

氏名 (生年月日) やまぐち いただき
山口 頂 (1976年4月25日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 論博 第190号

学位授与の日付 2013年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 タイ天然薬物 *Piper chaba* の薬理活性成分の探索

論文審査委員 (主査) 教授 松田 久司

(副査) 教授 渡辺 徹志

(副査) 教授 山下 正行

論文内容の要旨

コショウ科 (Piperaceae) コショウ属 (*Piper*) 植物は、700種以上が知られており、熱帯および亜熱帯地域に広く分布している。インド伝統医学であるアーユル・ヴェーダ医学や世界の伝統医療として用いられてきた。一方、世界各国で香辛料としても利用されており、黒胡椒、白胡椒の原料であるコショウ、さらにナガコショウ、ジャワナガコショウ (ヒハツモドキ, *P. retrofractum* = *Piper chaba*) などがスパイス・ハーブとして良く知られている。

コショウ属植物の含有成分として、piperine などの酸アミド類、精油成分のモノテルペン、セスキテルペン、フェニルプロパノイドなどが知られており、*P. nigrum* などの主要成分である piperine には、健胃、胃粘膜保護、消化管輸送能促進など多様な生体機能が知られている。また、栄養素や薬物の吸収促進作用や、小腸や肝臓における薬物代謝酵素シトクロム P450 を阻害することが報告されており、薬物相互作用について注意が必要とされている。

本研究ではタイ天然薬物の科学的解明研究や薬用食物の機能性成分の探索研究の一環としてタイ産コショウ科植物 *P. chaba* の乾燥果穂部の80%(v/v) 含水アセトンエキスに胃粘膜保護作用および肝保護作用が見出されたことから、*P. chaba* 果穂部に含有される成分の探索並びに活性成分の探索研究を実施するとともに、piperine (10) とその類縁体について 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導に及ぼす影響を研究した。さらに、*P. chaba* 果穂部に含有される主要な活性成分について、薬物の有効性、安全性を検証する上で重要な情報の1つとなる血中濃度推移について研究した。

P. chaba 含有成分の探索研究において、*P. chaba* 果穂部より得た 80%(v/v) 含水アセトンエキスより、methyl piperate (9) を含む 4 種の既知芳香族化合物、10, piperonaline (11), dehydropiperonaline (13), pipericide (16), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadeca-2,4-dienamide (18), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (19) を含む 29 種の既知酸アミド化合物、3 種の既知セスキテルペンおよび 2 種の既知フェニルプロパノイド配糖体を単離・同定するとともに、6 種の新規酸アミド化合物である piperchabamide A (1)~F (6) および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体 piperchabaoside A (7) および piperchabaoside B (8) を単離し、それらの化学構造を質量分析、核磁気共鳴スペクトルをはじめとする各種物理化学的データより決定した (Fig.1)。

P. chaba 含有成分のエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷モデルに与える影響を検討した結果、10 にエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷に対する保護作用が確認された。また、11, 13, 16, 18 および 19 はエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷モデルにおいて、25 mg/kg 投与にて胃粘膜損傷を抑制

率 50.9~73.3%で有意に抑制した。一方、インドメタシン誘発胃粘膜損傷モデルにおいて **9** には抑制作用が認められなかったことから、酸アミド構造が活性発現に重要である可能性が考えられた。

次に、*P. chaba* 含有成分のマウス初代培養肝細胞を用いた D-ガラクトサミン(D-GalN)または D-GalN/腫瘍壊死因子(TNF)- α 誘発肝細胞死に与える影響を評価した。その結果、piperoleine B (**12**)、*N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (**17**) および **19** に強い抑制作用が認められた。抑制作用が認められた成分の化学構造より、酸アミド構造が活性発現に必須であること、側鎖部の炭素数と二重結合の有無などにより活性強度に影響を及ぼすことが明らかとなった。引き続き *P. chaba* の主要成分である **10** の肝障害抑制作用の作用機序について検討をおこなった。D-GalN/リポ多糖(LPS)誘発肝障害モデルは D-GalN によって TNF- α に対する感受性の増大した肝細胞に LPS によって活性化されたマクロファージから産生される TNF- α が作用することにより肝細胞死が誘発されるためであることが報告されている。そこで D-GalN/LPS 誘発時のマウス血清中 TNF- α 濃度に及ぼす影響を検討したが、20 mg/kg の投与量においてもほとんど影響が認められなかった。また、LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージの NO 産生に対しても強い抑制活性を示さなかった。このことから、**10** は *in vitro* および *in vivo* のいずれにおいてもマクロファージの活性化を抑制しないことが推察された。一方、D-GalN/TNF- α による肝細胞死抑制作用を示したが、D-GalN のみによる細胞死に対しては抑制作用を示さなかった。さらに、L929 細胞を用いた TNF- α 誘発細胞死に対する作用を検討したところ、TNF- α による細胞死を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。以上のことから、D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルにおいて **10** は TNF- α 産生量には影響を与えず、D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- α 感受性を低減し、TNF- α による肝細胞死を抑制することによって肝保護作用を発現させることが推察された。

Piperlonguminine (**14**) および retrofractamide A (**15**) については 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化促進作用が報告されているが、**14** の分化促進作用の詳細については明らかにされていない。そこで **14** について脂肪細胞への分化促進作用を検討した。その結果、濃度依存的に 3T3-L1 細胞中の中性脂質量を増加させ、培地中のアディポネクチン量、糖の取り込み量についても濃度依存的な促進効果が見られた。また、**14** はアディポネクチン、PPAR γ 2、糖輸送担体である GLUT4 および分化の指標マーカーである aP2 の mRNA の発現を増加させた。さらに、PPAR γ に対する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 はアゴニスト活性を示した (EC₅₀=1.5 μ M) が、**14** はアゴニスト活性を示さなかった。以上の結果より **14** は直接的な PPAR γ アゴニスト活性を有しないが、PPAR γ アゴニスト様活性を示す新規シード化合物として有望であると思われる。

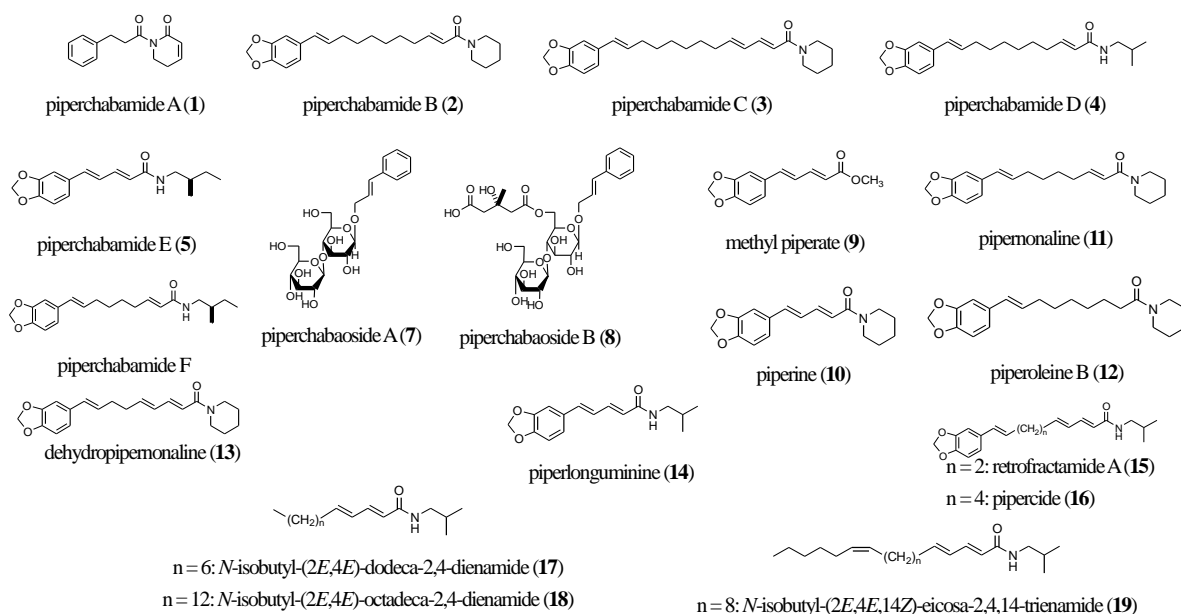


Fig.1. Chemical structures of compounds **1** - **19** from the fluit of *P. chaba*

論文審査の結果の要旨

コショウ科コショウ属植物はインド伝統医学であるアーユル・ヴェーダ医学や世界の伝統医療に利用されている。コショウ科植物である *Piper chaba* HUNTER (syn. *P. retrofractum* VAHL.) は香辛料として使用されるほか、健胃、強壮や抗炎症作用とみなされる薬効が伝承されているが、その科学的解明はほとんどなされていなかった。タイ天然薬物の科学的解明研究の一環として、タイ産 *P. chaba* 果穂部に含有される活性成分の探索研究を実施するとともに、主要成分の血中移行に関して検討し、以下のような結果を得た。

- 1) *P. chaba* 果穂部の 80% (v/v) 含水アセトン抽出エキスから主要成分である piperine を含む 38 種の既知化合物を単離・同定するとともに、6 種の新規酸アミド化合物および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体を単離し、それらの化学構造を明らかにした。
- 2) インドメタシン誘発胃粘膜損傷モデルにおける *P. chaba* 果穂部含有成分の作用を検討し、作用を示した成分の化学構造より酸アミド構造が重要である可能性が考えられた。
- 3) D-ガラクトサミン(D-GalN)/リポ多糖誘発肝障害モデルにおいて、主要成分である piperine の肝障害抑制作用の作用機序は、TNF- α 産生量には影響を与えず、D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- α 感受性を低減し、TNF- α による肝細胞死を抑制することによって肝保護作用を発現させることが示唆された。
- 4) 3T3-L1 細胞を用いた実験において、*P. chaba* の主要成分の 1 つである piperlonguminine は、直接的に PPAR γ に対する受容体レベルでのアゴニスト活性を示さなかったが、チアゾリジン誘導体に類似した PPAR γ アゴニスト様活性を示すことが明らかとなった。
- 5) Piperlonguminine の血中濃度は、piperine および retrofractamide A よりも高いことが明らかとなり、piperine の AUC は単独投与時よりもエキス投与時において増加し、エキス中の他の成分が piperine の血中濃度へ影響を与えることが明らかとなった。

本研究の成果より、タイ天然薬物である *P. chaba* の胃粘膜保護作用成分および肝障害抑制作用成分を明らかにするとともに、その活性発現に必要な部分構造を明らかにした。また、肝障害抑制作用に関して、主要成分である piperine の作用様式を解明した。さらに、piperlonguminine は、PPAR γ アゴニスト様活性を示し、糖尿病治療薬開発のための新規シード化合物として有望であることを見出した。最後に、主要成分の血中移行を明らかとし、タイ天然薬物 *P. chaba* の科学的解明の一助となった。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。