

氏名	ぐえん こっく ちゃう たん NGUYEN QUOC CHAU THANH
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第972号
学位授与の日付	令和2年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学位論文題目	Isolation and evaluation of anti-inflammatory constituents from lichen <i>Dirinaria applanata</i> and <i>Lasia spinosa</i> leaves (<i>Dirinaria applanata</i> 葉および <i>Lasia spinosa</i> 葉に含まれる 抗炎症物質の単離と評価)
審査委員	(主査)教授 金折賢二 教授 亀井加恵子 教授 堀内淳一

論文内容の要旨

本申請論文は、第1章「概要」、第2章「地衣類 *Dirinaria applanata* からの新規ホパン酸とデプシドの単離同定」、第3章「リポ多糖により誘発される RAW 264.7 マクロファージにおける *Lasia spinosa* 葉抽出物の抗炎症効果」、第4章「結論」からなっている。

第1章の冒頭では、医薬品開発における伝統的な医薬品と天然物の役割について、ヨモギの植物から単離され、抗マラリア治療薬へとつながったアルテミシニンの発見や、イチイの樹皮から単離され、現在では抗がん剤として用いられているタキソールについて紹介している。ハーブなどの抽出物と、その単離生成物が、人間の疾患、特に致命的な疾患を治療するための薬物の発見において重要であることが記述され、本申請論文の意義について述べられている。それに続き、天然物の有効成分の薬理効果の検証に用いられる抗酸化活性や抗炎症活性について、分子生物学的な観点から説明している。炎症における、活性酸素 (ROS)、一酸化窒素 (NO)、一酸化窒素合成酵素 (NOS) などの酵素、マクロファージの役割について述べ、マクロファージを最も活性化する因子であるリポ多糖 (LPS) について述べている。LPS 刺激の影響を受けやすく、抗炎症薬をスクリーニングするための優れたモデルでサイトカインの産生に関与する経路の阻害剤を評価できる RAW マクロファージ細胞 264.7 について紹介している。さらに、本申請論文の実験内容を理解する上で必須となるシグナル伝達経路の様々な転写調節因子が過不足なく網羅されている。RAW264.7 細胞系の応答を評価する指標となる NOS や核因子 κ B (NF- κ B)、NF- κ B の活性化に深く関係している転写調節因子であるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) などの作用について明解に記述されている。

第2章では、熱帯地域に広く分布する葉状地衣類である *Dirinaria applanata* (*D. applanata*) から2つのホパン誘導体とポリフェノールの一種であるデプシドを単離して構造同定し、それらについて RAW 264.7 細胞における抗炎症活性を確認した結果について報告した。以前から *D. applanata* からはアントラノリン、ジバリカチン酸とそのエステル誘導体、ヘマトメート酸メチル、 β -オルシノールカルボン酸メチル、ラマリン酸、リケンキサントン、タンニン、テルペンなど

が含まれていることがわかっていたが、二次元NMRと質量分析法を用いてホパン誘導体を構造同定し、2つのホパン誘導体うちの1つは新規化合物であることを決定した。これらの化合物のRAW 264.7細胞増殖に対する細胞毒性を評価し、これらの化合物は10 µg / mLまで細胞毒性を示さなかった。NO生成による抗炎症効果を調べ、ホパン誘導体化合物の1つがNOの生成を有意に減少させることを見出し、*D. applanata*の薬理効果について重要な知見を加えた。

第3章では、サトイモ科の*Lasia spinosa* (LS)の抽出物が示す抗炎症活性についての分子生物学的な研究を報告した。LSは多くの炎症性疾患の症状を緩和する作用によって伝統的なベトナム医薬として使用されており、アルカロイド、ポリフェノール、フラボノイドが含まれている。最近の研究では、LS葉抽出物がマウスの旋毛虫感染に対してかなりのレベルの有効性を持っていることが示されており、LSがもつ抗酸化性、抗菌性、抗高血糖性、および抗がん性などが注目を集めている。本論文では、LS葉からのエタノール抽出物が抗酸化活性をもつことを明らかにしたのち、その抽出物がLPSによって刺激されたRAW 264.7細胞に対して示す抗炎症特性を詳細に研究した。

LS葉抽出物 (< 400 µg / mL) は細胞毒性を示さず、LPS誘発毒性からRAW 264.7細胞を保護することが示された。50–400 µg / mLの濃度範囲でLS葉抽出物は、LPS刺激RAW 264.7細胞におけるNO、ROSの産生を抑制し、炎症時に免疫系に重要な役割を果たす炎症性サイトカインであるTNF-αの発現も抑制することが酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって明らかになった。LS葉抽出物はRAW 264.7における炎症性メディエーターの産生を抑制することが示された。そこで、定量的逆転写PCRを使用してLS葉抽出物が炎症性メディエーターの転写を抑制するかどうかを調べた。LS葉抽出物は、誘導型NOS、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、およびTNF-α、IL-1β、IL-6などのサイトカインをメッセンジャーRNA(mRNA)レベルで強く抑制することを見いだした。逆に、NF-E2関連因子2(Nrf2)およびヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)のmRNAレベルは、LS葉抽出物(100–400 µg / mL)で前処理することにより大幅に増加し、ウエスタンブロッティングと免疫染色により、LS葉抽出物がNrf2の核への移行を進めることを確認した。

また、NF-κBシグナル伝達経路の上流にある、MAPKなどのシグナル伝達経路はRAW 264.7細胞におけるLPS誘発炎症反応に重要な役割を果たすことが知られているため、ウエスタンブロットをおこない、LS葉抽出物がMAPKなどのリン酸化を効果的に低減することを明らかにした。このことから、NF-κBのシグナル伝達経路の上流を非活性化することにより、炎症反応を抑制するメカニズムが明らかになった。

第4章では、これらの結果を総合し、*D. applanata*での天然物からの単離精製法をポリフェノール成分が豊富なLS葉抽出物に適用することで、NF-κBシグナル伝達経路をブロックし、Nrf2/HO-1経路を促進する作用機序をもつ抗炎症剤の開発の可能性について述べた。

論文審査の結果の要旨

天然物や伝統的な医薬品は、治療薬や新薬のリード化合物の発見において重要な役割を果たしている。地衣類である*Dirinaria applanata*や、サトイモ科スピノサ(*Lasia spinosa*)の葉は、何世紀にもわたって多くの疾患を治療するための伝統的な薬として使用されてきたが、化学成分

と炎症反応への影響については明らかにされていない。申請者は、これらから抗酸化活性を示す有効成分を単離して構造決定し、抽出物のリポ多糖 (LPS) による RAW 264.7 マクロファージにおける抗炎症作用を明らかにした。

Dirinaria applanata のメタノール抽出物から、2 つのホパン誘導体と 2-*O*-メチルノルジバリカチン酸を単離同定した。ホパン誘導体のうちの 1 種類はこの地衣類種から初めて分離された化合物であった。LPS 誘起の炎症において、一酸化窒素の生成を減少させることにより抗炎症効果を確認した。

スピノサの葉のエタノール抽出物は、ポリフェノール化合物を多く含んでいて抗酸化活性を示し、抗炎症作用の有効成分を含む可能性が高いことが示唆された。そこで、この葉から抽出物による処理を多面的に研究した。スピノサ葉の抽出物は、一酸化窒素や活性酸素種などの炎症性メディエーターの産生と、LPS 刺激 RAW264.7 細胞における炎症誘発性サイトカインの発現を大幅に抑制した。さらに、葉抽出物で前処理することで、核因子 κ B (NF- κ B) の阻害剤である I κ B α の分解が阻害され、NF- κ B 経路の活性化を抑制することが明らかとなった。分裂促進因子活性化キナーゼと、ホスホイノシチド-3-キナーゼ/プロテインキナーゼ B (PI3K/Akt) 経路も、葉抽出物処理により抑制された。抽出物は、炎症性因子を抑制することに加えて、活性化核因子赤血球 2 関連因子 2/ヘムオキシゲナーゼ-1 (Nrf2/HO-1) の転写経路も促進し、抗酸化活性増進に寄与することが示唆された。得られた結果は、抗炎症成分の可能性を評価する上で重要な発見であり、炎症性疾患を克服するための新しい薬理戦略を発展させる方法論を提案した。

本論文の内容は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記論文 2 編を基礎としている。

1. Thanh Q. C. Nguyen, Tran Duy Binh, Tuan L. A. Pham, Yen D. H. Nguyen, Dai Thi Xuan Trang, Trong Tuan Nguyen, Kenji Kanaori and Kaeko Kamei, Anti-Inflammatory Effects of *Lasia spinosa* Leaf Extract in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–18. DOI: 10.3390/ijms21103439
2. Nguyen Trong Tuan, Mai Van Hieu, Nguyen Quoc Chau Thanh, Huynh Van Loi, Lai Huu Nghia, Tran Thi Tuyet Hoa, and Kenji Kanaori, Novel Hopanoic Acid and Depside from the Lichen *Dirinaria applanata*. *Rec. Nat. Prod.* **2020**, *14*, 248–255.
DOI: 10.25135/rnp.161.19.10.1441

参考論文 (関連論文)

1. Trong Tuan Nguyen, Thanh Nguyen Quoc Chau, Hieu Mai Van, Toan Phan Quoc, Qui Do Phuoc, The Duy Nguyen, Phuc Dam Nguyen, Tram Nguyen Thi Thu, Tien Dung Le, Trang Dai Thi Xuan, Kamei Kaeko, Kanaori Kenji, A new hopane derivative from the lichen *Dirinaria applanata*. *Nat. Prod. Res.* **2019**, 1–5. DOI: 10.1080/14786419.2019.1644511