



Title	Triterpenoids as lead compounds for the development of non-steroidal anti-inflammatory drugs
Author(s)	Vo, Ngoc Quynh Nhu
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76510
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (VO NGOC QUYNH NHU)	
Title	<p>Triterpenoids as lead compounds for the development of non-steroidal anti-inflammatory drugs</p> <p>(非ステロイド性抗炎症薬開発のためのリード化合物としてのトリテルペノイド)</p>
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that inhibit the activity of cyclooxygenase (COX)-1 and -2 are one of the most common medications of inflammation in the world. Nevertheless, COX-1 inhibitors are claimed to exhibit side effects for patients. COX-2 inhibitors that have fewer side effects have been developed; however, the therapeutic effects of COX inhibitors may be limited by the conversion of arachidonic acid to leukotrienes that cause inflammation through the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway. Therefore, newer drugs are expected to dually inhibit 5-LOX and COX-2 to enhance efficacy against inflammation and reduce side effects. Triterpenoids are promising since they are active principles having pharmacological activities. However, they also show hemolytic activity that is an important indicator of the toxicity of natural compounds in drug designing. There has been an increasing interest in natural triterpenoids comprising 6 isoprene units and 30 carbon atoms. In this study, I focused on evaluating the <i>in vitro</i> hemolytic effects of plant-derived triterpenes of various skeletons and their inhibitory activities against the four major anti-inflammatory targets of the arachidonic acid cascade, deducing their structure-activity relationships (SARs), and through combinatorial biosynthesis in yeast making a proof-of-concept of producing bioactivity-directed triterpenes.</p> <p>I provided a baseline in terms of the toxicity of natural triterpenoids to red blood cells. The majority of oleanane-type sapogenins had stronger hemolytic effects than those of the ursane and dammarane types. The presence of polar regions on sapogenins, such as a carboxylic acid group at position 28, an α-hydroxy group at position 16, and/or a β-hydroxy group at position 2, significantly enhanced hemolysis. Meanwhile, the introduction of an α-hydroxy moiety at position 2, or a hydroxy moiety at positions 23 or 24 was closely associated with reduced activity. My findings suggest that the skeleton type, distribution of functional groups, and stereochemical configuration of substituents at different positions of the aglycone are important factors that contribute to hemolytic activity, in addition to the complexity of sugar moieties.</p> <p>In addition, I evaluated the inhibitory effects of natural pentacyclic triterpenoids of two types of structural skeletons against the four major enzymes involved in the inflammatory process: 5-LOX, 15-LOX-2, COX-1 and COX-2. It was found that 3-<i>O</i>-acetyl-β-boswellic acid potently inhibited human 15-LOX-2 ($IC_{50} = 12.2 \pm 0.47 \mu M$). Analysis of the SAR studies revealed that the presence of a hydroxy group at position 24 was beneficial in terms of both 5-LOX and COX-1 inhibition. Notably, the introduction of a carboxylic acid group at position 30 was important for dual 5-LOX/COX inhibitory activity; furthermore, its combination with a carbonyl group at C-11 considerably increased 5-LOX inhibition. Also, the presence of an α-hydroxy group at C-2 or a carboxylic acid group at C-23 markedly suppressed the 5-LOX activity. The present findings suggest that the types and configurations of polar moieties at positions C-2, -3, -11, -24 and -30 are important structural aspects of pentacyclic triterpenes for their potential as anti-inflammatory lead compounds.</p> <p>From the important SAR studies described above, I used the combinatorial biosynthesis approach in making a proof-of-concept of producing target structures that were predicted to exhibit the 5-LOX/COX dual inhibitions and show no cytotoxicity to erythrocytes for drug candidate discovery. I could succeed in producing two compounds of interest in yeast: arjunolic acid (6.2 mg L⁻¹ yeast culture) that have modifications on C-2 α and C-23 and putative hyptatic acid A (4.0 mg L⁻¹ yeast culture) that have modifications on C-2 α and C-24; all those modifications are closely related to reduced hemolytic effect and potent inhibition on 5-LOX/COX. In addition, the putative hyptatic acid A was detected from the roots of <i>Nelumbo nucifera</i> (Nelumbonaceae).</p> <p>Overall, the present study revealed important structural aspects of natural triterpenoids of various skeletons for their hemolytic effects and inhibitory activities against the four major enzymes involved in the inflammatory process, which might be helpful for the design and synthesis of more potent triterpenes that are non/less toxic to red blood cells. Guided by these SARs, together with the availability of a number of biosynthetic enzymes, a plethora of high-value compounds will be produced through combinatorial biosynthesis in heterologous yeast.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (VO NGOC QUYNH NHU)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	松田 史生
	副 査	教 授	藤山 和仁
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	渡邊 肇
	副 査	教 授	内山 進
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	大政 健史
	副 査	教 授	本田 孝祐
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

植物は炭素数 5 を基本骨格とする「テルペノイド」と総称される一群の化合物を産生する。このうち、炭素数 30 のトリテルペノイドは、抗炎症、抗ウイルス、抗腫瘍などさまざまな生理活性を有するものが多い。ステロイド性の抗炎症薬は、優れた抗炎症作用を持つ一方、免疫抑制、胃腸障害、眼の疾病など多くの副作用を有することから、非ステロイド性抗炎症作用薬 (NSAIDs) が注目されている。一般的な NSAIDs は、抗炎症経路におけるプロスタグランジン生合成に関与するシクロオキシゲナーゼ (COX)-1 および -2 の活性を可逆的に競合阻害する。COX 阻害剤の治療効果は、炎症時に細胞膜から放出されるアラキドン酸が、5-リポキシゲナーゼ (5-LOX) 経路を介して炎症反応に重要な役割を果たすロイコトリエンに変換されることによって制限される可能性がある。そのため、COX に加え、5-LOX を阻害する新しいタイプの NSAIDs が求められていた。上記のように、トリテルペノイドは、非ステロイド性であり、植物は多様なトリテルペノイドを産生することから、新しいタイプの NSAIDs として潜在的な可能性がある。一方、薬剤設計において、溶血活性の有無は毒性の重要な指標である。

このような背景に基づき学位申請者は、まず、トリテルペノイドの構造と溶血活性の相関について検討し、次に、COX および LOX の阻害薬としてのトリテルペノイドの構造と活性相関について検討し、COX および LOX を二重に阻害するトリテルペノイドを抽出し、形質転換酵母における生産研究を行っている。

トリテルペノイドは、オレアナン型、ウルサン型およびダンマラン型に大別される。学位申請者は、トリテルペノイドの構造と溶血活性の相関検討として、赤血球に対する溶血評価を行っている。オレアナン型サボゲニンの大部分は、ウルサン型およびダンマラン型より強い溶血効果を示すことを見出している。28 の位置のカルボキシル基、C-16 位の α -ヒドロキシル基、あるいは、C-2 位の β -ヒドロキシル基などの極性領域の存在が溶血を著しく増強することを見出している。一方、C-2 位の α -ヒドロキシル基、C-23、C-24 位のメチルヒドロキシル基の導入により、溶血性が低下することを見出している。このように、アグリコンの骨格型、官能基の分布および異なる位置の置換基の立体化学的配置が、糖部分の複雑さに加えて溶血活性に寄与する重要な因子であることを見出している。

学位申請者は、また、5-LOX、15-LOX-2、COX-1 および COX-2 という炎症過程に関与する四つの主要な酵素に対する、トリテルペノイドの阻害効果を評価している。その結果、3-O-アセチル- β -ボスウェル酸がヒト 15-LOX-2 を強力に阻害することを見出している。さらに、C-24 位のヒドロキシル基の存在が、5-LOX および COX-1 阻害の両方に関して有効であることを明らかにしている。また、C-30 位のカルボキシル基の存在が、5-LOX および COX の二重阻害活性に重要であることを示している。さらに、C-11 位でのケトン基が加わることにより 5-LOX 阻害が増強すること

を見出している。また、C-2 位における α -ヒドロキシル基または C-23 位におけるカルボキシル基の存在は、5-LOX 活性を顕著に抑制することを見出している。これらの結果により、トリテルペノイドにおける C-2, C-3, C-11, C-24 および C-30 位の極性部分の型および配置が、抗炎症性リード化合物としての可能性の重要な構造であることを示唆している。

学位申請者はまた、COX および LOX を二重に阻害するトリテルペノイドを抽出し、形質転換酵母における生産研究を行っている。すなわち、トリテルペノイド生合成に関わるオキシドスクアレン環化酵素ならびに、シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ遺伝子を出芽酵母で発現させることにより、C-2 α 位と C-23 位が修飾されたアルジュノール酸、および、C-2 α 位と C-24 位が修飾されたヒプタチン酸 A と推定される化合物を生産させている。

以上のように、本論文は、植物が有する多様なトリテルペノイドの構造と溶血性との相関を調べ、さらに、5-LOX、15-LOX-2、COX-1 および COX-2 という炎症過程に関与する四つの主要な酵素に対する、トリテルペノイドの阻害効果を評価し、抗炎症活性の強化あるいは抑制に関わる構造を推定している。また、COX および LOX を二重に阻害するトリテルペノイドを二種抽出し、出芽酵母での生産を行っており、植物トリテルペノイドを用いた NSAIDs の生物工学的応用の可能性についても述べている。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。