

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名    ジャムニアン    チョンプー

題 目    抗糖尿病薬開発に向けたゲットウ成分の利用  
(Utilization of *Alpinia zerumbet* Components for Anti-Diabetes Medications)

糖尿病は、膵臓が十分なインシュリンを分泌しないか、インシュリンを効率的に利用できないために血糖値が高くなってしまふという疾患である。世界保健機関は、糖尿病は2030年までに世界人口の20~30%の人に影響を与えている最も一般的な内分泌疾患であるとし、しかもその発生率は上昇しているの見積もっている。これらのことから、抗糖尿病にまつわる代謝問題の克服へ向けた、新規薬物送達システムのデザインや開発を行う多大な機会が本研究に与えられることとなった。ゲットウは沖縄に広く分布する多年生植物であり、多くの興味深い生理活性成分を含むため、治療薬の原材料として選んだ。本研究において、計5種類の生理活性物質がゲットウより単離されたが、2種については、5,6-dehydrokawain および dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK) といった以前に根茎より単離された既知の化合物であった。さらに、以下の3種の新しい化合物、8(17),12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene) と (1*E*,3*E*,5*B*-6-methoxyhexa-1,3,5-trien-1-yl)-2,5-dihydrofuran (MTD) が根茎から、そして (1*B*-2,2,3,3-tetramethyl-8-methylene-7-(oct-6-en-1-yl)octahydro-1*H*-quinolizine (TMOQ) が種より単離された。糖尿病の発生と関連する5つの異なったシステムにおいて、これらの化合物の有効性と活性を調べた。

最初に行った研究において、解析の結果、labdadieneが3つの異なるステップにおいて糖化および AGE 生成を阻害する作用を持つことが明らかになった。この化合物により、アマドリ産物の生成が抑えられ ( $IC_{50} = 51.06 \mu\text{g/mL}$ )、それにより糖化によって誘導されるタンパク質の酸化およびジカルボニル化合物の生成が減少した。

第2に、ゲットウの持つ抗動脈硬化作用について調べた。Cholest-4-ene-3,6-dione は種子抽出液に含まれるステロイドであるが、腓リパーゼ、1,5-リポキシゲナーゼ、LDL 酸化に対して抑制効果を示した (それぞれ  $IC_{50} = 19.50, 54.79, 16.12 \mu\text{g/mL}$ )。

第3に、DKの抗皮膚病薬としての利用に向けた研究を行った。DKは、DPPH、ABTS、PMS-NADHを含む抗酸化試験において阻害活性を示した (それぞれ  $IC_{50} = 122.14, 110.08, 127.78 \mu\text{g/mL}$ )。また、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、チロシナーゼといった皮膚病に関連した酵素に対しても強い阻害活性を示した (それぞれ  $IC_{50} = 24.93, 19.41, 19.48, 76.67 \mu\text{g/mL}$ )。

第4に、妊娠性糖尿病におけるゲットウ成分の抗糖尿病活性について調べた。TMOQは、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、トリプシン、一酸化窒素に対して高い阻害活性を示した。MTDは用量依存的にトリプトファンヒドロキシラーゼを阻害した。これらの結果により、両化合物は妊娠性糖尿病の予防に利用できる可能性があることが明らかになった。

最後に、ゲットウ成分が、活性酸素種の放出や cAMP 生成酵素に対して抗糖尿病作用を持つか調べるため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。TMOQ はキサンチンオキシダーゼ ( $IC_{50} = 14.70 \mu\text{M}$ )、LDL 酸化 ( $IC_{50} = 10.33 \mu\text{M}$ )、NADPH オキシダーゼ (% of inhibition =  $47.84 \mu\text{M}$ ) に対して、高い阻害活性を示し、さらに cAMP のレベルも上昇させた (% increasing = 33.50)。

これらの実験の結果から、ゲットウは抗糖尿病特性を持つ多くの植物化学化合物の重要な供給源であると結論づけることができる。従って、この植物は糖尿病に対する自然薬物として医学的に利用されうるだろう。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Jamnian Chompoo

題 目 **Utilization of *Alpinia zerumbet* Components for Anti-Diabetes Medications**  
(抗糖尿病薬開発に向けたゲットウ成分の利用)

Diabetes is a disease in which a person has high blood sugar either because the pancreas does not secrete enough insulin or the body cannot effectively use the insulin. By 2030, the WHO estimates that it is the most common endocrine disorder affecting around 2-3% of the population worldwide and its incidence is rising. These drawbacks give this research tremendous opportunity to design and develop novel drugs delivery system for overcoming the metabolism problems associated with anti-diabetes. *Alpinia zerumbet*, a common herbaceous perennial plant in Okinawa (Japan), was chosen as potential therapeutic materials because it contains numerous interesting bioactive constituents. In this study, a total of five bioactive compounds of *A. zerumbet* were isolated, two of which were previously known compounds isolated from the rhizomes namely 5,6-dehydrokawain (DK) and dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK). In addition, three new compounds were isolated for the first time including 8(17),12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene) and (1*E*,3*E*,5*E*)-6-methoxyhexa-1,3,5-trien-1-yl)-2,5-dihydrofuran (MTD) from rhizomes and (*E*)-2,2,3,3-tetramethyl-8-methylene-7-(oct-6-en-1-yl)octahydro-1*H*-quinolizine (TMOQ) from seeds. These compounds were examined to assess the potencies and activities in five different systems which have been associated with the development of diabetes.

In the first study, the results of the analyses revealed that labdadiene expressed antiglycation and AGEs formation in three different steps in the pathway. This compound suppressed the formation of Amadori products ( $IC_{50} = 51.06 \mu\text{g/mL}$ ), thereby reducing glycation-induced protein oxidation and dicarbonyl compounds formation.

Secondly, the antiatherosclerogenic properties of *A. zerumbet* were investigated. Cholest-4-ene-3,6-dione, a steroid present in the seed extract, showed negative response against pancreatic lipase, 15-lipoxygenase and LDL oxidation ( $IC_{50} = 19.50, 54.79$  and  $16.12 \mu\text{g/mL}$ , respectively).

Thirdly, DK could be used as a potent inhibitor and further exploited for utilization as anti-skin disease formulations. It displayed inhibitory activities for antioxidants including DPPH, ABTS and PMS-NADH scavenging ( $IC_{50} = 122.14, 110.08$  and  $127.78 \mu\text{g/mL}$ , respectively). It also showed strong inhibitory activities against skin disease-related enzymes including collagenase, elastase, hyaluronidase and tyrosinase ( $IC_{50} = 24.93, 19.41, 19.48$  and  $76.67 \mu\text{g/mL}$ , respectively).

In the fourth study involved in anti-diabetic activities of *A. zerumbet* components in gestational diabetes which is a pathologic condition related to the high blood sugar during pregnancy. TMOQ showed high inhibitory activities on  $\alpha$ -glucosidase, trypsin and nitric oxide. Furthermore, MTD showed dose-dependent increase in the activity of tryptophan hydroxylase. The results revealed that both compounds may have probable applications in preventing gestational diabetes formation.

In the final study, the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used to evaluate the anti-diabetic potential of *A. zerumbet* components on oxygen species release and cAMP enzyme activity. TMOQ showed high inhibitory activities on xanthine oxidase ( $IC_{50} = 14.70 \mu\text{M}$ ), LDL oxidation ( $IC_{50} = 10.33 \mu\text{M}$ ) and NADPH oxidase (% of inhibition =  $47.84 \mu\text{M}$ ), moreover, this compound had ability to increase cAMP level (% increasing = 33.50).

From the results of these experiments, it can be concluded that *A. zerumbet* is an important source of numerous phytochemical compounds which possess antidiabetic properties. Thus, this plant could be medically utilized as natural drugs against diabetes.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Jamnian Chompoo
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学 准教授 福田 雅一
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 琉球大学 教授 金城 一彦
審査協力者	
題 目	<b>Utilization of <i>Alpinia zerumbet</i> Components for Anti-Diabetes Medications</b> <b>(抗糖尿病薬開発に向けたゲットウ成分の利用)</b>
<p>糖尿病は、膵臓が十分なインシュリンを分泌しないか、インシュリンを効率的に利用できないために血糖値が高くなってしまふという疾患である。世界保健機関は、糖尿病は2030年までに世界人口の20~30%に影響を与える最も一般的な内分泌疾患であるとし、しかもその発生率は上昇しているの見積もっている。これらのことから、抗糖尿病にまつわる代謝問題の克服へ向けた、新規薬物送達システムのデザインや開発を行うことが本研究の目的である。学位申請者は沖縄に広く分布する多年性植物で、多くの興味深い生理活性成分を含む、ゲットウを治療薬の原材料として選んでいる。本研究において、計5種類の生理活性物質がゲットウより単離されたが、2種については、5,6-dehydrokawain (DK) 及び dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK) といった以前に根茎より単離された既知の化合物であった。しかし、3種の新しい化合物、8(17),12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene) と (1<i>E</i>,3<i>E</i>,5<i>E</i>)-6-methoxyhexa-1,3,5-trien-1-yl)-2,5-dihydrofuran (MTD) を根茎から、そして (<i>E</i>)-2,2,3,3-tetramethyl- 8-methylene-7-(oct-6-en-1-yl)octahydro-1<i>H</i>-quinolizine (TMOQ) を種より単離し、糖尿病の発生および関連する5つの異なったシステムにおいて、これらの化合物の有効性と活性を調べている。</p>	

最初に行った研究において、解析の結果、labdadiene が 3 つの異なるステップにおいて糖化および AGE (糖化最終産物) 生成を阻害する作用を持つことを明らかにしている。この化合物により、アマドリ産物の生成が抑えられ ( $IC_{50} = 51.06 \mu\text{g/mL}$ )、それにより糖化によって誘導されるタンパク質の糖化物およびジカルボニル化合物の生成が減少した。

第 2 に、ゲットウの持つ抗動脈硬化作用について調べている。Cholest-4-ene-3,6-dione は種子抽出液に含まれるステロイドであるが、腓リパーゼ、1,5-リポキシゲナーゼ、LDL 酸化に対して抑制効果を示した (それぞれ  $IC_{50} = 19.50, 54.79, 16.12 \mu\text{g/mL}$ )。

第 3 に、DK の抗皮膚病薬としての利用に向けた研究を行っている。DK は、DPPH、ABTS、PMS-NADH を含む抗酸化試験において阻害活性を示した (それぞれ  $IC_{50} = 122.14, 110.08, 127.78 \mu\text{g/mL}$ )。また、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、チロシナーゼといった皮膚病に関連した酵素に対しても強い阻害活性を示した (それぞれ  $IC_{50} = 24.93, 19.41, 19.48, 76.67 \mu\text{g/mL}$ )。

第 4 に、妊娠性糖尿病におけるゲットウ成分の抗糖尿病活性について調べ、TMOQ は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、トリプシン、一酸化窒素に対して高い阻害活性を示した。MTD は用量依存的にトリプトファンヒドロキシラーゼを阻害した。これらの結果により、両化合物は妊娠糖尿病の予防に利用できる可能性があることを明らかにしている。

最後に、ゲットウ成分が、活性酸素種の放出や cAMP 生成酵素に対して抗糖尿病作用を持つか調べるため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、TMOQ はキサンチンオキシダーゼ ( $IC_{50} = 14.70 \mu\text{M}$ )、LDL 酸化 ( $IC_{50} = 10.33 \mu\text{M}$ )、NADPH オキシダーゼ (% of inhibition =  $47.84 \mu\text{M}$ ) に対して、高い阻害活性を示し、さらに cAMP のレベルも上昇 (% increasing = 33.50) させる事を見出している。

これらの実験の結果から、ゲットウは抗糖尿病特性を持つ多くの植物成分 (天然化合物) の重要な供給源であり、これら化合物を基にした治療薬の開発が今後期待されると評価づけられた。したがって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものと判定された。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Jamnian Chompoo
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学 准教授 福田 雅一
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 琉球大学 教授 金城 一彦
審査協力者	
実施年月日	平成 25 年 1 月 25 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成24年1月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力並びに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Jamnian Chompoo
-------------	-----------------

[質問1] ゲットウ (*Alpinia zerumbet*) は沖縄の広い地域で、伝統的な使用法としてどんな種類がありますか？

[回答1] それらはムーチャーやお茶のために使います。

[質問2] DK、DDK、labdadiene、MTD、TMOQ の単離方法は違うのですか？

[回答2] はい、それら化合物を単離するための方法は違います。また、分離源としても TMOQ はゲットウ種子から単離され、他の化合物は根茎から単離されました。

[質問3] これら単離された化合物の安定性はどうか、常温で安定ですか？

[回答3] すみません、実験が終了した後は冷蔵庫で保存しているため分かりません。

[質問4] ラットモデルを用いた血液内で良い効果を示すかどうか、単離した化合物を注入する実験はしますか？

[回答4] 現在のところ、私の研究ではラットモデルを使う計画はありません。

[質問5] 単離した化合物に対するどんな計画がありますか？

[回答5] 私達のラボに新しく入る学生が研究を続けるでしょう。私はサンプルをこの研究室に残します。

[質問6] 実験の多くが糖尿病を誘発する二次疾患です、なぜ皮膚病のように糖尿病を誘発するこれらの病気を選んだのですか？

[回答6] 皮膚病は糖尿病からの病気の結果です。これは糖尿病ではありません。高血糖糖尿病は血管が狭くなるのを誘発し、その時皮膚の輝きといった皮膚のいくつかの問題が起こります。

[質問7] 妊娠糖尿病に罹る女性ほどのくらいいますか？

[回答7] すみません、統計人数は調べていませんでした。

[質問8]  $\alpha$ -Glucosidase としては、植物起源と動物起源と種々のものがありますが、今回化合物の阻害活性の評価に用いたのは、いずれの起源のものですか？

[回答8] ヒト小腸由来です

[質問9] HUVEC 細胞で活性を調べた時、簡単でしたか？細胞は健常ですか？

[回答9] 細胞実験はとても難しいです、2 か月維持された細胞は、その際は細胞がコンタミしています。私は大量の細胞を再び注文し、とても慎重に実験を行いました。

[質問10] DK と DDK を混合した場合、活性はどうなりますか？あなたは活性が変わると思いますか？

[回答 1 0] DK と DDK はピロン基を持ち、構造は二重結合 1 つだけしか違いはありません。私は活性は変わると考えます、増加するでしょう。ピロン基は阻害活性を持つと報告されています。

[質問 1 1] labdadiene は AGEs 形成を阻害するようですが、MTD と TMOQ はどうですか？それら化合物は AGEs 阻害能を持ちますか？AGEs は糖尿病のための重要な経路であるため、AGEs 形成に対する MTD と TMOQ の効果を調べることを提案します。

[回答 1 1] 提案ありがとうございます。私の研究は AGEs 阻害から始まり、終了した後に次の段階の研究を行ったため、AGEs の阻害のための新しい化合物の効果を調べませんでした。とても興味深いポイントであるため、時間があれば調べます。

[質問 1 2] 2 つの新規化合物(TMOQ と MTD)は AGEs を阻害できると思いますか？

[回答 1 2] 分かりません、まだ AGEs 形成の阻害のためのそれら化合物の活性を調べていないためです。

[質問 1 3] あなたの考えはどうですか？

[回答 1 3] labdadiene の結果から、この構造はアルデヒド基を持ち、糖と競合できます。TMOQ と MTD は AGEs 形成の阻害のための活性を持たないかもしれません。

[質問 1 4] あなたの論文で、最も興味深い話題は何ですか？

[回答 1 4] 最も興味深い話題は最終糖化産物です、なぜならこの話題は糖尿病に直接関係があるからです。次に興味深い話題は HUVECs モデルです、なぜなら単離した化合物の能力を調べ、それら単離した化合物が本当に人間に対して使用できるか知る必要があります。

[質問 1 5] あなたの国に帰った後の計画はありますか、この研究を続行する予定ですか？

[回答 1 5] 私の大学ではこの研究を続けるための分析機器が無いため、私は別の場所へサンプルを送る必要があります、それはとても高価です。私は別のプロジェクトにこの技術を利用する予定です。