




崇城大学大学院
薬学研究科委員会

研究科長 小田切 優樹 殿

論文審査委員
主査 池田 剛



論文審査結果の報告（甲）

論文提出者	中嶋 圭介 （ 1 2 3 1 D 0 4 ）
論文題名	終末糖化生成物の産生を抑制するイカリソウ由来の プレニルフラボノイドに関する研究
審査委員	主査 教授 池田 剛 
	副査 教授 横溝 和美 
	副査 教授 衛藤 仁 

学位論文の要旨

世界規模での人口の高齢化が著しい近年、健康で長生きする、という人類の根源の欲求を追及する上で、「未病」を維持する予防医学的な対策が重要な役割を担っている。著者らの研究室では、これまでに医食同源の観点より、様々な植物由来の有効成分の探索研究を行っている。本研究において、著者は、糖尿病合併症や動脈硬化症など生活習慣病、並びに、骨粗鬆症やアルツハイマー病などの老化性疾患の発症や進展に関与する終末糖化生成物 **Advanced glycation end products (AGEs)** の生成を阻害する天然有機化合物を発見し、予防医学に貢献することを目指している。

コラーゲンは真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成する主要なタンパク質の一つであり、コラーゲンの AGEs 化は皮膚老化や骨粗鬆症の発症や進展のリスクなどにつながるという報告ある。そこで、本研究では、コラーゲン蓄積と病態との関連が明らかにされている AGEs 構造体である N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML)、並びに、コラーゲン特異的に生成する AGEs 構造体である N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) の2つのコラーゲン関連の AGEs 構造体に着目した。そして、CML, CMA の生成を阻害することで、生活習慣病や老化性疾患の発症や進展を予防・改善する天然素材とその活性成分を明らかにすることを目的として研究を行った。まず初めに、中国最古の本草書である神農本草経を基に、医食同源の観点より選抜した天然物抽出エキス 42 種について、CMA 生成阻害活性の測定を、抗 CMA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で行った。その結果、イカリソウ (*Epimedium Herba*) に最も強い CMA 生成阻害活性が観測された。そこで、イカリソウに含まれる CML, CMA 生成を阻害する天然有機化合物の探索を企図した。

先ず、ウチダ和漢薬より購入したイカリソウをメタノール抽出し、CML, CMA 生成阻害活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーを駆使して分離精製し、50 個のプレニルフラボノイドを単離した。得られた化合物は、各種スペクトルデータ (NMR など) を中心に化学構造の決定を行った。その結果、既知プレニルフラボノイド 30 個を同定するとともに、新規プレニルフラボノイド 20 個の化学構造を明らかにすることができた。さらに、不斉炭素を有するプレニルフラボノイドに関しては、酵素加水分解や光学分割の後、MTPA エステルに誘導し、改良モッシャー法を用いて絶対立体構造の決定を行った。次に、サンプル量が確保できた 35 個について、抗モノクローナル CML, CMA 抗体を用いた ELISA 法により、CML, CMA 生成阻害活性を測定した。その結果、阻害活性の強い化合物は、配糖体よりもアグリコンであった。また、アグリコンの中でも C 環 3 位に酸素官能基を有するフラボノール骨格より、3 位に酸素官能基が無いフラバン骨格で活性が強いことが判明した。即ち、**EK-B (8)**, **epimedinonin E (21)**, **G (22)**, **H (24)** の 4 種のプレニルフラボノイドに顕著な CML, CMA 生成阻害活性が観察された。

生成阻害活性の強い 4 種の化合物は、共通してカテコール基とプレニル基を有しているため、それらの官能基の重要性を検討した。先ず、**EK-B** のフェノール性水酸基をジアゾメタンでメチル化した。その結果、メチル化誘導体は **EK-B** より活性が低下したが、特にフラボノイド骨格 A 環 5 位の水酸基がメチル化された化合物は活性が顕著に低下した。このことから、A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニル基との水素結合が CML, CMA 生成阻害活性に重要であることが示唆された。また、カテコール基を持つ単純な 3 つの化合物 (gallic acid, pyrogallol, chlorogenic acid) と **EK-B** について CML, CMA 生成阻害活性を比較した。その結果、3 つの化合物ともに **EK-B** より弱い阻害活性を示すのみであった。次に、プレニル基の重要性を検討するために、プロポリス由来の **artepillin C**, **drupanin**, **baccharin** を用いて CML, CMA 生成阻害活性を検討した。しかしながら、どの化合物にも CML, CMA 生成阻害活性は確認できなかった。一方、ラセミ体 **epimedinonin G (22)**, **H (24)** を光学分割し得られた、**epimedinonin G1 (S 体)**, **G2 (R 体)**, 並びに **epimedinonin H1 (S 体)**, **H2 (R 体)** について、CML, CMA 生成阻害試験を行った。その結果、CML, CMA どちらの阻害活性試験においても活性がどちらかの光学活性化合物に偏ることなく、ラセミ体と同程度であった。

以上のデータを総合して、CML, CMA 生成阻害活性には、B 環部分にカテコール基、8, 5' 位にプレニル基を有することが必須であり、さらに、5 位の水酸基が水素結合すること、3 位に酸素官能基を持たないことが重要であると判明した。即ち、イカリソウ中の収量が多く、CML, CMA 生成阻害活性が最も強い **EK-B** がイカリソウ抽出エキスの活性本体であると判明した。

本研究において、イカリソウエキス中の活性本体をプレニルフラボノイドの **EK-B** であると同定した。また、プレニルフラボノイドの構造活性相関に関するいくつかの知見を明らかにすることができた。これは、今後、さらに強力な CML, CMA 生成阻害作用を有する化合物の合成を行う際の一助となると考えられる。

本研究で得られた知見より、従来、強壮薬としての利用しか知られていなかったイカリソウに抗糖化作用の可能性を示すことが出来た。現在、抗糖化作用を有する健康食品や化粧品が市場に出始めたことから、今後、イカリソウ含有の関連製品の開発が期待される。

論文審査結果の要旨

本研究は、コラーゲン蓄積と病態との関連が明らかにされている Advanced glycation end products (AGEs) 構造体である N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML) 並びに、コラーゲン特異的に生成する AGEs 構造体である N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) の 2 つのコラーゲン関連の AGEs 構造体に着目し、CML, CMA の生成を阻害することで、生活習慣病や老化性疾病の発症や進展を予防・改善する天然素材とその活性成分を明らかにすることを目的として研究を行っている。そして、以下の知見を得ている。

1. 神農本草経を基に、医食同源の観点より選抜した天然物抽出エキス 42 種について、CMA 生成阻害活性を測定したところ、イカリソウ (*Epimedium Herba*) に最も強い活性が観測された。
2. イカリソウより、CML, CMA 生成阻害活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーを駆使して分離精製し、50 個のプレニルフラボノイドを単離した。得られた化合物は、各種スペクトルデータを中心に化学構造の決定を行った。その結果、既知プレニルフラボノイド 30 個を同定するとともに、新規プレニルフラボノイド 20 個の化学構造を明らかにすることができた。さらに、不斉炭素を有するプレニルフラボノイドに関しては、酵素加水分解や光学分割の後、MTPA エステルに誘導し、改良モッシャー法を用いて絶対立体構造の決定を行った。
3. サンプル量が確保できた 35 個について、抗モノクローナル CML, CMA 抗体を用いた ELISA 法により、CML, CMA 生成阻害活性を測定した。その結果、阻害活性の強い化合物は、配糖体よりもアグリコンであった。そのうち、既知成分の **EK-B** と新規成分の epimedinin E, G, H の 4 種のプレニルフラボノイドに顕著な CML, CMA 生成阻害活性が観察された。
4. 活性の強い 4 種の化合物は、共通してカテコール基とプレニル基を有している。構造活性相関の検討より、以下の特徴が明らかとなった。
 - 1) フラボノイド骨格のフェノール性水酸基、特にカテコール基は活性発現に必須
 - 2) フラボノイド骨格の A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニル基との水素結合が活性を維持するために重要
 - 3) カテコール基を持つフラボノイド骨格の A 環 8 位と B 環 5' 位にプレニル基が結合すると活性が増加する。
 - 4) CML, CMA 生成阻害活性はプレニル基部分の立体化学に依存しない。
5. グリオキサール-ゼラチン系に替えて評価した結果より、**EK-B** は、主要な AGEs 生成経路である還元糖のアマドリ転位物に由来する生成経路を阻害することが判明した。
6. リボース-ゼラチン系で活性の強いプレニルフラボノイドは、ヒト I 型コラーゲンを用いた系でも強い CML, CMA 生成阻害活性を示すことが判明した。
7. 以上のデータより、イカリソウ中の収量が多く、CML, CMA 生成阻害活性が最も強い **EK-B** がイカリソウ抽出エキスの活性本体であると判明した。

以上、本研究では、イカリソウエキス中の活性本体をプレニルフラボノイドの **EK-B** であると同定した。また、強壯薬としての利用しか知られていなかったイカリソウに抗糖化作用の可能性を示すことが出来たことから、博士の学位論文に値する内容を有していると考えられる。加えて、申請者は口頭試問においても適切に対応し、十分な学力を有し、博士の学位論文に値すると判断された。

最終試験結果の要旨

本論文は、生薬イカリソウについて、数多くのプレニルフラボノイド類を単離構造決定すると共に、効率良く終末糖化生成物阻害活性を評価する ELISA 法による評価系の確立も行っている。研究の目的・背景が明確で、得られた結果も独創性が見られ、博士(薬学)の学位論文としての内容を満たし、加えて審査委員会および公聴会における質問に対しても適切に答え、実りある討論がなされた。以上の結果に基づき、本論文提出者は、博士(薬学)の学位を得る資格があると判定した。