4) Prof. Simon Lewis (Department of Chemistry, University of Bath, United Kingdom): Synthesis of grandifloracin analogues as the potential anticancer agents, 2017～
- 5) Dr. Sirivan Athikomkulchai (タイ・シーナカリンウィロート大学) : タイ薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究, 2011, 4～
- 6) Dr. Ampai Phrutivorapongkul (タイ・チェンマイ大学) : タイ薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究, 2017～
- 7) Dr. Surya Kant Kalauni (ネパール・トリブバン大学) : ネパール薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究, 2011, 4～
- 8) Dr. Mai Thanh Thi Nguyen (ベトナム・国立ホーチミン市大学) : ベトナム薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究, 2011, 4～
- 9) Dr. Bhusan Shakya (ネパール・トリブバン大学) : 栄養飢餓耐性を標的とする合成抗がん物質の探索研究, 2012, 4～
- 10) Prof. Jakob Magolan (Department of Chemistry, University of Idaho, USA (Current affiliation, Chemistry & Chemical Biology, McMaster University)): Synthesis of coumarin derivatives as antiausterity agents, 2012, 4～
- 11) Prof. Mark Coster (Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University, Australia): Total synthesis of antiausterity agents, 2015, 10～
- 12) Prof. Lih-Geeng Chen (Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Taiwan): Screening of Taiwanese medicinal plants for antiausterity activity and discovery of natural anticancer agents, 2015, 9～
- 13) Prof. Yu-Jang Li (Department of Applied Chemistry, National Chiayi University, Taiwan): Synthesis of antiausterity strategy based anticancer agents, 2015, 9～

(国内)

- 1) 上田純也 (広島国際大学薬学部) : 天然物由来 antiausterity 化合物の検索, 2015～

(学内)

- 1) 藤井 努 (医学部), 奥村知之 (附属病院): 選択した化合物の抗膵臓癌活性に関する研究, 2018～
- 2) 豊岡尚樹 (工学部・生命工学科): 天然物から着想を得た抗がん剤の合成, 2016～
- 3) 渡辺志朗 (和漢医薬学総合研究所): エゴマ葉の成分分析とその新に関する研究その新規活用法, 2016～
- 4) 松谷裕二 (薬学部): 合成 Guggulsterone 誘導体の antiausterity 評価, 2018～
- 5) 田浦太志 (薬学部): 生合成された CBGA 誘導体の抗膵臓癌活性, 2020～
- 6) 高崎一朗 (工学部・生命工学科): NR4a1 拮抗薬の antiausterity 活性に関する研究, 2018～

◆研究費取得状況

【天然物化学ユニット】

- 1) 基盤(A) (代表: 大利徹, 分担: 森田洋行) 「新規ペプチドエピメラーゼ類の反応基盤解明」
- 2) 若手研究 (代表: 児玉猛) 「沈香芳香成分フェニルクロモンの骨格形成酵素の精密機能解析と機能の拡張」
- 3) 小林国際奨学金財団研究助成 (代表: 児玉猛) 「ベトナム産天然資源からのヘム依存性二量体化蛋白質 PGRM1 の阻害活性物質の探索」
- 4) 田村科学技術振興財団下期助成 (代表: 児玉猛) 「モノテルペンインドールアルカロイドの生合成に関与するシトクロム P450 による非天然型新規アルカロイド類の創出」

◆研究室在籍者

【天然物化学ユニット】

学部 6 年生: 三宅弘士
大学院修士 1 年: 韓 嘯傑
大学院修士 1 年: Saw Yu Yu Hnin
大学院修士 1 年: Zin Paing Htoo
大学院修士 2 年: Hoang Nam Nhat (9 月修了)
大学院博士 1 年: Hoang Nam Nhat (10 月入学)
大学院博士 1 年: 邊 揮庸
大学院博士 2 年: Kiep Minh Do
大学院博士 2 年: 高 準徽
大学院博士 3 年: Yuan-E Lee
大学院博士 3 年: Sherif Ahmed Muhammed Ahmed Hamdy
研究生: 銭 荘 (10 月～)

【天然薬物開発ユニット】

学部 3 年生: 尾島智遥
学部 3 年生: 黒田真弘
学部 4 年生: 佐藤真央
学部 5 年生: 溝口美生
学部 5 年生: 高橋郁衣
学部 6 年生: 青池 滂

◆学位 (修士, 博士) 取得者

【天然物化学ユニット】

修士論文

Hoang Nam Nhat : Isolation of chemical constituents from *Alpinia galanga* collected from

Myanmar and their anti-Vpr activities

【天然薬物開発ユニット】

博士論文

Sijia Sun : Chemical Constituents and Anti-pancreatic Cancer Activities of Selected Thai Medicinal Plants

研究開発部門

Department of Research and Development

病態制御分野

Division of Bioscience

神経機能学領域

Section of Neuromedical Science

【神経機能学ユニット】

教授 東田 千尋

Prof. Chihiro Tohda

助教 楊 熙蒙

Assist. Prof. Ximeng Yang

助教 稲田 祐奈

Assist. Prof. Yuna Inada

【和漢薬知統合学ユニット】

准教授 東田 道久

Assoc. Prof. Michihisa Tohda

◆研究目的

神経機能学ユニット

- ・神経機能の維持・亢進に関わる神経回路形成機序
- ・アルツハイマー病，脊髄損傷，頸椎症，サルコペニア，緑内障に対する根本的治療を目指した和漢薬研究
- ・神経機能を制御する，中枢神経と末梢臓器のクロストークの分子基盤
- ・基礎研究を植物性医薬品開発，漢方方剤の効能拡大に繋げるための臨床研究
- ・ヒトの心身の健康状態に影響する要因分析とバイオマーカーの探索

和漢薬知統合学ユニット

- ・和漢薬理論に対するエビデンスの提供とそれを基盤にした新たな研究戦略の提供
- ・生体反応に寄り添った和漢薬独自の作用の解明とそれに基づく超低濃度作働性治療薬の開発
- ・和漢薬理論に立脚したうつ病の分類，発症機序の解明と，新規抗うつ薬の開発
- ・「抗がん薬副作用による心不全」「致死性再発心筋梗塞」を予防する和漢薬処方の開発

◆2021 年度研究概要

1) 認知症に関する研究

ウマ胎盤エキスによる抗アルツハイマー病効果を検討し，同エキスにはアミロイド β 存在下の環境において神経新生を促進する効果があることを見出した（論文 1）。また，以前の我々のヒト胎盤エキスの研究から見出した GPPGPAG ペプチドに関してさらに研究を進め，同ペプチドは経口投与後に脳内に移行し，アルツハイマー病モデルマウスの記憶障害と樹状突起減少を改善する作用があることとその分子ターゲットを明らかにした（論文 2）。フェヌグreekエキスをアルツハイマー病モデルマウスに経口投与すると脳内にトリゴネリンが移行し，記憶障害が改善されることを見出した（論文 5）。

若齢のアルツハイマー病モデルマウスの骨格筋を廃用性筋萎縮させると，記憶障害発症が早まる現象を初めて見出し，その機序として，骨格筋からのヘモペキシン分泌が増加し，それが脳に移行して脳内炎症を引き起こすことを明らかにした（論文 3）。現在，ヘモペキシンの分泌抑止による認知症の発症抑制について検討している。

2) 脊髄損傷に関する研究

脊髄損傷慢性期のマウスに，ジオスゲニンを髄腔内投与すると，運動機能が改善し，脊髄内の軸索密

度も増加することを見出した（論文4）。

3) 基礎研究を植物性医薬品開発に繋げるための臨床研究

これまで、ジオスゲニンやジオスゲニン高濃度ヤマモエキスに関して、アルツハイマー病モデルマウスでの記憶障害改善用や正常マウスでの記憶亢進作用（基礎研究）と、健常人での認知機能亢進作用（臨床研究）示してきた。現在、ジオスゲニン高濃度ヤマモエキスに関して、軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症への効果を検討する特定臨床研究を実施中である。

またこれまで、脊髄損傷モデルマウスにおいて運動機能障害改善作用を示し（基礎研究）、ロコモティブシンドロームでの歩行機能改善作用を示した（臨床研究）ニクジュウエキスに関して、頸椎症性脊髄症患者の機能改善効果を検討する特定臨床研究を実施中である。

4) 和漢薬作用の独自性に関する研究（和漢薬知統合学ユニット）

和漢薬・漢方薬の独自の特性として a) 生体に作働薬として作用（純薬のほとんどが抑制薬）、b) 生薬の組み合わせ効果（対薬）、c) 超微量成分の有効性、が考えられる。これらを明らかにすることにより、和漢薬に関する新しい研究戦略の提供とそれに基づく治療戦略の構築を目指した研究を、2020年度までに構築した120種生薬個々の成分プロファイルと細胞作用の基礎的検討（形態変化観察と発現遺伝子ライブラリーの構築）を出発点として推進している。

補中益気湯についての解析をすすめ、セロトニン 2C 受容体に対して強力な作働薬として作用する分子量 283.14 の超微量物質を升麻中に電気生理学的手法で見出した（構造未決定：a）、c）項目（和漢薬知統合学論文2）。その構造決定を進めるとともに、補中効果における対薬の柴胡および、利益気効果における対薬の黄耆との相互作用に関して検討を進めている（b項目）。黄耆の作用に関しては、培養細胞レベルにおける small RNA 発現変化をマイクロアレイ法により見出して解析している。また、和漢薬による気への効果が全身性作用を介している可能性を MRI を用いて示すための基礎的検討と手法取得を続けている。

大黃と黄連は相互作用により個々に有する強い細胞毒性を相互に打ち消しあうことを見出した。その効果は両者を一緒に抽出することではじめて現われることから、ベルベリンの沈殿化だけでは説明できず（和漢薬知統合学論文3：b項目）、その分子的メカニズムに関しての解析を続けている。

抗がん薬副作用としての心不全を予防する効果のある新規処方の人参附子湯を基盤にして開発することを目的として、マイクロアレイ法とそれに続く network pharmacology 解析により標的機能分子群を数種同定した（和漢薬知統合学論文1）。それに基づく詳細解析を進めるとともに、あわせる対薬群の効果についてもバイタルサインを指標にした全身性作用視点から解析を進める予定である。

生薬の中には、細胞死情報伝達機構に関しての強い選択性を示すものが少なくない。太陽病期内での感染重症化（傷寒論で言うところの“伝経”）抑制の観点から、それらのいくつかの生薬とそれを含む処方に関して、その組み合わせと関連遺伝子の発現解析変化との相関性を検討するとともに、臨床応用の可能性に関しての network pharmacology 解析にも着手している。

◆原著論文

【神経機能学ユニット】

- 1) de Toledo A, Nomoto K, Hirano E, Tohda C. Horse Placental Extract Enhances Neurogenesis in the Presence of Amyloid β . *Nutrients*. 2021 May 14;13(5):1672. doi: 10.3390/nu13051672.
- 2) Tohda C, Kogure C, Nomoto K, de Toledo A, Yang X, Hirano E. A Novel Heptapeptide, GPPGPAG Transfers to the Brain, and Ameliorates Memory Dysfunction and Dendritic Atrophy in Alzheimer's Disease Model Mice. *Front Pharmacol*. 2021 May 14;12:680652. doi: 10.3389/fphar.2021.680652.
- 3) Nagase T, Tohda C. Skeletal muscle atrophy-induced hemopexin accelerates onset of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021 Dec;12(6):2199-2210. doi: 10.1002/jcsm.12830.
- 4) Nakano A, Yang X, Kuboyama T, Inada Y, Tohda C. Intrathecal infusion of diosgenin during the chronic phase of spinal cord injury ameliorates motor function and axonal density. *Neurochem J*.

2021;15(4):454-461.

- 5) Farid MM, Nagase T, Yang X, Nomoto N, Kuboyama T, Inada Y, Tohda C. Effects of *Trigonella foenum-graecum* seeds extract on Alzheimer's disease transgenic model mouse and its potential active compound transferred to the brain. 日本食品化学学会誌. 2021; 28(2): 63-70. https://doi.org/10.18891/jjfc.28.2_63.

【和漢薬知統合学ユニット】

- 1) Zhao Q, Tohda M. Clarifying the pharmacological mechanisms of action of Shenfu Decoction on cardiovascular diseases using a network pharmacology approach. Drug Discov Ther. 2021 Sep 22;15(4):197-203. doi:10.5582/ddt.2021.01071.
- 2) Tohda M, Zhao Q, Kobayashi N, Kazuma K. Use of an electrophysiological technique for stepwise detection of trace agonist constituents of Hochuekkito in *Xenopus* oocytes injected with serotonin 2C receptor mRNA. Drug Discov Ther. 2021;15(3):143-149. doi: 10.5582/ddt.2021.01037.
- 3) Suzuki R, Zhao Q, Hosokai H, Tohda M. Examination of the molecular mechanism of the mutual inhibitory effect of each cytotoxicity caused by the combined extraction of *Coptidis Rhizoma* and *Rhei Rhizoma*: An example of providing evidence for 'herbal pair' theory. Traditional & Kampo Medicine.2021; 8(3):187-193. doi: <https://doi.org/10.1002/tkm.1295>.

◆学会報告

【神経機能学ユニット】

(国際学会)

- 1) Inada Y. Scientific elucidation of the optimal lifestyle for subjective good health. 2021 Association for Psychological Science Virtual Convention; 2021 May 26-27; Virtual.
- 2) Nagase T, Tohda C. Skeletal muscle atrophy-induced hemopexin accelerates onset of cognitive impairment in Alzheimer's disease. The 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021; 2021 Sep 15-17; Basel (Online).
- 3) Nagase T, Tohda C. Skeletal muscle atrophy accelerates onset of cognitive impairment in Alzheimer's disease via hemopexin delivery from muscle to the brain. ISN-APSN School, Behavioral Analysis Models for Neurochemical Research; 2021 Dec 9-10; Singapore (Online).

(国内学会)

- 1) 楊熙蒙, 東田千尋. Diosgenin によって軸索が再伸長し記憶が改善する分子メカニズムの解明. 第2回和漢医薬学会若手研究者フォーラム〜芽吹け! 若手の和漢薬研究〜; 2021 Sep 3; 金沢 (オンライン).
- 2) 須山真聡, 楊熙蒙, 野本かおり, 東田千尋. ニクジュヨウエキスによる後縦靭帯骨化症の運動機能改善作用の検討. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4; 金沢 (オンライン).
- 3) 稲田祐奈, 楊熙蒙, 東田千尋. ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの効果. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4; 金沢 (オンライン).
- 4) 楊熙蒙, 近藤麻布, 東田千尋. 運動神経から骨格筋への軸索投射を促進する和漢薬の探索. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4; 金沢 (オンライン).
- 5) 東田千尋, 小谷篤, 須山真聡, 野本かおり. ニクジュヨウエキスによる慢性期脊髄損傷の運動機能改善とそのメカニズム. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4; 金沢 (オンライン).
- 6) 久保山友晴, 荒毛優太, 南雲美咲, 小湊誠也, 東田千尋. 遠志成分 sibiricose A5 による抗アルツハイマー病作用. 第38回和漢医薬学会学術大会; 2021 Sep 4; 金沢 (オンライン).
- 7) 東田千尋, 楊熙蒙, 稲田祐奈. Diosgenin 含有山薬エキスによる認知機能向上作用: マウスおよび健常人での検討. 日本生薬学会第67回年会; 2021 Sep 19; 東京 (オンライン).
- 8) Suyama M, Yang X, Nomoto K, Tohda C. Effects of *Cistanche tubulosa* extract on motor function in ossification of posterior longitudinal ligament model mice. 第64回日本神経化学学会大会;

- 2021 Sep 30 ; 奈良 (オンライン).
- 9) Shibue S, Tohda C. Investigation of drug effects on optic nerve growth in a mouse model of normal tension glaucoma. 第 64 回日本神経化学学会大会 ; 2021 Sep 30 ; 奈良 (オンライン).
 - 10) Nagase T, Tohda C. Skeletal muscle atrophy increases hemopexin secretion and accelerates the onset of cognitive impairment in Alzheimer's disease. 第 64 回日本神経化学学会大会 ; 2021 Sep 30 ; 奈良 (オンライン).
 - 11) Yang X, Tohda C. Molecular mechanisms for long-distance axonal regeneration in the brain of Alzheimer's disease model mouse. 第 64 回日本神経化学学会大会 ; 2021 Sep 30 ; 奈良 (オンライン).
 - 12) Tohda C, Inada Y, Yang X. Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults. 第 64 回日本神経化学学会大会 ; 2021 Sep 30 ; 奈良 (オンライン).
 - 13) 東田千尋, 楊熙蒙, 稲田祐奈. Diosgenin によるアルツハイマー病脳内での軸索修復作用と臨床研究への展開. 第 94 回日本生化学大会 シンポジウム「健康長寿社会に向けた和漢薬研究の新展開」; 2021 Nov 03 ; 横浜 (オンライン).
 - 14) Yang X, Tohda C. Diosgenin promotes long-distance axonal regeneration in the brain and recovers memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. 第 95 回日本薬理学会年会 ; 2022 Mar 8 ; 福岡.
 - 15) 楊熙蒙, 東田千尋. Diosgenin がアルツハイマー病モデルマウスの脳内で軸索を再伸長させる分子メカニズムの解明. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; 名古屋 (オンライン).

◆特許

【神経機能学ユニット】

- 1) Tohda C, Kaku T, Miyazaki H ; 株式会社日本生物製剤, 富山大学 assignee. PEPTIDE FOR IMPROVING MEMORY. 第 2019-7024313 号 (韓国). 2021 Dec 13.

◆その他

【神経機能学ユニット】

- 1) Yang X, Tohda C. Diosgenin is a candidate drug for stimulating axonal regeneration in the brain and recovering memory deficits in Alzheimer's disease. 第 16 回国際伝統医薬シンポジウム・富山 2021 The 16th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama 2021 ; 2021 Nov 30 ; 富山 (オンライン).
- 2) 東田千尋. 「和漢薬と創薬」和漢薬からの創薬を目指した基礎研究と臨床研究. 富山大学サマースクール 創薬・製剤コース 2021 on WEB ; 2021 Sep 6-Dec 15 ; 富山 (オンライン).
- 3) 東田千尋. 脳活動を高めるヤマイモエキス. 令和 3 年度南砺市市民大学 ; 2021 Oct 19 ; 富山.
- 4) 東田千尋. 認知症に効果のある和漢薬. 令和 3 年度富山市民大学「生活医薬学を学ぶ」; 2021 Nov 12 ; 富山.
- 5) 東田千尋. 認知症に有効な漢方薬・生薬. 漢方薬・生薬薬剤師講座 ; 2021 Nov 20 ; 東京 (オンライン).
- 6) 「ニクジュヨウ 歩行機能改善示唆 ヒト試験富山大和漢研が報告」. 健康産業流通新聞 (FAX 速報) : 2021 Mar 22. (※昨年度未記載)
- 7) 「アルツハイマーヤマイモ新薬臨床研究 新聞折り込み活用協力者, 続々と」. 富山新聞 (朝刊) : 2021 Apr 3.
- 8) 「筋肉の衰え 記憶に悪影響 富大が研究 認知症原因物質を分泌」. 富山新聞 (朝刊) : 2021 Oct 22.
- 9) 「筋肉萎縮で認知症に 分泌物が発症加速 富山大東田教授ら発表」. 北日本新聞 (朝刊) : 2021 Oct 22.

- 10) 東田千尋. 女性研究者のキャリアと起業 女性研究者が事業化を進める上での課題やその解決策を探る. 仙台市ビジネス創出支援プログラム SENDAI NEW PUBLIC ; 2021 Oct 18 ; 仙台 (オンライン).
- 11) 東田千尋. 認知症治療への挑戦. BeneTV, 2021 Nov 16 (オンライン).
- 12) 東田千尋. 認知症に有効な和漢薬. NPO 法人富山のくすし 漢方医学と生薬講座 ; 2022 Feb 26 ; 富山.

◆受賞

【神経機能学ユニット】

- 1) 楊熙蒙 : 第 2 回和漢医薬学会若手研究者フォーラム 優秀発表賞「Diosgenin によって軸索が再伸長し記憶が改善する分子メカニズムの解明」2021 Sep 3.
- 2) 東田千尋, 楊 熙蒙, 稲田祐奈 : 日本生薬学会第 67 回年会 優秀発表賞 「Diosgenin 含有山薬エキスによる認知機能向上作用 : マウスおよび健常人での検討」2021 Sep 19.
- 3) Suyama M, Yang X, Nomoto K, Tohda C.: 第 64 回日本神経化学学会大会 若手道場優秀発表賞受賞 「Effects of Cistanche tubulosa extract on motor function in ossification of posterior longitudinal ligament model mice」 2021 Sep 30.
- 4) Nagase T, Tohda C.: 第 64 回日本神経化学学会大会 若手道場優秀発表賞受賞 「Skeletal muscle atrophy increases hemopexin secretion and accelerates the onset of cognitive impairment in Alzheimer's disease」 2021 Sep 30.
- 5) 楊熙蒙 : 第 95 回日本薬理学会年会 年会優秀発表賞「Diosgenin promotes long-distance axonal regeneration in the brain and recovers memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease」 2022 Mar .

◆共同研究

【神経機能学ユニット】

(国内)

- 1) 徳田隆彦 (量子科学技術研究開発機構) : 軸索修復の血漿バイオマーカーの研究, 2019～
- 2) 日本生物製剤 : 胎盤抽出物の中枢神経機能における効果の検討, 2015～
- 3) 内山奈穂子 (国立医薬品食品衛生研究所) : 高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの品質評価法に関する研究, 2021～

(学内)

- 1) 小松かつ子 (和漢医薬学総合研究所) : 神経変性疾患に有効な伝統薬物分子の探索とその治療戦略, 2010～
- 2) 小松かつ子 (和漢医薬学総合研究所), 渡り英俊 (和漢診療科), 鈴木道雄 (神経精神科), 田渕明子 (薬学部) : 富山大学機能強化プロジェクト「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」2016～
- 3) 鈴木道雄 (神経精神科) : 特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験, 2020～
- 4) 川口善治 (整形外科) : 特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験, 2021～
- 5) 林龍二 (臨床腫瘍部) : 特定臨床研究「慢性閉塞性肺疾患 (COPD)患者に対するニクジュヨウエキスの忍容性試験, 2021～

◆研究費取得状況

【神経機能学ユニット】

- 1) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 B (代表 : 東田千尋)「慢性期脊髄損傷の薬物治療 ; 骨格筋萎縮と軸索断裂を改善する生薬医薬品の開発研究」
- 2) 富山大学運営費交付金機能強化費 (代表 : 東田千尋, 分担 : 楊熙蒙, 稲田祐奈)「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」

- 3) 富山大学運営費交付金機能強化費（代表：川口善治，分担：東田千尋，稲田祐奈）「頰椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討する臨床研究とリバーストランスレーショナルリサーチによるメカニズム解析」
- 4) 文部科学省研究費補助金 挑戦的研究（萌芽）（代表：甲斐田大輔，分担：東田千尋）「ユビキチンプロテアソーム系活性化剤を用いた新規アルツハイマー病治療法の開発」
- 5) 富山県アンメットメディカルニーズ創薬・製剤研究（代表：東田千尋）「高齢者疾患を制する和漢薬研究：製品化に向けた臨床研究と品質研究」
- 6) 文部科学省研究費補助金 若手研究（代表：楊熙蒙）「脳内の軸索再伸長をターゲットとしたアルツハイマー病の根本的治療法の開発」
- 7) アイドリング脳科学研究センター 2020年度（第1回）「研究（創作）助成」（代表：楊熙蒙）「アルツハイマー病におけるアイドリング脳の機能改善：デフォルト・モード神経回路の修復に基づく治療薬開発」
- 8) 文部科学省研究費補助金 若手研究（代表：稲田祐奈）「言語発達を考慮した幼児用嗅覚検査の開発」
- 9) AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業「生薬及び漢方製剤の品質評価試験法の開発及び標準化に関する研究」（代表：袴塚高志，補助事業参加者：東田千尋）

◆研究室在籍者

【神経機能学ユニット】

学部3年生：金田みづほ
 学部3年生：羽柴圭悟
 学部3年生：永田朋也
 学部4年生：渋谷省吾
 大学院修士1年：須山真聡
 大学院修士2年：近藤麻布
 大学院博士1年：長瀬綸沙
 研究支援員：野本かおり

【和漢薬知統合学ユニット】

学部5年生：鈴木玲奈
 学部6年生：細貝春香
 大学院博士3年：趙慶峰（生命融合所属，10月入学）

研究開発部門

Department of Research and Development

病態制御分野

Division of Bioscience

生体防御学領域

Section of Host Defences

【がん・免疫ユニット】

教授	早川 芳弘	Prof. Yoshihiro Hayakawa
助教	薄田 健史	Assist. Prof. Takeshi Susukida
助教	佐々木 宗一郎	Assist. Prof. So-ichiro Sasaki

【脂質代謝ユニット】

准教授	渡辺 志朗	Assoc. Prof. Shiro Watanabe
-----	-------	-----------------------------

◆研究目的

【がん・免疫ユニット】

がん・免疫ユニットでは病態における生体防御機構の役割に関する研究、和漢薬の生体防御機構に及ぼす効果に関する研究について、特に免疫システムに着目して研究することを目的とする。生体防御システムを制御して疾患の発症予防や疾患の悪性化進展を阻止しうる薬効を生薬エキス、漢方方剤、天然物由来化合物、食物由来成分等から探索し、それらを活用して予防先制医療へと応用することを目指す。特に免疫疾患（がん・炎症・アレルギー病態）の制御について、生体防御に重要な自然免疫細胞に着目し、なかでもナチュラルキラー（Natural Killer: NK）細胞のバイオロジーや疾患制御における重要性について研究を進める。また、がん細胞の免疫逃避機構や免疫原性の制御によってがん免疫応答を強化する方法を見出すための研究を行う。さらに遠隔転移に代表されるがん進展における免疫応答や組織微小環境の役割について、病態モデルや *in vivo* イメージングを用いた解析に加え、和漢薬による免疫疾患の制御に関する研究を行う。

【脂質代謝ユニット】

脂質代謝ユニットの研究目的は、和漢薬ならびにその主要成分が有する病態生理制御効果を、脂肪酸と胆汁酸の網羅的分析をとおして、それらの新しい作用機構の概念を提唱することである。

◆2021 年度研究概要

【がん・免疫ユニット】

がん・免疫ユニットの 2021 年度の研究成果の概要

1. 免疫疾患における生体防御機構の役割に関する研究

生体イメージング手法を用いたがん進展過程における腫瘍内浸潤リンパ球の解析結果から、がん抗原特異的エフェクター CD8⁺ T 細胞には NKG2D 分子が発現することを明らかにした。がん細胞の肺転移早期における NK 細胞による免疫監視を ASK1 分子が抑制的に制御していること、骨転移形成には GPR56/ADGRG1 分子が重要であることを明らかにした。また、悪性黒色腫の免疫原性を規定する新たな因子として SOX10 が重要であることを見出した。さらに薬物-HLA 相互作用による薬疹発症のメカニズムに免疫の抑制システムも関わることを明らかにした。

2. 生体防御システムをターゲットとした疾患制御に関する研究

がん悪性化進展や慢性炎症病態に関わる炎症性シグナルをターゲットとして和漢薬ならびに天然物由来化合物、またその誘導体の薬効について探索研究を行い、さまざまな化合物の有用性について明らかにした。また冬虫夏草菌ライブラリの探索研究から、*Ophiocordyceps gracilioides* を新たに抗がん作用を示す天然資源として同定した。

【脂質代謝ユニット】

防己黄耆湯をマウスに投与すると、肝臓の中性脂肪含量が低下することを明らかにした。このとき糞便中のコレステロール濃度が高くなっていた。また防己黄耆湯の投与は、肝臓中の胆汁酸構成には影響を及ぼさなかったが、糞便中の主な2次胆汁酸であるデオキシコール酸の濃度を低下させることもわかった。以上の結果から、防己黄耆湯は腸管での糞コレステロールの吸収を抑制して、肝臓への脂質の蓄積を軽減すると推測できた。また防己黄耆湯による糞便中のデオキシコール酸の濃度の低下は、腸管での胆汁酸受容体活性の低下を来すと推測でき、これが肝臓での中性脂質含量の低下の一因になっていると考えた。以上の結果は、漢方薬が腸管内での脂質代謝を制御することで、遠隔臓器である肝臓の脂質代謝に影響する可能性を初めて示したものである。今後防己黄耆湯以外の漢方薬の脂質代謝制御効果ならびに、それにおける腸管内脂質代謝の役割について明らかにしていきたい。

◆原著論文

【がん・免疫ユニット】

- 1) Abdellatef AA, Fathy M, Mohammed AEI, Bakr MSA, Ahmed AH, Abbass HS, El-Desoky AH, Morita H, Nikaido T, Hayakawa Y. Inhibition of cell-intrinsic NF- κ B activity and metastatic abilities of breast cancer by aloe-emodin and emodic-acid isolated from *Asphodelus microcarpus*. *J Nat Med*. 2021 Sep;75(4):840-853. doi: 10.1007/s11418-021-01526-w.
- 2) Umeyama L, Hardianti B, Kasahara S, Dibwe DF, Awale S, Yokoyama S, Hayakawa Y. Anti-inflammatory effects of *Morus alba* Linne bark on the activation of toll-like receptors and imiquimod-induced ear edema in mice. *BMC Complement Med Ther*. 2021 Apr 9;21(1):115. doi: 10.1186/s12906-021-03291-5.
- 3) Mojic M, Shitaoka K, Ohshima C, Ucce S, Lyu F, Hamana H, Tahara H, Kishi H, Hayakawa Y. NKG2D defines tumor-reacting effector CD8⁺ T cells within tumor microenvironment. *Cancer Sci*. 2021 Sep;112(9):3484-3490. doi:10.1111/cas.15050.
- 4) Pothongsrisit S, Arunrungvichian K, Hayakawa Y, Sritularak B, Mangmool S, Pongrakhananon V. Eriandrin suppresses non-small-cell lung cancer cell metastasis through inhibition of Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Sci Rep*. 2021 Mar 23;11(1):6618. doi: 10.1038/s41598-021-85675-8.
- 5) Do KM, Shin MK, Kodama T, Win NN, Prema P, Nguyen HM, Hayakawa Y, Morita H. Flavanols and Flavanones from *Crinum asiaticum* and Their Effects on LPS Signaling Pathway Through the Inhibition of NF- κ B Activation. *Planta Med*. 2021 Sep 2. doi:10.1055/a-1585-5877.
- 6) Beshay BY, Abdellatef AA, Loksha YM, Fahmy SM, Habib NS, Bekhit AEA, Georgiou PE, Hayakawa Y, Bekhit AA. Design and synthesis of 2-Substituted-4-benzyl-5-methylimidazoles as new potential Anti-breast cancer agents to inhibit oncogenic STAT3 functions. *Bioorg Chem*. 2021 Aug;113:105033. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105033.
- 7) Shin MK, Sasaki F, Ki DW, Win NN, Morita H, Hayakawa Y. Identification of *Ophiocordyceps gracilioides* by Its Anti-tumor Effects through Targeting the NF κ B-STAT3-IL-6 Inflammatory Pathway. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(5):686-690. doi:10.1248/bpb.b20-01032.
- 8) Shin MK, Sasaki F, Ki DW, Win NN, Morita H, Hayakawa Y. Anti-metastatic effects of ergosterol peroxide from the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps gracilioides* on 4T1 breast cancer cells. *J Nat Med*. 2021 Sep;75(4):824-832. doi:10.1007/s11418-021-01520-2.
- 9) Abdellatef AA, Zhou Y, Yamada A, Elmekawy SA, Kohyama A, Yokoyama S, Meselhy MR, Matsuya Y, Sakurai H, Hayakawa Y. Synthetic E-guggulsterone derivative GSD-1 inhibits NF- κ B signaling and suppresses the metastatic potential of breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2021 Aug;140:111737. doi:10.1016/j.biopha.2021.111737.
- 10) Fujimoto M, Kamiyama M, Fuse K, Ryuno H, Odawara T, Furukawa N, Yoshimatsu Y, Watabe T, Prchal-Murphy M, Sexl V, Tahara H, Hayakawa Y, Sato T, Takeda K, Naguro I, Ichijo H. ASK1 suppresses NK cell-mediated intravascular tumor cell clearance in lung metastasis. *Cancer Sci*.

2021 Apr;112(4):1633-1643. doi:10.1111/cas.14842.

- 11) Fujiwara T, Miyazato K, Takahashi K, Hayakawa Y. Establishment of bioluminescent imaging model using murine T cell lymphoma susceptible to NK cell-dependent immune-surveillance. *J Immunol Methods*. 2021 Apr;491:112993. doi:10.1016/j.jim.2021.112993.
- 12) Yokoyama S, Takahashi A, Kikuchi R, Nishibu S, Lo JA, Hejna M, Moon WM, Kato S, Zhou Y, Hodi FS, Song JS, Sakurai H, Fisher DE, Hayakawa Y. SOX10 regulates melanoma immunogenicity through an IRF4-IRF1 axis. *Cancer Res*. 2021 Nov 2;canres.2078.2021. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2078.
- 13) Sasaki SI, Zhang D, Iwabuchi S, Tanabe Y, Hashimoto S, Yamauchi A, Hayashi K, Tsuchiya H, Hayakawa Y, Baba T, Mukaida N. Crucial contribution of GPR56/ADGRG1, expressed by breast cancer cells, to bone metastasis formation. *Cancer Sci*. 2021 Oct 10. doi: 10.1111/cas.15150.
- 14) Song B, Aoki S, Liu C, Susukida T, Kuwahara S, Ito K. The PD1 inhibitory pathway and mature dendritic cells contribute to abacavir hypersensitivity in human leukocyte antigen transgenic PD1 knockout mice. *Toxicology*. 2021 Nov;463:152971. doi: 10.1016/j.tox.2021.152971. Epub 2021 Oct 1.
- 15) Susukida T, Kuwahara S, Song B, Kazaoka A, Aoki S, Ito K. Regulation of the immune tolerance system determines the susceptibility to HLA-mediated abacavir-induced skin toxicity. *Commun Biol*. 2021 Sep 28;4(1):1137. doi: 10.1038/s42003-021-02657-2.

【脂質代謝ユニット】

- 1) Nishidono Y, Niwa K, Kitajima A, Watanabe S, Tezuka Y, Arita M, Takabayashi J, Tanaka K. α -Linolenic acid in *Papilio machaon* larvae regurgitant induces a defensive response in Apiaceae. *Phytochemistry*. 2021 Aug;188:112796. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112796.
- 2) Doshi M, Watanabe S, Natori Y, Hosoyamada M, Hirashima-Akae, Y. Triiodothyronine aggravates global cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Biol Pharm Bull*. 2021 Dec; 44(12):1824-1831. doi.org/10.1248/bpb.b21-00424

◆著書

【がん・免疫ユニット】

- 1) 早川芳弘. がん免疫ペディア. 吉村清編. 東京:羊土社; 2022 Feb. がん免疫におけるNK細胞; 未定.
- 2) 早川芳弘. がん微小環境に1細胞レベルで挑む. 藤田直也編集. 東京:羊土社; 2021 Aug. 腫瘍内の炎症・免疫応答を制御するNK細胞・NKT細胞・ $\gamma\delta$ T細胞; p.108-112.
- 3) 早川芳弘. 新臨床腫瘍学(改訂第6版). 日本臨床腫瘍学会編集. 東京:南江堂; 2021 May. 浸潤と転移; p. 38-41.

【脂質代謝ユニット】

- 1) Okuyama H, Sultan S, Ohara N, Hamazaki T, Langsjoen PH, Hama R, Ogushi Y, Kobayashi T, Natori N, Uchino H, Hashimoto Y, Watanabe S, Tatematsu K, Miyazawa D, Nakamura M, Ohhashi K. *Lipid Nutrition Guidelines A Comprehensive Analysis*. Basel Switzerland: MDPI; 2021 Apr. 84p. doi.org/10.3390/books978-3-03943-946-1.

◆学会報告

【がん・免疫ユニット】

(国際学会)

- * 1) Yoshihiro Hayakawa. Acquired resistance mechanism of cancer cells to anti-tumor immunity. The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages; 2021 Jun 15-16; オンライン.
- 2) Yoshimasa Yamamoto, Takuya Hirata, Yuki Shinguryo, Mikako Imai, Kazufumi Toume, Katsuko Komatsu, Yoshihiro Hayakawa. Identification of *Amomum xanthioides* as a natural medicine to enhance anti-tumor effector function of natural killer cells; The 39th Sapporo International Cancer

Symposium ; 2021 Jul 6-7; 札幌 (ハイブリッド).

(国内学会)

- 1) 山前結, 原大輔, 新宮領勇輝, 宮里紀穂, 川田学, 早川芳弘. タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A による NK 細胞のエフェクター機能抑制の解析. 第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 ; 2021 May 21-22 ; オンライン.
- * 2) 早川芳弘. がん細胞の免疫適応機構に関わる分子探索研究. 第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 ; 2021 May 21-22 ; オンライン.
- 3) 風岡顯良, 薄田健史, 桑原佐季, 青木重樹, 伊藤晃成. キメラ型 HLA 導入マウスを用いた特異体質薬物毒性の評価. 第 28 回 HAB 研究機構学術年会 ; 2021 Jun 3 ; オンライン.
- 4) 薄田健史, 青木重樹, 白柳智弘, 伊藤晃成, 早川芳弘. 薬物-HLA 相互作用を介した腫瘍免疫原性の改善に基づく新規がん免疫治療戦略の開発. 第 25 回日本がん免疫学会総会 ; 2021 Jul 1-3 ; 和歌山.
- 5) 佐々木宗一郎, Zhang Di, 馬場智久, 早川芳弘, 向田直史. 骨微小環境特異的マウス乳がん細胞株で発現が亢進する Gpr56/Adgrg1 を介した骨転移制御機構の解明. 第 30 回日本がん転移学会学術集会・総会 ; 2021 Jul 29-30 ; オンライン.
- 6) Sisca Ucche, Haruka Tsuihiji, Kohei Oki, Marija Mojic, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa. GSTA4 governs immune resistance and metastatic ability of melanoma cells. 第 30 回日本がん転移学会学術集会・総会 ; 2021 Jul 29-30 ; オンライン.
- 7) 山前結, 原大輔, 新宮領勇輝, 宮里紀穂, 川田学, 早川芳弘. Protein Phosphatase 2A による NK 細胞の抗腫瘍エフェクター機能制御. 第 30 回日本がん転移学会学術集会・総会 ; 2021 Jul 29-30 ; オンライン.
- * 8) Yoshihiro Hayakawa, Kazuyoshi Takeda. Paradoxical roles of host immunity in controlling tumor progression and metastasis. 第 80 回日本癌学会学術総会 ; 2021 Sep 30 - Oct 2 ; 横浜 (ハイブリッド).
- 9) Sisca Ucche, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa. GSTA4 governs immune surveillance resistant and metastatic ability of murine melanoma cells. 第 80 回日本癌学会学術総会 ; 2021 Sep 30 - Oct 2 ; 横浜 (ハイブリッド).
- 10) Abdellatif Amira A., Yoshihiro Hayakawa. Anti-metastatic functions of myrrh-triterpenes by inhibiting breast cancer cell-intrinsic NF- κ B/STAT3 activities. 第 80 回日本癌学会学術総会 ; 2021 Sep 30 - Oct 2 ; 横浜 (ハイブリッド).
- 11) 山前結, 川田学, 早川芳弘. Immuno-regulatory role of PP2A on anti-tumor effector function of NK cells. 第 80 回日本癌学会学術総会 ; 2021 Sep 30 - Oct 2 ; 横浜 (ハイブリッド).
- 12) So-ichiro Sasaki, Di Zhang, Tomohisa Baba, Yoshihiro Hayakawa, Naofumi Mukaida. Crucial contribution of the interactions between Gpr56/Adgrg1-expressing breast cancer cells and bone matrix to breast cancer bone metastasis. 第 80 回日本癌学会学術総会 ; 2021 Sep 30 - Oct 2 ; 横浜 (ハイブリッド).
- * 13) 早川芳弘. 健康長寿社会の実現に向けた生体防御システムの理解と和漢薬の可能性. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3-5 ; オンライン.
- 14) Sisca Ucche, Yoshihiro Hayakawa. Critical involvement of metabolic shift in cancer cell resistance to host immunity. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会 ; 2021 Nov 14 ; オンライン.
- 15) Ka He, Yui Yamamae, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa. Role of MHC class I recognition in regulating anti-tumor effector function of lung-tissue resident mature NK cells. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会 ; 2021 Nov 14 ; オンライン.
- 16) 青木重樹, 桑原佐季, 薄田健史, 風岡顯良, 伊藤晃成. HLA-B*57:01 遺伝子導入マウスを用いた免疫抑制因子の排除によるアバカビル依存的特異体質毒性の再現. 日本薬物動態学会 第 36 回年会 ; 2021 Nov 18 ; オンライン.
- 17) Sisca Ucche, Yoshihiro Hayakawa. GSTA4 regulates responsiveness to anti-tumor immune

- responses in melanoma cells. 第 50 回日本免疫学会学術集会 ; 2021 Dec 8-10 ; 奈良 (ハイブリッド).
- 18) Ka He, Yui Yamamae, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa. Role of MHC class I recognition in regulating anti-tumor effector function of lung-tissue resident mature NK cell. 第 50 回日本免疫学会学術集会 ; 2021 Dec 8-10 ; 奈良 (ハイブリッド).
- 19) 山前結, 早川芳弘. Regulatory role of Protein phosphatase 2A on T-bet expression and effector function of NK cell. 第 50 回日本免疫学会学術集会 ; 2021 Dec 8-10 ; 奈良 (ハイブリッド).
- 20) 薄田健史, 青木重樹, 白柳智弘, 伊藤晃成, 早川芳弘. アバカビルと HLA-B*57:01 分子との相互作用による腫瘍免疫原性の改善を志向とした新規がん免疫薬物療法の開発. 日本薬学会 第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).

【脂質代謝ユニット】

(国内学会)

- 1) 道志勝, 渡辺志朗, 名取雄人, 細山田真, 赤江豊. 甲状腺ホルモン投与がマウス脳虚血再灌流後の海馬 TGF- β 1 遺伝子発現に及ぼす影響. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).
- 2) 守田雅志, 浅倉礼奈, 土手陽世, 渡辺志朗, 川口甲介, 宗孝紀. ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質の脂肪滴形成への関与. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).
- 3) 渡辺志朗, 陳卓爾. ヒオデオキシコール酸は腸管内での飽和脂肪酸の可溶化を阻害することでその腸管吸収を抑制する. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 25-28 ; 名古屋 (オンライン).
- 4) 渡邊善之, 藤坂志帆, 桑野剛英, 西村歩, 角朝信, 五十嵐喜子, Rahil Muhammad Aslam, Bilal Muhammad, Nawaz Allah, 八木邦公, 渡辺志朗, 森永芳智, 戸邊一之. イソキサントフモールは腸内細菌の変化を介して宿主の小腸栄養トランスポーターを制御し抗肥満作用を発揮する. 第 42 回日本肥満学会・第 39 回日本肥満症治療学会学術集会 ; 2022 Mar 26-27 ; 横浜.

◆その他

【がん・免疫ユニット】

- 1) 横山悟, 早川芳弘, がん免疫療法 阻害物質を発見, 北日本新聞 (朝刊), 2021 Nov 3:31.
- 2) 横山悟, 早川芳弘, 免疫阻害の機構解明, 富山新聞 (朝刊), 2021 Nov 3:28.
- 3) Yoshimasa Yamamoto, Takuya Hirata, Yuki Shinguryo, Mikako Imai, Kazufumi Toume, Katsuko Komatsu, Yoshihiro Hayakawa. Identification of Amomum xanthioides as a natural medicine to enhance anti-tumor effector function of natural killer cells. 第 39 回札幌国際がんシンポジウム ; 2021 Jul 6-7 ; 札幌 (オンライン).
- 4) 薄田健史, 青木重樹, 白柳智弘, 伊藤晃成, 早川芳弘. 薬剤誘導性に免疫原性を改善する新規がん免疫療法の開発. 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021 年度若手支援技術講習会 ; 2021 Sep 6 ; オンライン.
- 5) 山前結, 原大輔, 新宮領勇輝, 宮里紀穂, 川田学, 早川芳弘. PP2A による NK 細胞のエフェクター機能制御メカニズムの解明. 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021 年度若手支援技術講習会 ; 2021 Sep 6 ; オンライン.
- * 6) Yoshihiro Hayakawa. Understanding host defence system and its application to drug discovery. 第 6 回富山・バーゼルジョイントシンポジウム ; 2021 Sep 15-17 ; オンライン.
- 7) Yoshimasa Yamamoto, Takuya Hirata, Yuki Shinguryo, Mikako Imai, Kazufumi Toume, Katsuko Komatsu, Yoshihiro Hayakawa. Amomum xanthioides from Myanmar enhanced anti-tumor effector function of natural killer cells. 第 6 回富山・バーゼルジョイントシンポジウム ; 2021 Sep 15-17 ; オンライン.
- 8) 山本祥雅, 平田卓也, 新宮領勇輝, 今井美佳子, 當銘一文, 小松かつ子, 早川芳弘. T-bet

を紹介したナチュラルキラー細胞の抗腫瘍活性を増強する生薬シクシャの同定.
Matching HUB Hokuriku 2021 ; 2021 Nov 12 ; 金沢.

- 9) 早川芳弘. フォーラム富山「創薬」第53回研究会 ; 2021 May ; 富山 (ハイブリッド).
- 10) Yoshihiro Hayakawa. Traditional Medicine Research Network Summit 2021. The 16th International Symposium on Traditional Medicine; 2021 Nov 30–Dec 1; 富山.

◆受賞

【がん・免疫ユニット】

- 1) Ka He, Yui Yamamae, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa. 日本薬学会北陸支部第133回例会 学生優秀発表賞「Role of MHC class I recognition in regulating anti-tumor effector function of lung-tissue resident mature NK cells」 2021,11.

◆共同研究

【がん・免疫ユニット】

(海外)

- 1) Varisa Pongrakhananon (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand) : Collaboration in cancer metastasis research. 2018～
- 2) Pornthip Waiwut (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand) : Collaboration in cancer metastasis research. 2017～
- 3) Meselhy Ragab M. Zayed (Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2017～
- 4) Adnan A. Bekhit (Faculty of Pharmacy, Alexandria University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2018～
- 5) Moustafa Fathy (Faculty of Pharmacy, Minia University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2019～
- 6) Subehan Lallo (Faculty of Pharmacy, Hasanuddin University, Indonesia) : Collaboration in cancer drug discovery research. 2020～

(国内)

- 1) 昆 俊亮 (東京理科大学生命医科学研究所) : de novo 発がんマウスモデルを用いたがん臨界点の同定と予防先制医療への応用, 2021～
- 2) 田原秀晃 (東京大学医科学研究所) : がん免疫応答に関する研究, 2012～
- 3) 佐々木 史 (富山県農林水産総合技術センター森林研究所) : 薬用・食用菌類の抗腫瘍活性に関する研究, 2017～
- 4) 一條秀憲 (東京大学薬学部) : がん転移制御に関する研究, 2012～
- 5) 磯濱洋一郎 (東京理科大学薬学部), 堀江一郎 (山口東京理科大学薬学部) : がん免疫療法における補剤の有用性に関する基礎研究, 2019～
- 6) 竹田和由 (順天堂大学医学部) : がん免疫逃避メカニズムに関する研究, 2017～
- 7) 伊藤晃成, 青木重樹 (千葉大学大学院薬学研究院) : 薬物-HLA 相互作用を利用した低免疫原性腫瘍に対する新規治療法に関する研究, 2020～

【脂質代謝ユニット】

(国内)

- 1) 古澤之裕 (富山県立大学) : 漢方薬による腸管内胆汁酸構成の改変における腸内細菌叢の役割の解明, 2019～
- 2) 能勢充彦 (名城大学薬学部) : 消化管に作用する漢方方剤の腸管内胆汁酸構成ならびに粘液分泌に及ぼす影響の解析, 2017～
- 3) 道志 勝 (帝京大学薬) : 動物胆構成胆汁酸による実験的脳虚血—再灌流後の神経細胞死の軽減効果の評価, 2018～
- 4) 田中謙 (立命館大学薬学部) : 生薬の外界刺激に対する防御機構における脂質代謝産物の関与に関する研究, 2021～
- 5) 長井良憲 (富山県立大学医薬品工学科) : マウスにおける脂肪性肝炎形成における胆汁酸と腸内細菌の役割に関する研究, 2021～

(学内)

- 1) 和田 努, 笹岡利安 (富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)) : 脂肪肝形成におけるペルオキシゾーム ABCD1 の役割の解明, 2018～
- 2) 恒枝宏史, 笹岡利安 (富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)) : 嗅覚を介する脂質代謝制御に関する研究, 2021～
- 3) Suresh Awale (富山大学和漢医薬学総合研究所) : すい臓がん細胞移植マウスに対する天然化合物の効果に関する研究, 2019～
- 4) 守田雅志 (富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)) : 副腎白質ジストロフィーにおけるペルオキシゾーム極長鎖脂肪酸代謝の異常の機構解明に関する研究, 2015～
- 5) 藤坂志帆, 戸邊一之 (富山大学大学院医学薬学研究部(医学)) : 腸内細菌を介したフラボノイドの脂質代謝改善効果に関する研究, 2021～
- 6) 田淵圭章 (富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)) : 腸管上皮細胞の機能制御における胆汁酸の役割, 2021～

◆研究費取得状況

【がん・免疫ユニット】

- 1) 文部科学省科学研究費 新学術領域研究 (分担: 早川芳弘) 「ケミカルバイオロジーを用いた炎症性疾患に対する分子標的予防研究」(H29.4.1～R4.3.31)
- 2) 文部科学省科学研究費 基盤研究(B) (代表: 早川芳弘, 分担: 田井中一貴) 「組織局在性NK細胞の腫瘍免疫監視機構における役割とその機能制御」(R3.4.1～R7.3.31)
- 3) 文部科学省科学研究費 基盤研究(C)最終 R4 (代表: 大橋若菜, 分担: 早川芳弘, 井村譲二) 「亜鉛トランスポーターを介した代謝制御機構の解明に基づく大腸がん治療戦略の創出」(R2.4.1～R4.3.31)
- 4) 文部科学省科学研究費 研究活動スタート支援 (代表: 薄田健史) 「自己抗原の異物化を介した腫瘍免疫原性の改善に基づく新規がん免疫療法の開発」(R2.4.1～R4.3.31)
- 5) 文部科学省科学研究費 基盤研究(C) (代表: 佐々木宗一郎) 「骨転移した乳がん細胞選択的に発現亢進するレセプター分子の病態生理学的役割の解析」(R2.4.1～R5.3.31)
- 6) 文部科学省科学研究費 若手研究 (代表: 薄田健史) 「薬疹モデルマウスを用いた薬物過敏症の個人差を生み出す細胞内代謝環境の重要性評価」(R3.4.1～R6.3.31)
- 7) 公益財団法人田村科学技術振興財団 2020 年度下半期助成 (代表: 薄田健史) 「HLA 遺伝子導入マウスを用いた HLA-薬物相互作用による薬物過敏症の発症因子の解明」(R3.3.31～R4.3.31)
- 8) 公益財団法人武田科学振興財団 2021 年度薬学系研究助成 (代表: 薄田健史) 「薬物-HLA相互作用による腫瘍免疫原性の改善を利用した低免疫原性腫瘍に対する新規治療法の開発」(R3.11.12～R6.5.31)
- 9) 公益財団法人田村科学技術振興財団 2021 年度上半期助成 (代表: 佐々木宗一郎) 「新規骨転移関連分子 GPR56/ADGRG1 を標的とする, 新たな骨転移治療法の開発」(R3.10.1～R4.9.30)

◆研究室在籍者

【がん・免疫ユニット】

学部3年生: 関夢乃, 千葉遊太, 村越魁吏
学部4年生: 魚住茉紘, 山口叶大, 原大輔
学部5年生: 遠藤麻夜, 對比地遥
大学院修士1年: 山本奨也
大学院修士2年: 山前結
大学院博士1年: 山本祥雅
大学院博士1年: 賀 卡 (10月入学)
大学院博士2年: Sisca Ucche

大学院博士3年：Min-Kyoung Shin

大学院博士3年：Amira Abdellatef Ahmed（10月入学）

学内研究生：松尾光浩（富山大学医学部麻酔科学）、Muhammad Irfan Rasul（富山大学医学部総合口腔科学）、Nguyen Tien Dung（富山大学医学部臨床腫瘍部）

外国人客員研究員：Rahma Tharwat Ahmed Hamdy

協力研究員：佐々木史（富山県森林研究所）

【脂質代謝ユニット】

学部3年生：高橋杏佳

学部4年生：坂本来那

学部4年生：武田沙也香

学部6年生：杉村美愛

◆学位（修士，博士）取得者

【がん・免疫ユニット】

修士論文

He Ka : Role of MHC class I recognition in regulating anti-tumor effector function of lung-tissue resident mature NK cells

山前 結 : Protein phosphatase 2A による転写因子 T-bet を介したナチュラルキラー細胞のエフェクター機能制御メカニズムの解明

博士論文

Min-Kyoung Shin : Identification of Ophiocordyceps gracilioides as an antitumor natural drug resource

Amira Abdellatef Ahmed Abdellatef : Targeting tumor-intrinsic Nuclear Factor kappa-B signaling pathway for the discovery of anti-metastatic drug candidates from natural recourses

研究開発部門

Department of Research and Development

複雑系解析分野

Division of Complex Biosystem Research

教授	中川 嘉	Prof. Yoshimi Nakagawa
准教授	金 俊達	Assoc. Prof. Jundal Kim

◆研究目的

生活習慣病の発症に係る分子メカニズムを解明するとともに、その知見を基に和漢薬による生活習慣病の改善作用を分子レベルで解明することを目的とし研究を行う。

◆2021 年度研究概要

1. CREBH は栄養飢餓と成長遅延を繋ぐ分子メカニズム

CREBH は絶食時に発現が上昇し、転写因子として機能する。新たに CRISPR/Cas9 システムを用い、活性化 CREBH を組織特異的発現させられるマウス(CREBH flox Tg マウス)を作成した。さらに肝臓で発現するように Albumin Cre Tg マウスと交配し、肝臓特異的 CREBH 過剰発現マウスを製作した。このマウスは生後 1 か月の時点で明らかな成長遅延を示した。CREBH L-Tg マウス血中成長ホルモン(GH)が異常高値、IGF1 がほぼ検出できないレベルであった。この状態は成長ホルモン抵抗性と言える。GH は肝臓に作用し GH 受容体(GHR)から JAK2-STAT5 を活性化し、IGF1 の発現、血中への放出を促進させることで体の成長を促進させる。CREBH L-Tg マウスでは GHR の mRNA の著しい低下に伴い、タンパクレベルではほぼ検出できないレベルであった。CREBH の標的遺伝子の 1 つ FGF21 の過剰発現マウスでも成長ホルモン抵抗性を示し、成長遅延が生じることがすでに報告されている。確かに CREBH L-Tg マウスでは FGF21 の発現上昇が認められた。そのため、CREBH L-Tg マウスで見られる表現型が FGF21 に依存するかを、CREBH L-Tg マウスと FGF21 KO マウスを交配し、確認した。しかしながら、CREBH L-Tg マウスで認められる肝臓での GH シグナル抑制、成長遅延には影響を及ぼさなかった。本研究から CREBH による成長遅延は FGF21 に依存しないメカニズムで、独自の作用によるものであること、CREBH が栄養飢餓と成長遅延を繋ぐ制御因子であることを見出した(Nakagawa *FASEB J* 2021)。

2. CREBH による食餌誘導性肝がん発症メカニズム

CREBH KO マウスに長期間、高脂肪・高シヨ糖食を負荷すると肝臓でがんが発症するデータを得た。CREBH は肝臓、小腸でのみ発現し、肝臓では脂質代謝を、小腸では脂質吸収を担っていることを明らかにしてきている。現在、肝臓での脂質代謝異常→炎症→線維化の増悪化に対する CREBH の機能の解析、小腸での脂質吸収、構造異常による炎症、腸内細菌叢の変化に対する CREBH の機能を解析している。今後、CREBH 欠損による肝がん発症のメカニズムが解明できれば、生活習慣病を発端とする肝がん発症のメカニズムの解明、CREBH を標的とした肝がん治療薬開発に期待できる。

3. SREBP-1 欠損マウスを用いた脂肪肝発症メカニズムの解明

SREBP-1 にはスプライシングバリンとして SREBP-1a と SREBP-1c が存在する。SREBP-1c が生理学的に主要であり、脂質合成に関わる酵素群の発現を制御する。一方、SREBP-1a の機能については注目されてこなかった。我々は SREBP-1a の組織特異的 KO マウスを作成し、食餌誘導性の脂肪肝に対する機能を解析した。肝臓、マクロファージで SREBP-1a を欠損するマウスに対し、メチオニン・コリン欠損食を負荷し、脂肪肝を発症させた。どちらの KO マウスでも脂肪肝から派生する脂肪肝炎が増悪化することを確認した。SREBP-1c は脂質合成を促進させることから、SREBP-1a の欠損では脂肪肝を改善させることを想定していたが、実際には脂肪肝から肝炎を惹起する予想外の結果を得た(投稿中)。

4. 生活習慣病治療効果を持つ和漢薬の同定

和漢薬ライブラリーを用い、生活習慣病改善に機能する遺伝子の発現を制御する和漢薬の同定を目指し、スクリーニングを行っている。すでに新規活性化因子として和漢薬を同定しており、現在、同定した和漢薬の成分から、活性化の実体物質の同定を試みている。今後は同定した物質による活性化の分子メカニズムを明らかにする。

◆原著論文

- 1) Mizunoe Y, Kobayashi M, Saito H, Goto A, Migitaka R, Miura K, Okita N, Sudo Y, Tagawa R, Yoshida M, Umemori A, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y. Prolonged caloric restriction ameliorates age-related atrophy in slow and fast muscle fibers of rat soleus muscle. *Exp Gerontol*. 2021 Oct 15;154:111519. doi:10.1016/j.exger.2021.111519.
- 2) Kainoh K, Takano R, Sekiya M, Saito K, Sugawara T, Ma Y, Murayama Y, Sugano Y, Osaki Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Yahagi N, Suzuki H, Miyamoto T, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Shimano H. CtBP2 confers protection against oxidative stress through interactions with NRF1 and NRF2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jul 12;562:146-153. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.069.
- 3) Nakagawa Y, Kumagai K, Han SI, Mizunoe Y, Araki M, Mizuno S, Ohno H, Matsuo K, Yamada Y, Kim JD, Miyamoto T, Sekiya M, Konishi M, Itoh N, Matsuzaka T, Takahashi S, Sone H, Shimano H. Starvation-induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling. *FASEB J*. 2021 Jun;35(6):e21663. doi: 10.1096/fj.202002784RR.
- 4) Cho K, Ushiki T, Ishiguro H, Tamura S, Araki M, Suwabe T, Katagiri T, Watanabe M, Fujimoto Y, Ohashi R, Ajioka Y, Shimizu I, Okuda S, Masuko M, Nakagawa Y, Hirai H, Alexander WS, Shimano H, Sone H. Altered microbiota by a high-fat diet accelerates lethal myeloid hematopoiesis associated with systemic SOCS3 deficiency. *iScience* 2021 Sep 11;24(10):103117. doi: 10.1016/j.isci.2021.103117.
- 5) Fujihara K, Nogawa S, Saito K, Horikawa C, Takeda Y, Cho K, Ishiguro H, Kodama S, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Shimano H, Sone H. Carrot Consumption Frequency Associated with Reduced BMI and Obesity through the SNP Intermediary rs4445711. *Nutrients*. 2021 Sep 30;13(10):3478. doi: 10.3390/nu13103478.
- 6) Satou-Kobayashi Y, Kim JD, Fukamizu A, Asashima M. Temporal transcriptomic profiling reveals dynamic changes in gene expression of *Xenopus* animal cap upon activin treatment. *Sci Rep*. 2021 Jul 15;11(1):14537. doi: 10.1038/s41598-021-93524-x.
- 7) Dinh TTH, Iseki H, Mizuno S, Iijima-Mizuno S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Kato K, Hamada Y, Hasan ASH, Suzuki H, Murata K, Muratani M, Ema M, Kim JD, Ishida J, Fukamizu A, Kato M, Takahashi S, Yagami KI, Wilson V, Arkell RM, Sugiyama F. Disruption of entire *Cables2* locus leads to embryonic lethality by diminished *Rps21* gene expression and enhanced p53 pathway. *Elife*. 2021 May 5;10:e50346. doi: 10.7554/eLife.50346.
- 8) Okajima Y, Matsuzaka T, Miyazaki S, Motomura K, Ohno H, Sharma R, Shimura T, Istiqamah N, Han SI, Mizunoe Y, Osaki Y, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Miyamoto T, Aita Y, Takeuchi Y, Sekiya M, Yahagi N, Nakagawa Y, Tomita T, Shimano H. Morphological and functional adaptation of pancreatic islet blood vessels to insulin resistance is impaired in diabetic db/db mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2022 Jan 8;1868(4):166339. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166339.
- 9) Kodama S, Fujihara K, Horikawa C, Kitazawa M, Iwanaga M, Kato K, Watanabe K, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Shimano H, Sones H. Predictive ability of current machine learning algorithms for type 2 diabetes mellitus - A meta-analysis. *J Diabetes Investig*. 2021 Dec 23. doi: 10.1111/jdi.13736.

◆総説

- 1) Nakagawa Y, Araki M, Han SI, Mizunoe Y, Shimano H. CREBH Systemically Regulates Lipid

Metabolism by Modulating and Integrating Cellular Functions. *Nutrients*. 2021 Sep 15;13(9):3204. doi: 10.3390/nu13093204.

- 2) Kasuya Y, Kim JD, Hatano M, Tatsumi K, Matsuda S. Pathophysiological roles of stress-activated protein kinases in pulmonary fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 3;22 (11):6041. doi: 10.3390/ijms22116041.
- 3) Nakagawa Y, Matsuzaka T, Shimano H. CREBH regulation of lipid metabolism through multifaceted functions that improve arteriosclerosis. *J Diabetes Investig* . 2022 Feb 5. doi: 10.1111/jdi.13766.

◆学会報告

(国際学会)

- 1) Masaya Araki, Yoshimi Nakagawa, Song-lee Han, Yunoug Wang, Yuhei Mizunoe, Takashi Matsuzaka, Naoya Yahagi, Motohiro Sekiya, Hitoshi Shimano. CREB3L3 protects atherosclerosis through increased lipolysis and inhibition of SREBP. The 19th International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021); 2021 Oct 26; Kyoto.

(国内学会)

- 1) 水之江雄平, 宮本崇史, 中川 嘉, 島野 仁. 筋細胞融合を制御する *de novo* コレステロールの重要性. 第 44 回日本分子生物学会年会 ; 2021 Dec 3 ; 横浜.
- 2) Yunong Wang, Yoshimi Nakagawa, Song-lee Han, Kae Kumagai, Yuhei Mizunoe, Masaya Araki, Takafumi Miyamoto, Motohiro Sekiya, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano. O-GlcNAcylation of CREBH and ChREBP synergistically control hepatic fructose-mediated nutrient metabolism. 第 44 回日本分子生物学会年会 ; 2021 Dec 3 ; 横浜.
- 3) 大野 博, 松坂 賢, 本村香織, 志村拓哉, 水之江雄平, 宮本崇史, 関谷元博, 中川 嘉, 林 昭夫, 島野 仁. 脂肪酸伸長酵素 Elovl6 による神経幹細胞の自己複製能制御機構解明. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 4) 中川 嘉. 栄養飢餓誘導転写因子が制御する栄養代謝メカニズムと生活習慣病改善機構. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 5) 中川 嘉. 動脈硬化における脂質代謝・吸収を司る転写制御メカニズム. 第 53 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 ; 2021 Oct 24 ; 京都.
- 6) 小林夢子, 金 俊達, 深水昭吉, 浅島誠. アクチビン処理下でのツメガエルのアニマルキャップのトランスクリプトーム解析. 第 44 回日本分子生物学会年会 ; 2021 Dec 3 ; 横浜.
- 7) 柳下玲奈, 加藤かざし, 宇田川里奈, 村谷匡史, 金 俊達, 木村圭志. 細胞分裂における SNRNP200 の制御メカニズムの解析-Sororin のスプライシングと中心体制御に機能する-. 第 44 回日本分子生物学会年会 ; 2021 Dec 3 ; 横浜.
- 8) 森 遥佳, 金 俊達, 石田純治, 深水昭吉. 二重酵素活性を有する PRMT8 の活性変異マウスの作製と機能解析. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 9) 中村夏奈子, 金 俊達, 権 哲源, 深水昭吉. 心臓における METTL18 を介したヒスチジンメチル化の生物学的意義の解明. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 10) 笠井郁也, 石田純治, 室町直人, 野口和之, 金 俊達, 深水昭吉. 遺伝子発現プロファイリングから探る, 心腎連関病態の H3 アゴニストによる病態改善メカニズム. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 11) 姚 遠, 金 俊達, 大徳浩照, 室町直人, 石田純治, 深水昭吉. Study on the effect of H179Y one-point mutation in murine PRMT1 on biological functions. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.
- 12) 岸川奈那, 金 俊達, 石田純治, 深水昭吉. 脂肪組織形成における METTL18 を介したヒスチジンメチル化に関する研究. 第 94 回日本生化学会大会 ; 2021 Nov 3 ; Web.

- 13) 田 純治, 松田紘奈, 金 俊達, 深水昭吉. 高血圧妊娠胎仔 FGR の遺伝子発現の特質解析. 第 94 回日本生化学会大会; 2021 Nov 3; Web.
- 14) 橋本美涼, 金 俊達, 村田知弥, 中川 寅, 深水昭吉. PRMT1 欠損は生後の脳においてアストロサイトやミクログリアの活性化を引き起こす. 第 85 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム; 2021 May 22; Web.

◆共同研究
(国内)

- 1) 大矢修生 (宇部興産株式会社 ライフサイエンス研究室): 部材を用いる細胞培養研究の応用展開, 2021~

◆研究費取得状況

- 1) 令和 3 年度~令和 6 年度 科学研究費補助金 基盤研究(A) (代表: 中川 嘉) 「腸肝連関における脂質代謝異常が誘導する肝がん発症メカニズムの解明」
- 2) 令和 2 年度~令和 3 年度 科学研究費補助金 挑戦的研究(萌芽) (代表: 島野仁・筑波大学, 分担: 中川 嘉) 「脳形成におけるコレステロール合成系の生理意義の確定と病態への応用」
- 3) 令和 2 年度~令和 4 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) (代表: 樋上賀一・東京理科大学, 分担: 中川 嘉) 「スプライシング調節によるエネルギー代謝の最適化を介した寿命制御」
- 4) 平成 31 年度~令和 3 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) (代表: 岩崎 仁・筑波大学, 分担: 中川 嘉) 「非アルコール性脂肪肝発症における肝臓内細胞連関の解明」
- 5) 平成 31 年度~令和 3 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) (代表: 韓 松伊・筑波大学, 分担: 中川 嘉) 「新規 SREBP-1 プロテアーゼ R4 による lipid-sensing 分子機構の解明」
- 6) 平成 31 年度~令和 3 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) (代表: 牛木隆志・筑波大学, 分担: 中川 嘉) 「SOCS3 が制御する高脂肪誘発性 myeloid hematopoiesis の機序」
- 7) 平成 30 年度~令和 4 年度 科学研究費補助金 基盤研究(A) (代表: 藤井宣晴・東京都立大学, 分担: 中川 嘉) 「運動の恩恵効果が骨格筋から分泌されるマイオカインによって媒介されることの証明」
- 8) 平成 30 年度~令和 5 年度 AMED CREST (代表: 林 悠・京都大学, 分担: 中川 嘉) 「睡眠の質の変化が引き起こす個体の機能低下~睡眠構築の操作によるメカニズムの解明と応用~」
- 9) 2021 年度 帝人ファーマ奨学寄附金 (代表: 中川 嘉) 「がんを発症する新規メカニズムの解明」
- 10) 2021 年度 公益財団法人武田科学振興財団 生命科学研究助成 (代表: 中川 嘉) 「絶食誘導因子による多面的調節機構を介した全身性脂質代謝メカニズムの解明」
- 11) 2021 年度 第 19 回花王健康科学研究会 助成金 (代表: 中川 嘉) 「飢餓誘導調節因子による栄養代謝と生活習慣病の改善」
- 12) 2021 年度 公益財団法人日本応用酵素協会 酵素研究助成 (代表: 中川 嘉) 「脂肪肝形成における O-GlcNAcylation によるタンパク安定化と転写因子機能制御」
- 13) 2021 年度 一般財団法人 代謝異常治療研究基金 研究助成金 (代表: 中川 嘉) 「過栄養応答脂質代謝調節と肝臓機能老化を繋ぐ新規機構の解明」
- 14) 令和 3 年度~令和 8 年度 AMED CREST (代表: 深水昭吉・筑波大学, 分担: 金 俊達) 「不可逆的タンパク質メチル化を介した進行性および加齢性心腎障害の分子基盤」
- 15) 令和 3 年度 宇部興産株式会社寄附金 (代表: 金 俊達) 「部材を用いる細胞培養研究の応用展開」
- 16) 令和 3 年度 産学連携共同研究 宇部興産株式会社 (代表: 金 俊達) 「部材を用いる細胞培養研究の応用展開」

- 17) 令和3年度（第38回）富山第一銀行財団「研究活動に対する助成」（代表：金 俊達）
「モデルマウスを ADHD の発症メカニズムの解明と治療戦略の構築」

◆研究室在籍者

学部3年生：鈴木恭平

学部3年生：榎本侑平

学部4年生：松尾和哉

学部4年生：山田泰成

研究開発部門

Department of Research and Development

未病分野

Division of Presymptomatic Disease

【未病創薬ユニット】

教授	小泉 桂一	Prof. Keiichi Koizumi
助教	条 美智子	Assist. Prof. Michiko Jo
研究員	犬鷲 明子	Postdoctoral Fellow Akiko Inujima

【情報科学ユニット】

特命准教授	奥 牧人	Spec. App. Assoc. Prof. Makito Oku
-------	------	------------------------------------

【腸管疾患ユニット】

助教	山本 武	Assist. Prof. Takeshi Yamamoto
助教	林 周作	Assist. Prof. Shusaku Hayashi

◆研究目的

日本の伝統医学（漢方医学）で未病として知られている疾病前状態は、東洋医学の概念であり、いまだ科学的に理解されていない。当分野では、発症過程における遺伝子、タンパク質、行動などの生体情報のゆらぎや発現変化を解析し、未病の状態を科学的に検出し、その生物学的意味を明らかにする研究を、富山大学未病研究センターと共同で行っている。メタボリックシンドロームなどの複合疾患の著しい増加に基づいて、現代の医薬品だけを使用してそれらを治療することは困難な状況である。一方で、疾病状態を標的とする現代の医薬品による治療とは対照的に、未病を標的とする医薬品は、予防および先制医療における大きな潜在的利点を持っている可能性がある。そのため、未病に対する医薬品の開発、ひいては新たな医療戦略を目指している。なお、本分野の研究は、富山大学未病研究センターと連携をとることで、効率的かつ迅速に遂行される仕組みとなっている。

<https://www.u-toyama.ac.jp/academics/rcpds/rcpds-center/>

◆2021 年度研究概要

1. 未病創薬ユニット

当該ユニットでは、未病を理解することは生体情報のゆらぎの理解することと位置付けている。本研究に関しては、ラマン顕微鏡による測定波長に DNB 解析を行うことで、T 細胞の活性化におけるゆらぎを検出することができた。また、未病の標的分子と考えているグルタミンナーゼの阻害剤の開発に関しては、新規のグルタミンナーゼ阻害物質をインシリコで探索し酵素阻害試験により同定し、特許申請を行った（特願 2022-019889）。さらに、疾病を未病の段階で防ぐには、免疫の活性化が必要である。これまでに数多くの医薬品が生薬や植物の二次代謝成分から開発されてきた。一方で、二次代謝成分から免疫抑制成分は見つかっているが、免疫活性化成分の詳細は不明である。そこで、我々は生薬の一次代謝成分に着目して研究を行った結果、甘草や生薬の煎じ液の中に、熱してもこれ以上は分解しない、熱安定性 RNA を発見し、これが生薬由来の免疫活性化成分であることを見出した。本研究は、今後、生薬・漢方薬の免疫活性化研究のブレークスルーになると考えられる（Inujima et al., *Biomed Pharmacother.* 2022）。今後も、和漢医薬学研究領域の独自性を発展させるために、上記未病研究を推進する。

2. 情報科学ユニット

当該ユニットでは、今年度は主に、早期疾患予測のためのデータ解析手法の開発と応用に関する研究を遂行した。これまでに我々は、家庭血圧測定データをもとに妊娠高血圧および妊娠高血圧

腎症を早期に予測するための手法を開発してきた。本年度は、開発手法について特許出願を行い（特願 2021-99260）、国際会議で発表した（Ohno et al., ISSHP 2021）。さらに、検証のための前向き研究を開始した（整理番号 R2021021）。今後は、前向き研究のデータを用いて手法の有効性を検証する予定である。

3. 腸管疾患ユニット

当該ユニットでは、生体防御の最前線で働く消化管において高度に発達した腸管粘膜免疫系および腸管神経系に着目し、これらのバランス異常が大きく関与する腸管免疫系疾患、特に炎症性腸疾患と食物アレルギーの病態解明研究、それに基づいた有用な治療戦略の創出を目指す研究を行なっている。今年度、私たちは、中枢神経系と腸管との抗炎症性臓器連関であるコリン性抗炎症機構が、腸管粘膜での形質細胞様樹状細胞（pDC）の遊走の抑制を介し、炎症性腸疾患の病態モデルでの大腸炎症状を改善することを明らかにし（Kanauchi et al., 2021）、スクリーニングから見出した pDC の遊走を阻害する生薬由来化合物の病態モデルへの投与が、大腸炎症状を改善することを報告した（Zhang et al., 2021）。また、腸管粘膜での腸管神経系と粘膜型マスト細胞とのクロストークが、食物アレルギーの病態形成に関与することを明らかにした（Yashiro et al., 2021）。今後、基礎研究から見出した知見を臨床応用に繋げる研究を進めると共に、腸管免疫系疾患での未病の解明に取り組む予定である。

◆原著論文

【未病創薬ユニット】

- 1) Fujii T, Shimizu T, Katoh M, Nagamori S, Koizumi K, Fukuoka J, Tabuchi Y, Sawaguchi A, Okumura T, Shibuya K, Fujii T, Takeshima H, Sakai H. Survival of detached cancer cells is regulated by movement of intracellular Na⁺,K⁺-ATPase. *iScience*. 2021 Apr 15;24(5):102412. doi: 10.1016/j.isci.2021.102412.
- 2) Inujima A, Koizumi K, Shibahara N. Immunostimulatory properties of heat-resistant RNA in a decoction of *Glycyrrhizae Radix*. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jan;145:112457. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112457.

【腸管疾患ユニット】

- 1) Zhang Y, Yamamoto T, Hayashi S, Kadowaki M. Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis. *Biomed Pharmacother*. 2021 Sep;141:111881. doi:10.1016/j.biopha.2021.111881.
- 2) Yashiro T, Ogata H, Zaidi SF, Lee J, Hayashi S, Yamamoto T, Kadowaki M. Pathophysiological Roles of Neuro-Immune Interactions between Enteric Neurons and Mucosal Mast Cells in the Gut of Food Allergy Mice. *Cells*. 2021 Jun 23;10(7):1586. doi: 10.3390/cells10071586.
- 3) Kanauchi Y, Yamamoto T, Yoshida M, Zhang Y, Lee J, Hayashi S, Kadowaki M. Cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates murine experimental Th2-type colitis by suppressing the migration of plasmacytoid dendritic cells. *Sci Rep*. 2022 Jan 7;12(1):54. doi: 10.1038/s41598-021-04154-2.

◆著書

【未病創薬ユニット】

- 1) 小泉桂一. 循環器内科. 吉村道博編. 東京：科学評社；2021 Sep. DNB 理論によるメタボリックシンドロームの未病状態の検出；p.321-325.

【腸管疾患ユニット】

- 1) 山本武. 花粉症等アレルギー疾患予防食品の開発. 今井伸二郎他編. シーエムシー出版；2021 Jul. 葛根湯および含有生薬や成分による食物アレルギー発症予防効果と経口免疫療法への併用による治療効率向上効果の検討；p.174-181.

◆総説

【未病創薬ユニット】

- 1) Aihara K, Liu R, Koizumi K, Liu X, Chen L. Dynamical network biomarkers: Theory and applications. *Gene*. 2022 Jan; 808 : doi:10.1016/j.gene.2021.145997.

◆学会報告

【未病創薬ユニット】

(国内学会)

- 1) 竹谷皓規, 山崎萌絵, 田原 旬, 小泉桂一, 山本 武, 大嶋佑介, 吉田泰彦, 春木孝之. ラマン分光法と DNB 解析による細胞遷移状態における分岐点解明技術開発. レーザー学会第 557 回研究会 ; 2021Nov.19 ; オンライン.
- 2) 金山大介, 鈴木瑞穂, 岡田卓哉, 条美智子, 合田浩明, 小泉佳一, 豊岡尚樹. グルタミンナーゼ阻害に基づく画期的抗肥満薬の開発研究. 2021 年度有機合成化学北陸セミナー ; 2021 Sep 29 ; オンライン.
- 3) 竹谷皓規, 佐藤勉, 和田暁法, 小泉桂一, 山崎萌絵, 田原 旬, 山本 武, 大嶋佑介, 春木孝弘, 吉田泰彦. ラマン分光法と DNB 解析を用いた炎症の遷移点検出に関する研究. 2021 年度レーザー学会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan 12 ; オンライン.
- 4) 文室温人, 山本 武, 竹谷皓規, 小泉桂一, 片桐崇史, 大嶋佑介. ラマン分光法によるマウス免疫細胞のフェノタイプ解析. 2021 年度レーザー学会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan 12 ; オンライン.
- 5) 山崎萌絵, 田原旬, 竹谷皓規, 小泉桂一, 吉田泰彦, 春木孝之, 朝岡竜士, 大嶋佑介. マクロファージ細胞の炎症誘導過程におけるラマン光の測定とその揺らぎの検出. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; オンライン.
- 6) 町田雄大, 赤木一考, 小泉桂一. 脂肪特異的 *GLS1* 欠損は高脂肪食負荷に伴う肥満を抑制する. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 28 ; オンライン.
- 7) 鈴木悠乃, 宗像理沙, 小俣大樹, 小泉桂一, 鈴木亮. 甘草由来ナノ粒子の免疫賦活化特性の評価とワクチンアジュバントへの応用. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; オンライン.

【情報科学ユニット】

(国際学会)

- 1) Ohno S, Metoki H, Oku M, Iwama N, Shiozaki A, Nakashima A, Saito S. Prediction of hypertensive disorders of pregnancy based on home blood pressure monitoring. ISSHP 2021; 2021 Sep 15-28; オンライン.

(国内学会)

- 1) 朴木久恵, 藤坂志帆, 今度悠樹, 篠田千恵, 圓角麻子, 瀧川章子, 八木邦公, 中條大輔, 奥牧人, 戸邊一之. 企業健診におけるとやまパラドックス問診票の有効性とインスリン関連指数の関係. 第 75 回富山県医学会 ; 2021 Dec 5 ; 富山.
- 2) 奥牧人. KampoDB をより使いやすくするための大幅更新. 第 69 回バイオ情報学研究会 ; 2022 Mar 11 ; オンライン.
- 3) 奥牧人. KampoDB の大幅更新による影響の利用統計に基づく評価. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; オンライン.
- 4) 朴木久恵, 藤坂志帆, 今度悠樹, 山田眞之介, 横山茉貴, 圓角麻子, 渡邊善之, 瀧川章子, 杉島有希, 八木邦公, 中條大輔, 奥牧人, 戸邊一之. 富山県民のメタボリック症候群の生活習慣の実態調査における腸内菌叢解析と食事記録解析. 第 42 回日本肥満学会 ; 2022 Mar 26-27 ; 横浜.

【腸管疾患ユニット】

(国内学会)

- 1) 山本 武, 後藤由佳, 門脇 真. 葛根湯併用経口免疫療法による食物アレルギー治療の粘膜型マスト細胞脱顆粒抑制作用とその機序の検討. 第 38 回和漢医薬学会学術大会 ; 2021

Sep ; 金沢 (オンライン).

- 2) 山本 武, 後藤由佳, 門脇 真. 食物アレルギー病態マウスを用いた長期葛根湯併用による経口免疫療法の寛解維持効果向上の検討. 第 70 回日本アレルギー学会学術大会; 2021 Oct ; 東京.
- 3) 竹谷皓規, 山崎萌絵, 田原 旬, 小泉桂一, 山本 武, 大嶋佑介, 吉田泰彦, 春木孝之. ラマン分光法と DNB 解析を用いた炎症の遷移点検出に関する研究. レーザー学会学術講演会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan; 神戸 (オンライン).
- 4) 文室温人, 山本 武, 竹谷皓規, 小泉桂一, 片桐崇史, 大嶋佑介. ラマン分光法によるマウス免疫細胞のフェノタイプ解析. レーザー学会学術講演会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan ; 神戸 (オンライン).
- 5) 林 周作, 小川雄大, 山本 武, 門脇 真. 炎症性腸疾患において再燃予防を実現する治療戦略の提案. 第 95 回日本薬理学会年会 ; 2022 Mar ; 福岡.

◆その他

【腸管疾患ユニット】

- * 1) 山本 武. 食物アレルギーの治療法の確立への葛根湯の応用 -葛根湯による腸管粘膜免疫系の制御を介した効果-. 日本東洋医学会北陸支部 第 27 回夏季講演会(招待公演) ; 2021Jul ; 金沢.
- 2) 竹谷皓規, 山崎萌絵, 田原 旬, 小泉桂一, 山本 武, 大嶋佑介, 吉田泰彦, 春木孝之. ラマン分光法と DNB 解析による細胞遷移状態における分岐点解明技術開発. レーザー学会第 557 回研究会 ; 2021 Oct ; 富山.

◆共同研究

【未病創薬ユニット】

(海外)

- 1) Jerome W. Breslin (Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Professor): Lymphatic contraction mechanisms, 2017~
- 2) Luonan Chen (Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, China, Professor): Medical applications in DNB theory, 2014~

(学内)

- 1) 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 藤井一希 (研究推進総合支援センター) : アクアポリン 1 遺伝子改変マウスの作製と表現型解析, 2020~
- 2) 春木孝之 (都市デザイン学部), 大嶋佑介 (工学部) : DNB 解析による未病の検出, 2020~
- 3) 森 寿 (医学部), 中川 崇 (医学部), 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 笹岡利安 (薬学部), 戸邊一之 (医学部), 豊岡尚樹 (工学部) : 種々の疾患に対する GLS1 の役割の解明と医薬品開発, 2020~

【情報科学ユニット】

(国内)

- 1) 朴木久恵, 戸邊一之, 奥牧人, 八木邦公, 藤坂志帆, 中條大輔, 岡部圭介, 角朝信, 西村歩, 圓角麻子, 今度悠樹 (富山大学) / 高嶋修太郎, 篠田千恵, 鈴木ひかり (高岡ふしぎ病院) / キュアコード株式会社 / オンキョースポーツ株式会社 : パーソナルヘルスレコード (PHR) 介入によるメタボリック症候群の予防・進行抑制効果の検証 (R2020203), 2020 年 12 月 21 日~2026 年 3 月 31 日.
- 2) 塩崎有宏, 中島彰俊, 米田哲, 米田徳子, 伊藤実香, 津田さやか, 小泉桂一, 奥牧人, 齋藤滋 (富山大学) / 目時弘仁 (東北医科薬科大学) / 谷川原真吾, 星和彦, 田中耕平, 山田雅明 (スズキ記念病院) : 家庭血圧測定による妊娠高血圧/妊娠高血圧腎症の発症予測—多施設共同、前方視的、数理科学的未病研究— (R2021021), 2021 年 4 月 22 日~2024 年 5 月 31 日.

- 3) 戸邊一之, 門脇真, 上田肇一, 木村巖, 春木孝之, 奥牧人, 中條大輔, 寺元剛, 岩田実, 八木邦公 (富山大学) / 山上孝司, 永田義毅 (北陸予防医学協会) / 四方雅隆 (済生会富山病院): 生活習慣病および関連する疾患の発症を予測する手法の開発 (R2021070), 2021年8月19日~2024年3月31日.

【腸管疾患ユニット】

(海外)

- 1) Asma Nusrat (アメリカ合衆国・ミシガン大学): 腸管免疫性疾患における腸管上皮の役割に関する研究, 2019, 1~

(国内)

- 1) 藏本博史 (京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 応用生物学部門 細胞機能学分野): 「逆流性食道炎の病態生理学的及び形態学的研究」 「腸管免疫性疾患における腸管神経系の役割に関する研究」 2004, 5~
- 2) 加藤伸一 (京都薬科大学 病態薬科学系 薬物治療学分野): 抗がん剤起因性腸炎に対する大建中湯, 紫苓湯および関連方剤の効果に関する研究 (和漢医薬学総合研究所 2012-2013年度, 2015年度公募型共同研究 採択課題), 2012, 4~
- 3) 合原一幸 (東京大学 国際高等研究所 ニューロインテリジェンス国際研究機構): 漢方医薬学と数理情報科学の融合による未病の科学的予測に基づく創薬研究 (和漢医薬学総合研究所 2014-2015年度公募型共同研究 採択課題), 2013, 11~
- 4) 山西芳宏 (九州工業大学大学院 情報工学研究院 生命化学情報工学研究系): 和漢薬のターゲットタンパク質のインシリコ探索によるドラッグ・リポジショニング (和漢医薬学総合研究所 2014-2015年度公募型共同研究 採択課題), 2014, 4~
- 5) 天ヶ瀬紀久子 (立命館大学 大学院薬学研究科 病態薬理学研究室): 難治性消化管疾患の病態薬理学的解析および治療ターゲット分子の探索研究, 2022, 2~

◆研究費取得状況

【未病創薬ユニット】

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (代表: 小泉桂一, 継続) 「漢方医薬学と複雑系数理科学の挑戦 ~未病の検出から始まる新たな医療戦略の構築へ~」
- 2) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (C) (代表: 条美智子, 新規) 「漢方方剤による二次性リンパ浮腫改善機序の解明」
- 3) 文部科学省科学研究費, 若手研究 (代表: 犬嶋明子, 新規) 「野菜の葉緑体由来 RNA の免疫活性化能を利用した免疫訓練の開拓と応用」
- 4) JST, ムーンショット (課題参加者: 小泉桂一, 新規) 「複雑臓器制御系の未病科学的研究」
- 5) AMED 東北大学, 橋渡し研究 (代表: 小泉桂一, 新規) 「GLS1 阻害剤を基盤としたフレイル治療および予防の開発」
- 6) 第一工業製薬, 共同研究 (代表: 小泉桂一, 継続) 「生薬抽出成分由来の天然多糖類ナノ粒子を活用した応用研究」
- 7) 協和発酵バイオ, 共同研究 (代表: 小泉桂一, 継続) 「アミノ酸分解酵素阻害化合物の研究」
- 8) ユーグレナ, 共同研究 (代表: 小泉桂一, 新規) 「ユーグレナ粉末など食品素材による寿命延伸、認知機能低下の予防効果についての検証」

【腸管疾患ユニット】

- 1) 日本学術振興会科学研究費 基盤研究(C) (代表: 山本 武) 「漢方薬併用経口免疫療法による食物抗原耐性獲得の検討と治療評価血液マーカーの探索」
- 2) 日本学術振興会科学研究費 基盤研究(C) (代表: 林 周作) 「粘膜バリアの再構築に基づく再燃予防を目指す炎症性腸疾患に対する治療戦略の創出」
- 3) 日本学術振興会科学研究費 基盤研究(C) (代表: 林 周作) 「腸管マクロファージの IL-10

- 産生亢進作用をもつ炎症性腸疾患の新たな治療薬の開発」補助事業期間延長
- 4) 日本学術振興会科学研究費 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)(代表:林 周作)
「炎症性腸疾患において腸管マクロファージが腸管粘膜の損傷を修復するメカニズムの
解明」補助事業期間延長
 - 5) 公益財団法人 喫煙科学研究財団 特定研究(代表:門脇 真, 分担:林 周作, 山本 武)
「腸内細菌による腸管神経系を介した脳腸関連の制御機構の解明と喫煙の影響」

◆研究室在籍者

【未病創薬ユニット】

学部3年生:深津日向子
学部4年生:田原旬
学部5年生:山崎萌絵
学部6年生:鈴木瑞帆, 竹内すずか
大学院修士1年:町田雄大(4月入学)

【腸管疾患ユニット】

学部3年生:平石亞希
大学院修士2年:後藤由佳
大学院博士3年:緒方華子
大学院博士3年:張 玥
大学院博士3年:金内優也
特別研究学生:上南静佳

◆学位(修士, 博士)取得者

【腸管疾患ユニット】

修士論文

後藤由佳:マウス腸管における芳香族炭化水素受容体を介した制御性T細胞の誘導機序
およびサブセットの検討

博士論文

張 玥: Effects of targeting inhibitors of plasmacytoid dendritic cell migration in immune diseases

研究開発部門

Department of Research and Development

国際共同研究分野

Division of International Cooperative Research

教授（兼）	早川 芳弘	Prof. Yoshihiro Hayakawa
客員教授		Visiting Prof. Shao-Qing Cai
客員教授		Visiting Prof. Rungpetch C. Sakulbumrungsil
客員教授		Visiting Prof. Meselhy Ragab Meselhy Zayed
客員教授	合田 幸広	Visiting Prof. Yukihiro Goda
客員教授	福田 真嗣	Visiting Prof. Shinji Fukuda
客員教授	紺野 勝弘	Visiting Prof. Katsuhiko Konno

◆研究目的及び概要

目覚ましい発展を遂げた現代西洋医学においても治療に難渋する疾患が多く、天然物を活用した伝統医学に関する研究成果や臨床効果に期待が寄せられている。伝統医学に関わる研究を高い水準で維持・発展させるためには、最新の研究方法論や天然物に関する情報交換が必要である。和漢医薬学総合研究所は天然物の研究を発展させるために、3カ国・4機関との間に国際協力拠点（ICC）を形成するとともに、8カ国・15機関と部局間協定を締結している。

国際共同研究分野は、各国の大学及び研究機関の研究者と連携して、伝統医学と現代医学を融合した国際共同研究を促進することを目的に、(1) タイ・チュラロンコン大学薬学部や中国・北京大学医学部薬学院との国際協力拠点を通じた国際共同研究の推進、(2) 大学間や部局間協定締結機関とのジョイントシンポジウム、学生交流を通じた国際共同研究の維持・発展を図っている。

◆原著論文

- 1) Duan KF, Zang XY, Shang MY, Zhang W, Xie BB, Wang L, Xu F, Cai SQ. Non-ephedrine constituents from the herbaceous stems of *Ephedra sinica*. *Fitoterapia*. 2021 Sep;153:104998. doi: 10.1016/j.fitote.2021.104998.
- 2) Wang CQ, Yi LW, Zhao L, Zhou YZ, Guo F, Huo YS, Zhao DQ, Xu F, Wang X, Cai SQ. 177 Saponins, Including 11 New Compounds in Wild Ginseng Tentatively Identified via HPLC-IT-TOF-MSⁿ, and Differences among Wild Ginseng, Ginseng under Forest, and Cultivated Ginseng. *Molecules*. 2021 Jun 2;26(11):3371. doi: 10.3390/molecules26113371.
- 3) Patikorn C, Taychakhoonavudh S, Sakulbumrungsil R, Ross-Degnan D, Anantachoti P. Financing Strategies to Facilitate Access to High-Cost Anticancer Drugs: A Systematic Review of the Literature. *Int J Health Policy Manag*. 2021 Sep 22. doi: 10.34172/ijhpm.2021.138.
- 4) Fahmy SA, Issa MY, Saleh BM, Meselhy MR, Azzazy HME. *Peganum harmala* Alkaloids Self-Assembled Supramolecular Nanocapsules with Enhanced Antioxidant and Cytotoxic Activities. *ACS Omega*. 2021 Apr 27;6(18):11954-11963. doi:10.1021/acsomega.1c00455.
- 5) Azzazy HME, Fahmy SA, Mahdy NK, Meselhy MR, Bakowsky U. Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles Loaded with *Peganum harmala* Alkaloids with Promising Antibacterial and Wound Healing Activities. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Sep 18;11(9):2438. doi: 10.3390/nano11092438.
- 6) Abdellatif AA, Zhou Y, Yamada A, Elmekawy SA, Kohyama A, Yokoyama S, Meselhy MR, Matsuya Y, Sakurai H, Hayakawa Y. Synthetic E-guggulsterone derivative GSD-1 inhibits NF- κ B signaling and suppresses the metastatic potential of breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2021 Aug;140:111737. doi:10.1016/j.biopha.2021.111737.
- 7) Rasheed DM, Emad AM, Ali SF, Ali SS, Farag MA, Meselhy MR, Sattar EA. UPLC-PDA-ESI/MS

- metabolic profiling of dill shoots bioactive fraction; evidence of its antioxidant and hepatoprotective effects in vitro and in vivo. *J Food Biochem.* 2021 Jun;45(6):e13741. doi: 10.1111/jfbc.13741.
- 8) Madi YF, Choucry MA, Meselhy MR, El-Kashoury EA. Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt: seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. *Nat Prod Res.* 2021 Nov;35(21):4063-4067. doi: 10.1080/14786419.2020.1713125.
 - 9) El-Mekkawy S, Hassan AZ, Abdelhafez MA, Mahmoud K, Mahrous KF, Meselhy MR, Sendker J, Abdel-Sattar E. Cytotoxicity, genotoxicity, and gene expression changes induced by methanolic extract of *Moringa stenopetala* leaf with LC-qTOF-MS metabolic profile. *Toxicon.* 2021 Nov;203:40-50. doi:10.1016/j.toxicon.2021.09.025.
 - 10) Kohyama A, Kim MJ, Yokoyama R, Sun S, Omar AM, Phan ND, Meselhy MR, Tsuge K, Awale S, Matsuya Y. Structure-activity relationship and mechanistic study on guggulsterone derivatives; Discovery of new anti-pancreatic cancer candidate. *Bioorg Med Chem.* 2021 Dec 11;54:116563. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116563.
 - 11) Hirasawa Y, Tanaka T, Hirasawa S, Wong CP, Uchiyama N, Kaneda T, Goda Y, Morita H. Cliniatines A-C, new Amaryllidaceae alkaloids from *Clivia miniata*, inhibiting Acetylcholinesterase. *J Nat Med.* 2022 Jan;76(1):171-177. doi:10.1007/s11418-021-01570-6.
 - 12) Yoshioka T, Itagaki Y, Abe Y, Kawahara N, Goda Y, Ozeki Y, Yamada A. NaCl dependent production of coniferin in *Alluaudiopsis marnieriana* suspension cultured cells. *Plant Biotechnol (Tokyo).* 2021 Mar 25;38(1):183-186. doi:10.5511/plantbiotechnology.21.0102a.
 - 13) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y. Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative ³¹P-NMR and Method Validation. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2021 Jul 1;69(7):630-638. doi: 10.1248/cpb.c21-00109.
 - 14) Maniwa A, Tsuji G, Ito T, Uchiyama N, Hosoe J, Ohtsuki T, Matsufuji H, Demizu Y, Goda Y. [Changes in Test Methods for Internationalization in the Japanese Pharmacopoeia (Part 1): Establishment of a Quantitative Test Method for Clonidine Hydrochloride Using HPLC Analysis]. *Yakugaku Zasshi.* 2021;141(4):591-598. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.20-00237.
 - 15) Maniwa A, Tsuji G, Ito T, Uchiyama N, Hosoe J, Ohtsuki T, Matsufuji H, Demizu Y, Goda Y. [Changes in Test Methods for Internationalization in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2): Establishment of a Quantitative Method for Lorazepam Using HPLC Analysis]. *Yakugaku Zasshi.* 2021;141(7):961-970. Japanese. doi:10.1248/yakushi.21-00010.
 - 16) Tanaka S, Uchiyama N, Goda T, Iida T, Horie S, Masada S, Arai R, Yamamoto E, Hakamatsuka T, Okuda H, Goda Y. A simple and rapid method to simultaneously analyze ciclesonide and its impurities in a ciclesonide metered-dose inhaler using on-line supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Sep 10;204:114253. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114253.
 - 17) Zhou T, Hirayama Y, Tsunematsu Y, Suzuki N, Tanaka S, Uchiyama N, Goda Y, Yoshikawa Y, Iwashita Y, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Isolation of New Colibactin Metabolites from Wild-Type *Escherichia coli* and *In Situ* Trapping of a Mature Colibactin Derivative. *J Am Chem Soc.* 2021 Apr 14;143(14):5526-5533. doi:10.1021/jacs.1c01495.
 - 18) Yamamoto E, Takeda Y, Ando D, Koide T, Amano Y, Miyazaki S, Miyazaki T, Izutsu KI, Kanazawa H, Goda Y. Discrimination of ranitidine hydrochloride crystals using X-ray micro-computed tomography for the evaluation of three-dimensional spatial distribution in solid dosage forms. *Int J Pharm.* 2021 Aug 10;605:120834. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120834.
 - 19) Yokoo H, Yamamoto E, Masada S, Uchiyama N, Tsuji G, Hakamatsuka T, Demizu Y, Izutsu KI,

- Goda Y. N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Formation from Ranitidine Impurities: Possible Root Causes of the Presence of NDMA in Ranitidine Hydrochloride. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2021;69(9):872-876. doi:10.1248/cpb.c21-00289.
- 20) Masada S, Hosoe J, Arai R, Demizu Y, Hakamatsuka T, Goda Y, Uchiyama N. Miroestrol Quantification in *Pueraria mirifica* Crude Drugs and Products by Single-Reference UPLC/PDA/MS Using Relative Molar Sensitivities to Kwakhurin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2021 Jun 1;69(6):573-580. doi: 10.1248/cpb.c21-00160.
 - 21) Miyazaki T, Aso Y, Goda Y. [Detection and Analysis of Drug Crystals in Medical Transdermal Patches by Using X-ray Diffraction Measurement]. *Yakugaku Zasshi*. 2022 Jan 1;142(1):65-74. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.21-00160.
 - 22) Tsuji G, Uchiyama N, Goda Y, Demizu Y. Study on the elimination of harmful reagents on the testing methods in the Japanese Pharmacopoeia III. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*. 2021; 52: 496-510.
 - 23) Takahashi H, Yang J, Yamamoto H, Fukuda S, Arakawa K. Complete Genome Sequence of *Adlercreutzia equolifaciens* subsp. *celatus* DSM 18785. *Microbiol Resour Announc*. 2021 May 13;10(19):e00354-21. doi:10.1128/MRA.00354-21.
 - 24) Watanabe Y, Takeuchi N, Yang J, Obana N, Morinaga K, Kusada H, Tamaki H, Fukuda S, Arakawa K. Complete Genome Sequence of *Atopobiaceae* Bacterium Strain P1, Isolated from Mouse Feces. *Microbiol Resour Announc*. 2021 Jul 15;10(28):e0062721. doi: 10.1128/MRA.00627-21.
 - 25) Sato S, Shimizu E, He J, Ogawa M, Asai K, Yazu H, Rusch R, Yamane M, Yang F, Fukuda S, Kawakami Y, Tsubota K, Ogawa Y. Positive Effects of Oral Antibiotic Administration in Murine Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 3;22(7):3745. doi: 10.3390/ijms22073745.
 - 26) Nakamura A, Kurihara S, Takahashi D, Ohashi W, Nakamura Y, Kimura S, Onuki M, Kume A, Sasazawa Y, Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Saiki S, Matsumoto M, Hase K. Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. *Nat Commun*. 2021 Apr 8;12(1):2105. doi:10.1038/s41467-021-22212-1.
 - 27) Kurokawa S, Tomizawa Y, Miyaho K, Ishii D, Takamiya A, Ishii C, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T. Fecal Microbial and Metabolomic Change during treatment course for depression: An Observational Study. *J Psychiatr Res*. 2021 Aug;140:45-52. doi: 10.1016/j.jpsychires.2021.05.009.
 - 28) Nishimoto Y, Nomaguchi T, Mori Y, Ito M, Nakamura Y, Fujishima M, Murakami S, Yamada T, Fukuda S. The Nutritional Efficacy of *Chlorella* Supplementation Depends on the Individual Gut Environment: A Randomised Control Study. *Front Nutr*. 2021 May 31;8:648073. doi: 10.3389/fnut.2021.648073.
 - 29) Ejima R, Akiyama M, Sato H, Tomioka S, Yakabe K, Kimizuka T, Seki N, Fujimura Y, Hirayama A, Fukuda S, Hase K, Kim YG. Seaweed Dietary Fiber Sodium Alginate Suppresses the Migration of Colonic Inflammatory Monocytes and Diet-Induced Metabolic Syndrome via the Gut Microbiota. *Nutrients*. 2021 Aug 16;13(8):2812. doi: 10.3390/nu13082812.
 - 30) Takahashi H, Yang J, Yamamoto H, Fukuda S, Arakawa K. Correction for Takahashi et al., "Complete Genome Sequence of *Adlercreutzia equolifaciens* subsp. *celatus* JCM 14811^T". *Microbiol Resour Announc*. 2021 Jun 3;10(22):e0050721. doi: 10.1128/MRA.00507-21.
 - 31) Furusawa C, Tanabe K, Ishii C, Kagata N, Tomita M, Fukuda S. Decoding gut microbiota by imaging analysis of fecal samples. *iScience*. 2021 Nov 22;24(12):103481. doi: 10.1016/j.isci.2021.103481.
 - 32) Yokoyama Y, Shinohara K, Kitamura N, Nakamura A, Onoue A, Tanaka K, Hirayama A, Aw W, Nakamura S, Ogawa Y, Fukuda S, Tsubota K, Watanabe M. Metabolic Effects of Bee Larva-

- Derived Protein in Mice: Assessment of an Alternative Protein Source. *Foods*. 2021 Nov 1;10(11):2642. doi: 10.3390/foods10112642.
- 33) Connell S, Kawashima M, Nakamura S, Imada T, Yamamoto H, Tsubota K, Fukuda S. Lactoferrin Ameliorates Dry Eye Disease Potentially through Enhancement of Short-Chain Fatty Acid Production by Gut Microbiota in Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 17;22(22):12384. doi: 10.3390/ijms222212384.
 - 34) Yang Y, Kumrungsee T, Kato N, Fukuda S, Kuroda M, Yamaguchi S. Supplemental *Aspergillus* lipase and protease preparations display powerful bifidogenic effects and modulate the gut microbiota community of rats. *Fermentation*. 2021; 7(4), 294. doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation7040294>.
 - 35) Suzuki K, Nakaoka S, Fukuda S, Masuya H. Energy landscape analysis elucidates the multistability of ecological communities across environmental gradients *Ecol. Monogr*. 2021;91, e01469. doi:<https://doi.org/10.1002/ecm.1469>.
 - 36) Maruyama Y, Nishimoto Y, Umezawa K, Kawamata R, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, Fukuda S. Comparison of oral metabolome profiles of stimulated saliva, unstimulated saliva, and mouth-rinsed water. *Sci Rep*. 2022 Jan 13;12(1):689. doi: 10.1038/s41598-021-04612-x.
 - 37) Nihei KI, Peigneur S, Tytgat J, Lange AB, Konno K. Isolation and characterization of FMRFamide-like peptides in the venoms of solitary sphecid wasps. *Peptides*. 2021 Aug;142:170575. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170575.
 - 38) Kanehara R, Tonouchi A, Konno K, Hashimoto M. Cyclohumulanoid Sesquiterpenes from the Culture Broth of the Basidiomycetous Fungus *Daedaleopsis tricolor*. *Molecules*. 2021 Jul 19;26(14):4364. doi:10.3390/molecules26144364.
 - 39) Alberto-Silva C, Portaro FCV, Kodama RT, Pantaleão HQ, Rangel M, Nihei KI, Konno K. Novel neuroprotective peptides in the venom of the solitary scoliid wasp *Scolia decorata ventralis*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2021 Jun 11;27:e20200171. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0171.
 - 40) Alberto-Silva C, Vieira Portaro FC, Kodama RT, Pantaleão HQ, Inagaki H, Nihei KI, Konno K. Comprehensive Analysis and Biological Characterization of Venom Components from Solitary Scoliid Wasp *Campsomeriella annulata annulata*. *Toxins (Basel)*. 2021 Dec 10;13(12):885. doi: 10.3390/toxins13120885.

臨床応用部門

Department of Clinical Application

教授（兼）	嶋田 豊	Prof. Yutaka Shimada
准教授（兼）	藤本 誠	Assoc. Prof. Makoto Fujimoto
助教（兼）	渡り 英俊	Assist. Prof. Hidetoshi Watari
客員准教授（兼）	田原 英一	Visiting Assoc. Prof. Eiichi Tahara

◆研究目的

本部門は、医療用漢方製剤の新たな応用を目指した臨床試験、植物性医薬品の開発を目指した臨床試験を推進する。即ち、和漢医薬学総合研究所における基礎研究から得られたシーズを基に、附属病院の臨床研究管理センターと連携し、トランスレーショナルリサーチの推進を図る。また、診療における疑問点を和漢医薬学総合研究所にフィードバックし、リバーstransレーショナルリサーチへの橋渡しを図る。

◆2021年度研究概要

- ・医療用漢方製剤の新たな応用を目指した臨床試験
 - (1) 特定臨床研究「軽度アルツハイマー型認知症を対象とする八味地黄丸の認知機能に対する有効性と安全性を確認する探索的オープン標準治療対照無作為化割付多施設共同試験」に関して、本学を含め症例登録を進めた。(和漢診療科 貝沼茂三郎特命教授)
 - (2) 特定臨床研究「メニエール病に対する苓桂朮甘湯のプラセボ対照無作為化二重盲検試験」に関して、倫理審査の承認を得て臨床試験を開始した。(和漢診療科 嶋田 豊教授, 耳鼻咽喉科 將積日出夫教授)
 - (3) 医師主導治験「パクリタキセル (Tri-weekly) 誘発性の筋肉痛・関節痛に対する芍薬甘草湯の緩和作用を検討するプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験」に関して、倫理審査の承認を得て臨床試験を開始した。(産科婦人科 中島彰俊教授)
- ・植物性医薬品の開発を目指した臨床試験
 - (1) 特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」に関して、症例登録を進めた。(和漢研 東田千尋教授, 神経精神科 鈴木道雄教授)
 - (2) 特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」に関して、臨床試験を開始した。(和漢研 東田千尋教授, 整形外科 川口善治教授)
 - (3) 「慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者の physical activity に対するニクジュヨウエキスの効果 (仮題)」に関して、臨床試験の倫理審査申請に向けての作業を進めた。(和漢研 東田千尋教授, 臨床腫瘍部 林 龍二教授)

◆原著論文

- 1) Nishida T, Tsuneyama K, Tago Y, Nomura K, Fujimoto M, Nakajima T, Noguchi A, Minamisaka T, Hatta H, Imura J. Effect of continuous feeding of Ayu-Narezushi on lipid metabolism in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci. World J.* 2021 Sep 6; 2021:1583154.
doi: 10.1155/2021/1583154.
- 2) 田原英一, 山下嘉昭, 下田宗人, 沼田真由美: 自家製丸薬調剤の製造実態調査報告—技術料の適正化の必要性—. 2021 Oct; 日東医誌, 72(4):397-404.

◆症例報告

- 1) 矢野博美, 牧俊允, 吉永亮, 井上博喜, 田原英一: 乳癌治療に関連する諸症に漢方治療が奏効した5例. 2021 Jul; 日東医誌, 72(3):264-274.

- 2) 田原英一, 牧俊允, 吉永亮, 井上博喜, 矢野博美: 著明な栄養障害に五苓散と補血剤が著効した1例. 2021 Apr; 日東医誌, 72(2):148-152.
- 3) 井上博喜, 牧俊允, 吉永亮, 矢野博美, 田原英一: 心下痞堅を目標に木防己湯を使用し有効であった2症例. 2021 Apr; 日東医誌, 72(2):166-170.
- 4) 吉永亮, 牧俊允, 井上博喜, 矢野博美, 田原英一: 蜂窩織炎における漢方治療の意義—下肢蜂窩織炎の3症例から—. 2021 Apr; 日東医誌, 72(2):135-143.

産官学連携部門

Department of Academia-Industry-Government Collaboration

教授（兼） 小泉 桂一 Prof. Keiichi Koizumi

◆目的

当研究所の使命の1つは、新薬の発見と開発であり、これには産業、政府、学際領域の協力が必要である。産官学連携部門は、医薬品開発を促進するために研究室の医薬品候補を発掘し、他の企業や公的機関にその候補を紹介し、さらに、これら医薬品候補を基盤に、起業を希望する当研究所の職員に対してのサポートを行う。なお、本部門の業務は、富山大学学術研究・産学連携本部と連携をとることで、効率的かつ迅速に遂行される仕組みとなっている。

<https://www.u-toyama.ac.jp/collaboration/cooperation/about/>

◆2021 年度活動概要

本年度は、以下を実施した。

- (1) 研究所所員が協調した企業との共同研究体制の構築を行った。具体的には、産官学連携部門が窓口になり、生体防御学領域、複雑系分野、および未病分野の3研究室合同で、近々、富山県の医薬品企業との共同研究を締結予定である。
- (2) 和漢医薬学総合研究所の研究者が中核となるムーンショット型研究開発制度（内閣府、JST）の管理運営の補助業務をコーディネートした。

今後は、上記の業務を発展させることで、和漢医薬学総合研究所の産官学連携に貢献する。

◆原著論文

- 1) Fujii T, Shimizu T, Katoh M, Nagamori S, Koizumi K, Fukuoka J, Tabuchi Y, Sawaguchi A, Okumura T, Shibuya K, Fujii T, Takeshima H, Sakai H. Survival of detached cancer cells is regulated by movement of intracellular Na⁺,K⁺-ATPase. *iScience*. 2021 Apr 15;24(5):102412. doi: 10.1016/j.isci.2021.102412.
- 2) Inujima A, Koizumi K, Shibahara N. Immunostimulatory properties of heat-resistant RNA in a decoction of *Glycyrrhizae Radix*. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jan;145:112457. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112457.

◆著書

- 1) 小泉桂一. 循環器内科. 吉村道博編. 東京：科学評社；2021 Sep. DNB 理論によるメタボリックシンドロームの未病状態の検出；p.321-325.

◆総説

【未病創薬ユニット】

- 1) Aihara K, Liu R, Koizumi K, Liu X, Chen L. Dynamical network biomarkers: Theory and applications. *Gene*. 2022 Jan; 808 : doi:10.1016/j.gene.2021.145997.

◆学会報告

(国内学会)

- 1) 竹谷皓規, 山崎萌絵, 田原 旬, 小泉桂一, 山本 武, 大嶋佑介, 吉田泰彦, 春木孝之. ラマン分光法と DNB 解析による細胞遷移状態における分岐点解明技術開発. レーザー学会第 557 回研究会；2021 Nov 19；オンライン.
- 2) 金山大介, 鈴木瑞穂, 岡田卓哉, 条美智子, 合田浩明, 小泉桂一, 豊岡尚樹. グルタミンナーゼ阻害に基づく画期的抗肥満薬の開発研究. 2021 年度有機合成化学北陸セミナー；2021 Sep 29；オンライン.

- 3) 竹谷皓規, 佐藤勉, 和田暁法, 小泉桂一, 山崎萌絵, 田原 旬, 山本 武, 大嶋佑介, 春木孝弘, 吉田泰彦. ラマン分光法と DNB 解析を用いた炎症の遷移点検出に関する研究. 2021 年度レーザー学会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan 12 ; オンライン.
- 4) 文室温人, 山本 武, 竹谷皓規, 小泉桂一, 片桐崇史, 大嶋佑介. ラマン分光法によるマウス免疫細胞のフェノタイプ解析. 2021 年度レーザー学会第 42 回年次大会 ; 2022 Jan 12 ; オンライン.
- 5) 山崎萌絵, 田原旬, 竹谷皓規, 小泉桂一, 吉田泰彦, 春木孝之, 朝岡竜士, 大嶋佑介. マクロファージ細胞の炎症誘導過程におけるラマン光の測定とその揺らぎの検出. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; オンライン.
- 6) 町田雄大, 赤木一考, 小泉桂一. 脂肪特異的 *GLS1* 欠損は高脂肪食負荷に伴う肥満を抑制する. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 28 ; オンライン.
- 7) 鈴木悠乃, 宗像理沙, 小俣大樹, 小泉桂一, 鈴木亮. 甘草由来ナノ粒子の免疫賦活化特性の評価とワクチンアジュバントへの応用. 日本薬学会第 142 年会 ; 2022 Mar 26 ; オンライン.

◆共同研究

(海外)

- 1) Jerome W. Breslin (Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Professor): Lymphatic contraction mechanisms, 2017～
- 2) Luonan Chen (Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, China, Professor): Medical applications in DNB theory, 2014～

(学内)

- 1) 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 藤井一希 (研究推進総合支援センター) : アクアポリン 1 遺伝子改変マウスの作製と表現型解析, 2020～
- 2) 春木孝之 (都市デザイン学部), 大嶋佑介 (工学部) : DNB 解析による未病の検出, 2020～
- 3) 森 寿 (医学部), 中川 崇 (医学部), 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 笹岡利安 (薬学部), 戸邊一之 (医学部), 豊岡尚樹 (工学部) : 種々の疾患に対する *GLS1* の役割の解明と医薬品開発, 2020～

◆研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (代表 : 小泉桂一, 継続) 「漢方医薬学と複雑系数理科学の挑戦 ～未病の検出から始まる新たな医療戦略の構築へ～」
- 2) JST, ムーンショット (課題参加者 : 小泉桂一, 新規) 「複雑臓器制御系の未病科学的研究」
- 3) AMED 東北大学, 橋渡し研究 (代表 : 小泉桂一, 新規) 「*GLS1* 阻害剤を基盤としたフレイル治療および予防の開発」
- 4) 第一工業製薬, 共同研究 (代表 : 小泉桂一, 継続) 「生薬抽出成分由来の天然多糖類ナノ粒子を活用した応用研究」
- 5) 協和発酵バイオ, 共同研究 (代表 : 小泉桂一, 継続) 「アミノ酸分解酵素阻害化合物の研究」
- 6) ユーグレナ, 共同研究 (代表 : 小泉桂一, 新規) 「ユーグレナ粉末など食品素材による寿命延伸, 認知機能低下の予防効果についての検証」

和漢医薬教育研修センター

Kampo Education and Training Center

教授	柴原 直利	Prof. Naotoshi Shibahara
教授（兼）	嶋田 豊	Prof. Yutaka Shimada
教授（兼）	加藤 敦	Prof. Atsushi Kato
准教授（兼）	藤本 誠	Assoc. Prof. Makoto Fujimoto
助教（兼）	渡り 英俊	Assist. Prof. Hidetoshi Watari

◆研究目的

文部科学省は医学・薬学・看護教育のモデルコアカリキュラムにおいて漢方教育について記載しており、2018年の医学教育モデルコアカリキュラムには、「漢方医学の特徴と主要な漢方処方への適応及び薬理効果を概説できる」とある。このモデルコアカリキュラムに基づき、多くの医療系学部が漢方教育に取り組んでいるが、漢方医学的概念を理解して漢方医学教育を実践できる教員はほとんどいない。したがって、漢方教育が可能な教員の育成が必要である。そこで本センターは、(1) 漢方医学教育における研修システムを確立すること、(2) 医師および薬剤師に漢方臨床研修を提供することを目的としている。

◆2021年度研究概要

(1) 漢方医学教育

① 和漢医薬学入門

医学部医学科、看護学科、薬学部薬学科、創薬学科の2年次の全学生を対象として和漢医薬学について講義するもので、2021年度はリモート形式で「人を診る・漢方診断学 漢方医学総論」とのテーマで講義を行った。

② 東洋医学概論

薬学部薬学科及び創薬学科の3年次の学生を対象にグループ学習により和漢薬に関わる基礎力、実践力および総合力を習得するもので、2021年度は10月より1月にかけて対面形式で行った。

③ 和漢医薬学演習

薬学部薬学科及び創薬学科の4年次の和漢薬コースを選択した学生を対象に東洋医学の基本的概念や診断・治療法について講義するもので、2021年度は4月より7月にかけて対面形式で症例検討、発表準備と発表会を行った。

④ 和漢医薬学実習

薬学部薬学科及び創薬学科の4年次の和漢薬コースを選択した学生を対象に外来見学および漢方調剤・漢方煎剤作製を体験するもので、2021年度は4月より8月にかけて対面形式で行った。

⑤ 薬学実務実習

薬学部薬学科の5年次の学生を対象に、漢方専門外来に陪席して症例を通して診療の実際や薬剤について学習するもので、2021年度は9月より11月にかけて対面で実習を行った。

2022年度も①～⑤を継続する予定である。

(2) 漢方医学研修

① 疾患別漢方ショー・トレクチャー

学内初期研修医と後期研修医及び医師、薬剤師、学生を対象とし、疾患毎の漢方方剤のエビデンスおよび頻用漢方薬を解説するもので、「冷え症に対する漢方薬」、「虚弱に対する漢方薬」、「夏バテに使用される漢方薬」、「全身倦怠感に対する漢方治療」、「下痢に対する漢方薬」、「痛みに対する漢方治療」、「尿トラブルの漢方治療」、「研修医が知っておくべき漢方の知識ならびに代表的方剤」、「便秘に対する漢方治療」のテーマで開催した。

② 和漢医薬研修プログラム

医師・薬剤師・鍼灸師の資格を有する医学部及び薬学部の教員を対象に、漢方医学関連講義や症例検討

会，外来陪席による研修プログラムを実施するものだが，コロナ渦の影響もあり，今年度は参加希望者がみられなかった。

③ 漢方診療研修

漢方に興味のある医師・薬剤師・鍼灸師を対象に，漢方専門外来に陪席して症例を通した漢方診療を研修するものであるが，コロナ渦の影響もあり，今年度は参加希望者がみられなかった。

④ 漢方専門医臨床研修

漢方専門医の取得を希望する医師を対象とし，基本領域専門医取得後より週1回以上の外来及び入院診療を通した3年間の臨床研修を実施するものだが，コロナ渦の影響もあり，今年度は参加希望者がみられなかった。

⑤ 漢方診断研修

漢方を扱う富山県内の医師・薬剤師・鍼灸師を対象とし，提示した症例について追加質問事項を含めて漢方医学的診断に基づいた治療を研修するものである。偶数月に開催した。

⑥ 漢方薬剤師研修

富山県内の漢方薬を扱う薬剤師に対し，附属病院薬剤部の協力の下，生薬や漢方調剤・服薬指導を研修するものだが，コロナ渦の影響もあり，今年度は実施できなかった。

2022年度は①及び⑤を継続するとともに，②③④⑥の研修を開催したいと考えている。

◆原著論文

- 1) Inujima A, Koizumi K, Shibahara N. Immunostimulatory properties of heat-resistant RNA in a decoction of *Glycyrrhizae Radix*. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jan;145:112457. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112457.
- 2) Nishida T, Tsuneyama K, Tago Y, Nomura K, Fujimoto M, Nakajima T, Noguchi A, Minamisaka T, Hatta H, Imura J. Effect of continuous feeding of Ayu-Narezushi on lipid metabolism in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci. World J*. 2021 Sep 6;2021:1583154. doi: 10.1155/2021/1583154.
- 3) Lu TT, Shimadate Y, Cheng B, Kanekiyo U, Kato A, Wang JZ, Li YX, Jia YM, Fleet GWJ, Yu CY. Synthesis and glycosidase inhibition of 5-C-alkyl-DNJ and 5-C-alkyl-1-ido-DNJ derivatives. *Eur J Med Chem*. 2021 Nov 15;224:113716. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113716.
- 4) Li YX, Wang JZ, Kato A, Shimadate Y, Kise M, Jia YM, Fleet GWJ, Yu CY. Stereocomplementary synthesis of casuarine and its 6-*epi*-, 7-*epi*-, and 6,7-*diepi*-stereoisomers. *Org Biomol Chem*. 2021 Nov 10;19(43):9410-9420. doi: 10.1039/d1ob01725j.
- 5) Byatt BJ, Kato A, Pyne SG. Synthesis and Structural Revision of Glyphaeaside C. *Org Lett*. 2021 May 21;23(10):4029-4033. doi: 10.1021/acs.orglett.1c01248.
- 6) Bordes A, Poveda A, Fontelle N, Ardá A, Guillard J, Ruan YB, Marrot J, Imaeda S, Kato A, Désiré J, Xie J, Jiménez-Barbero J, Blériot Y. Synthesis and chelation study of a fluoroionophore and a glycopeptide based on an aza crown iminosugar structure. *Carbohydr Res*. 2021 Mar;501:108258. doi:10.1016/j.carres.2021.
- 7) Désiré J, Foucart Q, Poveda A, Gourlaouen G, Shimadate Y, Kise M, Proceviat C, Ashmus R, Voadlo DJ, Jiménez-Barbero J, Kato A, Blériot Y. Synthesis, conformational analysis and glycosidase inhibition of bicyclic nojirimycin C-glycosides based on an octahydrofuro[3,2-b]pyridine motif. *Carbohydr Res*. 2022 Jan;511:108491. doi: 10.1016/j.carres.2021.108491.
- 8) Zhu S, Jagadeesh Y, Tran AT, Imaeda S, Boraston A, Alonzi DS, Poveda A, Zhang Y, Désiré J, Charollais-Thoenig J, Demotz S, Kato A, Butters TD, Jiménez-Barbero J, Sollogoub M, Blériot Y. Iminosugar C-Glycosides Work as Pharmacological Chaperones of NAGLU, a Glycosidase Involved in MPS IIIB Rare Disease*. *Chemistry*. 2021 Aug 5;27(44):11291-11297. doi: 10.1002/chem.202101408.
- 9) Kato A, Nakagome I, Kanekiyo U, Lu TT, Li YX, Yoshimura K, Kishida M, Shinzawa K, Yoshida T, Tanaka N, Jia YM, Nash RJ, Fleet GWJ, Yu CY. 5-C-Branched Deoxynojirimycin: Strategy for Designing a 1-Deoxynojirimycin-Based Pharmacological Chaperone with a Nanomolar Affinity

◆著書

- 1) 柴原直利. 専門家のコンセンサスに基づくポケット漢方薬ガイド 34. ポケット漢方薬ガイド編集委員会編. 東京: 南山堂; 2021 Aug.

◆学会報告

(国内学会)

- 1) 渡り英俊, 金原嘉之, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊. 桂枝茯苓丸料合茯苓沢瀉湯を用い加療を行った9症例の検討. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台.
- 2) 野上達也, 渡り英俊, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊. 漢方医学教育において学生同士のロールプレーを用いたシミュレーション教育はレクチャー形式の教育より学生の自己習熟度の評価を高める. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台.
- 3) 柴原直利. 専攻医のための説明会. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台.
- 4) 柴原直利. 指導医講習会. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台.
- 5) 柴原直利. 医療倫理・医療安全講習会. 第71回日本東洋医学会学術総会; 2021 Aug 13-15; 仙台.

◆その他

- 1) 柴原直利. 症例検討. 第58回漢方診断研究会; 2021 Apr 15; 富山.
- 2) 柴原直利. 臨床で頻用される10方剤. 富山のくすし 2021年度第1回漢方医学と生薬講座; 2021 Apr 17; 富山.
- 3) 柴原直利. 漢方医学の基本的な考え方. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2021 May 08; 富山.
- 4) 柴原直利. 症例検討. 第86回富山漢方談話会; 2021 May 18; 富山.
- 5) 柴原直利. 感染症の漢方治療. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2021 May 22; 富山.
- 6) 柴原直利. 不眠症の漢方治療. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2021 Jun 05; 富山.
- 7) 柴原直利. 肝・胆道系疾患の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第2回漢方医学と生薬講座; 2021 Jun 05; 富山.
- 8) 柴原直利. 夏バテに使用される漢方薬. 第19回疾患別漢方ショートレクチャー; 2021 Jun 10; オンライン.
- 9) 柴原直利. 症例検討. 第59回漢方診断研究会; 2021 Jun 17; 富山.
- 10) 柴原直利. 疲労・倦怠感の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第3回漢方医学と生薬講座; 2021 Jul 03; 富山.
- 11) 柴原直利. 漢方治療における随証治療と病名治療. 第48回大阪大谷大学薬学部地域連携学術交流会; 2021 Jul 10; オンライン.
- 12) 柴原直利. 症例検討. 第87回富山漢方談話会; 2021 Jul 20; 富山.
- 13) 柴原直利. 不眠の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第4回漢方医学と生薬講座; 2021 Oct 02; 富山.
- 14) 柴原直利. 身体と食物の陰陽について. 富山短期大学公開特別講演会; 2021 Oct 03; オンライン.
- 15) 柴原直利. 不眠症状に対する漢方随証治療の効果. 2021年中日中西医結合交流大会; 2021 Oct 20; オンライン.
- 16) 柴原直利. 症例検討. 第60回漢方診断研究会; 2021 Oct 21; 富山.
- 17) 向野晃弘, 渡り英俊, 藤本誠, 貝沼茂三郎, 柴原直利, 嶋田豊. 通脈四逆湯が有効であった反復性うつ病性障害を合併した起立性調節障害の1例. 第25回和漢診療学シンポジウム; 2021 Nov 7; オンライン.

- 18) 渡り英俊, 向野晃弘, 藤本誠, 貝沼茂三郎, 柴原直利, 嶋田豊. 背部の症状を目標に用いた当帰湯が有効であった2例. 第25回和漢診療学シンポジウム; 2021 Nov 7; オンライン.
- 19) 柴原直利. 症例検討. 第88回富山漢方談話会; 2021 Nov 16; 富山.
- 20) 柴原直利. 皮膚疾患の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第5回漢方医学と生薬講座; 2021 Nov 20; 富山.
- 21) 柴原直利. 消化器疾患の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第6回漢方医学と生薬講座; 2021 Dec 04; 富山.
- 22) 柴原直利. 尿トラブルの漢方治療. 第23回疾患別漢方ショートレクチャー; 2021 Dec 09; オンライン.
- 23) 柴原直利. 症例検討. 第61回漢方診断研究会; 2021 Dec 16; 富山.
- 24) 柴原直利. 症例検討. 第89回富山漢方談話会; 2022 Jan 18; 富山.
- 25) 柴原直利. 神経疾患の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第7回漢方医学と生薬講座; 2022 Jan 22; 富山.
- 26) 柴原直利. 漢方薬のEBMー服薬指導に役立つ知識ー. 薬剤師のためのツムラ漢方WEBセミナー; 2022 Feb 17; オンライン.
- 27) 柴原直利. 症例検討. 第61回漢方診断研究会; 2022 Feb 24; 富山.
- 28) 柴原直利. 癌治療における漢方治療. 富山のくすし 2021年度第8回漢方医学と生薬講座; 2022 Feb 26; 富山.
- 29) 柴原直利. 症例検討. 第90回富山漢方談話会; 2022 Mar 15; 富山.
- 30) 柴原直利. 眼科疾患の漢方治療. 富山のくすし 2021年度第8回漢方医学と生薬講座; 2022 Mar 26; 富山.

◆共同研究

(海外)

- 1) 方剛 (広西中医薬大学 荘医学准教授): 中日国際協力プロジェクトによる荘医学の新展開に関わる研究, 2017~
- 2) Nguyen Phuong Dung (University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city, Faculty of Traditional Medicine, Professor): 伝統薬の薬効評価に関わる日越共同研究, 2017~

(国内)

- 1) 花輪壽彦 (北里大学東洋医学総合研究所 所長), 小田口浩 (北里大学東洋医学総合研究所 副所長), 三瀧忠道 (島県立医科大学 会津医療センター漢方医学講座 教授), 並木隆雄 (千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座 准教授), 新井信 (東海大学医学部内科学系 准教授), 村松慎一 (自治医科大学内科学講座 神経内科学部門 特命教授), 嶋田豊 (富山大学医学薬学研究部 和漢診療学講座 教授): 漢方標準化プロジェクト, 2013~
- 2) クラシエ製薬株式会社: 瘀血における漢方処方有用性の薬理的検討, 2014~
- 3) 医療法人社団ファインメッド: 五苓散の経口投与と経直腸投与による血中成分濃度の相違に関する研究, 2016~

(学内)

- 1) 嶋田豊 (富山大学医学薬学研究部 (医学) 和漢診療学講座 教授): 漢方医学の臨床研修プログラムの開発, 1999~
- 2) 齋藤滋 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 産科婦人科学 教授), 林周作 (富山大学和漢医薬学総合研究所 消化管生理学 助教), 櫻井宏明 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学 教授), 藤秀人 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 医療薬学 教授), 梅寄雅人 (富山大学和漢医薬学総合研究所 情報科学 准教授), 春木孝之 (富山大学工学部 知能情報工学 講師), 笹野一洋 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 数学教室 教授), 中川肇 (富山大学附属病院 経営企画情報部 教授), 戸邊一之 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 第一内科学 教授), 関根道和 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 疫学健康政策学 教授), 笹岡利安 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 臨床薬理

学教授), 杉山敏郎 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 第三内科学教授), 北島勲 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 臨床分子病態検査学教授), 山城清二 (富山大学附属病院総合診療部教授), 鈴木道雄 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 神経精神医学教授), 嶋田豊 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 和漢診療学教授), 竹内登美子 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 老年看護学教授), 高崎一朗 (富山大学工学部生体情報薬理学准教授): 医薬学と情報数理学のからの挑戦〜「未病」および「時間治療」の規定因子の検出からの新たな医療戦略の構築〜, 2015〜

◆研究室在籍者

学部3年生: 小西真央

学部4年生: 鳥山花甫

学部5年生: 榎並魁人

大学院博士1年: 宋 迦楠 (10月入学)

民族薬物資料館

Museum of Materia Medica

館長（教授） 森田 洋行 Curator / Prof. Hiroyuki Morita
技能補佐員 出口 鳴美 Research Assist. Narumi Deguchi

◆目的

世界の諸民族の伝統薬物を蒐集、保存、展示するとともに、それらの学術情報を収載したデータベースを構築し、伝統薬物に関する共同研究を推進する。

◆活動概要

I) 民族薬物データベース (ETHMEDmmm) の構築

当資料館には、和漢薬、アーユルヴェーダ生薬、ユナニー生薬、タイ生薬、インドネシア生薬、チベット生薬など約 31,000 点の生薬標本が保存されている。これらに関するデータベース（以下、DB）について順次、生薬標本情報並びに学術情報を更新、整理している。

II) 一般公開

第 35 回民族薬物資料館一般公開：令和 3 年 11 月 7 日（午後 1 時 30 分～午後 5 時）

本学和漢医薬学総合研究所の小松かつ子教授を講師として、『民族薬物資料館アーカイヴス with 私』という演題で特別講演を開催した。講演後、同教授による資料館案内を開催した。コロナウイルス感染症対策のため、完全予約制にして参加を募り、講演会場においても座席数に余裕をもたせるなど工夫を凝らした。来館者は 33 名。

◆著書（翻訳、編集、分担・共同執筆を含む）

- 1) Win NN, Morita H. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 114. Kinghorn A.D., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J., Asakawa Y., Liu J-K. eds. Singapore: Springer; 2021 May. Bioactive Compounds from Medicinal Plants in Myanmar; p.135-251.

◆その他

- 1) 東京人。「東洋医学ミュージアム」；2021 Jul 3；p 101. 施設紹介.
- 2) 健康・機能性食品の基原物質事典 一食薬区分（非医）：動物由来物等・その他（化学物質等）編一. 2021 Sep 15；p 22. 生薬画像提供.
- 3) 小松かつ子, 出口鳴美. 現地学習（民族薬物資料館）. 令和 3 年度富山市民大学講座「生活医学薬学を学ぶ」；2021 Nov 29；富山大学.

◆記録

I) 見学者（2021 年 4 月 1 日 ～2022 年 3 月 31 日）

来館者総数：205 名（日本人 205 名）

案内総回数：21 回（日本人 21 回）

【国内】 文部科学省, 国公立大学 4 校, 公立高校 1 校, 富山大学公開講座, 製薬企業他

II) 民族薬物データベース（2021 年 4 月 1 日 ～2022 年 3 月 31 日）

アクセス数：34,765 件

Ⅲ) 証類本草データベース (2021年4月1日 ~2022年3月31日)

アクセス数 : 3,420件

専門検索登録者数 : 32名

活動記録

2021年度 和漢医薬学総合研究所活動記録

- 5月25日 令和2年度共同研究報告セミナー（民族薬物資料館3階会議室）
- 7月10日 第25回和漢医薬学総合研究所夏期セミナー（オンライン，民族薬物資料館3階会議室）
大学院っておもしろい！
- 7月14日 令和3年度第1回和漢医薬学総合研究所重点研究プロジェクト等合同集会
- 8月26日 令和3年度第1回東西医薬学交流セミナー
兼第426回和漢医薬学総合研究所セミナー
貝沼 茂三郎 特命教授（医学部医学科和漢診療学）
漢方医学的病態をもとにした基礎臨床研究の取り組み
- 11月7日 第35回民族薬物資料館一般公開
- 11月10日 令和3年度第2回和漢医薬学総合研究所重点研究プロジェクト合同集会
- 11月30日 第16回国際伝統医薬シンポジウム・富山2021（富山県民会館及びオンラインのハイブリッド開催）
～12月1日 第41回和漢医薬学総合研究所特別セミナーと合同開催
ASEAN-富山伝統医薬ネットワークサミット2021
- 1月13日 第427回和漢医薬学総合研究所セミナー
合田 幸広 博士（国立医薬品食品衛生研究所 所長）
食薬区分と機能性表示食品
- 1月27日 富山大学和漢医薬学総合研究所・長崎大学熱帯医学研究所第11回交流セミナー
（オンライン）
熱帯医学と和漢薬研究の新展開－新しい医療体系の構築をめざして－
- 1月31日 和漢医薬学総合研究所運営協議会（民族薬物資料館3階会議室）
- 2月2日 令和3年度第2回東西医薬学交流セミナー
兼第428回和漢医薬学総合研究所セミナー
將積 日出夫 教授（医学部医学科 耳鼻咽喉科学）
難治性めまい診療のUp to date－和漢薬の使用経験を含めて－
- 2月8日 第429回和漢医薬学総合研究所セミナー
福田 真嗣 博士（慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任教授）
腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来

**2021年度
共同利用・共同研究活動**

高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの品質評価法に関する研究

申請代表者	内山 奈穂子	国立医薬品食品衛生研究所・生薬部	第二室長
研究統括者	東田 千尋	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	教授
所内共同研究者	稲田 祐奈	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	助教

■背景・目的

現代において、単味生薬や漢方製剤は広く医薬品として使用されているが、現行の日本薬局方収載生薬の用途はほとんどが漢方製剤の製造原料であり、単味の医薬品としての承認は少ない。しかし、有効性と安全性のエビデンスを備えた単味生薬エキスが、医薬品として承認されるための制度整備が徐々に進められている。その一つとして、単味生薬製剤の承認審査に具備すべく特性を考慮した「生薬のエキス製剤の製造販売承認申請に係るガイダンスについて」が発出された（薬生審査発 1225 第 6 号，平成 27 年 12 月 25 日）。本ガイダンスの発出後，例えば，効能効果として中年期以降の物忘れの改善が示されたオンジエキスについては，OTC として市販されている。

一方，富山大学和漢研・東田らは，高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの薬理的検討(in vitro, in vivo, ヒト試験を含む)を行ってきた。例えばニクジュヨウエキスに関しては，脊髄損傷の受傷後慢性期から投与しても機能を回復させる活性があることを見出した（特許出願中）。また廃用性筋萎縮マウスにニクジュヨウエキスを投与すると歩行機能が改善することも見出した [1]。脊髄損傷マウスにおいては，ニクジュヨウエキスは経口投与でも筋肉注射でも運動機能回復効果を示したが，少なくとも筋肉注射の場合の活性成分は *verbascoside* (*acteoside*) であることが示された [2]。

さらに東田らは，臨床研究として「ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの予防及び改善効果の研究」を実施し，ニクジュヨウエキス 12 週間投与により歩行機能が改善する結果を得た [3]。これら基礎研究と臨床研究の結果を踏まえて，現在は新たに，富山大学附属病院において，特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」が進行中であり，ニクジュヨウエキスが脊髄症の機能障害改善に有効かどうかを検証することになっている。

神経機能の活性化において，ニクジュヨウエキス中の活性成分は *verbascoside* (*acteoside*) と *echinacoside* であることを東田らは既に見出しており，日本薬局方で規定されているニクジュヨウのうち，これら 2 化合物の含有量が高いことが報告されている *Cistanche tubulosa* を基原とするニクジュヨウを用い，また 30% エタノールエキスでの抽出を採用しており，この製法によるエキスを上述の臨床研究でも用いている。

ニクジュヨウエキスに関しては，今後，医師主導型治験の実施も想定されており，そこで成果が出た場合の，承認申請まで想定すると，ニクジュヨウエキスの医薬品としての品質評価法の確立が必要である。そこで，本共同研究では，ニクジュヨウ 30% エタノールエキスの品質評価法の確立を目的として，確認試験，定量法等の試験法の検討を行った。

■結果・考察

高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスとして，*C. tubulosa* を基原とするニクジュヨウを用いた 30%

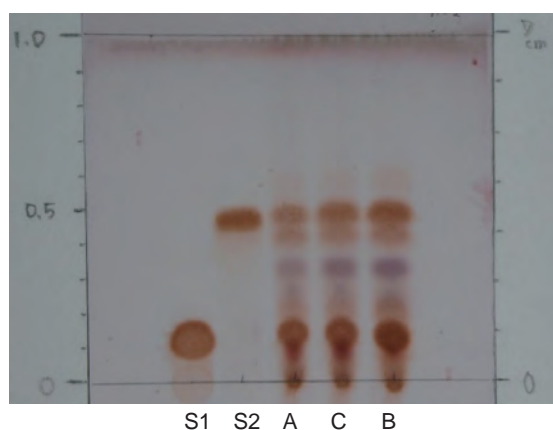
種目 (特定研究)

エタノールエキスについて、以下の通り、品質評価に関する確認試験、定量法等の試験法の検討を行った。

- 1) 各国公定書 (日本薬局方, 中国薬局方, 香港生薬標準など) での生薬ニクジュヨウの規格を参考として, 活性成分である verbascoside 及び echinacoside を指標成分としたニクジュヨウエキスの確認試験及び定量法の検討を行う。特に 30%エタノールエキスであることから, 指標成分の抽出効率等を考慮した試験法とする。
- 2) 確認試験: ニクジュヨウ 30%エタノールエキスを用いた確認試験として, TLC での検討を行う。複数のロットを用いて, 展開条件, 発色試薬等の検討を行う。
- 3) 定量法: HPLC を用いた試験法を検討する。複数ロットを用いて試料調製法及び分析条件等を検討する。
- 4) 含量規格値の設定: 確立した試験法により複数ロットでの定量分析を行い, 定量指標成分の含量規格値を設定する。
- 5) その他の品質評価項目として, 乾燥減量や灰分のデータも複数ロットを用いて同時に取得する。
- 6) 上記検討結果を反映させたニクジュヨウ 30%エタノールエキスの品質評価法案を作成する。

【確認試験】

ニクジュヨウ 30%エタノールエキスについて, TLC を用いた確認試験法を検討した。複数ロットでの TLC の結果を図 1 に示す。試料 0.2 g を用いて調製を行い, 確認指標成分としては, 日局生薬ニクジュヨウと同じくベルバスコシドを選択した。エキナコシドは参考までにスポットした。エキス 3 ロットについて 3 回試験した結果, いずれも標準溶液から得たスポット (ベルバスコシド) と色調及び Rf 値が等しかった。



- 標準溶液: スポット量 10 μ L
- S1: エキナコシド標準溶液 (1mg/mL)
- S2: ベルバスコシド標準溶液 (1mg/mL) → 確認成分
- ニクジュヨウ 30%エタノールエキス (0.2 g): スポット量 5 μ L
- A: Lot. A
- B: Lot. B
- C: Lot. C

(図 1) ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの TLC 結果

以上の結果から, ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの確認試験 (案) は, 以下の通りとした。

<確認試験 (案)>

試料に水 5 mL 及び 1-ブタノール 5 mL を加え, 15 分間振り混ぜた後, 遠心分離し, 1-ブタノール層を試料溶液とする。

別に薄層クロマトグラフィー用ベルバスコシド 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし, 標準溶液とする。

これらの液につき, 薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液 20 μ L 及び標準溶液 10 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/ギ酸/水混液 (8:1:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後, 薄層板を風乾する。これに噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液を均等に噴霧し, 105°C で 5 分間加熱するとき, 試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは, 標準溶液から得たスポットと色調及び Rf 値が等しい。

【定量法】

種目 (特定研究)

ニクジュヨウ 30%エタノールエキスについて、HPLC を用いた定量法を検討した。定量指標成分としてエキナコシドとベルバスコシドを選択し、両成分についての定量法を検討した。現時点での定量法の試験条件は、以下の通りである。当初、エキナコシドとベルバスコシドを別々に分析する定量法を検討していたが、最終的に、エキナコシド及びベルバスコシドを同時定量する方法とした。

項目	エキナコシド及びベルバスコシド定量法
試料溶液調整方法	本品 0.2g → 25mL 10%メタノール抽出 上澄み 2mL → 20mL メスアップ (1回抽出)
標準溶液調整方法	エキナコシド及びベルバスコシド エキナコシド 10mg 及びベルバスコシド 5mg → 100mL (溶媒:0.02mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 3.5):メタノール混液 (9:1))
試験条件	
検出器	紫外吸光光度計 (330nm)
カラム	ODS, 4.6×150mm, 5µm
カラム温度	60°C付近の一定温度
移動相	水/アセト/ギ酸混液 (1810:190:1)
注入量	10 µL
流量	エキナコシドの保持時間: 約 15 分 (参考:ベルバスコシドの保持時間: 約 37 分)
システム適合性	理論段数, シンメトリ係数:未定 6 回の RSD:1.5% 以下

【含量規格値の設定】

事前検討として、当初の2成分個別分析での定量法(案)を用いて、生薬ニクジュヨウ及び30%エタノールエキスの成分含量を測定した (data not shown)。その結果、生薬ニクジュヨウについて複数ロットで測定した成分含量は、エキナコシド、ベルバスコシドともにロット間のばらつきが大きかった (data not shown)。そのため、30%エタノールエキスについてもロット間のばらつきがある可能性が示唆された。従って、含量規格値については、今後、上記定量法(案)を最終的に確立した後、ニクジュヨウ 30%エタノールエキスを定量し設定する予定である。

【乾燥減量】

乾燥減量については、以下3点を検討した。

1. 乾燥時間の設定: 処理時間 5 時間→6 時間で乾燥減量値の差が 0.0% となったため、乾燥時間は 6 時間とした。
2. 併行精度 (試料量の確認含む): 試料秤取量を 1.6g, 2.0g, 2.4g とし、各 n=3 で分析し、計 9 検体の乾燥減量値の相対標準偏差を確認した。最終的に、試験条件: 試料秤取量 2g, 温度 105°C, 6 時間と設定した。
3. 複数ロットデータ: <乾燥減量> 平均=2.94% (n=5), 平均+3SD=6.33%。

以上の結果から、乾燥減量の規格案は以下の通りである。

<乾燥減量 (案)>

乾燥減量 (5.01) (6.0~)8.0%以下(1 g, 105°C, 6 時間)。

【灰分】

灰分については、以下2点を検討した。

種目 (特定研究)

1. 併行精度 (試料量の確認含む) : 試料秤取量を 1.6g, 2.0g, 2.4g とし, 各 n=3 で分析し, 計 9 検体の灰分値の相対標準偏差を確認した. 最終的に, 試験条件: 試料秤取量 2g と設定した.
2. 複数ロットデータ : <灰分> 平均=8.96% (n=5), 平均+3SD=14.8%.

以上の結果から, 灰分の規格案は以下の通りである.

<灰分 (案) >

灰分 (5.01) 15.0%以下 (2 g).

■結論

本研究では, 基礎研究でエビデンスが得られ, また特定臨床研究が進行中のニクジュヨウエキスに関して, その開発研究が将来的に, 治験, 承認申請へとプロセスを進めようとした時に対応できるよう, ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの品質評価法の検討を行った.

検討の結果から, 品質評価法として, 確認試験, 定量法, 乾燥減量, 灰分の規格案を作成した. 確認試験: 確認指標成分はベルバスコシドを選択し, TLC を用いた. 定量法: 定量指標成分は, ベルバスコシド及びエキナコシドを選択し, HPLC を用いて 2 成分を同時定量する方法 (案) を確立した. 定量法及び含量規格値の設定については, 今後も検討が必要である.

[参考文献]

- [1] Kodani A, Kikuchi T, Tohda C. *J Neurotrauma*. 2019;36(12):1935-1948.
- [2] Kimbara Y, Shimada Y, Kuboyama T, Tohda C. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:9283171.
- [3] Inada Y, Tohda C, Yang X.. *Nutrients*. 2021;13(1):E264.

研究協力機関: アルプス薬品工業株式会社

de novo 発がんマウスモデルを用いたがん臨界点の同定と予防先制医療への応用

申請代表者	昆 俊亮	東京理科大学・生命医科学研究所	講師
所外共同研究者	今野 雅充	東京理科大学・生命医科学研究所	助教
研究統括者	早川 芳弘	研究開発部門病態制御分野生体防御学領域	教授

■背景・目的

がんの80%以上は上皮細胞を起源とする固形癌であり、近年の診断技術や治療法の著しい進歩にも関わらず、本邦におけるがん死亡者数は年々増加している。腫瘍組織は特殊な微小環境が整備されており、がん細胞によって教育された線維芽細胞、脈管系内皮細胞、免疫細胞等の間質細胞が腫瘍進展に有利に作用することが分かっている。これまでのがん研究は、腫瘍化した組織の悪性化がん細胞自身または周辺に存在する腫瘍関連間質細胞の生物学的特性やこれらの細胞間における相互作用機構の解明に重点的に取り組まれてきた。その成果として、分子標的薬の開発や第4の治療法と称される免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん治療法に新たな選択肢が近年加えられてきた。しかしながら、がん種によっては高い奏効率が得られないことや治療抵抗性を獲得するがん細胞の出現など、万能ながん治療法とは言い難いのが現状である。このような背景より、がん治療戦略の抜本的な見直し、さらには既存のアプローチとは異なるがんの基礎研究が求められている。これまでのがん研究の大半は、最終的に悪性化した腫瘍組織もしくはがん細胞を対象として、これらと正常組織もしくは正常細胞との性状の違いを調べることにより、「がん」という疾病を理解しようと試みられてきた。しかしながら、がん細胞が誕生した瞬間、すなわち平和的な多細胞細胞社会に突如としてがん細胞が出現した際にどのような生体内反応が生じるかはよく分かっていない。がん細胞に従順し、がん細胞の生存・増殖を支持するような環境を整備するのか、もしくはがん細胞に抗い、がん細胞を駆逐しようと作用するのか、その実態は不明である。また、がん細胞が産生されて腫瘍が形成する過程において、どの段階より正確に「がん」と科学的解釈をもって判断できるのかを具体的に定義されたことはこれまでになく、何をもち「がん」とするのか曖昧のままである。このような腫瘍細胞社会の形成プロセスを理解するためには、がん細胞が出現した特異点における間質内での事象を多角的に解析し理解する必要があるが、これまでに適切なマウスモデルが存在しなかったことなどから、がん細胞誕生の瞬間にどのような生体内反応が生じているかはがん研究のブラックボックスである。

申請代表者はこれまでに、正常細胞とがん変異細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」研究に従事してきた。細胞競合とは、性質の異なる上皮細胞が共存したとき、一方が生存し他方が排除されることと定義されている。最近の研究より、ショウジョウバエもしくはマウス生体において、代謝不全、極性異常、酸化ストレスが増加した変異細胞などが細胞競合によって排除されることが明らかとなってきた。申請代表者は、マウス腸管の最終分化した吸収上皮細胞にて、少量のタモキシフェン依存的に活性化 Ras 変異をモザイクに誘導することが可能な細胞競合マウスモデルを作出し(Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)、ほとんどの Ras 変異細胞が管腔へと排除されることを明らかにし、哺乳類生体内においても細胞競合によってがん変異細胞が排除されることを世界に先駆けて報告した(Kon et al., Nat. Cell Biol., 2017)。さらに、この細胞競合マウスモデルの解析を深化させ、がん関連遺伝子の変異蓄積の負荷

種目 (特定研究)

による変異細胞の排除効率の変化を検討した結果、APC 遺伝子の変異による Wnt シグナルが活性化した上皮層に少数 Ras 変異を誘導すると、変異細胞の一部は基底膜を分解し、絨毛内間質へと浸潤することを見出した(図1)。このことから、APC 遺伝子の変異によって細胞競合の機能が変容し、変異細胞が上皮層より逸脱する方向性が転換することによって、浸潤性のがん細胞が産生されることが分かった。また、Ras 変異誘導 30 日後には、間質内へと浸潤したがん変異細胞は包巣を形成し、またこの腫瘍形成部位周辺には腺腫の成分が全く認められなかったことから(図2)、正常腸粘膜より直接的に発がんする(*de novo* 型発がん)と結論づけた。従って、本マウス(APCmin/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウス)は、これまで確立されていなかった *de novo* 発がんマウスモデルになり得ること、また「がん細胞が誕生した瞬間」を可視化することが出来るため、正常間質からがん間質への遷移を解析するための生体モデルとして非常に有用であることが考えられた。

研究代表者と所内共同研究者らは、がん成立という特異的臨界点の直前では組織を正常化する機能が弱まり、がん化と正常化のプロセスの拮抗作用により大きな揺らぎが生じるという仮説を立て、何らかの細胞の遺伝子発現量の少なくとも一部が強い同期性揺らぎを示すだろうとの着想に至った。そこで本研究では、研究代表者らが作出した単一細胞レベルでがん細胞が基底膜を超えて間質組織内へと浸潤し発がんする *de novo* 発がんマウスモデルを用いて、がん細胞が正常間質をがん間質へと遷移させる「がん臨界」の本態を解明することを目的とした。そのために、がん細胞誕生から腫瘍が形成されるまでの複数のタイムポイントにおいて、時系列的に時空間細胞アトラス情報と包括的な 1 細胞トランスクリプトーム情報を取得、統合的に解析することによってがん細胞と周辺間質細胞の遺伝子発現様式の変化を網羅的に俯瞰する。さらに、がん細胞の出現により間質細胞ネットワークに生じる攪乱度の指標として「揺らぎ」を同期性揺らぎ遺伝子理論に基づく数理解析により定量化し、正常組織で保たれていた複雑系としての上皮-間質細胞間ネットワークの均衡が破綻する変曲点となる臨界点を同定することを目指した。

■結果・考察

がん細胞が誕生した時より、がん細胞が拡張し腫瘍を形成するまでの周辺正常細胞の遺伝子発現の変化を解析することにより、がん臨界付近で発現レベルに揺らぎが生じる遺伝子群を同定し、がんの臨界点の分子実体を同定することが本研究の目的である。そこで、*de novo* 発がんマウスを用いて、がん細胞誕生からがん形成までの時空間的遺伝子発現アトラス情報の取得に注力した。具体的には、APCmin/Villin-

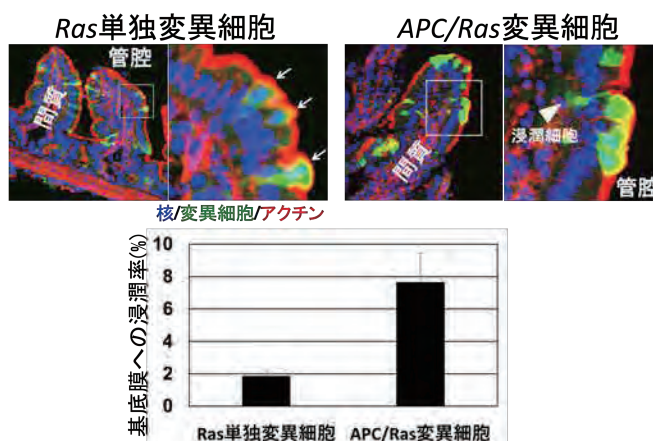


図1. 小腸絨毛でのがん変異細胞の挙動

Ras 誘導 3 日後の小腸絨毛の様子を示す。Ras 変異細胞のほとんどは管腔へ排除されるのに対し(上左図、矢印)、APC/Ras 変異細胞では基底膜に浸潤する細胞数が増加する(上右図、矢頭; 下図)

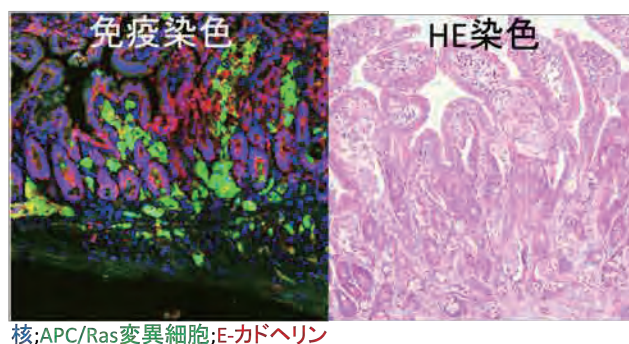


図2. APC/Ras 変異マウスで観察される *de novo* 型発がん
Ras 変異誘導 30 日後の腸管の様子免疫染色像(左図)と HE 染色像(右図)を示す。

種目 (特定研究)

CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスにタモキシフェンを投与し、APC/RasV12 の二重変異がん細胞を産生させた後、14日後のがん初期、28日後のがん形成期のマウス腸管を回収、スライス法にて凍結サンプルを作成し、腸管全領域をモニタリングしながら、GFP 蛍光の指標より腫瘍形成部位を同定した。そして、その周辺領域をクライオスタットにより薄切、スライドガラスに貼付し、組織切片の全細胞の遺伝子発現を空間情報を維持したまま解析することが可能な Visium 解析を行な

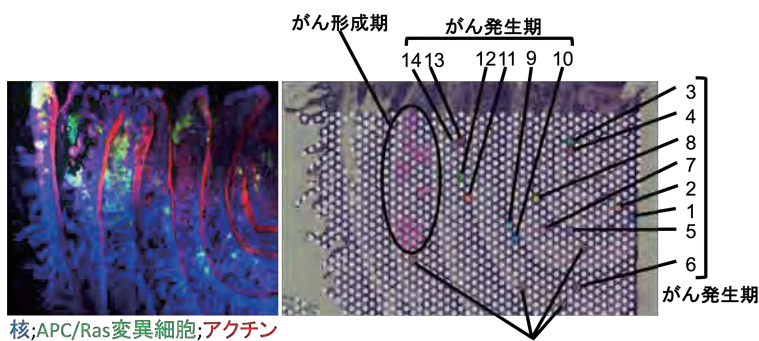


図3. Visium 解析の実際

de novo 発がんマウスに Ras 変異誘導 28 日後の腸管の様子の免疫染色像(左図)と Visium での解析部位(右図)を示す。腫瘍の大きさによりがん発生期とがん形成期とを区別した。

った。Visium 解析では、直径 55 μm のスポットを 5000 箇所等間隔に設定し、各部位に関して RNAseq を実施する。各スポットと免疫染色画像とを照らし合わせ、腫瘍が小さい領域を「がん発生期」、腫瘍が大きい領域を「がん形成期」と定義し、これらと正常組織でのデータを統合して、各がん形成段階における遺伝子発現情報を取得した(図3)。その結果、がん発生期とがん形成期の各フェーズにおいて、特異的に発現低下もしくは発現増加する遺伝子群を複数同定した。さらに、がん発生期の細胞集団のうち、少なくとも1つの細胞集団で遺伝子発現が増加、もしくは低下している Gene Ontology (GO) セットを抽出し、この中からがん形成期の細胞集団にて共通して発現増加する GO セットを探索した。その結果、RNA スプライシング制御、ROBO 受容体シグナルなど複数の GO セットを同定した。これらの GO 群はがん発生期にはその発現に「揺らぎ」が生じるが、がん形成期には安定して発現増加すると解釈される。同様の手法にて、がん発生期の「揺らぎ」を経て、がん形成期に安定して発現低下する GO セットを調べた結果、ER ストレス応答の GO セットを同定した。

研究代表者のこれまでの研究成果より、*de novo* 発がんする APC^{min}/Villin-CreERT2/LSL-RasV12-ires-eGFP マウスはリンパ行性特異的ながん細胞が転移することが分かっていた。そこで、腸管の whole mount 染色法を立ち上げ、がん細胞がリンパ管に侵襲する様子を詳細に解析した。その結果、腸管間質内に浸潤したがん細胞が組織内を拡充するにつれて、腸管の既存リンパ管構造である乳糜管が退

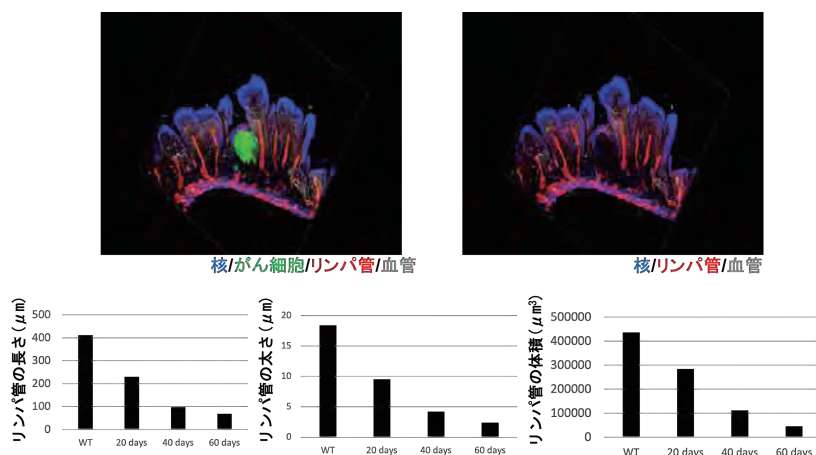


図4. *de novo* 発がんマウスで観察されるリンパ管退行

行する。一般的に、がん細胞は血管新生と同様にリンパ管の新生を促し(腫瘍リンパ管新生)、これががん細胞のリンパ管侵襲を助長するという説がこれまでの趨勢であったが、今回発見した現象はこれとは相反する結果であった。そこで上述の Visium 解析によって得られた情報を活用し、腫瘍部での遺伝子発現変化を詳細に解析した。その結果、内皮-間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal Transition; EndMT) に特徴的なマーカー分子の変化が複数認められた。そこで、代表的な EndMT マーカーである Transgelin の免疫染色を行った結果、腫

種目 (特定研究)

瘍部に存在するリンパ管内皮細胞で Transgelin の発現が著増していることが分かった(図5)。これらの結果より、APC/RasV12 がん細胞はリンパ管内皮細胞の EndMT を誘導することにより、リンパ管構造を脆弱化させ、その結果リンパ管侵襲することが示唆された。

■結論

本研究では、*de novo* 発がんマウスを用いた Visium 解析を行うことによって、がんが進行する過程における遺伝子発現様式の遷移を追跡した。その結果、がん発生期ではその発現シグニチャーが細胞集団によってばらつきの強度が比較的高

いのに対し、がん形成にかけて安定的な遺伝子発現パターンを示すようになることが分かった。また、GO 解析の結果より、がん発生期では RNA スプライシング制御や ROBO 受容体シグナルの発現、活性の強度にばらつきが認められるが、がんが形成されると安定的に増強されることが分かった。他方、ER ストレス応答はがん形成期では安定的に発現低下することを見出した。ER ストレスは一般的にがん細胞の生存・増殖を正に制御することが知られているが、本研究成果で見出した、がん形成後には安定的に発現低下するという結果は大変興味深い。今後は、ER ストレス関連遺伝子群の遺伝子変容を詳細に解析することを含め、より細かな時間軸を設定し(タモキシフェン投与後、7日、14日、21日、28日)、がん細胞誕生の瞬間からがんの臨界転移を経て、がん形成まで至る過程での空間的遺伝子発現情報を Visium 解析にて引き続き取得する予定である。しかしながら、Visium 解析を行ううえで十分に考慮すべきことは、1つのスポットではおおよそ 10 細胞ほどが含まれているため、これら複数の細胞の遺伝子発現の平均を解析していることである。すなわち、1細胞レベルで発現に「揺らぎ」が生じる分子を同定することは Visium 解析では不可能であるため、真のがん臨界点を同定するためには異なる解析法との併用が肝要である。そのため、がん発生期またはがん形成期の部位を単離し、1細胞 RNAseq 解析を行うことによって、がん臨界点を規定する揺らぎ分子群や、がん臨界点で同期的に揺らぎが生じる間質細胞クラスターとしての揺らぎ細胞群を今後同定する予定である。また、本研究成果より、*de novo* 発がん部ではリンパ管内皮細胞が EndMT を引き起こしていることを明らかとした。一般的に、個体の老化や慢性炎症などの病変では EndMT が誘導され、リンパ管の構造が脆弱化することが知られているが、がんと EndMT の関連についてはよく分かっていない。また、がん細胞がどのようにしてリンパ管内へと侵襲するかについても不明な点が多い。従って、本成果はがん細胞のリンパ転移機構の理解に資することが今後期待でき、将来的にはこの過程を制御する分子群を同定し、新規のリンパ行性転移の治療法確立へと昇華していきたい。

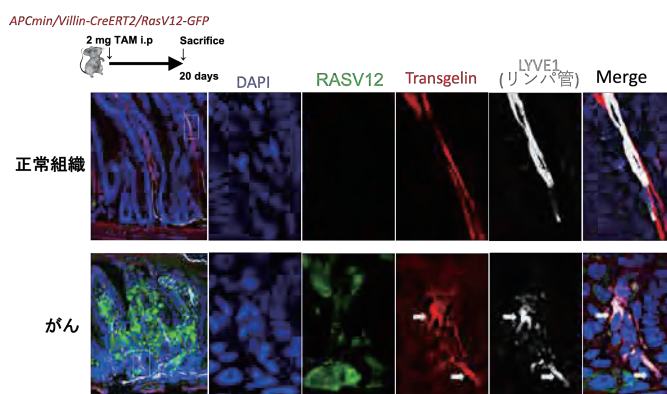


図5. *de novo* 発がんマウスで観察される EndMT

de novo 発がんマウスに Ras 変異誘導 20 日後の腸管での Transgelin、もしくはリンパ管の免疫染色像を示す。また、リンパ管内皮細胞で Transgelin の発現が認められる(矢印)。

タンパク質メチル化に対する和漢薬作用の生化学的効果の検証と代謝疾患への応用

申請代表者	深水 昭吉	筑波大学 生存ダイナミクス研究センター	教授
所外共同研究者	加香 孝一郎	筑波大学 生命環境系	講師
所外共同研究者	大徳 浩照	筑波大学 生存ダイナミクス研究センター	講師
研究統括者	中川 嘉	研究開発部門複雑系解析分野	教授

■背景・目的

ゲノム DNA の塩基配列自体は静的な記号の羅列に過ぎないが、その中にはタンパク質合成に関わる mRNA、tRNA、rRNA、small RNA からなる幾層もの情報がコードされており、これらは記憶媒体であるゲノム DNA を介して、親から子へと受け継がれていく。核酸やタンパク質といった生体高分子は、様々な化学修飾を受けることで、それら自体の安定性や局在、ひいては構造と機能に多様性が付与されるが、中でもメチル化は、セントラルドグマの構成要素である DNA、RNA、タンパク質の全てに共通する生物学的に重要な修飾である。

タンパク質の化学修飾（翻訳後修飾）の中、リン酸化やアシル化、ユビキチン化、糖鎖付加などは、いずれもタンパク質アミノ酸残基の官能基（多くの場合側鎖）とリン酸や有機酸、複合糖質、ユビキチンペプチドとの脱水縮合（または類似の）反応であるのに対し、メチル化はリジンやアルギニン、ヒスチジン残基の側鎖アミノ基（またはイミノ基）上の窒素原子による、メチル基供与体 S-アデノシルメチオニン（SAM）のメチルスルホニウムカチオンへの求核置換反応（S_N2 反応）であるため、メチル基の結合は化学的に不活性である。このことは、酸などによる加水分解反応において、リン酸基やアセチル基のような他の共有結合性修飾基が容易に脱離してしまうために修飾の有無が判別できないのに対し、メチル基は酸加水分解にも安定であることを意味する。すなわち、タンパク質メチル化の化学的特徴として、ペプチド結合の酸加水分解とそれに続くメチル化アミノ酸分析を行う際に、メチル基が脱離しないというアドバンテージがある（図1）。これまでに我々の研究グループは、この酸加水分解によって定量的に回収されるメチルアミノ酸を LC-MS/MS 分析により定量し、メチルアミノ酸の分析結果を基に MALDI-TOF/MS を用いてメチル化タンパク質の同定と共にメチル化部位を特定する手法を確立している。

生体内でのタンパク質のメチル化反応は、上記 SAM を供与体としてメチル基転移酵素により触媒される。また、一旦メチル化されたタンパク質中のメチルリジン残基は、脱メチル化酵素により酸化的に脱メチル化されることがわかっている。このメチル化・脱メチル化のメカニズムは、特にヒストンタンパク質

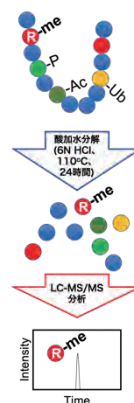


図1 酸加水分解に対するメチルアミノ酸の安定性

種目 (特定研究)

のメチル化状態が、真核生物の転写やクロマチンのエピジェネティックな制御に不可欠であるため、その生物学的意義が広く研究されてきた。一方で、近年ヒストンを含む多くのタンパク質におけるメチル化修飾が、ガンをはじめとするヒトの様々な疾患と密接に関連していることが報告され、メチル化・脱メチル化の阻害剤の開発が新たな治療戦略となりつつある。そこで本研究では、申請者らが確立した上記の方法を用いて、天然に存在する様々な化合物のうち、タンパク質のメチル化・脱メチル化を制御する治療薬候補物質の作用機序を明らかにすることを目的とする。今年度は、抗アレルギーや胆汁酸分泌促進の作用で知られる黄芩 (コガネバナ) の成分について、培養細胞のタンパク質メチル化に対する作用を検討した。

対象とする化合物は、コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) 抽出物および主成分であるオウゴン、バイカレイン、バイカリンの4種 (図2) である。またアッセイには、マウス肝臓由来の AML12 細胞を用いた。φ 10cm シャーレに播種した細胞を PBS (-) で洗浄回収後に遠心で細胞を集め、得られた細胞ペレットに対して氷冷質量分析用精製水を用いて懸濁後、0°Cで超音波破碎し、細胞抽出液 (タンパク質粗抽出物) を得た。タンパク質 150 μg に内部標準物質である *N*-プロピル-L-アルギニン (*N*-PLA) をスパイク後、酸加水分解 (6*N* 塩酸, 110°C, 24 時間) を行い、塩酸留去後の酸加水分解物について、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS、島津製作所) にて分析を行なった。

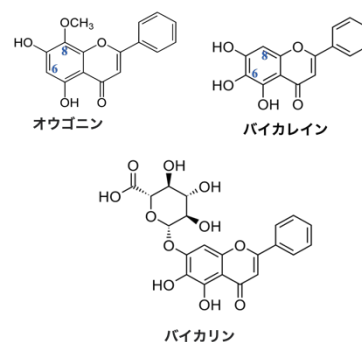


図2 コガネバナ抽出物 (黄芩) 中のフラボン誘導体

メチルアミノ酸の分離には SeQuant ZIC-HILIC Guard Fitting (φ 1.0 x 14 mm)(Merck KGaA)を装着した SeQuant ZIC-HILIC (φ 2.1 x 150 mm) (Merck KGaA)を固定相としてそれぞれ用いた。カラムからの溶出の条件は、40°Cでアセトニトリル/水/ギ酸 = 1 : 98 : 1 (A)とアセトニトリル/水/ギ酸 = 98 : 1 : 1 (B) を移動相として用い、サンプル注入から 1 分間 B 95%で維持し、9 分間かけて B 5%にした。4 分間 B 5%を維持した後に、B 95%で 7 分間カラムを置換した。各化合物の検出は、脱溶媒後にイオン化したそれぞれのプリカーサーイオンに対して、アルゴンガスによる衝突誘起解離 (CID) を行って生成したプロダクトイオンを検出する、多重反応モニタリング (MRM) により行った。質量分析の条件は、ヒーティングブロック温度 : 400°C、脱溶媒管温度 : 250°C、イオン化部温度 : 300°C、イオン化電圧 : 4.0 kV、イオン化電流 : 0.1 μA、ヒーティングガス (空気) 流量 : 10 L/min、ネブライザーガス (窒素) 流量 : 3 L/min、ドラインガス (窒素) 流量 : 10 L/min、CID アルゴンガス圧力 : 270 kPa で行った。上記の条件で、プロダクトイオンの検出強度を経時的に描画することでマスキロマトグラムを得、それぞれ標準品の混合溶液を用いて検量線を作成した。各メチルアミノ酸の MRM 遷移 (*m/z*) は、*N*^ε-モノメチルリジン (MML) : 161.10 > 84.15、*N*^ε,*N*^ε-ジメチルリジン (DML) : 175.15 > 84.15、*N*^ε,*N*^ε,*N*^ε-トリメチルリジン (TML) : 190.05 > 85.15、*N*⁰-モノメチルアルギニン (MMA) : 189.15 > 70.15、*N*⁰,*N*⁰-ジメチルアルギニン (ADMA) : 203.15 > 158.05、*N*⁰,*N*^ω-ジメチルアルギニン (SDMA) : 203.25 > 171.95、*N*^π-メチルヒスチジン (*N*^π-meHis) : 170 > 96.1、*N*^π-メチルヒスチジン (*N*^π-meHis) : 170 > 124.1、*N*-PLA : 9.216.60 > 70.15 であった。

■結果・考察

各標準メチルアミノ酸のクロマトグラムを図3に示す。LC-MS/MS では、それぞれの分析対象物が MS 室に導入される際にイオン化され、前駆体イオンとなる。続いて指定された分子量の

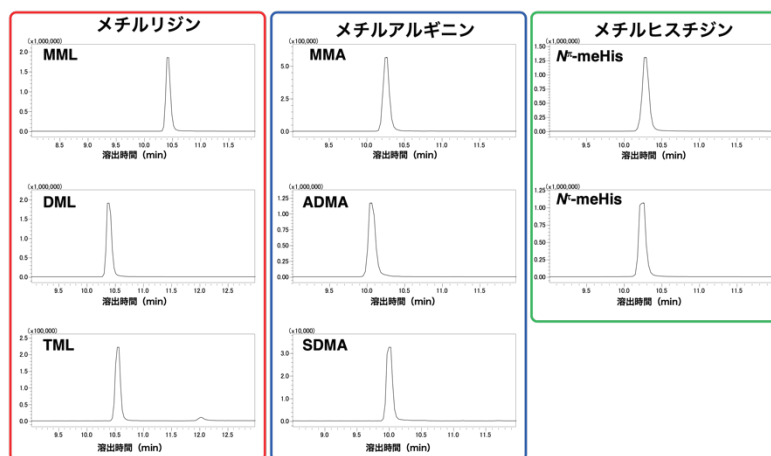


図3 メチルアミノ酸の代表的クロマトグラム

種目 (特定研究)

前駆体イオンのみが選別され、不活性ガスのアルゴンと衝突することにより、エネルギーの比較的低い共有結合 (C-N 間や C-O 間) で解裂が起こり (CID)、化合物の構造に由来したフラグメントイオンが生成する。従って、相互に分子量や化学的性質が酷似した構造異性体同士 (この場合では、ADMA と SDMA、或いはと *N*^m-meHis と *N*^r-meHis) において LC の溶出時間が近接している場合でも、解裂のパターンによりそれぞれを識別しながら定量分析することが可能である。

この原理に基づき、コガネバナ抽出物、オウゴン、バイカレイン、バイカリンの4種それぞれを添加した AML12 細胞の酸加水分解物を分析した結果 (2回の実験の平均) を図4に示す。アルギニン及びヒスチジンのメチルアミノ酸では、いずれの化合物を添加した場合も顕著な変化が認められなかったのに対し、メチルリジン、特に MML 及び DML のみ、バイカリン添加で顕著に減少していることが明らかとなった。

オウゴンとバイカレインは、互いに6位 (水酸基) と8位 (メトキシ基) の官能基が異なるだけのフラボノ類縁体であり、またバイカリンはバイカレインのグルクロニド (グルクロン酸抱合体) である (図2)。当初、バイカリンによる MML と DML の減少はフラボノイドの性質に由来するのではないかと推察された。しかし、フラボノイド骨格が原因であれば、バイカレインやオウゴンにも同様な効果が見られるはずであるが、メチルリジンの顕著な減少はバイカリンのみで観測されている。

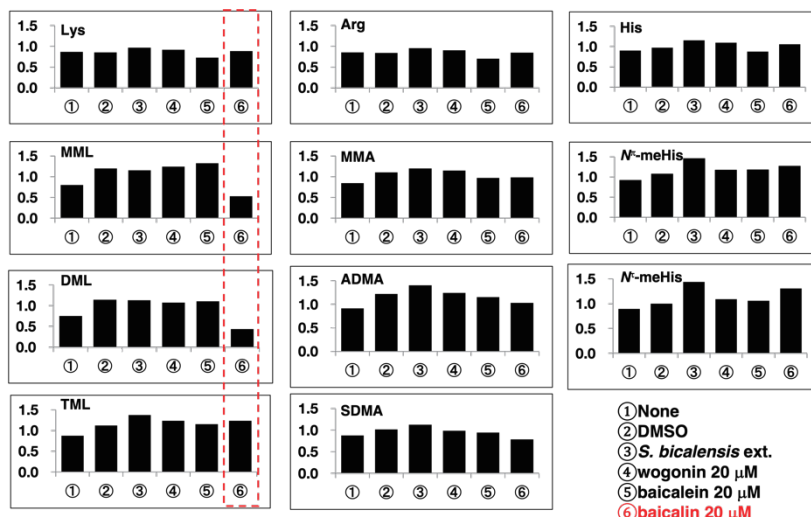


図4 化合物投与とAML12細胞のメチルアミノ酸分析 (2回の平均)

またこの作用は、リジンのメチル化が亢進し過ぎたために、トリメチル化の中間段階である MML や DML が減少している可能性も考えられたが、TML のレベルはコントロールとほぼ同レベルであり、トリメチル化されたタンパク質が細胞内に蓄積している可能性は低いと考えられる。従って、バイカリンによるモノメチルリジンとジメチルリジンの減少は、脱メチル化が亢進した結果であることが推察された。

これまでにメチル化されたタンパク質の脱メチル化は、メチルリジンにおいて生じることが多くの研究で確かめられている。この反応を触媒する酵素として、LSD1 (lysine-specific demethylase 1) ファミリーと JMJD (Jumonji domain containing) ファミリーに属するタンパク質脱メチル化酵素が知られている。これらはいずれも分子状酸素の存在下メチル基を酸化後、リジン側鎖 ε-アミノ基とメチル基間の N-C 結合を加水分解し、メチル炭素をホルムアルデヒドの形で脱離するが、補酵素として鉄イオンと α-ケトグルタル酸を要求する JMJD ファミリーの酵素群では、α-ケトグルタル酸の脱炭酸と共役した鉄錯体とのラジカル反応が律速段階となり、TML、DML、MML 全てのメチルリジンからメチル基を脱離するのに対し、FAD⁺を補酵素とする LSD1 ファミリーの酵素は、律速となる最初の酸化反応で、ε-アミノ基窒素原子の非共有電子対に水溶液中のプロトンが配位していることが必須であることから、DML、MML のみを基質とする。従って、今回のバイカリンによる MML や DML の減少は、LSD1 ファミリー酵素を何らかのプロセスを経て活性化していることが推測された。

そこで現在、申請者らはバイカリンの代謝を介した LSD1 ファミリー酵素の活性化機構について、図5のような仮説を立てている。

バイカリンは、肝細胞内に存在するβ-グルクロニダーゼによって、バイカレインとグルクロン酸に加水分解される。ここで生じたグルクロン酸は、NADPH⁺+H⁺を補酵素とする細胞内のグルクロン酸レダクターゼによりグルクロン酸に酸化されるが、これと同時に NADP⁺が細胞内に蓄積する。細胞内で増加した NADP⁺は、細胞膜他に局在する NADPH オキシダーゼにより、水と酸素ラジカル(または過酸化水素)から NADPH⁺+H⁺

種目（特定研究）

と分子状酸素を発生する。この分子状酸素が、LSD1 ファミリー酵素に共有結合している FADH₂ を酸化することにより、酵素は FAD⁺ 型（活性化型）に変換される。活性化した LSD1 ファミリー酵素は、メチルリジンから水素原子を引き抜き、それ以降の脱メチル化反応が進行する。

上記の推定代謝経路はあくまで仮説に過ぎないが、今回用いた AML12 細胞が肝臓由来の細胞であることや、バイカリンがバイカレインの、あるいはグルクロン酸の天然のプロドラッグであると見なすこともできることから、肝臓におけるバイカリンの生理作用発現の一端を示している可能性が考えられる。

一方 LSD1 自体は、ヒストンリジンメチル化の制御を介して遺伝子発現を制御し、幹細胞の維持や細胞分化、がん化など幅広い生命現象に寄与していることが報告されている。特に臨床的には、がん細胞にこの酵素が高発現していることから、トランシルプロミンをはじめとする様々な阻害剤が開発されてきた一方で、活性化剤についてはほとんど研究されていない。今後、結果の再現性を含め、メタボロームやトランスクリプトーム解析と共に、仮説の検証を進めていく予定である。

■結論

抗アレルギーや胆汁酸分泌促進の作用で知られる黄芩（コガネバナ）の成分について、マウス肝臓由来の AML12 細胞を用いてタンパク質メチル化に対する影響を調べたところ、アルギニン及びヒスチジンのメチルアミノ酸では、いずれの化合物を添加した場合も顕著な変化が認められなかったのに対し、メチルリジン、特に MML 及び DML のみ、バイカリン添加で顕著に減少していることが明らかとなった。バイカリンによるこの作用は、アグリコンであるバイカレイン部分の作用に加え、グルクロン酸部分の代謝を介してリジンメチル化タンパク質の脱メチル化酵素 LSD1 を活性化しているという新しい可能性も示唆された。

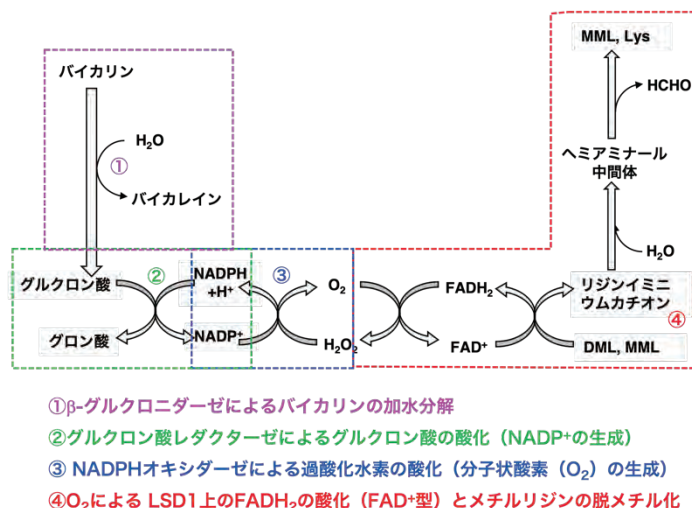


図5 推定されるバイカリンによるLSD1の活性化機構（酸化還元反応）

- ①β-グルクロニダーゼによるバイカリンの加水分解
- ②グルクロン酸レダクターゼによるグルクロン酸の酸化（NADPHの生成）
- ③ NADPHオキシダーゼによる過酸化水素の酸化（分子状酸素（O₂）の生成）
- ④O₂による LSD1上のFADH₂の酸化（FAD⁺型）とメチルリジンの脱メチル化

ラマン分光・イメージング技術を駆使した未病状態の検出と疾患予測システムへの応用

申請代表者	大嶋 佑介	富山大学学術研究部 工学系	准教授
所外共同研究者	朝岡 竜士	富山大学大学院 理工学教育部	大学院生
所外共同研究者	松本 悠希	富山大学大学院 理工学教育部	大学院生
研究統括者	小泉 桂一	研究開発部門未病分野	教授

■背景・目的

我が国において、リウマチや変形性関節症に代表される軟骨変性疾患、加齢や生活習慣と関連が深い骨粗鬆症、サルコペニア、脊柱管狭窄症、腰痛などの運動器慢性疼痛といった、日常生活に支障をきたすロコモティブシンドロームは現在その予備軍も含め 4,700 万人が相当すると推定されている。また、日本人の死因の第一位である「悪性新生物」、いわゆる大腸がんや白血病などがその代表であり、死因のおよそ3割を占めている。このような社会的背景を踏まえ、研究代表者らは、これまでにラマン分光・非線形光学イメージング技術を駆使して、がん、脊髄損傷、変形性関節症、神経障害性疼痛、骨粗鬆症などの疾患モデル動物を利用した超早期診断法の研究開発を展開してきた。しかしながら、これまでに疾患超早期すなわち未病における疾患マーカーの同定には至っておらず、ラマンスペクトルから得られる生体情報には多くのノイズが含まれるため、従来の解析アプローチでは抽出できる情報に限界があった。本共同研究では、軟骨変性や骨粗鬆症、がん、白血病や炎症状態に伴う細胞変化などに関して、ラマン分光・イメージングにより、生体情報の「ゆらぎ」を「時間軸」の視点から理解することで各種疾病の未病状態や遷移状態を検出し、これらの状態の生物学的な意義を解明すること、および、未病を改善・治癒することが可能な健康・医療戦略を構築することを目的とする（図1）。

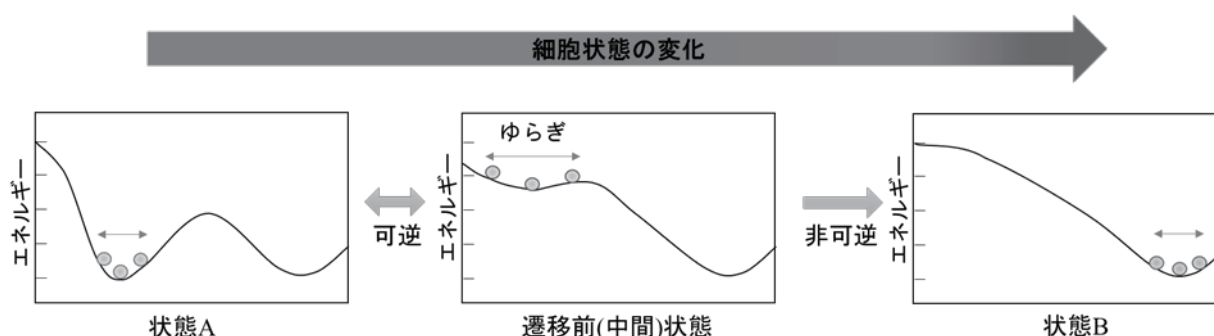


図1 細胞の状態遷移における中間状態と生体情報のゆらぎの関係

種目 (特定研究)

1. 動的ネットワークバイオマーカー (DNB) 理論は、数学の一領域である力学系理論をもとに、動的なバイオマーカーを観測することで、状態の「ゆらぎ」を数値的に解析することができる。研究総括者の小泉らは、DNB 理論を導入し、メタボリックシンドローム自然発症マウスの遺伝子発現量を解析することで、疾患が生じる前のゆらぎが発生する未病状態を数理的に証明することに成功した (K. Koizumi, M. Oku, S. Hayashi, A. Inujima, N. Shibahara, L. Chen, Y. Igarashi, K. Tobe, S. Saito, M. Kadowaki, K. Aihara, Sci. Rep. 9, 8767 2019)。以上の背景を踏まえ、DNB 理論を細胞の早期変化検出に適応できると考え、小泉らは、細胞を炎症誘導した時点から連続的に観察し、ゆらぎの検出から状態遷移点を特定することを考案した。遷移点観察には非破壊かつ連続的に状態変化を測定できる方法が必要であり、固定や染色なく低侵襲的に物質の評価が可能なラマン分光法に着目した。本研究では、ラマン分光法と DNB 理論の組み合わせにより、細胞の炎症誘導過程におけるゆらぎの検出を行った (図2)。

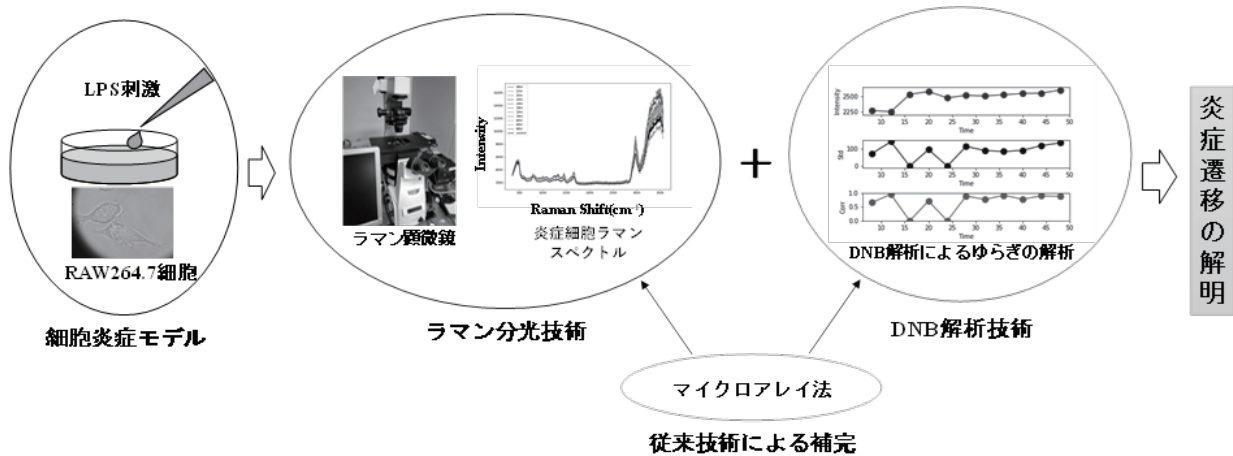


図2 炎症誘導した細胞の連続観察およびDNB解析によるゆらぎの検出

2. 疾患予測システムの実用化による未病状態の検出に先立ち、生体組織のラマン分光計測において疾患状態を的確に把握するため、変形性関節症例の手術検体のラマン分光法による解析を行った。試料調製およびラマンスペクトル測定は、朝岡竜士が担当した。ラマンスペクトル解析によって、変性軟骨の分子組成を明らかにし、正常な状態と疾患の状態を明確に区別することを目的とした。共焦点ラマン顕微鏡 (励起波長 532nm) を用いて、腱板断裂性変形性肩関節症の患者から摘出された手術標本の上腕骨頭部のラマンスペクトル解析を行った。クライオスタットを用いて、上腕骨頭の軟骨部分を厚さ 25 μm 程度に薄切し、ラマンスペクトルを取得した (図3)。各検体から得られたスペクトルデータに対して、ベースライン補正等のスペクトル前処理を行ったのち、主成分分析 (PCA) によるラマンスペクトルの特徴抽出を行った。

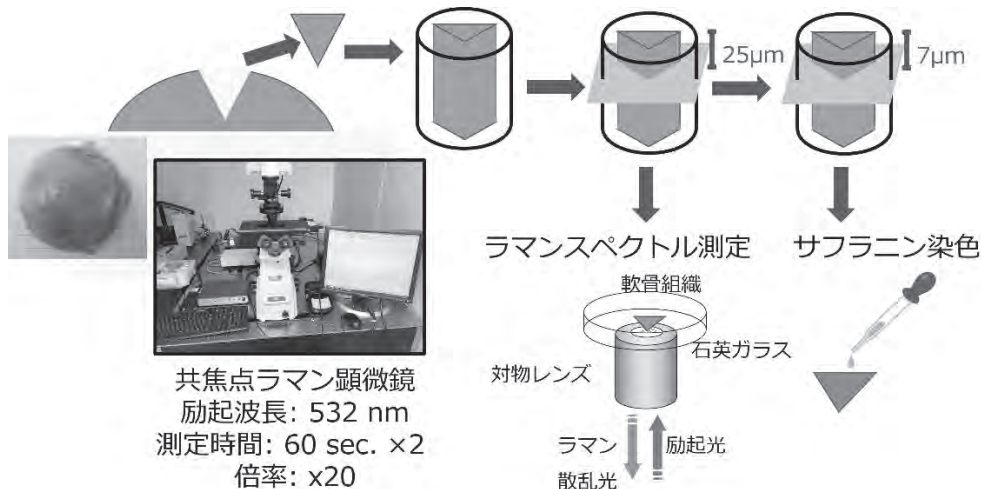


図3 軟骨変性疾患の病態予測のためのラマンスペクトル解析

■結果・考察

培養細胞の経時的・網羅的なラマン分光分析を可能にする顕微ラマンシステムを和漢研未病分野未病創薬ユニット実験室に設置した。顕微鏡 (ECLIPSE Ti : Nikon) は電動ステージを搭載しており、60 倍油浸対物レンズ (Apo TIRF : Nikon) で細胞を観察した。励起光源としてダイオードレーザー (Cobolt Samba 150 532nm) を使用し、サンプルポイントにおいてレーザー強度を 0.2~20mW で調整可能である。分光検出器は冷却 CCD カメラ (BI-DD Cooled CCD, Andor) を用いており、高感度なラマンシグナル検出が可能になっている。本システムは底面が石英の細胞培養ディッシュを置くことで接着細胞を生きたまま計測が可能となっている。細胞の炎症状態を想定し、RAW264.7 (Mouse macrophage cells) を用いて、リポポリサッカライド (LPS) を作用後に経時的に培養細胞のラマンスペクトル測定を行い、細胞の状態遷移とラマンスペクトル変化の相関解析を行った。マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) に LPS 添加で炎症を誘導し、4 時間ごとに 48 時間まで細胞からラマンスペクトルを取得した。LPS 添加前 1 時間にラマンスペクトルを測定し、これをコントロール群として実験群と比較した。細胞ラマンスペクトルの測定データに対して DNB 理論を基に、「標準偏差および相関強度が急激に上昇する」グループを抽出したものを「DNB」として定義し解析を行い、DNB が大きく変化した時間を追跡した。比較として未添加群を用意し計測と解析を行った。その結果、LPS 投与群において、LPS 添加後 12 時間時点でゆらぎとみなせる DNB の急激な上昇がみられ、LPS 刺激による細胞内変化を本技術で観測できたことが示唆された。DNB 理論を用いて検出されたゆらぎはラマンスペクトルの強度変化のみで捉えることは困難であり、細胞早期変化を捉える新たな指標としてラマン分光法と DNB 理論の組み合わせが有効であると考えられる。

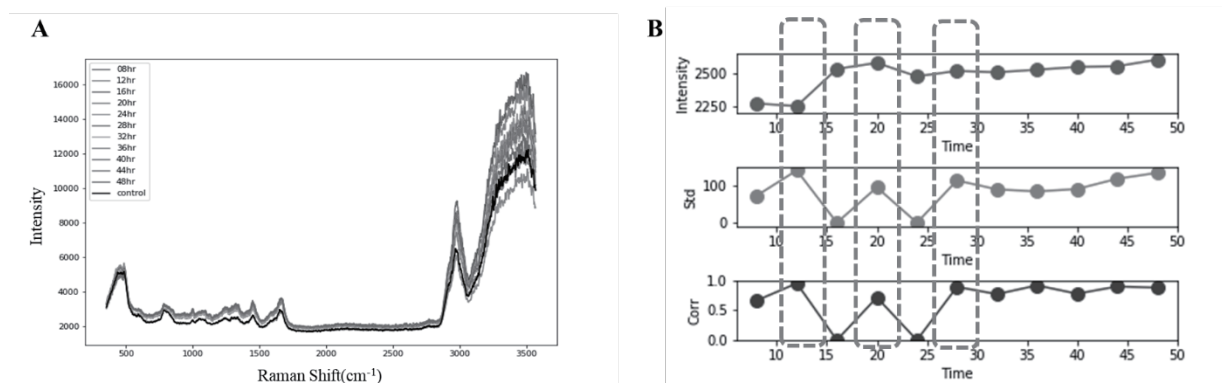


図4 細胞の48時間計測ラマンパクトル(A)とDNB解析結果(B)

ラマン分光法と DNB 解析を組み合わせた技術によって細胞の炎症状態が周期的に変化を生じていることが確認された。本実験中、添加した LPS は除去していないため細胞は継続的に LPS 刺激を受けており、細胞は LPS 刺激を受けて炎症を起こす反応と細胞に生じた炎症を治癒しようとする反応が同時に生じている中間遷移状態を介し、最終的に炎症を起こした安定状態に遷移していくことが推測される。図 4B の DNB 解析の結果は、炎症反応と治癒反応によって細胞が正常状態と中間遷移状態に前後している状態を DNB として検出されている可能性がある。30 時間以降は標準偏差と相関強度が高い状態で安定していることから、細胞の炎症反応と炎症を回避する反応が拮抗し、多くの細胞が中間遷移状態に移行したのではないかと推測される。DNB 解析によって炎症状態に遷移する中間状態の分岐点を探索できる可能性が示唆された。一方で、課題も残されている。今回 DNB 解析に使用したラマンスペクトルは解析への影響を懸念してバックグラウンドノイズの除去を行っていない。現在必要な情報を残したまま DNB 解析に最適なバックグラウンドノイズ除去手法を検討しており、DNB 解析の精度向上および再現性の検証を行っている。今後は、細胞の炎症状態が生じた時間に対しマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析し、ラマン分光法と DNB 解析で抽出された変化と比較し詳細な解析を行う予定である。

種目（特定研究）

本技術の臨床応用・社会実装に向けた取り組みとして、同じく共焦点ラマン顕微鏡（励起波長 532 nm）を用いて、腱板断裂性変形性肩関節症の患者から摘出された手術標本 10 検体の上腕骨頭のラマンスペクトル解析を行い、病理組織標本との比較を行った。上腕骨頭の軟骨部分を厚さ 25 μm に薄切し、測定条件 60 秒 \times 2 回積算でラマンスペクトル計測した。また、各検体から得られたスペクトルデータに対して、近似曲線でバックグラウンド補正をし、主成分分析（PCA）を行った。続いて、連続切片を厚さ 7 μm で作成し、サフランin 0 染色を行い、病理組織標本を作成した。10 検体のラマンスペクトルで PCA を行った結果、第二主成分、第三主成分において検体間の差が顕著に見いだされた。図 5 に示すように主成分分析によって大きく 2 つのグループに分けて、それぞれの検体の病理組織標本を比較したところ、おもに染色性の低下、軟骨表面部分の粗造化（表面が粗くなっている）、そして軟骨基質部分の空隙の数・大きさなど形態学的な差を認めた。さらに、第二主成分の負荷量グラフから、軟骨基質の分子組成に差があることを見いだした（図 5）。

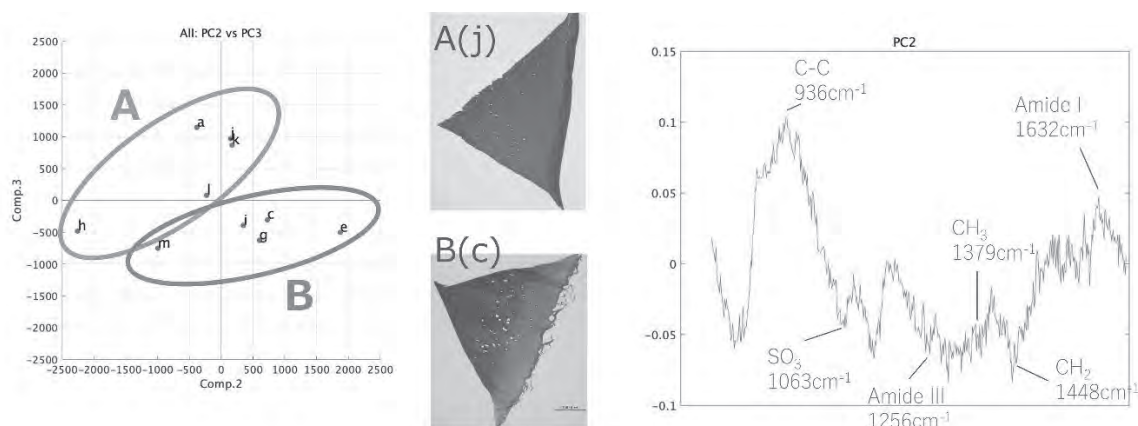


図 5 10 検体のラマンスペクトルデータ主成分分析（PCA）、代表的な病理組織像および主成分負荷量

■結論

ラマン分光・イメージング技術による高い時空間分解能で生細胞の状態遷移を計測する技術と、生体分子の「ゆらぎ」に着目した数学的アプローチを組み合わせることにより、発生ダイナミクス解析や疾患モデルの病態解明を進めることで、未病状態における生物学的ゆらぎの解析、多臓器間ネットワークの解明につながることを期待される。例えば、未病の治療法確立を目指した具体的な展開として、ロコモティブシンドロームのひとつである骨粗鬆症の発症予防、骨折リスク回避への応用が期待される。個体の *in vivo* ラマンスペクトル測定によって、骨質低下やがては骨折リスク増大につながる骨基質の変化を分子レベルで解析することで、ラマンスペクトル上で骨粗鬆症の予後因子をラマンスペクトルの「ゆらぎ」に見出すことができれば、骨基質そのものの異常だけでなく、臓器間ネットワークの異常から発病に至る過程において、未病状態を検出し、いち早く治療を開始することができる。また、再生医療分野への応用も期待される。軟骨の変性・再生の過程におけるラマンスペクトル変化から、リウマチや変形性関節症などの軟骨疾患における、軟骨組織の未病状態を明らかにする。軟骨細胞の分化・未分化状態、軟骨基質の成熟過程をリアルタイムで計測し、ラマンスペクトルの解析を行い、軟骨の再生および変性に関与する未病状態をモニタリングしながら、正常組織へと分化誘導することが可能と考えられる。さらに、がん研究への展開として、ヒト大腸がん組織から樹立したオルガノイドを用いて、ラマン分光・ラマンイメージングのタイムラプス計測を行うことで、状態遷移を鋭敏に捉え、がんの転移・浸潤メカニズムにも迫ることができる。がんの悪性度や浸潤能が異なるがん組織に由来する培養細胞およびオルガノイドを網羅的に解析することで、がん細胞の状態遷移を明らかにすることができれば、がんの超早期診断法への応用が期待できる。

プレニル基転移酵素の機能的リデザインを基軸とする生合成工学

申請代表者	田浦 太志	富山大学学術研究部薬学・和漢系	准教授
所外共同研究者	棚谷 綾介	富山大学大学院医学薬学教育部	博士後期課程 1年
所外共同研究者	西垣 奈緒	富山大学大学院医学薬学教育部	博士前期課程 2年
研究統括者	森田 洋行	研究開発部門資源開発分野天然物創薬学領域	教授

■背景・目的

天然物の生合成において、芳香族化合物のプレニル化反応は疎水性や膜透過性とともにより生物活性を劇的に変化させるステップであり、プレニル化ポリフェノールは強力かつ特異な生物活性を示すものが多く、医薬資源としての有用性に注目が集まっている。例えば Fig. 1 の cannabigerolic acid (CBGA) は tetrahydrocannabinol など薬理活性カンナビノイドの前駆体であり、大麻では微量成分ながら鎮痛、抗炎症、食欲増進および細胞毒性など多様な生物活性を有することから、医薬資源として期待される希少カンナビノイドである¹⁾。またセリ科およびミカン科植物に分布する *O*-プレニル化クマリンの umbelliprenin はがん細胞に対する強力な細胞毒性が知られており、近年はその作用機序の解明や効率的な薬物送達に関する研究が進展している^{2,3)}。

本研究ではこれらプレニル化ポリフェノールの生合成に関わるプレニル基転移酵素 (PT) の構造機能研究を、新たな医薬資源の開拓に結びつける。即ち 1) CBGA を生合成する大麻 (*Cannabis sativa*) 由来 CsPT4、および 2) umbelliprenin を生成するアギ (*Ferula assafoetida*) 由来の新規酵素 FaPT1 に焦点を絞り、基質特異性などの生化学的性質を明確にするとともに、酵素反応により多様な天然型および非天然型メロテルペノイドを獲得し、それらの生物活性を解明する。

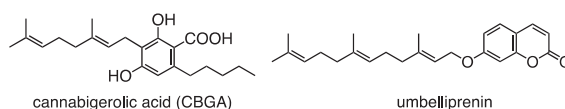


Fig. 1 Biologically active prenylated polyphenols

■結果・考察

1. 大麻由来 CsPT4 の詳細機能解析

CsPT4 はポリケチドの olivetolic acid (OLA) に GPP 由来のゲラニル基を転移することで CBGA を合成するプレニル基転移酵素である。本酵素は近年 Keasling のグループにより見出され、酵母を宿主とするカンナビノイドの合成生物学的に応用されているが、基質特異性をはじめ酵素機能の詳細は不明確である⁴⁾。

本研究では始めに、各種のプレニル基質に対する特異性を検討した結果、驚くべきことに CsPT4 は GPP のみならず、DMAPP から GGPP にいたる 4 種のプレニル基質と反応できることを明らかにした (Fig. 2)。

次いで OLA および関連化合物 (1~15, Fig. 2) を用いて芳香族基質に対する特異性を検討したところ、本酵素は下図に示す多数の芳香族化合物を受容可能であることを確認し、新規化合物を含む多様な生成物を与えることが判明した。興味深いことにそれらの芳香族基質には、アルキル側鎖の異なる OLA 類縁体のみでなく、ビベンジル型やフロログシノール型の基質も含まれている。ビベンジルに関しては、Fig. 2 のジヒドロピノシルビン酸 (DPA, 8) を受容し、苔類オオケビラゴケの二次代謝産物であるピンベンジルカンナビノイド前駆体を合成可能なことを確認した。近年、ビベンジルカンナビノイドは新たな生物活性天然物

種目 (特定研究)

として注目されており⁵⁾、CsPT4はその酵素合成にも応用可能と考えられる。また、フロログルシノール型の基質としては、OLAの異性体であるフロロカプロフェノン(9)や、DPAの異性体であるジヒドロカルコン誘導体(10)を受容して、それぞれのゲラニル化体を与えることを明らかにした。一般に酵素による基質認識は厳密な場合が多く、植物二次代謝PTも例外ではない。このように多様なプレニル基質および芳香族基質と反応するプレニル基転移酵素はCsPT4が初めてであり、バイオテクノロジーへの展開に極めて好適であると考えられた。

CsPT4の生化学的性質を詳細に解明するため、本酵素の反応速度論的解析を検討した。Table 1に各種のプレニル基質に対する速度定数を示している。K_m値より判断して、本酵素のGPPに対する親和性は中程度であるが、反応速度が極めて高いことから、反応効率の指標であるV_{max}/K_mが最も高く、GPPが最適なプレニル基質であると確認できた。これは植物体においてCBGAの生成に機能する酵素として適切な結果である。

その他の各プレニル基質への触媒機能について、本酵素はFPPに対しても高い活性および親和性を示したが、より長鎖のGGPPに対しては、非常に高い親和性を示した一方で、反応速度が著しく低いことが示唆された。さらにサイズの小さいDMAPPに関しては、親和性および活性がいずれも低く、生物学への展開は困難と推察された。このため、GGPPやDMAPPとの反応性を高めるためには、本酵素の立体構造を基盤として、論理的な変異導入を行うことで、酵素機能を改変する必要があると考えられる。

次に、芳香族基質に対する速度論的解析を行った。この結果、Table 2に示す通り本酵素の生理的な基質OLAに対するK_m値は約31 μMと、既知の植物由来芳香族PTと同程度であったが、DPAに対するK_m値は約17 μMと判明し、OLAよりもビベンジル型のDPAに対して高い親和性を示すことが確認された。また本酵素の反応速度は、OLAとDPAを用いた場合同程度であった。さらに本酵素はアルキル側鎖の短いディバリン酸(DVA, 4)に対して、OLAの場合よりも4倍程度高い反応速度を示すことを確認した。反応効率の指標であるV_{max}/K_mのレベルで見ても、本酵素はOLAよりむしろDPAやDVAに高い選択性を示すことが確認された。

さらに現時点で正確な反応速度は測定できていないものの、CsPT4はアルキル側鎖の長いOLAアナログに関して、炭素数11の側鎖を持つものまで受容可能であることを確認している。近年、共同研究者の森田洋行教授により、OLA生合成酵素の部位特異的改変によって、炭素数11までのアルキル側鎖を有する

	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
1. olivetolic acid (OLA)	+	+	+	+
2. olivetol	-	-	-	-
3. orsellinic acid	-	-	-	-
4. divaric acid (DVA)	-	+	+	+
5. 6-heptyl resorcylic acid (HRA)	-	+	+	-
6. 6-nonyl resorcylic acid	-	+	-	-
7. 6-undecyl resorcylic acid	-	+	-	-
8. dihydropinosylvic acid (DPA)	-	+	+	+
9. phlorocaprophenone	-	+	-	-
10. dihydropinoembrin chalcone	-	+	-	-
11. umbelliferone	-	-	-	-
12. naringenine	-	-	-	-
13. resveratrol	-	-	-	-
14. p-coumaric acid	-	-	-	-
15. homogentisic acid	-	-	-	-

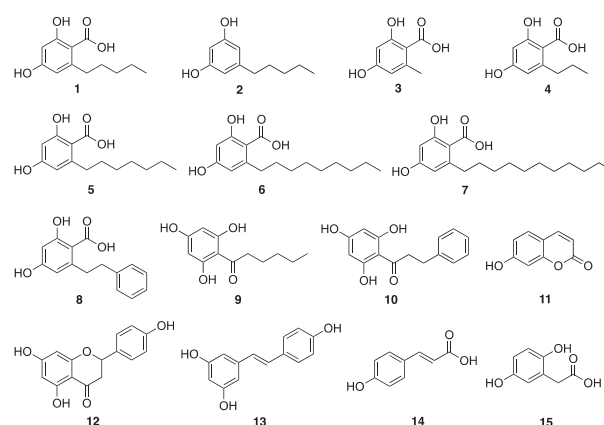


Fig. 2 Substrate specificity of CsPT4. The enzyme activities were assayed using all combinations of 14 aromatic and 4 prenyl substrates.

Substrate	Apparent affinity (K _m)	Catalytic rate (V _{max})	Catalytic efficiency (V _{max} /K _m)
	μM	pmol s ⁻¹ mg ⁻¹	pmol s ⁻¹ mg ⁻¹ μM ⁻¹
GPP	64.0 ± 0.7	1,435 ± 16	21.0 ± 0.01
FPP	21.4 ± 0.4	146 ± 0.7	6.8 ± 0.1
GGPP	6.30 ± 0.4	31.0 ± 1.2	4.9 ± 0.5
DMAPP	1,439 ± 506	7.46 ± 1.15	0.0055 ± 0.0013

Table 1 Steady-state kinetic parameters of CsPT4 for prenyl substrates. OLA was used as the aromatic substrate.

Substrate	Apparent affinity (K _m)	Catalytic rate (V _{max})	Catalytic efficiency (V _{max} /K _m)
	μM	pmol s ⁻¹ mg ⁻¹	pmol s ⁻¹ mg ⁻¹ μM ⁻¹
OLA	31.3 ± 0.05	2,493 ± 38	79.6 ± 1.3
DVA	78.1 ± 1.9	10,421 ± 121	134 ± 2
HRA	156 ± 28	158 ± 13	1.0 ± 0.1
DPA	16.9 ± 0.5	2,727 ± 17	162 ± 4

Table 2 Steady-state kinetic parameters of CsPT4 for aromatic substrates. GPP was used as the prenyl substrate.

種目 (特定研究)

OLA アナログの酵素合成が達成されている⁶⁾。当該変異酵素との組み合わせにより、多様な OLA アナログの酵素合成やバイオテクノロジーが可能になると考えている。

2. CsPT4 反応生成物の生物活性

先に述べた通り CsPT4 は新規化合物を含む多数の生成物を与えたことから、以下に示した代表的な酵素反応生成物 (16-22, Fig. 3) について生物活性試験を検討した。カンナビノイドは多様な薬理活性が注目された化合物群であるが、膵がんに関わる報告は多くない。そこでヒトすい臓癌細胞 PANC-1 に対する抗緊縮活性を検討することとした。すい臓癌細胞は多くの場合細胞増殖に血管新生が追いつかず、低酸素、低栄養といった栄養飢餓状態にさらされている。しかしながら、膵がん細胞は栄養飢餓に対して耐性を持ち、このことががんの活発な増殖や転移に結びつく。従って、栄養飢餓条件の膵がん細胞に毒性 (抗緊縮活性) を示す薬剤は、新たな抗がん剤の候補として期待される⁷⁾。

抗緊縮活性試験の結果は極めて興味深いものであり、フェノール骨格の OLA (1) が全く活性を示さなかったのに対して、プレニル化により抗緊縮活性が発現し、CBGA 類縁体の中では炭素数 15 のファルネシル基と結合した新規化合物 sesqui-CBGA (18) が最も高い活性を示した。プレニル化により疎水性が高まることで、膜透過性が亢進し、これにより細胞毒性を発現した可能性が考えられる。プレニル基は長鎖ほど良いわけではなく、炭素数 20 のゲラニルゲラニル基と結合した Diterpeno-CBGA (19) よりも Sesqui-CBGA の方が活性が高かったことから、最適値があることが確認できた。なお Sesqui-CBGA に対して、抗緊縮活性の指標となる PC₅₀ 値は 2.4 μM であった (Fig. 4)。これは本学の Suresh Awale 博士らを中心に現在臨床試験が進行しているゴボウ成分 artigenin の活性 (PC₅₀ 値 0.7 μM) より低いものの、ファーストスクリーニングとしては極めて有望であり、今後さらに多くの酵素反応生成物を試験することで、さらに強力な活性化合物の探索につなげたい。

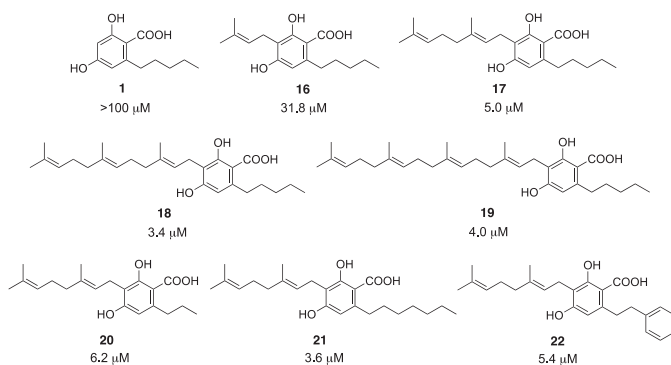


Fig. 3 Preferential cytotoxicity index (PC₅₀) of enzymatically-synthesized prenylated polyphenols against PANC-1 human pancreatic cancer cells.

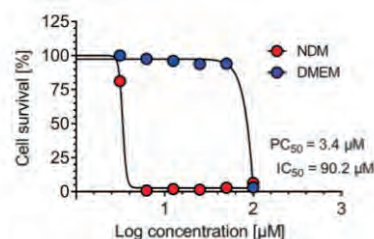


Fig. 4 Preferential cytotoxicity of sesqui-CBGA against PANC-1 human pancreatic cancer cells. NDM, nutrition-deprived medium; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium.

3. アギ由来 FaPT1 の同定および機能解析

アギ (*Ferula assa-foetida*) は、中近東やインドに分布するセリ科植物で、本植物から得られる樹脂はアサフェティダと称され、香辛料とする他、インドの伝統医学アーユルヴェーダでは喘息、神経衰弱および腹痛などの治療に適用されてきた。アサフェティダの成分である umbelliprenin は、がん細胞に対する強い細胞毒性や、抗炎症およびメラニン生合成阻害など興味深い生物活性を示すことが報告されており、医薬資源として期待されている²⁾。Umbelliprenin は umbelliferone の *O*-プレニル化によって生成すると予想される。しかしながら現時点で植物二次代謝に関与する *O*-プレニル基転移酵素 (*O*-PT) についての研究例は極めて少数で⁸⁾、umbelliprenin の生合成を触媒する酵素も未解明である。

本研究ではトランスクリプトーム解析に基づく *O*-PT の cDNA クローニングより検討を開始した。始めに、アギの若葉より RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した後、次世代シーケンシングにより取得したショートリードについて de-novo assembly を行うことで、アギのトランスクリプトームデータを確立した。次いで、既知 PT をクエリとしてホモロジー検索を行ったところ、3 種の PT 候補遺伝子 *FaPT1* ~3 の部分配列を確認した。そこで、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により、これらの末端配列を決定し、cDNA 全長を確定した。*FaPT1* ~3 の推定アミノ酸配列について、植物由来既知 PT との分子系統樹解析を

種目 (特定研究)

行ったところ、FaPT1 は一次代謝に関わるクレードから独立し、クマリン特異的プレニル基転移酵素とクレードを形成した (Fig. 5)。従って、FaPT1 がアギの二次代謝に関与する O-PT であると推察し、構造機能解析を検討することにした。

既知 PT の多くはプラスチドに局在し、MEP 経路由来のプレニル基質を利用することが知られているが、その一方でファルネシル基のもとになる FPP は一般にサイトゾルのメバロン酸経路で供給される。従って、FaPT1 の細胞内局在性は極めて興味深い。そこで、FaPT1-GFP 融合遺伝子を構築し、アグロバクテリウム LBA4404 株を介したアグロインフィルトレーション法により、ベンサミアナタバコの葉に融合タンパク質を一過的に発現させ、得られたプロトプラストについて、共焦点レーザー顕微鏡による観察を試みた。この結果、FaPT1-GFP 融合タンパク質の蛍光は、プラスチドに存在するクロロフィルの蛍光とは一致せず、主にサイトゾルにてドット状に観察された (Fig. 6)。このような局在パターンは小胞体タンパクに類似したものである。従って FaPT1 は小胞体膜に結合した形で存在し、メバロン酸経路から供給される FPP を利用していることが示唆された。

次いで、酵素機能の確認のため、酵母 *Pichia pastoris* での FaPT1 組換え酵素の発現と活性測定を検討した。このため、発現ベクター pPICZA に FaPT1 遺伝子を組み込み、エレクトロポレーション法により *P. pastoris* KM71H 株に導入した後、メタノールを含む培地で培養して組換え酵素の発現を誘導した。FaPT1 は膜タンパク質であると予測されたため、ミクロソーム画分を調製し、これを粗酵素液として、FPP および umbelliferone を基質とする酵素反応に供したところ、HPLC により umbelliprenin 標品と一致する明確なピークが確認された。以上から、FaPT1 が umbelliprenin の生合成反応を触媒する O-PT であることを確認した。植物二次代謝に関わる O-PT はグレープフルーツ由来の bergamottin 合成酵素⁸⁾に次いで二例目であり、またファルネシル転移酵素は初めての例である。

本酵素の基質特異性については、Fig. 7 に示した 8 種の芳香族化合物をプレニルアクセプターとし、FPP との酵素反応を行ったところ、umbelliferone のみならず、bergaptol についても反応生成物が確認された。このため、本酵素は多様なクマリン化合物と反応する可能性があり、さらに多くの芳香族基質を用いて解析を進めている。また Fig. 7 に示した 4 種のプレニル基質をプレニル基ドナーとして酵素反応に用いた結果、極めて興味深いことに GPP、FPP および GGPP に関して反応生成物を確認することができた。以上の結果から FaPT1 はプレニルアクセプターとしてクマリン骨格を有する芳香族化合物を認識し、また多様なプレニル基質を受容する酵素であると確認した。FaPT1 は広範な基質を受容可能であるため、プレニル化クマリンの酵素合成に応用可能と考えられる。今後は部位特異的変異による酵素機能の拡張も含めて、さらに多様な生成物の合成を試み、それらの生物活性を検討する計画である。

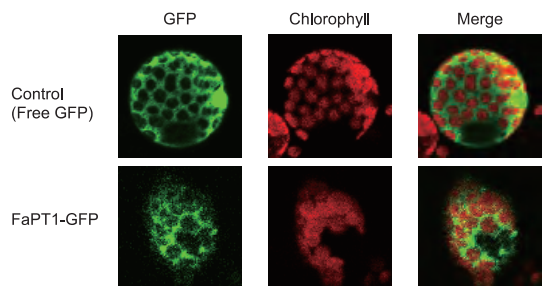
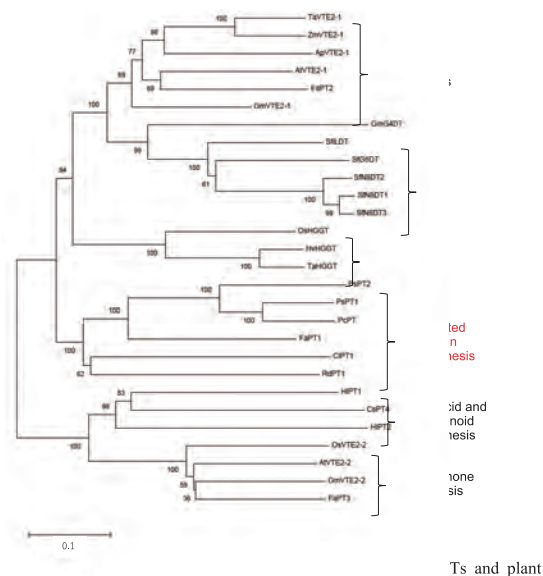


Fig. 6 Subcellular localization of FaPT-GFP fusion protein transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* mesophyll cells.

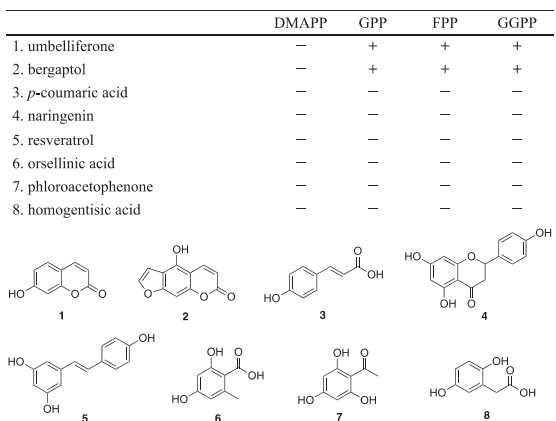


Fig. 7 Substrate specificity of FaPT1. The enzyme activities were assayed using all combinations of 8 aromatic and 4 prenyl substrates.

種目 (特定研究)

次いで umbelliprenin の生合成部位について RT-PCR により検討した。この結果、umbelliprenin の含量が根や側根に多いのに対して、本酵素遺伝子の発現は意外なことに若葉や葉柄などの地上部に集中しており、地下部ではほとんど観察できなかった。このことから、umbelliprenin は地上部で合成され、維管束 (おそらく篩管) を通じて地下部に輸送されると結論した。

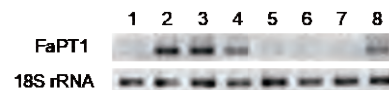


Fig. 8 RT-PCR analysis of tissue-specific expression of FaPT1. 1, flower; 2, leaf; 3, petiole; 4, pedicel; 5, stem; 6, main root; 7, lateral root; 8, achene.

■結論

本研究では大麻由来 CsPT4 およびアギ由来の新規酵素 FaPT1 のキャラクタリゼーションにより、これらプレニル基転移酵素が極めて広範な基質を受容して多様な生成物を合成可能であることを示し、また CsPT4 の産物については膀胱がん細胞に対する顕著な抗緊縮活性を有することを明らかにした。一般に酵素と基質は鍵と鍵穴の関係とされ、特に植物の二次代謝 PT は基質特異性が厳密なものが多い中で、これらの酵素は異例で、ゆえに物質生産に有用と考えられる。酵素により得られるプレニル化ポリフェノールの生物活性については助成期間終了後も追求し、医薬品応用に結びつく成果の創出につなげたい。

■参考文献

- 1) Russo, E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1344–1364.
- 2) Fiorito, S., Preziuso, F., Sharifi-Rad, M., Marchetti, L., Epifano, F., Genovese, S. (2020) Auraptene and umbelliprenin: a review on their latest literature acquisitions. *Phytochem. Rev.* <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09713-5>.
- 3) Eda, S., Nasibullin, I., Vong, K., Kudo, N., Yoshida, M., Kurbangalieva, A., Tanaka, K. (2019) Biocompatibility and therapeutic potential of glycosylated albumin artificial metalloenzymes. *Nature Catalysis* **2**, 780–792.
- 4) Luo, X., Reiter, M.A., d’Espaux, L., Wong, J., Denby, C.M., Lechner, A., Zhang, Y., Grzybowski, T., Harth, S., Lin, W., Lee, H., Yu, C., Shin, J., Deng, K., Benites, V.T., Wang, G., Baidoo, E.E.K., Chen, Y., Dev, I., Petzold, C.J., Keasling, J.D. (2019) Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* **567**, 123–126.
- 5) Chicca, A., Schafroth, M.A., Reynoso-Moreno, I., Erni, R., Petrucci, V., Carreira, E.M., Gertsch, J. (2018) Uncovering the psychoactivity of a cannabinoid from liverworts associated with a legal high. *Sci. Adv.* **24**, eaat2166.
- 6) Lee, Y.-E., Nakashima, Y., Kodama, T., Chen, X., Morita, H. (2021) Dual engineering of olivetolic acid cyclase and tetraketide synthase to generate longer alkyl-chain olivetolic acid analogs. *Org. Lett.* **24**, 410–414.
- 7) Sun, S., Kim, M.J., Omar, A.M., Phan, N.D., Aoike, M., Awale, S. (2021) GDP induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway. *Chem Biodivers.* **18**, e2100389.
- 8) Munakata, R., Olry, A., Takemura, T., Tatsumi, K., Ichino, T., Villard, C., Kageyama, J., Kurata, T., Nakayasu, M., Jacob, F., Koeduka, T., Yamamoto, H., Moriyoshi, E., Matsukawa, T., Grosjean, J., Krieger, C., Sugiyama, S., Mizutani, M., Bourgaud, F., Hehn, A., Yazaki, K. (2021) Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic *O*-prenyltransferases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2022294118

天然物医薬品開発のための和漢薬の遺伝子解析及び網羅的成分分析

申請代表者	丸山 卓郎	国立医薬品食品衛生研究所	主任研究官
研究統括者	小松 かつ子	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	教授
所内共同研究者	當銘 一文	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	准教授
所内共同研究者	朱 姝	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	助教

■背景・目的

天然物医薬品は、天然由来であるがゆえに、含有成分の組成、含量にバラツキが生じ、品質を一定に保つことが難しいという不安定な要素を持っている。生薬の品質に大きな影響を与える因子としては、原料植物の遺伝的背景の違い、栽培/野生の別、産地などの生育条件の違い、加工調製法の違いなどが挙げられる。このため、天然物医薬品の開発には、薬効成分の同定や臨床研究の他に、上記の因子を理解し、効果的なレギュレーションを課すことにより、一定した成分組成、量を有する生薬を確保することが重要である。

本研究では、検討対象品目として、ニクジュヨウ、カノコソウ及びショウブコンを選択し、これらの生薬について、遺伝的多様性と LC/MS, GC/MS 分析の結果を結び付けた解析を実施し、各標的疾患に適した、あるいは、安全性の高い成分組成を持つ生薬資源の探索、特定を目指した。

■結果・考察

1. ニクジュヨウ

ニクジュヨウ（肉菴蓉）は、神農本草経の上品に収載され、腎陽を補い、精血を増し、腸を潤し、便を通ずるなどの効能で応用されてきた。JP18¹では、その基原として、ハマウツボ科(Orobanchaceae)の *Cistanche salsa* (C. A. Meyer) G. Beck ホンオニク、*C. deserticola* Y. C. Ma, 又は *C. tubulosa* (Schrenk) Wight の肉質茎であると規定されている。このうち、*C. deserticola* 及び *C. tubulosa* は中華人民共和国薬典²にも基原として規定されている。さらに、同科の *Boschniakia rossica* (Cham. et Schltdl.) B. Fedtsch. ex Fedtsch. et Flerov オニクの全草は、ワニクジュヨウとして日本薬局方外生薬規格 2018³に収載されている。東田らは、ニクジュヨウの骨格筋機能改善作用をもつ化合物としてフェニルエタノイドである acteoside (=verbascoside) を見出し、本化合物の投与により、骨格筋から pyruvate kinase M2 (PKM2) が分泌され中枢神経系へ移行し軸索伸展促進作用と骨格筋増加作用を示すことを明らかにしている⁴。さらに、acteoside にグルコースが1分子追加された echinacoside についても活性化化合物である可能性を検討している。本研究では、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、それらに含まれる2つの活性化化合物の含量を調べることを目的とする。今年度はニクジュヨウの抽出物について¹H NMR 法による定量法 (qHNMR) の可能性について検討を行った。

HPLC を用いた検討で抽出に用いるメタノールの濃度を検討したところ、80%メタノールで最も高い抽出効率が得られたため、以後のニクジュヨウの抽出は80%メタノールで行った。ニクジュヨウエキスを DMSO-*d*₆ または CD₃OD に溶解し測定した¹H NMR スペクトルと、ニクジュヨウの代表的なフェニルエタノイド成分である echinacoside, acteoside, isoacteoside のスペクトルとを比較した。その結果、CD₃OD 中で測定したスペクトルにおいて、フェニルエタノイド類のシグナルはニクジュヨウエキスのスペクトルにおいても

種目 (特定研究)

十分な感度をもって検出できることを確認し、その量の大小を簡便に見積もることができることがわかった。これらのシグナルにはエキスのスペクトルにおいて比較的よく分離して観測されているものがあり、これらのシグナルを用いて、定量NMR法 (qHNMR法) によるフェニルエタノイド類の定量分析の可能性が示唆され、HPLCでの定量結果とも相関していることがわかった。また、これら化合物は共通する骨格構造をもち、共通するシグナルを示すことから、骨格構造が共通する化合物を一括して定量できることがわかった。さらに化合物ごとに特徴的な部分構造の違いに起因するシグナルが確認され、それらを用いた化合物ごとの定量が可能であることがわかった。以上より、ニクジュヨウのqHNMR法によるフェニルエタノイド類の定量分析法が確立できたと考えている。

上記の方法を用いて *C. salsa*, *C. deserticola*, *C. tubulosa*, *B. rossica* の植物サンプル18検体について検討したところ、個体差は大きいものの中国新疆ウイグル自治区産の *C. tubulosa* において echinacoside などのフェニルエタノイド類の含量が高いことを見出した。今後、検体数を増やして解析を進めることで、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにするとともに、すでに解析が済んでいる核ゲノムの ITS 領域の配列情報とを紐づけて、成分の差異と遺伝子配列の関係性についても解析を進める。

2. カノコソウ

カノコソウは、JP18において、カノコソウ *Valeriana fauriei* Briquet の根及び根茎と規定されている。本生薬は、元々、JP1~JP3に収載されていた欧州産カノコソウ (ワレリアナ根; *V. officinalis* L.) の代用または併用できる本邦産生薬の収載方針に基づき、JP2より収載されており、JP2~JP8までは、*V. officinalis* L. var. *latifolia* Miquel を基原植物学名として記載しているが、植物分類学上の扱いの変化に伴い、JP9以降、現在の *V. fauriei* が学名として採用されている⁵。カノコソウには、これまで、いくつかの品種が栽培されてきており、以前、盛んに栽培されたカメバキソウや、現在の市場品の主流であるホッカイキソウがある。これらは、精油量及びセスキテルペンの組成が異なることが知られており、また、近年では、需要の高まりに伴い、中国産も使用されている。本研究では、これらの試料について、遺伝子型と成分型の相関を探り、より薬用価値の高いものを、再現性よく供給するための基盤整備を行った。

Valeriana 属の遺伝子鑑別については、Fujii ら⁶により、葉緑体DNAの *psbA-trnH* intergenic spacer (IGS) 領域の有用性が示されており、本領域の塩基配列の違いにより、カノコソウと同属他種は区別可能であり、さらに、カノコソウは、5つの遺伝子型 (AH-1~AH-5) に細分類されることが明らかにされている。このことから、本領域の塩基配列解析を行った結果、日本のカノコソウ市場品31検体 (国内産29, 中国産2) は、3つの遺伝子型 (AH-1, 2, 5) に分類された。国内産のカノコソウは、AH-1, 2のいずれかを示し、中国産の2検体は、いずれもAH-5を示し、Fujii らの報告と一致した。

同じ試料に対して、GC/MS解析を行った結果、主に15本のピークが認められた。NIST検索、標品及び各検体からの精製品、その加水分解成績体との保持時間及びマススペクトルの比較から、このうちの9本のピークについては、borneol; bornyl acetate; α -terpinyl acetate; valeranone; α -kessyl acetate (KA); α -kessyl alcohol; 1-*O*-acetyl-2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol (ABD); 2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol (BD); kessyl glycol diacetate (KGD) と同定された。GC/MSデータに対して、多変量解析であるHCA及びPCAを行ったところ、市場品は、3つの成分型 (J_1 , J_2 , C) に分類された。さらに、参考試料として分析したカメバキソウも、別の成分型 (K) を示した。 J_1 , J_2 型は、いずれもKGDを主精油成分としていたが、 α -terpinyl acetate などのマイナー成分の含量に違いが見られた。一方、C型は、KGDとは骨格の異なるセスキテルペンであるABDを主精油成分としていた。また、K型は、KAを主精油成分としており、Suzuki らの報告⁷と一致した。

これらの成分型と *psbA-trnH* IGS 領域の遺伝子型を比較したところ、両者は、よく一致した。すなわち、AH-1の遺伝子型を示した検体は J_1 型、AH-2は J_2 型、AH-5は、C型を示した。このことから、各精油成分型の違いは、環境要因ではなく、遺伝的背景の違いに起因していると考えられた。

種目 (特定研究)

カノコソウは、漢方処方用薬ではなく、主に鎮静作用を目的に、種々の生薬製剤に配合される生薬である。先行研究では、バルビツレート誘導睡眠に対する延長作用やロコモーターアッセイによる自発運動量の現象が報告されており^{8,9}、その活性化合物として KGD 類が報告されている。一方、カノコソウには、Nerve Growth Factor (NGF; 神経成長因子)増強作用も知られており¹⁰、その活性化合物として、kissoone 類と共に、BD が報告されている。従って、この成分型を持つカノコソウには、認知症に対する効果も期待される。

以上のことから、カノコソウの精油成分型を把握し、イライラ、ヒステリー、認知症など、それぞれの症状の治療に適合する成分型を持つカノコソウを用いることで、より有効な薬物治療の実現が期待される。本研究成果は、カノコソウによる、より有効な薬物治療のための基礎的知見を与えるとともに、*psbA-trnH* IGS 配列が、有用な DNA マーカーとなることを示している。

3. ショウブコン

ショウブコンは、ショウブ *Acorus calamus* の根茎を基原とする生薬であり、類似生薬であるセキショウコンとともに、一般用医薬品製造販売承認基準の胃腸薬基準に掲載されている。両者は、よく似た外観を有することから、しばしば誤用されるものの、ショウブコンには、公的規格がない。また、Sugimoto ら¹¹は、ショウブコンに複数の精油型が存在することを報告している。そこで、本研究では、ショウブコンの品質標準化を目的に、ショウブコン及びセキショウコン市場品の遺伝子解析及び GC/MS 分析を行った。

ショウブコン市場品 9 検体 (安徽省, 広西産, 各 3 ロット, 江西省, 浙江省, 湖北省産, 各 1 ロット), セキショウコン市場品 3 検体 (安徽省産 2 ロット及び四川省産) について、5S rDNA IGS 領域, 核 rDNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域及び葉緑体 DNA の *psbA-trnH* IGS 領域の塩基配列解析を行った。広西チワン族自治区産の 3 ロットのうち、2 ロットは、いずれの領域においても PCR 産物が得られなかった。解析の結果、いずれの領域もショウブコンとセキショウコンを、鑑別可能であったが、*psbA-trnH* IGS 領域は、単一個体内に複数の配列を認めるものがあり、直接シーケンス法による鑑別には不向きであった。Sugimoto らは、国内で収集した *A. calamus* について、5S rDNA IGS 領域の塩基配列解析を行い、3 つの遺伝子型に分かれることを報告している。今回の解析したショウブコン市場品では、このうちの 2 つと、両者の混合物が認められた。

同じ試料について、GC/MS による精油成分の分析を行った。Sugimoto らの報告通り、ほぼアサロンのみからなる chemotype A, アサロンは僅かで、セスキテルペン類と推定される多数の成分を含む chemotype B, 両者の中間型である chemotype M の全てが認められたが、それらに属さない chemotype として、アサロンとメチルオイゲノールと推定される成分が、同程度含まれるものが検出された。一方、セキショウコン市場品は、全て chemotype A であった。

Sugimoto らは、5S rDNA IGS 領域の遺伝子型と chemotype が相関すると報告しているが、今回、我々が使用した試料では、相関性は認められなかった。原因として、Sugimoto らの実験材料が、国内産の *A. calamus* 6 検体に限られている点が推定された。*A. calamus* には、2 倍体, 3 倍体, 4 倍体が存在し、The Plant List では、それぞれを、*A. calamus* var. *americanus*, var. *calamus*, var. *angustatus* に細分類している。Plants of the World online では、国内に分布する *A. calamus* は、*A. calamus* var. *angustatus* であるとされており、一方の中国では、*A. calamus* var. *angustatus* の他に、*A. calamus* var. *calamus* も分布するとされている。国内に比べて、中国産の *A. calamus* は、遺伝的多様性が大きいと推定され、このことが、国産の *A. calamus* よりも多様な成分型を生じているものと思われる。

今後、検体数を増やして、この点を検証する予定である。

■結論

ニクジュヨウについては、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、活性成分の定量を目的として、定量 NMR を中心に検討を行い、実験条件の確立を行うとともに、その条件を

種目（特定研究）

用いた解析から、中国新疆ウイグル自治区産の *C. tubulosa* においてフェニルエタノイド類の含量が高いことを見出した。今後、遺伝子情報と合わせて解析を進めることで、活性成分の含量が高い基原植物の遺伝子型、産地の特定につながることを期待される。

カノコソウについては、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* IGS 配列と精油成分組成に相関があることを明らかにした。それぞれの主精油成分が持つ薬理活性は異なることから、精油成分型の違いを理解した上で、それぞれの症状に適した精油型のカノコソウを用いることで、より有効性の高い治療が実現できると期待される。

ショウブコンについても、精油成分組成に多様性が確認され、既報の情報との比較から、主産地である中国では、日本国内産のものよりも、多様性が大きいことが示唆された。毒性物質であるアサロンの含量が低い個体も見出されていることから、今後、さらに検体数を増やして検討を行うことで、より安全性の高いショウブコンの産地及び遺伝子型を特定することができると考えている。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 2021 年. 第十八改正日本薬局方, pp. 2017-2018.
- 2) 国家薬典委員会編, 2015 年. 中華人民共和国薬典 2015 版, 第一部, p. 135, 中国医薬科技出版社, 北京.
- 3) 局外生規 2018 出版検討会, 2020 年. 和英対訳日本薬局方外生薬規格 2018, pp. 201-202, 薬事日報社, 東京.
- 4) Kodani A., Kikuchi T., Tohda C., *J. Neurotrauma.*, **36**, 1935-1948 (2019).
- 5) Yanagisawa K., *Jpn. J. History Pharm.*, **48**, 63-74 (2013).
- 6) Fujii T., Mori T., Tatsuo Y., Takao Y., Fujino H., Tsuchida T., Minami M., *J. Nat. Med.*, **75**, 699-706 (2021).
- 7) Suzuki H., Zhang B. C., Harada M., Iida M., Satake M., *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 305-310 (1993).
- 8) Takamura K., Kakimoto M., Kawaguchi M., Iwasaki T., *Yakugaku Zasshi*, **93**, 599-606 (1973).
- 9) Yoshitomi S., Watanabe M., Kawanishi F., Satake M., *Nat. Med.*, **54**, 55-60 (2000).
- 10) Guo Y., Xu J., Li Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., *Planta Med.*, **72**, 373-375 (2006).
- 11) Sugimoto N., Kiuchi F., Mikage M., Mori M., Mizukami H., Tsuda Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 481-485 (1999).

栄養代謝調節因子に作用する和漢薬のスクリーニング

申請代表者	中川 嘉	研究開発部門複雑系解析分野	教授
共同研究者	金 俊達	研究開発部門複雑系解析分野	准教授

■背景・目的

現在、日本では成人男性の約3割が脂肪肝であり、脂肪肝のうち約2割が慢性肝炎、さらには肝硬変、肝臓ガンになることが明らかになっている。本課題では、和漢薬から生活習慣病の予防・疾患治療、特に非アルコール性脂肪肝に対する新たな治療薬として CREBH の活性化薬を和漢薬からスクリーニングすることを目的とする。申請者は転写因子 CREBH の解析を行ってきた。CREBH は肝臓、小腸にのみ発現し、肝臓では糖・脂質の代謝に係る酵素の遺伝子発現を制御し、血糖値、血中脂質を低下させる。その際、生活習慣病改善ホルモンで、肝臓から分泌される Fibroblast growth factor 21 (FGF21)が増加することがこれら変化に起因する。本課題では CREBH の標的遺伝子である FGF21 の発現量をモニターする FGF21 Luc を評価系として用い、和漢医薬学総合研究所の和漢薬ライブラリーから活性化する因子を同定し、生活習慣病の新規治療薬の開発に結び付けることを目的とした。

■結果・考察

CREBH の標的遺伝子であり生活習慣病全般を改善する肝臓由来ホルモンである FGF21 のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイをマウス肝細胞 AML12 で行った。和漢薬ライブラリーに含まれる薬剤の中から FGF21 Luc 活性を上昇させる薬剤として、オウゴンと同定した。さらに、オウゴンの主要成分である Baicalin、Baicalein、Wogonin に対しても、同様に FGF21 Luc 活性を評価したところ、Wogonin だけに活性が有していた。実際にオウゴン、Wogonin が細胞において FGF21 の発現を誘導するかを検討したところ、その発現を誘導することを確認した。Wogonin による FGF21 発現誘導にどの転写因子を介するかを、さらに遺伝子発現レベルで検証したところ、ATF4 のみが上昇し、タンパクレベルでも ATF4 の上昇を確認した。ATF4 siRNA により、ATF4 をノックダウンした細胞では Wogonin による FGF21 の発現誘導が抑制された。したがって、オウゴンの主成分の一つ Wogonin は ATF4 を介して FGF21 の発現を誘導させることを明らかにした。

■結論

オウゴンは脂質代謝改善に寄与する和漢薬として使用されている。本課題では和漢薬ライブラリーからオウゴンが生活習慣病全般を改善する肝臓由来のホルモン FGF21 の発現を誘導し、その効果が主成分の一つ Wogonin に起因すること、その作用点として Wogonin が転写因子 ATF4 を活性化し FGF21 の発現を上昇させることを明らかにした。

種目 (探索研究)

HBV 排除化合物の探索

和漢薬エキスライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングと活性成分の分析

申請代表者	松島 綱治	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	教授
所外共同研究者	本多 政夫	金沢大学 大学院医薬保健学総合研究科病態検査学講座	教授
所外共同研究者	上羽 悟史	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	准教授
所外共同研究者	Chandrasekar Balachandran	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	助教
所外共同研究者	横地 祥司	東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門	客員研究員

■背景・目的

東京理科大学生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門では、DOCK11(GEF)とその主要な会合分子である Cdc42(Rho GTPase)との分子間相互作用が、HBV DNA の複製に不可欠な役割を担うという共同研究者、橋本らの知見に基づき阻害化合物の探索を実施している。本研究では、和漢薬エキスライブラリーから、これらの分子間相互作用を阻害する低分子化合物を多段階スクリーニングにより探索し、最終的に細胞レベルでの検証および最適化試験を行い、HBV 排除化合物を同定することを目的とした。

■結果・考察

DOCK11 と Cdc42 組み換えタンパクを動物細胞にて発現させ、Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 技術により細胞内での相互作用 (PPI) をハイスループットスクリーニング (HTS) で検出できるアッセイ系を構築した。

NanoBRET スクリーニング系、および、HBV エントリー/cccDNA モニタリング系に、和漢薬エキスライブラリー、化合物ライブラリーをかけて、ヒットエキス・化合物を見つけた。

その結果、DOCK11 と Cdc42 の特異的相互作用を阻害する 3 つの化合物 (Honokiol, Shikonin, [6]-Shogaol) を見出した。

No	生薬名	試験名	NanoBRET assay				WST-8 (24 h)
		濃度	Dock9		Dock11		
	単位	50 μM	IC50 (μM)	50 μM	IC50 (μM)		
60	Honokiol	Active	36	Active	32	24.6	
91	Shikonin	Active	3.2	Active	8.5	4.7	
92	[6]-Shogaol	Active	42	Active	43	26.1	

しかしながら、いずれも、WST8 を用いた細胞毒性試験において、有効濃度と近い濃度での細胞毒性が検出されたため、そのままでは、医薬品としての開発は難しいものと考えられた。

ただ、これらの化合物は、ユニークな構造を持つ生理活性物質であることから、今後、これらの化合物の誘導体を合成して、細胞毒性のない有効化合物を開発していくことが期待できる。

■結論

和漢薬エキブライブラリーおよび化合物ライブラリーについて、DOCK11 と Cdc42 の細胞内蛋白質相互作用（PPI）の NanoBRET スクリーニングシステムを用いて阻害作用を評価した。その結果、特異的阻害作用を有する3つの化合物を見出した。

いずれも、薬効濃度に近い濃度での細胞毒性が検出されたため、そのままでは、医薬品としての開発は難しいものと考えられたが、ユニークな構造を持つ生理活性物質であることから、今後、これらの化合物の誘導体開発が期待できた。

タンパク質メチル化に対する和漢薬作用の生化学的効果の検証と代謝疾患への応用

申請代表者	深水 昭吉	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター	教授
所外共同研究者	加香 孝一郎	筑波大学・生命環境系	講師
所外共同研究者	大徳 浩照	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター	講師

■背景・目的

メチル化は、DNA や RNA などの核酸、タンパク質、脂質、代謝物など、多くの生体分子に共通してみられる化学修飾であり、メチル基供与体である *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) のメチル基がメチル基転移酵素（メチル化酵素）の触媒作用により基質に付加される反応である。このうちタンパク質のメチル化は、リジン、アルギニン、ヒスチジン残基に起こり、タンパク質の活性や安定性、タンパク質間相互作用などの変化を介して、遺伝子発現やシグナル伝達など広範な細胞機能の制御に関わる。申請者らは生体内のタンパク質メチル化状態を、タンパク質加水分解後のメチルアミノ酸分析によって網羅的に測定する方法を開発した。そこで本申請研究ではこの方法を活用することで、生薬由来化合物のタンパク質メチル化に対する薬理作用を検証し、代謝性疾患の治療への応用を目指すことを目的とする。

■結果・考察

ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T の通常培地にメチオニン、または AdOx を添加して培養し、細胞内タンパク質メチル化を測定したが、添加濃度や処理時間に相関した有意な変化は認められなかった。そこで改善策として、細胞をマウス肝細胞株 AML12 に変更することとした。一般的に生体内のメチル化反応は、肝臓で最も活発に起こることが知られている。実際に AML12 細胞から調製したタンパク質では、HEK293T 細胞に比べてリジン、アルギニン、ヒスチジンのいずれのメチル化も高いレベルで検出された。この細胞にコガネバナ抽出物（オウゴン）エキスおよびその薬理成分であるオウゴン、バイカレリン、バイカリンを終濃度 20 μ M で処理したところ、バイカリンのみでモノメチルリジンおよびジメチルリジンレベルの低下が認められた。

リジンメチル化はヌクレオソームを構成するヒストンの N 末端側に多く見られる可逆的な修飾であり、転写調節において重要な役割を担っている。ヒストンのリジン残基の脱メチル化酵素として知られる LSD1 はトリメチルリジンを脱メチル化できず、ジ・モノメチルリジンを脱メチル化することから、今回の結果は、バイカリンが LSD1 の酵素活性を亢進させている可能性を示唆している。

■結論

コガネバナ抽出物（オウゴン）の薬理成分であるバイカリンは、マウス肝細胞株 AML12 において細胞内タンパク質のリジン残基のモノ・ジメチル化の状態を低下させる薬理活性を有する。

和漢薬ライブラリーを用いた新興ウイルスに対する感染阻害薬の探索研究

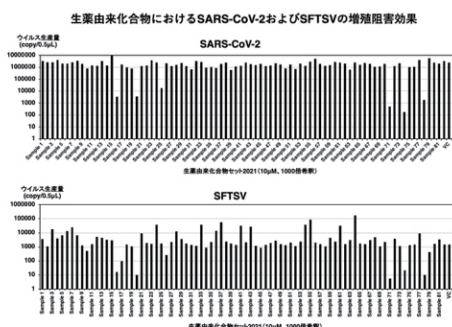
申請代表者	谷 英樹	富山県衛生研究所・ウイルス部	部長
所外共同研究者	五十嵐 笑子	富山県衛生研究所・ウイルス部	研究員
所外共同研究者	佐賀 由美子	富山県衛生研究所・ウイルス部	主任研究員

■背景・目的

近年、新しく発見されたウイルスによる感染症、いわゆる新興ウイルス感染症が現代社会の脅威となっている。一昨年から猛威を奮っている新型コロナウイルス感染症（COVID-19）をはじめ、マダニ媒介性ウイルスによる重症熱性血小板減少症候群（SFTS）など発見されてから間もないウイルス感染症の場合、早急にワクチンや治療薬等の開発が望まれる。本研究では、我々が既に開発している細胞侵入を解析できる擬似（シュードタイプ）ウイルスおよび実際の生ウイルス等を用いて、様々な創薬ライブラリーの中でも生薬および漢方方剤エキスが含まれる和漢薬ライブラリーに着目して、感染阻害薬の探索を行うことを目的とする。

■結果・考察

富山大学和漢医薬学総合研究所より分与いただいた242種の和漢薬ライブラリーを用いて、まず、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）および重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）の増殖性について評価した。具体的には96wellプレートに播種したVeroE6細胞に和漢薬ライブラリー（生薬および漢方方剤エキスセット2020、生薬由来化合物セット2021）をそれぞれ100μg/mlおよび10μMに希釈したものとSARS-CoV-2およびSFTSVをそれぞれ添加し、培養48時間後の培養上清を回収し、その培養上清中の各ウイルス遺伝子量をqPCRにより測定した。その結果、生薬エキスセット2020でのスクリーニングではSARS-CoV-2の増殖を抑制できる生薬候補は検出されなかったものの、SFTSVではいくつか阻害効果が認められる生薬が見つかった。中でも高い阻害効果が示されたのは、荊芥（ケイガイ）、鶏血藤（ケイケツトウ）、丹参（タンジン）、丁子（チョウジ）、麦門冬（バクモンドウ）、檳榔子（ビンロウジ）、樸椒（ボクソク）、蔓荆子（マンケイシ）、良姜（リョウキョウ）であり、数百倍増殖を抑制することが認められた。今後、より低濃度での阻害活性について評価する必要があると思われる。次に、生薬由来化合物セット2021、81種類でのスクリーニングでは、6種類の化合物でSARS-CoV-2が、SFTSVではそれに加えて合計7種類の化合物でウイルスの増殖が阻害されていることがわかった（右図）。6種類の化合物については、細胞毒性も考慮してより低濃度での阻害活性について検討する必要があると思われる。どの化合物においても他のウイルスでの阻害活性はいくつか報告があり、今回検証したSARS-CoV-2、SFTSVともに同様の抗ウイルス効果があることも十分考えられる。今後はより詳細なメカニズムについて検討する予定である。



■結論

本研究において、生薬・漢方方剤エキスおよび生薬由来化合物においてSARS-CoV-2およびSFTSVの増殖阻害に関与するいくつかの候補分子を見いだすことができた。今後、特異性や作用機序について検討していく必要があると考えられる。

種目 (探索研究)

「漢方 COVID-19 薬探索 熱研・和漢研プロジェクト」

The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro

Nagasaki University;

Mya Myat Ngwe Tun, Elizabeth Luvai, Khine Mya Nwe, Shusaku Mizukami, Kenji Hirayama, Kouichi Morita

Toyama University;

Kazufumi Toume, Katsuko Komatsu

所外共同研究代表者 森田公一 長崎大学熱帯医学研究所 教授

所内共同研究代表者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

■背景・目的

The emergence of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic in 2019 has led to a global health crisis. Mutations of the SARS-CoV-2 genome have impeded the development of effective therapeutics and vaccines against SARS-CoV-2. Natural products are important for discovering therapeutics to treat the 2019 coronavirus disease (COVID-19). To identify anti-SARS-CoV-2 drugs we screened 120 herbal extracts, 96 Kampo-related active compounds from a Kampo library which provided by the Institute of Natural Medicine (WAKANKEN) at the university of Toyama. After selected through the first in vitro assay, we detected three positive herbal extracts and two natural compounds for possible antiviral effect on SARS-CoV-2 infection. This study evaluated the inhibitory effects of those herbal drug extracts and natural compounds against SARS-CoV-2 infection in vitro.

■結果・考察

The antiviral activity of herbal drug extracts from Polygala Root, Areca, and Quercus Bark and natural compounds derived from herbal drug such as baicalin and glabridin, with IC₅₀ values of 9.5 µg/ml, 1.2 µg/ml, 5.4 µg/ml, 8.8 µM and 2.5 µM, respectively, against SARS CoV-2 infection in vitro.

種目 (探索研究)

The CC_{50} values of Polygala Root ext., Areca ext., Quercus Bark ext., baicalin and glabridin were 186.3 $\mu\text{g/ml}$, 89.6 $\mu\text{g/ml}$, 381.1 $\mu\text{g/ml}$, $> 1000 \mu\text{M}$ and 21.5 μM , respectively.

Consequently, the selectivity indexes ($SI = CC_{50}/IC_{50}$) of Polygala Root ext., Areca ext., Quercus Bark ext., baicalin and glabridin were 19.7, 73.6, 71.0, > 114.2 and 8.7, respectively.

Certain herbal drug extracts and natural compounds were found to inhibit viral RNA levels by quantitative real time RT-PCR and infectious titers of SARS-CoV-2 by infectivity assay in a dose-dependent manner.

Furthermore, NP expression in infected cells using western blot analysis and quantitative real time PCR for time-of-addition experiments showed that herbal drug extracts and natural compounds effectively inhibited SARS-CoV-2 in entry and post-entry treatments.

Our study revealed that three herbal drugs are good candidates for further in vivo and clinical studies.

■結論

1. Ngwe Tun MM, Toume K, Luvai E, Nwe K, Mizukami S, Hirayama K, Komatsu K, Morita K. The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro. 2022. **J Nat Med** 76, 402–409.
2. Ngwe Tun MM, Luvai E, Nwe K, Toume K, Mizukami S, Hirayama K, Komatsu K, Morita K. Anti-SARS-CoV-2 activity of various PET-bottled Japanese green teas and tea compounds in vitro. 2022. **Arch Virol**. doi: 10.1007/s00705-022-05483-x.

和漢医薬学総合研究所年報

第48巻

令和4年4月

編集
発行所

富山大学和漢医薬学総合研究所

〒930-0194 富山市杉谷2630番地
TEL (076) 434-2281(代)

印刷所

(株) なかたに印刷

〒939-2741 富山市婦中町中名1554-23
TEL (076) 465-2341(代)

リサイクル適性 

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。