

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08156

研究課題名(和文) o06系統油蚕を病態モデルとして利用する血中尿酸値改善作用フィトケミカルの探索

研究課題名(英文) Search for phytochemicals for improving blood uric acid level using o06 strain silkworm as a pathological model

研究代表者

田中 龍一郎 (Tanaka, Ryuichiro)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：80236653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高尿酸血症改善作用を指標とした資源植物成分の探索研究で、イノンドから新規なイソラムネチングルクロニドとケルセチンを得、カミツレからはE-桂皮酸モノグルコシド(2G4M)を単離した。2G4Mの混合物(CPPG)のマウス経口投与で、血中移行性を観察し、病態モデルへの投与で血中尿酸値低下作用を確認した。2G4Mの4種のアグリコンホモログのX0とのファーマコフォアを検討した。o06系統油蚕の5齢期には体液中のUAは代謝を制限され、アラントインとして排泄されず一定の値を維持するという新知見を見出した。カイコがよりヒトに近似するプリン代謝系を持ち、代替動物としての有用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitro 試験で尿酸生成を抑えるイノンドとカミツレ主成分を見出し、新規フラボノイドグルクロニドを含む活性体3種を見出した。後者から得られたトランス桂皮酸グルコシド(カモミールフェニルプロパノグルコシド)についてはマウス経口薬理試験で高いバイオアベイラビリティとその有効性を確認した。またその類縁体のキサントキサンチンオキシゲナーゼとのファーマコフォア検討を踏まえ特許出願(1件)と取得(1件)を達成した。さらに病態マウスの代替(苦痛の軽減と使用数の減少)となる我が国独自の遺伝子資源(NBRP)であるo06系統カイコの有用性を見出し、その付加価値を高める成果をあげた。

研究成果の概要(英文)：In this study of the resources plant ingredient, which assumed hyperuricemia improvement activity an index, it got new isorhamnetin glucuronide and quercetin from a dill and isolated E-cinnamic acid- glucoside (2G4M) from chamomile. By oral administration mouse of the mixture (CPPG) of 2G4M, we observed blood transitivity and confirmed blood uric acid level by the dosage to the condition of a patient model. We examined a pharmacophore with X0 of aglycone homologue of 2G4M. UA levels in the hemolymph, metabolism was limited for 5th instar larvae of the o06 and found a new finding to maintain a constant value without being excreted as allantoin. Allopurinol and other treatments effectively reduced the UA levels in the mutants. Moreover, the dose response data suggested that our model can be used for research on reagents that reduce blood UA levels in hyperuricemia. Our results indicate that the o06 strain is a potential substitute for the mouse hyperuricemia model in medical research.

研究分野：天然物化学、昆虫利用学

キーワード：カモミールフェニルプロパノグルコシド バイオアベイラビリティ 油蚕 尿酸代謝 尿酸排泄 非侵襲投与 アラントイン定量

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

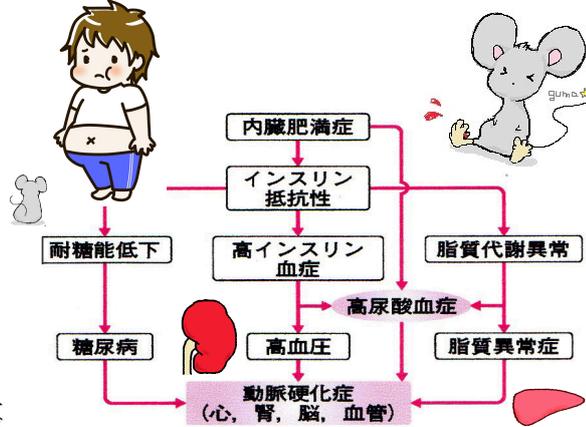
1. 研究開始当初の背景

血中尿酸値(UA)の高値は高血圧発症の予測因子や脳卒中の危険因子であり、痛風をはじめとする腎疾患や心筋梗塞など多くの疾病を誘発する。そのため100万人を越える高尿酸血症の患者とその予備群における血中尿酸値コントロールが予防医学的立場からも極めて重要となっている。これに対しバランスの良い食事と適度な有酸素運動が奨励される一方、安価で安全性の高い天然物、特に資源植物由来成分のメタボリック症候群改善効果への期待が高まっている。しかしながら同植物エキスや機能性食品の効能評価系において、その高尿酸血症改善効果を数値化し、モデル動物を用い科学的な検証を行った論文は現在、我々のそれと、吉住らの研究(Yakugaku zasshi, 125, 315-321, 2005)を散見するに留まり、同分野の成果の集積が急がれた。

一方、これまで動脈硬化、高血圧改善作用を指標としたフィトケミカルの探索研究では、ルチンやケルセチン等の食物フラボノイドが多数見出され、メタボリック症候群改善特付き食品成分として我々の知るところも多い。しかしながら血中尿酸値改善作用に関しては、用いるモデルマウスの尿酸値測定において採血処理での制約が多く、モデル作成操作が煩雑で、コストに見合う定量精度が期待出来ない理由からこれまでほとんど検討されていない。尚、上述のブラジルプロポリスから従来法で見出された既知フェノリクスのXO阻害作用は治療薬の数パーセントレベルかそれ以下であった(吉住ら2005)。

メタボリック症候群と高尿酸血症との関係

(Uchida T, Gout and Nucleic Acid Metabolism 39 (2): 2015.)



2. 研究の目的

高尿酸血症改善・新規機能性シーズのスクリーニングから高尿酸血症治療薬と同等あるいはそれ以上のXO阻害活性成分の存在を示すカミツレ、イノンド他を見出しており、これら活性を有するハーブ類の水溶性活性画分(粗活性画分)を用い、カイコ、マウスで濃度依存的な効果検証、有効性試験(IC50)と活性本体の構造決定を行う。また代替実験動物の有力な候補であるo06系統の油蚕への皮下投与(疑似静注、単回投与)と中腸投与(疑似経口投与、単回投与)、さらに任意経口投与(長期投与)での再評価も実施し、機能性食品評価系で有用なエビデンスを得る。

3. 研究の方法

本研究課題は、「o06及びXO阻害試験(in vitro)でのスクリーニング ⇄ 画分の活性評価(活性フラクションの特定) ⇄ 探索 ⇄ 活性画分の精製・単離 ⇄ 構造解析(決定) ⇄ XO阻害試験とマウス(o06も併用)での活性検証」のサイクルで進行し、課題解決を目指す。すなわちin vitroスクリーニングから見出された活性画分について代替実験動物候補であるo06ならびに従来評価法で用いるICRモデルマウスで濃度依存的な効果検証を行う。同時にこれまで判明しているイノンド、カミツレ両エキスの有意な活性フラクションの活性本体の精製から得られた活性物質の構造決定を行う。またこれらそれぞれのXO阻害率(%), IC50ならびに経口投与での活性検証も合わせて実施し、高活性な新規血中尿酸値改善作用フィトケミカルの発見を目指す。

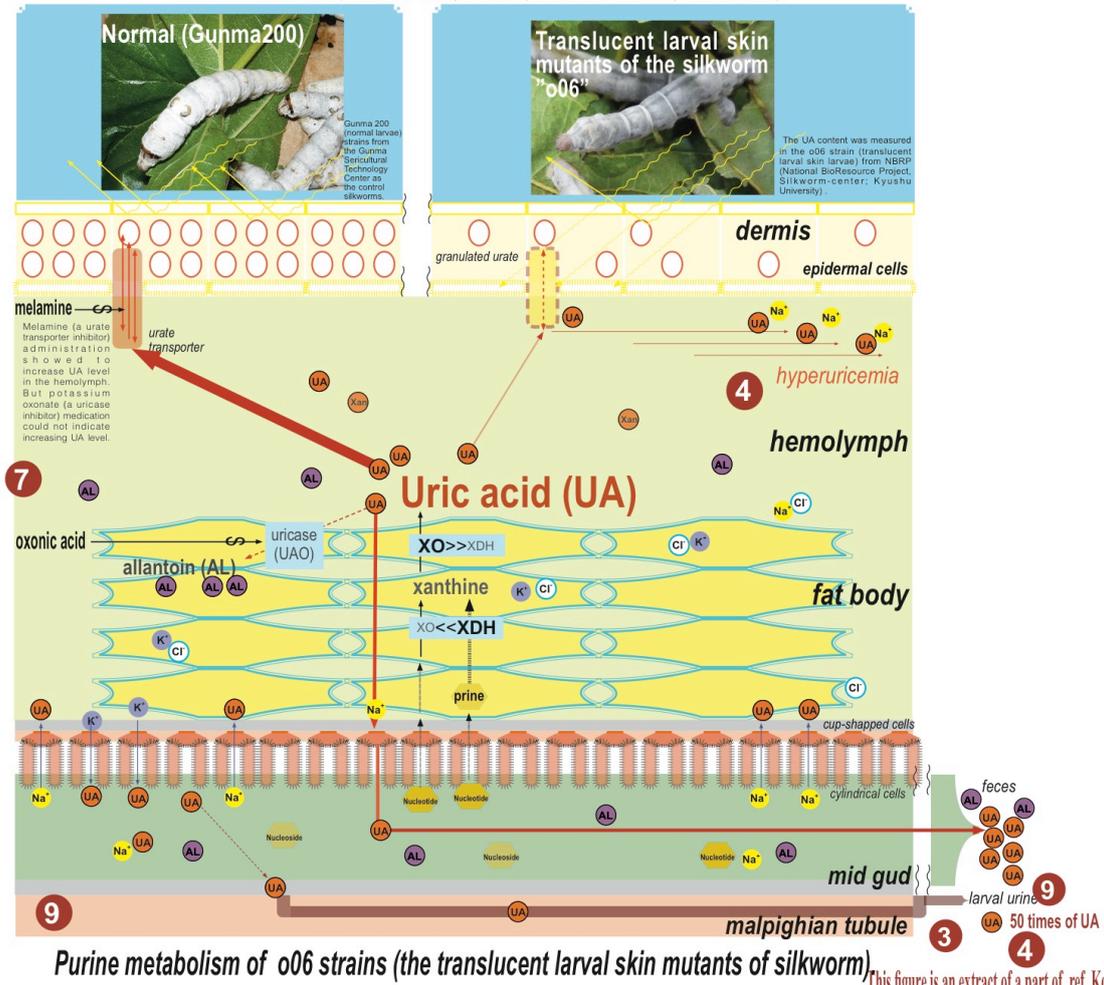
4. 研究成果

高尿酸血症改善作用を指標とした資源植物(全23種)のin vitroスクリーニングからイノンド、カミツレを含む7種の植物資源が見出された。まず治療薬レベルの活性が示唆されたイノンド、カミツレエキスから活性フィトケミカルの単離・同定、構造決定を行った。イノンド由来の活性フラボノイドは新規イソラムネチングルクロニドとケルセチンのそれと構造決定され、メルクマールとしてその物理恒数の測定ならびに各種スペクトルの帰属を行った。次いでカミツレからはE-桂皮酸モノグルコシド(2G4M)を単離した。このものが有する強いXO阻害活性と熱、光安定性を検討し、薬理試験では桂皮酸モノグルコシドのE, Z体混合物(CPPG)として調製し、その経時的なマウス経口投与での血中移行性を観察した。投与後60分後にin vitroで有意な活性を示す桂皮酸モノグルコシドの移行(35-38 μM)が示され、その有望なバイオアベイラビリティが示唆された。病態マウスへのCPPGの経口投与(30mg/匹)でも有意に血中尿酸値(UA)低下作用が示された。2G4Mのアグリコンホモログにも活性が示され、これら一連の成果の特許取得と出願を果たした。

2G4M のアグリコンホモログの X0 とのファーマコフォアの検討では PDB から入手した X0 の 3 次元構造情報をもとに rDock による結合シミュレーションで結合様式を評価した。その結果、2G4M のアグリコンである E-桂皮酸の 3 位の水酸基で活性は消失し、4 位の水酸基の存在で阻害率が上がることが示唆された。

さらに ICR 病態マウスの代替候補である o06 系統油蚕の体液、糞、蚕尿および蛾尿中の尿酸関連物質 (UA、アラントイン ; AL) の種々の条件下 (通常、ダイエット) での定量検討からその 5 齢期には体液中の UA は代謝が制限され、アラントインとして尿排泄されず体液で一定の値を維持しているという新知見を見出した。

Silkworm strains *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) were fed with fresh mulberries at 23°C ± 3°C until they were used in our experiment. The silkworms used in our experiment were AL age matched (from the 3rd to the 6th day of the fifth instar).



また種々の高尿酸血症治療薬の長期経口投与でも、疑似静注や経腸投与と同様の有効性を確認した。カミツレから調製した CPPG の用量効果反応をモデルマウスと比較し、カイコがよりヒトに近似するプリン代謝系を持ち、代替動物としての有用性も確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 田中龍一郎、森本康之、坂崎文俊、山口昌之、秋澤俊史	4. 巻 16
2. 論文標題 A Novel Lactone-Galactoside from Rhizome of Ephedra sp.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FOOD FUNCTION	6. 最初と最後の頁 2-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中龍一郎、森龍介、村田咲樹、山口昌之、坂崎文俊	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 カミツレ地上部由来、高活性フェノリックスの単離と血中尿酸値低下作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 77-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hikaru Kawakami, Miku Hosoki, Shoji Yamaguchi, Yutaka Banno and Ryuichiro Tanaka	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 A comparison of hyperuricemia model mice loaded with oxonic acid and the silkworm "o06" strain as an alternative for evaluating voluntary oral administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Linz2019-EUSAAT 2019	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryuichiro Tanaka, Nanae Nishikubo, Manato Sakamoto, Fumitoshi Sakazaki, and Yutaka Banno	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Uric acid metabolism and excretion of translucent skin mutants of 5th instar larvae of the silkworm "o06" strain as an animal model of hyperuricemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Linz2019-EUSAAT 2019	6. 最初と最後の頁 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森 龍介、山口 昌之、坂崎 文俊、大塚 正人、田中 龍一郎
2. 発表標題 カミツレ地上部由来フェニルプロパノイド配糖体の血中移行性と高尿酸血症改善作用について
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本 真人、西久保 南苗、山口 昌之、秋澤 俊史、大塚 正人、田中 龍一郎
2. 発表標題 親水性相互クロマトグラフィーを用いた病態モデル血漿中の尿酸関連物質の定量
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中龍一郎、奥山緋奈乃、森 龍介、山口 昌之、大塚 正人、坂崎 文俊
2. 発表標題 カモミール由来、高活性フェノリクス類縁体のXOD阻害活性
3. 学会等名 日本機能性食品医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥山緋奈乃、河合健太郎、大塚正人、田中龍一郎
2. 発表標題 高尿酸血症改善作用フェノリクスのファーマコフォアについて
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本真人、田中美妃、大塚正人、田中龍一郎
2. 発表標題 逆相系ならびにHILICカラムによるプリン塩基及び尿酸の一斉分析法の検討と ヒト血漿を用いた尿酸定量法の検証
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草場俊介、小林直木、大塚正人、田中 龍一郎
2. 発表標題 Klotho産生を指標とする抗老化天然由来成分の探索
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichiro Tanaka, Nanae Nishikubo, Manato Sakamoto, Fumitoshi Sakazaki, and Yutaka Banno
2. 発表標題 Uric acid metabolism and excretion of translucent skin mutants of 5th instar larvae of the silkworm "o06" strain as an animal model of hyperuricemia
3. 学会等名 EUSAAT-congress2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikaru Kawakami, Miku Hosoki, Shoji Yamaguchi, Yutaka Banno and Ryuichiro Tanaka
2. 発表標題 A comparison of hyperuricemia model mice loaded with oxonic acid and the silkworm "o06" strain as an alternative for evaluating voluntary oral
3. 学会等名 EUSAAT-congress2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中龍一郎,西久保南苗, 山口 昌之, 秋澤 俊史
2. 発表標題 血中尿酸低下作用物質の探索 (24) HPLC-UV法による血漿アラントインの定量
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中龍一郎, 森 龍介, 山口 昌之, 村田 咲樹,坂崎 文俊, 伴野 豊, 秋澤 俊史
2. 発表標題 血中尿酸低下作用物質の探索 (25) カミツレ <i>Matricaria chamomilla</i> L. 地上部の高活性フィトケミカルについて (II)
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中龍一郎, 西久保南苗, 細木 美来,坂崎 文俊, 伴野 豊,秋澤 俊史
2. 発表標題 血中尿酸低下作用物質の探索 (26) o06 系統油蚕の5齡期における血中尿酸の代謝と排泄 (II)
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血中尿酸値抑制剤および血中尿酸値抑制用食品	発明者 田中龍一郎、山口昌之	権利者 摂南大学、株）クレハ
産業財産権の種類、番号 特許、2018-223963	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 キサントニンオキシダーゼ阻害薬及びその製造方法	発明者 田中龍一郎、山口昌之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6628204	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

カミツレの葉・茎から高活性フェノリクス抽出 身近なハーブから発見された高尿酸血症改善作用
<https://shindofuji-nippon.com/ventures/1033/>

摂南大学薬学部ラボ ならNo.20
<http://www.setsunan.ac.jp/news/detail.html?id=4569>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 昌之 (Yamaguchi Syouji) (40193586)	摂南大学・薬学部・研究員 (34428)	
研究分担者	伴野 豊 (Banno Yutaka) (50192711)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	坂崎 文俊 (Sakazaki Fumitoshi) (90309378)	大阪大谷大学・薬学部・教授 (34414)	