

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ジンチョウゲ科植物由来の抗 HIV 活性ジテルペノイドの探索研究
キーワード	①ジンチョウゲ科、②HIV 感染症、③ジテルペノイド

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	オオツキ コウハル 大月 興春
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東邦大学 薬学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東邦大学 薬学部 助教
プロフィール	2019年3月に東邦大学薬学部を卒業し、薬剤師免許を取得。同年4月に東邦大学大学院薬学研究科博士課程に進学し、その後中退、2021年9月より東邦大学薬学部生薬学教室助教として着任。現在は革新的な HIV 感染症治療薬の創製に向けて、ジンチョウゲ科植物由来の抗 HIV 活性ジテルペノイドの探索研究に取り組んでいる。

1. 研究の概要

HIV感染症は結核、マラリアと並ぶ世界三大感染症の一つである。HIVは一旦感染すると宿主細胞に数年間に渡り潜伏するため、既存の抗HIV薬では潜伏期HIVを体内から完全に駆除することができず、HIV感染症を根治できない根本的な原因となっている。その中で、潜伏期HIVを再活性化して除去する「Shock & Kill」戦略は、既存のHIV感染症治療の問題点を根本から解決してHIV感染症の根治を達成することが大いに期待されている。ジンチョウゲ科植物より単離される大環状ダフナン型ジテルペノイド（大環状ダフナン）は、既存のHIV潜伏感染再活性化剤（LRA）候補化合物が比肩できないほど優れた潜伏期HIV再活性化作用を示し、LRA創薬における有力な候補化合物である。そこで本研究は、非常に優れた潜伏期HIV活性化作用と抗HIV複製活性を示した大環状ダフナンに着目し、ジンチョウゲ科植物から新規抗HIV活性ジテルペノイドを見出すことを目的として、LC-MS/MSを活用した日本産ジンチョウゲ科薬用植物ミツマタの成分研究を行ったので、その詳細について報告する。

2. 研究の動機、目的

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症は世界的に問題となっている三大感染症のうち、唯一未だに根治療法が確立されていない感染症である。現在標準的に行われている抗レトロウイルス療法（ART）は、HIVの増殖を抑制することはできるが、HIVリザーバー（潜伏感染細胞）を体内から完全に駆除することはできない。さらに、長期間ウイルスを良好に抑制できている場合でも、治療を中断してしまうことで瞬間にHIVが再増殖し後天性免疫不全症候群（AIDS）の発症に至る。そのため、HIV感染者は生涯に渡って抗ウイルス薬の継続服用が必要とされる。これに付随する抗ウイルス薬の慢性毒性、副作用、薬物耐性ウイルスの出現および治療に要する高額な医療費はいずれも HIV 感染症治療の大きな問題となっており、HIV の根絶を目指す新規抗 HIV 薬の創製が急務である。現在、HIV 潜伏感染再活性化剤（LRA）を用いて、潜伏期 HIV を再活性化して、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）などにより HIV リザーバーを排除、または ART の併用により除去する「Shock & Kill」戦略に基づいた革新的な HIV 感染症根治薬の創製が

期待されている。しかし、既知の LRA 候補化合物の作用強度が不十分であることが、LRA の創製研究において最大の課題である。すなわち、既知の LRA 候補化合物は潜伏 HIV を完全に再活性化するまでに到達できておらず、僅かに残る潜伏期 HIV のリバウンドにより HIV 感染症の再発が引き起こされることが問題とされている。

一方、本研究室はこれまでに、ジンチョウゲ科植物の生物活性ジテルペノイドの探索研究により、ジンチョウゲ科 *Stellera chamaejasme* (瑞香狼毒) からこれまでの LRA 候補化合物とは桁違いの強さの潜伏期 HIV 活性化作用をもつジテルペノイドを見出した。これらジテルペノイドは、5/7/6 員環構造を持つダフナン骨格の 1 位アルキル基がオルトエステル結合を介して形成した大環状構造を有することが特徴である(以下大環状ダフナンとする)。大環状ダフナンは潜伏期 HIV 活性化作用と極めて強力な抗 HIV 複製活性の二重作用を示す一方、ホルボールエステルが示すような炎症性や発がんプロモーター作用等の副作用は示さない。しかしながら、植物界における大環状ダフナンの分布ははかり限られており、ジンチョウゲ科の数属の植物から数十種の化合物のみが報告されている。そこで、本研究は「Shock & Kill」戦略に基づいた新規抗 HIV 薬創製を目指して、非常に優れた潜伏期 HIV 活性化作用と抗 HIV 複製活性を示した大環状ダフナンに着目し、ジンチョウゲ科植物から新規抗 HIV 活性ジテルペノイドを見出すことを目的とした。

3. 研究の結果

ジンチョウゲ科ミツマタ属ミツマタ (三椏, *Edgeworthia chrysantha*) は兵庫県、徳島県、岡山県、京都府などで栽培されている落葉低木である。樹皮に強い繊維質を持つことから古くより和紙や紙幣用紙の原料として用いられる。一方、中国伝統医学においては、ミツマタの蕾および根が角膜白斑、多涙、夢精などに用いられる。化学成分として、これまでにクマリン、フラボノイド、ステロイドおよびジテルペノイドが報告されている。これまでに本研究室の先行研究において、中国にて採取したミツマタの花蕾について成分研究を行い、5 種の大環状ダフナン型ジテルペノイド edgeworthianins A-E (1-5) を単離・構造決定した (図 1)。

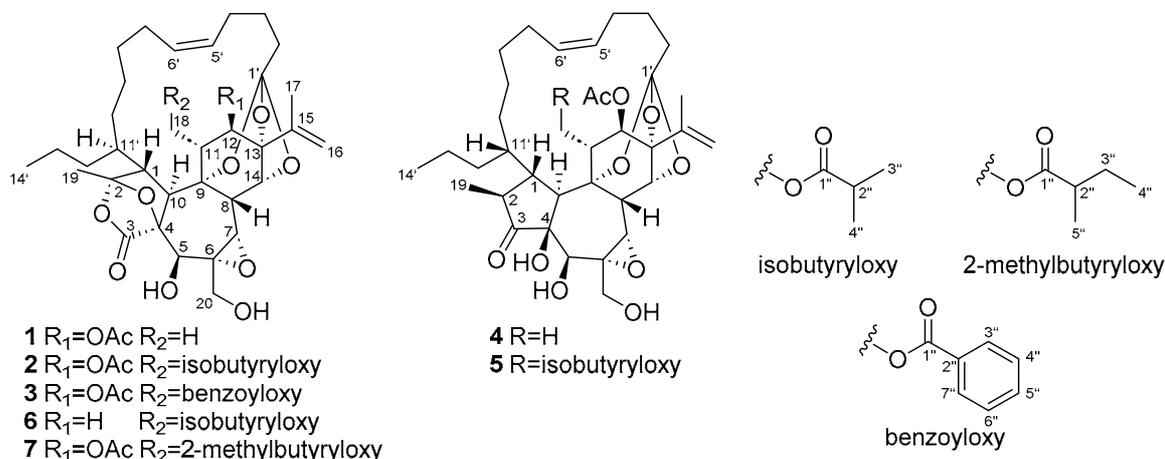


図 1. ミツマタより検出した 7 種の大環状ダフナン型ジテルペノイドの化学構造

本研究では、東邦大学薬学部附属薬用植物園にて栽培されているミツマタを植物材料とし、花蕾、花、葉および茎の 4 つの部位について LC-MS/MS 分析を行った。ミツマタの花蕾、花、葉および茎をそれぞれ、メタノールにて超音波抽出を行い、得られた抽出物を水と酢酸エチルにて分配操作して得られた酢酸エチル可溶画分について、SepPakC18 カートリッジにて前処理を行った後、超高速液体クロマトグラフを接続した高分解能 Q Exactive ハイブリッド四重極-Orbitrap 質量分析計を用いて LC-MS/MS 分析を行った。その結果、精密質量による組成式推定および MS/MS フラグメンテーション解析により、いずれの部位からも 7 種の大環状ダフナン由来のピークを検出した。そのうち、5 種のピークは以前にミツマタの花蕾より単離した edgeworthianins A-E (1-5) であり、2 種はこれまでに単離が報告されていない未知の大環状ダフナンであった。そこで、LC-MS 分析の結果に基づいて 2 種の未知大環状ダフナンについて単離を行った。ミツマタの花および茎をそれぞれメタノールにより超音波にて常温抽出し、得

られたメタノール抽出物を水と酢酸エチルにて分配操作を行った。酢酸エチル可溶画分についてさらに Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにて分画し、100%MeOH 溶出画分について各種クロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いた単離精製により、花から新規大環状ダフナン **6**、茎から新規大環状ダフナン **7** を単離した。新規化合物は MS および各種 NMR スペクトルの解析により化学構造を決定し、edgeworthianin F (**6**) および edgeworthianin G (**7**) と名付けた。

さらに、edgeworthianins A-G (**1-7**) については HIV-1 を感染させた MT4 リンパ球を用いて抗 HIV 活性を評価した。その結果、化合物 **5** ($EC_{50} = 2.9 \text{ nM}$) が最も強い活性を示し、次に化合物 **4** ($EC_{50} = 8.4 \text{ nM}$)、**2** ($EC_{50} = 29.3 \text{ nM}$) と強い活性を示した。化合物 **4** および **2** の活性を比較すると、A 環が 5 員環ケトン構造である大環状ダフナンはより強い抗 HIV 活性を示すことが示された。また、18 位置換基は抗 HIV 活性の発現に重要であり、イソブチリル基はベンゾイル基や 2-メチルブチリル基よりも活性が強いことを明らかにした。

本研究により日本産ジンチョウゲ科植物ミツマタより、強力な抗 HIV 活性をもつ新規活性ジテルペノイドを単離した。また、炭素数 14 の脂肪族鎖で構成される大環状環構造を有するダフナン型ジテルペノイドと抗 HIV 活性の構造活性相関を明らかにした。今後は更なる植物資源の確保、迅速な成分分析法の確立、新規化合物の単離と構造決定、および化学誘導体の合成によりこれらジテルペノイドの化学多様性の拡大を図り、抗 HIV 治療薬の創製を目指した構造活性相関の解明および構造の最適化を行う予定である。

4. 研究者としてのこれからの展望

私の研究における目標はアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患に対する治療薬の創製に貢献することです。そのために天然物創薬の分野において創薬シーズの探索研究に努めていきたいと考えております。天然由来化合物は複雑な化学構造を有することが多いため、正確な構造決定は研究の遂行に必要不可欠です。そこで、私は多彩な手法を用いて単離した化合物の絶対配置も含めた構造決定を行っていきます。また、活性スクリーニングに利用できる評価系の構築も積極的に行い、生物活性天然物の同定および構造活性相関の解明に活用していきます。このように抽出単離、構造決定、活性評価および構造活性相関の解析など各プロセスにおいて、様々な手法や最新技術を積極的に取り入れて研究を行っていきたいと思います。そして、天然薬用資源はもちろんのこと、未だ有効な活用法が見いだされていない未利用植物資源にも着目して優れた生物活性天然物の発見を目指していきます。今後さらに研鑽を積み、天然物創薬研究を通じて薬学の発展、ひいては人々の健康の向上に尽力していく所存です。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、本研究を遂行するにあたり若手研究者奨励金を賜りました、日本私立学校振興・共済事業団の関係者ならびに支援者の皆様に心より感謝とお礼を申し上げます。本奨励金は私が研究者となってから初めて獲得した外部競争的資金です。このことは、研究に遂行においてだけではなく、研究者としてスタートしたばかりの私にとっては精神的にも大きな後押しとなりました。今後もさらに自身の研究を発展させ、素晴らしい研究成果を得ることで、薬学研究を通じて人々の健康に貢献できるように一層精進してまいります。