

令和元年9月11日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08312

研究課題名(和文) 抗AGEs作用を基盤とした糖尿病合併症治療薬の開拓

研究課題名(英文) Search and development of antidiabetic agents based on anti-AGEs activity

研究代表者

松田 久司 (MATSUDA, Hisashi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40288593

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)：本研究では、天然薬物を探索資源として終末糖化産物(AGEs)生成抑制作用および培養細胞を用いたAGEs誘発細胞障害に対する抑制作用を調べた。その結果、指甲花の花部エキスに糖化アルブミンによるPC12細胞の突起伸長減少に対する抑制作用が認められ、(±)-eriodictyolなどのフラボノイドに有効性を認めた。また、キンモクセイの花部エキスにAGEs生成抑制作用が認められ、活性成分を明らかにした。さらに、オトメアゼナ全草に含まれるplantainoside Bなどやアマチャに含まれるthunberginol A, B, FなどにAGEs生成抑制やアルドース還元酵素阻害作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病治療には血糖降下薬など優れた医薬品が開発されているが、合併症の治療薬としてはアルドース還元酵素阻害剤のみしか開発に成功していない。私たちはこれまで糖尿病に有効と伝承されてきた天然薬物を素材として探索を行ってきた結果、多様な終末糖化産物(AGEs)の生成抑制物質を明らかにしてきた。本研究においては、AGEs生成抑制物質のみならずAGEsによる神経細胞や血管内皮に対する機能障害を抑制する物質を見出し、糖尿病合併症における神経変性や血管内皮障害に有効な物質を探索し、新しい医薬シーズの探索を目指すことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the inhibitory effects of the extracts of medicinal plants and their constituents on production of advanced glycation end-products (AGEs) and the AGEs-induced cell disorder using cultured cells. As a result, the extracts of flower of Lawsonia inermis improved the decrease in development of neurites of PC12 cells by a glycated-bovine serum albumin (Glycated-BSA), and searching for the active constituents using bioassay together, and flavonoids such as (±)-eriodictyol are found as active constituents. The flower extract of Osmanthus fragrans var. aurantiacus inhibited production of AGEs, and 10-acetoxyligstroside was found to be an active constituent. In addition, we found that the extract of whole plants of Bacopa monniera and its constituents plantainoside B et al. inhibited production of AGEs and aldose reductase (AR). The processed leaves of Hydrangea macrophylla var. thunbergii and its constituents, thunberginols A, B, and F, also inhibited the AR.

研究分野：薬用資源学, 生薬学

キーワード：終末糖化産物 PC12細胞 神経突起 アルドース還元酵素 指甲花 オトメアゼナ キンモクセイ アマチャ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞で生成されるインスリンの作用の絶対的あるいは相対的不足によりおこる慢性的に高血糖状態のことで、主徴として種々の代謝異常をきたす疾患である。本邦では「糖尿病が強く疑われる者」は約 950 万人、「糖尿病の可能性を否定できない者」は約 1,100 万人と推計されている。「糖尿病が強く疑われる者」と「糖尿病の可能性を否定できない者」を合わせると約 2,050 万人であり、平成 9 年以降、初めて減少に転じたが、依然として多くの国民が直面する問題である。糖尿病の治療には血糖値のコントロールが重要である。長期間の高血糖状態が、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎障害、糖尿病性神経障害の三大合併症の起因となっているが、合併症に有効な薬物としてアルドース還元阻害薬以外に有効な医薬品の開発は成功していない。一方、加齢や高血糖状態で促進的に生成される終末糖化産物（advanced glycation end-products: AGEs）の中には強い細胞障害を示すものがあり、末梢神経や血管内皮への障害によって神経障害、網膜症、腎症などを引き起こす原因となることが報告されている。特に糖代謝中間体に由来するグリセルアルデヒド由来 AGEs（toxic AGEs: TAGE）が受容体（receptor for AGEs: RAGE）を介し、血管合併症の発症・進展に強く関わっていることが明らかになり、新しい創薬ターゲットとして注目されている。

糖尿病の合併症治療薬の開発や伝承薬効の裏付けを目的として、合成化学物質や天然薬物からアルドース還元酵素阻害成分や AGEs 生成阻害成分が多数報告されてきたが、AGEs 生成阻害成分に関しては高濃度でしか抑制しないものがほとんどであり、AGEs による細胞機能障害を抑制する化合物に関しては報告がみられず、ほとんどの AGEs 生成阻害物質については実験動物での効果の検証がなされていない。一方、漢方薬を含めた伝承薬には、臨床的に血糖降下作用がほとんど認められないにもかかわらず、網膜症や腎症の発症を予防するものが報告されているが、有効成分や作用メカニズムの詳細は不明なままとなっている。

2. 研究の目的

糖尿病は血糖値のコントロールが重要であり、優れた医薬品が開発されているが、合併症の治療薬としてはアルドース還元阻害成分のみしか開発に成功していない。私たちはこれまで糖尿病に有効と伝承されてきた天然薬物を素材として探索を行ってきた結果、小腸 α -グルコシダーゼ阻害成分、アルドース還元阻害成分、糖吸収遅延成分および PPAR γ アゴニスト様成分を見出すとともに、多様な AGEs の生成抑制物質を明らかにしてきた。本研究では、AGEs 生成抑制物質のみならず AGEs による神経細胞や血管内皮に対する機能障害を抑制する物質を見出し、糖尿病合併症における神経変性や血管内皮障害に有効な物質を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、探索資源として、抗糖尿病作用や強壮作用が伝承され、安全性が十分確立している天然薬物 20 種程度の素材を厳選し、探索資源とした。

そして AGEs 生成抑制作用および神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞を用いて AGEs 誘発細胞障害に対する抑制作用を検討した。さらに、化学修飾した誘導体や関連化合物の活性を比較検討して、活性発現の必須構造など構造活性相関を解析するとともに、顕著な活性を示す化合物については糖尿病マウスで効果を確認することを最終目標とした。

- (1) AGEs 生成抑制活性：ブドウ糖などの還元糖と血清蛋白質アルブミンとの非酵素的反応によって生成する AGEs に対する生成抑制作用について検討を行った。
- (2) 糖化タンパク質や AGEs 関連物質によって生じる培養神経細胞（PC12 など）の神経突起伸張抑制、糖化コラーゲンへのヒト線維芽細胞（HDF）の接着や増殖の抑制、AGEs 関連物質と酸化ストレス（Fe³⁺）併用による HDF や血管内皮細胞（HUVEC）などに対する細胞毒性に対する効果について検討を行った。
- (3) 生成した AGEs と細胞毒性との相関性を調べた。
- (4) 有望な抽出エキスについては、バイオアッセイを併用しながら活性成分の単離と各種 NMR スペクトルの測定と解析、化学誘導等によって化学構造の解明を行うとともに、有望な化合物については、構造活性相関を明らかにするため化学誘導を行った。

4. 研究成果

神経成長因子（NGF）添加によるラット副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞の神経突起伸長などの神経細胞様分化に与える糖化アルブミンの影響を検討したところ、分化的形態変化が低下することを確認した（図 1）。構築済みのエキスライブラリーについて、AGEs の生成抑制のみならず、AGEs の PC12 細胞に及ぼす作用、アルドース還元酵素阻害作用などについて検討したところ、以下の結果が得られた

- (1) 指甲花（*Lawsonia inermis*）花部エキスに糖化アルブミンによる PC12 細胞の突起伸長減少に対する抑制作用が認められ、バイオアッセイを併用しながら活性成分の探索を行ったところ、*Lawsonia inermis* 花部に含まれる quercetin (1)、(±)-eriodictyol (3)、quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (4)、luteolin-4'-O- β -D-glucopyranoside (5)、spiraeoside (6)、(±)-taxifolin (8) など

のフラボノイドや inermioside A (9), polyoacetophenoside (10) などのアセトフェノン は、糖化タンパク質による神経様の突起伸長抑制作用を改善することを見出した。また、通常培養条件では神経様細胞突起進展作用が認められなかった (±)-taxifolin (8) が糖化タンパク質による神経様の突起伸長抑制作用を改善することが判明した (図2)。これらの結果は、糖尿病による末梢神経障害の発症予防に繋がる成果と言える。

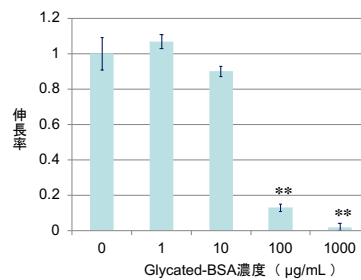


図1. 糖化タンパク質の神経細胞の突起伸長に及ぼす影響

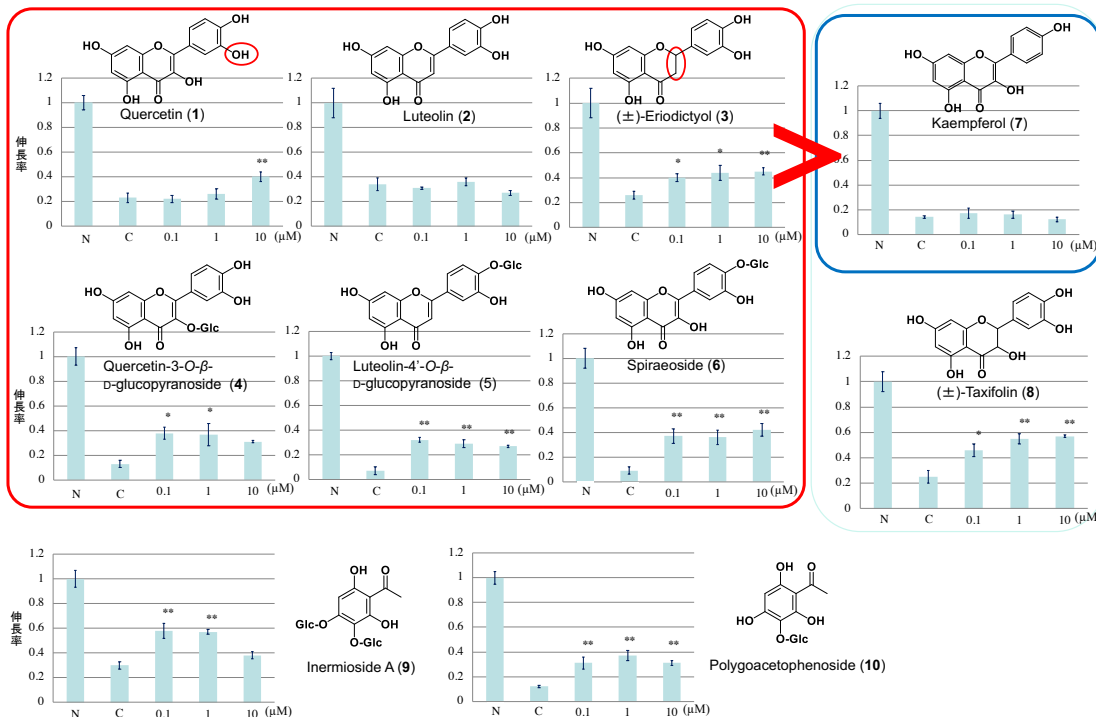


図2. Glycated-BSA による PC12 細胞の突起伸長抑制に対する指甲花成分の改善作用
N: Glycated-BSA (-), C: Glycated-BSA (100 µg/mL)

- (2) キンモクセイ (*Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus*) 花部エキスに AGEs 生成抑制作用が認められ、バイオアッセイを併用しながら活性成分の探索を行ったところ、10-acetoxyligstroside (12) に有効性を認めた。

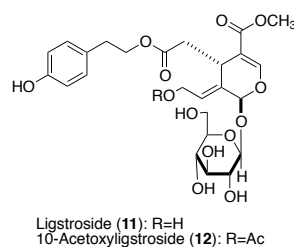


図3. キンモクセイ花部成分 (11, 12)

表1. キンモクセイ花部成分の AGEs 生成抑制作用

Conc.	抑制率 (%)				
	0	3	10	30	100 (µM)
11	0.0 ± 0.9	-30.3 ± 3.7**	-46.4 ± 5.3**	-50.3 ± 4.3**	-54.4 ± 10.3**
12	0.0 ± 2.5	17.3 ± 0.8**	22.5 ± 1.0**	33.2 ± 1.2**	47.7 ± 1.7**
10-Hydroxygeraniol	0.0 ± 1.6	-2.4 ± 6.8	4.1 ± 0.5	8.9 ± 1.1	11.5 ± 0.7

n=4

- (3) オトメアゼナ (*Bacopa monniera*) 全草の含有成分のうち、plantainoside B (15) および desrhamnosyl isoacteoside (16) は AGEs 生成抑制作用を示した。また、plantainoside B (15) および desrhamnosylisoacteoside (16), (E)-4-hydroxymethyl phenyl-6-O-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (17) などはアルドース還元酵素阻害作用を示した (図4)。そこで、カフェ酸誘導体について検討したところ、4-ethylcatechol, methyl caffeate, caffeic acid, (E)-3,4-dihydroxybenzylideneacetone および 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid は AGEs 生成抑制作用を示した (IC₅₀=70, 91, 59, 61, 27 µM)。一方、ethyl caffeate, methyl caffeate, (E)-3,4-dihydroxybenzylideneacetone および trans-ferulic acid はアルドース還元酵素阻害作用を示した (IC₅₀=6.3, 9.8, 23, 79 µM)。

以上の結果から、AGEs 生成抑制作用およびアルドース還元酵素阻害作用にはカテコール構造が重要であることが判明し、オトメアゼナ含有成分は、AGEs 生成抑制およびアルドース

ス還元酵素阻害作用を介した糖尿病合併症予防作用が期待された。

- (4) アマチャのメタノール抽出エキスに $IC_{50}=15.3 \mu\text{g/mL}$ と有意なアルドース還元酵素阻害作用が認められたことから、アマチャの含有成分について検討したところ、イソクマリン類である thunberginol A (22, $IC_{50}=4.2 \mu\text{M}$), thunberginol B (23, $IC_{50}=2.9 \mu\text{M}$), およびベンジリデンフタリド誘導体の thunberginol F (29, $IC_{50}=2.5 \mu\text{M}$) に有意なアルドース還元酵素阻害作用が認められた (図5)。なお、陽性対照にはエパルレスタット ($IC_{50}=0.01 \mu\text{M}$) を用いた。続いて、作用を示した成分について、アルドース還元酵素が関与する赤血球内ソルビトール蓄積に及ぼす作用を検討した。その結果、thunberginol A (22, $IC_{50}=67 \mu\text{M}$), thunberginol B (23, $IC_{50}<25 \mu\text{M}$), および thunberginol F (29, $IC_{50}=31 \mu\text{M}$) とともに有意なソルビトール蓄積抑制作用が認められた。

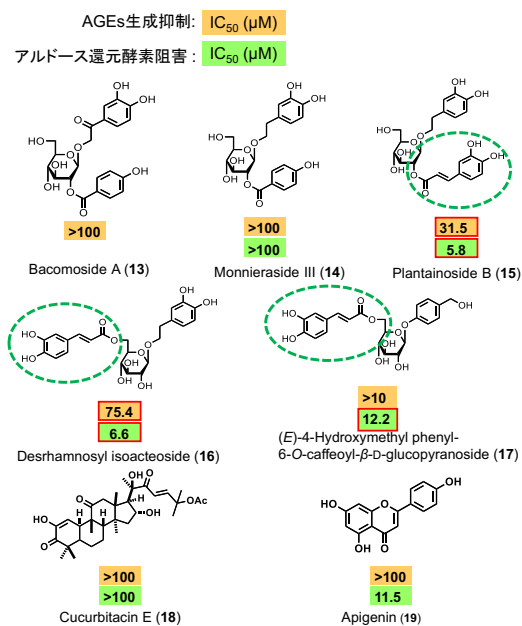


図4. オトメアゼナ含有成分 (13–19) の AGEs 生成抑制作用およびアルドース還元酵素阻害作用

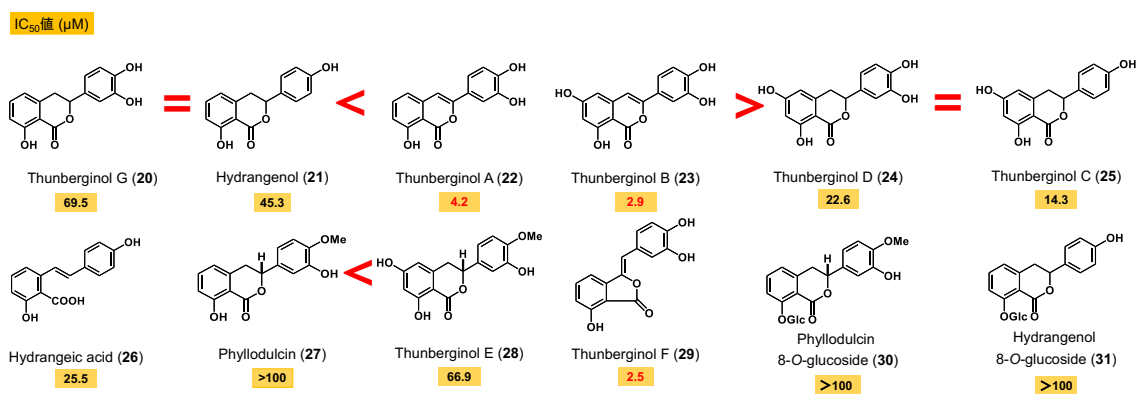


図5. アマチャ成分 (20–31) のアルドース還元酵素阻害作用

- (5) その他、本研究の過程で、*Cassia auriculata* 種子から新規アントラセノン誘導体 auriculatoaside A および B を得た。それらの化学構造を明らかにするとともにメラニン生成抑制作用を明らかにした。

以上、有望なエキスの成分単離および構造解明については結果を得ることができ、計画当初の目標を達成することができた。一方、*in vivo* 試験を行うため、量的な確保を試みたが、十分な量が得られなかった。また、毒性の強い AGEs の単離・構造解明を試みたが、結果を得るまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 中嶋聡一, 森本有紀子, 中村誠宏, 森浦俊次, 森田萌子, 古川茉奈, 劉江, 松田久司: キンモクセイ (*Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus*) 花部成分の化粧品原料としての機能性に関する基礎研究. *Fragrance Journal*, 査読有, **2**, 54–57 (2018).
- ② Weicheng Wang, Yi Zhang, Souichi Nakashima, Seikou Nakamura, Tao Wang, Masayuki Yoshikawa, and Hisashi Matsuda, Inhibition of Melanin Production by Anthracenone Dimer Glycosides Isolated from *Cassia auriculata* Seeds. *J. Nat. Med.*, 査読有, **63**, 439–449 (2019).

[学会発表] (計 7 件)

- ① 奥山優希, 尾田好美, 中嶋聡一, 中村誠宏, 太田智絵, 棚橋 舞, 小堀葉奈, 森田萌子, 松田久司: オトメアゼナの AGEs 生成抑制作用成分, 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (神戸), 2017 年 10 月.
- ② 井上知紘, 中嶋聡一, 中村誠宏, 森浦俊次, 鈴木杏子, 門 麻衣子, 森田萌子, 松田久司: キンモクセイ花部のアルドースレダクターゼ阻害作用成分および糖化抑制作用成分. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (神戸), 2017 年 10 月.
- ③ 森田萌子, 中嶋聡一, 中村誠宏, 鈴木杏子, 住田将也, 棚橋舞, 門麻衣子, 井上知紘, 松田久司: キンモクセイ (*Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus*) 花部のアルドース還元酵素阻害成分および糖化抑制成分. 日本生薬学会第 64 回年会 (千葉), 2017 年 9 月.
- ④ 中嶋聡一住田将也, 門 麻衣子, 島田あつみ, 井上知紘, 中村誠宏, 中村早紀, 吉川佳那, 岩崎宏樹, 山下正行, 松田久司: 甘茶イソクマリン類および誘導体のアルドースレダクターゼ阻害作用および赤血球内ソルビトール蓄積抑制作用, 日本薬学会第 138 年会 (金沢), 2018 年 3 月.
- ⑤ 青木麻琴, 中嶋聡一, 尾田好美, 中村誠宏, 劉 江, 松田久司: 糖化タンパク質による神経様分化抑制に対する指甲花 (*Lawsonia inermis*) 花部の改善作用, 第 35 回和漢医薬学会学術大会 (岐阜), 2018 年 9 月.
- ⑥ 中嶋聡一, 門麻衣子, 島田あつみ, 中村誠宏, 深谷匡, 井上知紘, 中村早紀, 吉川佳那, 月岡淳子, 松田久司: 甘茶成分のアルドースレダクターゼ阻害作用およびアマチャ収穫時期による作用変動について, 第 35 回和漢医薬学会学術大会 (岐阜), 2018 年 9 月.
- ⑦ 吉川佳那, 中嶋 聡一, 門麻衣子, 島田あつみ, 中村誠宏, 月岡淳子, 井上知紘, 中村早紀, 松田久司: アマチャ葉部の収穫時期別アルドース還元酵素阻害作用, 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (姫路), 2018 年 10 月.

[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://labo.kyoto-phu.ac.jp/syoyaku/shoyaku_lab02019/index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中村 誠宏

ローマ字氏名: NAKAMURA, Seikou

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20411035

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。