

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460144

研究課題名(和文) 健胃生薬を素材とした食欲シグナル制御物質の開拓

研究課題名(英文) Research and Development of Compounds with Effects on Appetite Signals from Natural Medicines Used as Stomachic

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：健胃作用が伝承されている天然薬物の中から香辛料素材について、シスプラチンによる食欲不振マウスおよびラットを用いて摂餌量への影響を調べた結果、数種類の辛味生薬のエキスに有効性を認めた。ショウガ科植物 *Kaempferia parviflora* 根茎のエキスについては、有効成分の単離と構造解明を実施した。単離したメトキシフラボノイド類に胃の内分泌細胞を用いた *in vitro* でのグレリン分泌促進活性を見出し、特に、pentamethylquercetin にマウスおよびラットでの有効性を確認した。その他、ショウキョウ、ナガコショウなどの辛味成分にグレリン分泌促進作用を見出した。

研究成果の概要(英文)：Effects of spices among the natural medicines, which have been used as stomachic, on cisplatin-induced anorexia mice and rats were examined. As a result, the extract of rhizome of *Kaempferia parviflora* and its principal constituents, methoxyflavonoids, such as pentamethylquercetin, were found to promote ghrelin secretion using endocrine cells fraction of rat stomach (*in vitro*), and pentamethylquercetin was effective in the mice and rats. In addition, several constituents with promotion effects on ghrelin secretions *in vitro* were isolated from spices such as ginger, long pepper, etc.

研究分野：生薬学

キーワード：グレリン分泌 シスプラチン誘発食欲不振モデル 香辛料 *Kaempferia parviflora* メトキシフラボノイド pentamethylquercetin ショウキョウ [10]-gingerol

1. 研究開始当初の背景

健胃生薬の重要な薬効として食欲不振の改善や強壮作用が伝承されているにもかかわらず、現代科学的に未解明なものが多い。健胃生薬には、センブリなど苦味を有する苦味健胃薬の他、生姜のように芳香性や辛味をもつものがあり、香辛料食品として応用されているものが多い。しかし、一部の健胃生薬に消化液の分泌亢進作用などが知られているのみで、それらの現代薬理学的研究は進んでいない。抗がん剤シスプラチンや抗うつ薬 SSRI の服用により生じるセロトニン受容体 5-HT_{2B/2C} 刺激を介した食欲抑制では、投薬の継続が困難となり治療の妨げとなっている。また、加齢に伴う食欲減退、拒食症や過剰なダイエットによる食欲不振、原因不明の食欲不振に対して有効で安全な医薬品がなく、食欲改善薬の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

健胃生薬には、苦味を有する苦味健胃薬の他、芳香性や辛味をもつものがあり、香辛料食品として応用されているものが多い。健胃生薬の重要な薬効として食欲不振の改善が伝承されているにもかかわらず、その薬理作用や薬効成分に関して、現代科学的に未解明なままとなっている。一方で、過剰な食欲亢進は摂取エネルギーの増加による肥満の原因ともなり、この場合には食欲を抑制することが必要となる。本研究においては、健胃作用や強壮作用が伝承されている天然薬物のうち香辛料に焦点を絞り、食欲不振モデル動物において食欲改善など食欲シグナル制御物質の探索を実施し、伝承薬効の証明を行うとともに食欲改善薬開発のためのリード化合物またはリード化合物の開拓を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

日本、中国、東南アジアにおいて健胃作用や強壮作用などの薬効が伝承され、食経験が十分であるなど安全性が確立している香辛料を選び、探索資源とした。マウスやラットにおける食欲不振モデル動物を作成し、それらに対する予防・改善作用を指標に食欲シグナル制御物質の探索候補となる素材を選択した。メタノール抽出エキスを溶媒分画した後、各種クロマトグラフィーを駆使して活性物質を単離し、それらの化学構造を質量分析および各種 NMR スペクトルなどの解析により明らかにした。食欲シグナルの伝達に関して、食欲亢進作用を有するグレリンの分泌促進作用や分解抑制作用などを検討した。

4. 研究成果

日本、中国、東南アジア地域で薬効が伝承されている天然薬物の中から香辛料素材について、シスプラチン (CDDP) による食欲不振マウスおよびラットを用いて摂餌量への影響を調べた結果、数種類のエキスに有効性

を認めた。

(1) *Kaempferia parviflora* (根茎): ショウガ科植物、黒ショウガ (*Kaempferia parviflora*) は、タイなどの熱帯地域が原産地とされる。日本では「黒ショウガ」または「黒ウコン」と呼ばれており、タイでは「クラチャイダム (Krachai Dam)」と呼ばれ、健胃、精力増進、滋養強壯の効果が伝承されている。

我々は、*K. parviflora* (根茎) の新規生体機能性について研究を行い、それに含まれるメトキシフラボノイド類に RAW264.7 マクロファージ様細胞におけるリポ多糖刺激による iNOS 誘導に対する抑制作用、3T3-L1 細胞を用いた研究で PPAR γ アゴニスト様の作用を明らかにし、報告してきた。^{1,2)} 本研究では、CDDP 誘発食欲不振モデルマウスおよびラットに対するメタノール抽出エキスおよび主要成分 pentamethylquercetin (=3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone)(9) の効果を検討した。また、食欲増進に関与することが知られているグレリンの分泌促進作用について調べる目的で、ラット胃内分泌細胞におけるグレリン分泌への影響を検討した。

主要なメトキシフラボノイド類 (化合物 1~9) は前報¹⁾ に準じて単離・同定した。約 16 時間前に絶食した S.D.系雄性ラットに被験サンプルを経口投与し、その 30 分後に CDDP (2mg/kg, i.p.) を投与した。CDDP 投与の 30 分後に給餌を開始し、給餌開始から 6 h および 24 h 後に各群における摂餌量を測定した。別に、給餌開始から 6 h 後に視床下部を摘出し、食欲亢進ペプチド neuro peptide Y (NPY) の mRNA を逆転写後 real-time PCR 法を用いて発現量を測定した。

その結果、メタノール抽出エキス (25~100 mg/kg) に食欲不振ラットでの食欲亢進作用が観察されたため、次に食欲増進ペプチドとして知られているグレリンの分泌亢進作用について *in vitro* で検討を行った。すなわち、胃内分泌細胞の分画を行い、被験サンプルとともに 1 時間インキュベーション後、培養上清中のグレリン濃度を市販の ELISA キットを用いて測定した。その結果、メタノール抽出エキスおよび単離したメトキシフラボノイド類にグレリン分泌促進活性を見出し、特に高含量の pentamethylquercetin (9, 25~100 μ M) に濃度依存的、かつ顕著な促進作用を認めた (図 1)。化合物 9 について、CDDP 誘発食欲不振ラットに対する効果について検討したところ 25 mg/kg で摂餌量に対する有意な亢進作用が認められ、視床下部における NPY mRNA 発現量の増加が観察された (表 1)。また、ddY 系雄性マウスを用いた実験においては、正常マウスの摂餌量には有意な影響を与えなかったが、CDDP (2 mg/kg/d, i.p.) の 7 日間の反復投与による摂餌量の低下に対して、化合物 9 は 50 および 100 mg/kg/d の用量で有意な摂餌量の増加が認められた。

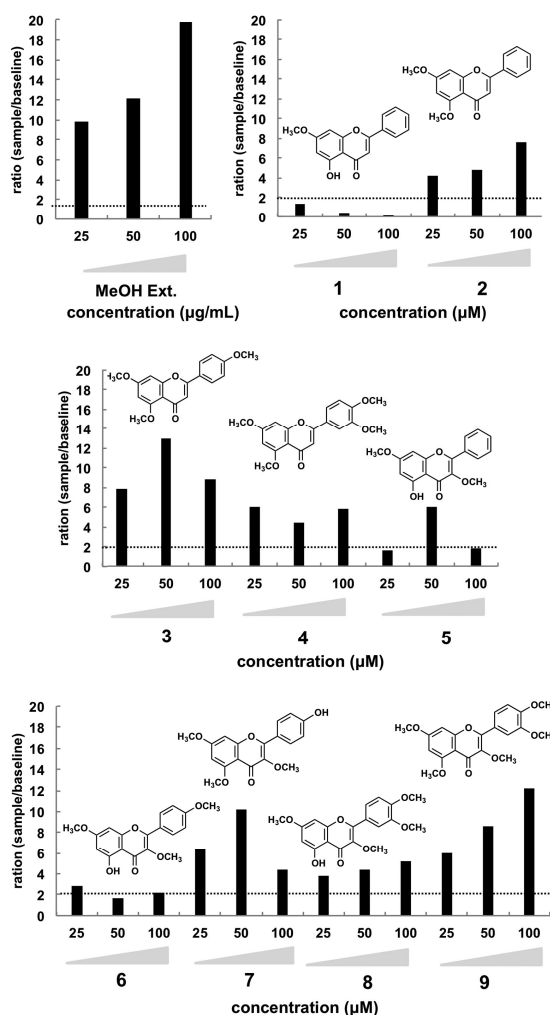


図 1. *K. parviflora* から単離したメトキシフラボノイド類のグレリン分泌促進作用 (*in vitro*)

表 1. ラットにおける摂餌量および視床下部における NPY mRNA の発現量に及ぼす Pentamethylquercetin (9) の効果

| Treatment | Dose (mg / kg, <i>p.o.</i>) | Food Intake (g/rat) 24 h | NPY/ β -actin (ratio) 6 h |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Normal | - | 26.3 \pm 0.6** | 1.00 \pm 0.08** |
| Control | - | 15.6 \pm 0.7 | 0.42 \pm 0.05 |
| Pentamethylquercetin (9) | | | |
| | 6.25 | 16.7 \pm 1.2 | 0.56 \pm 0.07 |
| | 12.5 | 18.3 \pm 1.3 | 0.87 \pm 0.02** |
| | 25 | 19.9 \pm 0.9* | 0.69 \pm 0.04** |

Values represent the means \pm S.E.M. ($n=5, 6$).

Significantly different from the control, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

以上の結果から、*K. parviflora* (根茎) およびそれに含まれる pentamethylquercetin (9) は食欲不振に有効であることが示唆された。

(2) 辛味生薬のグレリン分泌促進作用

代表的な辛味生薬成分について、ラット胃内分泌細胞を用いて検討したところ、健胃生薬として良く知られているショウキョウ (*Zingiber officinale*, 根茎) に含まれる

[6]-shogaol (11) や [10]-gingerol (12) にグレリン分泌遊離促進作用を見出した。なお、10 μ Mにおける被験サンプル未処理群との培養液中のグレリン濃度比はそれぞれ、5.68および7.62であった。[10]-gingerol (12) には、既に活性型グレリンの脱アシル化に關するコリンエステラーゼを阻害することが報告されているが、³⁾ 本研究において初めてグレリン分泌を促すことを明らかにした。一方、ショウキョウの主要成分 [6]-gingerol (10) にはほとんど活性が見出されなかった。また、*Curcuma comosa* 根茎から得られたジアリルヘプタノイド類、コショウやナガコショウに含まれるpiperine (13) やretrofractamide A (14) には緩和な促進活性が見出された (10 μ Mにおけるグレリン濃度比: 2.36~2.90)。これまで、[6]-gingerol (10) の側鎖の6位水酸基の立体配置に關して、混乱がみられていたが、合成的手法とキラルカラムによる分析などの結果から、天然型の10の6位水酸基の立体配置は*S*体であることを明らかにした。また、微量成分である12、14および関連化合物の合成を行った。

化合物12と同様の活性型グレリンの脱アシル化に關するエステラーゼを阻害する成分を単離する過程で、*Bombax ceiba* 花部に含まれるフラボノイド類に緩和なコリンエステラーゼ阻害活性物質を見だし、その構造活性相関に關する知見を得た。

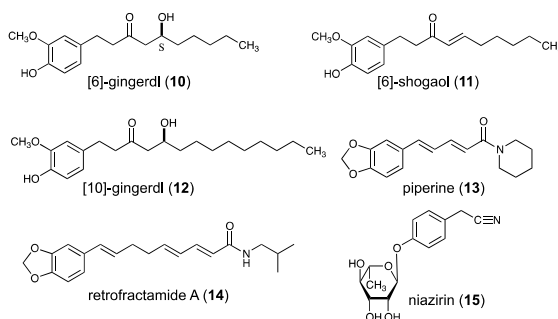


図2. 化合物10~15の化学構造

その他、ワサビノキ科植物ワサビノキ *Moringa oleifera* のメタノール抽出エキスは、*in vitro* 試験でグレリン分泌を抑制する傾向にあったが、これに含まれるniazirin (15) は逆にグレリン分泌促進作用を示した (10 μ Mにおけるグレリン濃度比: 2.41)。さらに、食欲抑制シグナルの一種glucagon-like peptide (GLP-1) の分解に關するDPP-IV阻害活性物質についてもあわせて検討し、マイカイカ (*Rosa rugosa*, 花部) に含まれる加水分解型タンニンに阻害活性を見出した。

以上、数種類の香辛料あるいは辛味性生薬から食欲亢進に關するグレリンの分泌促進作用を示す成分を明らかにし、特に作用の強かったpentamethylquercetin (9) にCDDP誘発食欲不振マウスおよびラットで、その有効性

を確認した。また、グレリンやGLP-1の分解に関与する酵素に影響を与える成分を明らかにするとともに単離成分の立体構造を含めた化学構造を明らかにするなど、それらの健胃作用を裏付ける知見を得た。

(引用文献)

- 1) Sae-Wong C., Matsuda H., *et al.* Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells, *J. Ethnopharmacol.*, **136**, 488–495 (2011).
- 2) Matsuda H., Kogami Y., *et al.*, Structural requirements of flavonoids for the adipogenesis of 3T3-L1 cells, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2835–2841 (2011).
- 3) Sadakane C., Muto S., *et al.*, 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **412**, 506–511 (2011).

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 2 件)

Yi Zhang, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Tao Wang, Masayuki Yoshikawa, Hisashi Matsuda: Chemical structures of constituents from the seeds of *Cassia auriculata*. *Tetrahedron*, 査読有, Vol. 71, 2015、pp. 6727–6732

Takahiro Matsumoto, Seikou Nakamura, Katsuyoshi Fujimoto, Tomoe Ohta, Keiko Ogawa, Masayuki Yoshikawa, Eri Onishi, Masashi Fukaya, Hisashi Matsuda: Structure of diarylheptanoids with antiallergic activity from the rhizomes of *Curcuma comosa*. *Journal of Natural Medicines*, 査読有, Vol. 69, 2015, 142–147

[学会発表](計 8 件)

Hisashi Matsuda, Seikou Nakamura, Itadaki Yamaguchi, Makoto Hamao, Masayuki Yoshikawa: Plasma concentrations of biofunctional amide constituents from fruit of *Piper chaba*, 7th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference, 2015年10月31日(台北, 台湾)

中嶋聡一, 門口尚子, 尾田好美, 海川 和, 小川裕樹, 前川友希, 中村誠宏, 伊藤 謙, 松田久司: インドおよびアーユル・ヴェーダー関連植物の機能解明—3: *Bombax ceiba* 花部のコリンエステラーゼ阻害成分. 日本薬学会第135年会, 2015年3月27日(神戸)

小川慶子, 松本崇宏, 中村誠宏, 中嶋聡一,

坂田侑里, 大西絵梨, 吉川雅之, 松田久司: タイ産 *Curcuma comosa* 根茎の生体機能性ジアリールヘプタノイド成分. 2014年度創薬科学フロンティアシンポジウム, 2014年11月22日(京都市)

中村誠宏, 中嶋聡一, 越智理蓉子, 宮下優, 横田奈美, 松本崇宏, 太田智絵, 小川慶子, 吉川雅之, 松田久司: カレーリーフ (*Murraya koenigii*) のアルカロイド成分とメラニン生成抑制作用. 第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム 2014年11月06日(東京都)

太田智絵, 中村誠宏, 濱尾 誠, 松本崇宏, 吉川雅之, 松田久司: 茶花 (*Camellia sinensis*, 花部) の食欲抑制作用成分. 日本ハーブ療法研究会第2回学術集会 2014年10月19日(京都市)

松田久司: 伝承薬物から生体機能性成分の探索. 日本ハーブ療法研究会第2回学術集会, 2014年10月19日(京都市)

中村誠宏, 松本崇宏, 安井理絵, 吉川雅之, 南出年輝, 早川祥平, 岡本あずさ, 松田久司: 中国産マイマイカ (*Rosa rugosa*, 花部) からの DPP- 阻害活性成分の探索. 日本生薬学会第61回年会, 2014年9月14日(福岡市)

松田久司, 加藤さつき, 松元佑里子, 岡本あずさ, 早川祥平, 南出年輝, 吉川雅之, 中村誠宏, 坂内 慎, 栗林かな: シスプラチン誘発食欲減退ラットに及ぼす *Kaempferia parviflora* 根茎含有メトキシフラボノール類の効果. 日本薬学会第134年会, 2014年3月28日(熊本市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
京都薬科大学 教育・研究 研究室・附属施設
の紹介 生薬学分野

[http://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/
laboratory/cat/post_10.html](http://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/laboratory/cat/post_10.html)

6 . 研究組織

(1)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：4 0 2 8 8 5 9 3

(2)研究分担者

中村 誠宏 (NAKAMURA, Seikou)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：2 0 4 1 1 0 3 5