

薬学総合研究所・食品薬学研究室

1. 研究課題名

「機能性食品素材から生活習慣病予防および改善作用を有する医薬シーズの探索研究」

2. 研究メンバー

森川 敏生	近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・講師
二宮 清文	近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・助教
吉川 雅之	近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・客員教授
村岡 修	近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・教授（兼任）
三宅荘八郎	ハイテクリサーチセンター・研究支援者（平成20年4月～）

3. 研究成果

世界各地で食用に供され、有用な生物活性を有する食品、ハーブ、さらには天然薬物について、その機能を発現する化合物を探索・特定することによりその機能を科学的に評価するとともに、見いだされた化合物を医薬シーズとして、がんや生活習慣病をはじめとする難治性疾患の治療のための創薬研究を実施することを目的とし、探索研究を実施している。当研究室では、上述したような機能性食品素材から生活習慣病予防および改善作用についての生物活性評価試験を指標に活性寄与成分を探索し、その化学構造の解析およびその機能解明をおこなっている。

3-1. 内臓脂肪蓄積抑制作用シーズの探索

3-1-1. デイジーフラワー

肥満症、糖尿病、脂質異常症および高血圧などの生活習慣病の併発は、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）として体系づけられており、その予防や改善には内臓脂肪の量的および質的異常を制御することが重要であると考えられる。我々の研究室では薬用としても供される食品（薬用食品）から生活習慣病などの改善・治療に寄与する成分の探索研究を実施しており、その一環として、

種々の薬用食品素材についてオリーブ油負荷マウスにおける血中中性脂質（TG）上昇抑制作用を指標に探索研究を実施している。今回、キク科（Asteraceae）植物デイジーフラワー

Table 1. Inhibitory Effects of the MeOH Extract from the Flowers of *B. perennis* on TG Elevation in Olive Oil-loaded Mice

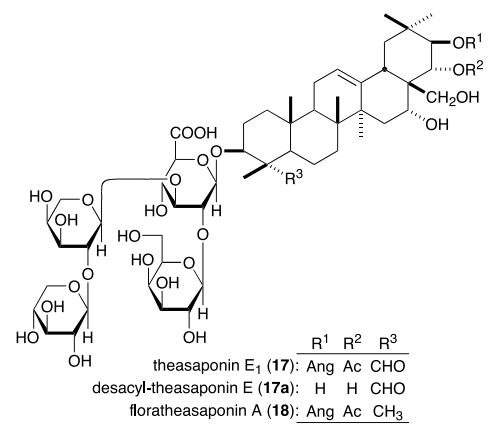
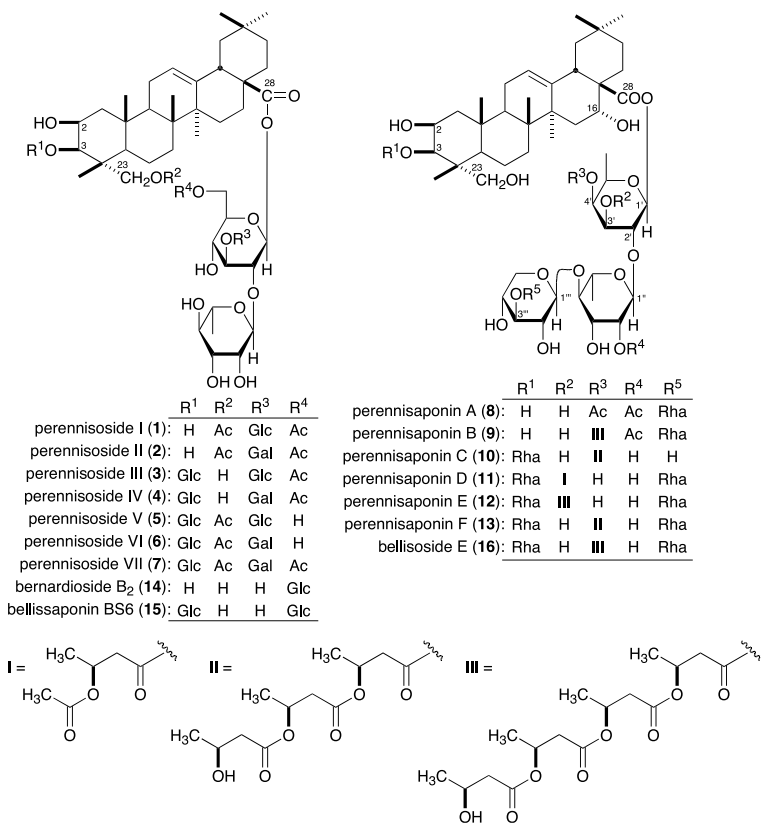
treatment	dose (mg/kg, p.o.)	N	plasma triglyceride (mg/dL) ^a	
			2.0 h	4.0 h
normal	—	6	120.9 ± 21.5 ^c	147.3 ± 15.5 ^c
control	—	6	551.2 ± 30.0	478.9 ± 37.6
MeOH ext.	250	6	615.0 ± 73.8	463.8 ± 78.7
	500	6	337.5 ± 95.1 ^b	528.9 ± 79.2
normal	—	10	140.0 ± 7.4 ^c	124.6 ± 9.3 ^b
control	—	10	439.4 ± 34.5	267.5 ± 22.4
clofibrate	250	10	441.2 ± 25.4	340.5 ± 58.6
	500	10	318.2 ± 18.2 ^c	239.7 ± 28.7

^aValues represent the means ± S.E.M. ^b*p* < 0.05, ^c*p* < 0.01.

(*Bellis perennis*, 花部) のメタノール抽出エキスに中性脂質上昇抑制作用を見出した (Table 1) ことから, その活性成分の探索研究に着手した.

ダイジーは, 和名を雛菊, 延命菊および長命菊とも称される多年生植物で, 西ヨーロッパ原産とされており, ヨーロッパおよび西アジアに広く分布し, 日本には明治時代初期に渡来したとされている. その若葉および花部は食用としても用いられるほか, 根部は古くからヨーロッパにおいて薬用としてリウマチの治療や去痰薬などとして利用されてきた.

我々は, ダイジーフラワーの MeOH 抽出エキスに含有される中性脂質上昇抑制作用成分の探索を目的に, 溶媒分画, 各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC などにより含有成分を精査したところ, これまでに 13 種の新規アシル化オレアナン型トリテルペンサポニン perennisoside I—VII (1—7) および perennisaponin A—F (8—13) を単離・構造決定するとともに 27 種の既知化合物を単離・同定した. これらの新規サポニンには, NMR および MS スペクトルなどの詳細な解析および化学的手法によるアシル基部分の有機酸および構成糖の同定の結果, その化学構造を決定した.¹⁾ 得られたサポニンについて, エキスと同様にオリーブ油負荷マウスにおける血中 TG 上昇抑制作用を検討したところ, 新規サポニン perennisoside I (1) および II (2) および既知サポニン bellissoside E (16) に, 50—100 mg/kg の経口投与において有意な血中 TG 上昇抑制作用が認められた. これらの作用強度は, チャ (*Camellia sinensis*) の種子に多く含有されるサポニン成分である theasaponin E₁ (17) およびチャ花部より見出した floratheasaponin 類 (18) と同程度であった.²⁾ 一方, 既知サポニンの bernardioside B₂ (14) および bellissaponin BS6 (15) および 17 のデスアシル体である desacyl-theasaponin E (17a) においては, 100 mg/kg の経口投与において有意な血中 TG 上昇



抑制作用は認められなかったことから、これらのオレアナン型サポニンの作用発現にはアシル基の存在が重要であることが示唆された (Table 2). また、得られたサポニン成分の腓リパーゼ阻害作用および胃排出速度に及ぼす影響についても検討した. その結果、アシル基を有するサポニン成分に弱いながらも腓リパーゼ阻害活性が認められるとともに、サポニン分画に胃排出速度の抑制作用が認められ、これらの作用によって、消化管からの中性脂肪の吸収を抑制していることが明らかとなった.

Table 2. Inhibitory Effects of Saponins (**1**, **2**, **14**—**18**, **17a**) on TG Elevation in Olive Oil-loaded Mice

treatment	dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	N	plasma triglyceride (mg/dL) ^a	
			2.0 h	4.0 h
normal	—	6	141.4 ± 9.1 ^c	101.6 ± 10.7
control	—	6	501.5 ± 64.0	239.0 ± 58.6
perenissoside I (1)	50	6	326.9 ± 50.5 ^b	355.8 ± 67.5
	100	6	135.7 ± 33.5 ^c	278.7 ± 78.2
control	—	6	338.5 ± 61.9	207.0 ± 26.3
perenissoside II (2)	50	6	232.5 ± 31.8	180.4 ± 33.4
	100	6	179.4 ± 15.3 ^c	155.6 ± 24.5
control	—	6	519.1 ± 60.5	429.8 ± 24.9
bernardioside B ₂ (14)	100	6	352.0 ± 48.6	335.4 ± 57.6
control	—	6	511.0 ± 65.3	542.8 ± 102.8
bellissaponin BS6 (15)	100	6	468.6 ± 83.1	455.1 ± 32.0
control	—	6	425.2 ± 28.7	336.7 ± 31.4
bellisoside E (16)	50	6	368.1 ± 51.6	389.5 ± 80.4
	100	6	127.3 ± 10.4 ^c	294.6 ± 72.8
normal	—	5	178.8 ± 16.9 ^c	132.9 ± 9.8 ^b
control	—	6	575.5 ± 26.4	368.6 ± 22.6
theasaponin E ₁ (17)	50	7	373.9 ± 72.9	312.2 ± 46.4
	100	7	342.3 ± 56.5 ^b	389.5 ± 56.9
normal	—	6	122.6 ± 17.4 ^c	127.1 ± 21.3 ^c
control	—	6	414.4 ± 34.2	311.8 ± 42.1
17a	100	7	440.8 ± 60.6	363.2 ± 40.1
normal	—	9	140.8 ± 5.9 ^c	92.1 ± 3.9 ^b
control	—	9	566.6 ± 22.2	325.9 ± 31.4
floratheasaponin A (18)	50	6	387.4 ± 74.7 ^b	392.9 ± 27.3
	100	6	158.3 ± 31.9 ^c	242.0 ± 58.4

^aValues represent the means ± S.E.M. ^b*p* < 0.05, ^c*p* < 0.01.

3-1-2. ローズヒップ

バラ科植物 *Rosa canina* L. の果実であるローズヒップは、そのビタミンCの含有量の多さから飲料や機能性食品などへ利用されている. 今回、*R. canina* 果実および種子の含水アセトン抽出エキスにマウスを用いた 14 日間連続投与における体重増加抑制および内臓脂肪蓄積抑制作用が認められ、その活性成分としてアシル化フラボノール配糖体 *trans*-tiliroside (**1**) を見い出

した。すなわち、ddY系雄性マウス (11w) への *trans*-tiliroside (**1**) の14日間の投与 (0.1–10 mg/kg, p.o.) により、マウスの体重推移、食餌量、内臓脂肪重量および耐糖能に与える影響について検討したところ、**1** は、低用量 (0.1 mg/kg/day) から有意に体重増加を抑制することおよび肝臓中の中性脂肪 (TG) 含量を低下させるとともに内臓脂肪重量 (副睾丸+腸間膜+腎周囲脂肪) についても有意に

Table 3. Effects of *trans*-tiliroside (**1**) on the gain of body weight and liver TG

	Dose (mg/kg/day)	Gain of body weight		Liver TG (mg/liver)
		(g)	(% of control)	
control	—	4.6±0.5	100.0±9.9	57.3±5.4
1	0.1	2.6±0.5*	56.7±10.4*	46.7±9.7
	1	1.3±0.6**	28.3±11.3**	30.8±5.5**
	10	1.4±0.2**	30.1±4.8**	29.2±4.7**

Mean ± S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 5-7$

Table 4. Effects of *trans*-tiliroside (**1**) on the accumulation of visceral fat in mice

	Dose (mg/kg/day)	Epididymal fat ^a (mg)	Mesenteric fat ^b (mg)	Paranephric fat ^c (mg)	Visceral fat (a+b+c) (mg)
control	—	1205±136	846±62	372±48	2424±235
1	0.1	716±98**	662±50*	284±41	1663±181*
	1	407±89**	509±43**	141±37**	1057±159**
	10	350±24**	516±16**	132±18**	998±52**

Mean ± S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 5-7$

減少することが観察された (Tables 3, 4). 加えて、サンプル投与群動物に対し、耐糖能試験 (glucose 1 g/kg, i.p.) を行った結果、**1** の投与は空腹時血糖値に対しては影響を与えないが、糖負荷時の血糖値の推移を有意に低下させることが判明した (Table 5).

そこで、*trans*-tiliroside (**1**) の構造における活性発現に必須な構造を明らかにする目的で、**1** を構成する部分構造、すなわち kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1a**), kaempferol (**1b**) および *p*-coumaric acid (**1c**) における抗肥満活性を比較検討した。その結果、**1b** および **1c** では活性が認められなかったのに対し、**1a** では有意ではないが、体重増加と内臓脂肪重量の低下傾向が観察された。本結果より、**1** の有する顕著な抗肥満活性の発現には、**1a** に結合する *p*-coumaroyl 基の存在が重要であることが示唆された。次に、**1** の作用機序を明らかにする目的で、**1** の投与 (10–100 mg/kg, p.o.) 24 時間後における肝臓および副睾丸脂肪組織での糖および脂質代謝関連遺伝子の発現について検討した。その結果、いずれも 10 mg/kg の単回投与で肝臓中 PPAR- α および CPT II, 副睾丸脂肪中 adiponectin および PPAR- γ mRNA の発現亢進が観察された。³⁾

Table 5. Effects of *trans*-tiliroside (**1**) on glucose tolerance in mice

	Dose (mg/kg/day)	Plasma glucose (mg/dL)				AUC (hr · mg/dL)
		0	30	60	120 min	
control	—	105±3	311±10	268±12	185±11	474±19
1	0.1	92±6	238±26*	206±17*	152±6	372±23**
	1	101±6	284±12	177±18**	154±9	377±23*
	10	101±4	233±19*	153±12**	138±12**	325±25**

Mean ± S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 5-7$

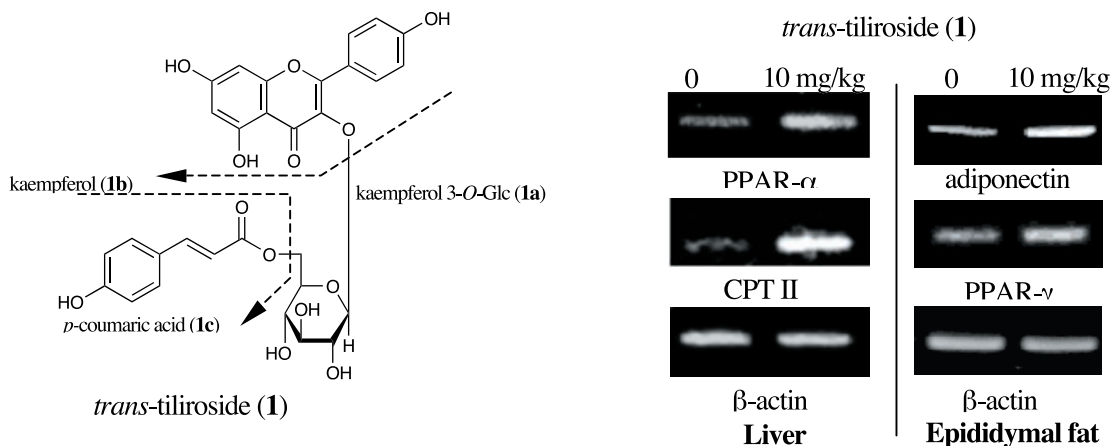
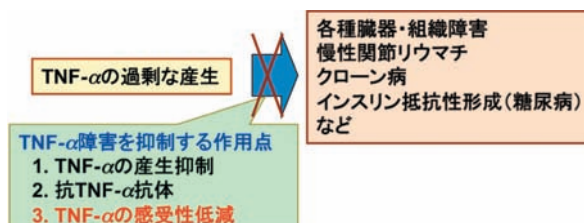


Figure. Effects of single oral administration of **1** on mRNA expressions in liver and epididymal fat tissue in mice

3-2. TNF- α 感受性低減作用を指標とした肝保護作用シーズの探索

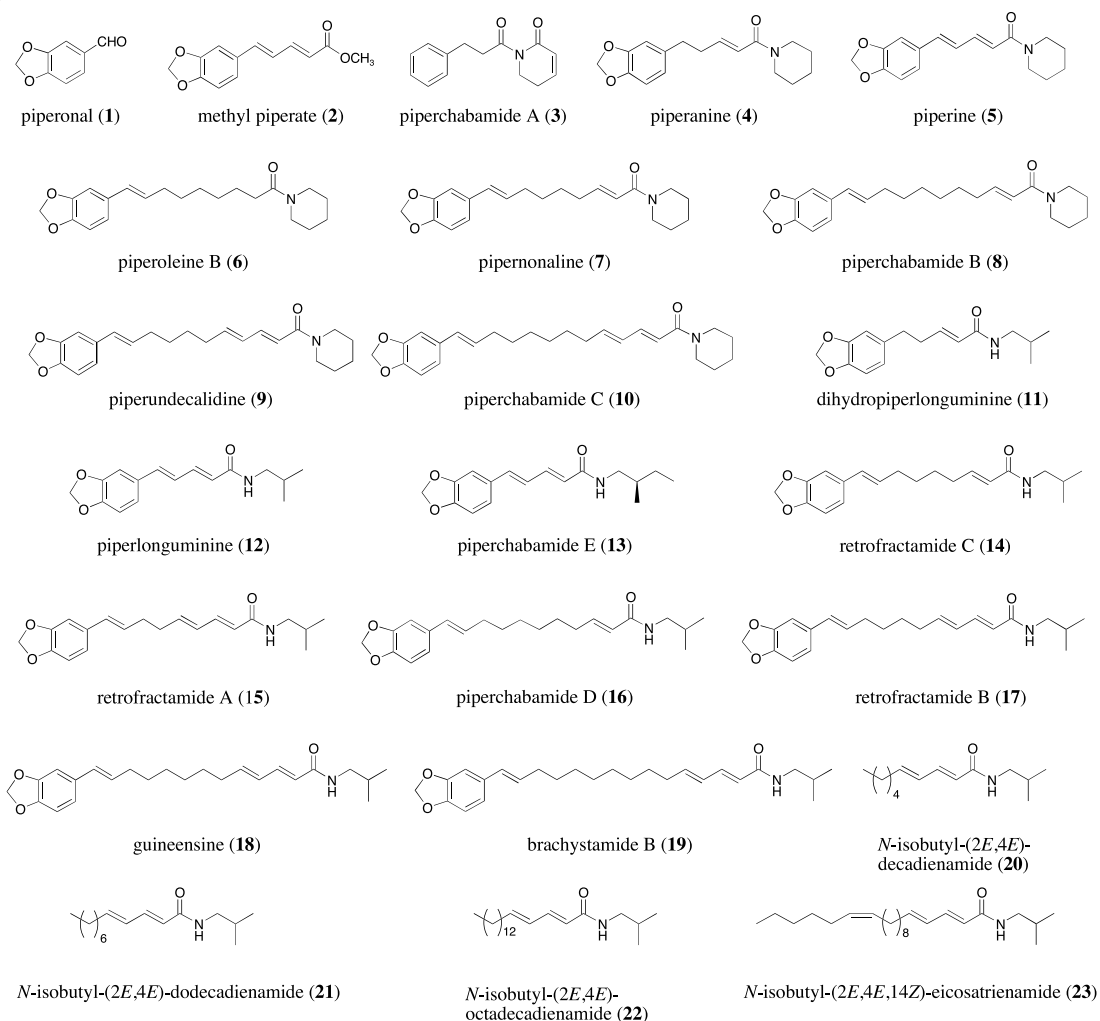
3-2-1. タイ天然薬物 *Piper chaba*

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、肝臓をはじめ種々の臓器や組織への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形成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いたが、近年、抗原抗体反応により TNF- α 自身の作用を低減させる医薬品として、抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブ (infliximab: レミケード[®]) が開発され、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、抗体医薬品であることに起因する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。従って、TNF- α の感受性を低減し、その炎症性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・改善効果を有する医薬シーズとなりうることを期待できる。我々は、天然由来化合物から TNF- α の作用を低減する低分子化合物の探索を実施することを目的に、まず、上記探索に必要なスクリーニング手法の構築を実施した。すなわち、TNF- α 高感受性株として知られているマウス由来繊維芽細胞である L929 細胞を用い、TNF- α およびその細胞障害作用の増強因子として actinomycin D を共存させ、MTT アッセイ法による細胞生存率を判定することで、TNF- α の作用を低減する低分子化合物シーズを見い出すこととした。その結果、コショウ科植物 *Piper chaba* に含有される TNF- α 感受性低減作用成分とその構造活性相関および

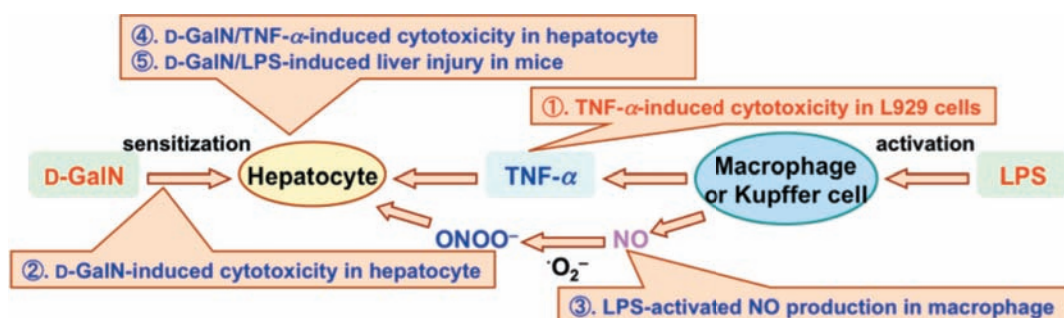


TNF- α の過剰産生による各種障害および疾病

TNF- α による臓器障害予防作用のひとつとして、肝障害モデルに対する肝保護作用を検討したものである。すなわち、コショウ科植物であるコショウ [*Piper nigrum* (white peper, inhibition: $72 \pm 5\%$ at $30 \mu\text{g/mL}$; black peper, $55 \pm 5\%$)] およびタイ地域で Dee plee と称されるジャワナガコショウ (*P. chaba*, $85 \pm 2\%$) の80%含水アセトン抽出エキスに強いTNF- α 感受性低減作用が認められた。そこで、*P. chaba* について、活性を指標に含有成分を精査したところ、新規酸アミド化合物として piperchabamide A—E などを単離・構造決定するとともに、下図に示す化合物を単離した。新規化合物の構造解析は、NMR および MS をはじめとした各種 physical data の詳細な解析から明らかとなった。⁴⁾



得られた化合物について、エキス同様に TNF- α 感受性低減作用試験を実施するとともに、TNF- α による臓器障害のうち、肝臓に及ぼす影響について着目し、下図に示す②から⑤の評価試験について実施した。とりわけ、②. マウス初代培養肝細胞を用いた D-ガラクトサミン (D-GalN)/TNF- α 誘発細胞障害抑制作用の *P. chaba* 含有成分の構造活性相関について、i. アミド結合の存在は、強い活性発現に必須である、ii. 芳香環とアミド結合までの炭素鎖の長さや二重結合の有無は活性の強度に影響し、とりわけ 1,9-デカジエン構造が強い活性を示す、ことなどが示唆された。

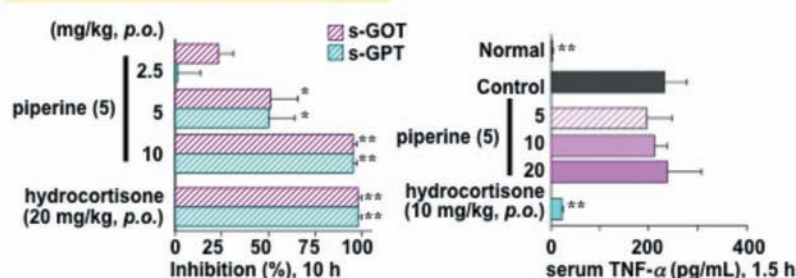


加えて、*P. nigrum* および *P. chaba* の主要成分である piperine (5) について、マウスを用いた D-GalN/LPS 誘発肝障害抑制作用試験を実施した。その結果、5—10 mg/kg の経口投与において、血中のトランスアミナーゼ活性(s-GPT, s-GOT)の上昇を有意に抑制することが示された。また、5—20 mg/kg の用量において血中の TNF- α 濃度に変化は認められず、マウス初代培養肝細胞における D-GalN 単独添加による細胞障害抑制作用が認められなかったことから、5 の肝保護作用の作用点としては、肝細胞において TNF- α の感受性を低減させることが *in vivo* 評価試験においても示された。

以上のことから、我々は TNF- α の過剰産生による各種臓器障害などの炎症性疾患について、

TNF- α の感受性を低減させることにより、その改善・治療作用を発現する、新たな医薬シーズの探索を目的に、TNF- α 高感受性細胞株である L929 細胞を用いた TNF- α 誘発細胞傷害抑制作用スクリーニング試験を構築した。本アッセイ系により、各種香辛料素材抽出エキスをスクリーニングした結果、コショウ科植物 *P. chaba* 抽出エキスに強い TNF- α 感受性低減作用を見出した。活性を指標に含有成分を精査したところ、含有酸アミド成分に強い活性を見出すとともに、その構造と活性強度に関する相関についての知見を得た。また、主要酸アミド成分である piperine (5) について、マウスを用いた D-GalN/LPS 誘発肝障害抑制作用について検討し、5 mg/kg (*p.o.*)の低用量から顕著な肝保護作用を認め、その作用点として TNF- α の産生量には影響を与えず、TNF- α の感受性を低減していることを、*in vivo* の評価試験においても証明した。

D-GalN/LPS-induced liver injury



引用文献

- 1) Morikawa T., Li X., Nishida E., Ito Y., Matsuda H., Nakamura S., Muraoka O., Yoshikawa M.: *J. Nat. Prod.*, **71**, 828-835 (2008).
- 2) Morikawa T., Matsuda H., Li N., Li X., Yoshikawa M.: *Helv. Chim. Acta*, **90**, 2342-2348 (2007).
- 3) Ninomiya K., Matsuda H., Kubo M., Morikawa T., Nishida N., Yoshikawa M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3059-3064 (2007).
- 4) Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yasuda D., Yamaguchi I., Yoshikawa M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2038-2042 (2008).