

Title	Search for New Antiviral Principles with Novel Mechanism of Actions from Medicinal Plants
Author(s)	楊, 光明
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49181">https://hdl.handle.net/11094/49181</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	楊 光 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 9 5 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	Search for New Antiviral Principles with Novel Mechanism of Actions from Medicinal Plants (新規作用メカニズムに基づいた薬用植物由来抗ウイルス活性物質の探索)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 上 啓 寿  (副査) 教 授 田 中 徹 明 教 授 今 西 武 教 授 小 林 資 正

### 論 文 内 容 の 要 旨

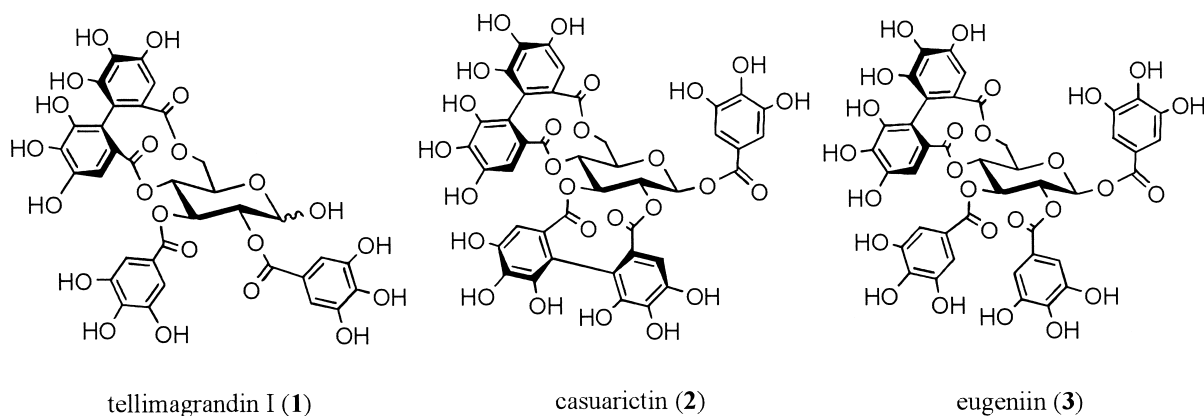
年々増加する癌による死亡率のうち、第3位に挙げられる肝癌の多くはウイルス性肝炎を原因に発生しており、そのうちC型肝炎が70～80%と最多で、次いでB型肝炎が10～20%を占めている。C型肝炎はhepatitis C virus (HCV) が血液を介して感染する疾病で、感染後に高率で慢性化し、肝炎から肝硬変、肝癌へと非常に高い確率で症状が進行する最も重要な疾病の一つとなっている。過去に非加熱製剤などの使用により本人の知らぬところで感染しているケースも多く、今まさに社会的問題となっている疾病でもある。1989年にHCVの核酸断片がクローニングされて以来、簡便なウイルス同定手法が開発され、新たなC型肝炎患者の発生は激減したが、今なお世界におよそ1億7000万人、国内でも100～300万人ものHCV感染者が存在するとされている。現時点でのワクチン開発は達成されておらず、主な治療薬となっているインターフェロン製剤も、肝機能が持続的に正常化する著効例は3割程度と低いため、新規治療薬の開発が切望されている。しかしながら、*in vitro*におけるHCV培養法が完全には確立されていないこと、およびHCVが感染性を示す動物モデルが現在までにチンパンジー以外に見出されていないことから、抗HCV薬の開発研究は極めて難航しており、HCV由来プロテアーゼやポリメラーゼ等の酵素阻害剤の探索がそのほとんどを占めていた。最近になり大阪大学微生物病研究所の松浦教授らの研究グループから、HCVのエンベロープ蛋白E1およびE2がHCVの感染侵入過程において必須であることを示すとともに、E1、E2と蛍光蛋白GFPを発現させた水泡性口内炎ウイルス(VSV)が、ヒト肝癌細胞HepG2に感染性を示すHCVモデルウイルスとなることが報告された。これまでE1E2を介したHCVの感染侵入過程を標的とした抗HCVリード化合物は報告されていないことから、著者は、HCVエンベロープ蛋白E1E2を発現させたモデルウイルスを用いたHCV侵入過程を標的とした抗HCVリード化合物の探索に着手した。

松浦教授らとの共同研究により、まず、レポーター遺伝子として分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)を組み込み、エンベロープ蛋白としてE1、E2を発現させたHCVモデルウイルスを調製した。次に、宿主細胞としたヒト肝ガン細胞HepG2にサンプルを添加して培養後、調製したモデルウイルスを添加してさらに培養し、感染成立によって培養上清に分泌されるSEAPの活性を測定し、サンプル非添加の場合と比較することで感染阻害率を評価した。

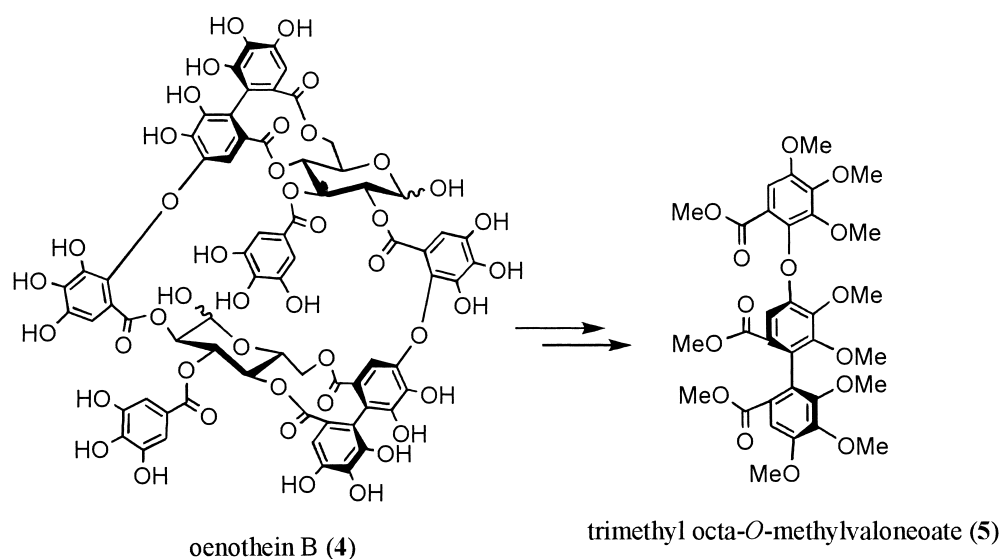
本アッセイ系を用いておよそ320種の薬用植物メタノールエキスに対してスクリーニングを行い、顕著なウイルス

侵入過程阻害活性が認められた薬用植物として“マイカイカ”、“ツクミソウ”および生薬“マオウ”を見出した。さらに、これら薬用植物抽出エキスより活性試験の結果を指標に分画精製を進めた。

まず“マイカイカ”より、活性成分として加水分解型タンニン tellimagrandin I (1)、casuarictin (2)、eugenin (3) を同定した。また、これら活性化合物の CD スペクトルを測定することで分子内に存在する hexahydroxydiphenyl (HHDP) 基の立体配置が *S* 配置であることを明らかにするとともに、HHDP 基を含まない合成アナログの活性が減弱していたことから HHDP 基が活性発現に重要であることを明らかにした。



次に、薬用植物“ツクミソウ”からは、環状の2量体加水分解型タンニン oenothin B (4) を活性化合物として同定した。本活性化合物に含まれる2つの valoneoyl 基の絶対立体配置については、分解反応によって得られる trimethyl octa-*O*-methylvaloneoate (5) の CD スペクトルよりいずれも *S* 配置であることを明らかにした。



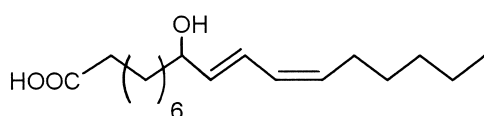
さらに、生薬“マオウ”からは、活性物質としてプロアントシアニジン (6) を見出した。また、プロアントシアニジンの単量体ユニットであるエピカテキンおよび2量体である proanthocyanidin B2 はほとんど活性が認められなかったことから、オリゴマーであることが活性発現に重要であることを明らかにした。

一方、HCV と同様にウイルス感染症として対策が急務である疾病にエイズが挙げられる。エイズは主に HIV-1 によって引き起こされ、今や世界中がその脅威に曝されている。現在のエイズ化学療法において、薬剤耐性ウイルスの出現が大きな問題となっており、新規作用機序に基づく抗 HIV 剤の開発が求められている。

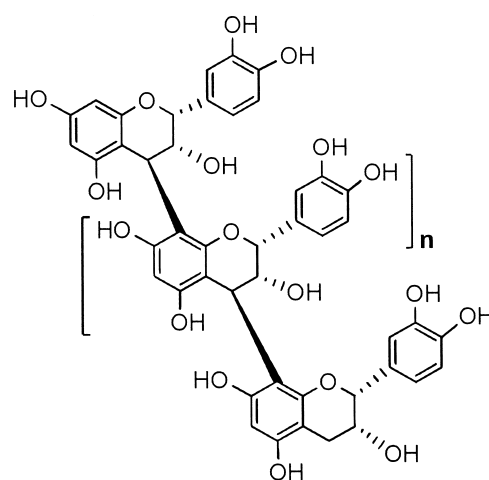
HIV の感染初期に発現する Rev 蛋白は、ウィルス mRNA と結合するとともに、分子内に存在する核外移行シグナル (NES : nuclear export signal) によって輸送担体 CRM1 とも結合することで複合体を形成し、mRNA を核外へ

と移行させる作用を有している。この Rev 蛋白の核外移行は HIV の増殖に必須のプロセスであることから、Rev 蛋白の核外移行阻害物質は新規作用機序を有する抗 HIV リードとして非常に有用であると考えられる。そこで、Rev 蛋白が機能することで HIV 由来 mRNA が細胞質へと移行した結果生じる Gag 蛋白を定量するアッセイを用いることで、Rev 蛋白核外移行阻害物質の探索に着手した。

薬用植物抽出エキスに対してスクリーニングを行った結果、強力な阻害活性を示した南米産薬用植物 *Sida cordifolia* のメタノール抽出エキスから分画を進め、最終的に活性本体として (10*E*,12*Z*)-9-hydroxyoctadeca-10,12-dienoic acid (7) を見出した。さらに、本活性化合物のアナログを合成し、その活性を比較することで、共役ジエン構造および水酸基とカルボキシル基間のアルキル鎖長が活性発現に重要であることを明らかにした。



(10*E*,12*Z*)-9-hydroxyoctadeca-10,12-dienoic acid (7)



proanthocyanidin (6)

#### 論文審査の結果の要旨

申請者は、薬用植物由来の新規作用機序を有する抗ウイルス活性天然物の探索に着手し、以下の研究成果を得た。

1. ウイルス表面に HCV エンベロープ蛋白 E1E2 を発現し、レポーター遺伝子として SEAP を組み込んだ HCV モデルウイルスを用いて、HCV 侵入過程阻害活性を評価するアッセイ法を確立した。
2. 上記アッセイ法を用いて、薬用植物“マイカイカ”より HCV 侵入過程阻害物質として加水分解型タンニンである tellimagrandin I を見出した。
3. Tellimagrandin I の類縁体について活性を比較することで、glucose 4、6 位に結合した HHDP が活性発現に重要であることが示唆された。
4. 生薬“ツキミソウ”より HCV 侵入過程阻害物質として oenothein B を見出した。
5. 生薬“マオウ”より HCV 侵入過程阻害物質として、プロアントシアニジンを見出した。
6. 南米産薬用植物 *Sida cordifolia* より、Rev 蛋白核外移行阻害活性物質として (10*E*,12*Z*)-9-hydroxyoctadeca-10,12-dienoic acid を見出し、本活性本体が R 体 : S 体 = 40 : 60 の混合物あることおよび光学異性体間で活性にほとんど差がないことを明らかにした。

本研究成果は、薬用植物から新規作用機序を有する抗ウイルス活性天然物を明らかにしただけでなく、今後、本化合物をシーズとした様々な研究成果が得られることが期待される。したがって、本論文は薬学博士を授与するに相応しい内容であると結論した。