

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19590024
 研究課題名 (和文) 薬食同源の視点から香辛料食品を素材とした生活習慣病の予防、治療成分の開拓
 研究課題名 (英文) Development for preventive and therapeutic constituents on lifestyle diseases from spices.
 研究代表者
 吉川 雅之 (YOSHIKAWA MASAYUKI)
 京都薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：90116129

研究成果の概要：

本研究では、薬食同源の視点から薬効が伝承されている天然薬物の中から香辛料食品に焦点を絞り、新規機能性成分の開拓を行った。この研究過程で、特にローズヒップ (*Rosa canina*) やナガコショウ (*Piper chaba*, 果実) の含有成分に強い抗肥満作用・抗糖尿病を有することを見いだすとともに、活性発現のための必須構造および作用機序の一部を明らかにした。また、種々の香辛料食品から新規機能性成分を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：香辛料食品，伝承薬物，薬食同源，生活習慣病，抗肥満作用，抗糖尿病作用，作用機序，新規機能性成分

1. 研究開始当初の背景

現代社会において、動物性食品の摂取増加あるいは偏食や過剰栄養などから、欧米諸国のみならず全世界的に糖尿病や高脂血症などの生活習慣病が深刻さを増している。糖尿病をはじめとした生活習慣病の最も認知されているリスクファクターとして肥満症があり、糖尿病および肥満症の治療や予防に対する社会のニーズは高い。また、近年、花粉症などのアレルギー性疾患は増加の一途をた

どり、糖尿病のみならずアレルギー性疾患もまた日本の国民病と言っても過言ではない。これらの生活習慣病やアレルギーの予防や治療には長期連用に耐えうる副作用の全くない安全な医薬品の開発が必要とされている。

香辛料食品の含有成分に関してはこれまでに数多くの成分研究が報告されてきたが、ウコンに含まれる **curcumin**，チョウジに含まれる **eugenol**，唐辛子の **capsaicin** など一部の

成分を除き、それらの薬理学的研究は十分ではない。特に、抗糖尿病・抗肥満作用成分および抗アレルギー作用成分に関する研究はほとんど見られない。また、最近では、韓国、中国、台湾では国家プロジェクトとして、天然薬物の有効成分の解明と医薬リード化合物の開拓が積極的に進められており、欧米においてもハーブ類の科学的研究が注目されている。

一方、申請者らは薬食同源の視点から、これまでに糖尿病に有効と伝承され、食経験のある天然薬物素材について、ラット糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用試験によるスクリーニング結果を基盤として生物活性物質の探索を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、薬食同源の視点から研究対象とする薬用資源として、医学体系が確立されている中国や東南アジアの伝統医学やインドのアーユル・ヴェーダ医学、ユナニー医学などにおいて薬効が伝承されている天然薬物の中から香辛料食品に焦点を絞り、*in vitro* や *in vivo* 系アッセイを組み合わせた評価系を構築応用して、(1) 抗糖尿病・抗肥満作用成分 (2) 抗炎症・抗アレルギー作用成分 (3) 胃粘膜保護作用成分 (4) 肝保護作用成分を探索、解明することによって新規機能性成分の開拓を行う。特に、抗糖尿病・抗肥満作用成分の探索には効率の良い評価システムを構築して実施する。さらに、発見した活性物質から化学修飾した誘導体や関連化合物の活性を比較検討して、活性発現の必須構造などの構造と活性相関を解析するとともに、顕著な活性を示す化合物については、その作用メカニズムを解明することによって医薬品のリード化合物あるいはリード化合物の開発を目指す。

本研究の特色は、*in vitro* および *in vivo* 系アッセイを中心とした評価法を構築して、食経験が永く高い安全性が期待でき、かつ薬効が確実な香辛料食品に着目して生活習慣病の予防や治療効果のある天然物質を効率よく開拓することである。また、申請者らは、同じ研究室内で化学と薬理学の両面から密接に連携して研究を遂行しており、資源調査、活性物質の探索、構造決定と薬効解明、構造と活性相関、作用メカニズム解析、化学合成を同一研究室内で効率良く遂行する点に特長があると言える。

3. 研究の方法

(1) 香辛料食品のうち、強壯、止渴、制痒、解毒および健胃が伝承されているショウガ科、シソ科、マメ科、ウコギ科植物を基源とするもの約 100 種類を厳選し、エキスの作製を行

い、*in vivo* および *in vitro* でのバイオアッセイを実施し、有望な香辛料食品の選別を行う。

(2) 活性の見出されたエキスについて、引き続きバイオアッセイ結果を指標に各種クロマトグラフィーを用いて活性成分の単離を行い、高分解能 NMR, MS などの詳細な解析や化学誘導によって化学構造の解明を行う。さらに、顕著な活性を示す物質については、化学修飾後に活性試験を行い、活性発現の必須構造の解明を試みる。

(3) 医薬シーズとして有望な化合物については各種阻害剤で前処理した実験動物や培養細胞、cDNA マイクロアレイシステムによる網羅的遺伝子発現の解析結果から新規機能性および作用機序の解明を試みる。

(4) 有望な化合物の構造-活性相関に関する情報から、低分子プローブの作製を試みる。低分子プローブの作製にはアジド基などのような光親和性官能基を有する蛍光プローブを活性化合物に導入または放射性同位体で標識した活性化合物の設計と創製を試みる。

4. 研究成果

当研究室が保有する香辛料食品のバイオアッセイを実施し、有効な抗糖尿病・抗肥満作用、抗炎症・抗アレルギー作用、胃粘膜保護成分を探索した。この研究過程で、特にローズヒップ (*Rosa canina*) やナガコショウ (*Piper chaba*, 果実) の含有成分に強い抗肥満作用・抗糖尿病を有することを見いだすとともに、活性発現のための必須構造および作用機序の一部を明らかにした。また、種々の香辛料食品から新規機能性成分を見いだした。

(1) ローズヒップは近年、主にビタミンCの含有量の多さから、茶剤、清涼飲料水や機能性食品を中心に利用が増加している素材である。私たちは、ローズヒップ抽出物のマウスへの投与が体重増加および副睾丸脂肪重量を低下させることを見いだした。さらに、果実全体、果皮および種子から得られた抽出物の活性を比較した結果、体重増加抑制活性は種子に集約していることが判明した。そこで、種子中に含まれる成分を精査した結果、*trans*-tiliroside (1), buddlenoid A および B, dihydrodiconiferyl alcohol および ulolignoside の 6 種の化合物を単離同定した。主成分として得られた *trans*-tiliroside (1) の連投時 (0.1-10 mg/kg/day, p.o.) における体重増加および内臓脂肪蓄積等への影響について、マウスを用いて検討した。すなわち、成熟した雄性マウス (ddY, 11w) への *trans*-tiliroside (1) の14日間の投与 (0.1-10 mg/kg/day, p.o.) によ

り、マウスの体重推移、食餌量、内臓脂肪重量および耐糖能に与える影響について検討した。その結果、**1** は、低用量 (0.1 mg/kg/day) から有意に体重増加を抑制することおよび肝臓中の中性脂肪 (TG) 含量を低下させるとともに内臓脂肪重量 (副睾丸+腸間膜+腎周囲脂肪) についても有意に減少することが観察された。さらに、**1** を 14 日間投与した後に耐糖能試験 (glucose 1 g/kg, i.p.) を行った結果、**1** の投与は、空腹時血糖値に対しては影響を与えなかったが、糖負荷時の血糖値の推移を有意に低下させることが判明した。そこで、*trans*-tiliroside (**1**) の構造で、活性発現に必須な構造を明らかにする目的で、**1** を構成する部分構造、即ち kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**), kaempferol (**3**), および *p*-coumaric acid (**4**) (Fig. 1) における抗肥満作用を比較検討した。その結果、**3** および **4** では活性が認められなかったのに対し、**2** では有意ではないが、体重増加と内臓脂肪重量の低下傾向が観察された。

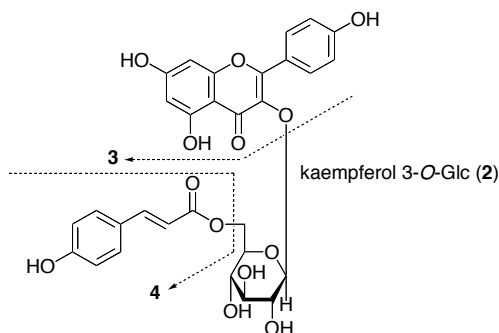


Fig. 1. Chemical Structures of *trans*-Tiliroside (**1**) and Related Compounds

これらの結果より、**1** の強い抗肥満活性の発現には、**2** に結合する *p*-coumaroyl 基の存在が重要であることが明らかとなった。次に、**1** の作用機序を明らかにする目的で、**1** の投与 (10–100 mg/kg, p.o.) 24 時間後における肝臓および副睾丸脂肪組織での糖および脂質代謝関連遺伝子の発現について検討した。その結果、いずれも 10 mg/kg の単回投与で肝臓中 PPAR α および CPT II, 副睾丸脂肪中 adiponectin および PPAR γ mRNA の発現亢進が観察された。以上の結果から、ローズヒップの *trans*-tiliroside (**1**) は肥満予防物質のシーズとして有用と思われる。

(2) コショウ科植物 *Piper chaba* Hunter (syn. *P. retrofractum* Vahl., Piperaceae) は東南アジアに分布するコショウ科の植物であり、タイではその果実は Dee Plee と称され、タイの伝統医学において駆風薬、去痰薬、鎮咳薬、抗真菌薬、避妊薬、鎮静催眠薬、食欲増進薬

として用いられている。

一方、最近、troglitazone や pioglitazone などのチアゾリジン誘導体は核内受容体 PPAR γ のアゴニストで、主に脂肪細胞における PPAR γ に作用することによってインスリン抵抗性を改善すると考えられており、特に、血中アジポネクチン濃度を上昇させ、これが糖代謝異常の改善に繋がっていることが明らかとなっている。申請者は、PPAR γ アゴニストが脂肪前駆細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化を促進しアジポネクチンの産生を増加させることに着目し、*P. chaba* (果実) 含有成分について、3T3-L1 細胞における細胞内の中性脂質 (TG) の蓄積を分化の指標として検討したところ 3,4-methylenedioxyphenyl 基と *N*-isobutyl 基から構成されるアミド類、retrofractamide A (**5**), B, C および piperlonguminin に活性を認めた (Fig. 2)。

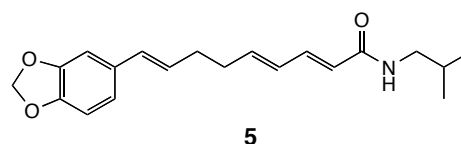


Fig. 2. Chemical Structure of Retrofractamide A (**5**)

特に、**5** は低濃度 (1 μ M) から活性を示した。次に、retrofractamide A (**5**) について、アジポネクチン産生・遊離に及ぼす影響について検討する目的で、メディウム中のアジポネクチン濃度の測定を行ったところ、濃度依存的な増加が観察された。さらに、定量 RT-PCR によって遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、アジポネクチン、PPAR γ 2 および GLUT4 mRNA などの発現を有意に増加させることが判明した。また、³H-2-deoxyglucose の取込量に及ぼす影響を調べたところ、濃度依存的な増加が認められた。また、Nuclear Receptor Cofactor Assay 法を用いて受容体レベルでのアゴニスト活性を検討したところ、比較対照薬である troglitazone とは異なり、**5** および **6** は受容体レベルでのアゴニスト活性を示さなかった。以上の結果から、retrofractamide A (**5**) は、troglitazone などの PPAR γ アゴニストとは異なった作用機序を有する抗糖尿病薬シーズとして有望であると考えられる。加えて、*Piper chaba* のアミド成分が肝保護作用を有することも明らかにした。

(3) その他、① 香辛料の西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) から得られるイソチオシアネート類に胃粘膜保護作用を見いだした。② タイ産香辛料 *Curcuma comosa* (根茎) から得られるセスキテルペン類に抗腫瘍壊

死因子 α (TNF- α) 活性を見いだした。③タイ産香辛料 *Zingiber cassumunar* (根茎) にごん浸潤抑制および NO 産生抑制活性を見いだした。④フェニルプロパノイド 1'S-1'-acetoxychavicol acetate の低分子プローブの創製を試みた。

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 6 件)

- ① Fengming Xu, Seikou Nakamura, Yang Qu, Hisashi Matsuda, Yutana Pongpiriyadacha, Lijun Wu, Masayuki Yoshikawa: Structures of new sesquiterpenes from *Curcuma comosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1710–1716 (2008).
- ② Seikou Nakamura, Yang Qu, Fengming Xu, Hisashi Matsuda, Masayuki Yoshikawa: Structures of new monoterpenes from Thai herbal medicine *Curcuma comosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1604–1606 (2008).
- ③ Hailong Zhang, Hisashi Matsuda, Seikou Nakamura, Masayuki Yoshikawa: Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3272–3277 (2008).
- ④ Hisashi Matsuda, Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Daisuke Yasuda, Itadaki Yamaguchi, Masayuki Yoshikawa: Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF- α -induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2038–2042 (2008).
- ⑤ Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Mizuho Kubo, Toshio Morikawa, Norihisa Nishida, Masayuki Yoshikawa: Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: Structural requirements and mode of action of *trans*-tiliroside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3059–3064 (2007).
- ⑥ Hisashi Matsuda, Momotaro Ochi, Akifumi Nagatomo, Masayuki Yoshikawa: Effects of allyl isothiocyanate from horseradish on several experimental gastric lesions in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **561**, 172–181 (2007).

上記の論文はすべて査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中村誠宏, 許鳳鳴, 浅尾恭伸, 李雪征, 中嶋聡一, 石見純子, 若山広子, 松田久司, 吉川雅之: タイ産ショウガ科植物のがん浸潤抑制および抗炎症活性成分 -*Zingiber cassumunar*, *Curcuma comosa*, *Curcuma zedoaria*-。第 17 回天然薬物の開発と応

用シンポジウム, 2008 年 11 月 14 日, 九州大学医学部百年講堂 (福岡市)。

- ② Masayuki Yoshikawa, Hisashi Matsuda: Antiobese and Gastroprotective Constituents from Several Spices. International Conference on Food Factors for Health Promotion -ICoFF2007-, 2007 年 11 月 29 日, 京都国際会館 (京都市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 雅之 (YOSHIKAWA MASAYUKI)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90116129

(2) 研究分担者

松田 久司 (MATSUDA HISASHI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40288593
中村 誠宏 (NAKAMURA SEIKOU)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 20411035