

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590028

研究課題名(和文) 老化に関わる難治性疾患の予防・改善を目指した天然薬物の研究

研究課題名(英文) Study on crude drugs aimed at prevention and improvement of intractable diseases related

研究代表者

北中 進 (Kitanaka, Susumu)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：40102553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：白桃花から分離したアロマデンドリンは、脂肪細胞のアディポネクチン発現量を上昇させるため、類似化合物を合成して神経細胞に対して試験を行い、神経細胞を保護する可能性が認められた。ベンケイソウ科植物 *Rhodiola sacra* からマクロファージの活性化を抑制する 2-phenylethyl gallate を明らかにし、類似化合物を合成し慢性炎症に有効である可能性が示唆された。アルツハイマー疾患などで問題となる神経疾患を保護する化合物を探索する目的で *Licopodium serratum* var. *longipetiolatum* の成分研究を行い新規アルカロイド *effususol A* を単離した。

研究成果の概要(英文)：Flavanonol derivative, aromadendrin, obtained from white peach flowers was increased by the secretion of adipocain using murine preadipocytes 3T3-L1. Result of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress inhibitory activity test using HT22 cells from the hippocampus of these compounds, two flavanonols showed high inhibitory activity. From *Rhodiola sacra*, 2-phenylethyl gallate was isolated as a compound to inhibit the activation of macrophages, and evaluated four synthesized compounds. As a result, strongest activity was observed in the compound with four methylene groups. For the purpose of neuroprotective component, a new alkaloid *effususol A* was extracted and isolated from *Licopodium serratum* var. *longipetiolatum*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 神経保護 アルツハイマー

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病として代表的な糖尿病、高血圧、脂質代謝異常、癌は、加齢と共に増加する疾病であり、加齢抑制を視野に入れた薬物の開発が望まれる。我々は、生物活性を有する生薬中の含有成分を研究する過程で、脂肪前駆細胞を用いた試験でアディポネクチンの分泌を促進する生薬や化合物を見出した。

一方で、センチュウを用いた抗加齢の研究で寿命延長成分が見出され、これら2つの発見には同一成分に認められたこともあり、インスリンシグナル伝達と加齢との関連性が我々の研究からも推察され、このような化合物は、生活習慣病の諸疾患の予防、改善に働くことが期待される。そこで本研究は、活性が認められた生薬及び成分について脂肪細胞、センチュウの抗加齢効果、神経細胞に対する保護効果を検討して、老化と関係深い諸疾患の予防・改善に対して有益な天然薬物を探索し薬物開発における基礎的な研究を行った。

抗老化の捉え方は、太古では不老不死を願ったが、現在では老化に起因する疾病を予防し健康寿命を延ばすことに主眼が置かれている。厚生労働省の平成22年簡易生命表を見ると、日本人の平均寿命は男性79.64歳でカタル、香港、スイスについて世界第4位、女性86.39歳で世界第1位、フランス、イタリアが次いでいる。

しかし、寿命まで健康でいる人は少なく、実際には寝たきり、介護の必要な人が多くを占めている。WHOが発表した健康寿命では、日本人で女性は78歳、男性が72歳で世界のトップであるが、男性で7年、女性で8年寝たきりになる可能性がある。急速に進行しつつある高齢化社会に対して医療費の増大による財政の圧迫や介護の問題が指摘されている。日本人の死因はガン、脳血管障害、心臓疾患で約60%を占めており、このうち、脳、心臓疾患の原因となる動脈硬化を予防することが重要である。この動脈硬化に大きく関与している身体の異常な状態である「メタボリックシンドローム」は、内臓脂肪蓄積が根底にあり、脂質代謝異常、糖代謝異常(糖尿病)、高血圧症が加わった合併症で、脳血管障害や心疾患の危険率が飛躍的に高くなることが知られている。

また、肥満は脂肪組織での炎症が誘導され、インスリン抵抗性に大きく関与している。インスリン抵抗性状態では、高インスリン血症を介して腎臓でのNa<sup>+</sup>再吸収の促進や交感神経活性化による高血圧を生じやすくなり、更にインスリンのもつ血管拡張作用が減弱するため、動脈硬化に進展しやすくなる。脂肪細胞に多量の脂肪が蓄積し大型脂肪細胞になるとTNF- $\alpha$ などの悪玉アディポカインを分泌すると共に脂肪組織での慢性炎症の重要性が確認されている。肥満者の脂肪組織では、MCP-1などの増加によりマクロファージの浸潤が認められ、マクロファージは

TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを分泌して脂肪組織の炎症を促進し、アディポサイトカインの調節の波錠が起こり慢性的な炎症が生じると考えられる。従って脂肪組織においてマクロファージの活性化を抑制する薬物は、肥満であってもインスリン抵抗性がない状態をつくりだせる可能性がある。以上より、天然薬物の研究において、1)肥満を抑制する生薬及び活性成分 2)小型脂肪細胞を誘導しインスリン感受性の亢進、動脈硬化抑制、抗炎症、心筋肥大抑制などの作用を持つアディポネクチンを分泌する生薬及び活性成分 3)マクロファージの活性化を抑制する生薬及び活性成分というコンセプトで研究を行ってきており、さらに研究を進展させるために計画を立案した。

## 2. 研究の目的

糖尿病、高血圧、脂質代謝異常、神経変性疾患、骨粗鬆症などの難治性疾患は、現代医療においても治療が難しく、増加の一途をたどっている。生薬には食品として用いられているものが多くあり、これらの疾患を予防・改善する可能性を秘めている。そこで糖尿病、脂質代謝異常、神経変性疾患をターゲットとして、生薬中の活性成分について研究を行い、利用されるべくエビデンスを与える。また共に、抗老化作用をも視野に入れた研究とし、これから益々進む高齢化社会に還元できるような天然薬物研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1)生薬及び単離成分の分離、構造解析には、各種クロマトグラフィーを用いて分離し、NMR、MSなどの機器分析により構造決定を行った。

(2)糖尿病の改善やメタボリックシンドロームのもとになる肥満を対象に、アッセイ系としてマウス前駆脂肪細胞3T3-L1を用い、トリグリセリド(TG)及びグリセロール3-リン酸脱水素酵素(GPDH)活性、分泌されにはアヒポネクチンやTNF- $\alpha$ などのアディポカインを解析した。また、マクロファージ様細胞RAW264.7を用いて、LPSで活性化させ、一酸化窒素(NO)産生量を測定し、マクロファージに対する活性化抑制の評価をした。

(3)寿命延長試験にはセンチュウ(fer-15)を用い、液体振とう法により行い、採卵後4日後にアンピシリンを添加した後、生死判定を行って生存率を測定して平均寿命と最大寿命について検討した。

(4)海馬由来HT22細胞を用いてtunicamycinを添加し、細胞生存率を求めて小胞体ストレス阻害活性を評価した。

## 4. 研究成果

(1)白桃花より単離したaromadendrinは、脂肪前駆細胞の分化を促進し、adiponectinの分泌が増大した。

(2)マリアアザミ種子より、taxifolinの

他、silybin A, silybin B, silichristin 及び silydianin を単離した。taxifolin, silybin A, silybin B は TG 量及び GPDH 活性の上昇、アディポネクチン分泌量を増加した。さらに PPAR- $\alpha$  に対するアゴニスト作用が認められた。

(3) 枳椇子より、センチュウの寿命を延長させる成分として、aromadendrin, taxifolin, ampelopsin のフラバノール誘導体を明らかにした。

(4) ベンケイソウ科植物 *Rhodiola sacra* S. H. Fu からこれまでにマクロファージの活性化を抑制 (NO 産生抑制) する化合物として 2-phenylethyl gallate (IC<sub>50</sub> = 6.6  $\mu$ M) を明らかにし、これをリード化合物としてベンジルアルコール部のメチレン部を 2 から 5 に延長した 4 種の化合物を合成したところ、メチレン 4 個化合物に最も強い活性を認めた。

(5) 灯心草から 1 種の新規化合物 effusol A を 7 種の既知 phenanthrene 化合物 effusol, dehydroeffusol, juncsol, dehydrojuncsol, juncuenin B, dehydrojuncuenin B, juncuenin D、2 種の既知フラボノイド、luteolin、luteolin 5-methyl ether および 4-hydroxy-2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide と共に単離し、得られた 10 種の phenanthrene およびフラボノイドについて、海馬由来 HT22 細胞における tunicamycin 誘導型小胞体ストレスの阻害活性ならびに同細胞に対する細胞毒性試験を行った結果、effusol, juncsol, juncuenin B, dehydrojuncuenin B、および juncuenin D において caspase-3 を介した細胞毒性を見出した。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Jue Hao, Shun Liu, Yan Chen, Yongxia Li, Susumu Kitanaka, Heran Li, Coumarins from the twigs of *Juglans regia* and their nitric oxide inhibitory activities *Chemistry of Natural Compounds*, 2015, in press

Kan'hiro Ishiuchi, Yasuhiro Kosuge, Hazuki Hamagami, Mayu Ozaki, Kumiko Ishige, Yoshihisa Ito, Susumu Kitanaka, Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells, *Journal of Natural Medicines*, **2015**, *69*, in press

Tadahiro Yahagi, Naoyuki Yakura, Keiichi Matsuzaki, Susumu Kitanaka, Inhibitory effect of chemical constituents from *Artemisia scoparia* Waldst. Et Kit.

On triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW 264.7 cells *Journal of Natural Medicines*, *68*, 414-420 (2014)

Zhi-Gang YANG, Xiu-Feng WEN, Yu-Kai GU, Yong-Hai LI, Keiichi MATSUZAKI, Satoshi

TAKAMATSU, Susumu KITANAKA, Inhibitory Effects of Constituents from *Hippophae rhamnoides* L. on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric, *Chem. Pharm. Bull.*, *61*, 279-285 (2013)

〔学会発表〕(計 11 件)

松崎桂一、川本広明、牧野三津子、古川めぐみ、周彪、廣瀬大、飯田隆、北中 進、草間國子、日本薬学会 第 135 年会、2015 年 3 月 26 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫・神戸)

矢作忠弘、吉田裕樹、米山達朗、高松智、榊原巖、北中 進、*Saussurea amara* (L.) DC. のマクロファージ活性化抑制成分の探索研究 (3)、日本薬学会 第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫・神戸)  
蒋文君、飯島洋、北中 進、抗炎症フラボノイドの合成と構造活性相関、日本薬学会 第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫・神戸)

石内勘一郎、森田智子、高橋依子、Jue Wang、北中 進、小美石斛の成分研究、小美石斛の成分研究、日本薬学会 第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫・神戸)

石内勘一郎、姜文平、藤原章雄、呉金濱、北中 進、台湾産オニトウゲシバ由来リコポジウムアルカロイドの構造とマクロファージ泡沫化阻害活性、日本生薬学会 第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日、福岡大学薬学部(福岡・福岡)

石内勘一郎、濱上葉月、尾崎茉柚、北中 進、灯心草 (*Juncus effusus* var. *decipens*) の成分研究、日本生薬学会 第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日、福岡大学薬学部(福岡・福岡)

蒋文君、石内勘一郎、古川めぐみ、飯島洋、北中 進、圣地紅景天由来 2-phenethyl gallate の NO 産生抑制活性に対する構造活性相関研究、日本薬学会 第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館(熊本・熊本)

石内勘一郎、姜文平、呉金濱、北中 進、台湾産オニトウゲシバ由来新規アルカロイドの構造日本薬学会 第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館(熊本・熊本)

鈴木麻優子, 高野小夜子, 古川めぐみ,  
楊志綱, 岸野浩明, 土屋沙絵子, 村野佳  
世, 八木絢子, 松崎桂一, 北中 進. 沙  
棘葉の成分とその抗炎症作用について,  
日本生薬学会第 60 回年会, 2013 年 9 月 8  
日、北海道医療大学(北海道・当別)  
小畑久成、石内勘一郎、古川めぐみ、北  
中 進, ツチアケビ (*Galeora*  
*septentrionalis*)由来 NO 産生抑制化合物  
の探索, 日本生薬学会第 60 回年会, 2013  
年 9 月 8 日, 北海道医療大学(北海道・  
当別)  
矢作忠弘、米山達朗、高松 智、榊原 巖、  
北中 進, スナジヒゴタイ *Saussurea*  
*amara*(L.)DC.のマクロファージ活性化  
抑制成分の探索, 日本薬学会 133 年会,  
2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜展示  
ホール(神奈川・横浜)

〔図書〕(計 1 件)

北中進、寺林進、高野昭人、他, カラーグラ  
フィック薬用植物 第 4 版 廣川出版, 2015,  
200

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北中 進 (KITANAKA, Susumu)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号: 40102553

### (2) 研究分担者

中村 智徳 (NAKAMURA, Tomonori)

慶応大学・薬学部・教授

研究者番号: 30251151

### (3) 連携研究者

草間 國子 (KUSAMA, Kuniko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号: 10130436