

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08009

研究課題名(和文) 薬用食品から高インスリン血症の改善を機序とする生活習慣病改善作用成分の探索

研究課題名(英文) Search for anti-lifestyle disease principles through the improvement of hyperinsulinemia from medicinal foods

研究代表者

二宮 清文(NINOMIYA, Kiyofumi)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10434862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：本課題は、肥満の形成過程などにおいて観察される高インスリン血症を改善することで過度の肥満、種々生活習慣病の発症を抑制する物質を探索することを目的とする。
本研究の成果は、生薬コウズクより得たフェニルプロパノイド成分、生薬センキュウより得たフタリド成分、およびブラジル生薬である *Carapa guianensis* より得たリモノイド成分の一部が肝細胞中の中性脂肪含量を有意に低下させることを見いだした。さらにマウスを用いた *in vivo* での評価では、コウズクから得たフェニルプロパノイドの3日間の投与により、糖負荷時の耐糖能の改善、肝臓中中性脂肪含量の有意な低下が観察されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find the compounds that improve hyperinsulinemia from medicinal foods. In results of this study, we found phenylpropanoids from fruit of *Alpinia galanga*, phthalides from rhizomes of *Cnidium officinale*, and limonoids from seed oil of *Carapa guianensis* as bioactive constituents. Reduction of triglyceride contents in HepG2 cells was observed by addition of these compounds in culture medium. Furthermore, only three times administration of phenylpropanoids, 1'S1-acetoxychavicol acetate and 1'S1-acetoxyeugenol acetate isolated from *A. galanga*, ameliorated glucose tolerance in mice. Additionally, triglyceride contents in liver was reduced by the administration in mice.

研究分野：食品薬学，生薬学

キーワード：糖尿病 インスリン コウズク phenylpropanoid センキュウ phthalide *Carapa guianensis* limonoid

1. 研究開始当初の背景

食および生活習慣の欧米化に伴い、糖尿病をはじめとする生活習慣病の罹患者の増加が指摘されてから久しいが、本邦をはじめとするアジア諸国の新興国においても一連の生活習慣病の罹患者の増加は、もはや社会問題として急務の対策が必要な課題の一つとして認識されている。日本では、平成 24 年の国民健康・栄養調査によると「糖尿病が強く疑われる人」の 950 万人と「糖尿病の可能性を否定できない人」の 1,100 万人を合わせると 2,050 万人に糖代謝異常がある可能性が示されており、これは日本の全人口の 16% に相当する数に当たる。前回調査 (H19 年) から、「糖尿病の可能性を否定できない人」については微減であったものの、より重篤である「糖尿病が強く疑われる人」については、前回調査比で 107%、本調査が開始された平成 9 年の推計値と比較すると 138% に増加している。

内臓脂肪組織は消化管から栄養素が吸収・運搬される道筋である腸間膜、門脈肝流域に位置する脂肪組織で、過栄養や運動不足などにより、その蓄積が加速される。とりわけ肝臓は門脈を介して内臓脂肪と直結しているため、内臓脂肪の過剰蓄積により機能異常を呈した内臓脂肪由来のアディポカインと総称される炎症性サイトカインなどが高濃度で流入し、肝臓の代謝に影響を与える。特に肥満者で観察される高インスリン血症では、肝臓でのインスリン受容体シグナルはグリコーゲン合成の抑制と中性脂肪合成の亢進を示すことが知られており、脂肪肝、VLDL の過剰産生、高トリグリセリド血症を助長する。本邦を含むアジア地域の肥満の特徴として、欧米人と比較して皮下脂肪組織への脂肪蓄積能力が弱く、過栄養に応じきれなくなると軽度の肥満状態から内臓脂肪組織や肝臓、骨格筋、脾臓、血管、心筋などへの異所性脂肪の蓄積が進行し、耐糖能異常、高血圧症、脂質異常症などの発症が増加する [益崎裕章ら, *肝臓*, **53**, 336-343 (2012)., Fruci B., et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 22933-22966 (2013).]。これらのことから、過栄養と肥満で観察される高インスリン血症を是正することが、糖尿病を含めた一連の生活習慣病の予防において重要であると考えられ、加えて、糖尿病初期段階を含め肥満者では、骨格筋や肝細胞内の異所性の脂肪蓄積が増加していることから、食後過血糖を改善し、過度のインスリン分泌を抑制することが重要であると考えられる [Capeau J., et al., *Diabetes Metab.*, **34**, 649-657 (2008)]。

一方、脂肪肝を罹患している場合には、肝臓への糖取り込み能の低下による食後血糖値の増悪、糖新生、脂肪合成およびコレステロール合成の亢進などが観察される。従って、脂肪肝を改善することは糖尿病のみならず、その他の生活習慣病の発症、増悪を制御するうえで有効な手段であると考えられる。

2. 研究の目的

糖質の吸収・代謝過程において、小腸から吸収されたグルコースは、門脈を介し肝臓へと流入する。小腸からの糖の全吸収量のうち 1/3 が肝臓 (GLUT2) に取り込まれた後に、残りの 2/3 が末梢血へと移行していく。末梢血へと流入した糖の内 1/3 はインスリン応答により速やかにインスリンの標的組織である筋肉と脂肪 (GLUT4) に取り込まれ、残りの 1/3 は血球と脳 (GLUT1) で消費されることが知られている。従って、既存の多くの抗糖尿病薬の作用機序であるインスリンを介した血糖値制御に関わる糖消費は、血液中からの細胞内への糖の移行については、全体の 1/3 の機能を亢進しているにすぎない。また、1/3 の糖消費に関わる肝臓への糖取り込みはインスリンに非依存的な糖輸送担体である GLUT2 を介して行われる。GLUT2 は、高血糖時に肝細胞内に糖を輸送するため、本経路による血糖調節では低血糖を誘発し難いと考えられる。

そこで、本研究課題では、薬用食品を研究題材として、食後過血糖の是正から、食後に観察される高インスリン血症を改善する部室を探索することを目的とする。ここでいう薬用食品とは、食品として広く供されるとともに、生体の調節機能（食品の第三次機能）を目的に長年使用されてきた食品である。また、糖尿病などの慢性疾患の治療には、長期間の医薬品または機能性素材の摂取が必要となることが多く、医食同源・薬食同源の観点からも、長い食歴を有する薬用食品を研究の題材とすることは理にかなっている。本研究は薬用食品素材から、肝臓での中性脂肪の低減を介した肝糖代謝の亢進を機序として、食後の過血糖を改善することで、高インスリン血症により惹起される種々生活習慣病の改善、特に抗糖尿病薬シードの創製を目的とする。

3. 研究の方法

西洋ハーブ、香辛料をはじめアジア諸地域や和漢生薬由来で食経験があるなど安全性が確立されている機能性（薬用）食品約 140 種と野菜を中心とした一般食品を探索資源とする。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を使用して肝細胞内中性脂肪含量を指標に探索資源を絞り込む。さらに *in vivo* での有効性が確認された素材について活性成分の探索を行うとともに、得られた成分の薬理活性を *in vitro* および *in vivo* 試験により確認する。また、活性成分の誘導体合成、類縁体の薬理活性評価をあわせて行うことで、活性成分に関する構造活性相関を明らかにするとともに、関連遺伝子の発現やタンパク質発現・修飾など細胞内シグナルトランスダクションに対する影響を検討する。

本研究では、研究対象とする薬用食品素材として、西洋ハーブや韓国、中国、タイをはじめとするアジア諸地域において伝統医学

や民間薬として供される植物や和漢生薬，即ちこれまでの使用経験から安全性が確立されている薬用（機能性）食品素材および野菜を中心とした一般食品を使用する．本研究方法の特徴は，遺伝子発現／抑制や標的タンパク質の変動などのミクロな視点で実施するのではなく，中性脂肪量の低減や耐糖能の改善を指標に実施していくことで，生体レベルでの薬理活性を有する物質を中心とした展開を行う．

4．研究成果

本課題の研究成果としては，ブラジル生薬アンディローバ (*Carapa guianensis*) 種子油より単離したリモノイド成分が肝細胞内の中性脂肪含量を低下させる事を明らかにし，gedunin など種子有中の主成分の一つが，活性寄与成分であることを明らかにして，2017年度の食品薬学シンポジウムなどで報告している．また，これまでの研究成果から，ローズヒップ，センキュウおよびコウズクから得た薬理活性成分について種々の学会において報告した．いずれの薬用食品，生薬においても *in vitro* 試験における有効成分の同定までは完了しており，進捗状況として概ね順調であることがうかがえる結果を得た．

現在，糖質負荷時のインスリン分泌に与える影響，投与量の最適化，作用機序等の検討を並行して進めている段階である．成果については，データが出そろった段階にて，論文として投稿する予定である．

本課題の研究から得られた成果の代表的なものとしては，生薬センキュウの抽出エキ스가マウス肝臓中中性脂肪含量の低下作用を有することを明らかにするとともに，耐糖能の改善作用を有することを明らかにした．さらに，*in vitro* の実験に於いて，肝細胞内中性脂肪含量を低下させる化合物としてフタリドである senkyunolide G および H を明らかにするとともに，活性発現の機序に脂肪酸合成酵素 (FAS) の発現低下などが関与している事を明らかにした．

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Takanobu Inoue, Yuuki Matsui, Takashi Kikuchi, Takeshi Yamada, Yasuko In, Osamu Muraoka, Chie Sakai, Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Reiko Tanaka, Carapanolides M-S from seeds of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells., *Tetrahedron*, **71**, 2753-2760 (2015)., DOI:10.1016/j.tet.2015.03.017, 査読有り

〔学会発表〕（計 33 件）

1. 二宮清文，酒井千恵，丸本真輔，長友暁史，村岡 修，菊池 崇，山田剛司，田中麗子，森川敏生，アンディローバ (*Carapa guianensis*) 含有リモノイド成分の脂肪性肝炎抑制作用.，第 7 回食品薬学シンポジウム，2017.10.28.-29.（京都府，京都薬科大学）
2. 二宮清文，森川敏生，西洋ハーブからの肝脂肪低減を介した生活習慣病予防改善物質の探索.，第 7 回食品薬学シンポジウム，2017.10.28.-29.（京都府，京都薬科大学）（招待講演）
3. 二宮清文，長友暁史，岳 誉泰，三木芳信，平 徳久，堀佑一郎，北原潤美，村岡 修，森川敏生，アシル化フラボノール配糖体の肝細胞における糖・脂質代謝改善作用および構造活性相関.，第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会，2017.10.14.（兵庫県，兵庫医療大学）.
4. 二宮清文，宮坂賢知，塩谷美幸，山本紗也，森川敏生，センキュウ (*Cnidium officinale*，根茎) の糖消費促進活性成分の探索.，第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会，2017.10.14.（兵庫県，兵庫医療大学）.
5. 二宮清文，二宮 与，酒井千恵，萬瀬貴昭，村岡 修，森川敏生，漢薬コウズクの肝細胞内中性脂肪低減活性成分.，第 38 回日本肥満学会，2017.10.07.-08.（大阪府，大阪国際会議場）.
6. 二宮清文，宮坂賢知，塩谷美幸，二宮 与，酒井千恵，森川敏生，センキュウの耐糖能改善作用成分.，日本生薬学会第 64 回年会，2017.09.09.-10.（千葉県，東邦大学）.
7. 宮坂賢知，二宮清文，塩谷美幸，森川敏生，センキュウ (*Cnidium officinale*，根茎) の糖消費促進活性成分の探索.，第 34 回和漢医薬学会大会，2017.08.26.-27.（福岡県，福岡国際会議場）.
8. 二宮清文，二宮 与，酒井千恵，塩谷美幸，森川敏生，センキュウ (*Cnidium officinale*，根茎) の耐糖能改善作用成分の探索.，第 34 回和漢医薬学会大会，2017.08.26.-27.（福岡県，福岡国際会議場）.
9. 長友暁史，西田典永，田中(東)幸雅，吉川雅之，村岡 修，二宮 清文，森川 敏生，ローズヒップエキスおよび *trans*-tiliroside の肝内脂肪低減作用.，第 17 回日本抗加齢医学会総会，2017.06.02.-04.（東京都，東京国際フォーラム）.
10. 長友暁史，西田典永，田中(東)幸雅，吉川雅之，村岡 修，二宮 清文，森川 敏生，ローズヒップエキスおよび *trans*-tiliroside の肝細胞内中性脂肪代謝促進作用.，第 71 回日本栄養・食糧学会大会，2017.05.19.-20.（沖縄県，沖縄コン

- ベンションセンター).
11. 長友暁史, 西田典永, 田中(東)幸雅, 吉川雅之, 村岡 修, 二宮 清文, 森川 敏生, ローズヒップ含有成分の肝細胞内中性脂肪代謝促進作用., 日本薬学会第137 年会 2017.03.24.-27. (宮城県, 東北大学).
 12. 二宮清文, 萬瀬貴昭, 二宮 与, 森 祐樹, 酒井千恵, 村岡 修, 森川敏生, フェニルプロパノイドの肝臓中脂肪低減を介した耐糖能改善作用., 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2016.11.30-12.02. (茨城県, つくば国際会議場).
 13. 森川敏生, 二宮清文, 二宮 与, 丸本真輔, 酒井千恵, 村岡 修, 菊池 崇, 山田剛司, 田中麗子, ブラジル生薬アンディローバ由来リモノイド成分の脂肪肝低減作用., 第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2016.10.29.-31. (北海道, 東京農業大学オホーツクキャンパス).
 14. Kiyofumi Ninomiya, Kumi Ninomiya, Chie Sakai, Osamu Muraoka, Takashi Kikuchi, Takeshi Yamada, Reiko Tanaka, Toshio Morikawa, Limonoids from Brazilian folk medicine, Andiroba, with fat metabolizing activity in hepatocytes., The 12th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会), 2016.10.27.-30. (大阪府, 近畿大学東大阪キャンパス).
 15. 二宮清文, 長友暁史, 西田典永, 田中(東)幸雅, 吉川雅之, 村岡 修, 森川敏生, ローズヒップエキスおよび trans-Tiliroside の脂質代謝促進作用., 第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2016.10.27.-28. (千葉県, 千葉大学亥鼻キャンパス).
 16. 二宮清文, 二宮 与, 酒井千恵, 塩谷美幸, 森川敏生, センキュウの肝臓中脂肪低減を介した耐糖能改善作用., 第 37 回日本肥満学会, 2016.10.07.-08. (東京都, 東京ファッションタウン).
 17. 二宮清文, 今野拓哉, 矢田佳凜, 森川敏生, サイコ (*Bupleurum falcatum* L.) の肝細胞内中性脂肪代謝作用., 日本生薬学会第 63 回年会, 2016.09.24.-25. (富山県, 富山国際会議場).
 18. 森川敏生, 二宮清文, 二宮 与, 丸本真輔, 酒井千恵, 宮澤聖也, 尾関快天, 松尾菜都子, 村岡 修, 菊池 崇, 山田剛司, 田中麗子, アンディローバ (*Carapa guianensis*) 含有リモノイド成分の脂肪性肝炎抑制., 第 58 回天然有機化合物討論会, 2016.09.14.-09.16. (宮城県, 東北大学).
 19. Kiyofumi Ninomiya, Kumi Ninomiya, Chie Sakai, Osamu Muraoka, Takashi Kikuchi, Takeshi Yamada, Reiko Tanaka, Toshio Morikawa, Limonoids from flower and seed oil of *Carapa guianensis* with fat metabolizing activity in hepatocytes., International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (国際学会), 2016.09.01.-04. (徳島県, 徳島文理大学).
 20. Kiyofumi Ninomiya, Takuya Konno, Karin Yada, Toshio Morikawa, Triterpene saponins from roots of *Bupleurum falcatum* with triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells., International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (国際学会), 2016.09.01.-04. (徳島県, 徳島文理大学).
 21. Kiyofumi Ninomiya, Akifumi Nagatomo, Norihisa Nishida, Yukimasa Tanaka-Azuma, Takeru Suyama, Masayuki Yoshikawa, Osamu Muraoka, Toshio Morikawa, Lipid metabolizing effect of *trans*-tiliroside, a principal constituent in rosehip., International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (国際学会), 2016.09.01.-04. (徳島県, 徳島文理大学).
 22. 今野拓哉, 二宮清文, 矢田佳凜, 森川敏生, 柴胡含有サポニン成分の肝細胞内中性脂肪低減活性成分., 第 33 回和漢医薬学会学術大会, 2016.08.27.-28. (東京都, 星薬科大学).
 23. 二宮清文, 二宮 与, 酒井千恵, 萬瀬貴昭, 村岡 修, 早川堯夫, 森川敏生, コウズク (*Alpinia galanga*, 果実) の耐糖能改善作用成分., 第 33 回和漢医薬学会学術大会 2016.08.27.-28. (東京都, 星薬科大学).
 24. 二宮 与, 二宮清文, 酒井千恵, 塩谷美幸, 森川敏生, センキュウ; (*Cnidium officinale*, 根茎) の耐糖能改善作用物質., 第 33 回和漢医薬学会学術大会, 2016.08.27.-28. (東京都, 星薬科大学).
 25. Kiyofumi Ninomiya, Chie Sakai, Kumi Ninomiya, Miyuki Shiotani, Toshio Morikawa, Phthalides from rhizomes of *Cnidium officinale* accelerate metabolism of triglyceride in hepatocytes., 9th Joint Natural Products Conference 2016(国際学会), 2016.07.24.-27. (デンマークコペンハーゲン, Tivoli Hotel & Congress Center).
 26. 二宮清文, 二宮 与, 酒井千恵, 村岡 修, 菊池 崇, 山田剛司, 田中麗子, 森川敏生, Andiroba (*Carapa guianensis*) 含有リモノイド成分の肝細胞内中性脂肪低下作用., 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2016.07.16. (石川県, 石川県立音楽堂邦楽ホール・交流ホール).
 27. Kiyofumi Ninomiya, Chie Sakai, Miyuki Shiotani, Toshio Morikawa, Phthalides from rhizomes of *Cnidium officinale* as new leads for fatty liver therapeutic candidates., 7th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference

- (国際学会), 2015.10.30.-11.02. (台湾台北, 国立台湾大学).
28. 萬瀬貴昭, 二宮清文, 西 亮介, 橋本佳典, 酒井千恵, 二宮 与, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡 修, 森川敏生. コウズク (*Alpinia galanga*, 果実) 由来フェニルプロパノイド成分の肝細胞内中性脂肪代謝促進作用., 第 6 回食品薬学シンポジウム, 2015.10.30.-31. (岡山県, 岡山大学).
29. 二宮清文, 酒井千恵, 塩谷美幸, 森川敏生, センキュウ (*Cnidium officinale*, 根茎) の肝脂肪低減作用成分の探索., 第 36 回日本肥満学会, 2015.10.02.-10.03. (愛知県, 名古屋国際会議場).
30. 二宮清文, 酒井千恵, 村岡 修, 菊地 崇, 山田剛司, 田中麗子, 森川敏生, アンデローバ含有リモノイドの肝細胞内中性脂肪低減作用., 日本生薬学会第 62 回年会, 2015.09.11.-12. (岐阜県, 長良川国際会議場).
31. 二宮清文, 萬瀬貴昭, 橋本佳典, 酒井千恵, 二宮 与, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡 修, 森川敏生, コウズクの機能性成分(6)-フェニルプロパノイド成分の肝細胞内中性脂肪代謝促進作用および構造活性相関構造-. 日本生薬学会第 62 回年会, 2015.09.11.-12. (岐阜県, 長良川国際会議場).
32. Kiyofumi Ninomiya, Miyuki Shioktani, Chie Sakai, Toshio Morikawa, Phtalide constituents from rhizomes of *Cnidium officinale* with triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells., Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015(ISPSA2015) (国際学会), 2015.08.29.-09.02. (徳島県, 徳島文理大学).
33. Yoshiaki Manse, Kiyofumi Ninomiya, Ryosuke Nishi, Chie Sakai, Saowanee Chaipech, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Toshio Morikawa, Phenylpropanoids from *Alpinia galanga* with lipid metabolism-promoting activity in high glucosepretreated HepG2 cells., 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015) (国際学会) 2015.05.14.-18. (神奈川県, パシフィコ横浜).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/medfood/>

(1)研究代表者

二宮 清文 (NINOMIYA, Kiyofumi)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号: 10434862

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森川 敏生 (MORIKAWA, Toshio)

近畿大学・薬学総合研究所・教授

研究者番号: 10340449