

氏名(本籍)	WONG, CHIN PIOW (マレーシア)		
学位の種類	博士(薬学)		
学位記番号	甲第159号		
学位授与年月日	平成25年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者		
学位論文の題名	Research of ceramicines from <i>Chisocheton ceramicus</i> on anti-lipid droplets accumulation activity		
論文審査委員	主査	教授	森田博史
	副査	教授	小林恒雄
	副査	教授	細江智夫

論文内容の要旨

The invaluable terrestrial plants as a source of drug candidates initiate us to explore deeper in the research on plant natural products. Countless species from the Meliaceae family have generated much interest due to their various significant biological activities. Activities such as insecticidal, insect anti-feedant, anti-bacterial, anti-fungal, anti-malarial, anti-cancer, and anti-viral have so far been reported.

The biological activities shown by plant natural products made it an interesting source for various medical conditions including obesity. The cause of obesity morbidity is divided into two attributes, increase of lipid mass and increase of lipid cells numbers. Both of these attributes could be decreased by reducing lipid-droplets accumulation (LDA) and adipocyte differentiation.

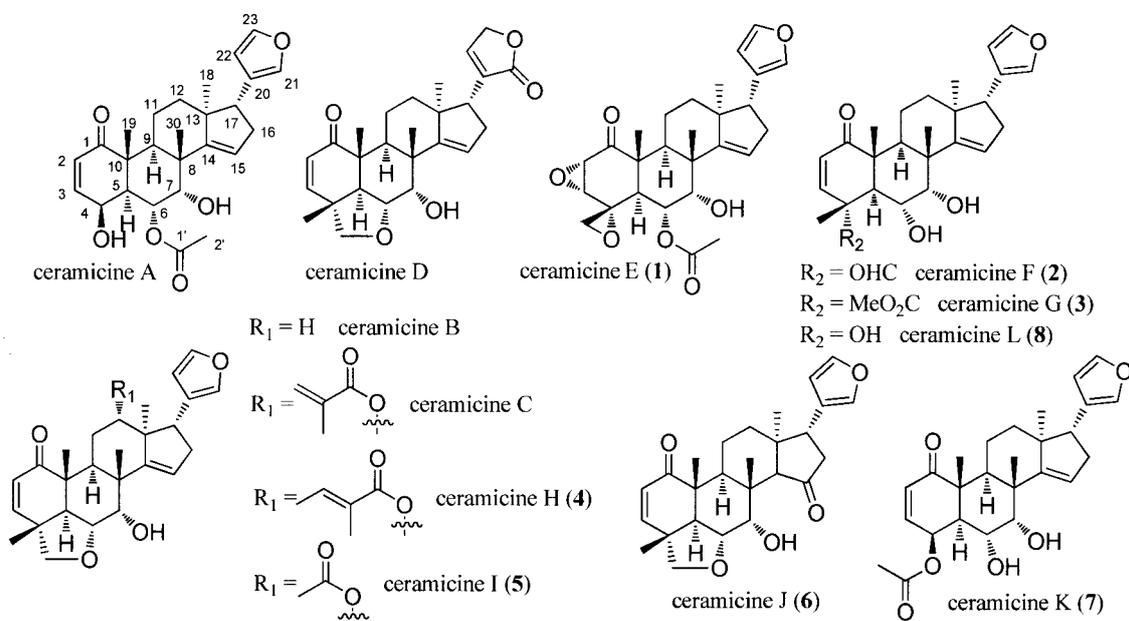


Figure 1. Structures of previously reported ceramicines A-D and eight new limonoids, ceramicines E-L (1-8)

The objective of present study is to identify compounds from *Chisocheton ceramicus* Miq (*C. ceramicus*) with anti-LDA activity on mouse pre-adipocyte cell line, MC3T3-G2/PA6 cells. Investigation showed that previously isolated ceramicine B possessed anti-LDA activity (Figure 2). In effort to identify additional compounds with anti-LDA activity, *C. ceramicus* bark extract and subsequent hexane fraction were studied. Further investigation led to isolation of eight new limonoids, ceramicines E-L (1-8) and their relative structures were elucidated by using 1D and 2D NMR data.

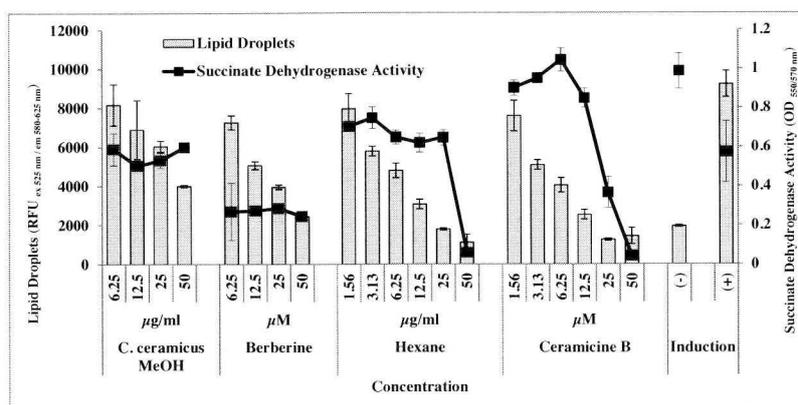


Figure 2. Anti-LDA activity of *C. ceramicus* bark methanol extract, hexane fraction, and ceramicine B on mouse pre-adipocyte cell line, MC3T3-G2/PA6 cells were compared to berberine used a control (bar). Anti-LDA activity was measured using Nile red lipid droplets fluorescent staining method. Cytotoxicity of samples was measured indirectly via mitochondrial succinate dehydrogenase activity (solid square) using MTT assay.

Structure Elucidation of Eight New Limonoids, Ceramicines E-L (1 – 8) from *C. ceramicus* Bark

Ceramicine E (**1**) was isolated as a colorless amorphous solid and had molecular formula, $C_{27}H_{32}O_7$ as determined by high resolution-electrospray ionization-time of flight-mass spectra (HR-ESI-TOF-MS). The planar structure of **1** was elucidated with 1D and 2D NMR data (Figure 3). Thus, **1** was established as a new limonoid with a cyclopenta[α]phenanthren ring system with a β -furyl ring at C-17, an acetate at C-6, and two epoxide rings.

The relative stereochemistry of **1** was elucidated by nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) correlations as shown in computer-generated 3D rendering (Figure 3). NOESY correlations suggested stereochemistry of two epoxides as shown in Figure 3. The 3J proton coupling constants ($^3J_{H-5/H-6} = 11.7$ Hz and $^3J_{H-6/H-7} = 2.6$ Hz) as well as NOESY correlations indicated that H-6, H-7, and H-17 adopted a β -configurations, and H-5, H-9, and C-18 adopted an α -configurations as shown in Figure 3. The planar structure and relative configurations of **2-8** shown in Figure 1 were also determined by 1D and 2D NMR data.

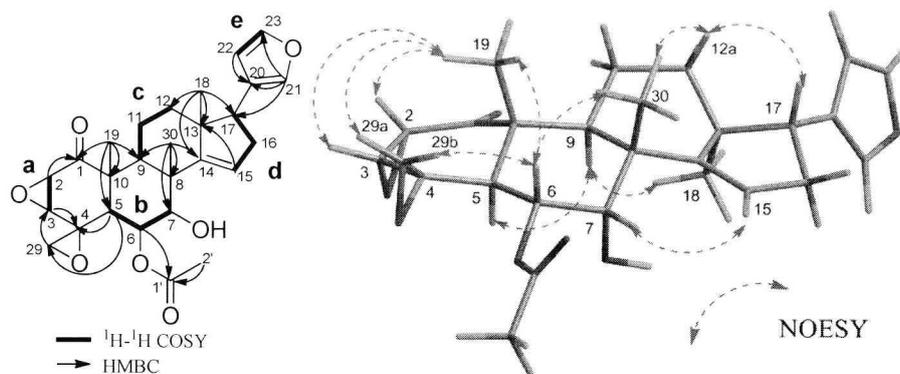


Figure 3. Selected 2D-NMR correlations for ceramicine E (1)

Absolute Configuration of Ceramicine B

The unknown absolute configuration of ceramicine B, a major limonoid from *C. ceramicus*, was also studied. The CD spectrum of *p*-Br-benzoyl derivative of ceramicine B indicated that the mutual relationship of dipole moment of the benzoate and α,β -unsaturated ketone chromophores was oriented in a counter clockwise manner, indicating absolute configuration at C-7 as *S* configured. Additional X-ray crystallography results confirmed the total structure of ceramicine B including its absolute structure [Flack parameter, $\chi = -0.0(2)$]. Therefore, the absolute configuration of ceramicine B was assigned as (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*S*, 8*R*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, and 17*R*).

Ceramicines with Anti-Lipid Droplets Accumulation Activity

Ceramicine B was shown to have anti-LDA activity (Figure 2). Thus, preliminary structural activity relationship of ceramicines was also investigated. It was observed that the furan ring attached to C-17, double bond formed between C-2 and C-3, and between C-14 and C15 were important for anti-LDA activity, whereas additional component added to C-12 resulted in the decrease of anti-LDA activity. Finally, it was found that, substitution pattern and stereochemistry of C-4, C-5, C-6, and C-28 appear to be critical for elicitation of anti-LDA activity. However, further studies are required to determine the importance of the tetrahydrofuran ring form between ring **A** and **B** through C-4,

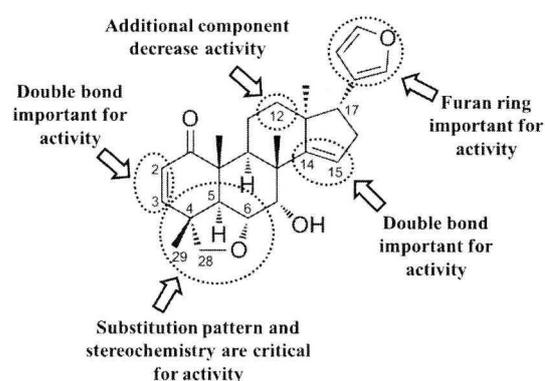


Figure 4. Structure activity relationship summary of ceramicines anti-lipid droplets accumulation activity with ceramicine B as example.

C-5, C-6, and C-28. Summary on the preliminary structure activity relationship of ceramicines was shown in Figure 4.

Mechanism Studies of Ceramicine B on Anti-Lipids Droplets Accumulation Activity

Evaluation by Nile red lipid droplets fluorescent staining resulted that ceramicine B is most potent compound in inhibiting LDA activity in MC3T3-G2/PA6 cells. Subsequent RT-PCR results showed that, adipocyte specific genes, GLUT4, LPL, and HSD11 β 1 mRNA expression was down-regulated in by ceramicine B (Figure 5A). The mRNA expression of PPAR γ and C/EBP α , upstream transcription factors of GLUT4, LPL, and HSD11 β 1 were also shown to be down-regulated by ceramicine B (Figure 5A). Additional western blot analysis demonstrated that PPAR γ protein level was indeed inhibited by ceramicine B in MC3T3-G2/PA6 cells (Figure 5B).

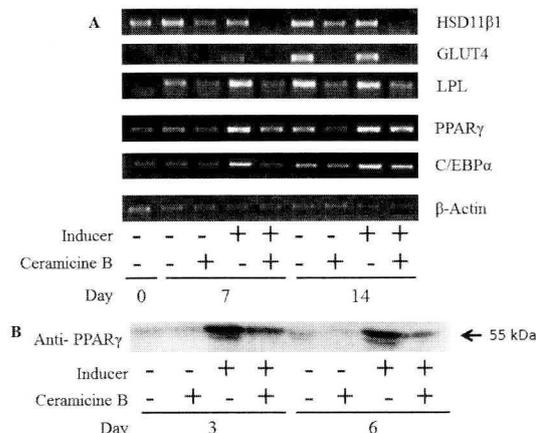


Figure 5. A) RT-PCR analysis on MC3T3-G2/PA6 cells treated with ceramicine B. B) PPAR γ protein expression was investigated with anti-PPAR γ monoclonal antibody.

Effect of ceramicine B was then examined on Forkhead Box O1 (Foxo1), a repressor of PPAR γ transcription. Western blot analysis showed that presence of ceramicine B was found to inhibit phosphorylation of Foxo1 when compared to unphosphorylated Foxo1 (Figure 6). This suggested that ceramicine B mechanism of anti-LDA activity was partly *via* inhibition of Foxo1 phosphorylation. Considering that Akt acts on phosphorylation of Foxo1 as insulin signaling pathway implies, further studies on ceramicine B effect on Akt signaling is necessary.

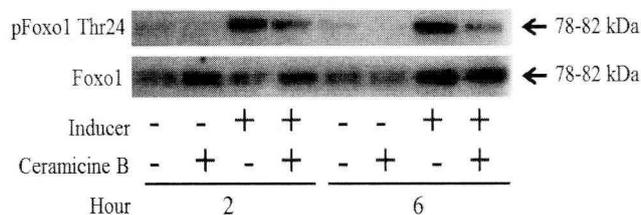


Figure 6. Phosphorylation of Foxo1 was investigated with anti-Foxo1 and anti-pFoxo1 Thr24 monoclonal antibody.

Present studies have yielded eight new limonoids, ceramicines E-L (1-8). Further investigation led to identification of previously isolated ceramicine B as a potent compound with anti-LDA activity. Studies also suggested that anti-LDA activity of ceramicine B was partly due to inhibition of Foxo1 phosphorylation.

論文審査の結果の要旨

肥満は、糖尿病、高血圧、高脂血症などに関係して、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の危険性を高めるほか、一部のがんの発症率を高める。肥満における脂肪組織の増大は脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞の新生によりもたらされる。重度の肥満症患者では脂肪細胞の肥大化とともに小型の脂肪細胞が出現することも観察されており、肥満における脂肪細胞分化の重要性を示唆すると考えられる。したがって、肥満を抑えるような生物活性を持つ新しい化合物の発見は、これらの疾患の治療に貢献すると考えられる。

本論文では、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化過程において、脂肪滴の蓄積を抑制する植物由来の新しい機能性天然分子の探索研究を行った。熱帯未利用植物資源から調製した抽出エキスイブラリーをスクリーニングした結果、マレーシアに自生するセンダン科 *Chisocheton ceramicus* の樹皮より新しいリモノド、ceramicine 類を発見した。本論文によって得られた結果は、以下のようである。

1) *Chisocheton ceramicus* の活性成分の研究

Chisocheton ceramicus の樹皮のメタノールエキスを液液分配し、各画分の脂肪滴蓄積抑制活性を検討した結果、活性はヘキサン可溶性画分に認められた。各種クロマトグラフィーにより分離を行い、新規 ceramicine E～L を ceramicine A～D とともに単離した。Ceramicine E～L の構造は、2 次元 NMR を中心としたスペクトル解析と化学変換により決定した。Ceramicine 類は、4 環性のテトラノルトリテルペノイド骨格の 17 位にフラン環を有しており、A 環を含めて様々に酸化状態が異なる構造であると帰属した。相対立体構造は、NOESY 相関により明らかにした。また、ceramicine B の絶対構造を、p-Br ベンゾエート体の CD スペクトルの解析（励起子キラリティー法）と X 線結晶解析により決定した。

2) Ceramicine 類の脂肪滴蓄積抑制作用

単離した 12 種類の ceramicine A～L の脂肪蓄積抑制活性を検討した結果、ceramicine A と B に強い活性が認められた。I にも僅かな活性があったが、その他には認められなかった。Ceramicine B を脂肪前駆細胞株である MC3T3-G2P A6 に添加するとコントロールの細胞の形態に殆ど影響を与えず、インス

リンと IBMX と DEX を添加して分化させる過程において脂肪滴の生成を抑制した。

3) Ceramicine B の作用機序の解析

主成分であり最も活性の強い ceramicine B の脂肪蓄積抑制作用について、遺伝子発現を指標として解析したところ、脂肪細胞の分化マーカーである GLUT4, PLP, HSD11 β の各 mRNA 発現の抑制を認めた。さらに、ceramicine B は分化誘導を担う遺伝子である PPAR γ と C/EBP α の2つの転写因子の遺伝子発現も抑制し、ウエスタンブロット (WB) 法により PPAR γ タンパクの発現も抑制されていることが明らかとなった。

PPAR γ の転写については、リプレッサーである Foxo1 による制御機構が知られている。Foxo1 は通常 PPAR γ プロモーターに結合し、その転写を抑えている。インスリンシグナルによる Foxo1 のリン酸化は、Foxo1 の PPAR γ プロモーターからの解離を促す結果、PPAR γ に対する各種転写促進シグナルのスイッチが ON にできるようになる。この抑制解除はインスリンの PI3K から AKT を介するシグナルによってもたらされると考えられている。

Foxo1 のリン酸化について WB 法で検討した結果、インスリンを含む分化誘導剤を添加後、2～6 時間で上昇する Foxo1 のリン酸化が ceramicine B の添加によって抑制された。よって、ceramicine B による各種の脂肪細胞関連遺伝子の発現抑制は、Foxo1 のリン酸化の抑制によって生じていることが示唆された。

以上のように、本研究では8種の新規リモノイド、ceramicine E～L を発見し、各 ceramicine 類の脂肪滴蓄積抑制効果の検討を行った。また、最も活性の強い ceramicine B の脂肪滴蓄積抑制作用の作用機序を解明したものである。Ceramicine B は AKT から Foxo1 の周辺で作用し、Foxo1 のリン酸化を抑制することにより、PPAR γ の転写促進シグナルを抑制すると考えられた。その結果、脂肪細胞の分化が抑制されると考えられる。リモノイドの生物活性についての報告は、そのほとんどが細胞増殖抑制や抗がん作用であり、脂肪細胞に対する作用は珍しく興味深い。したがって、抗肥満薬の創薬シーズの探索の面から価値ある優れた研究成果を含んでおり、博士（薬学）論文に値するものと判断する。