

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460135

研究課題名(和文)身近な資源の有効利用、リンゴ葉の生物活性物質を探索し、創薬基盤を確立する

研究課題名(英文) Search of bioactive components from apple leaves

研究代表者

立川 英一 (Tachikawa, Eiichi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50146031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ葉はリンゴの栽培過程で、果実の生育を促すために大量に摘み取られ、廃棄される。そこで、葉の有効利用を考え、葉から成分を探索し、葉のメタノール抽出物から10種の成分を単離、同定した。得られた成分のいくつかは、ウシ副腎細胞からのコルチゾルやカテコールアミンなどのストレスホルモン分泌を強く抑制した。さらに葉のMeOH抽出物をマウスに投与しておく、ストレスによって惹起される病態が抑制された。これらの結果は通常は廃棄されてしまうリンゴ葉を有効利用できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Apple leaves are discarded in large quantities to facilitate the growth of apple fruits. In the study, to beneficially utilize the apple leaves, we tried to isolate some components from the leaves. From the methanol (MeOH) extract of apple leaves, 10 kinds of components were successfully isolated and identified. Some of the components strongly inhibited catecholamine and/or cortisol secretion called stress hormones from bovine adrenal cells. Further, some disorders induced by stress were avoided in the mouse when the MeOH extract was pre-administered to mouse. Therefore, it is possible that apple leaves discarded in large amounts during the cultivation process of apple fruits are utilized as the resources of medicines.

研究分野：内分泌・神経薬理学

キーワード：リンゴ葉 ストレス カテコールアミン コルチゾル 副腎髄質 副腎皮質 副腎 生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

リンゴ (学名 *Malus pumila Mill*) はバラ科 (Rosaceae) に属し、現在 7500 種以上が栽培され、生食用を中心に日本では年間 100 万トン前後生産されている。リンゴ栽培過程において、果実品質と商品価値の向上を目的として日当たりを良くし、リンゴの実を大きく、皮をよく着色させるため、摘葉がおこなわれる。しかし、この摘みとられた葉は大量の廃棄物となる。

リンゴに特徴ある機能性成分の探索研究については、リンゴの皮に抗がん作用を持つトリテルペノイドが存在すること (J. Agric. Food Chem., 55, 4366-4370, 2007)、皮や果実に含まれる強力な抗酸化作用を持つポリフェノール類 (エピカテキン、プロシアニジン、アントシアニンなど) が肥満防止効果、高血圧予防効果および皮膚老化抑制効果 (第 10 回日本抗加齢医学会総会、2010) を示すことが報告されている。このようにリンゴの機能性成分研究は皮や果実に限られている。

そこで、これまで全く着手されていないリンゴの“葉”を有効利用するため、当研究室では、葉成分の機能性を追求している。その結果、リンゴ葉から抽出した粗精製成分 (HP-20 カラムクロマトグラフィー溶出画分 (HP-20 カラム溶出画分) が「悪性腫瘍細胞増殖抑制活性」、「カテコールアミン分泌阻害活性」および「コルチゾル産生阻害活性」を有することを *in vitro* 研究で見つけ、リンゴ葉に生物活性成分が含まれていることを明らかにしている。

副腎の皮質から分泌されるコルチゾルと髄質から分泌されるアドレナリンやノルアドレナリンなどのカテコールアミンは普段、生体の恒常性維持に働いているが、ストレスによって刺激を受けるとこれらホルモンは大量に分泌され、ストレスに対抗する。このためカテコールアミンやコルチゾルはストレスホルモンとよばれる。しかし分泌が長期

化するとストレスホルモンは生体にダメージを与え、様々な器官が疲弊し、機能低下をきたして疾患を誘発する。記憶に深く関わる脳海馬の萎縮、高血圧、心筋梗塞、脳卒中、免疫低下による感染症、さらにガンの発生率も高める。このためカテコールアミンとコルチゾルの過剰分泌を緩和することは様々な疾患の発症を予防することになる。

2. 研究の目的

“1. の研究開始当初の背景”を踏まえ、リンゴ葉から成分の探索と成分の *in vivo* と *in vitro* における生物活性の検証をおこない、医薬品の候補 (リード) 化合物を見出し、創薬基盤の確立をおこなう。

具体的には、

- (1) 病態モデル動物を利用して、HP-20 カラム溶出画分の疾患への治療効果を検証する。
 - ① ヒト 2 型糖尿病モデルである KK/Ta マウスでの HP-20 カラム溶出画分の治療効果や改善効果を明らかにする。
 - ② ヒトと極めて類似した本態性高血圧症と脳卒中の病態を呈する脳卒中易発症ラットを用い、HP-20 カラム溶出画分の影響を調べる。
 - ③ 認知症病態モデルとしての老化促進モデルマウスにおける HP-20 カラム溶出画分の記憶・学習障害に与える効果を行動薬理学手法で観察する。
 - ④ 子宮ガン細胞を移植した坦ガンヌードマウスを用い、HP-20 画分のガン増殖と転移、寿命に対する効力を検証する。

以上の *in vivo* 研究を研究開始当初は行う予定であったが、*in vitro* の研究において、リンゴ葉にストレスホルモン分泌抑制活性を示す成分が含まれていることがより一層明らかになったので、ストレス誘発病態モデルマウスに対する影響を検討することにした。さらにリンゴ葉成分の *in vitro* での抗菌活性についても検証した。一方、このテーマの研究中に①に関しては、リンゴ葉成分の

phlorizin が抗糖尿病作用を示すことが他の研究者グループから報告された。

(2) 認められた生物活性を指標に有効成分を精製し、構造を決定する。

(3) 構造決定された生物活性物質の薬理学的解析をおこない、作用メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リンゴ葉からの成分の分離と構造決定

リンゴ葉成分を MeOH で抽出し、抽出物を HP-20 カラムクロマトグラフィーで 25%、50%、70%MeOH そして EtOH を用い分画した。次に HP-20 カラム 50%および 70%MeOH 溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー並びに逆相 ODS カラムクロマトグラフィーを繰り返して、溶出溶媒を変えながら行うことによって成分を単離した。単離した成分を質量分析と NMR で解析し、化学構造を決定した。

(2) ウシ副腎細胞からのカテコールアミンとコルチゾルの分泌並びに定量

ウシ副腎髄質と皮質の切片を作り、コラゲナーゼで処理し、それぞれの細胞を分離して培養した。培養髄質細胞と皮質細胞をそれぞれリンゴ葉成分とアセチルコリン又は副腎皮質刺激ホルモンで処置し、分泌されたストレスホルモンを蛍光定量した。

(3) ストレス誘発病態モデル動物の作製とストレスに対するリンゴ葉成分の影響

マウスに拘束、低温を負荷し、ストレス病態モデルを作成した。このマウスでは、胃潰瘍の発生と血中アドレナリン並びにコルチコステロン値の増加が観察された。マウスにあらかじめ HP-20 カラム 70%MeOH 溶出画分を投与し、ストレスを負荷した。その後、胃潰瘍の程度と血中アドレナリン並びにコルチコステロンを定量した。

(4) Disk diffusion 法による抗菌効果の測定

抗菌活性の測定には、グラム陽性菌として

黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、グラム陰性菌として大腸菌を使用した。それぞれの菌株を培地に加え、シャーレに分注した。培地が固まった後に、リンゴ葉成分をペーパーディスクに染み込ませ、寒天培地上に静置した。16-20 時間培養後に阻止円の直径の大きさから抗菌効果を判定した。また測定用培地とリンゴ葉成分をそれぞれ混合した寒天培地を作成し、培地上に抗生物質の ampicillin、cefalotin、norfloxacin、tetracycline や gentamicin、を含むディスクを静置した。16-20 時間培養後に阻止円の大きさから抗菌活性を測定し、併用効果を判定した。

4. 研究成果

(1) リンゴ葉からの成分の分離と構造決定

リンゴ葉 MeOH 抽出物成分の HP-20 カラムクロマトグラフィーをおこない、25%、50%、

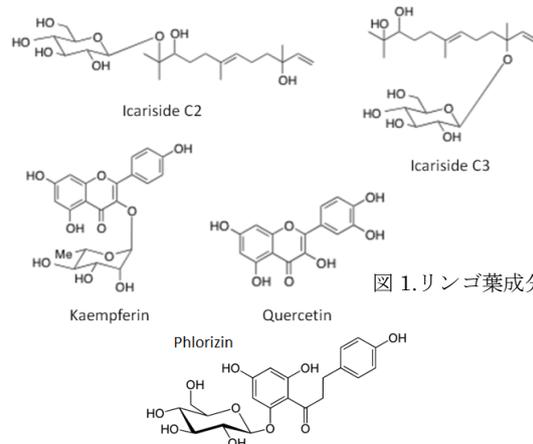


図 1. リンゴ葉成分

70%MeOH、EtOH で成分を分画した。次に HP-20 カラム 70%MeOH 溶出画分を各種クロマトグラフィーで精製し、quercetin、kaempferin、phlorizin および icaricide C2 と C3 を分離して構造決定した (図 1)。icaricide C2 や C3 はリンゴ葉から初めて単離された。さらに HP-20 カラム 50%MeOH 溶出画分から同じように各種クロマトグラフィーを行い、trilobatin、sieboldin、aureusidin、6-O-β-D-glucoside、roseoside および vomifoliol を単離、同定した (図 2)。

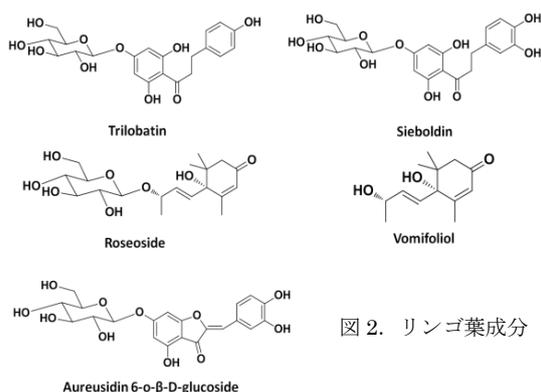


図 2. リンゴ葉成分

(2) ウシ副腎皮質と髄質細胞からのコルチゾル分泌並びにカテコールアミン分泌に対するリンゴ葉単離成分の影響

ウシ副腎皮質と髄質細胞からのコルチゾル分泌並びにカテコールアミン分泌に対するリンゴ葉単離成分の影響を検討した。その結果、kaemferin のアグリコンである kaempferol、phlorizin のアグリコンである phloretin や icariside C3、そして sieboldin や aureusidin 6-O-β-D-glucoside が 両ホルモン分泌またはカテコールアミン分泌を強く抑制した。このように HP-20 カラム 70%MeOH 溶出画分の単離成分が特に *in vitro* で抗ストレスホルモン分泌を強く阻害することが明らかとなった。さらにリンゴ葉単離成分の作用点は髄質細胞においては、ニコチン性アセチルコリン受容体、皮質細胞においては、コルチゾル産生におけるコレステロールからプレグネノロン生成過程であることも明らかとなった。

(3) ストレス誘発性病態モデルマウスに対する HP-20 カラム 70%MeOH 溶出画分の影響

HP-20 カラム 70%MeOH 溶出画分の成分が *in vitro* でストレスホルモン分泌を強く抑制したので、ストレスによって誘発される病態に 70%MeOH 溶出画分が影響するか検討した。マウスに寒冷拘束ストレスを負荷すると胃潰瘍の発生と血中カテコールアミンとコルチコステロンレベルが上昇する。このストレス病態モデルマウスにあらかじめ 70%MeOH 溶出画分を投与しておく、ストレスによって惹起される胃潰瘍形成と血中カテコールアミ

ンとコルチコステロン上昇が抑制された。これらの結果は 70%MeOH 溶出画分に抗ストレス作用を有する成分が含まれていることを示しており、ストレスによって誘発される疾病の予防に有効であることを示唆している。さらに、通常は廃棄されてしまうリンゴ葉を有効利用できる可能性も示している。

(4) リンゴ葉成分の細菌増殖に対する効果

黄色ブドウ球菌と大腸菌の増殖に対するリンゴ葉成分の phloretin、kaempferol 並びに icariside C3 のアグリコン類似の化合物である nerolidol の影響を検討した。用いられたすべての抗菌薬は黄色ブドウ球菌と大腸菌の増殖に対して阻止円を形成した。しかしリンゴ葉成分は細菌増殖に影響を与えなかった。一方、全ての抗菌薬は nerolidol、phloretin 並びに kaempferol との併用で、黄色ブドウ球菌増殖に対する阻止円をさらに拡大させた。またメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRSA) の増殖に対して、norfloxacin、tetracycline および gentamicin は阻止円を形成し、抗菌活性を示した。これらの抗菌薬は phloretin や kaempferol との併用で阻止円をさらに拡大させた。しかし、nerolidol との併用では、効果は認められなかった。このことはリンゴ葉成分に抗菌薬の活性を高める作用があることを示している。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 12 件)

- ①飯塚 俊介、高藤 裕美、青木 滯、福田 啓人、杓掛 真彦、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一、横須賀 章人、三卷 祥浩、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章

「リンゴ葉からの生物活性成分の探索 -カテコールアミン分泌抑制活性成分-

第 129 回 日本薬理学会関東部会 (東京) 2013

- ②青木 滯、飯塚 俊介、福田 啓人、高藤 裕未、岳 広欣、杓掛 真彦、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一、横須賀 章人、三卷 祥浩、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章

「リンゴ葉からの精製成分の副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌に対する作用」
日本薬学会 第 134 年会 (熊本) 2014

③桑原 直子、福田 啓人、青木 滯、高藤 裕未、飯塚 俊介、沓掛 真彦、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章
「副腎細胞からのホルモン分泌に対するリンゴ葉成分の影響」
生体機能と創薬シンポジウム 2014 (大阪) 2014

④福田 啓人、高藤 裕未、飯塚 俊介、青木 滯、沓掛 真彦、桑原 直子、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章、柳原 延章
「副腎皮質細胞のコルチゾル産生に対するリンゴ葉成分の影響」
第 130 回日本薬理学会関東部会 (東京) 2014

⑤川口 貴史、桑原 直子、青木 滯、福田 啓人、秋吉 理沙、猪瀬 貴大、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一
「副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌に対するリンゴ葉成分ネロリドールの影響」
第 73 回西東京内分泌代謝研究会 (東京) 2014

⑥桑原 直子、福田 啓人、青木 滯、高藤 裕未、飯塚 俊介、沓掛 真彦、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章
「ウシ副腎皮質細胞のコルチゾル産生に対するリンゴ葉成分フロレチンの作用」
第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015

⑦川口 貴史、桑原 直子、青木 滯、福田 啓人、秋吉 理沙、猪瀬 貴大、吉江 幹浩、田村 和広、立川 英一
「副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌に対するリンゴ葉成分 nerolidol の影響」
第 132 回日本薬理学会関東部会 (千葉) 2015

⑧川口 貴史、秋吉 理沙、猪瀬 貴大、青木 滯、

福田 啓人、桑原 直子、吉江 幹浩、田村 和広、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章、沓掛 真彦、立川 英二

「副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌に対するリンゴ葉成分の icariside C₃ と nerolidol の影響」

第 89 回日本薬理学会年会 (横浜) 2016

⑨齊藤 萌菜美、秋吉 理沙、猪瀬 貴大、佐藤 響、桑原 直子、吉江 幹浩、田村 和広、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章、立川 英一

「リンゴ葉成分の副腎細胞におけるコルチゾル産生およびカテコールアミン分泌に対する作用」

日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016

⑩佐藤 響、齊藤 萌菜美、秋吉 理沙、猪瀬 貴大、川口 貴史、桑原 直子、吉江 幹浩、田村 和広、横須賀 章人、三卷 祥造、佐藤 弘人、小森 貞夫、壽松木 章、立川 英一

「副腎細胞からのホルモン分泌並びにストレス負荷マウスに対するリンゴ葉成分の影響」

第 134 回日本薬理学会関東部会 (大田原) 2016 (発表予定)

⑪N. Kuwabara, H. Fukuda, M. Aoki, Y. Takato, S. Iiduka, M. Yoshie, K. Tamura, A. Yokosuka, Y. Mimaki, H. Sato, S. Komori, A. Suzuki, M. Kutsukake, E. Tachikawa

「Effects of phlorizin isolated from apple leaves and its aglycone phloretin on adrenal cortisol production」

The 29th European College of Neuropsychopharmacology Congress

2016. 9. 17~20 Vienna, Austria (発表予定)

⑫E. Tachikawa, N. Kuwabara, H. Fukuda, M. Aoki, Y. Takato, S. Iiduka, M. Yoshie, K. Tamura, A. Yokosuka, Y. Mimaki, H. Sato, S. Komori, A. Suzuki, M. Kutsukake

「Effects of phlorizin isolated from apple

leaves and its aglycone phloretin on catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells]

The 29th European College of Neuropsychopharmacology Congress

2016.9.17~20 Vienna, Austria (発表予定)

[その他]

ホームページ

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/shinkeiya-kuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立川 英一 (TACHIKAWA, Eiichi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50146031

(2) 研究分担者

柳原 延章 (YANAGIHARA, Nobuyuki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80140896

三巻 祥浩 (MIMAKI, Yoshihiro)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90229790

(3) 連携研究者

小森 貞夫 (KOMORI, Sadao)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：00333758