

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510240

研究課題名（和文）アーユルヴェーダ生薬からPPARの発現制御を指標とした生活習慣病改善物質の探索

研究課題名（英文）Search for effective constituents for life-style related diseases through expression of PPAR

研究代表者

松田 久司（MATSUDA HISASHI）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40288593

研究成果の概要（和文）：インドのアーユルヴェーダ生薬を探索資源とし、糖尿病や肥満などの生活習慣病の改善を目的とした核内受容型転写因子のひとつであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）の発現を制御する物質の探索を行った。脂肪前駆細胞（3T3-L1細胞）を用いた脂肪細胞への分化促進作用や脂肪酸のβ酸化による肝細胞中の中性脂質量の減少を指標にPPAR γ および α アゴニスト様物質探索のための候補となる薬用植物の選別を行った。それらの中で、インドのみならず東南アジアで薬用として用いられているショウガ科植物*Kaempferia parviflora*（根茎）、ハス科植物ハス（*Nelumbo nucifera*）花部に強いPPAR γ アゴニスト様作用を見出した。種々のカラムクロマトグラフィーおよび分取HPLCを用いて有効成分の単離を行い、活性成分としてメトキシフラボノール類やアボルフィン型アルカロイド類を見出した。メトキシフラボノール類については関連フラボノイド44種の結果から構造活性相関に関する知見を得るとともに、受容体レベルでのアゴニスト作用は認められなかったがPPAR γ mRNAの発現亢進を確認した。さらに、C/EBP α および β の発現亢進などその作用機序に関する知見を得た。その他、ナガコショウの一種*Piper chaba*に含まれるpiperlonguminineやretrofractamide AにPPAR γ 2 mRNAの発現亢進を確認すると共に、経口投与後の薬物動態およびretrofractamide A誘導体の合成を行い、より有望な物質の開拓を進めた。

研究成果の概要（英文）：We mainly focused on Ayurvedic traditional medicine and have researched the active constituents for therapeutics of life-style related diseases through expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). As the results, the extracts and the constituents from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*, flower of *Nelumbo nucifera*, and amide constituents from the fruit of *Piper chaba*, which are cultivated in India as well as southeast Asia, were found to show PPAR γ agonist-like effects in 3T3-L1 adipocytes. The active constituents, 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavonol, *N*-normuciferine, piperlonguminine, and their derivatives showed enhancement of PPAR γ 2, C/EBP α and β mRNA, although they had less agonistic activity at PPAR γ levels. Furthermore, plasma concentrations were determined after administration of piperlonguminine and retrofractamide A in mice, together with synthesis of retrofractamide A and its derivatives to find more effective constituents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：アーユルヴェェーダ生薬、PPAR、メトキシフラボノール、アポルフィン型アルカロイド

1. 研究開始当初の背景

近年、豊かな食生活の中で、動物性食品の増加、偏食や過剰栄養も手伝って、欧米諸国をはじめ日本においても糖尿病、高血圧などの生活習慣病などが深刻さを増しており、植物性食品を中心とした食事療法が必要と言われている。その中で、糖尿病にはインスリン依存型（1型）と非依存型（2型）があり、日本では2型糖尿病が多くを占め、最近の調査では、日本人の約1割が発病またはその予備軍と言われており、特に肥満者が糖尿病になる確率が非常に高いことが知られている。現在、インスリン製剤以外の経口抗糖尿病薬として、膵臓のβ細胞を刺激し、インスリンの分泌を促す薬物（トルブタミドなど）、消化管からの糖質の吸収を抑制することによって食後の過血糖を改善するα-グルコシダーゼ阻害薬（ボグリボースなど）の他、インスリン感受性改善薬として主として肝臓での糖新生を抑制するビグアナイド系薬物（メトホルミンなど）や末梢での糖利用を促進するチアゾリジン系薬物（ピオグリタゾンなど）が臨床応用されているが、これらの薬剤は長期服用が必要なため、より有効性が高く、安全性の高い薬物が常に求められている。

私たちは、これまでに、甘茶成分hydrangenolやhydrangeic acidおよびナガコシヨウのアミド成分retrofractamide Aはピオグリタゾンと類似し、*in vitro*試験でアジポネクチンの産生を促し、hydrangenolやhydrangeic acidは2型糖尿病マウス（KK-A^yマウス）で血糖降下作用を示すことを報告した。核内受容体型転写因子の中でペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体（PPAR）は、脂質・糖代謝に関わる核内受容体であり、α、γ、δの3種類のサブタイプが知られている。高脂血症治療薬のフィブラート系薬剤クロフィブラートやフェノフィブラートはPPARαアゴニストであり、インスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン誘導体（ピオグリタゾンやロジグリタゾン）はPPARγアゴニストとして作用していることが明らかとなっている。しかし、フィブラート類はPPARαに対する親和性やサブタイプ選択性が低く、またチアゾリジン誘導体には肥満、心臓浮腫、肝障害などの副作用が知られている。

一方、申請者らは、抗肥満作用を示すアシル化フラボノール配糖体tilirosideの作用メカニズムについて検討した結果、PPARαの発現を亢進し、これによって脂肪酸のβ酸化が促進されることを見出した。さらに、定量

RT-PCRを用いたhydrangenol、hydrangeic acidの遺伝子発現解析の結果、アディポネクチンの発現促進のみならず、PPARγの発現そのものを濃度依存的に亢進させていることを明らかにした。しかし、レセプターアッセイの結果からtilirosideはPPARαとの親和性は弱いものであり、hydrangenolにおいてもPPARγとの親和性は認められなかった。これらの結果から、受容体そのものの発現を亢進させる物質の探索もまた、糖尿病などの生活習慣病を改善する薬物の開発につながると考えられるに至った。これまでPPARを分子標的とした生活習慣病治療薬の開発研究は活発に行われており、様々なタイプの化合物が創製されている。しかし、いずれもアゴニストまたはアンタゴニストとしての開発であり、核内受容体型転写因子であるPPARそのものの発現を介した薬物の探索例はなかった。

2. 研究の目的

インドのアーユルヴェェーダ医学において肥満、糖尿病、動脈硬化などに有効と解釈される薬効が伝承され、食経験があるなど安全性が確立している薬用植物を探索資源とし、PPARなどの核内受容型転写因子の発現を制御する物質を探索する。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その作用メカニズムを解明することによって新しい抗肥満・抗糖尿病薬開発のためのリード化合物あるいはリード化合物の発見を行う。

3. 研究の方法

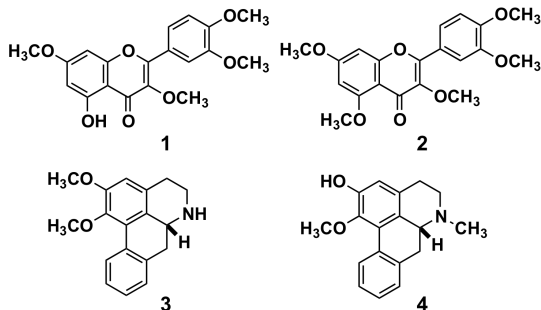
インドのアーユルヴェェーダ医学における伝統医学において抗肥満、抗糖尿病、抗動脈硬化と解釈される薬効が伝承され、食経験があるなど安全性が確立している薬用植物50種を厳選し、探索資源とした。

(1) 核内受容型転写因子PPARγおよびPPARαのアゴニスト様物質の探索には脂肪前駆細胞3T3-L1細胞の分化促進作用や培養肝細胞における中性脂質の減少を指標とし、種々のカラムクロマトグラフィーおよび分取HPLCを用いて活性成分の単離を行った。得られた化合物について、NMRを中心とした各種分析機器（FT-IR、旋光度、UV測定器、CD測定器、EI-MS、FAB-MSなど）により構造解析を行った。

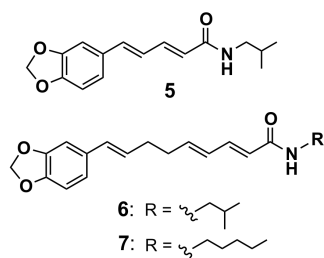
(2) 次に、RT-PCR 法を用いて PPAR γ および PPAR α mRNA の発現量を増加させる化合物の選別を行うとともに活性成分について構造活性相関を明らかにした。関連遺伝子発現や情報伝達系への影響についての検討を行い、hydrangenol および retrofractamide A については cDNA マイクロアレイによる解析およびビオチン標識化合物を用いて標的タンパク質の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) アーユルヴェーダのみならず、東南アジアで薬用として用いられているショウガ科植物 *Kaempferia parviflora* (根茎) エキスおよびハス科植物ハス (*Nelumbo nucifera*) 花部エキスを強い PPAR γ アゴニスト様作用を見出した。種々のカラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いて有効成分の単離を行い、活性成分としてメトキシフラボノール類 [3,7,3',4'-tetramethoxy-flavonol (1), 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavonol (2)] やアポルフィン型アルカロイド類 [*N*-normuciferin (3)、*N*-methylasimilobine (4)] を見出した。メトキシフラボノール類については関連フラボノイド 44 種の結果から構造活性相関に関する知見を得るとともに、受容体レベルでのアゴニスト作用は認められなかったが PPAR γ 2 mRNA の発現亢進を確認した。さらに、PPAR γ 2 発現を促す C/EBP α および β の発現亢進などその作用機序に関する知見を得た。



(2) ナガコシヨウの一種 *Piper chaba* の活性成分 piperlonguminine (5) や retrofractamide A (6) およびそれらの誘導体の合成を行った。*Piper chaba* 果実の主成分 piperine, 5 および 6 について投与量決定のためにマウスにおける血中濃度の測定を行ったところ、曲線下面積 (AUC) は 5 > piperine > 6 の順であり、*in vitro* での有効濃度から 5 は 20 mg/kg 以上の用量で 1 日複数回の投与が必要であることが推定された。6 の誘導体を合成し、そ



れらについて検討した結果、より活性の強い化合物として *n*-pentyl amide から成るアミド化合物 7 などを見出し、PPAR γ 2 および C/EBP α および β mRNA の発現の亢進が認められた。

(3) その他、インド、アラビア地域において薬用とされているニゲラ (*Nigella sativa*) 種子から新規 dolabellane 型ジテルペン nigellamine B₃ および D を単離し、それらの化学構造を明らかにするとともに、HepG2 細胞において PPAR α アゴニスト様の脂質代謝促進活性を見出した。中国西部で健康飲料として用いられている羅布麻 (白麻 *Poacynum hendersonii*) 花部から得られた数種のフラボノイド類や芳香族配糖体に緩和な PPAR γ アゴニスト様活性を認めた。さらに、脂肪細胞内 TG の減少を指標に PPAR γ 発現が減少する候補化合物を探索した結果、クロロゲン酸誘導体に可能性を見出した。

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 5 件)

- ① Hisashi Matsuda, Yuichiro Kogami, Seikou Nakamura, Tomomi Sugiyama, Tsubasa Ueno, Masayuki Yoshikawa: Structural requirements of flavonoids for the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, **19**, 2835–2841 (2011). DOI: 10.1016/j.bmc.2011.03.040.
- ② 中村誠宏, 松田久司, 吉川雅之: 薬用食品から抗糖尿病作用成分の開拓に挑む. *Yakugaku Zasshi*, 査読有, **131**, 909–915 (2011).
- ③ Toshio Morikawa, Katsuya Imura, Sohachiro Miyake, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Chihiro Yamashita, Osamu Muraoka, Takao Hayakawa, Masayuki Yoshikawa: Promoting the effect of chemical constituents from the flowers of *Poacynum hendersonii* on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Nat. Med.*, 査読有, **66**, 39–48 (2012). DOI: 10.1007/s11418-011-0549-3
- ④ Toshio Morikawa, Kiyofumi Ninomiya, Fengming Xu, Naomichi Okumura, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, Takao Hayakawa, Masayuki Yoshikawa: Acylated dolabellane-type diterpenes from *Nigella sativa* seeds with triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells. *Phytochem.*

Let., 査読有, 6, 198-204 (2013).

- ⑤ Itadaki Yamaguchi, Hisashi Matsuda, Hailong Zhang, Makoto Hamao, Chihiro Yamashita, Yuichiro Kogami, Haruka Kon'I, Megumi Murata, Seikou Nakamura, Masayuki Yoshikawa: Adipogenic effects of piperlonguminine in 3T3-L1 cells and plasma concentrations of several amide constituents from *Piper chaba* extracts after treatment of mice. *J. Nat. Med.*, 査読有, 67, (2013), in press.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 松田久司, 吉川雅之: メディシナルフラワーの生体機能成分 - 茶花, 白梅花, 菊花 -. 第 27 回和漢医薬学会大会, 京都薬科大学, 2010 年 8 月 29 日 (京都府).
- ② 松田久司, 山下千裕, 張 海龍, 小神雄一郎, 中村誠宏, 吉川雅之: アマチャ含有スチルベン類の抗糖尿病作用. 第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム, 2010 年 8 月 21 日, 千里阪急ホテル (大阪府).
- ③ 松田久司, 小神雄一郎, 杉山智美, 上野翼, 中村誠宏, 吉川雅之: フラボノイド類の脂肪細胞分化誘導活性. 第 60 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 摂南大学薬学部, 2010 年 10 月 30 日 (大阪府).
- ④ Hisashi Matsuda, Masayuki Yoshikawa: Anti-diabetic and anti-obese constituents from several medicinal foods. International Symposium on Development of Functional Food Materials from Plant Resources, 2010 年 11 月 26 日(ソウル, 韓国).
- ⑤ Hisashi Mastuda, Masayuki Yoshikawa: Anti-diabetic and anti-obese constituents from several medicinal herbs and foods. International Forum on the Development of Traditional Chinese Medicine 2011 年 9 月 22 日 (天津, 中国).
- ⑥ 二宮清文, 山田友規, Zhang Yi, 中村誠宏, 松田久司, 村岡修, 吉川雅之, 森川敏生: 垂盆草 (*Sedum sarmentosum*) 成分の肝細胞における中性脂肪蓄積抑制作用. 第 4 回食品薬学シンポジウム, 慶應義塾大学薬学部, 2011 年 10 月 29 日 (東京都).
- ⑦ 松田久司, 中村誠宏, 森川敏生, 二宮清文, 村岡修, 吉川雅之: ナガコショウ (*Piper chaba*, 果実) 成分の生体機能 - 胃保護, 肝保護および抗糖尿病作用 -. 第 4 回食品薬学シンポジウム慶應義塾大学薬学部,

2011 年 10 月 29 日 (東京都).

- ⑧ Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Toshio Morikawa, Osamu Muraoka, Masayuki Yoshikawa: *Trans*-Tiliroside, a potent anti-obese principle from *Rosa canina*: Structural requirements and the mode of action. 2011 International Conference on Food Factors, 2011 年 11 月 20-23 日 (台北, 台湾).
- ⑨ Seikou Nakamura, Hisashi Matsuda, Chihiro Yamashita, Hailong Zhang, Masayuki Yoshikawa: Effects of amide constituents from pepper (*Piper chaba*, Fruit) on adipogenesis in 3T3-L1 cells. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 京王プラザホテル, 2011 年 11 月 30 日 (東京都).
- ⑩ 松田久司, 山口 頂, 中村誠宏, 濱尾 誠, 紺井 悠, 吉川雅之: ナガコショウ (*Piper chaba*, 果実) 含有薬理活性アミド類の血中移行について. 日本薬学会第 132 年会, 北海道大学, 2012 年 3 月 30 日 (北海道).
- ⑪ 松田久司, 小川慶子, 小神雄一郎, 中村誠宏, 藤本勝好, 松本崇宏, 吉川雅之: メディシナルフラワー研究: ロータス (*Nelumbo nucifera*) 花部アルカロイド成分の抗糖尿病作用, パシフィコ横浜, 2013 年 3 月 28 日 (神奈川県).

[図書] (計 2 件)

- ① 松田久司: スパイス・ハーブの機能と最新応用技術 第 11 章 コショウ科植物由来スパイス・ハーブと生体機能 pp.183-197, (2011) シーエムシー出版
- ② 松田久司: 薬用食品の開発 II 第 4 章 甘茶の新規生体機能 pp.46-59 (2012) シーエムシー出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 久司 (MATSUDA HISASHI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：40288593

(2) 研究分担者

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

中村 誠宏 (NAKAMURA SEIKOU)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20411035

(3) 連携研究者

()

研究者番号：