

学位論文題名

「天然物由来新規有用薬理活性物質に関する研究」

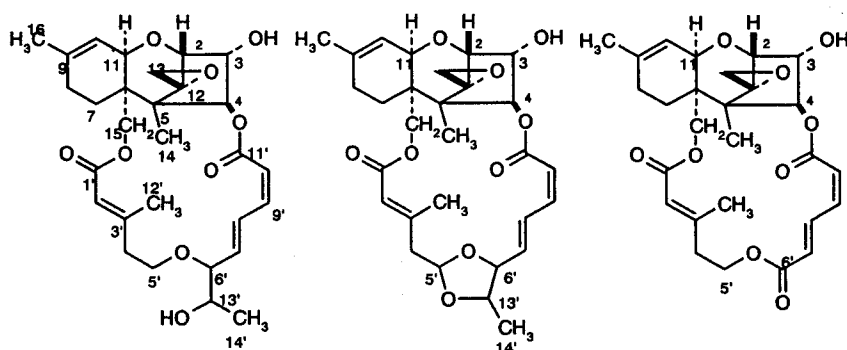
学位論文内容の要旨

近年ヒトゲノム情報の解析が進み、分子レベルでの疾病の要因解明の速度はますます加速している。また種々の医薬品候補物質を探索するスピードも飛躍的に増加し、多種多様な医薬品候補物質がさまざまな生物試験を通してスクリーニングされている。

本研究では、日本人の死因の上位を占める、がん、脳・心疾患および近年その患者数が増大しているアレルギー領域における治療薬探索を目的としたアッセイ系を構築し、合成医薬品にないユニークな医薬品リード化合物の探索源として重要な位置を占める天然物サンプル(微生物代謝産物や海洋生物の抽出物)からのスクリーニングを実施した。その結果、それぞれの領域で新規薬理活性物質を取得することができた。以下にその結果を要約する。

(1) 新規抗腫瘍抗生物質 roridin L, M および verrucarin M

米国国立がん研究所(NCI)で提唱された disease-oriented screening の考え方に従い、各種の腫瘍細胞に対する増殖抑制活性をパネル評価することで、特定の癌種に対して選択的に作用する物質を探索した。その結果、カビ *Myrothecium verrucaria* cm04 株が白血病細胞に対して選択的に作用する物質を生産していることを見出し、活性物質を単離した。活性物質である roridin L(1), M(2) および verrucarin M(3)の平面構造は各種 2D-NMR 分光法を用いて決定した。



Roridin L (1)

Roridin M (2)

Verrucarin M (3)

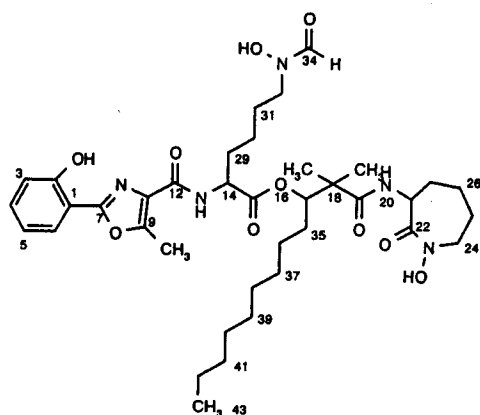
これらは trichothecene 系抗生物質に属する物質であるが、trichothecene 環部分の 3 位に水酸基を有するという点で、初めてのカテゴリーに属する化合物である。この 3 位の水酸基の相対立体構造は NOESY スペクトルによる NOE 解析と J_{HH} 値の検討により決定した。

化合物 1, 2 および 3 はそれぞれ 3.0, 8.7 および 9.0 nM という極めて低い濃度の IC_{50} 値で白血病細胞 P388 に対して増殖抑制活性を示した。また 1 の各種固形癌細胞に対する増殖抑制作用を検討した結果、予想通り白血病細胞に対してより強い増殖抑制活性を示すことが明らかとなった。従って白血病に選択的に作用する新規抗腫瘍物質を得ることができたと考えられる。今後 *in vivo* モデルにおける有効性を検討する予定である。

(2) 新規抗酸化物質 formobactin

活性酸素による傷害が心臓や脳などの虚血性疾患、動脈硬化、糖尿病、炎症、リウマ

チ、腎不全、自己免疫疾患、癌といった各種の疾患の発症、進展に関与することが示唆されている。中でも血液の供給が低下した虚血後の組織に血流を再開することによって、多量の活性酸素の生成が惹起され著しい組織傷害へと導かれることが明らかになり、本現象は虚血再灌流傷害として臨床の場で注目を集めている。



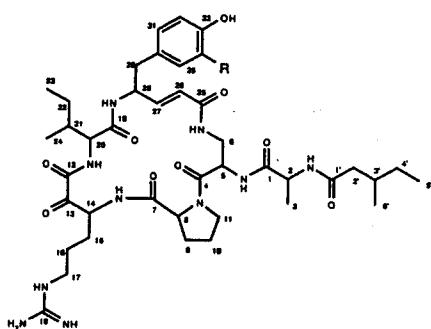
Formobactin (4)

そこでラット脳ホモジネートを材料とし、活性酸素の作用により生じる過酸化脂質の生成抑制を指標としたスクリーニング系を構築して、抗酸化作用を示すサンプルをスクリーニングした。その結果、放線菌 *Nocardia* sp. ND20 株が活性物質を生産していることを見出した。活性物質を単離し、formobactin(4)を得た。化合物 4 の平面構造は各種 2D-NMR、 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE 等の NMR 分光法を用いて決定した。

本物質の生物活性をラット脳ホモジネート系で評価した結果 IC_{50} 値 $0.65\ \mu\text{M}$ で過酸化脂質生成抑制活性を示した。この作用は反応系に Fe^{2+} を添加することで低下したこと、4 の類縁物質に鉄キレート作用が報告されていることから、過酸化脂質生成を引き起こす原因物質の一つである、 Fe^{2+} をキレートすることで作用を示すものと考えられた。

一方、近年脳虚血によって引き起こされる神経細胞壊死はグルタミン酸による興奮毒性によるものであると言われており、その細胞壊死が引き起こされるメカニズムにフリーラジカルが関与していることが明らかとなっている。そこで 4 の神経保護作用を検討した結果、グルタミン酸添加による細胞死を $0.017\ \mu\text{M}$ の EC_{50} 値で抑制することが明らかとなった。これらの結果から 4 は抗酸化活性に加えて神経保護作用を有することが明らかになった。

(3) 新規ヒトマスト細胞由来トリプターゼ阻害物質 cyclotheonamide E4 および E5
アトピー型気管支喘息、アレルギー性鼻炎、花粉症、アナフィラキシーといったアレルギー反応にマスト細胞の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。これまで開発されてきた抗アレルギー薬の多くは、マウスマスト細胞を用いて薬効評価を行っているため、アレルギー反応における重要な現象であるヒトマスト細胞の



R=H; cyclotheonamide E4 (5)

R=OH; cyclotheonamide E5 (6)

脱顆粒に対しては抑制効果が低く、ヒトマスト細胞をターゲットとする治療薬の開発が望まれていた。これまで困難であったヒトマスト細胞の培養技術が確立されたことに加え、当研究所において共同研究機関よりヒトマスト細胞の入手が可能であったことを利用してスクリーニング系を構築した。

今回著者らはマスト細胞内の顆粒中に含まれ、最近疾患との関連が注目されているトリプターゼに焦点を絞り、その阻害活性を有するサンプルを探索した。スクリーニングの結果、沖縄近海で採取された海綿 *Ircinia* sp. の抽出物に活性を見出した。

活性本体を単離・精製し、各種 2D-NMR 等により構造解析した結果、これまでに thrombin な

どのセリンプロテアーゼ阻害剤として報告されている cyclotheonamide 類の新規類縁化合物であることが判明し、それぞれ cyclotheonamide E4(5)および E5(6)と命名した。

化合物 5 および 6 はヒトマスト細胞由来トリプターゼをそれぞれ 5.1 , 84.7nM の IC_{50} 値で阻害した。さらに、5 はマスト細胞活性化の指標であるロイコトリエン産生に対しても抑制活性を示したことから、今後各種アレルギー疾患の治療薬としての新たなリード化合物となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 原 照 彦

副 査 教 授 田 原 哲 士

副 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 教 授 佐 野 嘉 拓

学 位 論 文 題 名

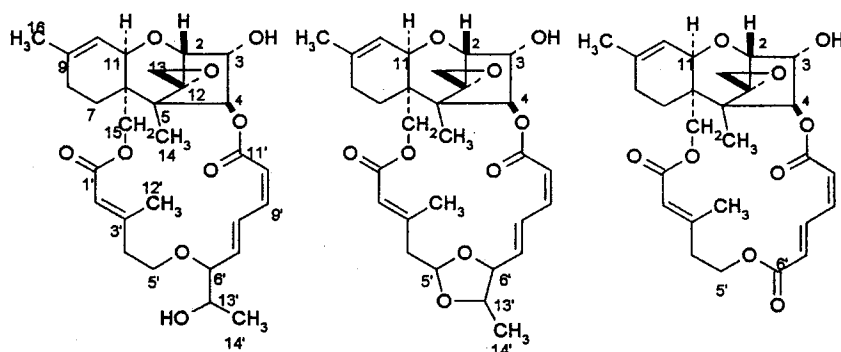
「天然物由来新規有用薬理活性物質に関する研究」

近年ヒトゲノム情報の解析が進み、分子レベルでの疾病の要因解明の速度はますます加速している。また種々の医薬品候補物質を探索するスピードも飛躍的に増加し、多種多様な医薬品候補物質がさまざまな生物試験を通してスクリーニングされている。

本研究では、日本人の死因の上位を占める、がん、脳・心疾患および近年その患者数が増大しているアレルギー領域における治療薬探索を目的としたアッセイ系を構築し、合成医薬品にないユニークな医薬品リード化合物の探索源として重要な位置を占める天然物サンプルからのスクリーニングを実施した。その結果、それぞれの領域で新規薬理活性物質を取得することができた。

(1) 新規抗腫瘍抗生物質 roridin L, M および verrucarin M

各種の腫瘍細胞に対する増殖抑制活性をパネル評価することで、特定の癌種に対して選択的に作用する物質を探索した。その結果、カビ *Myrothecium verrucaria* cm04 株が白血病細胞に対して選択的に作用する物質を生産していることを見出し、活性物質を単離した。活性物質である roridin L(1)、M(2) および verrucarin M(3)の平面構造は各種 2D-NMR 分光法を用いて決定した。



Roridin L (1)

Roridin M (2)

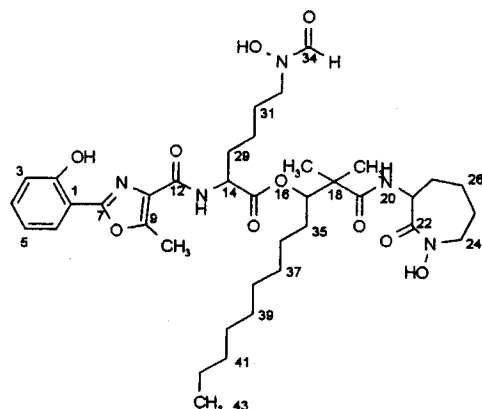
Verrucarin M (3)

これらは trichothecene 環部分の 3 位に水酸基を有するという点で、初めてのカテゴリーに属する化合物である。

化合物 1, 2 および 3 はそれぞれ 3.0, 8.7 および 9.0 nM という極めて低い濃度の IC₅₀ 値で白血病細胞 P388 に対して増殖抑制活性を示した。また 1 の各種固形癌細胞に対する増殖抑制作用を検討した結果、予想通り白血病細胞に対してより強い増殖抑制活性を示すことが明らかとなった。従って白血病に選択的に作用する新規抗腫瘍物質を得ることができたと考えられる。

(2) 新規抗酸化物質 formobactin

活性酸素による傷害が心臓や脳などの虚血性疾患、動脈硬化、糖尿病といった各種の疾患の発症、進展に関与することが示唆されている。



Formobactin (4)

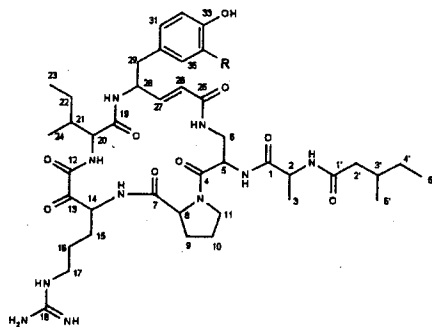
そこでラット脳ホモジネートを材料とし、活性酸素の作用により生じる過酸化脂質の生成抑制を指標としたスクリーニング系を構築して、抗酸化作用を示すサンプルをスクリーニングした。その結果、放線菌 *Nocardia* sp. ND20 株が活性物質を生産していることを見出した。活性物質を単離し、formobactin(4)を得た。化合物 4 の平面構造は各種 2D-NMR、 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE 等の NMR 分光法を用いて決定した。

本物質の生物活性をラット脳ホモジネート系で評価した結果 IC_{50} 値 $0.65\ \mu\text{M}$ で過酸化脂質生成抑制活性を示した。この作用は反応系に Fe^{2+} を添加することで低下したことから、 Fe^{2+} をキレートすることで作用を示すものと考えられた。

一方、近年脳虚血によって引き起こされる神経細胞壊死はグルタミン酸による興奮毒性によるものであると言われており、その細胞壊死が引き起こされるメカニズムにフリーラジカルが関与していることが明らかとなっている。そこで 4 の神経保護作用を検討した結果、グルタミン酸添加による細胞死を $0.017\ \mu\text{M}$ の EC_{50} 値で抑制することが明らかとなった。これらの結果から 4 は抗酸化活性に加えて神経保護作用を有することが明らかになった。

(3) 新規ヒトマスト細胞由来トリプターゼ阻害物質 cyclotheonamide E4 および E5

アトピー型気管支喘息、アレルギー性鼻炎といったアレルギー反応にマスト細胞の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。これまで開発されてきた抗アレルギー薬の多くは、マウスマスト細胞を用いて薬効評価を行っているため、アレルギー反応における重要な現象であるヒトマスト細胞の脱顆粒に対しては抑制効果が低く、ヒトマスト細胞をターゲットとする治療薬の開発が望まれていた。



R=H; cyclotheonamide E4 (5)
R=OH; cyclotheonamide E5 (6)

今回マスト細胞内の顆粒中に含まれ、最近疾患との関連が注目されているトリプターゼに焦点を絞り、その阻害活性を有するサンプルを探索した。その結果、沖縄近海で採取された海綿 *Ircinia* sp. の抽出物に活性を見出した。

活性本体を単離・精製し、各種 2D-NMR 等により構造解析した結果、これまでに thrombin などのセリンプロテアーゼ阻害剤として報告されている cyclotheonamide 類の新規類縁化合物であることが判明し、それぞれ cyclotheonamide E4(5)および E5(6)と命名した。

化合物 5 および 6 はヒトマスト細胞由来トリプターゼをそれぞれ 5.1 , 84.7nM の IC_{50} 値で阻害した。さらに、5 はマスト細胞活性化の指標であるロイコトリエン産生に対しても抑制活性を示したことから、今後各種アレルギー疾患の治療薬としての新たなリード化合物となることが期待される。

以上のように本論文は天然物由来新規有用薬理物質について多くの新知見を得ており、学術的並びに実用的に高く評価される。よって、審査員一同は村上泰展が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。