

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460141

研究課題名(和文) 糖化終末化合物生成を抑制し糖尿病合併症予防に有効な新規プレニルフラボノイドの創製

研究課題名(英文) Study on the prenylflavonoids suppressing to advanced glycation end products, and preventing to diabetic complication.

研究代表者

池田 剛 (IKEDA, Tsuyoshi)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80295138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖化終末化合物(AGEs)生成阻害活性成分の探索研究を行い、既知プレニルフラボノイド30種、新規プレニルフラボノイド20種を単離構造決定した。その中でも既知のEpimedokoreanin B, 及びES-1, ES-2, ES-4 と仮称する新規プレニルフラボノイドに強い生成阻害活性が認められた。生成阻害活性の強い化合物の構造活性相関を検討した結果、プレニルフラボノイドにおいては、配糖体よりもアグリコンでAGEs生成阻害活性が強く、またフラボノイド骨格のB環部分にカテコール基を有し、8, 5' 位にプレニル基を有することがAGEs精製阻害活性作用の発現に必須であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Because advanced glycation end products (AGEs) are reported that involved in the pathogenesis and progression of lifestyle-related diseases and aging diseases, treatment with AGEs inhibitors is believed to be a potential strategy for the prevention of these diseases. Accordingly, we have been searched for natural products that inhibits the formation of AGEs. In our previous study, MeOH extract of Epimedii Herba (EH) was found to inhibit the formation of AGEs during incubation of collagen-derived gelatin with ribose. Epimedokoreanin B (EKB) which was typical prenylflavonoid from EH was found having most strong inhibitory activity among the tested samples. This result was able to demonstrate the potential of anti-glycation effect in EH in addition to the traditional tonic effect. Furthermore the development of foodstuff including EKB is expected as a supplement, tea or cosmetics with anti-glycation action.

研究分野：天然薬物学

キーワード：糖化終末化合物 糖尿病合併症 プレニルフラボノイド イカリソウ

1. 研究開始当初の背景

著者らは、当研究室が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、健康維持や疾病予防に有効な「機能性天然薬物」の探索研究を行っている。これまでに、抗動脈硬化作用を有するトマト新規配糖体 (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27, 2400–2406 (2007)) やトリテルペン (*J. Agri. Food Chem.*, 59, 4544–4552 (2011))、内臓脂肪の蓄積を抑制する杜仲葉由来イリドイド配糖体 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 1786–1791 (2011)) などを発見してきた。さらに近年、この研究の一環として、糖尿病合併症や動脈硬化症、アルツハイマー病などの発症や進展に関与する糖化終末化合物 Advanced glycation end products (AGEs) の生成を阻害する天然化合物の探索を行っている。AGEs は、グルコースなどの還元糖と生体タンパクのアミノ酸との非酵素的な反応であるメイラード反応によって生成する化合物群である。メイラード反応は大別して、アマドリ転移物が生成する前期反応と、その後、酸化・還元・縮合などを経て AGEs を生成する後期反応とに分けられる。身近な AGEs の例として、血糖コントロールの指標で臨床的に測定されている HbA1c は、ヘモグロビン鎖の N 末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転移物である。AGEs は健康人よりも糖尿病患者や慢性腎不全患者、また加齢などで顕著に高値であると報告されている (図 1)。

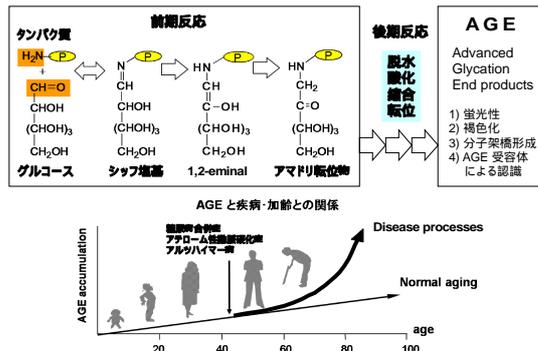


図 1 AGEs の生成と疾病・加齢との関係

AGEs にはこれまでに 30 種以上の多数の構造体が報告されている。著者らは、それら AGEs 構造体のうち、既に生体内での局在部位、病態との関与、生成経路が報告されている lysine 由来の CML (*N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine)、arginine 由来の CMA (*N*<sup>ω</sup>-(carboxymethyl) arginine) に着目した。CML は、酸化反応のバイオマーカーとしても捉えられている AGEs で、糖尿病合併症病変部位や動脈硬化巣に蓄積が増加している。また、CML は RAGE (receptor for AGE) によって認識され、炎症反応を誘導することも知られている。一方、CMA は、コラーゲン特異的に生成する AGEs である。コラーゲンに蓄積した CMA は、骨芽細胞や線維芽細胞のアポトーシスの誘導、糖尿病患者におけるケラチノサイトの遊走・接着の低下など、様々な病

態や老化の原因となる現象を引き起こす。

以上のように、CML、CMA は様々な病態への関与が示唆されている。したがって、生体内において、これらの生成を抑制することが出来れば、糖尿病合併症や皮膚疾患の予防、及び治療に有効であると考えられる。そこで、著者らは、共同研究者の永井らにより作成された抗 CML、抗 CMA 抗体を用いた ELISA 法により、これらの AGEs の生成を阻害する新規の活性化合物の探索を行っている (Nagai R., Ikeda T., et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1126, 38–41 (2008))。先ず、中国古来の神農本草經の上品に収載されている生薬を中心に 54 種の天然物抽出エキスから CML および CMA の生成を阻害する生薬を探索した。その結果、14 種が CML、6 種類が CMA 生成を阻害した。その中でも、オウギ抽出エキスが CML の生成を、キクカとイカリソウの抽出エキスは CML、CMA 両者の生成を顕著に抑制した。そこで、これらの生薬より活性成分の単離を行った結果、オウギより Astragaloside V (Ikeda T., et al., *J. Agri. Food Chem.*, 57, 7666–7672 (2009))、キクカより Luteolin、イカリソウよりプレニルフラボノイド類を発見した。本研究では、CML 及び CMA の両者の生成を強く抑制するイカリソウエキスの活性フラクシオンよりプレニルフラボノイド類を単離・精製し化学構造の決定を行っていること、プレニルフラボノイドの中には、元のプレニル化されていない化合物にはなかった生物活性が付与される例が多数報告されていること (Batta B., et al., *Curr. Med. Chem.*, 12, 713–739 (2005)) から、様々なプレニルフラボノイド関連化合物を調製し、AGEs 生成阻害剤の探索を行うことを企図した。

2. 研究の目的

本研究では様々なプレニル修飾フラボノイド関連誘導体を調製し、糖尿病合併症や動脈硬化症、アルツハイマー病などの発症や進展に関与する AGEs の生成を阻害する誘導体の創製を目指して研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) イカリソウより各種プレニルフラボノイド誘導体の調製：これまでに CML、CMA 生成阻害活性を有する生薬イカリソウの活性画分より、プレニルフラボノイドを得ることが出来た。イカリソウにはまだまだ多数のプレニルフラボノイドの存在が確認されていることから、プレニル基を含む低極性の化合物に焦点を絞り更に分離精製を進めていく。

(2) AGEs 生成抑制活性の評価：得られた化合物の AGEs 生成抑制活性試験は、モノクローナル抗 CML 抗体、抗 CMA 抗体を用いた ELISA 法で行う。ポジティブコントロールとして、Luteolin を用いる。そして、プレニル化の影響について詳細な構造活性相関の検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) イカリソウより各種プレニルフラボノイドの単離・精製と化学構造決定・・・生薬イカリソウを本研究用にウチダ和漢薬より購入した。イカリソウをメタノールで抽出し、ヘキサンで脱脂した後、ポリスチレンゲル (MCI gel CHP-20P) にて分画した。既に AGEs 生成阻害活性が観測されている 80%~100%メタノール溶出画分をさらに各種カラムクロマト (Sephadex LH-20、中圧カラム、シリカゲル、分取 HPLC) にて分離精製した。得られた化合物の化学構造は、NMR を中心とする各種スペクトル解析より、必要に応じて誘導体に変換して決定した。そして、活性試験に利用した。

(2) AGEs 生成抑制活性の評価・・・各種プレニル誘導体について、CML、CMA の生成阻害試験を行う。先ず、CML、CMA が生成する条件下 (リボース (30 mM) とゼラチン (2 mg/mL) の混合溶液) に DMSO に溶解した化合物 (100 μM) を添加し、37°C で 7 日間インキュベートする。次に、抗 CML 抗体 (Mouse monoclonal anti-CML antibody (6D12))、抗 CMA 抗体 (Mouse monoclonal anti-CMA antibody (3F5)) を一次抗体として、以下に示す ELISA 法で生成阻害活性を評価した (図 2)。対照薬としては、AGEs 阻害剤である Pyridoxamine とキクカ由来の Luteolin を用いた。

#### 【ELISA の手順】

96 well イムノプレートに、10 μg protein/mL に希釈したサンプルを入れ、室温で 2 時間静置してコーティングする。洗浄後、Blocking buffer を入れ室温で 1 時間静置してブロッキングする。洗浄後、一次抗体を入れ、室温で 1 時間静置する。洗浄後、二次抗体 (HRP-goat anti-mouse IgG) を入れ、室温で 1 時間静置する。洗浄後、発色液を入れ 5 分間静置し発色させる。その後、反応停止液を入れマイクロプレートリーダーを用いて 492 nm の吸光度を測定する。得られたデータを基に、プレニル化の影響について詳細な構造活性相関の検討を行い、更なる誘導体の調製に活用した。

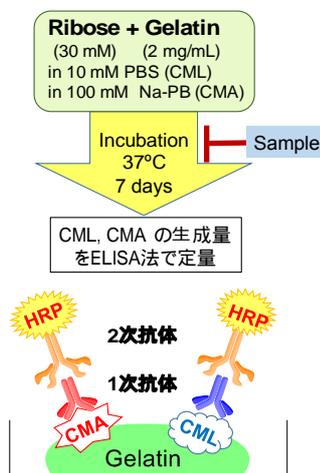


図 2 ELISA 法による AGEs の検出

### 4. 研究成果

(1) イカリソウの抽出分離のフローチャートを以下に示す (図 3)。活性の確認された分画 2,3 を、セファデックスやシリカゲル、HPLC など、各種クロマトグラフィーにより分離し、50 個の化合物を単離した。その内、青で囲んだ 1-30 番が既知化合物として同定した化合物、赤で囲んだ 31-46 番の化合物が新規化合物として単離・構造決定した化合物である。

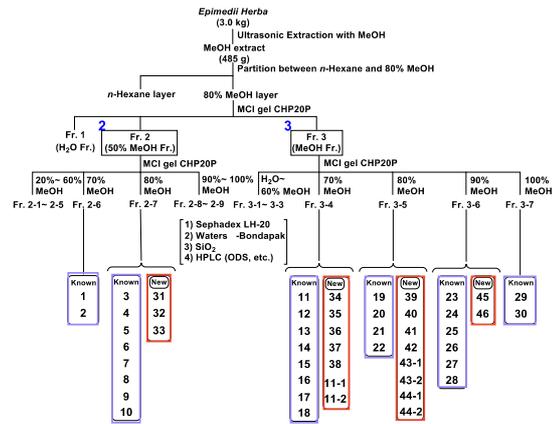


図 3 CML, CMA 生成阻害活性画分の精製

単離したイカリソウ由来プレニルフラボノイドの中で、サンプル量が確保できた化合物 35 種 (図 4) について CML, CMA 生成阻害活性を ELISA 法で測定した。

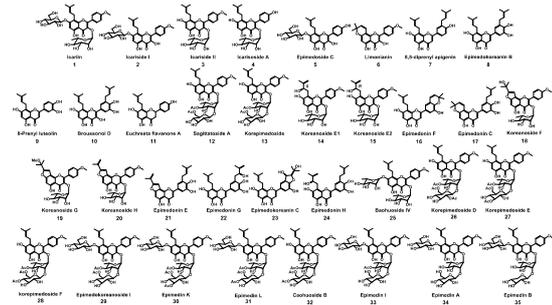


図 4 活性試験に用いた化合物

(2) CML, CMA 生成阻害試験の結果を示す (図 5)。活性の強い化合物はバーが小さくなる。

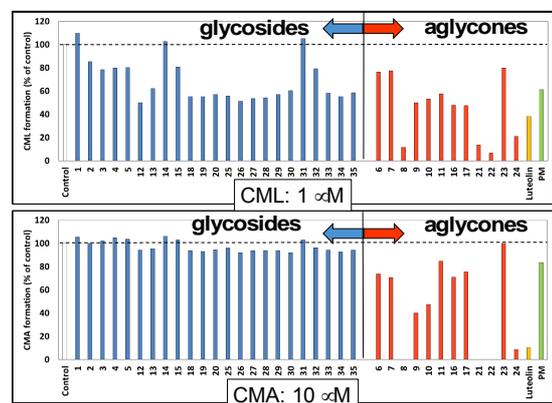


図 5 CML, CMA 生成阻害活性の比較

グラフの左側に配糖体、右側にアグリコンと分類すると、アグリコンに阻害活性が強い傾向があることが確認された。

既知化合物 Epimedokoreanin B (EKB)、新規プレニルフラボノイドアグリコンである Epimedonin E, G, H に顕著な阻害活性を確認できた。(図6) これらの化合物の共通構造として、B環にカテコール基、A環8位とB環5'位にプレニル基を有することが特徴である。

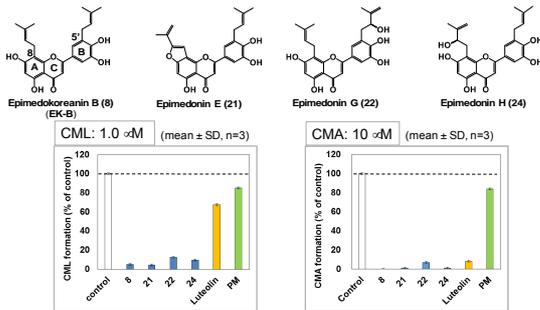


図6 活性の顕著な化合物の再検定

Epimedonin G, H はラセミ体であることから、それぞれ光学分割し、改良モッシャー法で絶対立体構造を決定した Epimedonin G1, G2, H1, H2 について阻害活性を測定した(図7) その結果、ラセミ体、S体、R体の間で顕著な阻害活性の差は確認されなかった。このことから、イカリソウのプレニルフラボノイドにおいては光学活性化合物に阻害活性が偏ることなく、ラセミ体と同程度、CML, CMA 生成を阻害することが確認された。

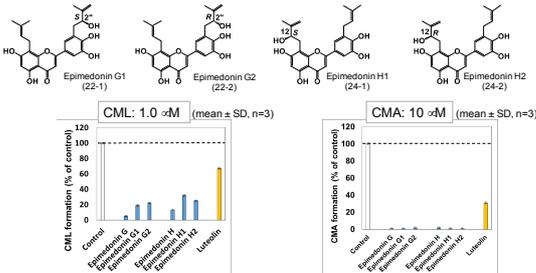


図7 光学異性体の阻害活性の比較

活性化合物の水酸基の重要性を検討するために EKB をジアゾメタンで処理し、各種誘導体を調製した(図8)

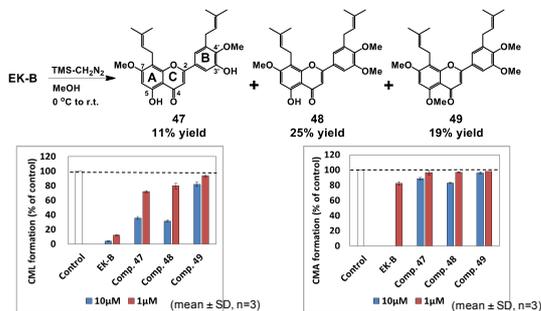


図8 メチル誘導体の合成と阻害活性試験

その結果、メチル誘導体はいずれも活性が低下したが、特に A 環 5 位の水酸基がメチル化された化合物 49 は顕著に活性が低下した。

活性を示す共通構造の一つであるカテコール基を持つ単純な化合物 (gallic acid, pyrogallol, chlorogenic acid) と比較したところ、EKB は最も強い阻害活性を示した。

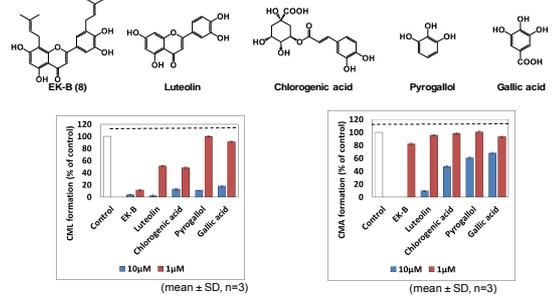


図9 カテコール誘導体の阻害活性

次に、共通構造の一つであるプレニル基の重要性を検討するために、プレニル基を含有する単純な化合物 (Artepillin C, Baccharin, Drupanin) を用いて実験したところ(図10) どの化合物も阻害活性を示さなかった。

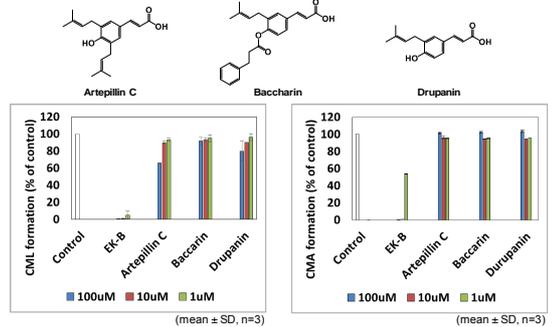
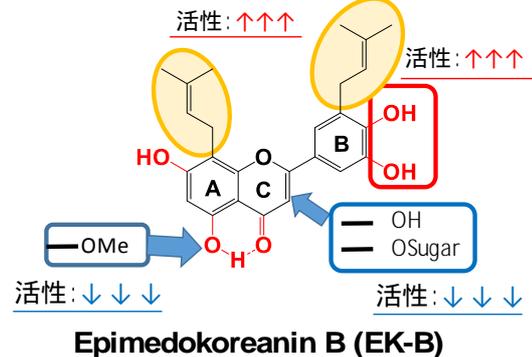


図10 プレニル誘導体の阻害活性

以上、構造活性相関の検討の結果、図11に示す構造が活性発現に必須と判明した。



- B 環にカテコール基をもつフラバン骨格
- A 環 8 位、B 環 5'位にプレニル基
- A 環 5 位と C 環 4 位の間に水素結合

図11 プレニルフラボノイドの構造活性相関のまとめ

最も阻害活性が強く、また収量も多い (0.084%) ことから、イカリソウの CML, CMA

生成阻害活性の本体は **EKB** と判明した。

本研究により、従来、強壯の目的で使用されてきたイカリソウに、抗糖化作用の可能性を示すことが出来た。今後、抗糖化作用のあるサプリメントや茶剤、化粧品としてイカリソウ含有商品の開発が期待される。一方、イカリソウの主要化合物群であるプレニルフラボノイド配糖体は、経口摂取すると腸内細菌で代謝されてアグリコン (icaritin 等) となり吸収される。今後、本研究を展開する際に必要な動物実験においては、**EKB** と共に、プレニルフラボノイド配糖体やその対応するアグリコン部の検討も必要である。

#### 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 9 件)

Kariu T., Nakao R., Ikeda T., Nakashima K., Potempa J., Imamura T., Inhibition of gingipains and *Porphyromonas gingivalis* growth and biofilm formation by prenyl flavonoids. *Journal of periodontal research*, 査読有, **52** (1), 2017, 89-96

DOI: 10.1111/jre.12372

Sugawa H., Ohno R., Shirakawa J., Nakajima A., Kanagawa A., Hirata T., Ikeda T., Moroishi N., Nagai M., Nagai R., *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products. *Food Funct.*, 査読有, **7** (6), 2016, 2566-2573

DOI: 10.1039/C5FO01563D

Nakashima K., Miyashita H., Yoshimitsu H., Fujiwara Y., Nagai R., Ikeda T., Two new prenylflavonoids from *Epimedii Herba* and their inhibitory effects on advanced glycation end-products. *J. Nat. Med.*, 査読有, **70** (2), 2016, 290-295

DOI: 10.1007/s11418-015-0962-0

Usui K., Ikeda T., Horibe Y., Nakao M., Hoshino T., Mizushima T., Identification of HSP70-inducing activity in *Arnica montana* extract and purification and characterization of HSP70-inducers. *J. Dermatol. Sci.*, 査読有, **78** (1), 2015, 67-75

DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.01.014

##### [学会発表](計 8 件)

池田 剛 他、終末糖化生成物の生成を阻害する天然薬物の探索研究-ローズレッドについて-、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 26 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

池田 剛 他、終末糖化生成物の生成を抑制する天然有機化合物の探索、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ikeda Tsuyoshi、Prenylflavonoids from

*Epimedii Herba* inhibits formation of advanced glycation end-products、International conference on conservation of biodiversity and sustainable use of tropical and subtropical plants、2015 年 11 月 3 日、Guilin Plaza Hotel、Guilin (China)

池田 剛 他、プレニル誘導体の AGEs 生成阻害活性の検討、日本生薬学会第 62 回年会、2015 年 9 月 11 日、長良川国際センター(岐阜県・岐阜市)

池田 剛 他、イカリソウのプレニルフラボノイド類の AGEs 生成阻害活性の検討、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(兵庫県・神戸市)

池田 剛 他、イカリソウに含まれる AGEs 生成阻害成分の探索研究、第 24 回日本メイラード学会年会、2014 年 11 月 7 日、熊本市国際交流会館(熊本県・熊本市)

池田 剛 他、イカリソウ由来の AGEs 生成阻害活性プレニルフラボノイドの光学分割に関する研究、日本生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月 14 日、福岡大学薬学部(福岡県・福岡市)

池田 剛 他、イカリソウの終末糖化産物(AGEs)生成抑制成分について、生薬若手懇話会第 12 回研修会、2014 年 8 月 16 日、長崎国際大学薬学部(長崎県・佐世保市)

##### [図書](計 1 件)

藤原章雄、池田 剛、永井竜児、シーエムシー出版、メイラード反応の機構・制御・利用、2016、25 (273-282)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池田 剛 (IKEDA Tsuyoshi)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80295138