

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790026

研究課題名（和文）TNF- α 感受性低減作用を作用点とする肝保護作用成分の探索研究課題名（英文）Search for hepatoprotective constituents by reductive effect of sensitivity to TNF- α from medicinal plants

研究代表者

森川 敏生（MORIKAWA TOSHIO）

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10340449

研究成果の概要（和文）：炎症性サイトカインとして知られている TNF- α の感受性を低減することにより、TNF- α の過剰産生により惹起される各種臓器障害や炎症反応などの種々の生体内イベントを軽減あるいは調節できる天然由来低分子化合物を探索することを目的とし、各種薬用資源素材抽出エキスについて TNF- α 高感受性株である L929 細胞を用いた TNF- α 誘発細胞障害抑制活性試験を実施した。その結果、数種のタイ天然薬物（*Piper chaba* 果実、*Sapindus rarak* 果皮、*Kaempferia parviflora* 根茎、*Shorea roxburghii* 樹皮、*Mammea siamensis* 花部）やカンカニクジュヨウ（*Cistanche tubulosa* 肉質茎）などから種々の活性寄与成分を明らかにするとともに、GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスを用いた *in vivo* 肝保護作用試験を検討するとともに、それらの活性発現の必須構造、構造活性相関および作用メカニズム解析を実施した。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate hepatoprotective constituents by reductive effect of sensitivity to TNF- α from medicinal plants, we examined inhibitory effect on TNF- α -induced cytotoxicity in L929 cells as a first screening trial. As the results, several materials such as Thai medicinal plants, *Piper chaba* (fruit), *Sapindus rarak* (pericarps), *Kaempferia parviflora* (rhizomes), *Shorea roxburghii* (bark), and *Mammea siamensis* (flowers) and *Cistanche tubulosa* (stems) were found to inhibit the activity. From those candidate materials, several constituents were investigated as the active compounds. Furthermore, the structural requirements and the mode of action of the active compounds were also examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生薬・天然物化学

1. 研究開始当初の背景

TNF- α (tumor necrosis factor- α : 腫瘍壊死因

子) は、当初、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として発見されたが、その歴史的経

緯とは別に、近年では炎症を通じた生体防御機構に広く関わるサイトカインとして理解されるようになった。生体防御機構において重要な働きを担っている TNF- α であるが、その持続的かつ過剰な産生や、不適切な場所や時間での産生は、組織障害を引き起こしたり、慢性関節リウマチ、クローン病や糖尿病におけるインスリン抵抗性などの原因や増悪をもたらすことが知られている。従来、この TNF- α の過剰な産生や遊離を抑制する機能分子の探索が広く実施されてきたが、近年、TNF- α に対する抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体製剤が関節リウマチ、クローン病などの治療を目的に臨床で使用されている。しかしながら、本剤の投与は抗体医薬品であるがための副作用であるアナフィラキシー様症状や遅発性過敏症などが観察される場合があり、その使用には注意を要する。一方、生体内において最大の内分泌組織として認識されるようになった脂肪組織においては、その肥大化に伴い TNF- α の産生量が増大するとともにアディポネクチンの産生量を減少させ、各種生活習慣病の成因基盤となっている内臓脂肪蓄積型肥満を進展させることが明らかとなっている。従って、TNF- α の感受性を低減し、その応答を軽減する低分子化合物は、過剰に産生される TNF- α により惹起される種々の疾病の予防・改善作用を有する医薬シーズとなりうることを期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、世界各地の伝承・伝統薬物や薬用食品などの天然資源素材から TNF- α 感受性低減作用を指標に活性成分を探索するとともに、活性発現の必須構造や構造活性相関および TNF- α により惹起される疾病の予防・改善作用を示す医薬シーズ探索研究として、肝障害モデルに対する肝保護作用成分を見いだすことを目的とする。

TNF- α に対する感受性の低減作用の簡便なスクリーニング試験として、TNF- α 高感受性株として知られているマウス由来線維芽細胞である L929 細胞を用い、培地中に TNF- α を添加することにより誘発される細胞障害に対する抑制作用試験を構築した。本アッセイ法を用いた広範なスクリーニング試験をおこない、TNF- α 感受性低減作用成分の探索研究を実施するとともに、TNF- α により惹起される疾病予防・改善作用を示す医薬シーズの探索研究例として、マウスを用いた肝障害モデルに対する肝保護作用成分を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

我々の研究室では、既に約 120 種の世界各地の伝承・伝統薬用植物および薬用食品素材についての抽出エキスをライブラリーを有し

ているとともに、海外の共同研究機関を通じて採取した素材を収集しエキスをライブラリーの充実をはかっている。これらのエキスをライブラリーを用いて、i. L929 細胞を用い構築したスクリーニング試験 (*in vitro*) を経て候補素材を絞り込む、ii. ピックアップされた素材について、生物活性を指標に成分探索を実施し活性成分を見いだす、iii. 活性成分について、マウス初代培養肝細胞を用いた GalN および GalN/TNF- α 誘発細胞障害抑制作用 (*in vitro*) を検討する、iv. 活性成分に化学修飾を加えるなどして合成した各種類縁体や関連化合物の活性を比較し、活性発現の必須構造や構造活性相関を解明する、v. 顕著な活性が認められた化合物について、GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスを用いた肝保護作用 (*in vivo*) および血中 TNF- α 濃度におよぼす影響について検討する。

活性寄与成分の探索は、上述する生物活性を指標に分離・精製し、NMR をはじめとする各種スペクトルの解析から活性成分および新規化合物の構造解析を実施する。また、見いだされた活性成分について、各種類縁体合成を実施して、活性発現の必須構造や構造活性相関研究へと繋げ、医薬シーズとしての提案ができるべく検討を重ねる。また、過剰な TNF- α により惹起される疾病モデルとして GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスを用いた肝保護作用について検討する。

4. 研究成果

(1) 中国新疆ウイグル自治区の薬用資源であるカンカニクジュヨウ (*Cistanche tubulosa* 肉質茎) から、GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスにおける *in vivo* 肝保護作用試験において有意な血中トランスアミナーゼ活性の上昇抑制作用が認められるフェニルエタノイド配糖体 echinacoside, acteoside および isoacteoside を見いだすとともに、その構造活性相関および作用機序に関する知見を得た。

(2) タイ天然薬物 *Sapindus rarak* 果皮に含有される 4 種の新規アシル化セスキテルペン配糖体であるモノアセチル mukurozioside IIa 類に TNF- α 誘発細胞障害抑制活性を見いだした。

(3) タイ天然薬物 *Piper chaba* (ジャワナガコショウ) 果実に含まれる種々の酸アミド化合物に、L929 細胞を用いた TNF- α 誘発細胞障害抑制活性およびマウス初代培養肝細胞を用いた GalN 誘発細胞障害抑制活性を見いだした。活性の認められた化合物のうち、コショウ (*Piper nigrum*) などの辛味成分としても知られている piperine について、GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスにおける *in vivo* 肝保護作用試験において有意な血中トランスアミナーゼ活性の上昇抑制作用が認められた用量において、血中の TNF- α 濃度

に変化が認められなかったことから、TNF- α の産生量に影響を与えずその感受性を低減させていることが示唆された。

(4) 薫香生薬である乳香 (*Boswellia carterii* 樹脂) から得られたテルペノイド成分 *olibanumol* 類に、マウス腹腔マクロファージからの LPS 誘発 NO 産生抑制活性を見いだした。

(5) タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 根茎に含有されるメトキシフラボノイド化合物にマウス初代培養肝細胞を用いた GalN 誘発細胞障害抑制活性を見いだした。

(6) タイ天然薬物 *Shorea roxburghii* 樹皮から得られたオリゴスチルベノイド化合物に GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスにおける *in vivo* 肝保護作用が認められた。

(7) タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部にマウス腹腔マクロファージからの LPS 誘発 NO 産生抑制活性を有するクマリン類を見いだした。

本研究により見いだされた TNF- α 感受性低減作用を示す低分子化合物は、TNF- α により惹起される種々の疾病の予防・改善作用を有するとともに、これまでに広く探索されている TNF- α 産生抑制作用剤などとは異なる作用メカニズムの独自性の高い医薬シーズの提案に繋げられ、また、それらとの併用効果も期待できる。

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 7 件)

- ① Chaipech S., Morikawa T., Ninomiya K., Yoshikawa M., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Structures of two new phenolic glycosides, kaempferiaosides A and B, and hepatoprotective constituents from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 62-69 (2012). 査読あり
- ② Morikawa T., Oominami H., Matsuda H., Yoshikawa M., New terpenoids, *olibanumols* D-G, from traditional Egyptian medicine *olibanum*, the gum-resin of *Boswellia carterii*. *J. Nat. Med.*, **65**, 129-134 (2011). 査読あり
- ③ Morikawa T., Oominami H., Matsuda H., Yoshikawa M., Four new ursane-type triterpenes, *olibanumols* K, L, M, and N, from traditional Egyptian medicine *Olibanum*, the gum-resin of *Boswellia carterii*. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1541-1544 (2010). 査読あり
- ④ Morikawa T., Pan Y., Ninomiya K., Imura K., Yuan D., Yoshikawa M., Hayakawa T.,

Muraoka O., Iridoid and acyclic monoterpene glycosides, *kankanosides* L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1403-1407 (2010). 査読あり

- ⑤ Morikawa T., Xie Y., Ninomiya K., Okamoto M., Muraoka O., Yuan D., Yoshikawa M., Hayakawa T., Inhibitory effects of acylated acyclic sesquiterpene oligoglycosides from the pericarps of *Sapindus rarak* on tumor necrosis factor- α -induced cytotoxicity. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1276-1280 (2010). 査読あり
- ⑥ 森川敏生, TNF- α 感受性低減作用を指標とした香辛料由来生物活性成分の探索-タイ天然薬物 *Piper chaba* の肝保護作用成分-. *薬学雑誌*, **130**, 785-791 (2010). 査読あり
- ⑦ Morikawa T., Pan Y., Ninomiya K., Imura K., Matsuda H., Yoshikawa M., Yuan D., Muraoka O., Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 1882-1890 (2010). 査読あり

[学会発表] (計 14 件)

- ① Morikawa T., Chaipech S., Sueyoshi M., Matsuda H., Nomura Y., Umeiyama M., Yabe M., Sakakibara R., Matsumoto T., Hikita T., Ninomiya K., Yoshikawa M., Mukai H., Kiso Y., Pongpiriyadacha Y., Muraoka O., Anti-inflammatory effects and mode of action of prenylcoumarins from the flower buds of *Mammea siamensis*. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11), 29 November-2 December 2011 (Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan).
- ② Morikawa T., Ninomiya K., Pan Y., Imura K., Matsuda H., Yoshikawa M., Yuan D., Li Z., Muraoka O., Hepatoprotective effect and mode of action of acylated phenylethanoid oligoglycosides from *Cistanche tubulosa*. 2011 International Conference in Food Factors (ICoFF2011), 20-23 November 2011 (Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan).
- ③ Chaipech S., Morikawa T., Matsuda H., Sugawara K., Mukai H., Kiso Y., Ninomiya K., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Yoshikawa M., Anti-inflammatory effects of methylated flavonoids from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. 2011 International Conference in Food Factors (ICoFF2011), 20-23 November 2011 (Taipei International Convention

- Center, Taipei, Taiwan).
- ④ 森川敏生, 末吉真弓, Chaipech Saowanee, 松田久司, 梅山美樹子, 榑原理恵, 疋田武士, 二宮清文, 吉川雅之, 向井秀仁, 木曾良明, Pongpiriyadacha Yutana, 早川堯夫, 村岡 修, タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部の機能性成分(2) -新規プレニルクマリン mammeasin 類の化学構造と HL-60 由来好中球様細胞の活性化抑制作用-. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011 年 10 月 22 日(神戸学院大学ポートアイランドキャンパス, 神戸).
- ⑤ Chaipech Saowanee, 森川敏生, 二宮清文, 吉川雅之, 早川堯夫, 村岡 修, Pongpiriyadacha Yutana, タイ天然薬 *Kaempferia parviflora* 根茎の機能性成分(2) -新規フラボノイド配糖体 kaempferiaoside 類の化学構造と肝細胞障害抑制活性-. 日本薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月(東京).
- ⑥ 森川敏生, 末吉真弓, Chaipech Saowanee, 二宮清文, 早川堯夫, 村岡 修, 松田久司, 野村友起子, 冢邊美久子, 松本明子, 吉川雅之, Pongpiriyadacha Yutana, タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部の機能性成分(1) -新規プレニルクマリン mammeasin 類の化学構造と NO 産生抑制活性-. 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 24-25 日(昭和大学旗の台キャンパス, 東京).
- ⑦ 二宮清文, 森川敏生, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 赤木良典, 吉川雅之, 早川堯夫, 村岡 修, Pongpiriyadacha Yutana, タイ天然薬物 *Shorea roxburghii* 樹皮の機能性成分(5) -含有スチルベン成分の肝保護作用と定量分析-. 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 24-25 日(昭和大学旗の台キャンパス, 東京).
- ⑧ 松田久司, 梅山美樹子, 向井秀仁, 居村克弥, 中村誠宏, 森川敏生, 村岡 修, 吉川雅之, HL-60 由来好中球様細胞を用いた人参果 (*Potentilla anserina*) 成分 maslinic acid および関連化合物の抗炎症作用. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 28-31 日(ツインメッセ静岡, 静岡).
- ⑨ 森川敏生, 二宮清文, 松浦豪之, 赤木良典, 村岡 修, 早川堯夫, 吉川雅之, 漢薬胡黄連の新規アシル化イリドイド配糖体成分および肝保護作用. 日本薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月 25-26 日(徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島).
- ⑩ Ninomiya K., Morikawa T., Pan Y., Imura K., Matsuda H., Yoshikawa M., Yuan D., Hayakawa T., Muraoka O., Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. The 5th JSP-CCTNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy in Tokushima, 24 September 2010 (Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan).
- ⑪ 二宮清文, 森川敏生, 居村克弥, 赤木良典, 山口貴大, 村岡 修, 吉川雅之, 早川堯夫, 漢薬蕨麻の肝障害抑制活性および作用機序の解明. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010 年 8 月 28-29 日(京都薬科大学, 京都).
- ⑫ 居村克弥, 森川敏生, 二宮清文, 坂本幸栄, 藤倉翔太, 村岡 修, 吉川雅之, 早川堯夫, 漢薬女貞子の TNF- α 誘発細胞障害抑制活性成分. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010 年 8 月 28-29 日(京都薬科大学, 京都).
- ⑬ 森川敏生, 二宮清文, 松浦豪之, 赤木良典, 村岡 修, 吉川雅之, 早川堯夫, 漢薬胡黄連の肝障害抑制活性成分. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010 年 8 月 28-29 日(京都薬科大学, 京都).
- ⑭ Chaipech S., 松田久司, 森川敏生, 菅原かおる, 梅山美樹子, 向井秀仁, 木曾良明, 村岡 修, 早川堯夫, Pongpiriyadacha Yutana, 吉川雅之, タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来フラボノイド成分の HL-60 由来好中球様細胞の活性化抑制作用. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010 年 8 月 28-29 日(京都薬科大学, 京都).

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 敏生 (MORIKAWA TOSHIO)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10340449