

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

ガーナ由来薬用植物による抗ウイルス及び抗寄生虫活性候補物質の研究

(ガーナ共和国)

平成23年度実施報告書

代表者：山岡 昇司

東京医科歯科大学 大学院・医歯学総合研究科・教授

<平成21年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

ガーナでは先進医療の理解と普及がじゅうぶんでなく HIV、マalaria等の蔓延が深刻化し、治療が立ち遅れている。本プロジェクトは、ウイルス複製、寄生虫増殖を制御できる有用な植物由来抽出物を見出し、その作用機序を解明してガーナの実情を踏まえた感染症治療に有効と考えられる治療法開発に貢献すること、これらをとおしてガーナおよび日本における科学技術の向上と今後の研究を担う人材の育成に寄与することを目標とする。平成21年度は、(1)植物抽出物の抗 HIV 活性評価系を構築、(2)HIV 潜伏感染ヒト T 細胞株をあらたに樹立し、phorbol ester である PMA でプロウイルス発現が誘導されることを確認、(3)アフリカトリパノソーマ原虫の実験室内維持を開始し、herbal product による抗原虫活性をアッセイする系を確立した。平成22年度には、(1)HIV、トリパノソーマに対し抑制活性があることがわかっている物質等を用いて評価系の改良と検証を行った、(2)樹立した複数のレポーター細胞を反応性、結果の安定性、感度などの面から比較検討し、スクリーニングに最も適する細胞を選んだ、(3)採集した植物からの抽出法を開始し、(4)ハーブ抽出物のトリパノソーマに関する試行的バイオアッセイを開始した。平成23年度には、(1)複数の植物粗抽出物が潜伏感染ウイルスを活性化することを見出しており、(2)強い抗トリパノソーマ活性を示す4件の植物抽出物を見だし、そのうち一つについて新規構造を有する成分を含む4つの精製標品を得た。作用機序については tubulin 抑制を介した鞭毛形成異常を引き起こすことを明らかにした。(3)ガーナで得られた候補物質の生物活性を日本側で再現し、日本、ガーナで得られた候補物質中の有効成分の部分精製を行い、(4)部分精製標品を用いた活性評価を行った。平成24年3月段階で当初リストアップした95種類の植物のうちガーナ国内で可能な植物をほぼすべて採集し終え、部位別に87種類の粗抽出物を作製、ガーナおよび日本で毒性試験、一次および二次バイオアッセイを行った。期待する効果が得られたサンプルについては今後分取とバイオアッセイを繰り返すことにより有効成分を解析し、作用機序の解明を行う。

2. 研究グループ別の実施内容

A. 東京医科歯科大学グループ

(1)研究題目:ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目:抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容:ハーブ抽出物の抗 HIV 活性をスクリーニングするためのアッセイ系開発と改良

① 研究のねらい

抗 HIV 活性を有するハーブ抽出物をスクリーニングするためには、細胞培養系を利用し試料の毒性と抗 HIV 効果を判別でき、定量化が可能で再現性が高い評価系を開発する必要がある。そのために昨年度までにヒト T 細胞株で恒常的に発現しうるレポーター遺伝子発現ユニットを作製し、これをもとに細胞ゲノムに安定に組み込むためのレンチウイルスベクターを構築、Jurkat ほかのヒト T 細胞株にこのベクターを発現するレンチウイルスを感染させ、安定にレポーター遺伝子を発現する細胞株を樹立した。さらに Jurkat やほかの安定細胞株が長期間の培養後も安定にレポーター遺伝子を発現しスクリーニングに使用できるかどうかの検証し、Jurkat、Molt4、SupT1 ヒト T 細胞株が HIV 急性感染実験に適することがわかった。

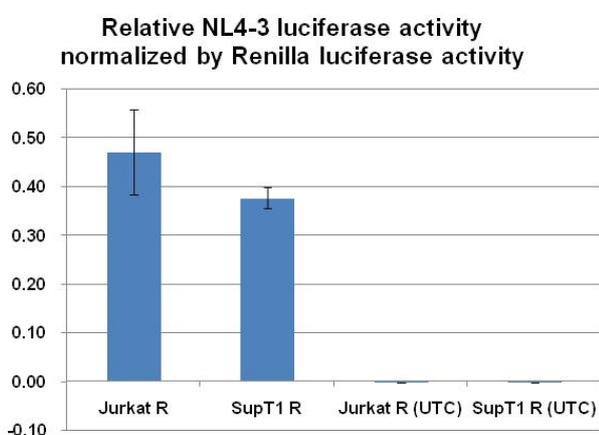
② 研究実施方法

ガーナ野口研では主に Jurkat レポーター細胞株を用いて VSVG-pseudotyped NL4-3Luc ウイルスの感染実験による1次スクリーニングを実施している。これまでに感染を抑制する植物抽出物は見いだされていない。Jurkat と SupT1 細胞についてレポーター細胞としての優劣を比較した結果、非感染細胞(UTC)ではいずれの細胞株でも *renilla luciferase activity* は計測されたが *firefly luciferase activity* はバックグラウンドと同レベルであり、NL4-3luc ウイルスを感染させた場合、Jurkat のほうがわずかに高値を示した。

Firefly luciferase 活性を Renilla luciferase 活性で割った値を Y 軸に示す。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ガーナにおける1次スクリーニングでは、これまでに感染を抑制する植物抽出物は見いだされていない。現在 Jurkat、Molt4、SupT1 という3種類のレポーターT細胞株を準備できている。HIV 感染を抑制する植物抽出物が得られれば直ちに抗 HIV 活性の検証を異なる細胞株で行える態勢にある。



④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

長期専門家として着任した魚田が、ガーナ人若手研究者とともに *Renilla luciferase* レポーター遺伝子を発現する Jurkat 細胞株にガーナ野口研 P3 研究室で作製した NL4-3luc ウイルスを感染させ、dual luciferase assay を行っている。各3週間の日程で来日した野口

研 research assistant 2名に対し、細胞培養、ウイルス作製、dual luciferase assay、western blotting などの技術指導を実施した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

特記すべき事項なし。

(2) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

① 研究のねらい

APOBEC3G (A3G) 及び BST-2/Tetherin (BST-2) はこれまで報告されてきた宿主因子の中で最も強い抗 HIV-1 活性を示すことから、本研究ではこれらの遺伝子発現をガーナ産植物抽出物スクリーニングの第一指標として選出した。前者は、HIV-1 の逆転写産物に G→A 変異を頻発させ感染性を低下する機能を有し、後者はウイルス粒子が細胞表面から出芽するのを阻害する機能を持つ宿主蛋白質である。

② 研究実施方法

各々の遺伝子発現 (mRNA 発現) の変化を定量化すべく、リアルタイム RT-PCR によるアッセイ系を

確立する。標準曲線作製のためのプラスミド DNA 構築、プライマー及びプローブの設計、PCR サイクルの条件設定等を行う。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

前年までに本実験に必要な機材が導入され、その動作確認を終えていた。そこで、本年はこの系を使って、植物抽出物が Jurkat 細胞の A3G と BST-2 の発現に与える影響を調べた。定量 PCR のうちインターカレート法を用いているので、融点が一定していることで特定の遺伝子が増幅されていることを確かめた (図 1)。

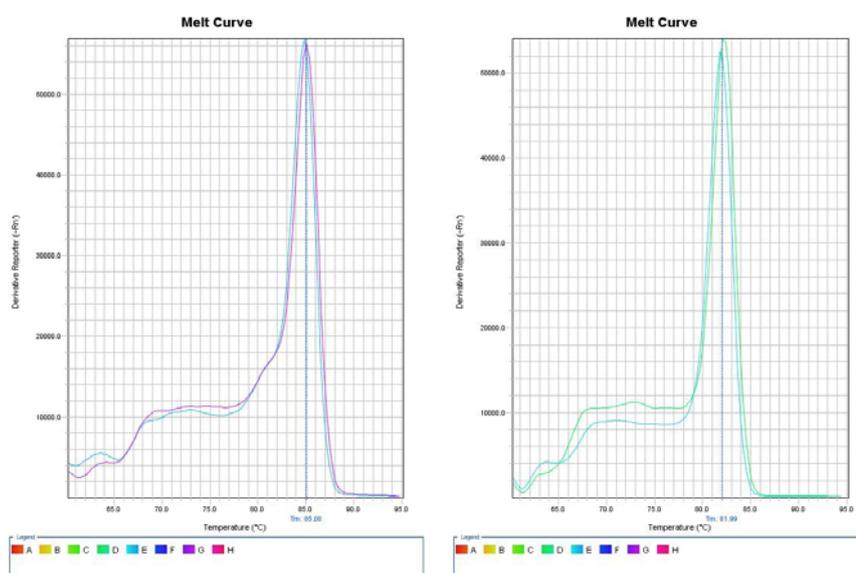


図 1 A3G (左) と BST-2 (右) に対する溶解曲線。プラスミドから得られた産物の融点と細胞から得られたそれとで融点の一致が見られた。

系が働いていることを確かめたので、各遺伝子に対する標準曲線を描いた (図 2)。

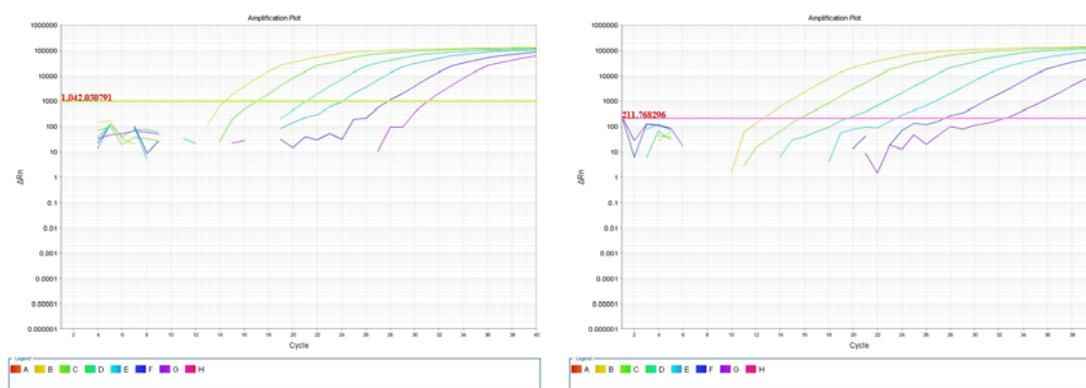


図 2 標準曲線を描く為に用いたプラスミドから得られた増幅曲線。 A3G (左) と BST-2 (右)。

次に植物抽出物で処理された Jurkat 細胞の RNA を抽出し逆転写した産物を用いて当該遺伝子に対して定量 PCR を行った (図 3)。残念ながら今回用いた植物抽出物の処理では抗ウイルス因子の発現の上

昇は確認出来なかった。今後は全ての植物抽出物について調べていくことで、A3G 及び BST-2 の発現を増強するような物質を見つけ出すことを目標としている。

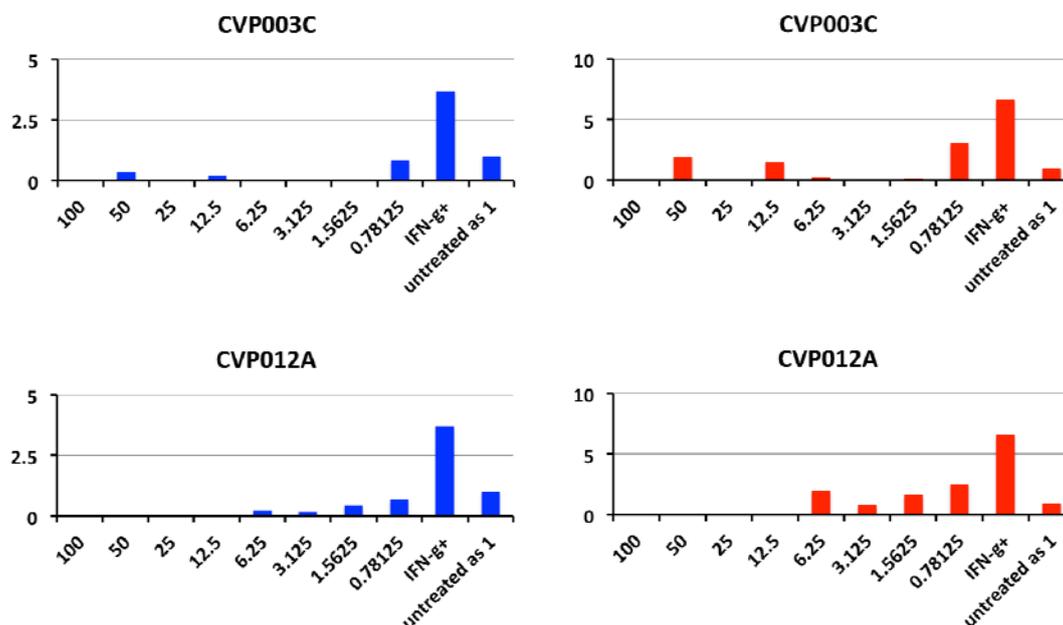


図3 植物抽出物の処理に拠る抗ウイルス因子の発現への影響。 Jurkat 細胞を様々な濃度の植物抽出物(µg/ml)で処理し、APOBEC3G (左)と BST-2 (右)に対する定量 PCR を行った。今回は抽出物として CVP003C 及び CVP012A を用いた。

⑥ カウンターパートへの技術移転の状況

魚田専門家が野口研ウイルス部門にて実験系を確立し、ガーナ側に技術指導・移転を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

ガーナという地理的条件、実験材料の入手や輸送時の安定性の問題から、本事業ではこれまで報告のある加水分解プローブ法ではなくインターカレート法を用いた。

(3) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：潜伏感染 HIV-1 プロウイルスを活性化する植物成分の解析

① 研究のねらい

抗レトロウイルス薬物治療(ART)が一定の効果을あげている場合でも、いったん ART を中断すると潜伏感染細胞からウイルスが産生され始め、再びウイルス量が増大してくることが知られている。潜伏感染細胞を駆逐するためには、未感染細胞を ART で守りつつ潜伏感染細胞を刺激してプロウイルス発現を誘導しなければならない。Phorbol esters はプロウイルス発現を誘導できる代表的薬剤であるが、免疫系細胞をいたずらに刺激することなく安全にプロウイルス発現を誘導する物質でなければ臨床的には使用できない。HDAC 阻害剤も同様である。本課題では、このような性質をもつ物質を植物抽出物に見出すことを目的としており、樹立したアッセイ系を用いてガーナの1次スクリーニングで得られた候補植物抽出物について検証実験を行うこと、ウイルス蛋白質の発現を western blotting で確認すること

を本年度の課題として設定した。さらに、より生体に近い潜伏感染 T 細胞を作成する目的で、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株の樹立も合わせて試みた。

② 研究実施方法

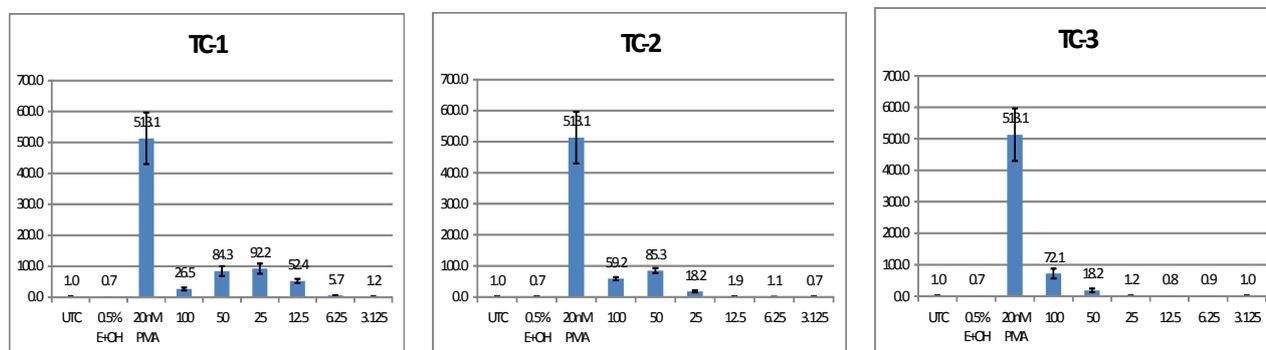
日本側での植物抽出物による潜伏プロウイルス活性化

植物 A の抽出物を更に精製、分離することで、どの様な画分に刺激する作用があるのかを検討した。この分離作業は長崎国際大学にて行われた。これまでの知見から、抽出物の中で物質 a の重合体群に活性がある可能性が考えられたため、この物質をそれぞれの重合度別に抽出した。これら抽出して得られた画分をそれぞれ JLR 細胞に対して処理し、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。

潜伏感染レポーター細胞株 JLR-2 を用いた結果を示す。

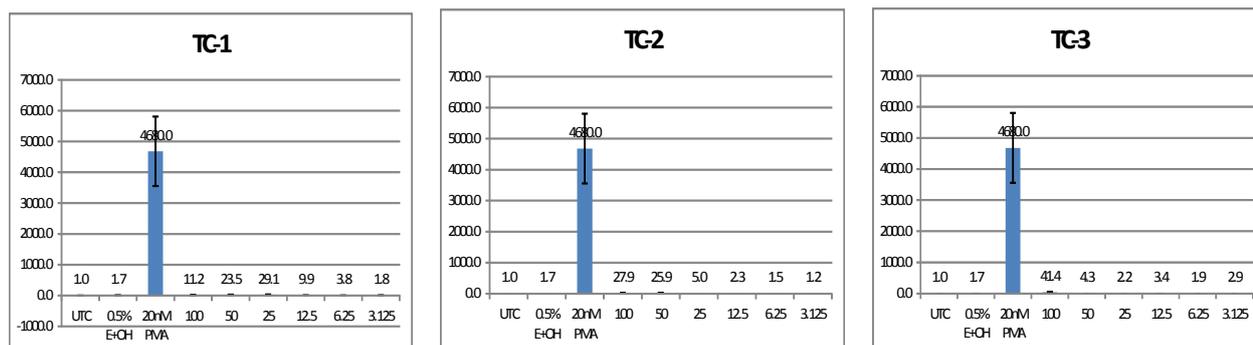
陽性対照 PMA に比べると低いですが、日本で入手可能な植物 A 加工物由来抽出物より高い活性を持つ画分が認められた。Fr-4 と Fr-10 はそれぞれ三量体、二量体であり、その他は四量体以上と考えられた。植物 A を材料に更なる分画作業を行い構造決定した(長崎国際大学の報告参照) 3 (Tc-1)、4 (Tc-2)、5 (Tc-3) 量体標品を用いて、レポーターアッセイでプロウイルス遺伝子発現を、western blotting でウイルス蛋白質発現を解析した。ところで、プロウイルスの LTR 領域には転写因子 NF-κB 結合配列が存在する。これらの標品によるプロウイルス発現誘導に NF-κB が関与するかどうかを調べる目的で、コントロールベクター(EV)もしくは NF-κB 特異的阻害蛋白質 Super repressor form of IκBα (SR)発現ベクターを発現させた JLR-2 に NL4-3Luc ウイルスを感染させた。濃度はμg/mL で、未処理細胞(UTC)での値を 1 としてある。

コントロール JLR-2 細胞



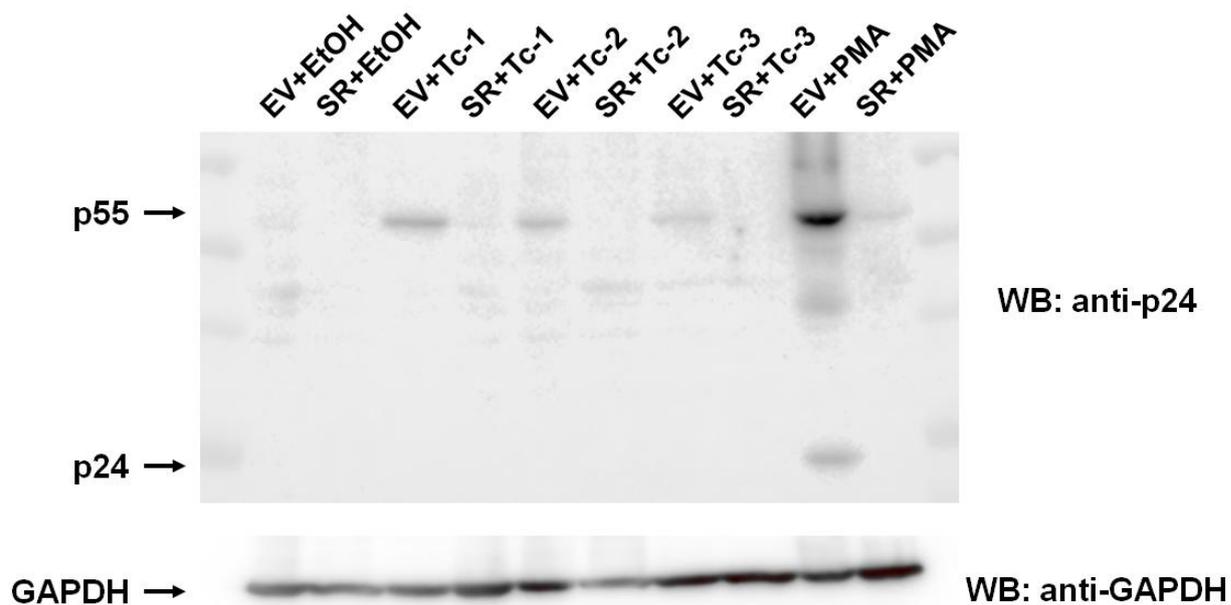
JLR-2 細胞中では、構造決定したものの中で 3 量体が最も強いプロウイルス遺伝子活性化能を示した。次に SR 発現 JLR-2 細胞では、これら標品によるプロウイルス活性化は著しく減弱していることがわかった。

NF-κB 特異的阻害蛋白質 SR 発現 JLR-2 細胞



次に、ウイルスのコア蛋白質(Pr55Gag および p24)の実質的発現量を知るために、同時に調製した細胞溶解液を用いて western blotting を行った。EV: control vector-expressing JLR-2 cells; SR: SR-expressing JLR-2 cells.

JLR-2, EV (control) and SR (Super repressor I κ B α)-expressing cells



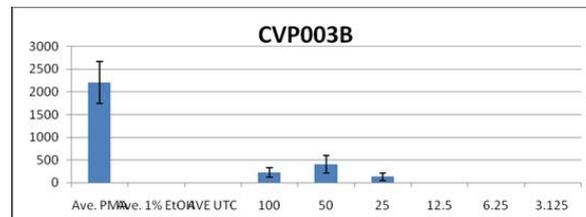
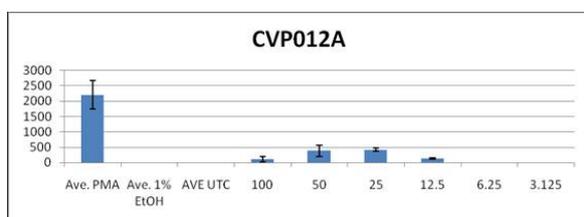
この結果は、dual luciferase assay 結果とよく相関して、Tc-1 (3 量体) が最も強い発現誘導能を有していること、SR によって NF- κ B 活性化が特異的に阻害されるとこれら物質 a 重合体によるプロウイルス発現誘導が著しく抑制されることを示している。

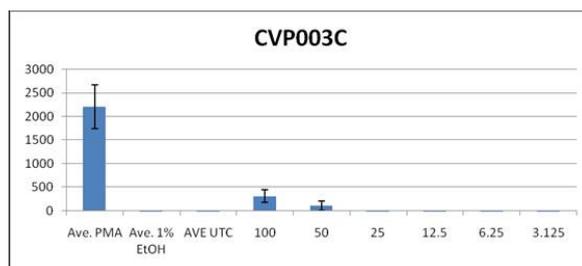
野口研でのスクリーニング進捗状況

SAMPLE ID	RESULTS	SAMPLE ID	RESULTS
CVP001A	++	CVP017A	-
CVP001B	-	CVP018A	-
CVP002A	-	CVP019A	-
CVP002C	-	CVP020A	-
CVP003A	-	CVP017B	-
CVP003B	+++	CVP021A	-
CVP003C	+++	CVP022A	+++
CVP004A	-	CVP021B	-
CVP004B	-	CVP020B	-
CVP005A	-	CVP023A	+
CVP005B	-	CVP016B	-
CVP006A	-	CVP019B	-
CVP007A	-	CVP023B	-
CVP008A	-	CVP024A	-
CVP009A	-	CVP025A	+++
CVP010A	-	CVP026A	+++
CVP011A	-	CVP024B	-
CVP010B	-	CVP027A	-
CVP012A	+++	CVP016C	-
CVP012B	-	CVP028A	+++
CVP011B	-	CVP029A	-
CVP013A	-	CVP030A	-
CVP013B	-	CVP031A	-
CVP014A	-	CVP032A	-
CVP015A	-	CVP033A	-
CVP016A	-		

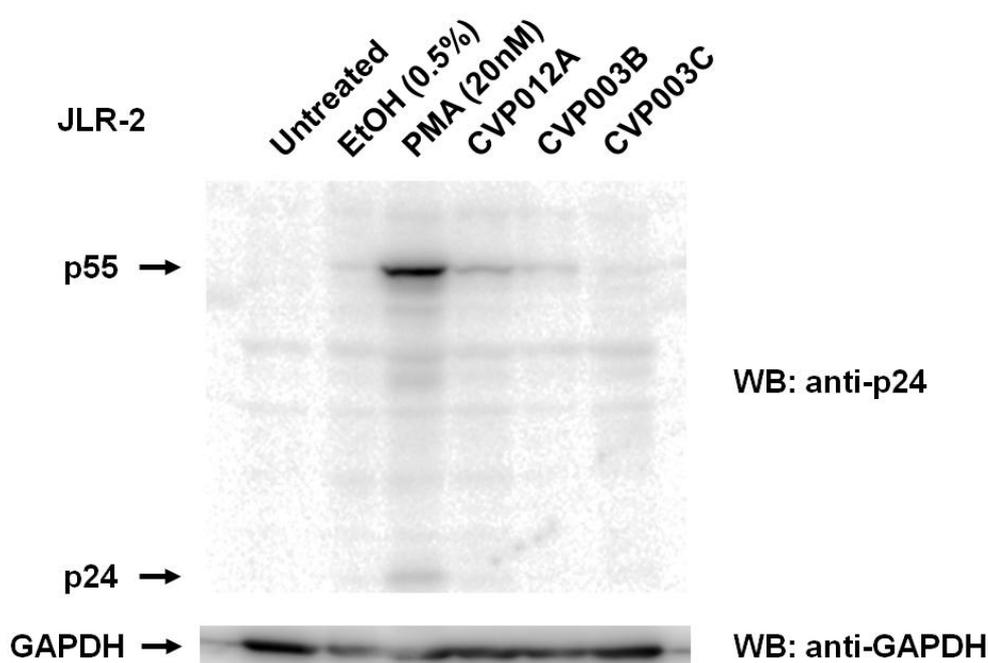
-: less than 10 fold activation
 +: 10 to 50 fold activation
 ++: 50 to 100 fold activation
 +++: more than 100 fold activation

野口研でプロウイルス発現誘導能ありと判定された植物抽出物 3 種類（野口研コード CVP012A、CVP003B、CVP003C）について、JLR-1 レポーター細胞株を用いて日本側で検証実験を行った。





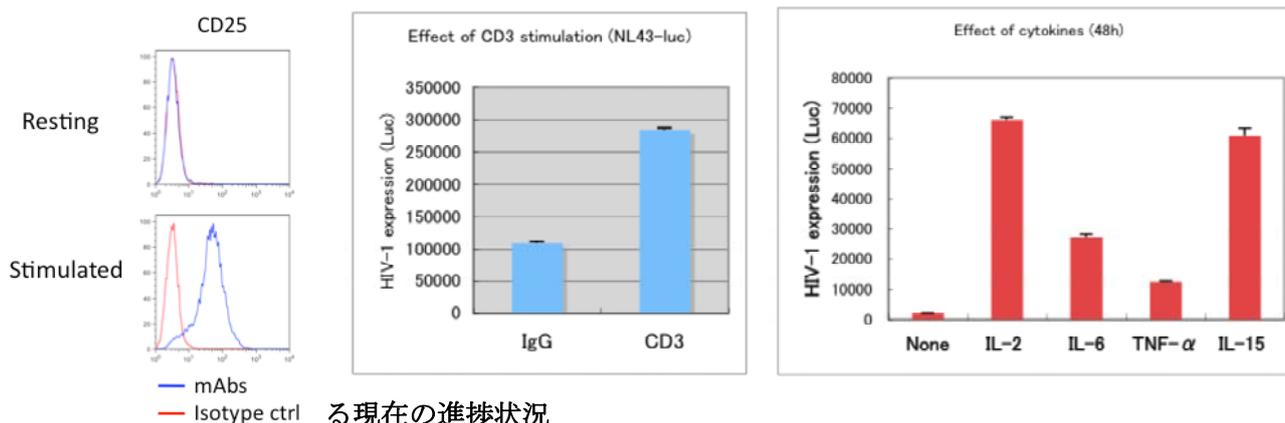
野口研でのスクリーニング実験結果を反映して、陽性コントロール PMA ほどではないが強い誘導作用が再確認された。濃度は $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、1%エタノール処理細胞での luciferase activity を 1 としてある。次に、これらの植物 50%エタノール抽出物 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ によるウイルス蛋白質発現誘導について、western blotting で調べた。



この結果、CVP012A が最も強いウイルス蛋白質発現誘導能を有することがわかり、その程度は植物 A に匹敵すると考えられた。

健常人末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞株の樹立と解析

より生体に近い T 細胞として健常人末梢血由来の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株をいくつか樹立したが、長期間維持できた CD4 陽性 T 細胞株は 1 種類であった。この細胞株は高濃度の IL-2 依存性であり、増殖は非常に遅いが CD3/CD28 刺激に応じて増殖が再開した。この細胞株についてフローサイトメトリーで表面形質を調べたところ、刺激の内状態では CD25 陰性であったが、刺激後 CD25 陽性となった (図左)。この細胞株に VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 を感染させると、ルシフェラーゼ活性が検出され、HIV-1 感染感受性であることが分かった。また、CD3 刺激によりルシフェラーゼ活性は増強し、T 細胞受容体の抗原刺激に応じて HIV-1 発現の増加をモニターできることが分かった (図中央)。また、IL-2 非存在下では Luc 活性は減弱するが IL-2 または IL-15 の添加でウイルス発現は回復し、IL-6, TNF α 等の炎症性サイトカインの添加によっても増加が見られた (図右)。



現在の進捗状況

バイオアッセイの結果、約10種類の植物由来粗抽出物が潜伏感染 HIV-1 の発現を誘導することを見出し、そのうち7種は強い活性化を示した。また、より生体に近い T 細胞として抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株を樹立した。今後レポーターHIV-1 感染を試みる予定である。

③ カウンターパートへの技術移転の状況

平成24年1月からガーナ・野口研に本課題の専門家（魚田慎）が長期派遣されたので、カウンターパートへの技術移転を本格化した。野口研ウイルス学部に必要な細胞株を導入しその増殖を確認したので、その培養を継続して植物抽出液処理による遺伝子発現解析などを技術移転課題としている。

平成24年1月から3月にかけて、野口研 Research Assistant であるガーナ人2名を東京医科歯科大学ウイルス制御学教室に各3週間派遣し、細胞培養、dual luciferase assay、western blotting など多岐にわたる技術指導を行った。

(4) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗原虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：ハーブ抽出物による抗アフリカトリパノソーマ原虫活性スクリーニングシステムの確立

①研究のねらい

西アフリカ地域ではツエツエバエが伝播する原虫 *Trypanosoma brucei gambiense* によるアフリカ睡眠病が流行しており、中枢神経症状を呈して臨床的に重篤化する風土病であるが、典型的な Neglected Tropical Diseases (NTD) として対策の遅れが指摘される疾患でもある。現在でも安全で有効な駆虫薬が開発されていないため、安価で有効かつ安全な治療薬の開発が急務である。本研究ではガーナ産薬用植物の抗トリパノソーマ活性に関する生物学的機序を解析し、効果を示す植物の薬効機序の解析、薬効物質の精製と構造活性相関に基づくより広範なスクリーニングのシステム確立と新規薬剤開発を視野に入れた有効薬用成分の同定を目的としている。

昨年度までに確立した Alamar blue を用いた殺原虫活性評価システムをガーナ野口研寄生虫学部門へ導入し、実際にガーナ産植物のスクリーニングの運用を開始した。本年度はさらに 96 穴ハイスループットのフローサイトメトリーを用いて、アポトシスあるいは細胞周期異常を簡便かつ敏速に解析すると共に、蛍光免疫染色法を用いて形態異常あるいは、数種のマーカータンパク質の発現変動を検出するシステムを確立する。また、これらの情報を一つのデータベースに集約して管理することで、薬効成分

の殺原虫活性とその薬効機序を分子レベルで同時に理解し、情報化することが可能となる。このシステム構築によって粗抽出の段階では見落としがちなマイナーな有効成分であってもユニークな薬効機序を示すものはクローズアップすることができ、新規の薬効成分同定にたいへん有用であると考える。

②研究実施方法

- (1) 昨年度後半にガーナに導入された Alamar blue 殺原虫活性評価システムを用いて、日本とガーナ両サイドから上がったスクリーニング候補植物約 100 種類についてスクリーニングを行う。すなわち、植物粗抽出物濃度 0~200 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 8 点のポイントを取り、抽出物添加後 24 時間で Alamar blue を添加、48 時間後の増殖をプレートリーダーにて検出。各粗抽出物の IC₅₀ を算出し、解析時の raw data 及びグラフ情報も含めてデータベース化する。
- (2) IC₅₀ が 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の粗抽出物について、FACS によるアポトシス、細胞周期解析を行う。アポトシスアッセイについては、粗抽出物 0~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でアポトシス（あるいはネクロシス）を誘導するか、誘導する最小濃度をそれぞれデータベースに記録。細胞周期解析については、各粗抽出物の IC₅₀ 値にて細胞周期ヒストグラムとともに細胞周期のどの phase に異常をきたしているかをデータベースに記録する。
- (3) 植物粗抽出物がトリパノソーマ細胞に与える影響は多岐に及ぶ。その影響をトリパノソーマ細胞の形態的变化あるいは、各器官、組織の機能を裏付ける各種タンパク質をマーカーとしてその発現量、発現場所等の変化を観察することで粗抽出物がどのようにトリパノソーマに作用し、殺原虫活性を引き起こすか、その薬効機序についての重要な知見が得られると考える。すなわち、各粗抽出物の IC₅₀ 値にて 24 時間培養後、細胞を回収。各種タンパク質の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察。形態変化、あるいはマーカータンパク質の発現変動が観察されればその画像とともにデータベースに記録。近年、トリパノソーマにおいて鞭毛が細胞外因子の取り込みや細胞分裂等大変重要な機能を担っていることが示唆されているため、鞭毛への影響についてより詳細に検討する。
- (4) (1)-(3)で出たデータベースをもとに成分精製、構造解析へ進める。各精製段階の分画サンプルについて Alamar blue によるバイオアッセイを行い単一成分精製まで進める。また、精製された構造を元に構造活性相関を明らかにする。
- (5) 同じく(1)-(3)で出たデータベースをもとに活性成分が示す薬効機序（作用点、標的分子等）について推測し、候補標的分子について RNAi ノックダウンを行った上で活性成分の殺原虫効果への影響を観察する。活性成分の殺原虫効果と標的分子ノックダウンに相乗効果等の関連性が見られれば、アフィニティカラムを用いて標的分子と活性成分との物理的相互作用の有無を検討する。
- (6) *Trypanosoma* 活性が知られている有効成分 b と基本骨格が同一の b 類は植物 B に高濃度に含まれる。長崎国際大学にて植物 B 樹皮からエキス抽出を行い、ガーナ産植物と同じ系にて殺原虫効果を調べ、活性が取ればその活性成分と思われる b 類を単離精製することで、ガーナ産植物の今後の展開に先駆けて構造活性相関、動物感染治療実験などのパイロットサンプルとする。
- (7) 平成 22 年度の研究成果として植物 C からの化合物 c-1 の抗トリパノソーマ活性を明らかにしているので、さらに Jurkat 細胞を用いた選択毒性と薬効カイネティックスを *in vitro* の原虫培養系で検討する。

④ 当初計画の進捗状況

ガーナ産植物エキス約 90 種のスクリーニングを終え、非常に強い抗トリパノソーマ活性を示す 4 つの植物を同定し、そのうちのひとつから新規構造を含む 4 つの標品を単離したが活性成分はまだ得られていない。これは全体計画の 60%域にあたるが、すでに、分画サンプルの時点で鞭毛形成阻害という作用機序を明らかにしていることから、70%相当と判断する。②研究実施方法に基づく当該年度進捗の詳細は以下の通りである。

- (1) 選択されたガーナ産薬用植物リスト、約 90 種(植物部位別も含め)の粗抽出物について Alamar blue を用いた殺原虫活性評価を行った(Table 1)。その結果、25%の植物エキスが IC₅₀ 値 50μg/ml 以下の殺原虫活性を示した。いずれにおいても哺乳類細胞 Jurkat cell を用いた毒性試験において強い毒性は認められなかった。さらに IC₅₀ 値 10μg/ml 以下の大変強い殺原虫効果を示したのは 6 種類であった。

Table 1

CODE	IC ₅₀ (μg/ml)						Ave.
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	
<i>Positive control</i>	5.43	4.40	14.60	2.42	1.36	10.50	6.5
JJNC001L	34.11	56.90	42.83	94.04	63.99		58.4
JJNC001SB	74.50	57.40					66.0
JJNC001R	565	265	172				334.6
JJNC002L	82.30	84.87					83.6
JJNC002R	265	1410					>500
JJNC003SB	286	1336					>500
JJNC003R	527	2103					>500
JJNC005SB	169	296					233.2
JJNC005L	242	186					214.6
JJNC006L	57.68	79.73	41.96				59.8
JJNC006SB	25763	516					>500
JJNC007SB	846	161	341				449.5
JJNC008L	6.11	1.11	10.65				6.0
JJNC008R	525	474					499.7
JJNC008SB	41.60				-		41.6
JJNC009L	14.45	39.87			-		27.2
JJNC010L	251	5842					>500
JJNC012L	120	101					111.0
JJNC013S	50366	931	1795				>500
JJNC013L	251				-		251.4
JJNC015L	30.73	24.22	22.94			-	26.0
JJNC018L	86.92	117	644	355			301.1
JJNC019L	93.00	226.23					159.6
JJNC019SB	32.90	39.30					36.1
JJNC020R	295.93	519.86					407.9
JJNC020SB	122.70	1101	65.65				429.8
JJNC022L	26.53	21.27	20.49		-	-	22.8
JJNC023L	46.47	45.26					45.9
JJNC023R	226	353					289.7
JJNC024L	33.20	35.73					34.5
JJNC024SB	485						485.3
JJNC025L	58.20	11.30	9.74			-	26.4
JJNC025SB	55.07	59.14		-		-	57.1
JJNC026L	6.64	38.60			-		22.6
JJNC026L	44.37	12.70	22.70	43.48		-	30.8
JJNC026SB	9.81	9.88	10.20				10.0
JJNC027R	74.76	51.70					63.2
JJNC028L	72.55	7.08	51.00	45.67		-	44.1
JJNC028SB	378	159					268.7
JJNC029SB	18.18	11.09				-	14.6
JJNC029L	707	1733					>500

JJNC030L	14.77	17.03					15.9
JJNC030SB	389	431					410.4
JJNC030R	70.41	9.36	20.20				33.3
JJNC031SB	110	87.12					98.9
JJNC032L	13.61	10.70					12.2
JJNC032SB	39.99	8.25	64.00				37.4
JJNC033SB	50.03	56.45					53.2
JJNC034WP	251	149					200.5
JJNC035SC	109	131	250				163.9
JJNC035L	330	174	14436				252.4
JJNC036R	7.66	52.08	85.40	15.60	5.98		33.3
JJNC037SB	300	183	489	474			362.0
JJNC037L	46.31	266	98.78	168			145.1
JJNC038L	25.68	75.59	58.86	12.98			43.3
JJNC039SB	283	46.45	211	334			219.0
JJNC040SB	2715	5579	849				>500
JJNC041WP	163	268					215.9
JJNC042WP	73.87	294	153	74.35	27.53	67.39	115.0
JJNC043SB	227	287	185				233.6
JJNC044WP	24.88	2.14	5.40				10.8
JJNC045L	14783	440					>500
JJNC046L	528	118					323.4
JJNC047WP	65.22	54.18	32.86	67.76			55.0
JJNC048L							
JJNC048SBL	33.54						33.5
JJNC049LSB	32.20	62.68					47.4
JJNC050L	36.60	86.50	51.80				58.3
JJNC050SBL	113	86.40					100.0
JJNC051ST	65.61	90.82	91.90	93.82			85.5
JJNC051L	160	200					180.3
JJNC052L	48.40	20.47					34.4
JJNC052SB	39.29	306					173.0
JJNC052R	105						105.2
JJNC053WP	0.64						0.6
JJNC054WP	167	454					310.7
JJNC055L	97.37	150	43.80	21.70			78.4
JJNC055SC	117	152					135.3
JJNC056L	40.40	101					71.1
JJNC057SB	117	118					117.9
JJNC058SB	85.98						86.0
JJNC058RB	97.35	95.08					96.2

- (2) (1)において IC₅₀ 値 50 μ g/ml 以下の殺原虫効果を示した 25%の粗抽出物について、FACS によるアポトシス及び細胞周期異常の検出を行った結果、9 種において 25 μ g/ml 以下の低濃度でアポトシスを誘導していることが明らかとなった。特に興味深いのは JJNC008L においては、アポトシスとネクロシス両方を誘導する作用を持つことが明らかとなった(Fig. 1)。また、細胞周期解析においては、アポトシス誘導を示した多くのものは G₂/M phase の欠損が見られ、DNA 複製から核分裂にいたる何らかの作用が阻害されていることがわかった (Fig. 2)。JJNC008L においては、DNA 量が激減している細胞集団が顕著に誘導され (矢印、Fig. 3)、細胞サイズ自体が縮小している可能性が示唆された。

Fig. 1

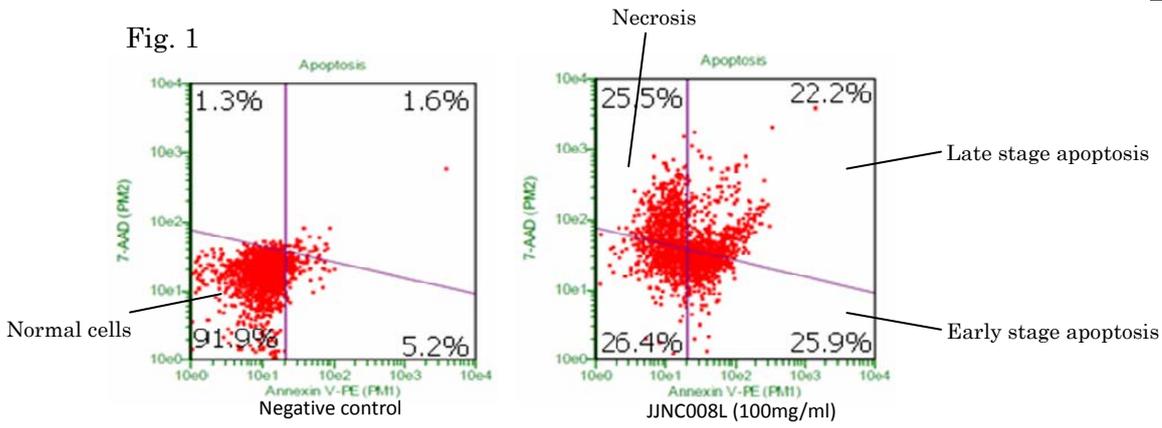


Fig.2

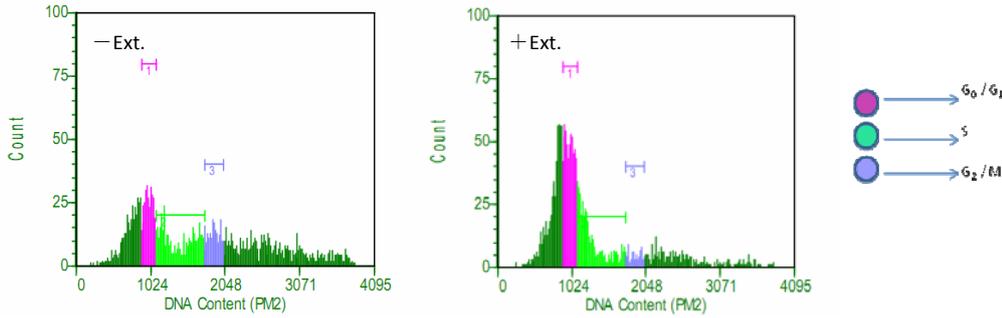
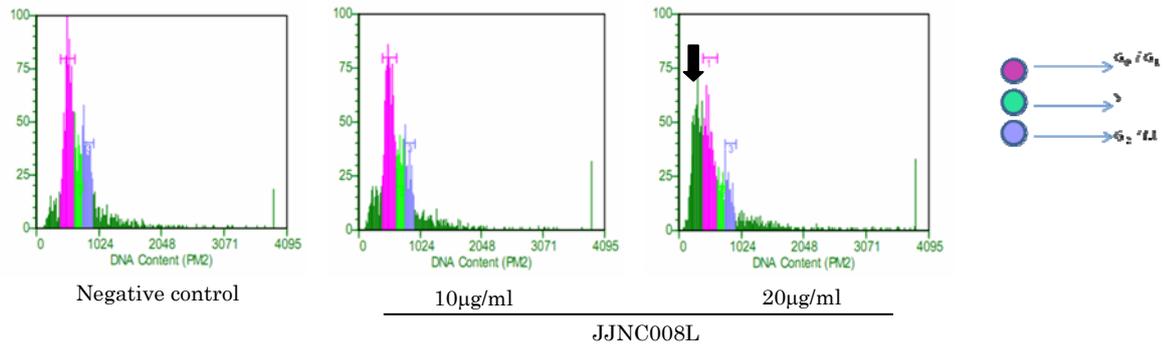


Fig.3



(3) 強い殺原虫活性を示した 25%の浴抽出物について、DAPI による核染色、 α -tubulin 抗体を用いた免疫染色を行った結果、多くの場合、一つの細胞に 2つの核が存在する状態の細胞 (4n cell) の減少が見られた (Fig.4)。これは、FACS を用いた細胞周期解析における G₂/M phase の欠損という結果と一致する。JJNC008L においては、核の形状変異 (Fig. 5 白矢印) と共に高濃度では鞭毛を持たない球体の細胞が多く観察され、それら球体の細胞では α -tubulin の発現が抑制されていた (Fig.5 赤矢尻)。以上の結果から、JJNC008L の作用機序として、 α -tubulin 発現の抑制などを介して、鞭毛形成を阻害していることが強く示唆された。

Fig.4

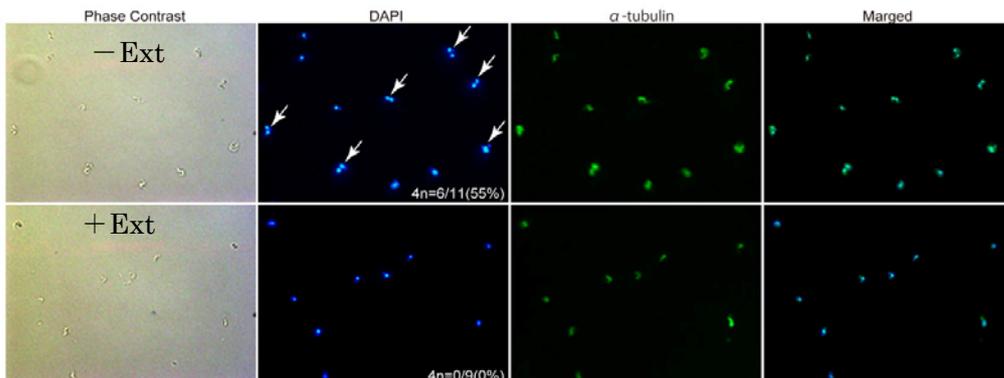
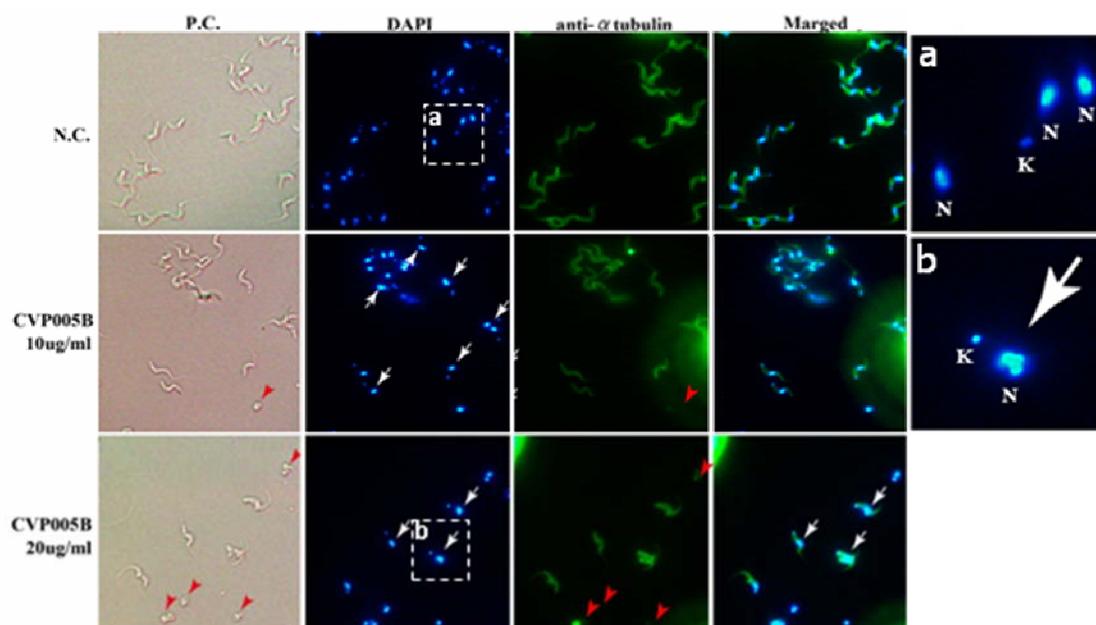


Fig.5



(4) IC₅₀ 値 10 μ g/ml 以下の殺原虫活性を有し（哺乳類細胞への毒性なし）、さらに FACS 及び免疫染色において大変興味深いデータが得られている JJNC008L および JJNC053WP について分画、精製作業に進めた。JJNC008L については、CSRPM にて水親性による分画で 5 種（ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水）の画分にわけたもののうち、ヘキサン、クロロホルム画分において強い殺原虫活性が検出されたため、クロロホルム画分より成分精製を開始した（長崎国際大学報告の通り）。現在までに 4 種について精製が完了しそのうち 3 種が成分名、構造共に明らかとなった。そのうちの一つの成分は新規の構造を有していることが明らかとなった（論文投稿準備中）。今のところ、抗寄生虫活性を示す成分は得られていないが、残りの成分について精製と殺原虫効果の解析を継続中である。JJNC053WP については CSRPM にて同様に分画を行ったところ、クロロホルム、酢酸エチル、ヘキサンの画分で強い活性を検出した。現在活性成分の精製を行うための大量調製が CSRPM にて進められている。

Table 2) JJNC008L 分画、精製成分についてのアッセイ結果

		IC50 [ug/ml]				Apoptosis	Cell Cycle
From CSRPM	Crude	JJNC008L	6.11	10.65	+++	-	
	fractions	JJNC008L A	254.27	265.26	-	25	Normal
		JJNC008L B	324.9	268.9	-		Normal
		JJNC008L C	1.212	2.565	+++	12.5	G2/M arrest
		JJNC008L E	14.5		++	12.5	Normal
		JJNC008L H	3.79		+++	25	Normal
From NIU	fractions	JJNC008L	58.7	28.043	++		
		JJNC008L B	>100		-		
		JJNC008L C	14.24	35.7	++		
		JJNC008L E	59.5		+		
	compounds	JJNC008L-C-1	>100		-		
		JJNC008L-C-2	>100	>100	-		
		JJNC008L-C-3	>100	>100	-		

		New compound	>100	>100	-		
--	--	--------------	------	------	---	--	--

Table 3) JJNC053WP 分画、精製成分についてのアッセイ結果

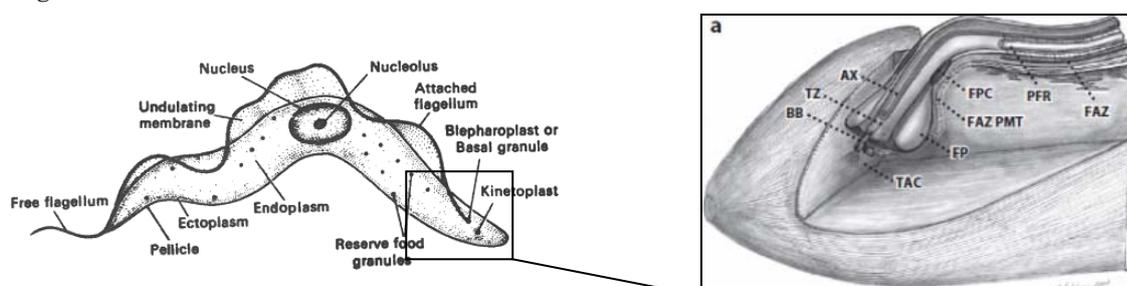
		IC50 [ug/ml]		
Crude	JJNC053WP	9.24	9.3	+++
fractions	JJNC053WP A	>100	>100	-
	JJNC053WP B	89.59	26.4	-
	JJNC053WP C	15.14	5.58	+++
	JJNC053WP E	28.89	5.72	++
	JJNC053WP H	13.07	4.21	+++

(5) 29-13 株において RNAi による遺伝子ノックダウンのシステムを野口研にて確立した。現在、活性成分探索中の JJNC008L において、鞭毛形成阻害という作用が観察されるため鞭毛にかかわる数種の遺伝子についてクローニングを行い、現在、抗体作製を進めている。以下にその他抗体作製の進捗を示す。

Table 4) 鞭毛形成にかかわる分子（詳細は Fig.6 参照）の抗体作製状況

遺伝子	発現領域	クローニング	リコンビナントタンパク質作製	抗体作製	条件検討
UNC119	FP	○	○	○	○
PFR2	PFR	○	○	作成中	
PF16	FAZ	○	作成中		
TFR	FP 膜	○	○	準備	

Fig. 6



(6) 長崎国際大学にて植物 B 粗抽出物の調製後、野口研にてガーナ産植物スクリーニングと同じ系を用いた殺原虫効果の判定を行った結果、陽性対象としている Berberine（標準成分）の IC₅₀=3.8μg/ml と同等の 3.04 μg/ml を示した。そこで、予定通り長崎国際大学にて b 類の成分精製を行って、これまでに 7 種類の単離成分について殺原虫効果の解析を行った。その結果、b-1、b-2、b-3 にて Berberine を大幅に上回る IC₅₀=0.5 μg/ml の大変強い殺原虫効果を示した (Table 5)。

Table 5) 植物 B の活性成分を獲得

	Ext. name	IC50 (μg/ml)	Cell cycle (10μg/ml)
	B crude	3.842	No effect
Compounds	B-1	0.585	G2/M phase arrest
	B-2	0.545	G2/M phase arrest
	B-3	0.595	G2/M phase arrest
	B-4	10.175	—
	B-5	36.288	—
	B-6	22.687	—
	B-7	531.929	—

- (7) 長崎国際大学で抽出した植物 C 粗抽出物は IC₅₀ が 0.707 μg/ml と高い活性を有するが、Jurkat 細胞を用いた細胞毒性試験では少なくとも 10² オーダーでの選択毒性を示すことが明らかとなった。また、*in vitro* で投与後 4 時間の時点で強い殺原虫活性を示すことが明らかになり、これも論文を準備中である。

Fig.7

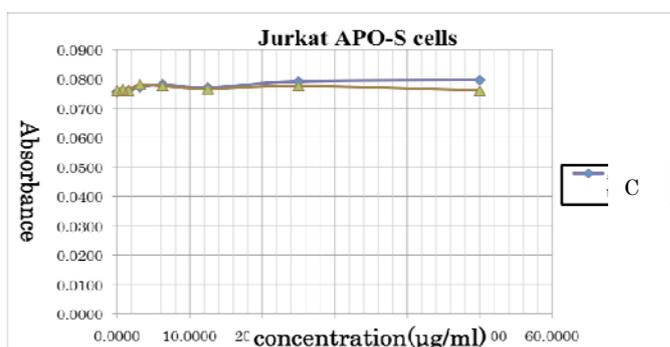
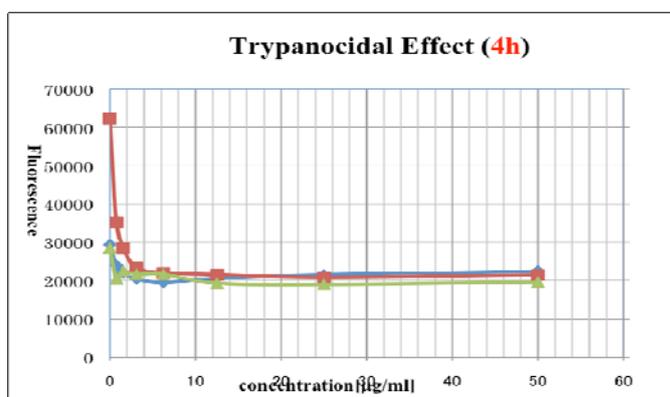


Fig.8



④ カウンターパートへの技術移転の状況

野口研に派遣中の本課題の専門家（鈴木光子）と連携しながらカウンターパートへの技術移転を進め

ている。上記(1)-(3)で用いた Alamar blue による殺原虫活性評価システム、FACS によるアポトシス、及び細胞周期解析システム、蛍光顕微鏡を用いた蛍光免疫染色の検出システム全てにおいて野口研寄生虫学への導入を完了し、ガーナ産植物を用いたスクリーニングに運用されている状況である。Alamar blue のシステムおよび、FACS の取り扱いについてはカウンターパートフェローのもとでリサーチアシスタント(RA)が実験を行い、データベースへのデータ集計、管理を行っている。また月例進捗レポートおよび月例進捗ミーティングのプレゼンテーションも自力で作成している。現在、蛍光顕微鏡を用いた免疫染色、および *T. brucei* 29-13 株を用いた遺伝子発現解析、RNAi の手法などを技術移転課題としており、カウンターパート研修として野口研の Mr. Kwadwo K. Frempong が平成 24 年 1 月 10 日から平成 24 年 2 月 10 日まで来日し、東京医科歯科大学にて研修した。さらに今年度は JST 事業として野口研で実際に実験に従事する若手研究者 2 名 (Mr. Kofie、Ms. Ammah) を 3 週間ずつ日本に招聘して技術研修を実施した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

プロジェクト発足当初より野口研所長により精製や構造解析など高度な技術と機材を要する解析を全て日本で行うことへの懸念が表明されていた。しかしながら、システムを全てガーナに導入しガーナで行うことは時間的にも技術的にも限界がある。そこで SATREPS 事業部岡谷室長と相談し、プロジェクトで雇っている 8 人の若手研究者 (リサーチアシスタント) をサンプルと同時に本邦へ送り、彼らが研修できる環境を整えることで日本での精製と構造解析を早急に行うことのできることを得た。これによって 4 種の成分単離と 3 種の構造解析が完了し、そのうち 1 つは新規構造を有していたことから、現在論文投稿準備中である。これらはプロジェクトの大幅な加速を実現する一助となっただけでなく、実際に手を動かしている若手リサーチアシスタントに日本の研究室の雰囲気を感じ、同じ世代の日本人若手研究者が日々の研究に取り組む姿勢を目の当たりにしてもらいよい機会となった。今後 3 年間で抗寄生虫活性成分の単離に留まらず、動物臨床実験も含めたガーナ産薬剤の開発に向け努力したい。

B. 長崎国際大学グループ

(1) 研究題目：ハーブ抽出物の有機化学的研究

① 研究のねらい

ウイルス複製、寄生虫増殖を制御できる有用な植物由来抽出物を見出すために、リストアップしたガーナ由来薬用植物の採取を進め、各種一次バイオアッセイのために粗抽出エキス調製を行う。期待する効果が得られた植物サンプルについては各種有機溶媒を用いた分画やさらなる精製・単離を行い、バイオアッセイを繰り返すことにより最終的に有効成分の同定を目指す。

② 研究実施方法

1) 植物 A 抽出エキスに含まれる有効成分 a 類の構造解析および活性評価

前年度得られた乾燥植物 A 抽出エキスをセファデックス系のカラムクロマトにより精製し活性予測がなされた有効成分 a 類に付き更に繰り返しカラムを行い、有効成分 a 類-1 から 1 種、有効成分 a 類-2 から 3 種、有効成分 a 類-3 から 3 種の化合物の構造決定を行い、それらにつき山岡研究室にて活性を評価した。その結果、有効成分 a 類-3 に弱いながらも活性が認められた。引き続き精製を進めた結果、有

効成分 a 類-3 のフラクションから 1 種、有効成分 a 類-4 のフラクションから 1 種、有効成分 a 類-5 のフラクションから 1 種の化合物を新たに単離し構造決定した。これら 3 種の有効成分 a 類については活性評価に進んだ(医科歯科大学潜伏感染 HIV-1 プロウイルスを活性化する植物成分の解析の項、Tc-1, -2, -3 の結果参照)。なお、有効成分 a 類-5, 有効成分 a 類-6 及び有効成分 a 類-7 のフラクションからの更なる精製は、それぞれの有効成分 a 類の含量が極めて低いため、又、NMR による構造解析に限度が有るため、単離構造決定は極めて困難な感触を得ている。

2) 植物 B メタノール粗エキスからの有効成分 b 類の精製・単離および抗 Trypanosoma 活性評価

抗ウイルス作用が報告されている有効成分 b 類を高濃度に含有する植物 B メタノール粗エキスは、ポジティブコントロールとなりうる可能性が考えられる。植物 B メタノール粗エキスから有効成分 b 類を精製・単離し、それぞれの有効成分 b 類の化合物につき太田研究室と連携して抗 Trypanosoma 活性評価を行った。その結果、メジャーな成分である単一化合物 b-1 および他 2 種の有効成分 b 類(単一化合物 b-2、単一化合物 b-3 に強い抗 Trypanosoma 活性を見出した。又、新化合物 4 種を単離構造決定したので、太田研究室にて活性評価がなされる予定である。

3) 植物 C メタノール粗エキスからの有効成分 c 類の精製・単離および抗 Trypanosoma 活性評価

4 種の植物(植物 C、植物 D、植物 E、植物 F) 粗エキスについて抗 Trypanosoma 活性を評価した結果、植物 C に強い活性が見出された。このため同粗エキスをパーティションにより分画、クロロフォルム画分に活性が集中していたので、本画分を各種クロマトにより精製・単離し、10 種の化合物を単離・構造決定した。これらの中で比較的含有の高い有効成分 c 類の化合物 6 種につき太田研究室にて活性評価を行い、高い抗 Trypanosoma 活性が認められた。更に精製を進め、4 種の新化合物の単離・構造決定に成功した。これらサンプルに付いても太田研究室にて活性評価が行われつつある状況である。

4) 候補植物としてリストアップされたガーナ産植物の抽出エキス調製と各種有機溶媒での画分調製

初年度にリストアップされた約 100 種類の候補植物の採取を進めた。採取植物の採取場所・日時・採取量・写真などはデータベースに保存し CSRPM にて管理している。採取された植物から順次粗エキス調製を行い、凍結乾燥した粗エキス粉末を NMIMR の 3 部門に送り、抗 HIV 活性および抗 Trypanosoma 活性評価を行った。活性が得られた植物は、水と各種有機溶媒にて順次分配を行い、各フラクションを用いて活性評価を行った。活性画分については主としてセファデックス系のカラムクロマトに付し活性を指標として精製を進める。植物の粗エキス粉末名及び分画粉末名は CSRPM および NMIMR にて二重コード化し、柏原現地調整員にてデータベース化し、JCC での合意事項に基づき Principal Investigator と位置づけられた野口研所長、CSRPM 所長、チーフアドバイザー、正山のみ閲覧可能とした。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

1) 植物 A 抽出エキスに含まれる有効成分 a 類の構造解析および活性評価

植物 A (990 g) を粉碎後、80%エタノール抽出し(3 L×3, 40°C, 12 時間、sonication)粗エキス(60 g)を得た。TLC の検討から有効成分 a 類はエキスの 5%前後の含量と推定した。また、有効成分 a 類-4~6 に相当するスポットを確認し、セファデックスを中心としたカラムクロマトを繰り返して分画・精製し、有効成分 a 類-1 (1 種)、有効成分 a 類-2 (3 種)、有効成分 a 類-3 (4 種)、有効成分 a 類-4 (1 種)、有効成分 a 類-5 (1 種)の精製・単離・構造決定に成功した。有効成分 a 類-1~3 について山岡研究室で抗 HIV 活性が評価され、有効成分 a 類-3 に若干の活性が認められたので、有効成分 a 類-4~6 につい

でも精製・単離を進めている。

2) 植物 B メタノール粗エキスからの有効成分 b 類の精製・単離および抗 HIV 活性評価

有効成分 b 類を高濃度に含有する植物 B を九州大学演習林より分与頂き、植物 B を乾燥 (1.1 kg) 後、エタノール抽出 (3 L×3, 40°C, sonication) エタノールエキスを得た。本エキスに抗 *Trypanosoma* 活性が認められたので、本粗エキスについて水-有機溶媒系で分配精製、さらに各種クロマトを繰り返して、単一化合物 b-1 を主成分とする 10 種の有効成分 b 類を単離し、その 3 種に強い抗 *Trypanosoma* 活性が認められた。新化合物 4 種に付いても活性評価中である。

3) 植物 C メタノール粗エキスからの有効成分 c 類の精製・単離および抗 *Trypanosoma* 活性評価

植物 C エキスから単一化合物 C を主成分とする有効成分 c 類を単離・構造決定し、これらの中で比較的含量の高い化合物 6 種に付き太田研究室にて活性評価を行い、高い抗 *Trypanosoma* 活性が認められた。更に精製を進め、4 種の新化合物の単離・構造決定に成功した。これらサンプルに付いても太田研究室にて活性評価が行われつつある状況である。



CSRPMでの粗エキス調製



凍結乾燥された粗エキス粉末はコード化されNMIMRへ送られる

4) 候補植物としてリストアップされたガーナ産植物の抽出エキス調製と各種有機溶媒での画分調製

A. 植物の採取

2011 年 8 月の時点で初年度にリストアップされた約 100 種類の約半数の植物しか採取されておらず、当初の計画より大幅に遅れていた。8 月の宇都短期専門家の訪問時に CSRPM の植物採取担当の Ampaw 氏と話し合い、残り 55 種類の植物のうち 32 種類を 2012 年 1 月までに採取完了し、23 植物に関しては市場などで購入することを決めた。その後、若干の遅れはあったが、2012 年 1 月末の段階でリストアップされたほとんどの植物採取を完了することが出来た。

B. エキス調製のスピードアップ化

昨年度より CSRPM における粗エキスの調製のスピードが遅く、それに伴い NMIMR でのバイオアッセイも遅れ、プロジェクト全体の進行上課題となっていた。森永および宇都短期専門家の現地訪問により、実態調査を行い現地の状況に即した簡便な方法を検討した。これまで採取した植物全量を用いて抽出を行っていたが、植物粉末と抽出溶媒 (50%エタノール) の大幅なスケールダウン化、またロータリーエバポレーターでの効率的な濃縮法を行ったところ、バイオアッセイでの初期スクリーニングに必要な十分量を毎月 10 サンプル以上調製することが可能になった。現在、粗エキス調製のスピードは NMIMR でのバイオアッセイの進行に影響を与えず、効率的に進んでいる。

C. 活性のあった植物サンプルの画分調製

NMIMR での初期スクリーニングにおいて、抗 HIV-1 活性および抗 *Trypanosoma* 活性があった植物サンプルは分画やカラムクロマトを用いて精製・単離を行う。CSRPM において森永および宇都短期専門家訪問時に、基本的な分画調製方法について説明した。初期スクリーニングにおいて 1 サンプル (コード JJNC008L) で活性が確認されており、各種有機溶媒を用いて分画調製を行い、それらを用いて現在 NMIMR 及び東京医科歯科大においてバイオアッセイを行っている。



CSRPM での分画調製



JJNC008L の分画サンプル

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

1) 平成 23 年 8 月: CSRPM への宇都短期専門家訪問

リストアップされた植物の採取に関する計画作成とエキス調製のスピードアップを中心に技術指導した。

- エキス調製のスピードアップ化の説明とデモンストレーション
- 植物採取のスケジュール検討会議
- 分画方法の説明とデモンストレーション
- 凍結乾燥機のメンテナンス法説明
- 水道水の現状確認と蒸留水装置の設置検討
- ディープフリーザーの設置



凍結乾燥機のメンテナンス法説明



分画方法の説明とデモンストレーション

2) 平成 23 年 8 月: CSRPM への森永短期専門家訪問

エキス調製のスピードアップ化と蒸留水装置のセットアップを中心に技術指導した。

- エキス調製のスピードアップ化の検討
- CSRPM での蒸留水装置の設置検討
- HPLC セットアップ
- 植物エキスの保存方法の指導

3) 平成 23 年 7 月～9 月: CSRPM の Aboagye Frederick Asare 氏が NIU 研究室で研修

エキス調製から、分画、成分精製、構造決定まで、植物エキスから精製成分同定までの一連の実験手法を習得した。

- スピードアップ化されたエキス調製法
- HPLC 操作法

- 各種カラムクロマトグラフィーを用いた植物成分単離
- NMR を用いた構造決定 CSRPM での蒸留水装置の設置検討
- HPLC セットアップ



HPLC を用いた解析法説明

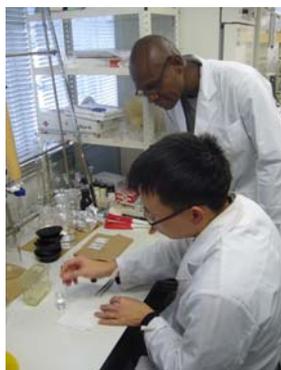
4) 平成 23 年 11 月：CSRPM への森永短期専門家訪問

CSRPM 新所長 Edoh 氏への挨拶と HPLC のセットアップを中心に活動した。

- Edoh 氏との面会およびプロジェクト説明
- HPLC のセットアップ
- Aboagye Frederick Asare 氏の技術フォローアップ
- 植物市場調査

5) 平成 24 年 1 月～3 月：CSRPM の Vincent Tettey 氏が NIU 研究室で研修

エキス
まで、植物
の実験手
と分取



調製から、分画、成分精製、構造決定
エキスから精製成分同定までの一連
法を習得した。さらに分析用 HPLC
HPLC の取り扱いを習得した。

分画サンプルを用いて TLC を行う様子

6) 平成 24 年 1 月～3 月：野口研 Clinical Pathology 部門 Mark Ofosuhene 博士が NIU 研究室で研修

多種類の細胞培養から *in vitro* 毒性試験、アポトーシスの検出まで、一連の植物抽出物に関する毒性試験をすべて習得した。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0件、国際 1件)

本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 1件)

③ 論文詳細情報(著者名、発表論文タイトル、掲載誌(誌名、巻、号、発表年)などを発行日順に記載して下さい)。なお、同一の論文は一報として記載して下さい(グループ毎の重複記載は不要)。

Takuhiro Uto, Guo-Weo Qin, Osamu Morinaga, Yukihiro Shoyama. 17-Hydroxy-jolkinolide B, a diterpenoid from *Euphorbia fischeriana*, inhibits inflammatory mediators but activates heme oxygenase-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2012 Jan;12(1):101-9.

(2) 特許出願

① 本年度特許出願内訳(国内 0件、海外 0件、特許出願した発明数 0件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 0件)

4. プロジェクト実施体制

(1)「東京医科歯科大学」グループ(研究題目)ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

① 研究者グループリーダー名: 山岡 昇司 (東京医科歯科大学・教授)

② 研究項目

抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容: HIV-1 潜伏感染 T 細胞株の樹立

ハーブ抽出物の抗 HIV 活性をスクリーニングするためのアッセイ系開発

抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

抗寄生虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

(2)「長崎国際大学」グループ(研究題目)ハーブ抽出物の有機化学的研究

① 研究者グループリーダー名: 正山 征洋 (長崎国際大学・教授)

② 研究項目

ハーブ抽出物の有機化学的研究

以上