

学 位 論 文 要 旨

氏 名

大野木 宏

題 目

明日葉 (*Angelica keiskei*) 由来カルコン類のメタボリックシンドローム及び関連疾患に対する機能性の研究
 (The studies of the functions of chalcones from *Angelica keiskei* against metabolic syndrome and related diseases)

本研究において、メタボリックシンドローム及び糖尿病を中心としたその関連疾患の予防や早期改善のための新規機能性素材の開発を目的に、日本固有の伝承植物である明日葉とその特徴的な二次代謝成分のカルコン類に焦点を当て、その有用性ならびに安全性について基礎研究とヒト試験を行った。まず、明日葉のエタノールエキスから 9 種類の新規物質を含むカルコン類を単離しその化学構造を解明した。得られたカルコン類のアディポネクチン産生に対する効果を 3T3-L1 脂肪細胞株を用いて評価した結果、カルコン類がアディポネクチンの mRNA 発現とタンパク質産生を強く促進することが明らかとなった。次に、明日葉カルコン類のメタボリックシンドロームへの効果について高フルクトース負荷ラットを用いて評価した。その結果、明日葉カルコン類を含むエキスの 11 週間の経口投与によりインスリン抵抗性と高トリグリセリド血症が顕著に抑制された。また、高フルクトース負荷による血中アディポネクチン値の減少も明日葉エキス投与により正常レベルに改善され、肝臓の脂肪酸β-酸化と HDL 産生に関わる遺伝子群の発現低下も抑制されることが明らかとなった。経口投与された明日葉カルコンは速やかに血中に吸収されることがマウスを用いた試験によって明らかにされたことから、明日葉カルコン類は摂取後に体内に移行しアディポネクチン産生作用などの効果を発揮する可能性が考えられた。次いで、明日葉カルコン類のヒトに対する有効性と安全性を評価するため、軽度糖尿病患者および血糖値境界領域者を対象にプラセボ対照二重盲検試験を実施した。その結果、明日葉青汁の 6~12 週間の摂取により血糖パラメーターの改善及び血中アディポネクチン値の増加が認められた。また、メタボリックシンドローム該当者を対象にオープン試験を実施した結果、8 週間の明日葉青汁摂取により腹部内臓脂肪面積の明らかな減少、血中アディポネクチン値の増加傾向が認められた。これらの評価に加え、明日葉の安全性に関して詳細な検討を行い、復帰突然変異試験、ラットへの単回及び 13 週反復経口投与試験において問題がないことを確認した。さらに、明日葉青汁の 4 週間の過剰量摂取試験においても、臨床上問題となるような検査値の異常変動ならびに有害事象は認められなかった。これらの結果から、明日葉ならびにカルコン類の高い安全性が示された。

以上、本研究において明日葉とカルコン類のメタボリックシンドロームや軽度糖尿病に対する有効性を解明し、その作用機構として明日葉カルコン類のアディポネクチン産生促進能が寄与している可能性が示された。さらに、基礎的・臨床的アプローチから明日葉の高い安全性が確認された。これらの研究成果はメタボリックシンドロームならびにその関連疾患の予防や早期改善に対する、わが国固有の天然資源である明日葉の有用性を示すものである。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Hiromu OHNOGI

題 目

The studies of the functions of chalcones from *Angelica keiskei* against metabolic syndrome and related diseases(明日葉 (*Angelica keiskei*) 由来カルコン類のメタボリックシンドローム及び関連疾患に対する機能性の研究)

Angelica keiskei (Ashitaba) is a Japanese traditional vegetable which abundantly contains chalcones, a kind of polyphenol. The objective of this study was to investigate the biological functions of chalcones from *A. keiskei* against metabolic syndrome (Mets) and related diseases.

Xanthoangelol (XA), 4-hydroxydericin (4HD) and nine new chalcones were isolated from ethanol extract of the roots of *A. keiskei* by octadecyl silyl and silica gel chromatography and identified by 1D- and 2D-NMR and high-resolution mass spectrometric analyses. These chalcones markedly enhanced the expression of the adiponectin gene and the production of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. Orally administrated chalcones were rapidly absorbed into the blood in ICR mice and the absorption of 4HD was higher than that of XA. Ethanol extract of *A. keiskei* (AE) containing chalcones reduced the serum insulin, blood glucose, HOMA-R and serum triglyceride levels in fructose drinking rats as a model for the Mets. Further, AE increased serum adiponectin and HDL-cholesterol levels. A hepatic gene analysis showed that treatment of AE enhanced the expression of the genes related to fatty acid β -oxidation (ACO and MCAD) and HDL production (ABCA-1 and Apo-A1). These results suggested that chalcones from *A. keiskei* improved insulin resistance and hypertriglyceridemia by enhancing adiponectin production in fructose drinking rats.

The double blind placebo-controlled studies were performed to evaluate the efficacy and safety of *A. keiskei* on borderline and mild diabetes. As a result, ingestion of *A. keiskei* green juice (12.4-17.5 mg chalcones / day) for 6-12 weeks reduced HbA1c level and increased the serum adiponectin level (total and high-molecular-weight type, respectively) when compared with chalcone-removed placebo juice. In open label pilot study, ingestion of *A. keiskei* green juice (12.3 mg chalcones / day) of for 8 weeks decreased visceral fat area, body weight, BMI and body fat, and tended to increase serum adiponectin level on the patients and candidates with Mets. These results suggested that *A. keiskei* and its chalcones showed anti-Mets and anti-diabetes actions, at least in part, by enhancing adiponectin production. In these studies, no adverse clinical changes were observed in blood analysis and urinalysis and no serious symptom was observed. In the bacterial reverse mutation test, AE had no reverse mutation inducing activity on five bacterial strains with or without S9 metabolic activation. In single and 13 weeks repeated oral toxicity tests, *A. keiskei* powder showed no adverse effects in male and female SD rats. Further, excess ingestion of *A. keiskei* green juice (60.5 mg chalcones / day) for 4 weeks showed no adverse clinical changes in blood analysis and urinalysis on normal and borderline mildly diabetic adults. These findings indicated that *A. keiskei* was safe on healthy adults and the patients with Mets and diabetes.

In conclusion, *A. keiskei* and its chalcones are useful and safe food materials for preventing the Mets and related diseases.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	大 野 木 宏
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 客員教授 向 井 博 之
	副査 鹿児島 大学 客員教授 北 川 正 成
	副査 鹿児島 大学 客員准教授 峰 野 純 一
審査協力者	
題 目	明日葉(<i>Angelica keiskei</i>)由来カルコン類のメタボリックシンドローム 及び関連疾患に対する機能性の研究 (The studies of the functions of chalcones from <i>Angelica keiskei</i> against metabolic syndrome and related diseases)
<p>メタボリックシンドローム及び糖尿病をはじめとする生活習慣病は食生活の乱れや運動不足などに起因して起こる国民病と言われる疾患となっている。これらの疾患の予防や早期段階での病状改善が強く求められ、食生活の改善や機能性食品素材の活用などによる疾患対策が講じられている。後者の場合、多種多様な機能性食品素材から安全で有効かつ安価なものを探求し、疾患に適応した機能性素材を開発・提供することが重要である。明日葉は日本固有のセリ科シシウド属の植物であり、特徴的に機能成分であるカルコン類を豊富に含有していることから生活習慣病の予防や病症改善への適用が期待され、様々な研究が始められているが、未だ十分な研究成果は得られていない。</p> <p>本研究では、明日葉由来カルコン類のメタボリックシンドローム及び糖尿病の予防・改善効果を培養細胞と動物及びヒトの試験で検証し、新規機能性食品素材としての開発を目指した。明日葉をエタノール抽出したエキスをより、9種類の新規物質を含むカルコン類を単離し、それらの化学構造</p>	

を決定した。そして、単離されたカルコン類のアディポネクチン産生促進効果について3T3-L1培養脂肪細胞を用いて検証した。カルコン類はアディポネクチン遺伝子の転写を促進し、タンパクの産生を増強させた。さらに明日葉エキスの長期経口投与により、高フルクトース負荷によるラットのインスリン抵抗性と高トリグリセリド血症は顕著に改善され、低下した血中のアディポネクチンも正常レベルに維持されることを確認した。また、明日葉エキスは肝臓の脂肪酸 β -酸化とHDLコレステロール合成に関わる遺伝子群の発現を促進し、高フルクトース負荷の影響を防止することが確かめられた。マウスを用いた吸収性試験において、経口投与されたカルコン類は速やかに吸収され、血中に到達することが明らかとなり、カルコン類が生体内で有効に機能するものであると結論した。

次に、カルコンを含む明日葉の有効性および安全性を評価するために、軽度糖尿病患者及び血糖値境界領域者を対象にプラセボ対照二重盲検試験を実施した。明日葉青汁の6〜12週間摂取により血糖パラメーターの改善が見られ、カルコンの1日の摂取量として12.4mgが最適と考えられた。また、メタボリックシンドローム該当者及び予備群を対象としたオープン試験の結果、明日葉青汁の8週間の摂取により、腹部内臓脂肪面積、体重及びBMIの顕著な減少と血中のアディポネクチン値の増加傾向が認められ、明日葉はメタボリックシンドロームの予防・改善にも有効であった。

続いて、カルコンと明日葉の安全性の検討を行い、復帰突然変異試験、ラットへの単回及び13週間反復投与試験の結果、いずれの試験においても問題となる異常は認められなかった。加えて、健康者及び軽度糖尿病患者を対象にした明日葉青汁の4週間の過剰摂取試験では、臨床上問題となるような検査値の異常や有害事象は認められず、カルコンと明日葉の高い安全性が裏付けられた。

以上のように、本論文でまとめた研究は明日葉由来カルコン類の有効性を基礎的試験およびヒト試験において明らかにし、国民的な疾病であるメタボリックシンドローム及び糖尿病の予防、症状改善に大きく貢献するものと判断された。また、本研究は、わが国固有の伝統的な農作物資源である明日葉を機能性食品素材として広く普及できる可能性を示唆したものであり、わが国の農業及び食品産業にも貢献するものとなった。このような研究成果は、学術的な価値が極めて高く、農学のみならず予防医学、食品学分野において大きく貢献するものである。したがって、本論文は博士の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

学力確認結果の要旨

学位申請者
氏 名

大 野 木 宏

審査委員

主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志

副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一

副査 鹿児島 大学 客員教授 向 井 博 之

副査 鹿児島 大学 客員教授 北 川 正 成

副査 鹿児島 大学 客員准教授 峰 野 純 一

審査協力者

実施年月日

平成24年 8月17日

試験方法（該当のものを○で囲むこと。）

☒ 口答・☐ 筆答

主査および副査は、平成24年8月17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、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。

また、筆記により、外国語（英語）の学力を確認した。

その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者と同
等以上の学力および識見を有するものと認め、農学の分野だけでなく薬学、予防
医学の分野に貢献する研究成果を提供したことにより、博士（学術）の学位を
与えるに十分な資格を持つものと判定した。

学位申請者
氏 名

大 野 木 宏

〔質問 1〕本研究では明日葉抽出物とカルコン精製物の両方を使用しているが、抽出物の効果にはカルコン類以外の成分の効果も含まれるのか？

〔回答 1〕動物実験に抽出物を使った理由は、カルコン類の精製品を大量に調整するのが難しいということである。ただし、先行研究の脂肪細胞への分化誘導作用の結果から、抽出物の効果には2つのメジャーなカルコン類（キサントアンゲロールと4-ハイドロキシデリシン）の貢献が大きいと考える。しかしながら、明日葉にはカルコン類の他にクマリン類や他のポリフェノールも含まれており、それらが貢献している可能性は十分ある。

〔質問 2〕ヒト試験で、血糖パラメータにおいて8週間目で見えていた効果が12週間目で見えなくなっているがそれは何故か？

〔回答 2〕食品は効果が穏やかであり、その効果を論じるにはもう少し試験デザインを長期にしたり対象者やそのN数を考えたりした方がよいかもしれない。今回の試験は境界域（空腹時血糖値が110～125 mg/dl）の非常に狭い範囲を対象にしているので、試験としてはそもそも難しいところがある。また、健康食品の試験ではよくあるが、食品へのなれ効果もあるかもしれない。

〔質問 3〕ヒトに対するアディポネクチンの上昇効果は長期では下がらないのか？

〔回答 3〕本研究の2つの試験において、メタボリックシンドローム者を対象とした試験では8週目で増加傾向、境界域糖尿病患者を対象とした試験では12週目で増加が認められている。長期の効果は期待されると思うが、さらに長期間の効果は検討が必要と考える。

〔質問 4〕軽度糖尿病患者を対象とした試験で、中用量で認められた効果が高用量で認められなかった理由は？

〔回答 4〕この実験の主目的は明日葉の血糖パラメータへの効果を広く把握することであり、例数も各群10例程度と少ない。有効用量については、今後、試験をさらに長期にしたり、例数を増やしたりする必要がある。また、今回はマイルドな糖尿病患者を対象に試験したが、より病態がシビアな患者では明確な効果が出る可能性も考えられる。

〔質問 5〕明日葉は高血圧には効果があるか？

〔回答 5〕高フルクトース負荷モデルは血圧が上がるということが報告されているが、今回は評価していない。ヒトの過剰摂取試験において、血圧が高い人を対象とした層別解析では高血圧が改善されていた。先行研究では、明日葉にはニコチアミンというアンジオテンシン変換酵素阻害成分が含まれていることが報告されているので、今後は高血圧に対する効果も検討する意義があると考ええる。

〔質問 6〕明日葉カルコン類のアディポネクチン産生促進作用とPPAR γ との関係は？

〔回答 6〕カルコン類にはPPAR γ のリガンド活性はないが、PPAR γ のmRNA誘導を促進することがわかっている。従って、PPAR γ のリガンドであるピオグリタゾンなどの薬剤との相乗効果が期待できる。

〔質問 7〕明日葉カルコンのアディポネクチン上昇とインスリン様活性は同じものを見ているのか？

〔回答 7〕アディポネクチン産生増強作用は脂肪細胞の分化に伴い発揮され则认为るので、カルコン類のインスリン様活性のうち分化誘導活性は同じものを見ていると思われる。

〔質問 8〕 高フルクトース負荷動物試験において肝脂質代謝で評価する遺伝子を選んだ基準は？

〔回答 8〕 このような試験で一般的に評価されているものを選んだ。より網羅的な遺伝子発現解析が重要であると考ええる。

〔質問 9〕 明日葉と食べ合わせの良いもの、悪いものはあるか？

〔回答 9〕 ピオグリタゾンほどではないが、私の研究において大豆イソフラボンにPPAR γ リガンド活性があることを確認しているので、これらとカルコン類との相乗作用が期待できる。一方、ワーファリン服用者は明日葉に限らずビタミンKを多く含む緑黄色野菜の摂取を注意した方がよい。それ以外では特に食べ合わせの悪いものはないと考えられる。

〔質問 10〕 カルコン類によりアディポネクチンが上昇する作用機序は？

〔回答 10〕 前駆脂肪細胞から小型脂肪細胞への分化誘導を促進し、その数を増やすことが理由と考えられる。ただし、実際に動物実験で小型脂肪が増えているかどうかまでは確認できていないので、今後の課題と考える。

〔質問 11〕 細胞の分化誘導試験では、トリグリセリドが蓄積しているが、高フルクトース負荷モデルにおいては、血中トリグリセリドが減少するのはなぜか？

〔回答 11〕 カルコン類により小型脂肪細胞が増えアディポネクチンの産生が促進されることにより、肝臓中の脂肪酸の β 酸化酵素活性が上昇し、その結果血中のトリグリセリドが減少するのではないかと考えられる。

〔質問 12〕 過剰摂取試験において軽度糖尿病患者に対する効果はどうだったか？

〔回答 12〕 血糖値が高かった人を対象に層別解析を行ったが効果は確認できなかった。その理由は対象者が少人数であったためと考えられる。

〔質問 13〕 ヒトの抗メタボリックシンドローム試験で内臓脂肪は下がるが、腹囲は変化がないのか？

〔回答 13〕 本試験において明日葉摂取により確かに内臓脂肪は下がったが、腹囲は変化がなかった。一般に、内臓脂肪の減少が直ちに腹囲の減少につなげることがないケースもある。

〔質問 14〕 高フルクトース負荷により肝重量が上がっている理由は何か？

〔回答 14〕 肝臓の脂質は増加していない。はっきりとした理由是不明だが、グリコーゲンのような糖質が増えていることが原因の可能性はある。

〔質問 15〕 明日葉にはカリウムが多いことは高血圧の改善が期待できるが、一方、腎機能が低下した人にはカリウムが多い食品は問題ではないか？

〔回答 15〕 明日葉には利尿作用があることが伝承されており、カリウムによる血圧改善作用も期待できる。また、腎機能低下者には明日葉に限らずカリウムが多い食品は注意を要すると考える。

〔質問 16〕 明日葉の糖新生を抑制するということはないか？

〔回答 16〕 高フルクトース負荷モデルにおいては肝臓の糖新生に関連する遺伝子にはあまり影響がなかった。

〔質問 17〕 カルコン類が小型脂肪細胞を増やすということだが、そのもととなる未分化細胞はヒトの中にも十分あるのか？

〔回答 17〕 実際に何%含まれているかということとはわからないが、ピオグリタゾンでは糖尿者の小型脂肪細胞の数を増やすことが報告されているので、カルコン類が効果を発

揮する前駆脂肪細胞の余地は十分あると考えられる。

[質問 18] カルコン類は巨大脂肪細胞に対しては効果がないのか？

[回答 18] カルコン類では確認できていないが、ピオグリタゾンでは巨大脂肪細胞に対して作用しアポトーシスを誘導することが知られている。

[質問 19] 種々の新規カルコンを単離し、アディポネクチン産生上昇を試験しているがそれらの脂肪細胞への分化誘導作用との相関はどうか？

[回答 19] 理論上は分化誘導作用とアディポネクチン産生促進作用は相関するはずであるが、相関の見られないものもあった。従って、カルコンによるアディポネクチン産生促進作用は分化誘導作用によるものだけではないかもしれない。

[質問 20] カルコンの生体内吸収は30～60分でピークに達するということが、肝臓で代謝されたものに活性はないのか？

[回答 20] 他の研究機関の論文では、アグリコン型の血中動態については我々が行った結果と同様だった。また、カルコンはマウスの臓器ではほとんどアグリコンとして存在していることも報告されている。従って、明日葉カルコン類の作用は、細胞実験で示されたようにアグリコン型で作用していると思われる。

[質問 21] 長期摂取の間に肝臓でのカルコンに対する代謝力が亢進し、そのため不活性化され機能が低下することはないか？

[回答 21] 動物試験においてカルコン類が肝臓の薬物代謝酵素（CYP類）に影響を及ぼさないことを確認している。従って、カルコン自体の代謝能が変化したり、医薬品の代謝に明日葉は影響したりすることはないと考えられる。

[質問 22] 新規カルコン類が精製の過程で生じたアーティファクトである可能性はないのか？

[回答 22] 単離したカルコン類が明日葉中に存在することをLC-MSにより確認している。

[質問 23] 明日葉からの新規カルコンの単離に根を用いた理由は？

[回答 23] 葉にはクロロフィルが多く含まれており、カルコン類の精製作業上、それらを除くのが大変である。明日葉においては、葉と根で含有率は異なるが、成分はほとんど同じなので、根から抽出した。