

## TNF- $\alpha$ 感受性低減作用を指標とした香辛料由来生物活性成分の探索 —タイ天然薬物 *Piper chaba* の肝保護作用成分—

森川 敏 生

### Search for TNF- $\alpha$ Sensitivity Degradation Principles from Medicinal Foods —Hepatoprotective Amide Constituents from Thai Natural Medicine *Piper chaba*—

Toshio MORIKAWA

Pharmaceutical Research and Technology Institute Kinki University,  
3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka, Osaka 577-8502, Japan

(Received January 7, 2010)

Eighty percent (80%) aqueous acetone extract from fruit of *Piper chaba* (Piperaceae) was found to have a hepatoprotective effect on D-galactosamine (D-GalN)/lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in mice. Among the isolates, several amide constituents inhibited D-GalN/tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced death of hepatocytes, and the following structural requirements were suggested: i) the amide moiety was essential for strong activity; ii) the 1,9-decadiene structure between the benzene ring and the amide moiety tended to enhance the activity. Moreover, a principal constituent, piperine, exhibited strong *in vivo* hepatoprotective effect at a dose of 5 mg/kg, *p.o.* and its mode of action was suggested to depend on the reduced sensitivity of hepatocytes to TNF- $\alpha$ .

**Key words**—medicinal food; *Piper chaba*; hepatoprotective activity; TNF- $\alpha$  sensitivity degradation activity; piperine; amide constituent

#### 1. はじめに

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は当初腫瘍壊死因子として発見されたが、現在では生体防御機構において重要な役割を担っているサイトカインとして理解されている。すなわち TNF- $\alpha$  は、強力な炎症性サイトカインとして炎症性組織破壊や神経変性などに密接に関与し、その持続的かつ過剰な産生は種々の臓器や組織への障害を引き起こすとともに、リウマチやクローン病、各種アレルギー性疾患などの炎症性疾患の病態形成や糖尿病におけるインスリン抵抗性の形成などをもたらすことが知られている。<sup>1-4)</sup> そのため TNF- $\alpha$  の産生・放出の制御は、上述した疾患などの薬物療法の標的となり得ると考えられ、これまでに TNF- $\alpha$  の過剰産生を抑制する機能分子の探索が広く実施されるとともに、生物学的製剤（抗 TNF- $\alpha$  抗体）が開発され、リウマチやク

ローン病などの治療薬として臨床応用されている。<sup>5)</sup> このような背景のもとわれわれは、TNF- $\alpha$  の感受性を低減しその炎症性応答を軽減することで、過剰に産生された TNF- $\alpha$  により惹起される種々の疾病の予防及び改善に寄与すると考え、TNF- $\alpha$  感受性低減作用を有するシーズを天然由来低分子化合物から探索することとした。

#### 2. *Piper chaba* から TNF- $\alpha$ 感受性低減作用成分の探索

**2-1. TNF- $\alpha$  高感受性 L929 細胞を用いた抽出エキスの TNF- $\alpha$  誘発細胞障害抑制作用** TNF- $\alpha$  感受性低減作用を有するシーズ探索のスクリーニング手法として、TNF- $\alpha$  高感受性細胞株として知られているマウス由来の線維芽細胞である L929 細胞を用い、培地中に TNF- $\alpha$  を添加することにより誘発される細胞障害を MTT アッセイ法による細胞生存率を判定することで TNF- $\alpha$  感受性低減作用の指標とした。<sup>6,7)</sup> すなわち Fig. 1 に示すプロトコールに従い、各種和漢生薬、ハーブ及び薬用食品素材の抽出エキスについてスクリーニングした結果、タイにおいて“Dee Plee” と称し、去痰、鎮咳、健胃薬など

近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室 (〒577-8502 東大阪市小若江 3 丁目 4 番 1 号)

e-mail: morikawa@kindai.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会近畿支部奨励賞（化学系薬学）の受賞を記念して記述したものである。

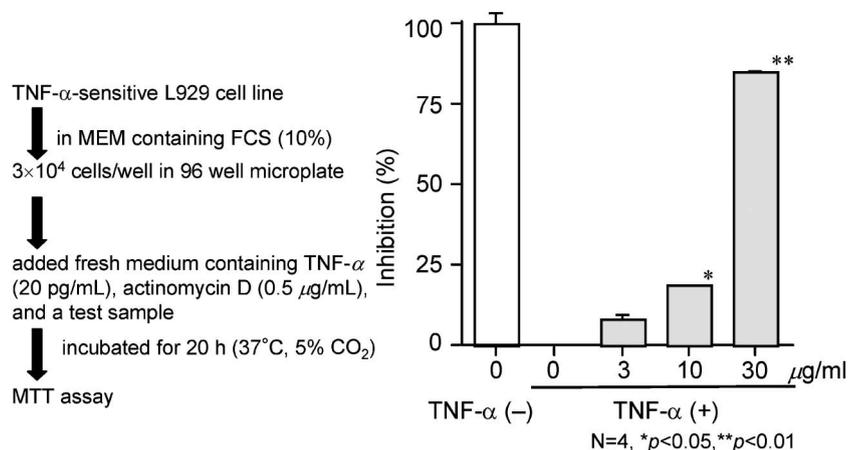


Fig. 1. Experimental Protocol and Effect of the Extract from Fruit of *P. chaba* on TNF- $\alpha$ /actinomycin D-induced Cell Death in L929 Cells

として用いられるとともに香辛料として食用にも供される薬用食品素材であるコショウ科 (*Piperaceae*) 植物 *Piper chaba* HUNTER (syn. *Piper retrofractum* VAHL.) 果穂部<sup>8)</sup>の80%含水アセトン抽出エキスに活性が認められた ( $IC_{50}=14 \mu\text{g/ml}$ ).

**2-2. *P. chaba* 抽出エキスの D-GalN/LPS 誘発マウス肝障害モデルを用いた肝保護作用** 上述したように TNF- $\alpha$  が各種臓器障害に関与していることは広く認識されているが、肝臓においては肝虚血/再灌流、ウイルス及びアルコールなどによって誘発される肝障害においても TNF- $\alpha$  の関与が知られている.<sup>9)</sup> したがって、TNF- $\alpha$  誘発細胞障害抑制作用スクリーニング試験において活性が認められた *P. chaba* 抽出エキスは、これらの肝障害を抑制する肝保護作用が期待される。そこで、マウスを用いた D-galactosamine (D-GalN)/lipopolysaccharide (LPS) 誘発肝障害に対する肝保護作用について検討したところ、*P. chaba* 抽出エキスは 25–50 mg/kg の経口投与において有意な血中トランスアミナーゼ活性 (sAST 及び sALT) の上昇を抑制することが見いだされた (Fig. 2)。本肝障害モデルは D-GalN によって障害を受けた肝細胞に、LPS により活性化されたマクロファージやクッパー細胞から産生する過剰な TNF- $\alpha$  などが作用することにより誘発されることが知られている。

そこで D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルにおける肝保護作用の作用点について、以下に示す *in vitro* 試験を実施した。すなわち *P. chaba* 抽出エキスについて、i) D-GalN 単独での肝細胞に対する障害抑

制作用試験として、マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN 誘発細胞障害抑制作用、ii) 活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの過剰産生に対する抑制作用の指標として、マウス腹腔マクロファージを用いた LPS 刺激による一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性及び iii) 肝細胞における TNF- $\alpha$  に対する障害抑制作用試験として、マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発細胞障害抑制作用を検討したところ、いずれの系においても活性が認められた (i.  $IC_{50}=18 \mu\text{g/ml}$ , ii.  $44 \mu\text{g/ml}$ , iii.  $11 \mu\text{g/ml}$ ).

**2-3. 活性成分の探索** *P. chaba* 抽出エキスに認められた肝保護作用の活性成分の探索を目的に、詳細な含有成分探索に着手した。その結果、piperchabamide A–H を含む計 37 種の酸アミド化合物 (1–37)、4 種の芳香族化合物 (38–41)、piperchabaoside A 及び B を含む 3 種のフェニルプロパノイド配糖体 (42–44) 及び 4 種のセスキテルペン (45–47) を得た (Scheme 1).<sup>10–13)</sup> これらのうち、piperchabamide A–H (1–8) 及び piperchabaoside A (42) 及び B (43) は新規化合物として見いだされ、その化学構造は各種 NMR 及び MS スペクトルなどのフィジカルデータの詳細な解析により構造決



森川敏生

近畿大学薬学総合研究所准教授。1972 年生まれ。京都薬科大学卒業。京都薬科大学大学院博士後期課程中退。2001 年京都薬科大学生薬学教室助手。2005 年近畿大学薬学総合研究所講師。2010 年より現職。生薬学、天然物化学、食品薬学。

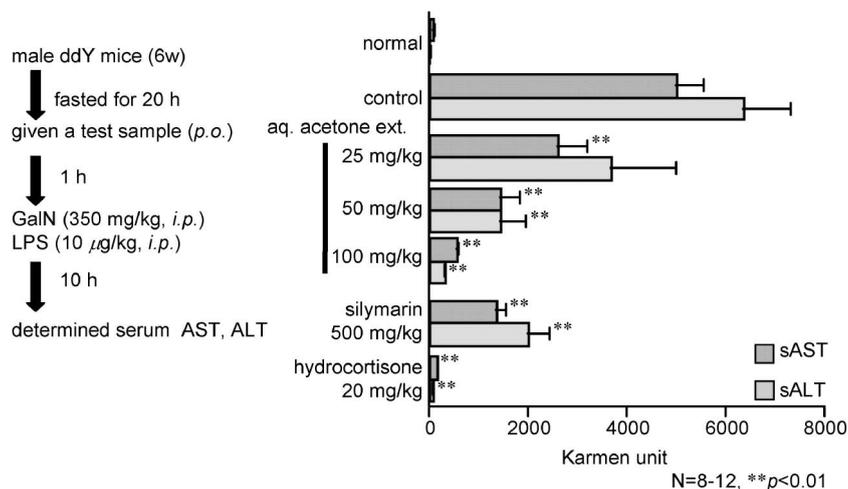


Fig. 2. Experimental Protocol and Protective Effect of the Extract from Fruit of *P. chaba* on D-GalN/LPS-induced Liver Injury in Mice

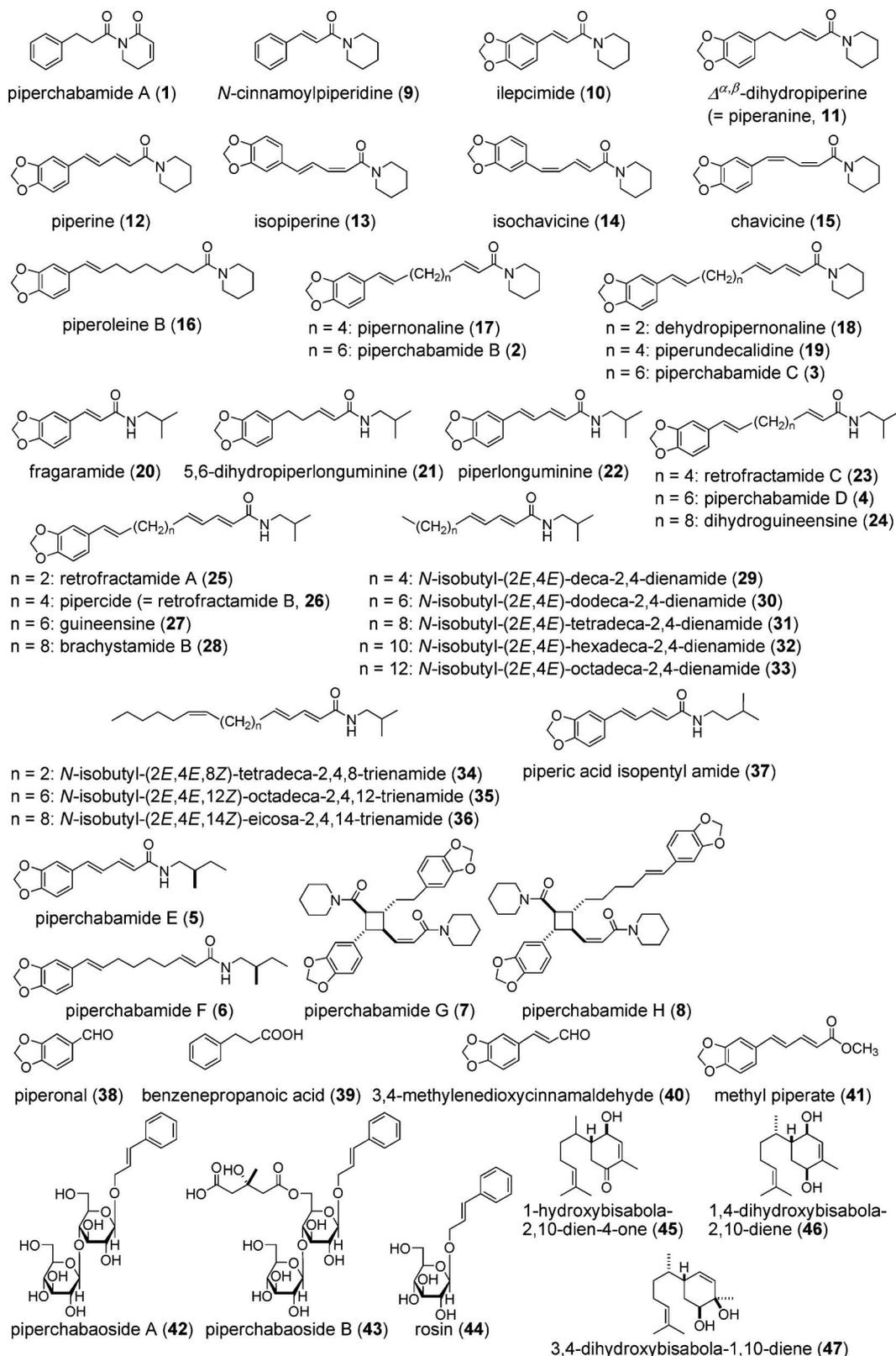
定した。

上述したように *P. chaba* 抽出エキスにマウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 評価試験である D-GalN 単独及び D-GalN/TNF- $\alpha$  により誘発される細胞障害抑制作用が、いずれも認められたことから含有成分についても同様に検討した。<sup>11,12)</sup> その結果、D-GalN 単独障害の系において、piperoleine B (**16**, IC<sub>50</sub>=2.9  $\mu$ M), *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (**30**, 9.3  $\mu$ M) 及び *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*, 14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (**36**, 6.4  $\mu$ M) に活性が認められた。これらの活性強度は、ドイツにおいて植物療法として肝機能改善などに用いられている天然薬物のオオアザミ (マリアアザミ, *Silybum marianum*)<sup>14,15)</sup> に含有される活性成分の silybin (39  $\mu$ M) と比較して強いものであった。<sup>16,17)</sup> 一方、D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発障害の系においては、ほとんどの酸アミド成分に 1–30  $\mu$ M の濃度において有意な細胞障害抑制活性が認められ、とりわけ、piperchabamide B (**2**, inhibition: 63% at 3  $\mu$ M) 及び D (**4**, 57%), piperlonguminine (**22**, 50%), retrofractamide C (**23**, 51%) 及び pipericide (=retrofractamide B, **26**, 54%) は、3  $\mu$ M において 50% 以上の障害抑制活性が認められた (IC<sub>50</sub>  $\leq$  3  $\mu$ M)。また、piperchabamide A (**1**, IC<sub>50</sub>=14  $\mu$ M), C (**3**, 6.7  $\mu$ M), E (**5**, 4.9  $\mu$ M), G (**7**, ca. 4  $\mu$ M) 及び H (**8**, ca. 11  $\mu$ M),  $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (=piperanine, **11**, 17  $\mu$ M), piperine (**12**, 12  $\mu$ M), **16** (17  $\mu$ M), piperundecalidine (**19**, 11  $\mu$ M) 及び 5,6-dihydropiperlonguminine (**21**, 8.2  $\mu$ M) に silybin

(15  $\mu$ M) と同程度あるいはそれ以上の活性が認められた。これら含有酸アミド化合物と D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発細胞障害抑制作用との構造活性相関について以下の知見が示唆された。i) 酸アミド構造の存在は活性発現に必須である [methyl piperate (**41**, inhibition: 21% at 30  $\mu$ M) < **12** (68%)] 及び ii) 芳香環と酸アミド構造との間の側鎖部が 1,9-デカジエン構造を有する化合物 (**2**, **4**) が最も強い活性が認められるなど、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などが推察された。

次に、活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの過剰産生に対する抑制作用の指標としてマウス腹腔マクロファージを用いた LPS 刺激による NO 産生抑制活性試験を検討した。<sup>12,18,19)</sup> その結果、**1** (IC<sub>50</sub>=20  $\mu$ M), **3** (42  $\mu$ M) 及び **7** (28  $\mu$ M) に陽性対照剤である NO 合成酵素阻害剤の *N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 36  $\mu$ M) よりも強い活性が認められた。これらの知見から *P. chaba* に含有される肝保護作用成分として Fig. 3 に示すように、i) D-GalN 誘発肝細胞障害抑制作用成分 (**16**, **30**, **36**), ii) LPS 誘発マクロファージ活性化抑制作用成分 (**1**, **3**, **7**) 及び iii) D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞障害抑制作用成分 (**2**, **4**, **22**, **23**, **26** など) が見い出された。

加えて、*P. chaba* 含有成分の TNF- $\alpha$  に対する感受性に及ぼす影響について明らかにする目的で、抽出エキス同様に L929 細胞を用いた TNF- $\alpha$  誘発細



Scheme 1.

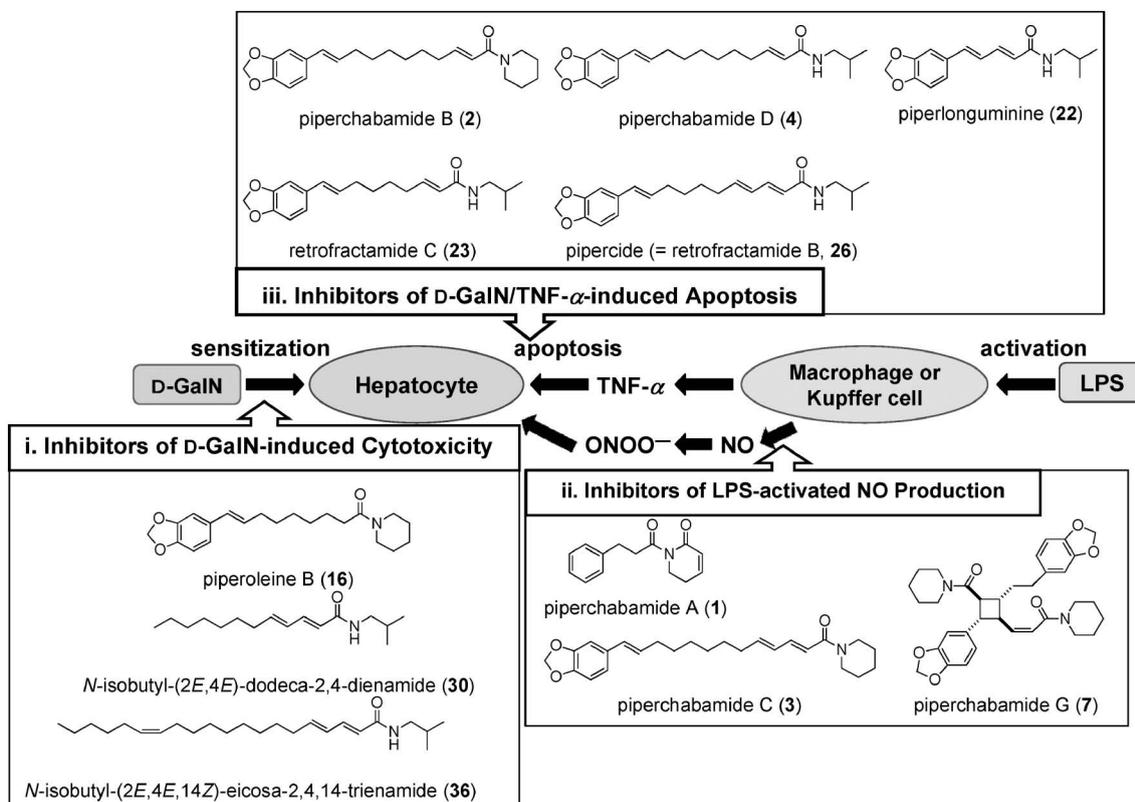


Fig. 3. Mode of Action of D-GalN/LPS-induced Liver Injury in Mice

胞障害抑制作用試験を実施した。<sup>12)</sup> その結果, **1** ( $IC_{50}=13 \mu M$ ), **2** ( $33 \mu M$ ), **3** ( $42 \mu M$ ), **12** ( $42 \mu M$ ), **16** ( $64 \mu M$ ) 及び **36** ( $25 \mu M$ ) に活性が認められた。とりわけ, **1** は陽性対照として用いたウコン (*Curcuma longa*) 由来の肝障害抑制作用成分の curcumin<sup>20-22)</sup> ( $IC_{50}=20 \mu M$ ) と同程度の活性を示した。

**2-4. Piperine (12) の肝保護作用及び TNF- $\alpha$  感受性低減作用** *P. chaba* と同じく *Piper* 属植物で, ポピュラーな香辛料素材であるコショウ (*P. nigrum* L., 果実) やインドナガコショウ (ヒハツ, *P. longum*, 果穂) などの近縁植物にも主要成分として含有されている piperine (**12**) は, これらの辛味成分としても広く認知されている。<sup>23)</sup> そこで, **12** についてマウスを用いた D-GalN/LPS 誘発肝障害に対する肝保護作用を検討したところ, Fig. 4 に示すように 5 mg/kg の経口投与において有意な肝保護作用が認められた。本肝障害モデルにおいては, LPS 刺激によりマクロファージやクッパー細胞から TNF- $\alpha$  が過剰産生され肝細胞障害が惹起される。そこで, マウスに D-GalN/LPS 投与 1.5 時間後の血中 TNF- $\alpha$  濃度に及ぼす影響について検討し

た。その結果, **12** は肝保護作用が認められた投与量よりも高用量である 20 mg/kg の経口投与群においても, 血中 TNF- $\alpha$  濃度にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。また, 上述の初代培養肝細胞及び L929 細胞を用いた各種 *in vitro* 細胞障害抑制作用において, **12** は Fig. 4 に示すように TNF- $\alpha$  により誘発される細胞障害を抑制していることが明らかとなっている。以上のことから, D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルにおいて **12** は, TNF- $\alpha$  産生量に影響を与えずに TNF- $\alpha$  への感受性を低減することにより肝細胞への TNF- $\alpha$  障害を抑制するといった作用メカニズムを有することが示された。このような TNF- $\alpha$  感受性低減作用を示す低分子化合物は, これまでにわれわれの知る限りほとんど報告されておらず,<sup>7)</sup> TNF- $\alpha$  障害により誘発される種々の疾病に対する新たな医薬シーズになり得るものと考えている。

### 3. おわりに

和漢生薬や世界各地の伝統薬物など, 古くから薬用に供される天然素材 (薬材) の中には, 薬用のみならず食用にも供されることがしばしば認められ

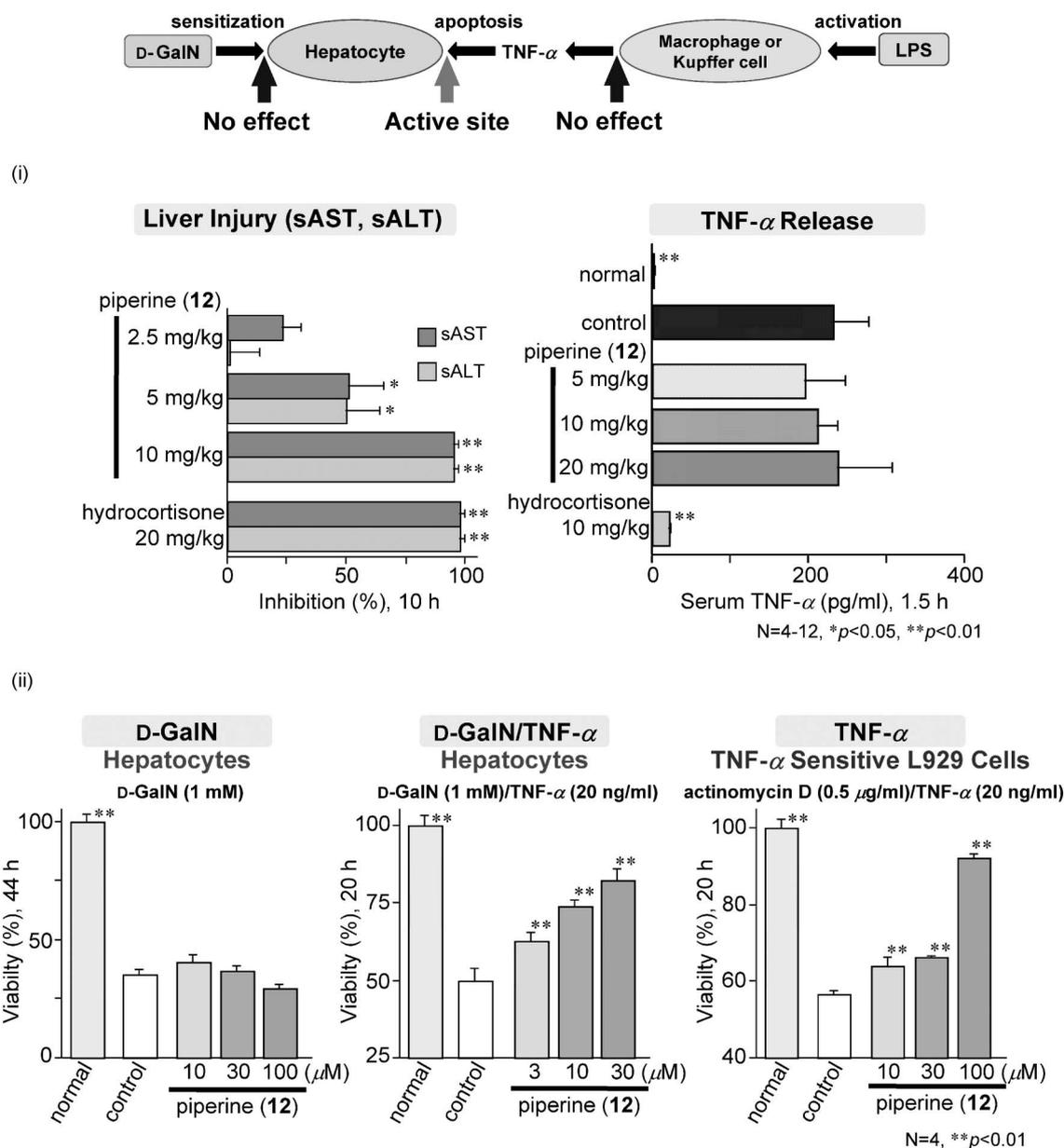


Fig. 4. Hepatoprotective Activity of Piperine (12) and Its Mechanisms of Action

(i) Effects on liver injury and serum TNF- $\alpha$  elevation induced by D-GaIN/LPS in mice, (ii) Effects on D-GaIN or D-GaIN/TNF- $\alpha$ -induced cell death in primary cultures mouse hepatocytes and TNF- $\alpha$ -induced cell death in L929 cells.

る。このような薬材にも利用される食品素材(食材)はまた、農産物としての一面も持ち合わせており安定供給が可能である。とりわけ“薬味”などとして料理の風味付けなどに用いられる香辛料は、比較的薬材の要素の強い有用素材と考える。今回、タイなどの東南アジア地域にて香辛料として用いられる薬用食品 *P. chaba* から TNF- $\alpha$  感受性低減作用を有する酸アミド成分が得られるとともに、新たな生物活性としてマウスを用いた D-GaIN/LPS 誘発肝障害抑制作用を見出した。その活性成分のひとつで、

同様に香辛料として広く世界中で利用されている同属植物であるコショウやナガコショウなどと共通の辛味成分である piperine (12) に強い肝保護作用を見出すとともに、LPS 投与などにより活性化されたマクロファージやクッパー細胞からの TNF- $\alpha$  産生量に影響を与えずに、その感受性を低減することにより細胞障害を抑制するといった、TNF- $\alpha$  感受性低減作用を有することを明らかにした。今後、piperine (12) などの酸アミド成分をシーズとして創薬研究が展開されることを期待したい。

**謝辞** 本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学生薬学分野、吉川雅之教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の全般にわたりご助言、ご協力を頂きました京都薬科大学生薬学分野 松田久司准教授に心より感謝いたします。さらに本研究の遂行にあたりご協力頂いた近畿大学薬学総合研究所 二宮清文博士を始め多くの大学院学生及び学部学生諸氏に感謝いたします。本研究は文部科学省私立大学高度化推進事業ハイテク・リサーチ・センター整備事業(2007-2011)、科学研究費補助金若手研究 (B)、財団法人武田科学振興財団の助成により行われたものであり、ここに深謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Hide I., *Nippon Yakurigaku Zasshi.*, **121**, 163–173 (2003).
- 2) Wang Y., Singh R., Lefkowitz J. H., Rigoli R. M., Czaja M. J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 15258–15267 (2006).
- 3) Tilg H., Day C. P., *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **4**, 24–34 (2007).
- 4) Seronello S., Sheikh M. Y., Choi J., *Free Radical Biol. Med.*, **43**, 869–882 (2007).
- 5) Sugita T., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 19–24 (2009).
- 6) Humphreys D. T., Wilson M. R., *Cytokine*, **11**, 773–782 (1999).
- 7) Uboldi A. D., Savage N., *Cytokine*, **19**, 250–258 (2002).
- 8) Tewtrakul S., Hase K., Kadota S., Namba T., Komatsu K., Tanaka K., *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 603–608 (2000).
- 9) Lucey M. R., Mathurin P., Morgan T. R., *N. Engl. J. Med.*, **360**, 2758–2769 (2009).
- 10) Morikawa T., Matsuda H., Yamaguchi I., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., *Planta Med.*, **70**, 152–159 (2004).
- 11) Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yasuda D., Yamaguchi I., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2038–2042 (2008).
- 12) Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yasuda D., Yamaguchi I., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7313–7323 (2009).
- 13) Morikawa T., Yamaguchi I., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1292–1295 (2009).
- 14) Kitagawa I., Yoshikawa M., “*Shokuhin-yakugaku Handbook*,” Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, 2005, pp. 193–194.
- 15) “*Natural Standard Herb & Supplement Reference: Evidence Based Clinical Reviews*,” eds. by Ulbricht C. E., Basch E. M., Sunchoh Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2007, pp. 158–175.
- 16) Feher J., Deak G., Muzes G., Lang I., Niederland V., Nekam K., Kartesz M., *Orv. Hetil.*, **130**, 2723–2727 (1989).
- 17) Skottova N., Krecman V., *Physiol. Res.*, **47**, 1–7 (1998).
- 18) Matsuda H., Kiyohara S., Sugimoto S., Ando S., Nakamura S., Yoshikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 147–149 (2009).
- 19) Yoshikawa M., Morikawa T., Oominami H., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 957–964 (2009).
- 20) Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 339–344 (1998).
- 21) Matsuda H., Morikawa T., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 909–916 (2001).
- 22) Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 627–631 (2002).
- 23) Yoshikawa M., *Shokuhin to Kagaku*, **48**, 25–27 (2006).