

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18895

研究課題名(和文)腸内代謝モデル組み込み活性評価システムと肝庇護物質の天然素材からの創薬

研究課題名(英文)The research of intestinal metabolism experimental model built-in biological activity evaluation and liver shield substances from natural materials

研究代表者

土橋 良太(Tsuchihashi, Ryota)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：00369026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：天然薬物や食経験のある野草いやゆる山菜などから配糖体を多数分離し、それら化合物についてヒト由来腸内細菌株、及びヒト腸内細菌叢を用いた代謝研究をおこなった。また、それら天然物から得られた化合物、それらの代謝物に関して肝保護活性の評価を行った。分離したすべての配糖体は代謝を受けることが判明した。それら代謝実験により、それぞれの代謝速度なども判明した。肝保護活性の測定の結果、最終代謝物のquercetin、Kaempferolに大幅な活性上昇が確認された。腸内細菌による代謝が、活性の賦活化に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many glycosides were isolated from natural medicines and wild grasses that have eating experiences, such as wild vegetables, and these compounds were studied for metabolism using human intestinal bacterial strains and human intestinal flora. In addition, hepatoprotective activity was evaluated for compounds obtained from these natural products and their metabolites. It turned out that all separated glycosides were metabolized. Through these metabolic experiments, the metabolic rate of each was also found out. As a result of measurement of hepatoprotective activity, significant increase in activity was confirmed in the final metabolites quercetin and Kaempferol. It was suggested that metabolism by intestinal bacteria affects activation of activity.

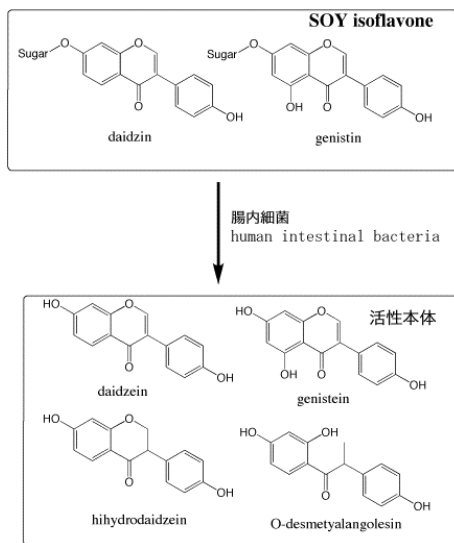
研究分野：天然薬物学

キーワード：腸内細菌 薬物代謝 天然物 肝保護

1. 研究開始当初の背景

近年注目を浴びている機能性食品成分に、大豆中のダイズイソフラボンがある。世界中で数多くの研究がなされ、大豆イソフラボンの活性本体は、それらの腸管内代謝物である equol でないかと推測されている。

大豆イソフラボンのヒト生体内での代謝及びそれらのエストロゲン活性を解明するため、ヒト尿中より以下に示す 10 種もの大豆イソフラボン由来代謝物を分離同定し、またそれらのエストロゲン活性も測定し非常に興味深い知見も得ている。それらの結果より、ダイズイソフラボンの生理活性を示すには、腸管内での腸内細菌による代謝が不可欠であることが判明した。



また、現在までに、“21世紀には国民病”といわれる肝炎に着目し、天然素材からの肝保護物質の探索を行ってきた。その過程で、HepG2細胞を用いた *in vitro* 肝保護活性試験などを行ってきたが、*in vivo* 試験結果との不一致を経験し、生体内での代謝が活性の賦活化に重要ではないかと考えるようになった。さらに、天然薬物や機能性食品などが経口より摂取され、消化管内において代謝された後に、吸収されるものと考えられている。それゆえ、経口摂取時における生体内代謝を考える場合、消化管内でのそれら成分の代謝、特に腸内細菌での代

謝による影響を考慮しなければならないと考えている。

また、医薬品などの生体内代謝研究においては、肝臓での代謝（特に薬物代謝酵素など）に関しては比較的よく研究されているが、第二の肝臓とも言われるほど代謝酵素に富んだ腸内細菌による代謝に関する研究は、特に不十分と言わざると終えない。さらには、天然薬物や機能性食品中の成分に関する詳細なヒト生体内での代謝の研究は、大豆イソフラボンや一部の生薬・天然薬物を除き、ほとんど研究が行われていないのが現状である。

それらのことから、申請者は平成 25~26 年度に科研費(若手研究:B)の助成を受け、腸管内薬物代謝実験モデルと *in vitro* の生物活性評価実験を組み合わせた実験により、生体内での、代謝が加味された天然薬物や機能性食品の肝保護活性の評価を行った。その結果、肝保護効果のある化合物の発見、および、腸内細菌による代謝の関係を明らかにした。そして今回、これまでの、成果をさらに発展させるために、より腸管内代謝に近づけた代謝実験を行うために腸内細菌叢(人糞便)を用いた実験を行うことにより、さらなる詳細な肝保護物質の探索が可能になると考え、本実験を計画した。

2. 研究の目的

(1)平成 25~26 年度に科研費(若手研究:B)の助成を受け構築した腸管内代謝実験モデルを組み込んだ肝保護活性評価試験を用いて伝承的に肝保護効果のある天然薬物や食経験のある野草いわゆる山菜の活性の解明。

(2)効果の認められた天然薬物や食経験のある野草いわゆる山菜に関しては、成分の分離精製を行い、この実験系を用いて活性解明。

(3)活性の認められた化合物に関しては、さ

らなる代謝の影響を考察するために、腸内細菌叢(人糞便)による代謝後の代謝物の分離精製、それらの構造決定を行い、腸内細菌叢による代謝と肝保護活性の活性相関を考察する。上記のように試験を行い、天然薬物や食経験のある野草いわゆる山菜の効果の評価及び探索を行い、肝炎治療薬のリード化合物を探索する。さらには、代謝物の構造解析から腸内細菌叢による代謝と活性の相関も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成分の分離・構造決定

効果の認められた天然薬物や食経験のある野草いわゆる山菜をメタノールを用いて抽出を行い、それらをシカゲル、ODS、ダイアイオン HP-20、Sephadex LH-20 などのゲルによるオープンクロマト法に分離を行い、分離を行った。単離した化合物に関しては、NMR 及び MS スペクトル解析の結果に基づきそれぞれの化学構造を解析した

(2) 腸内細菌株による代謝の解明

理化学研究所 微生物系統保存施設より入手した通性嫌気性菌 14 種、偏性嫌気性菌 14 種、好気性菌 2 種の合計 30 種の菌株を用いる。各腸内細菌株を、GAM 培地に播種し、37 °C、嫌気状態で 24 時間、前培養した。次にその前培養液(100 µL)を、サンプル(約 0.1mg)含む GAM 培地 (1.0mL)に加え、37 °C、24 時間及び 72 時間、嫌気状態で培養する。その培養液を OASIS HLB 固相抽出カラムを用いて抽出し、その濃縮乾固したものを代謝実験サンプルとし、HPLC を用いて代謝を測定する。代謝が確認されたものに関しては、分離を行い構造を決定する。

(3) 肝保護活性評価

ヒト由来細胞である HepG2 細胞を用いて *in vitro* 肝保護活性試験をする。

HepG2 細胞を 96 穴プレートに播種, CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養したものを

試験に用いる

各種代謝サンプルは連続的な希釈系を用い、適宜の濃度で添加する。

その後、起炎剤として *t*-BuOOH 添加し、各サンプル濃度での吸光度を測定する。

肝保護率は起炎剤および sample 非添加時の細胞数を reference, 起炎剤添加での細胞数を control, さらに起炎剤および sample 添加時の細胞数を sample で表し, $(\text{sample-control}) / (\text{reference-control}) \times 100$ で算出する。

(4) 腸内細菌叢を用いた代謝の解明

より腸管内での代謝に近づけ、さらなる代謝による影響を考察するために、スケールアップした腸内細菌叢(人糞便)による代謝実験を行い、代謝物の分離・精製し、構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) 天然薬物や食経験のある野草いわゆる山菜の葛花、コシアブラ、桑の葉、大豆のメタノールエキスを種々のオープンクロマト、フラッシュクロマトにより分離精製を行い、次の化合物を単離した。単離した化合物は、NMR 及び MS スペクトル解析に基づき、Nicotiflorin, Astragaloside, Kaempferol-3,7-di-*O*-glucoside, Rutin, Isoquercitrin, 6-hydroxygenistein-6-*O*-glucosyl-7-*O*-xylosylglucoside, 6-hydroxygenistein-7-*O*-di-glucoside, Tectorigenin-7-*O*-xylosylglucoside, Tectoridin, Tectorigenin, Glycitein-7-*O*-xylosylglucoside, Glycitin, Glycitein, Wistin, kakkalide, Kaempferitrin, Kaempferol-3-*O*-*D*-glucosyl-(1-2)-*D*-galactoside-7-*O*-*L*-rhamnoside, Kaempferol-3-*O*-*D*-glucosyl-(1-2)-*D*-6'-acetylgalactoside-7-*O*-*L*-rhamnoside、Soyasaponin I と同定した。葛花より得られた 6-hydroxygenistein-6-*O*-glucosyl-7-*O*-xylosylglucoside と、コシアブラ

より得られた、Kaempferol-3-O-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-galactoside-7-O-α-L-rhamnoside は、新規化合物であった。

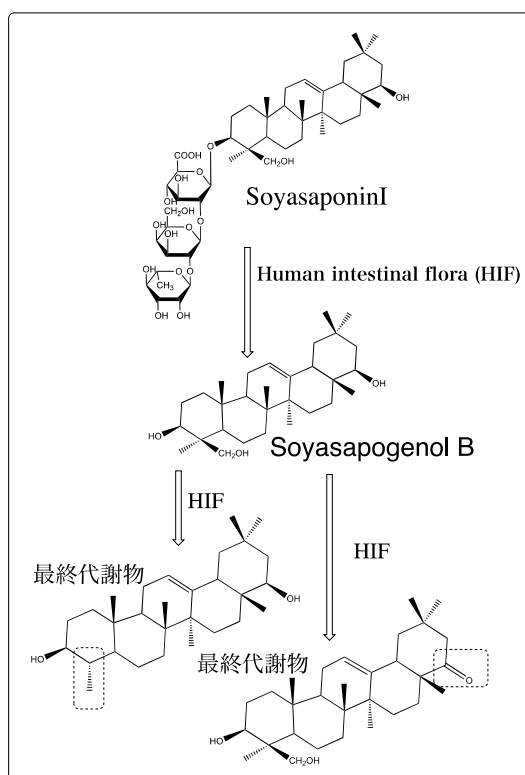
(2) 腸内細菌株 30 種を用いて化合物の代謝の解析を行ったところ、以下の表で示す代謝物が確認された。代謝物の同定を行ったところ、糖部が代謝を受けた最終代謝物が得られた。

	最終代謝物
Kaempferitrin	Kaempferol-3-O-β-D-rhamnoside
Kaempferol-3-O-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-galactoside-7-O-α-L-rhamnoside	Kaempferol
Kaempferol-3-O-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-6'-acetylgalactoside-7-O-α-L-rhamnoside	Kaempferol
Nicotiflorin	Kaempferol
Astragaln	Kaempferol
Kaempferol-3,7-di-O-glucoside	Kaempferol
Rutin	Quercetin
Isoquercitorin	Quercetin

菌株ごとの代謝を解析したところ、グルコース配糖体の Astragaln、Isoliquiritin、Kaempferol-3,7-di-O-glucoside、ほぼすべての腸内細菌株ですみやかに最終代謝物への代謝が確認されたことから、ヒト腸内細菌叢の個人差による影響を受けにくいと考えられる。複合配糖体である Kaempferitrin、Kaempferol-3-O-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-galactoside-7-O-α-L-rhamnoside、Kaempferol-3-O-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-6'-acetylgalactoside-7-O-α-L-rhamnoside、Rutin は、限られた菌種でのみ代謝が確認され、さらには代謝の速度も遅かった。さらに糖部の末端糖の種類、末端糖の結合位置による代謝菌種の変化も確認された。これら複合配糖体化合物は代謝を受けにくいと考えられ、これらの化合物の代謝はヒト腸内細菌叢の個人差による影響を受けやすいと考えられる。また、kaempferitin に関しては、アグリコンまで代謝されず最終代謝物は、Kaempferol-3-O-β-D-rhamnoside でありラムノース配糖体は代謝を受けにくい事が判明した。

腸内細菌株により代謝を受けなかった Soyasaponin I に関しては、ヒト腸内細菌叢 (Hu-

man Feces) を用いた代謝実験を行った結果、以下の代謝物が得られた。



(3) ヒト由来細胞である HepG2 細胞を用いて *in vitro* 肝保護活性試験を行った結果、コシアブラ、桑の葉の配糖体 (EC₅₀ 200 μM) の最終代謝物である Quercetin と、kaempferol にそれぞれ EC₅₀ 8.2 μM、91.0 μM の強い肝保護作用が確認された。

本研究により、腸内細菌による代謝が肝保護活性の発現に必要な事が示唆され、腸内細菌による代謝の重要性が示された。

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

土橋 良太, 吉積 侑希, 福家 成美, 中野 大輔, 大川 雅史, 金城 順英 ヒト腸内細菌株による代謝研究(14) -ヒト腸内細菌によるクワの葉フラボノイドの代謝研究- 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 26 日 石川県・金沢市
土橋 良太, 福家 成美, 吉積 侑希, 中

野 大輔、大川 雅史、金城 順英 ヒト腸
内細菌株による代謝研究(13)

Kaempferol 配糖体の代謝研究 日本生
薬学会第64回年会 2017年9月10日
千葉県・習志野市

土橋良太，福家成美，吉積侑希，手島貴
也，中野大輔，大川雅史，金城順英，野
原稔弘，細野 剛，吉江紀明，渡壁典生，
飛田和達紀，向井宏充 葛花の新規イソ
フラボン配糖体に関する研究(2) 日
本薬学会第137年会 2017年3月26
日 福島県・仙台市

土橋良太，手島貴也， 福家成美，吉積
侑希，中野大輔，大川雅史，金城順英
ヒト腸内細菌株による代謝研究(12)
～Human Feces による大豆サポニンの代
謝～ 日本生薬学会第63年会 201
6年9月29日 富山国際会議場 富
山県・富山市

6. 研究組織

(1)研究代表者

土橋 良太 (Tsuchihashi Ryota)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：00369026

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし