

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590017
 研究課題名（和文） 植物成分由来新規メタボリックシンドローム治療改善薬の開発研究
 研究課題名（英文） Researches into phytochemicals leading to the improvement of metabolic syndrome
 研究代表者
 三巻 祥浩（MIMAKI YOSHIHIRO）
 東京薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：90229790

研究成果の概要：生薬チョウジ（丁字）ならびにカンゾウ（甘草：*Glycyrrhiza glabra* を基原とするもの）の有機溶媒抽出物について、PPAR α リガンド活性を指標とした成分検索を行い、チョウジよりデヒドロジオイゲノール A、デヒドロジオイゲノール B を、カンゾウよりグラブリジンを活性物質として特定した。チョウジのエタノール抽出物ならびにカンゾウの疎水性フラボノイド画分は、KK-A γ マウスの血糖値上昇を抑制したが、その活性にはこれら PPAR α リガンド活性物質が深く関与しているものと考えられる。さらに、カショウ（花椒：*Zanthoxylum bungeanum* の成熟果皮）のエタノール抽出物より 6 種のアミド化合物を単離し、構造を明らかにした。これらアミド化合物は期待に反し PPAR α リガンド活性を示さなかったが、特異な苦味を有し、さらに 6 種のうち 3 種の化合物は文献未記載の新規化合物であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：メタボリックシンドローム、PPAR α リガンド活性、チョウジ、カンゾウ、カショウ、デヒドロジオイゲノール A、デヒドロジオイゲノール B、グラブリジン

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームとは、インスリン抵抗性を基盤に、高血圧症、肥満、脂質代謝異常、耐糖能異常といった動脈硬化因子が 3 種以上集積した病態のことをいい、2001 年に米国のコレステロール教育プログラムの第三次成人管理基準（NCEP-ATP III）

で提唱されたものである。本邦において、NCEP-ATP III の定義に基づき危険因子の集積を調べたところ、男性の約 25% にメタボリックシンドロームが認められたという報告がある。さらに、一つひとつの異常は軽度であってもメタボリックシンドロームを有する群では、有さない群に比べて脳心血管イベ

ントの発生率が有意に高いことも明らかとなっている。すなわち、悪性腫瘍とならんで日本人の死亡原因の約 30% を占める虚血性脳心疾患の原因とされる動脈硬化発症の基盤には、マルチプルリスクファクターであるメタボリックシンドロームがあり、その予防、改善、治療は高齢化社会での各個人の QOL を高めるとともに、増大し続けている高齢者医療費削減へと繋がるものと考えられる。事実、厚生科学審議会地域保険健康増進栄養部会の生活習慣病対策の推進に関する中間取りまとめ案（2005 年 9 月）や健康フロンティア戦略でもメタボリックシンドロームの概念が導入され、ハイリスク群への積極的な対策が求められている。

(2) 天然由来の PPAR α リガンド活性物質として、15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ や Δ^{12} -プロスタグランジン J₂ などのアラキドン酸代謝物、 Δ^{-3} 多価不飽和脂肪酸、 Δ^{-7} -リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの不飽和脂肪酸、9-ヒドロキシオクタデカジエン酸や 13-ヒドロキシオクタデカジエン酸などのエイコサノイド類などが知られている。

また、フラボン誘導体であるクリシンおよびアピゲニン、フラボノール誘導体であるケンフェロールが PPAR α リガンドであることが報告されている。しかしながら、申請者による最近のカンゾウ（甘草：*Glycyrrhiza uralensis* を基原とするもの）やウコン（鬱金）の PPAR α リガンド活性物質に関する研究以外は、PPAR α リガンド活性を指標に生薬・植物成分の検索を行った例はない。

2. 研究の目的

(1) メタボリックシンドロームの基盤となるインスリン抵抗性を改善する作用のある化合物を、ハーブ類やスパイス類、生薬・薬用植物に着目し、PPAR α リガンド活性を指標に活性物質の単離を試みる。得られた活性物質の化学構造を明らかにし、構造活性相関について検討するとともに病態動物モデルでの評価を行い、植物成分由来新規メタボリックシンドローム治療改善薬の開発に繋げる。

(2) カンゾウ（甘草：*Glycyrrhiza uralensis* を基原とするもの）抽出物について PPAR α リガンド活性を指標とした成分検索を行い、活性画分より 1 種の新規化合物を含む計 24 種の化合物を単離し、高分解能 NMR スペクトルを中心としたスペクトル解析によりそれらの構造を明らかにした。単離された化

合物それぞれの PPAR α リガンド活性強度とその含有率より、6 種の低分子フェノール性化合物が抽出物全体の活性に大きく寄与していることと活性発現に必要な基本構造を明らかにした。さらに、抽出物より高収率で得られた PPAR α リガンド活性物質グリシリンは KK-A γ マウスに対し、合成 PPAR α リガンドであるピオグリタゾンと同様有意に血糖値上昇抑制効果を示すことを見出した。また、ウコン抽出物とその主芳香族化合物のクルクミン類や ar-ターメロンにも同様の効果を確認した。カンゾウとウコンの研究で確立した研究手法のノウハウを、伝承的背景をもつ多くの生薬・植物素材に適用することで、天然よりさらに活性が強く、有効性の高い化合物の発見へと研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) 生薬・植物素材抽出物に含まれる PPAR α リガンド活性物質の探索：生薬・植物素材抽出物を、ポリスチレン系多孔質樹脂であるダイアイオン HP-20（三菱化学社製）を充填したカラムに付し、順次溶媒の極性を下げながら溶出させる。各溶出画分の PPAR α リガンド活性を評価し、活性が認められた場合はさらに PPAR α リガンド活性を指標に、シリカゲルあるいは RP-18 シリカゲルを充填したカラムクロマト、分取 HPLC を繰り返すことにより、活性物質の分離・精製を行う。得られた活性物質について、NMR を中心としたスペクトル解析（1D TOCSY スペクトル、¹H-¹H COSY、DQF-COSY、2D-TOCSY、HSQC、HSQC-TOCSY、HMBC、NOESY、ROESY スペクトル）および化学的手法により、立体構造を含めた全構造を明らかにする。

(2) PPAR α リガンド活性試験：CV-1 細胞（雄性アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞）を 96 穴培養プレートに 6 x 10³ cells/well になるように播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養する。培地には、10% FBS（ウシ胎仔血清）、10 mL/L ペニシリン・ストレプトマイシン溶液（それぞれ 5000 IU/mL、5000 μ g/mL）、37 mg/L アスコルビン酸を含む DMEM を用いる。細胞を OPTI-MEM で洗浄した後、pM-PPAR α と 4 x UASg-luc を、リポポリフェクトアミン・プラスを用いてトランスフェクションする。pM-PPAR α は、哺乳類発現プラスミドである pM に、酵母由来転写因子 GAL4 遺伝子（アミノ酸配列 1-147）とヒト PPAR α リガンド結合部位遺伝子（アミノ酸配列 174-475）を結合させたキメラタンパクの遺伝子を挿入したプラスミドである。また、4 x UASg-luc はルシフェラーゼ遺伝子の上流

に GAL4 の応答配列 (UASg) を 4 回組み込んだレポーター・プラスミドである。トランスフェクションの約 24 時間後、サンプルを含む培地に交換し ($n = 4$)、24 時間培養する。なお、サンプルはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地に 1/1000 量添加する (無処置対照には DMSO のみを添加する)。細胞を Ca、Mg 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS+) で洗浄した後、ルックライトを添加し、トップカウント・マイクロプレートシンチレーション/ルミネッセンスカウンターにてルシフェラーゼの発光量を測定する。コントロール群には pM のみをトランスフェクションした細胞を用いる。サンプル添加群とコントロール群の発光強度の平均値 ($n = 4$) の比 (サンプル添加群/コントロール群) を算出し、その値の無処置対照群に対する比活性をサンプルの PPAR- α リガンド活性とする。生薬・植物素材抽出物については、30 μ g/mL における抽出物の発光量がトログリタゾン (TRG) 0.5 μ M における発光量よりも強い場合に活性ありと評価する。

(3) 血糖値上昇抑制活性に関する実験：自然発症型糖尿病マウス (KK-A^y マウス、雌性、5 週齢) を 1 群 6 匹、3 群に分け、各群にそれぞれ粉末飼料、生薬・植物素材抽出物配合粉末飼料、ポジティブコントロール配合粉末飼料を与えて 3-4 週間飼育 (飼料および水道水を自由摂取) する。尾静脈から血液を採取して血糖値を測定する。

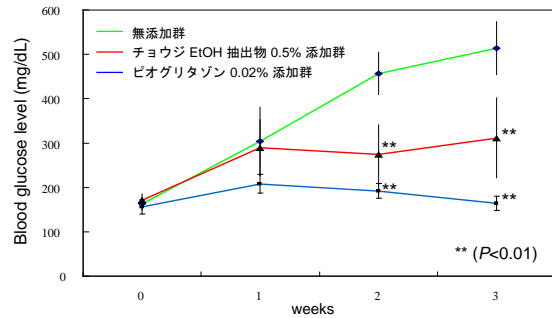
(4) 内臓脂肪減少効果に関する実験：C57BL/6J マウス (雌性) を高脂肪飼料で 6 週間飼育 (飼料および水道水を自由摂取) 後、1 群 7 匹、2 群に分け、各群をそれぞれ粉末 CE-2 飼料、生薬・植物素材抽出物配合粉末 CE-2 飼料を与えて 4 週間飼育 (飼料および水道水を自由摂取) する。一晩絶食したマウスをエーテル麻酔下で開腹後、腎臓周辺脂肪、子宮周辺脂肪および腸間膜周辺脂肪を摘出し、重量を測定する。この 3 種の脂肪の和を腹腔内脂肪量として評価する。

4. 研究成果

(1) KK-A^y マウスに生薬チョウジのエタノール抽出エキスを 0.5% 添加した飼料を 3 週間自由摂取させたところ、血糖値の上昇を有意に抑制した。また、高脂肪食により 6 週間飼育した C57BL/6J マウスにチョウジのエタノール抽出エキスを 1% 添加した飼料を 4 週間自由摂取させたところ、体重あたりの腹腔内脂肪量 (%) は通常飼料を摂取した対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) に低下した (対照群：1.73 \pm 0.73%，チョウジ添加群：0.79 \pm

0.15%)。チョウジエタノール抽出エキスを、ダイアイオン HP-20 を充填したカラムに付し、30% メタノール、50% メタノール、80% メタノール、メタノール、エタノール、酢酸エチルで

チョウジエタノール抽出エキスの血糖値ト



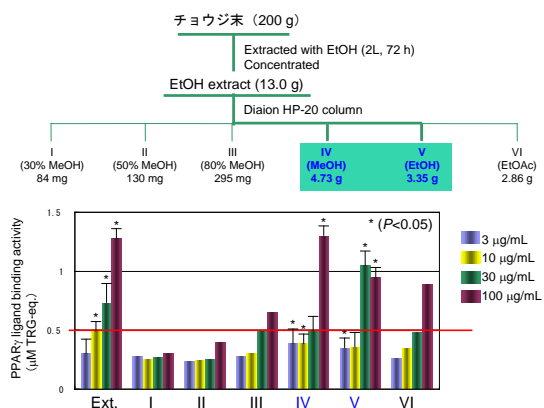
チョウジエタノール抽出エキスの内臓脂肪減少効果

($n = 8$ 群, Mean \pm SD)	摂食量 (g/日/匹)	給餌後体重 (g)	体重当たり腹腔内脂肪 (%)
無添加群 (対照群)	3.17 \pm 0.43	22.9 \pm 1.5	1.76 \pm 0.73
1% チョウジ抽出物添加群	2.55 \pm 0.53	21.7 \pm 0.6	0.79 \pm 0.15 *

* ($P < 0.05$)

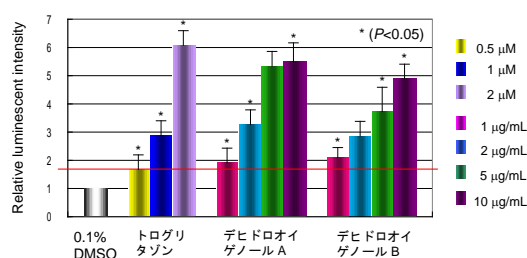
順次極性を下げながら溶出させた。各画分について、PPAR- α リガンド活性を測定したところ、メタノールおよびエタノール溶出画分に強い活性が認められた (それぞれ 30 μ g/mL における比発光強度は、0.5 μ M トログリタゾンにおける強度と同等かそれ以上であった)。

チョウジエタノール抽出エキスの分画と PPAR- α リガンド活性

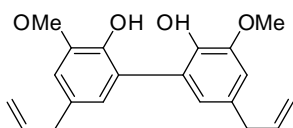


そこで、メタノールおよびエタノール溶出画分について、順相および逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC により分離・精製を行ったところ、フェニルプロパノイドのオイゲノール、リグナンのデヒドロジオイゲノール A とデヒドロジオイゲノール B、セスキテルペノイドの 6,7-エポキシ-3(15)-カリオフィレン、植物ステロールの β -シトステロールとそのモノグルコシド、トリテルペノイドのオレアノール酸、ベツリン酸、マスリン酸、 2α -ヒドロキシウルソール酸、アルジュノール酸、アジアテック酸が単離された。これら化合物の PPAR α リガンド活性を測定した結果、デヒドロジオイゲノール A とデヒドロジオイゲノール B に有意な活性が認められた。

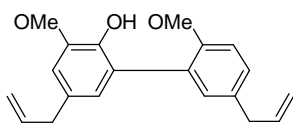
デヒドロジオイゲノール A とデヒドロジオイゲノール B の PPAR α リガンド活性



ヒドロジオイゲノール A とデヒドロジオイゲノール B の化学構造



ヒドロジオイゲノール A

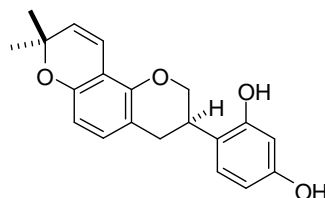


デヒドロジオイゲノール B

(2) *Glycyrrhiza glabra* の根およびストロン（日本薬局方カンゾウの基原植物の 1 つ）の有機溶媒抽出物が PPAR α リガンド活性を示したことから、活性本体の同定を試みるとともに、*G. glabra* のフェノール性化合物（疎水性フラボノイド類）を高い含有率で含

む抽出物 (LFO) の高脂肪食摂取 KK-A y マウスに対する抗高血糖効果について検討した。*G. glabra* の根およびストロン（乾燥粉末 4 kg）を 95% エタノールで抽出した。得られた粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトにより 4 個の画分に分画した (G-A、G-B、G-C、G-D)。これらの PPAR α リガンド活性を評価したところ、一番極性の低い G-A 画分に最も強い活性が認められたことから、同画分について順相および逆相シリカゲルカラムクロマト、逆相分取 HPLC にて繰り返し精製を行い、30 種に及ぶフラボノイドならびにフラボノイド関連物質を単離した。単離された化合物の収量と PPAR α リガンド活性試験の結果から、イソフラバン誘導体であるグラブリジンが *G. glabra* 抽出物の活性本体であることが明らかとなった。次に、LFO の高脂肪食摂取 KK-A y マウスに対する抗高血糖効果を検討した。0% (コントロール)、1.0%、2.0% の LFO を添加した高脂肪食を雌性 KK-A y マウス (6 週齢) に 4 週間自由摂取させた。1 週間ごとに 4 週目まで尾静脈より血液を採取し、血糖値を測定したところ、LFO 添加群はコントロール群に比べ、用量依存的に有意な血糖値上昇抑制効果を示した。

グラブリジンの化学構造



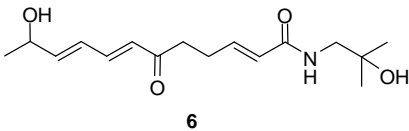
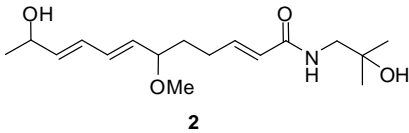
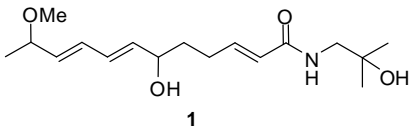
(3) カシヨウのエタノール抽出エキスに、PPAR α リガンド活性ならびに α 3 アドレナリン受容体アゴニスト活性が確認されたことから、活性成分の探索を行った。カシヨウの粉末約 700 g をエタノールにて冷浸した。冷浸抽出液を減圧下濃縮し、エタノール粗抽出物約 100 g を得た。エタノール粗抽出物を、ダイアイオン HP-20 を充填したカラムに付し、30% メタノール、50% メタノール、80% メタノール、メタノール、エタノール、酢酸エチル (各 2 L) で順次溶出させ、6 画分に分画した。50% メタノール溶出画分に PPAR α リガンド活性ならびに α 3 アドレナリン受容体アゴニスト活性が認められたことから、同画分について順相および逆相シリカゲルカラムクロマト、逆相分取 HPLC にて繰り返し精製を行い、6 種の化合物を以下

の収量で単離した。

化合物 **1**: 38.2 mg ; 化合物 **2**: 16.7 mg ; 化合物 **3**: 18.4 mg ; 化合物 **4**: 19.7 mg ; 化合物 **5**: 28.8 mg ; 化合物 **6**: 15.6 mg)

化合物 **1-6** について、マススペクトル、NMR (^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC、NOESY) スペクトルを中心とした機器分析により構造決定を行ったところ、化合物 **1**、**2**、**6** は文献未記載の新規アミド系化合物であることが明らかとなった。化合物 **1-6** の PPAR α リガンド活性ならびに α -3 アドレナリン受容体アゴニスト活性を評価したが、期待した活性は認められなかった。しかしながら、これらアミド化合物は、サンショウの辛味成分のサンショオールと構造が類似しているにもかかわらず辛味を示さず、特異な苦味を示しことは大変興味深い。

新規化合物 **1**、**2**、**6** の化学構造



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 三卷祥浩、天然素材からの新規機能性成分の探索、日本香粧品学会誌、**30**、256-260 (2006)、査読なし

[学会発表] (計 2 件)

① 黒田明平、三卷祥浩、甘草 (*Glycyrrhiza*

glabra L.) からのペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) α リガンド活性成分の探索と KK-A ν マウスに対する抗糖尿病活性、第 4 回甘草に関するシンポジウム、平成 20 年 6 月 28 日、大阪

② 黒田明平、三卷祥浩 他 4 名、甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 抽出物の PPAR α リガンド活性成分の探索と抗糖尿活性、第 49 回天然有機化合物討論会、平成 19 年 9 月 19 日、札幌

[図書] (計 1 件)

① 黒田明平、三卷祥浩、シーエムシー出版、薬用食品の開発 - 薬用・有用植物の機能性食品素材への応用 -、2007 年、pp. 92-102

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三卷 祥浩 (MIMAKI YOSHIHIRO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90229790

(2) 研究分担者

黒田 明平 (KURODA MINPEI)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80266890

横須賀 章人 (YOKOSUKA AKIHITO)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20318190