

令和 6 年 6 月 1 4 日現在

機関番号：3 7 4 0 1

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：2 2 K 2 0 7 3 0

研究課題名（和文）終末糖化産物の生成を抑制し加齢性疾患を予防する天然化合物の探索と関連誘導体の創製

研究課題名（英文）Search of natural compounds for prevention age-related disease due to inhibition the formation of Advanced Glycation End-products, and synthesis of related derivatives.

研究代表者

中嶋 圭介（Nakashima, Keisuke）

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：5 0 9 6 4 4 4 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本検討の前提となるイカリソウに関するCMA、CML生成抑制活性に対する知見を論文投稿・受理された。またホップ由来のプレニル関連化合物 7 種の活性を測定・評価した結果、ラセミ体の Xanthohumol Dおよび光学分割した各鏡像異性体にCMA生成阻害活性を見出した。イカリソウおよびホップの知見から、活性に必須のコア構造はフェノール性水酸基、それも水酸基が2個以上結合したカテコール基やガロイル基を有することが重要であることを明らかにした。さらに、それら化合物を高含有するという報告のあるノブドウについて検討を行った結果、7種の化合物を単離・同定し、予想通り強力な活性を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討からフェノール性水酸基を豊富に含む天然資源には強力な抗糖化作用が期待されることが明らかとなった。中でも本検討で用いたノブドウは、生育は容易で繁殖力もあるため育成は容易であるが、味等の問題から商業的に利用が難しい未利用資源に分類される植物である。このような未利用資源であっても、今回のような抗糖化活性を有することが明らかとなれば商業的な利用価値を付与できる可能性があり、未利用資源の利活用につながることを期待される。またノブドウから活性化合物を精製し、それを原料としてより強力な活性を有する化合物を創出する等、本検討が抗糖化を介した疾病予防薬創出の足掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The findings on the CMA and CML formation inhibitory activity of Epimedium Herba (EH), which is the premise of this study, were submitted and accepted for publication. In addition, 7 prenylated compounds from Humulus lupulus (hops) were isolated and evaluated the activity. As the result, Xanthohumol D (XHD), isolated as racemic compound and each enantiomer (XHD1, D2) had CMA formation inhibitory activity at a final concentration of 1 mM. The findings with EH and hops revealed that the core structure for activity is a phenolic hydroxyl group, with at least two hydroxyl groups (catechol or galloyl groups). Therefore, a study was conducted to identify active compounds from Ampelopsis glandulosa var. heterophylla (wild grape), which has been reported to contain a large amount of phenolic compounds. As a result, 7 compounds were identified and found to have significant activity, as expected.

研究分野：薬用植物学・天然物化学

キーワード：終末糖化産物 カテコール基 ガロイル基 プレニル関連化合物 ホップ ノブドウ 抗CMAモノクローナル抗体 抗CMLモノクローナル抗体

## 1. 研究開始当初の背景

世界的な高齢化社会のなかで、予防・未病の観点から若い世代から長期的で持続可能な「健康長寿」をキーワードとした行動が重要になっている。疾病に対する治療薬は多数存在しているが、疾病になる前段階において継続的に服用する「予防薬」あるいは「未病薬」に相当するものは認可されていない。また、継続的に摂取可能な予防・未病を目的とした食品についての検討は発展途上であるが、社会全体で強く求められている。申請者らの研究室では、予防・未病に焦点を当てた研究課題として、糖尿病性合併症および加齢疾病に関与する終末糖化産物 (AGEs) 生成阻害剤を天然素材から探索している。本研究では、30 種以上報告されている AGEs 構造体の中でも疾病との関連が明らかにされている CML ( $N^{\alpha}$ -(carboxymethyl) lysine), CMA ( $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) arginine) に着目し、生成阻害剤の探索研究を行っている。生薬エキスを中心に食品としても摂取可能な素材 30 種以上のスクリーニング試験の結果、イカリソウ (Epimedium Herba) など数種の素材の有効性が判明した。なかでも顕著な活性の認められたイカリソウエキスについて詳細な成分研究を行い、得られた特徴的なプレニルフラボノイド類に CML 並びに CMA の両方を強く生成阻害することを明らかにした。構造活性相関の検討の結果、活性の発現にはプレニル基が重要であること、Epimediumkoreanin B (以下 EKB) がイカリソウの活性本体であることが判明した (Nakashima K, *et al*, *J. Nat. Med.* 2016)。イカリソウのプレニルフラボノイドで活性が認められた知見をもとに新たに活性化合物を得る目的で医食同源に関連した天然素材のスクリーニングを開始しているところであるが、より網羅的に様々な化合物との活性比較を行うことでさらに精度の高い構造活性相関に関する知見が得られる。また、プレニルフラボノイド類を含むフラボノイド類は一般的に経口投与時の生体利用率が極めて低いことが指摘されている。改善策としては機能性関与成分の一つであるモノグリコシルヘスペリジンのように、糖鎖を付加して水溶性向上させる方法などが現在工業的に用いられている。EKB およびそれに類する化合物について、ヒトでの実際利用を考えた際には活性を維持しながら生体利用率を向上するような工夫が求められている。

## 2. 研究の目的

プレニル基とフェノール性水酸基を有する化合物群には CML と CMA のどちらか、または両方の生成を阻害することが推察される。アサ科ホップの Xanthohumol 等のプレニルカルコン類、さらにブラジル産プロポリスのプレニル桂皮酸誘導体 Artepillin C 等には CML と CMA の阻害活性が期待される。本研究では、ホップを手始めとして抽出・分離精製しプレニル基とフェノール性水酸基をコア構造とする化合物の集積を行うことを目的に検討を行った。また検討を重ねる過程において、フェノール性水酸基、それも水酸基が 2 つ (カテコール基) 以上が活性に必須のコア構造であることが示唆されたため、ポリフェノールを豊富に含みエキスクリーニングでも顕著な活性を示したノブドウ果実からより強力な活性化合物を探索するために検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) CMA, CML 生成抑制活性試験について

CMA, CML 生成抑制活性 (以下、活性) 試験は既報に従い、ELISA 法を用いた。簡潔に、活性を測定するサンプルを加えた反応液を 37℃ で 7 日間インキュベーションした。インキュベートした反応液を希釈し、96 well マイクロプレートリーダーに分注した。2 時間静置した後にマイクロプレートリーダーを洗浄、ブロッキングをし、各反応溶液に生成した CML, CMA の量を抗 CMA, CML モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で測定・定量した (図 1)。

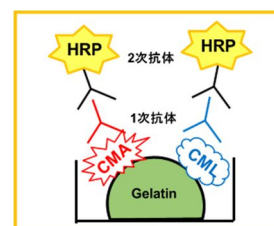


図 1. AGEs 生成阻害活性試験概略図

### (2) 植物の抽出・分離・化合物の精製法および構造決定について

市販のホップ (*Humulus lupulus*, カリス成城、東京、日本) を購入し、その 400 g についてメタノール (MeOH) に浸潤し、超音波処理を加えて抽出物を作成した。その後、上記活性を指標としながら各種クロマトグラフィーを用いて分画・精製を繰り返し、ホップに含まれる活性成分の探索検討を行った。また、ノブドウ果実については崇城大学薬学部附属薬用植物園 (熊本県) で採取し、その 368g についてホップと同様、MeOH に浸潤し超音波を加えて抽出物を作成した。その後、上記活性を指標としながら各種クロマトグラフィーを用いて分画・精製を繰り返し、ノブドウに含まれる活性成分の探索検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) イカリソウの知見について

申請者らが先に明らかにしていたイカリソウ由来活性成分のより詳細な探索研究およびプレニル関連化合物を中心とした構造活性相関について論文投稿し、受理された (Nakashima K, *et*

al, *Front. Chem.* 2024)。本知見を基に、得られたフェノール性水酸基またはプレニル基およびその両方を有する化合物群の構造活性相関を議論する上で有用な論文になることが期待される。

## (2) ホップの活性成分探索検討について

市販のホップ (*Humulus lupulus*, カリス成城、東京、日本) を購入し、その 400 g についてメタノール (MeOH) に浸潤し超音波処理を加えて抽出液を作成した。作成した抽出液を減圧乾固し抽出物 (113.3 g) を得た後、水に再溶解し酢酸エチルを用いて分液した。酢酸エチル層 (74.9 g) について、少量の MeOH で再溶解した後にポリスチレンゲルである Diaion SS (Φ5.0×45 cm) に付し、H<sub>2</sub>O, 50% MeOH, 100% MeOH およびアセトン画分を得た (Fraction (以後、Fr.) 1-1~1-4)。収量が多く、また活性も強力であった MeOH 溶出画分 (Fr. 1-3, 52.5 g) の一部 (25 g) を次に Chromatrex ODS カラム (Φ5.0×24 cm) に付し、50%~100% MeOH の順に 10% 間隔で溶出し、各画分を得た (Fr. 1-3-1~1-3-8)。活性の強力であった 70% MeOH 画分である Fr. 1-3-3 (9.1 g) について、Sephadex LH-20, SiO<sub>2</sub> 等各種クロマトグラフィーを用いて分離を行い、最終的には HPLC を用いて化合物を精製することで、キサントフモールを中心とした 7 種のプレニル関連化合物を単離した (図 2)。

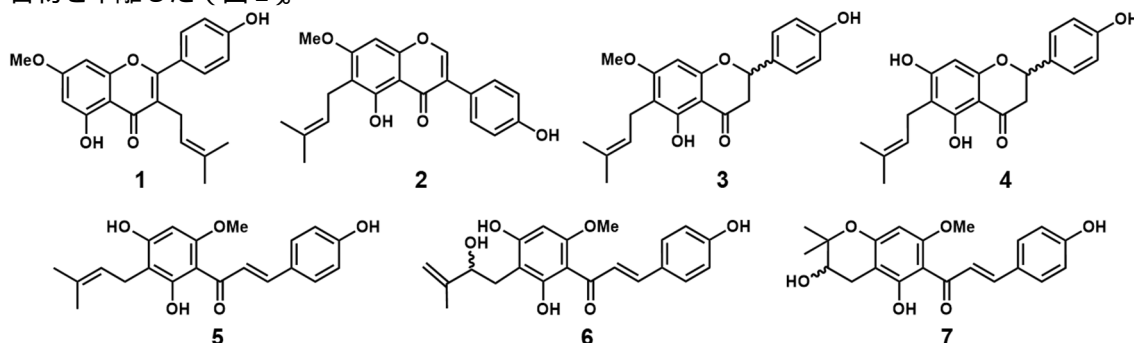


図 2. ホップより単離したプレニル関連化合物の構造式

単離した 7 種の化合物の内、化合物 2 については文献未記載の新規化合物であると推定している。また、各化合物の活性を測定・評価した結果、特に化合物 6 (Xanthohumol D, 以下 XHD) に終濃度 1 mM の濃度において CMA 生成阻害活性が認められた (図 3)。一方で、XHD はプレニル基 2 位に不斉炭素が存在するが、旋光度を測定するとほぼ 0 であり、ラセミ体として得られた。そこで、XHD の鏡像異性体 (*S*, *R* 体) の違いで活性に影響が出るかを検討するために、XHD の光学分割を試みた。キラルカラム (Cellulose C, Φ 4.6×250, YMC CO., LTD., Kyoto, Japan) を用いて検討をしたところ、面積比 1:1 の 2 つの化合物 (XHD<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) を得た。XHD<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> は <sup>1</sup>H-NMR のデータは一致していたが旋光度がそれぞれ XHD<sub>1</sub>: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -9.1 (*c* 0.20, MeOH), XHD<sub>2</sub>: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +8.8 (*c* 0.20, MeOH) であったため、鏡像異性体であった。そこで、XHD<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> の絶対立体構造を明らかにするために、改良モッシャー法を試みた。その結果、XHD<sub>2</sub> は *R* 体であることを明らかとし (図 4) その鏡像異性体である D<sub>1</sub> は *S* 体と決定した。

次に鏡像異性体間で活性に差があるかを検討した結果、どちらかの鏡像異性体に阻害活性が偏ることなくラセミ体 (XHD) と同程度であった (図 5)。今回のホップの検討から得られた知見およびイカリソウの探索検討より得られた知見 (Nakashima K, et al, *Front. Chem.* 2024) から、活性に必須のコア構造はカテコール基以上のフェノール性水酸基が重要であり、プレニル基はそのコア構造に結合することで活性を増強する効果があることが示唆された。

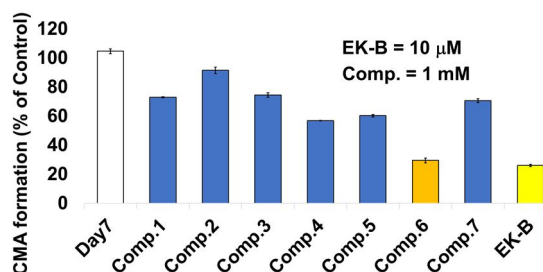


図 3. ホップより単離した 7 種のプレニル関連化合物の CMA 生成阻害活性試験結果

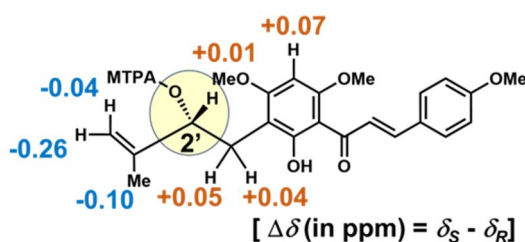


図 4. XHD<sub>2</sub> の絶対立体構造の決定



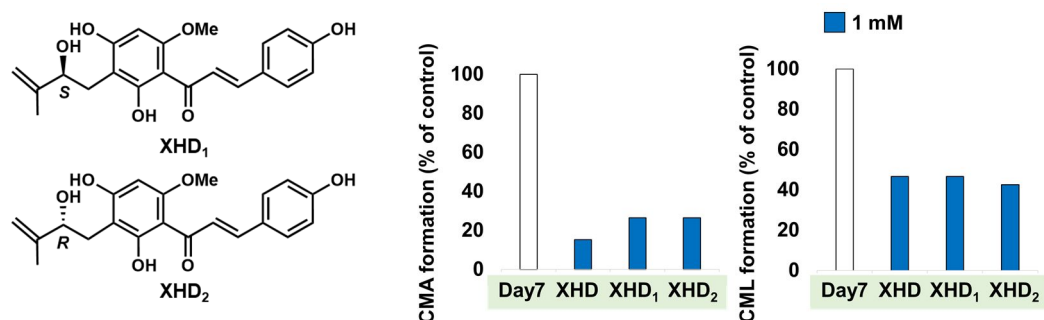


図 5. XHD<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> の構造式と各活性試験結果

### (3) ノブドウの活性成分探索検討について

崇城大学薬学部附属薬用植物園で採取されたノブドウ (*Ampelopsis glandulosa* var. *heterophylla*) を約 400 g はかりとり、MeOH に浸潤し超音波処理を加えて抽出液を作成した。作成した抽出液を減圧乾固し抽出物 (14.24 g) を得た後、少量の MeOH で再溶解した後にポリスチレンゲルである MCI gel CHP-20P (Φ 5.0 × 45 cm) に付し、H<sub>2</sub>O, 50% MeOH, 75% MeOH, 100% MeOH, およびアセトン画分を得た (Fr. 1~5)。その後、各種クロマトグラフィーを用いて活性を指標とした分画を行った結果、7 種類のポリフェノール類 (A-G) を単離・精製した。単離した化合物について、NMR を用いて構造式を決定した後に活性試験を行った。その結果、化合物 B (afzelin) を除き、何れのサンプルも 10 μM の低濃度域で EK-B と同等の活性を示した (図 6)。

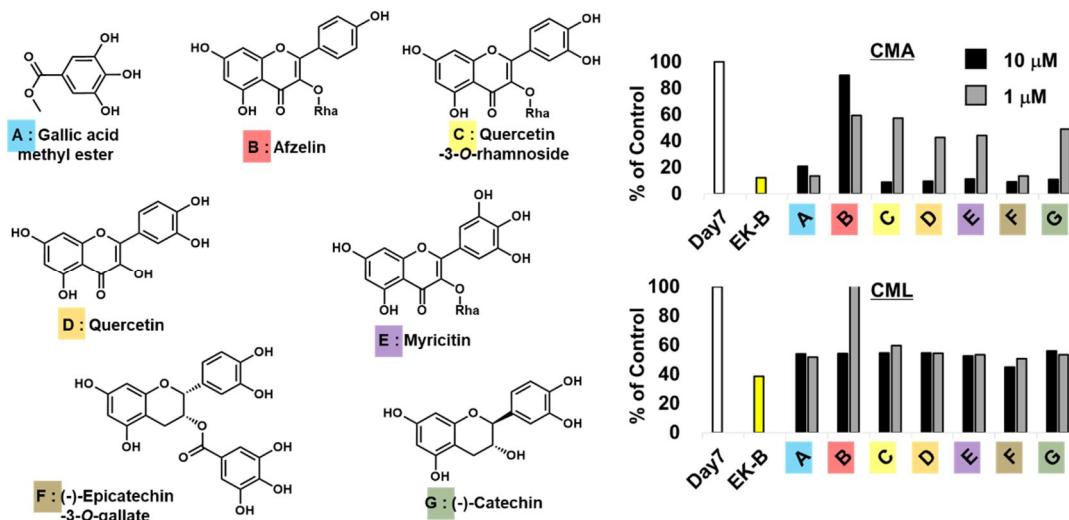


図 6. ノブドウ由来化合物 (A-G) の構造式と各活性試験結果

イカリソウ由来の epimedokoreanin B (EK-B, 10 μM) を比較対照とした。化合物 B (afzelin) を除き、何れのサンプルも 10 μM の濃度で EK-B と同等の活性を示した。CMA 生成阻害試験においては、さらに低濃度の 1 μM において、化合物 A (gallic acid methyl ester) と化合物 F [(-)-epicatechin-3-O-gallate] は強力な CMA 生成阻害活性を示した。化合物 A は副生成物の可能性もあることから、化合物 F もしくは収量の多い化合物 C (quercetin-3-O-rhamnoside) と化合物 G ((-)-catechin) が主要な抗 CMA 活性成分と推察された。一方、CML 生成阻害試験においては、10 μM と 1 μM での阻害活性に大きな違いが観測されなかったが、0.1 μM まで濃度を下げると生成阻害活性は消滅する。よって、化合物間の活性の強弱を比較するのは難しい状況であるので、化合物 B を除き、何れのサンプルも 1 μM で強い阻害活性を持つ化合物であると判断された。この結果は先に述べたイカリソウおよびホップの検討より得られた活性に必須のコア構造はカテコール基以上のフェノール性水酸基が重要であることと矛盾はない。また、興味深いのは化合物 C (quercetin-3-O-rhamnoside) や E (myricetin) のように、配糖体であってもカテコール基以上のフェノール性水酸基を骨格に有する化合物には顕著な活性があるという点はイカリソウの知見 (Nakashima K, *et al*, *Front. Chem.* 2024) では得られなかった新たな事実である。さらにこれら活性成分を HPLC において、Cosmosil AR-II (Φ 4.6 × 250 mm, NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan) を用い、アセトニトリルを用いたグラジエント溶離を行うと、すべての化合物が良い分離ピークを示す条件を開発した (図 7)。これはノブドウ果実に含まれる主要な活性成分の含量比を類推するのに役立つ方法であると考えている。

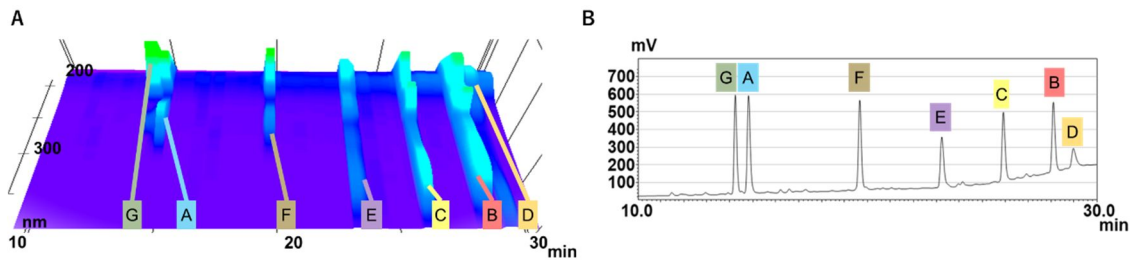


図7. ノブドウ由来化合物 (A~G) の一斉分析について (A:PDA 検出器によるクロマトグラム (波長 200~500 nm) B: 波長 220 nm におけるクロマトグラム)

またノブドウより活性化合物を効率的に単離・精製する方法を検討した。ノブドウ果実 500 g を水 : アセトン = 1 : 1 溶液を用いて超音波抽出し、約 20 g の抽出物を得た。抽出物を 80% MeOH に溶解し、ヘキサンを用いて分液し約 16 g の 80% MeOH 層画分を得た。得られた画分はポリスチレンゲルに付し、H<sub>2</sub>O, 50% MeOH, 75% MeOH, 100% MeOH で溶出し 4 つの画分を得た (Fr. 1~4)。50% MeOH 溶出画分 (Fr. 2, 3.6 g) を Sephadex LH-20、中圧カラムで粗分画を得た後、最終的には Toyopearl HW 40S に付した後、50% MeOH で溶出すると、化合物 G ((-)-catechin) が純度良く一気に約 160 mg (エキスに対して収率約 0.8%) 精製できることが明らかとなった。本手法を活かし、今後はノブドウ由来化合物 G ((-)-catechin) を原料とし、プレニル基を導入することで活性にどのような影響が表れるのか、より詳細な構造活性相関を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima Keisuke, Miyashita Hiroyuki, Yoshimitsu Hitoshi, Fujiwara Yukio, Nagai Ryoji, Ikeda Tsuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Prenylflavonoids isolated from Epimedium Herba show inhibition activity against advanced glycation end-products	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 01-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fchem.2024.1407934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋圭介、宮下裕幸、吉満 斉、藤原章雄、永井竜児、池田 剛
2. 発表標題 イカリソウに含まれるプレニルフラボノイド類のAGEs生成阻害活性について
3. 学会等名 第32回日本メイラード学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋圭介、宮下裕幸、吉満 斉、藤原章雄、永井竜児、池田 剛
2. 発表標題 ホップに含まれる終末糖化産物（AGEs）生成阻害活性化合物の探索研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋圭介、宮下裕幸、吉満 斉、藤原章雄、永井竜児、池田 剛
2. 発表標題 ホップに含まれる終末糖化産物（AGEs）生成阻害活性化合物の探索研究
3. 学会等名 第69回日本生薬学会
4. 発表年 2023年

1．発表者名 中嶋圭介、合澤 慎、桑田直幸、辻本真理乃、宮下裕幸、 吉満 斉、藤原章雄、永井竜児、池田 剛
2．発表標題 生薬、民間薬由来の抗糖化成分の探索研究：ノブドウについて
3．学会等名 第33回日本メイラード学会
4．発表年 2023年

1．発表者名 中嶋圭介、穉田 侑奈、大田 宙依、権藤 早紀、古川 理菜、宮下裕幸、吉満 斉、藤原章雄、永井竜児、中畑 広一、野村 久徳、若原 孝徳、若原 久美子、池田 剛
2．発表標題 生薬、民間薬由来の抗糖化機能性素材の探索研究：ノブドウ(Ampelopsis glandulosa var. heterophylla)の成分研究について
3．学会等名 第144回日本薬学会年会
4．発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--------	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------