

Title	抗アレルギー作用を指向した薬用植物由来のIgEレセプター発現抑制物質に関する研究
Author(s)	義平, 邦周
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49185
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	よし 義 平 邦 周
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21620 号
学位授与年月日	平成 19 年 11 月 5 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	抗アレルギー作用を指向した薬用植物由来の IgE レセプター発現抑制物質に関する研究
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

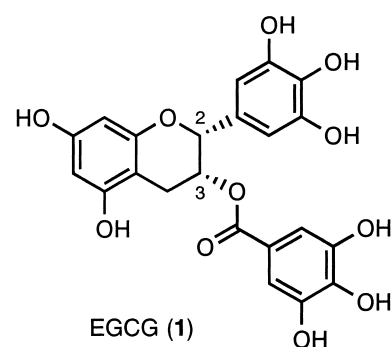
論文内容の要旨

花粉症やアトピー性皮膚炎に代表される I 型アレルギー反応において、アレルギー症状の直接的な原因となるマスト細胞の脱顆粒は、マスト細胞上に発現している IgE レセプター ($Fc\epsilon RI$) への IgE の結合が引き金となっていることから、マスト細胞上の $Fc\epsilon RI$ の発現はアレルギー反応に必須のプロセスと考えられ、 $Fc\epsilon RI$ の発現を制御する化合物はアレルギー反応を抑制できると考えられる。さらに、近年、 $Fc\epsilon RI$ を欠損させたノックアウトマウスは正常に存在するが急性アレルギー反応を起こさないことが報告されたことから、生物の生存上、 $Fc\epsilon RI$ の発現は必ずしも必要ではない可能性が高く、副作用の少ない新たな抗アレルギー薬の標的になる可能性が示唆された。しかしながら、これまでヒトマスト細胞上の $Fc\epsilon RI$ 発現に着目した抗アレルギーリード化合物の探索は行われていなかった。このような背景のもと、著者は、抗アレルギー作用を指向した薬用植物由来 $Fc\epsilon RI$ 発現抑制物質の探索研究に着手した。

まず、 $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性を評価するアッセイ系を確立した。細胞表面上に $Fc\epsilon RI$ を発現する細胞としてヒトマスト細胞株 HMC-1 を使用することとし、市販されているヒト $Fc\epsilon RI$ に対する抗体を 1 次抗体として用いた後、蛍光ラベル化された 2 次抗体を作用させることにより、細胞表面上に発現している $Fc\epsilon RI$ 量をフローサイトメトリーで検出できることを確認した。さらに、培養時間、被検薬物を溶解させる溶媒の検討を行い、被検薬物を DMF 溶液（最終濃度 0.2%）として添加し 3 日間培養後に $Fc\epsilon RI$ 発現量を測定し、薬物非添加条件と比較することで $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性を評価する方法を確立した。

本アッセイ系を用いて種々の薬用植物の抽出エキスについてスクリーニングを行い、茶 (*Theae Folium*) の 80%アセトン抽出エキスより活性本体として 3 種のカテキン、(-)-epigallocatechin gallate (1, EGCG)、(-)-epicatechin gallate (ECC)、(-)-epigallocatechin (EGC) を見出し、これら 3 種のうち 1 に最も強い $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性 (40%、100 μM) を見出した。

また、構造活性相関の検討を目的として、種々カテキン類の $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性を評価したところ、2*R*、3*R* の立体配置が $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性

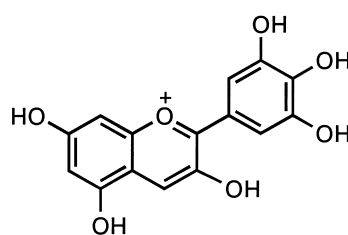


に優位であり、3位水酸基上のガロイルエステルおよびB環部のピロガロール構造が活性発現に重要であることが示唆された。さらに、各種 *O*-メチル化 EGCG の活性を検討したところ、**1** のピロガロール構造を構成している全ての水酸基が $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制活性に重要であることが示された。

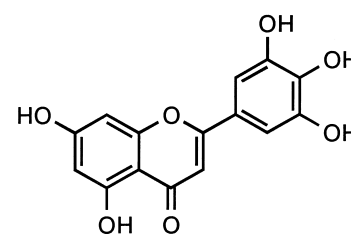
ポリフェノールの1種であるカテキン類に $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制活性が見出されたことから、他のポリフェノール類(アントシアニン類、フラボン類)について

でも $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制活性を評価した。

その結果、B環部ピロガロール構造を有するアントシアニン delphinidin およびフラボ tricetinidin のみに $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制活性が認められたことから、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制活性にはB環部のピロガロール構造が重要であることが示された。

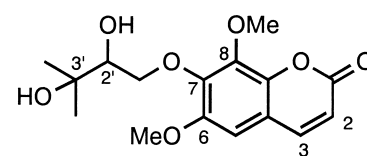


delphinidin



tricetinidin

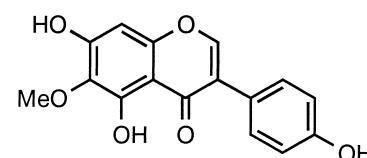
また、著者は南米産薬用植物からも活性物質の探索を行った。約 300 種の南米産薬用植物の MeOH 抽出エキスについてスクリーニングを行い、強力な活性が認められた *Verbascum thapsus* L. より活性本体として 2',3'-dihydroxypuberulin (**2**) を単離した。見出した **2** は、キラルカラムによる HPLC 分析により 2'*R* 体 : 2'*S* 体 = 1 : 1 のラセミ混合物であることが判明し、また、両エナンチオマーの活性はラセミ混合物とほぼ同等であることを明らかにした。



2',3'-dihydroxypuberulin (**2**)

さらに、**2** の 6-*O* および 8-*O*-メチル基ならびに側鎖水酸基の活性発現に対する寄与を明らかにする目的で 6-*O*-demethyl 体 (**3**)、8-*O*-demethyl 体 (**4**)、2'-dehydroxy 体 (**5**)、3'-dehydroxy 体 (**6**)、2',3'-dehydroxy 体 (**7**) を合成し、活性を評価した。**3** 以外のアナログについては 6,7-dihydroxy-8-methoxycoumarin より誘導することで合成した。一方、**3** については 6、7、8 位に酸素官能基を有するクマリンの合成法が報告されていなかったことから、没食子酸メチルを出発原料として、1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin による臭素原子の導入に続く水酸基への変換および Grubbs 触媒による閉環メタセシスを鍵反応として合成した。しかしながら、合成した 5 種のアナログはいずれも **2** より活性が大きく減弱していたことから、今回検討したいずれの構造部位も活性発現に重要であることが明らかとなった。

これまで標的としてきた $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ は、主に $\alpha\beta\gamma_2$ の 4 サブユニットから構成されていることが知られている。そこで、著者が $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制物質として見出したカテキン EGCG (**1**)、クマリン 2',3'-dihydroxypuberulin (**2**) および先に研究室において活性物質として単離されたイソフラボン tectorigenin (**8**) に対して、3 者の作用機序の比較を目的として各サブユニットをコードする mRNA の発現量変化を調べた。その結果、**1** 及び **8** は、 γ -サブユニットの mRNA 量を、また、**2** は、 β -サブユニットの mRNA 量を抑制していることが判明した。以上の結果から、**1** 及び **8** は、 γ -サブユニット量を、**2** においては β -サブユニット量を低下させることで、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の 4 量体構造の構築を阻害し、その細胞表面への発現を抑制していることが示唆され、クマリン 2',3'-dihydroxypuberulin が、カテキン EGCG およびイソフラボン tectorigenin とは異なる作用機序を有することが明らかとなった。



tectorigenin

論文審査の結果の要旨

申請者は、一連のアレルギー反応において必須のプロセスと考えられるマスト細胞上の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の発現を標的として、抗アレルギー作用を指向した薬用植物由来 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 発現抑制物質の探索を行い、見出した活性物質について種々検討を行った。

まず、ヒトマスト細胞上 $Fc\epsilon RI$ 発現量の測定法およびその抑制活性を評価するアッセイ系を確立し、スクリーニングの結果、茶 (*Theae Folium*) より活性本体として3種のカテキンを見出した。また、種々カテキン類の $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性を評価し、活性発現に重要な構造部位を明らかにした。次に、他のポリフェノール類についても $Fc\epsilon RI$ 発現抑制活性を評価し、B環部ピロガロール構造を有するアントシアニンおよびフラボンにのみに活性が認められ、本部分構造が重要であることが示された。

また、南米産薬用植物からは *Verbasucum thapsus* L. より活性本体として 2',3'-dihydroxyuberverulin (**1**) を見出すとともに、**1** がラセミ混合物であり、両エナンチオマーの活性がラセミ混合物とほぼ同等であることを明らかにした。さらに、**1** の芳香環上メトキシル基あるいは側鎖水酸基を欠落させたアナログを5種合成し、いずれの官能基も活性発現に重要であることが明らかにした。

一方、標的としてきた $Fc\epsilon RI$ の構成サブユニットをコードする mRNA のうち、各活性物質がいずれの発現量を抑制しているかを明らかにするとともに、見出した両活性物質が異なる作用機序を有することを明らかにした。

本研究成果は、薬用植物から前例のない抗アレルギーリード化合物に繋がる $Fc\epsilon RI$ 発現抑制成分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。