

氏 名 (生年月日) お だ よ し み 尾 田 好 美 (1984 年 12 月 17 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 科 学)

学 位 記 番 号 博薬科 第13号

学位授与の日付 2018年9月28日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 *Lawsonia inermis* の部位別 lawsone 含有量の比較および有効利用に向けた
花部および枝部の神経細胞様分化促進作用物質の探索

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 松 田 久 司

(副査) 教 授 高 田 和 幸

(副査) 教 授 渡 辺 徹 志

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

アーユルヴェーダ医学や中医学などの伝統医学や民間療法において用いられる薬用植物には薬用としての使用部位 (薬用部位) が定められており, 使用部位と不使用部位が存在する. このような違いは薬効成分の含有量の差や伝統的な利用に基づいている. これまでほとんど研究されていない未利用部位に新たな機能性を見出すことができれば, 植物の有用性を高めるとともに, 既知の利用部位に含まれる有効成分とは異なる新たなシード化合物の発見も期待できる.

Lawsonia inermis L. は日本, インド, 中国およびエジプトなど多くの国で栽培されるミソハギ科の植物である. 一般的に “Henna (ヘナ, ヘナ)” と呼ばれ, アーユルヴェーダ医学や中医学では葉部が頭痛, 創傷の治療などに外用される. その他, インドでは古くから婚礼や儀式の際にタトゥーとして, また日本でもヘアカラーやヘアトリートメントとして広く使用されている. 一方, 葉部の収穫の際に廃棄される花部および枝部の含有成分や生体機能性については報告例がほとんどないことから, 新規有効成分探索の研究素材となり得る. そこで, *L. inermis* 未利用部位の有効利用を目的として研究を行った.

第1章 *L. inermis* 部位別 lawsone 含有量の比較

L. inermis 葉部には, 特徴的な含有成分として lawsone と呼ばれる 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone が知られている (図 1). Lawsone (1) は髪や肌のタンパク質に結合することで染色作用を示すことから, 葉部は染色剤としても有名である. しかしながら, 葉部収穫時に得られる枝部は利用されておらず, 花部についてもわずかに香水で

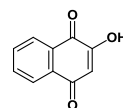


図1.

化合物1の化学構造

使用されるのみである. また, これまでに1が*L. inermis*の葉部以外の部位に含有されているかどうかは明らかにされておらず, 花部および枝部のlawsone含有量が少なければ, 染色効果をほとんど示すことのない, 葉部とは異なる機能性を示す研究素材となり得る. そこで,*L. inermis*の花部, 葉部および枝部に含有される1の量を, 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて測定した. その結果, 花部メタノール抽出エキスを117 µg/g, 葉部メタノール抽出エキスを486 µg/gお

よび枝部メタノール抽出エキスを 5.4 $\mu\text{g/g}$ 含有されていることが明らかとなった (図 2). さらに各部位のエキス収率 (順に 31.8, 35.2, 6.0%) を考慮すると, 花部では葉部の約 1/5, 枝部では葉部の約 1/500 の lawsone 含有量であることがわかった. 以上のことから *L. inermis* の花部および枝部は染色効果の少ない素材であることが明らかとなった.

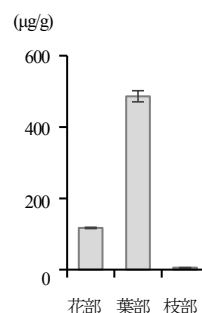


図2. 部位別エキス中 lawsone 含有量

第2章 *L. inermis* 花部および枝部の神経突起伸長促進作用

花部は鎮静作用などを目的に香水として使用され, 中枢への作用を持つ成分の含有が期待される. そこで, 神経細胞の突起伸長を促す物質を見出すことを目的に, ラット副腎髄質由来褐色細胞腫PC12細胞を用いて神経突起伸長促進作用を検討した. なお, 同様の研究で従来報告されているような, 血清量を極端に減らし突起伸長を誘導させるといった急激な変化は, 本来生体内で起こり難いと考えられたことから, 血清量の変化が無い実験条件にて検討した. その結果, それぞれのメタノール抽出エキスを作用傾向が認められ, 花部酢酸エチル可溶性画分は 10 $\mu\text{g/mL}$ において

対照群の 1.89 倍と有意な作用を示した. さらに作用成分および含有成分の解明を目的に, 花部および枝部の酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分について, 順相シリカゲル, 逆相 ODS および HPLC を繰り返し使用し, 分離・精製を行い, 花部より新規アセ

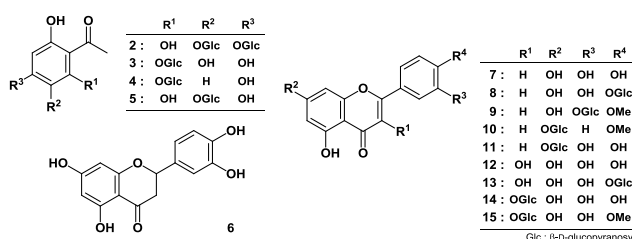


図3. *L. inermis* 花部より単離した化合物 2-15 の化学構造

トフェノン配糖体 inermioside A (2), および既知化合物 3-15 を (図 3), 枝部より既知化合物 4, 14, 16-22 を単離・同定した (図 4). なお, 6, 9, 13-22 の本植物からの単離は初めての報告である. 花部では quercetin (12) をはじめとするフラボノイドが多く単離され, これが花部の特徴と考えられた. 一方, 枝部から単離されたフラボノイドは微量であった. 単離化合物についても神

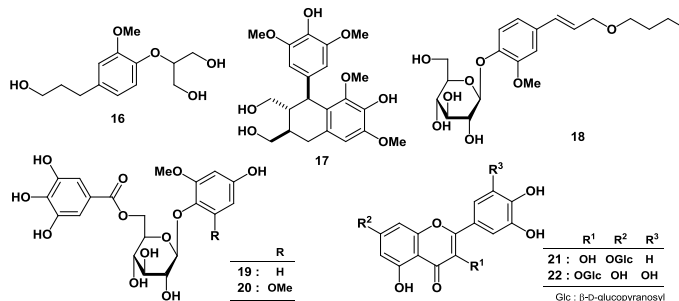


図4. *L. inermis* 枝部より単離した化合物 16-22 の化学構造

経突起伸長促進作用を検討した結果, 新規化合物 2 は 10 μM 処理で対照群の 1.80 倍と有意な作用を示した. 既知化合物 12, 16 および 21 もまた, それぞれ順に 10 μM 処理で 2.16 倍, 1 μM 処理で 1.76 倍, 10 μM 処理で 1.95 倍と有意な作用を示した. また, いずれの化合物も WST-8 法による細胞毒性は認められなかった. 最も強い作用を示した化合物 12 の作用様式を検討する目的で, 神経突起伸長に關与する Ntrk1, Vav3 および Rac1 の mRNA 発現への影響について検討した. その結果, 12 は Vav3 の mRNA 発現量を増加させており, メカニズムの一つとして Vav3 の発現を介した経路が考えられた. なお, Vav3 の mRNA 発現量を増加させる低分子化合物としては初めての報告である.

結論

今回, *L. inermis* 葉部の染色作用成分 lawsone (1) の部位別含有量を測定することで, lawsone が葉部に集約していることを初めて明らかにし, 花部および枝部は染色効果をほとんど示さずに利用できる素材であることが判明した. また, 花部および枝部の新たな機能性として, 培養および実験条件間の血清量変化の無い条件にて, 新規化合物 2 や, 既知化合物 12, 16 および 21 に神経突起伸長促進作用を見

出した。これらは認知症を含む神経変性疾患で失われた神経細胞の機能を補填するような有望なシード化合物と考えられ、これまで未利用であった *L. inermis* 花部および枝部の有効利用につながる有意義な研究成果が得られたと考えられる。

審査の結果の要旨

アーユルヴェーダ医学や中医学などの伝統医学や民間療法において用いられる薬用植物には薬用としての使用部位が定められており、使用部位と不使用部位が存在する。これまでほとんど研究されていない未利用部位に新たな機能性を見出すことができれば、植物の有用性を高めるとともに、既知の利用部位に含まれる有効成分とは異なる新たなシード化合物の発見が期待できる。そこで申請者は、日本をはじめ多くの国で栽培されるミソハギ科植物 *Lawsonia inermis* L. に着目し、葉部収穫時に廃棄される花部および枝部の有効利用を目的としてラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた神経突起伸長促進作用の検討をおこなった。

1) *L. inermis* 部位別 lawsone 含有量の比較

L. inermis 葉部の特徴成分として lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) が知られている。この成分が髪や肌のタンパク質と結合し、染色作用を示すことから、葉部は染色剤としての利用方法が確立されている。しかしながら、葉部収穫時に同時に得られるにもかかわらず、花部および枝部は有効利用されていない。また、lawsone が葉部以外の部位に含有されているかどうかは明らかにされていない。そこで、申請者は花部および枝部の有効利用を目指して、LC-MS を用いて部位別の lawsone 含有量を測定した。その結果、lawsone は葉部に集約し、花部および枝部の含有量はわずかであることを初めて明らかにした。すなわち、花部および枝部は染色効果をほとんど示さずに利用できる、新規機能性成分探索の研究素材であることが判明した。

2) *L. inermis* 花部および枝部の神経突起伸長促進作用

申請者は、花部および枝部の新たな機能性を見出す目的で、PC12 細胞を用いて神経突起伸長促進作用を検討した。この実験においては、従来報告されているような血清量を極端に減らし突起伸長を誘導させるといった方法ではなく、血清量の変化が無い条件にておこなった。その結果、花部および枝部メタノール抽出エキスに神経突起伸長を促進させる傾向が認められ、特に花部酢酸エチル可溶性画分に有意な作用を見出した。続いて、作用成分および含有成分の解明を目的に、花部および枝部の酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分について各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離精製をおこなったところ、1 種の新規アセトフェノン配糖体 inermioside A を含む計 21 種の成分を単離し、それらの化学構造を明らかにした。その内 13 種の成分は本植物からの単離は初めての報告である。また、単離化合物について神経突起伸長促進作用を検討した結果、inermioside A を含む 4 種の成分に有意な作用を見出し、これらは、認知症を含む神経変性疾患で失われた神経細胞の機能を補填するような有望なシード化合物であると考えられた。

以上、本研究は、未利用であった *L. inermis* 花部および枝部の価値を高め、有効利用につながる研究成果が得られたことから、新規機能性素材および機能性成分の開発研究の一助となると考えられ、高く評価できる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士 (薬科学) の学位論文としての価値を有するものと判断する。