

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590153

研究課題名(和文) 機能性食品から肝臓内中性脂肪低減を機序とする新規抗糖尿病作用成分の探索

研究課題名(英文) Search for new anti-diabetic medicine from functional foods through the reduction of liver fat

研究代表者

二宮 清文 (NINOMIYA, Kiyofumi)

近畿大学・薬学総合研究所・講師

研究者番号：10434862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存医薬品の作用機序とは異なり、肝臓中の中性脂肪含量の低減を介して、肝臓による糖取り込み能の亢進によってもたらされる血糖値改善作用物質を探索した。

その成果として、報告者はタイ産のフタバガキ科植物 *Shorea roxburghii* 樹皮からスチルベンオリゴマー (-)-hopeaphenol や (+)-isohopeaphenol、ベンケイソウ科植物 *Sedum sarmentosum* より、flavonol 配糖体 sarmenoside 類、エジプト産ブラッククミン (*Nigella sativa* 種子) から nigellamine A5 など明らかにした。

研究成果の概要(英文)：From a series of search for anti-diabetic compounds from functional foods, several compounds which reduced contents of triglyceride (TG) in hepatocytes were found. Through the period of this study, (-)-hopeaphenol from burk of *Shorea roxburghii*, sarmenosides from aerial parts of *Sedum sarmentosum*, nigellamines from seeds of *Nigella sativa*, and flavonol glycosides from *Rosa canina* and *Camellia sinensis* were elucidated as bioactive compounds which reduced TG contents in hepatocytes. Moreover, reduction of liver TG in mice was observed in vivo studies through the oral administration of several extracts.

研究分野：生薬学，食品薬学，薬理学

キーワード：糖尿病 脂肪肝 肝臓 中性脂肪

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病をはじめとする一連の生活習慣病は、アジア諸国の急速な経済的発展も併せ、世界規模で罹患者が増加している疾患群である。従来より、生活習慣病の発症および増悪については、食事内容、運動習慣などの関与が知られており、日本においても特定健康診査が実施されるようになり、メタボリックシンドロームをはじめ、その予防・改善を志向して多くの取り組みがなされているものの、当初期待された目標が達成されていないのが現状である。報告者は、肥満を基礎病態とする疾患群、特に、日本における糖尿病患者の大半が2型糖尿病であることに着目し、それらの多くの患者が異所性の脂肪蓄積である脂肪肝を罹患していること、および脂肪肝を形成した状態では糖摂取後の糖代謝が大きく変動することに着目し、本研究計画を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

口から摂取された糖質は、消化管内での消化を経て、小腸で血中へと移行する。血中へと移行したグルコースは、門脈を経て肝臓内を通過した後に末梢血へと供給される。この際、正常な場合には、糖輸送担体の一種である GLUT2 を介した糖輸送により肝臓内へとグルコースが取り込まれることになる。しかしながら、脂肪肝を呈している場合には、この肝臓へのグルコースの糖取り込み能が低下していることが報告されていた。即ち、肝臓への糖取り込み能の低下により、末梢血へのグルコース分布量の増大が観察されることから食後過血糖の増悪を引き起こしている。報告者は、当時、脂肪肝に対する薬物が存在していなかったことも併せて、脂肪肝を改善することで、血糖の正常化に寄与できるものと考えた。従って、本研究の目的は機能性食品に含まれる成分による、肝臓内脂肪低下作用を機序として、血糖値の制御に利用できる物質の探索をすることである。

### 3. 研究の方法

西洋ハーブをはじめアジア諸地域や和漢生薬由来で食経験があるなど安全性が確立されている機能性食品約 120 種を探索資源とする。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を使用して、肝細胞内中性脂肪含量および糖消費能の亢進を指標に探索資源を絞り込む。さらに *in vivo* での有効性が確認された素材について活性成分単離を行うとともに、得られた成分の薬理活性を *in vitro* および *in vivo* 試験により確認する。これら一連の研究を通して活性成分に関する構造活性相関を明らかにする。具体的には、一次スクリーニングとして、上記の HepG2 細胞を使用した高濃度グルコースまたはオレイン酸誘発肝細胞内中性脂肪蓄積抑制活性、肝細胞内中性脂肪代謝促進活性および糖消費促進活性を指標に候補となる機能性食品の探索を行うとともに

に、適宜実験動物を用いた *in vivo* での評価を併せて実施する。また、機能性食品素材からの有効成分の探索については、*in vitro* 試験によりバイオアッセイを指標とした成分探索を実施し、有効成分の特定を進める。また、*in vitro* で有効性が確認された成分については、投与量を確保するための成分分離の他、化学誘導等も併せて実施し、*in vivo* での有効性を確認する。

### 4. 研究成果

平成 24 年度

タイ産のフタバガキ科植物 *Shorea roxburghii* 樹皮から得た MeOH 抽出エキスに有意な脂肪蓄積抑制および脂肪代謝促進活性を見出した。そこで、本 MeOH 抽出エキスに含有される活性成分を特定すべく、その含有成分についても同様の評価を行った。その結果、*S. roxburghii* の樹皮に主成分のひとつとして含有される (-)-hopeaphenol や (+)-isohopeaphenol などが 3  $\mu$ M 以上の濃度で、有意な脂肪蓄積抑制作用を示すことを明らかにした。これら、*S. roxburghii* 樹皮より見いだした活性成分の多くは、ポリフェノールの一種であるスチルベンオリゴマーであった。この他、中国において肝疾患の改善に利用されているベンケイソウ科植物 *Sedum sarmentosum* 全草より、肝細胞への脂肪蓄積抑制活性成分として flavonol 配糖体成分などを明らかにした。平成 25 年度

エジプトにおいて食用にも薬用にも供される *Nigella sativa* 種子から得た dolabellane 型ジテルペンに肝細胞内中性脂肪含量の低減作用を明らかにしている。さらに、*N. sativa* 種子より得られたジテルペンより、構造と活性発現にに必要な化学構造を一部明らかにするとともに、本作用の発現については、脂質代謝酵素が誘導されることが知られている核内受容体型転写因子 PPAR- $\alpha$  のへの関与は低いことなどを明らかにしている。また、マウスを用いた *in vivo* での評価では、*N. sativa* 抽出エキスが肝臓内の中性脂肪含量を低下させることを見いだした [*Phytochemistry Lett.*, **6**, 198-204 (2013).]

この他、チャ (*Camellia sinensis*) 花部より得た flavonol 配糖体については、脂肪酸によって惹起される肝細胞内への中性脂肪蓄積抑制作用を見いだし報告している [*Food Chem.*, **140**, 352-360 (2013).]

平成 26 年度 (2014)

平成 26 年度の取り組みからは、日本薬局方にも収載されている生薬でもあるセンキュウ *Cnidium officinale* 根茎より、特徴的な成分でもある senkyunolide 類に肝細胞内中性脂肪含量の低下作用を見いだした。また、センキュウの抽出エキスが *in vivo* で肝臓内中性脂肪含量を低下させることを明らかにした。また、ローズヒップより見いだし

た成分については、肝細胞内において脂肪酸合成酵素 (FAS) の発現に影響を与えることなどを明らかにした。

この他、近年生薬ニクジュヨウ代用品として、機能性食品としての利用があるカンカニクジュヨウ (*Cistanche tubulosa*, 肉質茎) より、主成分であるフェニルエタノイド成分 echinacoside および acteoside にマウスにおける耐糖能改善作用を確認しており、本成分の機序についてはインクレチン分解酵素である DPP-IV の阻害が関与している事を明らかにした。

本研究課題の成果として得られた化合物は、細胞への作用として約 20 時間で肝細胞内の脂肪量を 20-30% 以上低下させることから、強力な脂肪低減作用を発揮する。今後、医薬リード候補として有用であるかどうかを含め、更なる研究を進めていく予定である。

## 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 5 件)

Morikawa T., Ninomiya K., Imamura M., Akaki J., Fujikura S., Pan Y., Yuan D., Yoshikawa M., Jia X., Li Z., Muraoka O., Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice., *J. Nat. Med.*, 査読有り, **68**, 561-566 (2014).

DOI:10.1007/s11418-014-0837-9

Morikawa T., Ninomiya K., Miyake S., Miki Y., Okamoto M., Yoshikawa M., Muraoka O., Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity and simultaneous quantitative analysis of 15 polyphenols and caffeine in the flower buds of *Camellia sinensis* from different regions by LCMS., *Food Chem.*, 査読有り, **140**, 353-360 (2013).

DOI:10.1016/j.foodchem.2013.02.079

Morikawa T., Ninomiya K., Xu F., Okumura N., Matsuda H., Muraoka O., Hayakawa T., Yoshikawa M., Acylated dolabellane-type diterpenes from *Nigella sativa* seeds with triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells., *Chemistry Lett.*, 査読有り, **6**, 198-204 (2013).

DOI:10.1016/j.phytol.2013.01.004

Morikawa T., Chaipech S., Matsuda H., Hamao M., Umeda Y., Sato H., Tamura H., Ninomiya K., Yoshikawa M., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Anti-hyperlipidemic constituents from the bark of *Shorea roxburghii*., *J. Nat. Med.*, 査読有り, **66**, 516-524 (2012).

DOI:10.1007/s11418-011-0619-6

Morikawa T., Ninomiya K., Zhang Y., Yamada T., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Hayakawa T., Yoshikawa M., Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory

activity from *Sedum sarmentosum*., *Phytochemistry Lett.*, 査読有り, **5**, 53-58 (2012).

DOI:10.1016/j.phytol.2011.07.012

〔学会発表〕(計 12 件)

Morikawa T., Ninomiya K., Imamura M., Akaki J., Pan Y., Yuan D., Yoshikawa M., Jia X., Li Z., Muraoka O., Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice., International Conference on Food for Health in Niigata 2014 (ICFHN2014), 2014 年 10 月 30-31 日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市).

二宮清文, 塩谷美幸, 酒井千恵, 森川敏生, 漢薬川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の肝細胞内中性脂肪低減作用., 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学 (京都府・京都市).

Ninomiya K., Minamino T., Ozeki K., Matsuo N., Kawabata C., Hayakawa T., Morikawa T., Effects of constituents from hooks of *Uncaria rhynchophylla* on neurite outgrowth and TNF- $\alpha$ -induced cell damage., The 8th JSP-CCTCM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2014 年 9 月 13 日, 福岡大学 (福岡県・福岡市).

Morikawa T., Ninomiya K., Imamura M., Akaki J., Fujikura S., Pan Y., Yuan D., Yoshiukawa M., Jia X., Li Z., Muraoka O., Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice., The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), 2014 年 9 月 2-6 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市).

酒井千恵, 二宮清文, 北原潤美, 堀 佑一郎, 村岡 修, 早川堯夫, 森川敏生, ローズヒップ (*Rosa canina*, 果実) の肝臓内脂肪低減作用成分., 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日, 酪農学園大学 (北海道・江別市).

二宮清文, 奥村尚道, 村岡 修, 許 鳳鳴, 松田久司, 吉川雅之, 森川敏生, エジプト天然薬物 *Nigella sativa* 種子成分の肝細胞内中性脂肪代謝促進活性成分., 第 34 回日本肥満学会, 2013 年 10 月 11-12 日 (東京都).

森川敏生, 萬瀬貴昭, 二宮清文, 西 亮介, 酒井千恵, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡 修, 紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の中性脂肪代謝促進活性成分 - ., 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2013 年 10 月 5-7 日, 埼玉大学 (埼玉県・さいたま市).

萬瀬貴昭, 二宮清文, 酒井千恵, 西亮介, 村岡 修, 早川堯夫, Chaipech Saowanee, 森川敏生, 紅豆蔻 (*Alpinia galanga* 果実) 由来フェニルプロパノイド成分の中性脂肪代謝促進活性., 第 30 回和漢医薬学会大会, 2013

年 8 月 31-9 月 1 日, 金沢大学 (石川県・金沢市).

酒井千恵, 二宮清文, 中西勇介, 宮本陸平, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生. 川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の脂肪代謝促進活性成分., 第 30 回和漢医薬学会大会, 2013 年 8 月 31-9 月 1 日, 金沢大学 (石川県・金沢市).

二宮清文, 奥村尚道, 八木亮平, Chaipech Saowanee, 吉川雅之, 村岡 修, 早川堯夫, 森川敏生, フタバガキ科 *Shorea roxburghii* 樹皮由来抗糖尿病活性成分., 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2012 年 11 月 1-2 日, 大阪大学 (大阪府, 豊中市).

森川敏生, Saowanee Chaipech, 二宮清文, 三宅莊八郎, 奥村尚道, 八木亮平, 松田久司, 濱尾誠, 梅田洋平, 佐藤宏樹, 田村晴佳, 紺井悠, 吉川雅之, Yutana Pongpiriyadacha, 村岡 修, タイ天然薬物 *Shorea roxburghii* 樹皮由来オリゴスチルベノイドおよびジヒドロイソクマリンのメタボリックシンドローム予防作用., 第 54 回天然有機化合物討論会, 2012 年 9 月 18-20 日, 東京農業大学 (東京都, 世田谷区).

二宮清文, 奥村尚道, Chaipech Saowanee, 吉川雅之, 村岡 修, 早川堯夫, 森川敏生, タイ天然薬物 *Shorea roxburghii* の機能性成分 (7)-含有スチルベン成分の脂肪代謝促進作用-, 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 17-18 日, かずさアカデミアパーク (千葉県・木更津市).

〔図書〕(計 1 件)

二宮清文 (共著), 吉川雅之, 村岡 修 (監修), シーエムシー出版, 薬用食品の開発 II-薬用・有用植物の機能性食品素材への応用-第 12 章 ローズヒップに含有される内臓脂肪蓄積低減作用成分, pp141-151 (2012 年).

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/medfood/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二宮 清文 (NINOMIYA Kiyofumi)

近畿大学・薬学総合研究所・講師

研究者番号: 10434862

### (2) 連携研究者

森川 敏生 (MORIKAWA Toshio)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号: 10340449