

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790122

研究課題名 (和文) 薬用食品から肝糖代謝亢進を機序とした抗糖尿病作用成分の探索

研究課題名 (英文) Search for anti-diabetic constituents from medicinal foods-through the enhancement of glucose metabolism in hepatocytes-

研究代表者

二宮 清文 (NINOMIYA KIYOFUMI)

近畿大学・薬学総合研究所・助教

研究者番号：10434862

研究成果の概要 (和文)：標記の肝細胞における糖代謝を亢進することを機序とする抗糖尿病作用成分を広く探索した。その結果、新たに helichryoside などのアシル化フラボノール配糖体が、肝細胞内の中性脂肪含量を低減させることを見い出すとともに、培養液中のグルコース消費を亢進させることを見出した。さらに、同化合物は *in vivo* の試験においても耐糖能改善作用を示すことを明らかにした。また、糖尿病の治療に利用されているヒュウガトウキ根部からは、肝細胞においてインスリンによる糖消費を亢進させる成分として isopteryxin などの khellactone 型クマリン成分、スイボンソウからは、脂肪代謝促進活性を示す新規メガスチグマン配糖体 neosedumoside II を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In order to investigate anti-diabetic constituents from medicinal foods, we examined following screening tests: (1) inhibitory effects on high glucose-induced triglyceride (TG) accumulation in HepG2 (2) effects on TG metabolism in high glucose pre-treated HepG2 (3) effects on glucose consumption in HepG2. As the results, acylated flavonol glycosides, tilioside and helichryoside, reduced TG contents in high glucose pre-treated HepG2 and enhanced glucose consumption in HepG2. In addition, administration of helichryoside improved glucose tolerant in ddY mice. Furthermore, we found that isopteryxin, a khellactone-type coumarine, improved insulin-induced glucose consumption in HepG2 cells, and that neosedumoside II, a megastigmane glycoside, reduced TG contents in high glucose pre-treated HepG2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病、特に糖尿病の罹患者数は、日本のみならずアジア諸国、欧米においても著しい増加が確認されており、本疾病の予防や、根本的な治療薬の開発は重要な課題

として認識されるに至っている。また、糖尿病、脂質異常症（高脂血症）、高血圧または腹部肥満が一個人に集積するメタボリックシンドロームの概念が広く認知され、動脈硬化性疾患発症の背景として重要であること

が知られるようになった。本症候群は、単に多数の因子が偶然に集積したものではなく、その上流には内蔵脂肪の蓄積と機能異常など、いわゆる生活習慣を基盤とする栄養過多・運動不足などの背景が存在する。これらの素因は、単に肥満症を誘発するのみではなく、糖尿病以外の生活習慣病、即ち、高脂血症や高血圧症などの罹患率を上昇させることが知られており、これらの疾病を同時に予防・改善する方法の確立が望まれている。これまでに、肥満の治療薬としては、消化管内における脂肪の消化を抑制する *orlistat* や中枢に作用する *mazindol* などが利用されている。しかしながら、前者は食事時の栄養物の吸収の抑制、後者は食欲抑制に基づく食事量の抑制によるものであり、効果は限定的である。従って、一連の生活習慣病の素因である過剰に蓄積した脂肪を減少させることで、結果として耐糖能異常、高脂血症および高血圧症などの生活習慣病の予防・改善に寄与できると考えられる。

一方、食事として摂取された糖質の消化吸收過程は、消化管内で単糖（主にグルコース）にまで加水分解され、次いで小腸から *SGLT* を介した細胞内輸送を経て、小腸周囲の毛細血管へと移行する。これら血中へと移行したグルコースは門脈を介して肝臓へと運搬される。ここで、消化管から吸収されたグルコースの約 1/3 は肝臓へと *GLUT2* を介した経路により肝細胞内へと取り込まれ、肝臓を通過したグルコースが、末梢血中のグルコース（血糖値）として観察される。しかしながら、肥満者の多くに罹患が認められる脂肪肝の状態では、上記に示した *GLUT2* を介した肝細胞内へのグルコースの取り込みが低下していることが知られており、食後過血糖を助長することから、糖尿病発症の危険因子と考えられている。加えて、脂肪肝では肝臓におけるコレステロールおよび脂肪合成の亢進、脂肪酸代謝（ β -酸化）の低下や肝臓でのインスリン抵抗性が観察される。従って、肝臓の機能を正常化させることにより、脂肪肝のみならず、その他の生活習慣病、特に糖尿病や高脂血症の予防・改善が期待できる。一方、脂肪肝の治療については断酒や食事、運動習慣などの生活指導が中心に行われており、積極的な介入は行われていない。

2. 研究の目的

上記に明記したように、脂肪肝の改善および肝細胞内へのグルコースの取り込みを亢進させることにより、結果として耐糖能異常、高脂血症の改善が期待できる。

本研究の目的は、肝細胞内への脂肪蓄積抑制および肝細胞内の脂肪代謝（減少）促進活性を有する化合物を薬用食品中成分より見出し、肝細胞のグルコース消費を亢進させ

ることのできる化合物を見出すことで、既存の医薬品には無い、作用機序を有する新規抗糖尿病薬シーズを提案することである。

さらに、上記の薬理活性を示す化合物により *in vivo* での評価を行うことで、本作用機序による、耐糖能の改善作用を検証することが目的である。

3. 研究の方法

1) *Effects on triglyceride (TG) accumulation in HepG2*

ヒト肝癌細胞 *HepG2* (RCB1648) を提供者のプロトコールに従って培養して実験に供した。*HepG2* 細胞への中性脂肪 (TG) 蓄積に与える影響については、被験物質共存下、高濃度グルコース (HG, 4500 mg/L) 含有 *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) により培養することで肝細胞内への TG 蓄積を誘発した。肝細胞内の TG については、細胞を蒸留水中で破碎して得られるホモジネート中の TG を市販キットで定量した。併せて、ホモジネート中のタンパク質濃度を定量して、タンパク量当たりの TG 量として、肝細胞内への TG の蓄積を評価した。

2) *Effects on TG contents in HG-pretreated HepG2*

同細胞を用いて、上記に示すプロトコールに従い、既に細胞内に TG を蓄積させた *HepG2* を使用して実験を行った。細胞を被験物質とともに、培養液を低濃度グルコース (LG, 1000 mg/L) 含有 DMEM で 20 時間培養したときの細胞内 TG を上記と同様に測定して、同様に評価した。

3) *Effects on glucose consumption in HepG2*

上記の実験と同じく *HepG2* 細胞を用いて実験を行った。同細胞を 2 日間被験物質共存下、DMEM (LG) にて培養した。被験物質添加培地 (DMEM (LG)) を 2 日ごとに交換して、計 6 日間培養した。さらに培養液を DMEM HG に交換して 20 時間培養したときの培地中のグルコース濃度を定量して、細胞のグルコース消費量とした。

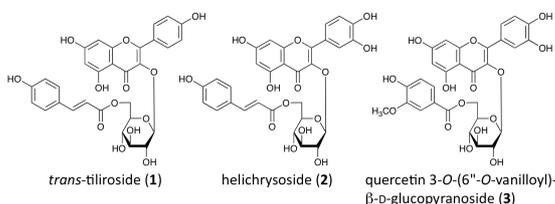
4) *Effects on glucose tolerant in mice (in vivo)*

上記の *in vitro* 実験において有効性を見出した被験物質について、マウスに経口投与を行って *in vivo* での有効性を確認した。実験は、10 週齢の雄性 ddY マウスを購入して 1 週間馴化飼育後から、被験物質を 2 週間、毎日経口投与した。投与期間終了後、20 時間絶食したマウスにグルコース (1 g/kg, *i.p.*) を負荷して、耐糖能に与える影響を検討した。併せて、血漿中脂質成分などに与える影響についても検討した。

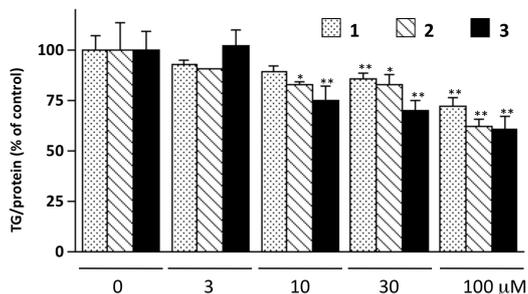
4. 研究成果

1) アシル化フラボノール配糖体の脂肪代謝促進およびグルコース代謝促進活性

これまでの研究において、報告者が *in vivo* での抗肥満活性と耐糖能改善活性を確認しているアシル化フラボノール配糖体 *trans*-tiliroside (1) [Ninomiya K., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3059–3064 (2007).] とその類縁化合物の活性を比較した。まず、活性の期待された 1 では、有意な脂肪蓄積抑制活性は観察されず、1 のアグリコンである **kaempferol** に有意な脂肪蓄積抑制活性が観察されたが、同時に測定しているホモネート中のタンパク質濃度に著しい低下が観察されており、細胞増殖の抑制による見かけ上の TG 蓄積抑制であることが明らかになった。そこで、すでに、細胞内へと蓄積している TG に与える影響について検討した。その結果、1 および、類縁化合物 **helichrysid** (2) や **quercetin 3-O-(6"-O-vanilloyl)- β -D-glucopyranoside** (3) などでは、顕著な細胞内 TG 代謝促進活性が観察された。

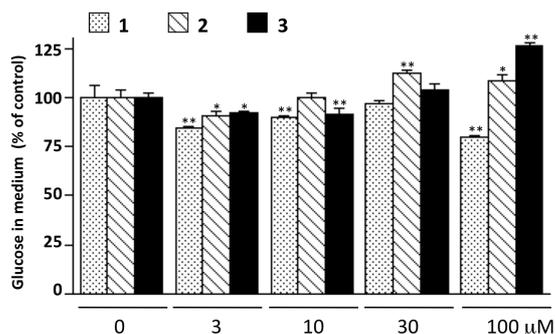


Chemical structures of 1–3



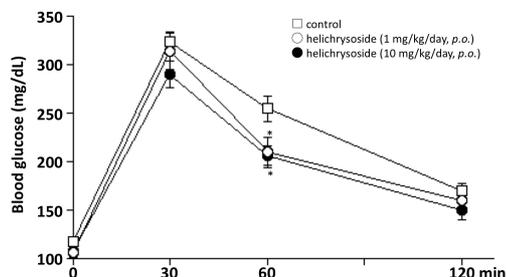
Effects of 1–3 on TG contents in high glucose pre-treated HepG2

さらに、本研究の主題である肝細胞によるグルコース消費に与える影響について検討した。その結果、次図に示すようにアシル化フラボノール配糖体 1–3 は、いずれも 3 μ M で有意な糖消費亢進活性を示すことを明らかにした。

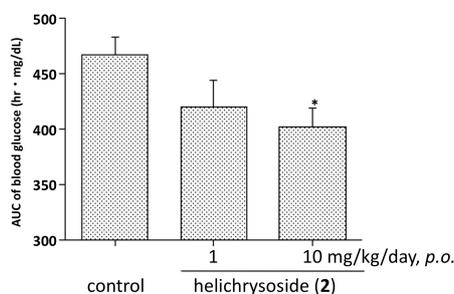


Effects of 1–3 on glucose consumption in HepG2

そこで、有意な脂肪代謝亢進活性およびグルコース消費亢進活性が観察された 2 について *in vivo* での評価を行った。その結果、2 の ddY マウスへの連続投与では、耐糖能試験 (GTT) において有意な血糖値の低下が観察されるとともに、血糖値の AUC においても有意な改善が観察され、*in vivo* においても耐糖能を改善させることを明らかにした。



Effects of 2 on glucose tolerant test in mice

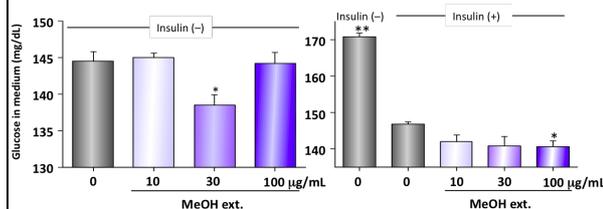


Effects of 2 on AUC of blood glucose in GTT

2) ヒュウガトウキ成分のグルコース代謝促進活性

ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) は、宮崎県、大分県および愛媛県などの山岳地域に自生する植物である。

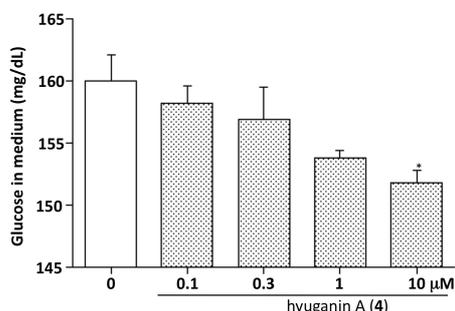
本植物の根部は、主に九州地方で糖尿病の治療に用いられていることに着目し、*A. furcijuga* 根部について、肝細胞における糖消費亢進活性について検討した。まず、根部より調製した MeOH 抽出 ext. について検討した結果、下図に示すように、10 μ g/mL 程度の濃度から、インスリン共存下における糖消費を亢進する傾向が観察された。



Effects of *A. furcijuga* on glucose consumption in HepG2

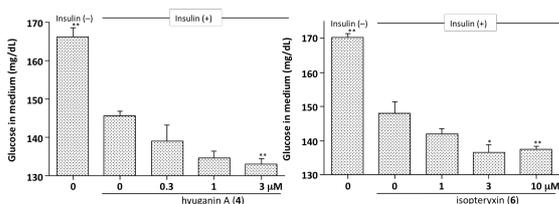
そこで、根部の含有成分について、糖消費亢進活性を検討した。その結果、インスリン

非共存下では、khellactone 型クマリン hyuganin A (4) や クマリン配糖体 apiosylskimmin (5) などに糖消費亢進活性を認めた。

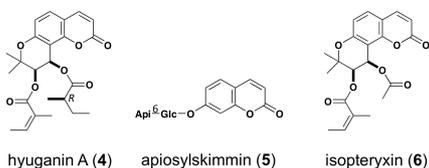


Effects of 4 glucose consumption in HepG2

さらに MeOH 抽出エキスで観察された、インスリン共存下での糖消費についても検討した。その結果、isopteryxin (6) および hyuganin A の khellactone 型クマリン成分に有意な糖消費亢進活性を認めた。



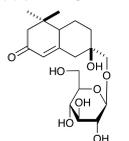
Effects of 4 and 6 on insulin-induced glucose consumption in HepG2



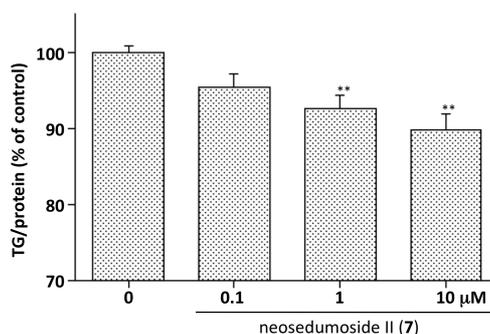
Chemical structures of 4—6

3) スイボンソウ成分の肝細胞内脂肪蓄積抑制活性成分

ベンケイソウ科植物ツルマンネングサ (*Sedum sarmentosum*) は、スイボンソウ (垂盆草) とも称され、韓国などでは野菜として食用にも供される他、肝障害の改善を目的に民間薬としても利用されている植物である。報告者は、*S. sarmentosum* の全草の含有成分の中から、新規化合物として単離・構造決定したメガスチグマン配糖体 neosedumoside II (7) に 1 μM 以上の濃度で有意な脂肪代謝促進活性を見出した。



Chemical structure of neosedumoside II (7)



Effects of 7 on TG contents in high glucose pre-treated HepG2

以上、報告者は、アシル化フラボノール配糖体およびクマリン誘導体に、本研究の目的である肝細胞の糖代謝亢進活性を見出すとともに、アシル化フラボノール配糖体に *in vivo* での耐糖能改善作用を明らかにした。また、スイボンソウ含有新規メガスチグマン配糖体成分に肝細胞内脂肪代謝促進活性を見出した。

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 1 件)

- ① Muraoka O., Morikawa T., Zhang Y., Ninomiya K., Nakamura S., Matsuda H., Yoshikawa M., Novel megastigmanes with lipid accumulation inhibitory and lipid metabolism-promoting activities in HepG2 cells from *Sedum sarmentosum*., *Tetrahedron*, **65**, 4142—4148 (2009). (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 水野修一, 二宮清文, 森川敏生, 三木芳信, 三宅荘八郎, 赤木良典, 村岡 修, 吉川雅之, ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) 成分の肝脂質代謝促進作用および手尾量分析. 第 27 回和漢医薬学会大会, 2010 年 8 月 28 日 (京都).
- ② 二宮清文, 森川敏生, 岳 譽泰, 三木芳信, 松田久司, 吉川雅之, 村岡 修, フラボノイドの肝細胞内脂肪低減作用. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009 年 11 月 25 日 (東京).
- ③ 二宮清文, 森川敏生, 村岡 修, 中村誠宏, Zhang Yi, 松田久司, 吉川雅之, 漢薬“垂盆草 (*Sedum sarmentosum*)”の肝細胞内中性脂肪蓄積抑制作用成分. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2009 年 10 月 24 日 (大阪)
- ④ 二宮清文, 森川敏生, 赤木良典, 堀 佑一郎, 村岡 修, 松田久司, 吉川雅之, 水野修一. ヒュウガトウキ (*Angelica*

- furcijuga*) 根部の糖代謝改善作用成分. 日本生薬学会第 56 回年会, 2009 年 10 月 3 日 (京都).
- ⑤ 水野修一, 二宮清文, 森川敏生, 赤木良典, 堀 佑一郎, 松田久司, 村岡 修, 吉川雅之, 日本民間薬ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) の糖代謝改善作用, 第 26 回和漢医薬学会大会, 2009 年 8 月 29 日 (千葉).
- ⑥ 森川敏生, 二宮清文, 山田友視, Zhang Yi, 中村誠宏, 松田久司, 村岡 修, 吉川雅之, 垂盆草 (*Sedum sarmentosum*) の中性脂肪蓄積抑制フラボノイド成分. 第 26 回和漢医薬学会大会, 2009 年 8 月 29 日 (千葉).

[その他]

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・助教

研究者番号：10434862