

大学通信
Vol.103

城西大学薬学部生薬学研究室（その2）



城西大学薬学部薬科学科
教授 白 瀧 義 明

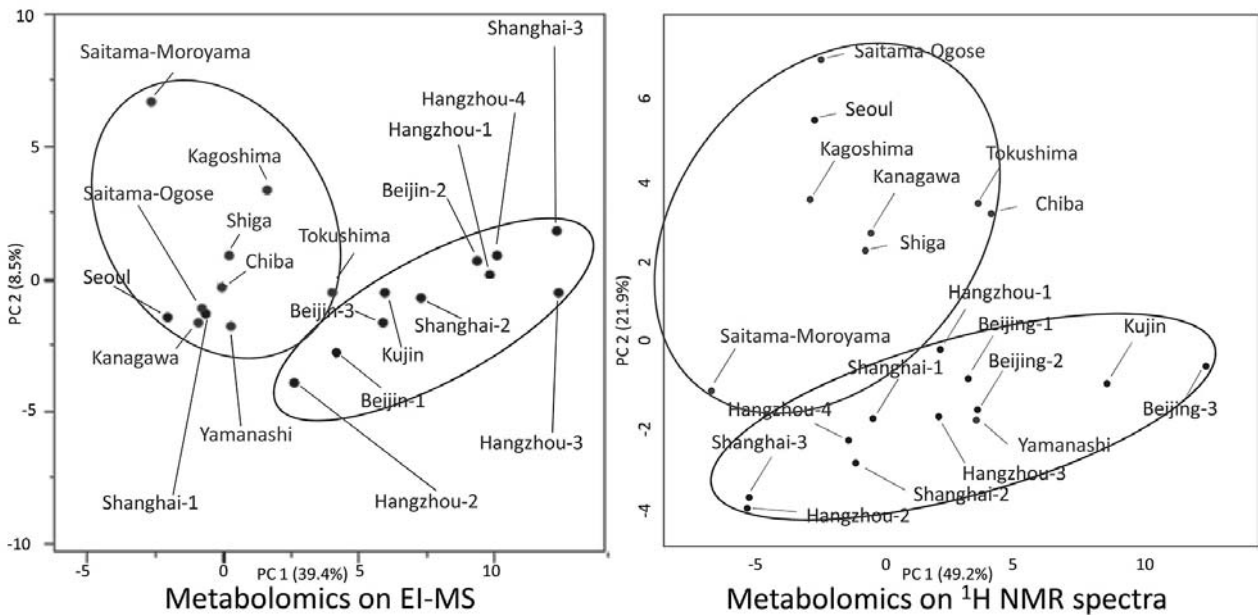
〈前号からのつづき〉

次に、¹H-NMR スペクトルを用いたメタボロミクスでは、日本産クララと中国産クララをメタノール抽出し、そのジエチルエーテル可溶部の¹H-NMR スペクトルをPCAしたところ、これらは産地別にクラス分けすることが出来たことから、日本産と中国産は成分に違いがあることが明らかとなり、さらに loading plot 解析から、クラス分けに寄与しているのは0.95ppm 付近のシグナルであり、これは日本産クララに特異的に含まれているプレニルフラボノイドの1,2に存在するlavandulyl 基の methyl 基由来のシグナルであることが判明しました。このことから、NMR メタボローム解析によって日本産クララと中国産クララとの識別が可能であることが示されました。MSによるメタボロミクスでも同様の結果が得られ、最近では、基原植物の同定を行うため日本各地や中国産のクララをはじめ、*Sophora alopecuroides*, *Sophora davidii*=*S. viciifolia* などの栽培も行い、¹H-NMR スペクトルやMS等の分析機器を使ったメタボミクスによる新たな研究を展開しています。（図7）その他、新薬用植物園では800種を超える種々の薬用植物を栽培し、今後、更なる研究を行う予定であります。また、本園では絶滅危惧植物であり、埼玉県では坂戸市入西（白花）と秩父（淡紫色花）の2ヶ所しか確認されていないという埼玉県指定の天然記念物でもあるステゴビル（ユリ科）の保存栽培も行っています。

最近ではフラボノイドやスチルベン化合物などの芳香族化合物の構造決定についての知見を活かし、水分や養分を豊富に蓄えているというラン科

植物 *Odontioda Marie Noel* ‘Velano’や *Odontoglossum Harvengtense* ‘Tutu’のバルブ（Bulb：偽球茎）の成分研究を行い、数多くのスチルベン化合物やフェナンスレン化合物を単離し、明海大学の坂上宏教授らと共に破骨細胞分化抑制活性、ヒト口腔扁平上皮癌細胞（HSC-2、HSC-3、HSC-4）、ヒト前骨髄性白血病細胞（HL-60）等を使い、抗腫瘍活性を検討しています。生薬学研究室で行っているフラボノイド化合物とは黄色を示すフラボノール、フラボンや赤色を示すアントシアニンなどのC6-C3-C6の環状構造を有する化合物の総称で、生理活性としては抗酸化性や抗変異原性を示すこと、発がんプロモーション抑制作用、がん細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導と正常細胞への分化誘導作用、サイトカイン産生の促進と抑制による免疫調整作用、リポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼなどの酵素の阻害作用、コレステロール降下作用、血圧降下作用、紫外線防護作用など、多くの生理活性が認められています。当研究室で行っているイソフラボンおよびイソフラボン誘導体の細胞傷害性・腫瘍選択活性については、*Sophora* 属植物由来の11種類については、*S. secundiflora*（米国テキサス）より単離した *secundiflorol A*（図8）が最大の腫瘍選択活性を示したことから2つのイソプレニル基（A、B環に1つずつ結合）またはB環のC-5'位にイソプレニル基をもつ化合物が比較的高い細胞傷害活性を示すことが判明しました。また、スチルベン化合物については、ブドウの果皮やワインに含まれている *resveratrol* がよく知られ、スチルベン化合物の生理活性としては、抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗炎症作用、アンチエイジング

Metabolomics of SOPHORAE RADIX



EIMSおよび¹H NMRスペクトルをPCAに供した結果、中国産と日本産クララは別々にカテゴリー化され、それらの成分が異なることが明らかとなった

統計処理の結果、日本産クララにはKurarinolとKushenol Hが特異的に含まれていた

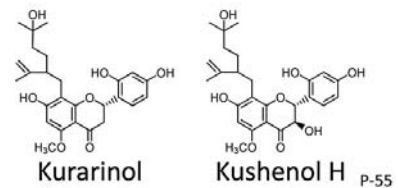


図7. クララ (苦参) のメタボロミックス

などが報告されています。我々のグループは、スチルベン重合体として3量体である sophorastibene A、(+)- α -viniferin および2量体である(-)- ϵ -viniferin についての細胞傷害性・腫瘍選択活性について報告し、スチルベン化合物の腫瘍選択活性については、重合により強くなる傾向が見られました。アポトーシス誘導活性については、水酸基の結合部位の異なるスチルベン8種類を比較し、スチルベン構造の3位、4位の隣接する水酸基が存在することにより活性が強まることが判明しました。

次に、ラン科植物 *Odontioda* Marie Noel 'Velano'バルブの細胞傷害性・腫瘍選択活性、NO 産生抑制活性、紫外線 (UV) 保護活性については乾燥バルブをメタノール抽出し、得られたメタノール抽出物を、さらに、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出し、水層を含めた各画分を得 (図9) た。これら各画分について細

胞傷害性・腫瘍選択性、NO 産生抑制活性、UV 保護活性を検討し、最も高い腫瘍選択性を示した酢酸エチル画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画して得た粗画分 fr. 1~fr. 5について細胞傷害性・腫瘍選択性評価および細胞傷害メカニズム解析を行い、強い細胞傷害作用が認められた fr. 1について細胞傷害メカニズム解析を行ったところ、DNA 断片化、caspase-3 活性、cPARP の検出が認められなかったことから、fr. 1の細胞傷害メカニズムはアポトーシスによるものではないことが示唆されました。(表1)

強い細胞傷害作用が認められた fr. 1について活性成分を解明することを目的として、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム:メタノール(100:1→1:1)]により分離精製を行い、compound1,2をそれぞれ、単離し、単離した2種の化合物はUV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2次元NMR, MS等による各種スペクトルにより構造解析を行



写真7 *Sophora alopecuroides*



写真8 *Sophora davidii* = *S. viciifolia*



写真9 *Sophora davidii* と私



写真10 *Odontioda Marie Noel* 'Velano'



写真11 *Odontioda Marie Noel* 'Velano' のバルブ



写真12 *Odontoglossum Harvengtense* 'Tutu'

ったところ、いずれもフェナンスレン誘導体の 5-hydroxy-2,3-dimethoxy-1,4-phenanthrenequinone (1) (新規化合物)、および 5-hydroxy-2-methoxy-9,10-dihydro-1,4-phenanthrenequinone (ephemeranthoquinone B(2)) であることが判明しました (図10)。

そこで、さらに compound 1 および 2 の細胞傷害性・腫瘍選択性評価を行ったところ、いずれも、

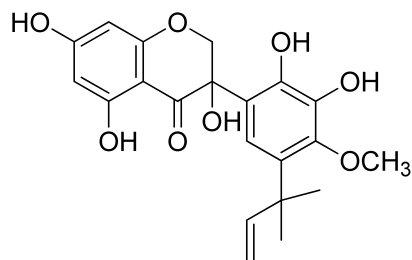
ヒト口腔内腫瘍細胞、前骨髄性白血病細胞に対し、細胞傷害作用を示し、さらに腫瘍選択性の評価では、compound 2 (TS=2.0) と比較し、compound 1 (TS=2.3) で高い活性が見られました (表2)。

フラボノイドとスチルベンを用いて細胞傷害性・腫瘍選択性を評価した報告では、HL-60 細胞において IC₅₀ 値 (Inhibitory concentration) はフラボノイドで 5-31 μM、スチルベンで 6-810



写真13 *Odontoglossum Harvengtense* 'Tutu'のバルブ

μMを示した。また、compound 1 および 2 と同じフェナンスレン骨格を持つ化合物を用いた細胞傷害作用評価の報告では、HL-60 細胞に対して、17–55.8 μM で活性を示すことが報告されています。本実験では HL-60 細胞の細胞傷害作用は compound 1 で $CC_{50}=4.7 \mu M$ 、compound 2 で $CC_{50} < 3.0 \mu M$ であったことから、今回単離した化合物は、フラボノイドやスチルベン、これまで報告されているフェナンスレン類と比較し、同じか、やや高い細胞傷害作用を示すことが明らかとなりました。今回、紹介致しましたこれらの研究は、本学薬学部創設以来、1 期生からの多くの卒業生の協力のもとに行われたものです。この場をお借りし、厚くお礼申し上げます。と同時に、近年、多くの薬系大学では、薬剤師養成が主目的となり、



secundiflorol A

図8. secundiflorol A の構造式

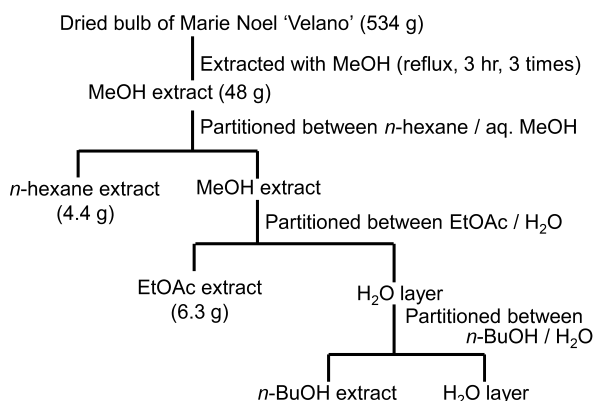


図9. *O. Marie Noel 'Velano'*の有機溶媒による抽出図

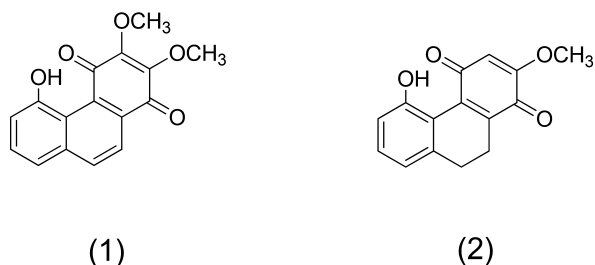


図10. Compound 1, 2の構造式

	CC ₅₀ (μg/ml)							
	Tumor cell lines				Normal cell lines			
	HSC-2	HSC-3	HSC-4	HL-60	HGF	HPC	HPLF	TS
fr.1	21.1 ± 2.4	23.1 ± 0.7	17.6 ± 4.7	9.5 ± 0.7	28.7 ± 10.8	36.8 ± 7.5	49.3 ± 1.0	2.2
fr.2	65.4 ± 18.2	92.3 ± 18	48.1 ± 10.1	11.8 ± 1.5	178.3 ± 50.6	208.1 ± 13.5	216.4 ± 12.3	3.7
fr.3	159.8 ± 15.9	149 ± 18	72.9 ± 4.0	13.4 ± 5.1	242.8 ± 4.2	227.8 ± 12.8	>250	>2.4
fr.4	161.3 ± 15.7	172.7 ± 29.5	82.8 ± 3.3	21.0 ± 2.8	240.7 ± 6.3	248.1 ± 1.1	>250	>2.3
fr.5	236 ± 14.6	>250	196.8 ± 16.0	66.9 ± 15.0	>250	>250	>250	>1.3

Cells were incubated for 48 hours with various concentrations of test samples.

CC₅₀, 50 % cytotoxic concentration. TS, tumor-specificity. Mean ± S.D. of three independent experiments.

表1. *O. Marie Noel 'Velano'*抽出物のヒト培養癌細胞に対する細胞傷害性・腫瘍選択性評価

	CC ₅₀ (μM)							
	Tumor cell lines				Normal cell lines			
	HSC-2	HSC-3	HSC-4	HL-60	HGF	HPC	HPLF	TS
1	31.9 ± 1.1	25.8 ± 5.2	34.8 ± 3.7	4.7 ± 0.5	36.3 ± 1.9	72.5 ± 1.9	59.4 ± 11.3	2.3
2	15.4 ± 2.3	23.1 ± 1.3	26.2 ± 1.2	3.0 ± 1.0	23.0 ± 1.4	38.3 ± 0.5	39.6 ± 1.1	2.0
	CC ₅₀ (μg/ml)							
MeOH extract	>246 ± 7	>221 ± 32	188 ± 9	106 ± 29	>243 ± 13	>239 ± 13	>243 ± 12	1.3
EtOAc fraction	106 ± 39	95.1 ± 39.9	45.1 ± 8.9	35.0 ± 20.8	142 ± 84	133 ± 80	166 ± 59	2.1
1	9.1 ± 0.3	7.3 ± 1.5	9.9 ± 1.1	1.3 ± 0.1	10.3 ± 0.5	21.1 ± 0.5	16.9 ± 3.2	2.3
2	4.0 ± 0.6	6.0 ± 0.3	6.8 ± 0.3	0.8 ± 0	5.9 ± 0.4	9.9 ± 0.1	10.2 ± 0.3	2.0

CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; TS, tumor specificity; HGF : human gingival fibroblast; HPC : human pulp cells; HPLF : human periodontal ligament fibroblast

表2. Compound1, 2の細胞傷害性・腫瘍選択性評価

とかく実験が軽視されがちですが、薬用植物からの新薬開発は薬学の原点と思っています。山歩きをしながら薬草に親しむのはとても楽しいことです。薬剤師の皆様だけでなく、若い薬学生の諸君にも是非、この素晴らしさを知って欲しいものです。