

博士論文

代謝性疾患リスク低減への応用を目指した

食品成分の機能解析

堀場 太郎

## 目次

第1章 序論	4
第2章 トマト果皮に含まれるナリンゲニンカルコンによる脂肪細胞代謝プロ ファイル調節機能	23
第1節 緒言	24
第2節 実験方法	24
第3節 結果	29
第4節 考察	32
第3章 ユズ種子に含まれるオバクノンの肥満、高血糖改善作用	52
第1節 緒言	53
第2節 実験方法	53
第3節 結果	58
第4節 考察	61
第4章 マンゴスチンに含まれる $\alpha$ -マンゴスチンの筋分化促進作用	72
第1節 緒言	73
第2節 実験方法	73
第3節 結果	77
第4節 考察	80
第5章 総合討論	94
引用文献	104
原著論文	121
要旨	122
謝辞	127

略語

13-HODE	:13-hydroxyoctadecadienoic acid
15d-PGJ <sub>2</sub>	:15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J <sub>2</sub>
9-HODE	:9-hydroxyoctadecadienoic acid
AMPK	:5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
ATF3	:activating transcription factor 3
BMP	:bone morphogenetic protein
CDK5	:cyclin-dependent kinase 5
CRE	:cAMP response element
DAVID	:Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEGs	:differentially expressed genes
DFW	:distribution free weighted
DMEM	:Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	:dimethyl sulfoxide
DPPIV	:dipeptidyl peptidase IV
ELISA	:enzyme linked immunosorbent assay
FATP	:fatty acid transport protein
FBS	:fetal bovine serum
FDR	:false discovery rate
GLP-1	:glucagon like peptide 1
GCOS	:genechip operating software
GO	:gene ontology
GPCR	:G protein-coupled receptor
HPLC	:high performance liquid chromatography
LBD	:ligand binding domain
LPL	:lipoprotein lipase
MCP-1	:monocyte chemoattractant protein-1

MEF2	:myocyte enhancer factor 2
MRFs	:myogenic regulatory factors
PEPCK	:phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPAR $\gamma$	:peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PPRE	:PPAR response element
qFARMS	:factor analysis for robust microarray summarization
RGMB	:repulsive guidance molecule family member B
RXR $\alpha$	:retinoid X receptor $\alpha$
SGLT1	:sodium glucose cotransporter 1
TBEs	:TCF/LEF1 binding elements
TGF- $\beta$	:transforming growth factor- $\beta$
TLC	:thin layer chromatography
TLCA	:taurocholic acid
TNF- $\alpha$	:tumor necrosis factor- $\alpha$

第1章  
序論

## 研究の背景

健康状態を示す包括的指標のひとつとして考えられる平均寿命は、日本において戦後急速に延伸し、1984年より今日まで、世界トップクラスの水準を維持している。このような平均寿命延伸の背景には、感染症の激減と、それに反するような生活習慣病の増加といった疾病構造の変化がある。さらに近年になり、寝たきりや痴呆といった、高齢化に伴う機能障害の増加も認められるようになった。これらの疾病や機能障害は生命を奪うのみならず、身体機能の低下や生活の質の低下を招くものが多く、これらの予防・改善にあたっては日常生活の質をいかに維持するかが重要な課題となる。

平均寿命が延伸する一方で、急速な出生率の低下により高齢化が進展し、平成32年(2020年)には4人に1人が、平成62年(2050年)には3人に1人が65歳以上になるという超高齢社会になり、人口が1億人を切ることが、21世紀における国民健康づくり運動「健康日本21」において予測・言及されている。このような、人類が未だ経験したことのない超高齢社会においては、疾病による負担が極めて大きな社会となることが予測される。即ち、高齢化に伴う上記のような疾病、機能障害の増大に伴い、これらの治療や介護の必要性がますます増加し、その社会的負担が経済成長を大きく上回るようになることが懸念される。既に平成22年度国民医療費において、年齢階級別に医療費額を見ると65歳以上で20兆円を超え、全体の55.4%を使用するまでになっており、今後この割合はさらに上昇するものと予想される。こうした事態を回避するためにも、生活習慣病や高齢化に伴う機能障害の予防・軽減による社会的負担を軽減することが強く求められるようになってきている。上記のような生活習慣病、高齢化に伴う機能障害の予防・改善のためには、個人が継続的に生活習慣を改善することで積極的に健康を増進してゆくことが肝要であると考えられ、そうした対策の一環として、2008年4月から、特定健康診断・特定保健指導制度を導入することで個人の行動変容を促す試みが開始されており、そのなかでも適切な食や運動習慣が推奨されている。

このように、超高齢社会を迎えようとしている日本において、疾病や機能障

害による負担やリスクの低減を考えるにあたり、「食」が寄与するところは大きいと考えられる。我々が普段口にする食品の役割、機能には、生命の維持のための1次機能、美味しさ・嗜好性の2次機能に加え、健康維持・疾病リスク低減の3次機能があるとされるが、とりわけ3次機能については1980年代半ばに文部省重点領域「機能性食品」研究班が立ちあげられたことに端を発し、現在に至るまで様々なアプローチで研究が行われ、知見が蓄積されてきている。食の3次機能は、毎日摂取するという食の基本的特性から、薬剤に比べて単回の摂取における効果が大きくなくとも、積み重ねにより機能発現することが期待でき、上記のような個人の生活習慣・行動変容を介した生活習慣病や高齢化に伴う機能障害の予防・改善策として有望であると考えられる。

このことから、食の機能性を活用した健康維持・疾病リスク低減は、超高齢社会において、医療費増大をはじめとした社会的負担を抑制しながら効果が期待できるアプローチの一つと考えられる。平成22年度国民医療費において、脳血管疾患や高血圧性疾患などの推計患者数が65歳以上で多く、要介護度別にみた介護が必要となった主な原因も脳血管疾患をはじめとした生活習慣病が3割を占めること、及び、厚生労働省の調査結果において、特定健康診断・特定保健指導制度において、メタボリックシンドローム該当者であった者の年間平均医療費は、非該当者よりも約9万円高いという結果が報告されていることを鑑みると、こうした代謝性疾患のリスクを食によりある程度コントロールすることができれば、医療費増大をはじめとした社会的負担軽減に貢献できる可能性が期待できる。

## 脂肪組織

肥満、あるいは過剰な内臓脂肪の蓄積は冠動脈性疾患、2型糖尿病あるいはメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患のリスクファクターとなることが知られている (Matsuzawa Y, 2006)。多くの研究から、脂肪組織は単に過剰なエネルギーを脂質として蓄積するだけでなく、アディポサイトカインとして知られる多様な生理活性物質を分泌する内分泌器官としての側面を持つことが明らか

となってきた (Fig.1-1)。アディポサイトカインは摂食調節、インスリン感受性、エネルギー代謝などにおいて重要な役割を担っていることが報告されている (Fasshauer M and Paschke R, 2003)。肥満状態の脂肪組織では、マクロファージの浸潤 (Weisberg SP et al, 2003)、インスリン抵抗性に関与している tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現の増加が認められる一方で (Hotamisligil GS et al, 1993; Sartipy P and Loskutoff DJ, 2003)、インスリン抵抗性改善作用や抗炎症作用を示すアディポネクチンの発現は低下している (Yamauchi T et al, 2001; Diez JJ and Iglesias P, 2003)。これらの知見から、脂肪組織におけるアディポサイトカイン分泌を適切に調節することは、メタボリックシンドロームなどの肥満に関連した代謝性疾患のリスクコントロールに寄与するものと考えられる。

## 骨格筋

上述したように、メタボリックシンドロームをはじめとした代謝性疾患との関連を考える上で脂肪組織は重要な役割を担っていると考えられるが、一方で、安静時エネルギー消費量の 20%超を占める骨格筋 (Gallagher D et al, 1998) もまた、大きな影響を持つ器官であると考えられる。高齢化や傷害、疾病による長期の寝たきりでしばしば引き起こされる骨格筋の萎縮、機能低下は生体の運動機能を大きく減弱させ、ヒトの深刻な QOL 低下につながることで問題となっている。こうした背景から、骨格筋を含む、運動器の障害による要介護の状態や要介護リスクの高い状態を表す概念として、ロコモティブシンドロームが日本整形外科学会により提唱され、骨格筋を含む運動器の機能維持の重要性が啓発されている。

骨格筋の合成は、単核細胞の増殖、細胞周期からの離脱、細胞融合による筋管の形成、そしてそれに引き続いて起こる筋管から筋繊維への成熟からなる、複雑なプロセスである。この筋分化の過程は、多様な細胞プロセスの相互作用によって成り立っている (Weintraub H et al, 1991; Chambers RL and McDermott JC, 1996; Perry RL and Rudnick MA, 2000)。筋芽細胞が増殖を続けるか、あるいは筋



分化の過程に移行するのには、細胞周期制御因子によってコントロールされている。通常の細胞周期から離脱した後、筋芽細胞は互いに融合することによって多核の筋管を形成するが、この過程は、ミオシン重鎖、軽鎖のような筋分化マーカーの発現と深い関わりを持っている。このように、筋分化の過程についてはこれまでに様々な研究がおこなわれてきているが、これらのプロセスに関与している個々の反応やそれらの相互作用については未だ十分に解明されていない。

上述した脂肪組織や骨格筋の機能不全に関与する代謝性疾病の予防・改善策として、日常の定期的な運動を含むライフスタイルの変容は有効な手段ではあるものの、運動習慣を継続させるには強いモチベーションが必要であり、これがライフスタイルの変容、行動介入を困難にさせている大きな原因となっている。こうした理由から、代謝性疾病の効果的な予防・改善につながる、あるいは補助する治療・介入の確立には大きな関心が寄せられている。

## PPAR $\gamma$

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は核内受容体型の転写因子であり、同じく核内受容体型の転写因子である retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) とヘテロダイマーを形成し、PPAR-responsive element (PPRE) に結合する (Fig.1-2)。PPARには $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ のサブファミリーが存在するが、特に脂肪細胞において高い発現が認められるのがPPAR $\gamma$ であり、その分化過程や成熟した脂肪細胞の特性維持において重要な役割を担っている (Rosen ED et al, 1999; Tamori Y et al, 2002)。PPAR $\gamma$ の標的遺伝子として、aP2、lipoprotein lipase (LPL)、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、fatty acid transport protein (FATP)、perilipinのほか、後述するアディポネクチンなど、脂質代謝制御を語る上で欠かせない遺伝子群が名を連ねていることから、PPAR $\gamma$ は脂質代謝のマスターレギュレーターであると考えられている。

PPAR $\gamma$ の転写活性はリガンド依存的に調節されており、内因性のリガンドとして、15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) や、9-hydroxyoctadecadienoic

acid (9-HODE)、13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) が報告されている (Forman BM et al, 1995; Kliewer SA et al, 1995; Nagy L et al, 1998)。また、合成アゴニストであるチアゾリジン誘導体類は PPAR $\gamma$  の転写活性を上昇させ、上記の脂質代謝や糖質代謝に関わる遺伝子群の発現を制御することによって脂肪細胞の機能を改善することが知られており (Ferre P, 2004)、こうした特性から 2 型糖尿病の治療薬として用いられているものも存在する。

### アディポネクチンとアディポネクチン受容体

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌され、VIII 型及び X 型コラーゲンと相同性の高いコラーゲン様ドメインと、補体 C1q との相同性の高い球状ドメインを有するアディポサイトカインの 1 種である。他のアディポサイトカインに比べても血中濃度は高く、単量体が結合した 3 量体を基本的な構造として、6 量体、12~18 量体を形成して血中に存在していることが明らかになっている (Oh DK et al, 2007)。血中アディポネクチン濃度は病的な肥満状態では低下し、逆に肥満からの減量、あるいはインスリン抵抗性改善薬により上昇することが明らかとなっている (Kadowaki T and Yamauchi T, 2005; Oh DK et al, 2007)。アディポネクチンは冠動脈性心疾患や 2 型糖尿病、メタボリックシンドロームなどの代謝性疾患リスクに大きく関与している (Bik W and Baranowska B, 2009; Swellam M et al, 2009) ほか、その受容体をノックアウトされた個体は野生型に比べて有意に短命となること (Okada-Iwabu M et al, 2013)、及び、アディポネクチン過剰発現マウスは長寿となることが報告されている (Yamauchi T and Kadowaki T, 2013)。これらの知見から、アディポネクチンは代謝性疾患に関わる因子の中でも特に重要な役割を果たすキープレイヤーとして注目を集めている。

アディポネクチンは、細胞膜上に存在する AdipoR という受容体に結合することにより機能を発揮する (Kadowaki T and Yamauchi T, 2005)。AdipoR は現在までに AdipoR1、AdipoR2 の 2 種が同定されており (Yamauchi T et al, 2003)、AdipoR1 の活性化は、5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 経路を活性化する一方、AdipoR2 の活性化は、PPAR $\alpha$  を活性化することが明らかとなっ

ている。AdipoR はこれら下流のシグナル活性化を介して糖取り込みの促進作用や脂肪酸酸化の亢進作用を示すと考えられている (Fig.1-3)。

近年、AdipoR に作用し、アディポネクチンの機能を模倣・代替する物質の探索に関心が集まっており、アディポネクチンと配列上の相同性はないものの立体構造上の相同性が認められる、植物のストレス応答タンパク質であるオスモチン (Min K et al, 2004) が、AdipoR に結合して AMPK 経路を活性化することが報告されている (Narasimhan ML et al, 2005)。また、AdipoR に作用して AMPK や PPAR $\alpha$  経路を活性化する低分子化合物として AdipoRon が見出されている (Okada-Iwabu M et al, 2013)。

## TGR5

TGR5 は G タンパク質共役受容体 (GPCR) メンバーの 1 つであり、胆汁酸であるリトコール酸により活性化される受容体として同定された (Maruyama T et al, 2002; Kawamata Y et al, 2003)。GPCR は 7 回膜貫通型の構造を持つ細胞膜局在タンパク質であり、低分子化合物やホルモンなどのシグナルを受容し、G タンパク質との共役を介して下流へとシグナルを伝達するタンパク質である。現在までに多数の GPCR が同定されており、多くの細胞応答プロセスに関与していることが明らかになっているが、依然としてその機能や内在性のリガンドが不明なオーファンレセプターのままとなっているものも多い。現在使用されている治療薬の多くは GPCR を標的としたスクリーニングから見出されており、創薬のターゲットとして注目を集め続けている。

TGR5 は胆のう、回腸、褐色脂肪組織や骨格筋などの様々な組織で発現が認められており、胆汁酸の結合により活性化され、細胞内の cAMP 濃度の上昇を介して下流へとシグナルを伝達する (Fig.1-4)。胆汁酸による TGR5 シグナル経路の活性化は、高脂肪食負荷時における体重増加や肝障害を抑制し (Watanabe M et al, 2006; Thomas C et al, 2009)、小腸における glucagon like peptide 1 (GLP-1) 分泌誘導を介して糖代謝改善に資することが示唆されている (Katsuma S et al, 2005)。このような特性から、TGR5 の活性化は、代謝性疾病の予防・改善に向けた有望

なストラテジーの一つであると期待される。現在までに、複数の天然由来の化合物が TGR5 のリガンドとして報告されており、オレアノール酸、ベツリン酸がリガンド活性を示すことが報告されている (Sato H et al, 2007; Genet C et al, 2010; Genet C et al, 2010)。

### Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーとミオスタチン

TGF- $\beta$  スーパーファミリーは細胞周期調節や細胞分化、細胞接着、骨形成、創傷治癒など、実に多岐にわたる細胞応答プロセスを調節するリガンドグループである (Kingsley DM, 1994; Hogan BL, 1996; Massague J, 2000; Attisano L and Wrana JL, 2002)。TGF- $\beta$  スーパーファミリーのオルソログは線虫からヒトに至るまで種を超えて広く保存されており、関与している生体調節プロセスが進化上も重要であったことを物語っている。TGF- $\beta$  スーパーファミリーは、哺乳類においては互いに関連、あるいは類似しながらも重複はしない生理機能の調節に関わる、TGF- $\beta$ 、アクチビン/インヒビン/ノーダル、及び bone morphogenetic protein (BMP) からなる3つの主要なサブファミリーに分類される (Shi Y and Massague J, 2003; Dennler S et al, 2002)。TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属するリガンドの多くは組織特異的な発現パターンを示し、オートクライン/パラクラインを含む内分泌経路により作用する。

ミオスタチンは TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属するリガンドであり、主に骨格筋に発現が認められ、骨格筋の成長を負に制御する (McPherron AC et al, 1997)。ほとんどの TGF- $\beta$  スーパーファミリーリガンドがそうであるように、ミオスタチンもまた不活性型の前駆体として合成される。C末端側のジスルフィド結合を介してホモダイマーを形成した後、プロセッシングを受けることで活性型へと変化する (Massague J, 1998)。ミオスタチンの過剰発現は筋萎縮を誘導する一方、ミオスタチンの機能破壊により骨格筋重量が増加することが報告されている (Zimmers TA et al, 2002; McPherron AC et al, 1997)。骨格筋に成長ホルモンが作用するとミオスタチンの発現は抑制されることから、成長ホルモンによってもたらされる骨格筋の同化作用の少なくとも一部は、ミオスタチン経路を介して発

揮されている可能性が指摘されている (Liu W et al, 2003)。また、成長ホルモンとは逆に、異化作用を促進するグルココルチコイドは骨格筋に作用してミオスタチンの発現を亢進することから、発現亢進したミオスタチンの生理機能がグルココルチコイドによる筋萎縮に関与していると考えられている (Schakman O et al, 2009)。これらの知見から、ミオスタチン経路を抑制することが、サルコペニアや筋ジストロフィーなど、筋萎縮を伴う疾病の治療につながるのではないかと期待されている。この可能性を裏付けるかのように、Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスを用いた検討において、ミオスタチンの抑制により骨格筋の増大が認められたとの報告がなされている (Amthor H and Hoogaars WM, 2012)。

#### トマトとナリンゲニンカルコンについて

トマトは南アメリカ大陸のアンデス山脈原産の野菜であり、ビタミンやミネラル、カロテノイドやフラボノイドといった抗酸化物質などの、健康維持に有用な栄養素を豊富に含んでいる。事実、トマトを日常的に摂取することにより、心血管疾患の発症が抑えられることが報告されている (Pandey DK et al, 1995) ほか、2 型糖尿病患者における血小板凝集を抑制することが報告されている (Lazarus SA et al, 2004)。

トマトは色による分類ではピンク系トマトと赤系トマトに大別することができ (Fig.1-5)、日本ではピンク系トマトは主に生食用とされ、赤系トマトは主に加工用に用いられている。

ナリンゲニンカルコンはトマトに含まれる特徴的なフラボノイドの一種で、主に赤系トマトの果皮に蓄積され、果肉、種子部にはほとんど蓄積が認められないというユニークな特徴がある。植物体の中でのナリンゲニンカルコンは、カルコンイソメラーゼによりナリンゲニンへと変換され、様々なフラボノイド類合成へとつながる代謝経路上の化合物として存在している。多くのフラボノイド類は、植物体内では糖と結合した配糖体の状態で存在しているが、トマト中のナリンゲニンカルコン及びナリンゲニンは糖と結合していないアグリコン

として存在しており、この点も他のフラボノイド類とは異なったユニークな特性であると言える。ナリングニンカルコンの生理機能として、ヒスタミン遊離抑制作用を介し、アレルギー反応を抑制することが明らかとなっている (Yamamoto T et al, 2004) ほか、マクロファージにおける TNF- $\alpha$  や MCP-1 といった炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている (Hirai S et al, 2007)。

#### ユズとリモノイドについて

ユズはアジア北東部を原産とする香酸柑橘の一種である。一般的な柑橘が主に果肉部、あるいは搾汁して得られる果汁を食品として利用するのに対し、ユズは果皮を香辛料や薬味として用いるほか、血流改善や風邪に対する伝統薬としても用いられてきた経緯があるなど、果肉部以外にも広く活用されてきた。伝統薬としての用途を裏付けるように、ユズ抽出物には抗血小板作用があることが報告されている (Yu HY et al, 2011)。

リモノイドは柑橘類に存在するトリテルペン誘導体の総称であり、リモノイドアグリコン、及びその配糖体が種子や果肉部に蓄積することが知られている (Hasegawa S et al, 1989; Fong CH et al, 1989)。リモノイド類の存在比は柑橘の種により様々に異なっておりバラツキが認められるものの、主要なリモノイドはリモニンとノミリンであり、デアセチルノミリンやオバクノンがそれらに次いで存在している (Fig.1-6)。リモノイド類の生理活性については現在までに様々な検討がなされており、抗ガン、抗マラリア、抗菌作用などが報告されている (Roy A and Saraf S, 2006; Manners GD, 2007)。この他、上述した TGR5 に対するリモノイドの活性についても検討が行われており、ノミリンが TGR5 リガンドとして作用する一方で、リモニンにはその活性が認められないこと、及び、高脂肪食負荷時におけるノミリンの摂取が食事誘導性肥満や高血糖の予防に有効であることが報告されている (Ono E et al, 2011)。オバクノンはリモノイド生合成経路において、ノミリンやイチャンジンなどとともにリモニン合成へのステップ上の中間体として位置づけられており、発がん物質による発がん誘導のリスクを

低減することが報告されている (Tanaka T et al, 2001)。

#### マンゴスチンとキサントン

マンゴスチンは東南アジア原産の熱帯性の常緑樹である。マンゴスチンの果皮や果実は東南アジアにおいて長年伝統薬として、下痢、赤痢、皮膚感染症、炎症、高熱などの治療に用いられてきた (Pedraza-Chaverri J et al, 2008; Obolskiy D et al, 2009)。マンゴスチンは、キサントン類という、3環構造のポリフェノールを多量に含んでおり、これが上記のような薬理作用に寄与しているものと考えられている。一般的に、キサントンはごく一部の高等植物に含まれることが知られており、少なくともマンゴスチンには68種類の類縁体が含まれていることが確認されている (Obolskiy D et al, 2009)。マンゴスチン果皮に含まれる主要なキサントンは $\alpha$ -マンゴスチンと $\gamma$ -マンゴスチンであり (Fig.1-7)、中でも $\alpha$ -マンゴスチンは最も広く、様々な生理活性について研究されているキサントンである (Walker EB, 2007)。現在までに、 $\alpha$ -マンゴスチンの抗アポトーシス作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗酸化作用などが報告されている (Gutierrez-Orozco F and Failla ML, 2013)。

#### 本研究の目的

冒頭に述べたように、超高齢社会を今まさに迎えようとしている日本において、食の機能性を活用した健康維持・疾病リスク低減は、医療費増大をはじめとした社会的負担を抑制しながら効果が期待できるアプローチの一つと考えられる。そこで、本研究では、社会的負担の潜在的な増加要因として大きな地位を占めると考えられるメタボリックシンドローム、ロコモティブシンドロームをはじめとした代謝性疾病リスクを食の機能性により低減できることを目指し、我々の研究グループが過去に行った検討結果より着目した、食品由来の成分の機能性について検討を行った。

第2章では、メタボリックシンドロームの病態基盤である内臓脂肪蓄積に着目し、その構成要素である脂肪細胞の機能に焦点を当ててアディポサイトカイ

ン分泌などへの影響をスクリーニングした結果見出されてきた、トマトに含まれるナリングニンカルコンに着目した。ナリングニンカルコンは活性や植物体内の分布を含めてユニークな特徴を有するポリフェノールであったことから、これが脂肪細胞のアディポネクチン分泌や代謝機能に及ぼす影響について検討を行った。

第 3 章では、柑橘特異的に含まれるリモノイド類が肥満・高血糖に及ぼす影響を評価する上で、安定して多量のリモノイドを供給可能なソースとなりうる柑橘の選抜を行った結果、リモノイドアグリコンを蓄積している種子が多く含まれる香酸柑橘のユズに着目した。ここでは、ユズに比較的多く含まれるリモノイドのオバクノンが肥満・高血糖に及ぼす影響について検討を行った。

第 4 章では、代謝性疾患の中でもロコモーション関連の機能性として、筋管の合成に関わる機能性スクリーニングにより見出されてきた、マンゴスチン中の主要なキサントンである  $\alpha$ -マンゴスチンに着目し、骨格筋への分化や筋管合成へ及ぼす影響の解析を行った。

まとめとして総合討論では各章の結果を概観したうえで、今後代謝性疾患リスク低減策として、機能性を有する食品素材の活用を考えた時に、これをより実効性のあるアプローチへとつなげるために必要と考えられる課題について考察した。



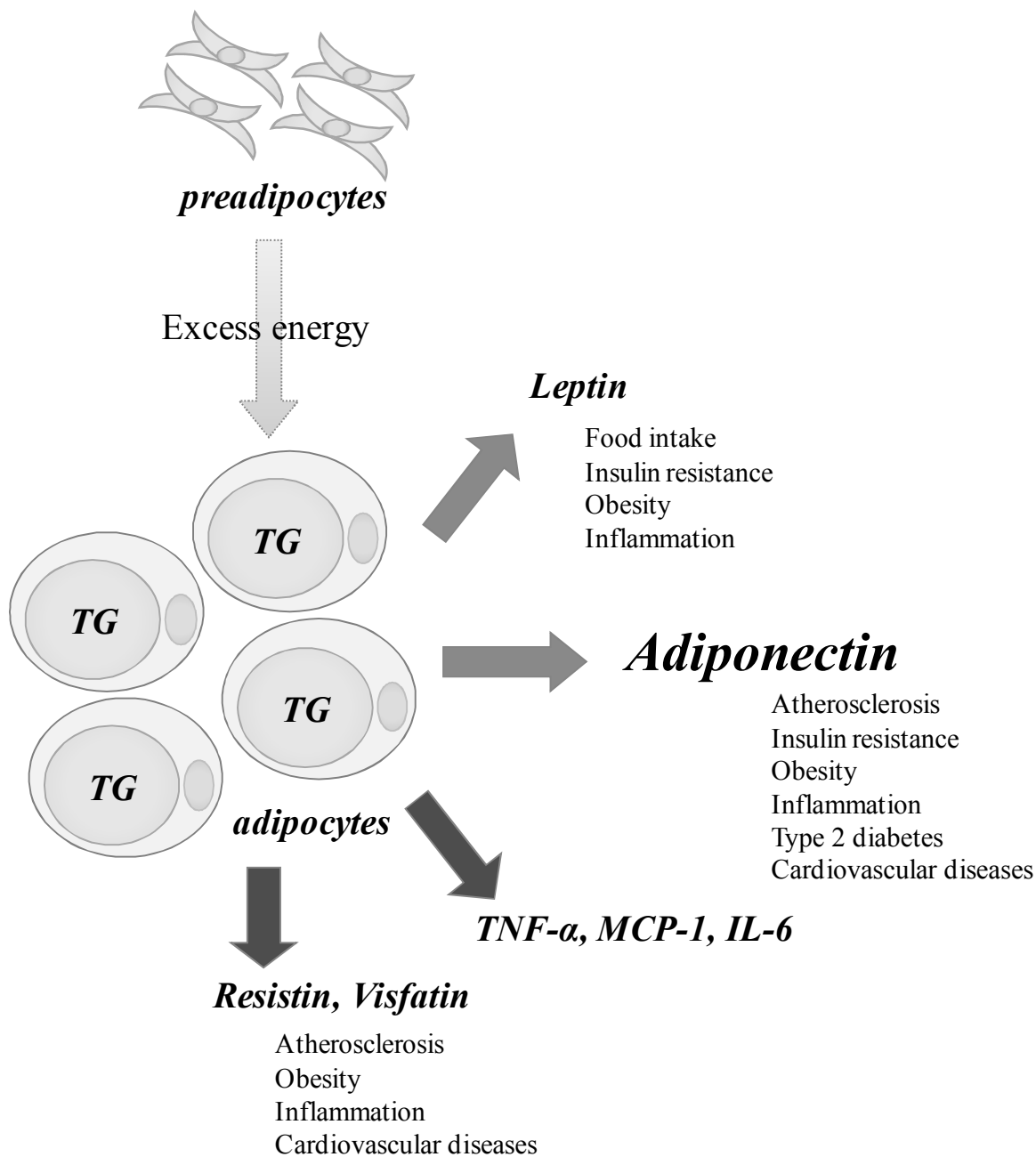


Fig.1-1 内分泌器官としての脂肪組織と代謝調節

脂肪組織は余剰エネルギーを脂質として蓄積する組織と考えられてきたが、多様な生理活性を示すアディポサイトカインを分泌することにより生体の代謝調節に深く関与していることが明らかとなってきた。

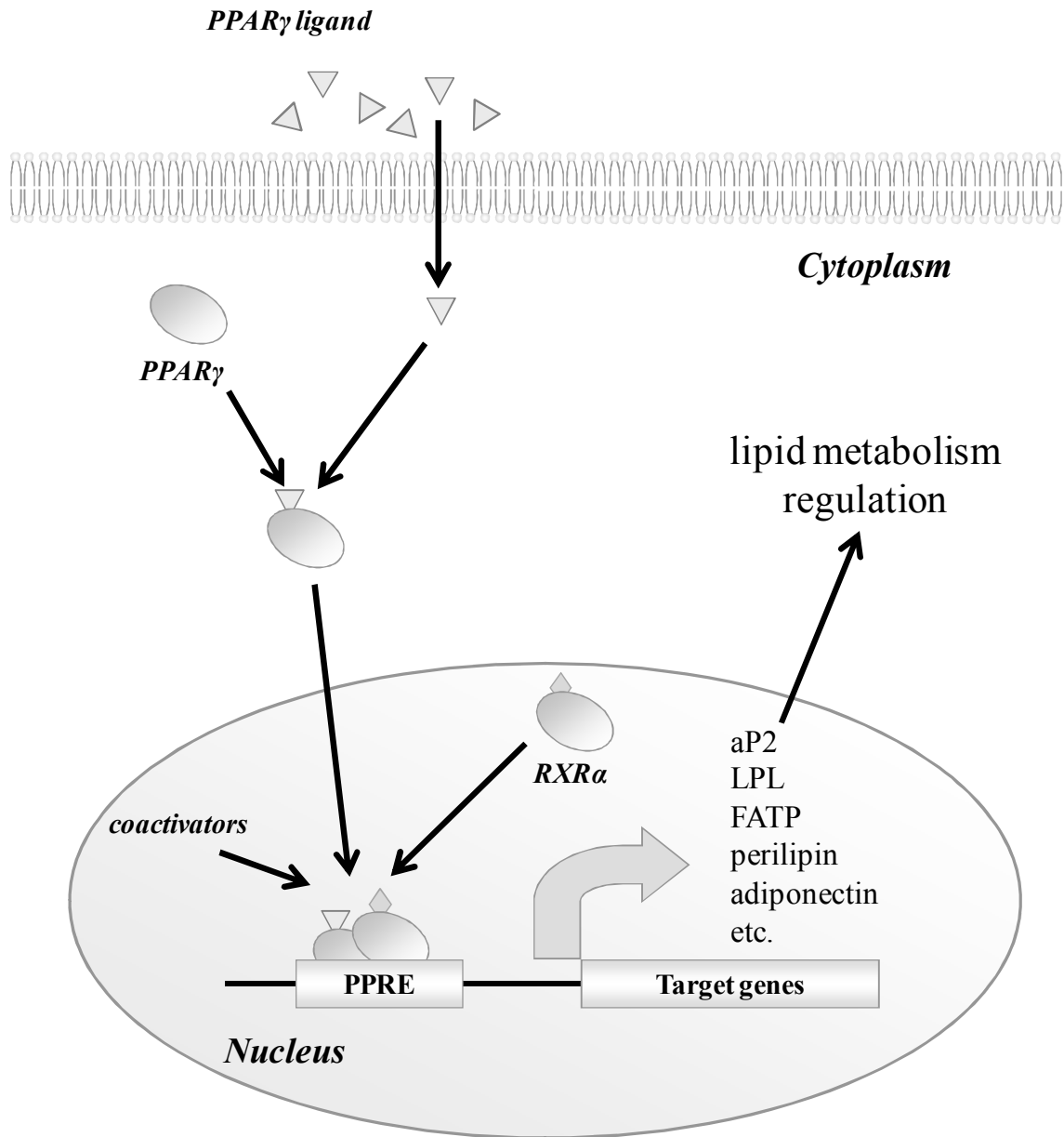


Fig.1-2 PPAR $\gamma$  による転写制御

PPAR $\gamma$  はリガンド依存的に転写活性を制御する。核内にて RXR $\alpha$  とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子の PPRE に結合し、転写共役因子とともに転写を活性化する。PPAR $\gamma$  の標的遺伝子にはペリリピンやアディポネクチンなど、脂質代謝制御に深く関与している遺伝子が多く、それゆえ PPAR $\gamma$  は脂質代謝のマスターレギュレーターとして位置づけられている。

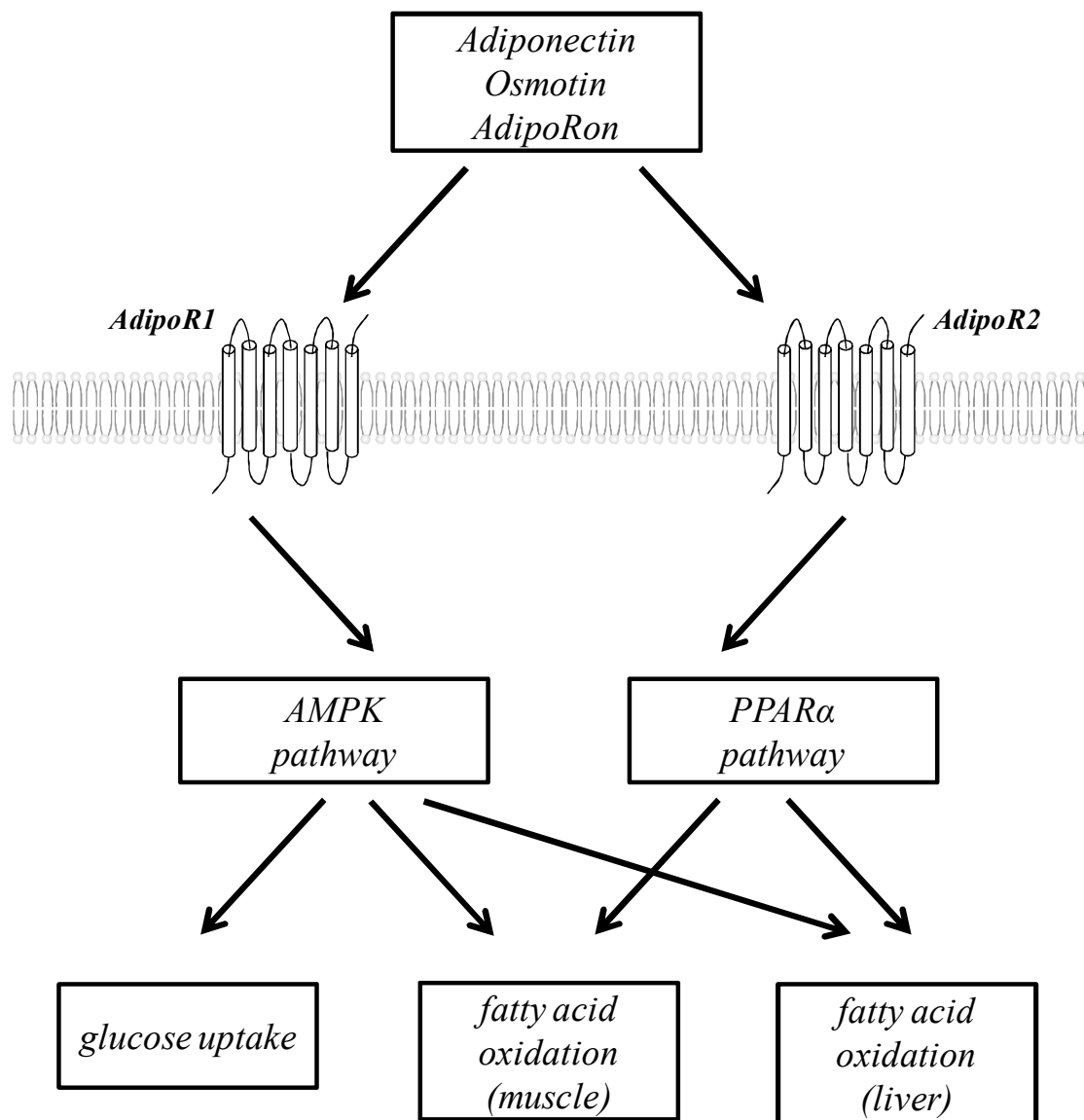


Fig.1-3 アディポネクチン受容体によるシグナル伝達と発現調節

AdipoRは7回膜貫通型タンパク質で、AdipoR1、AdipoR2の2種が同定されている。AdipoR1はAMPK経路を活性化する一方、AdipoR2はPPAR $\alpha$ を活性化し、これらのシグナル経路活性化により、糖取り込みの促進作用や脂肪酸酸化の亢進作用を示すと考えられている。

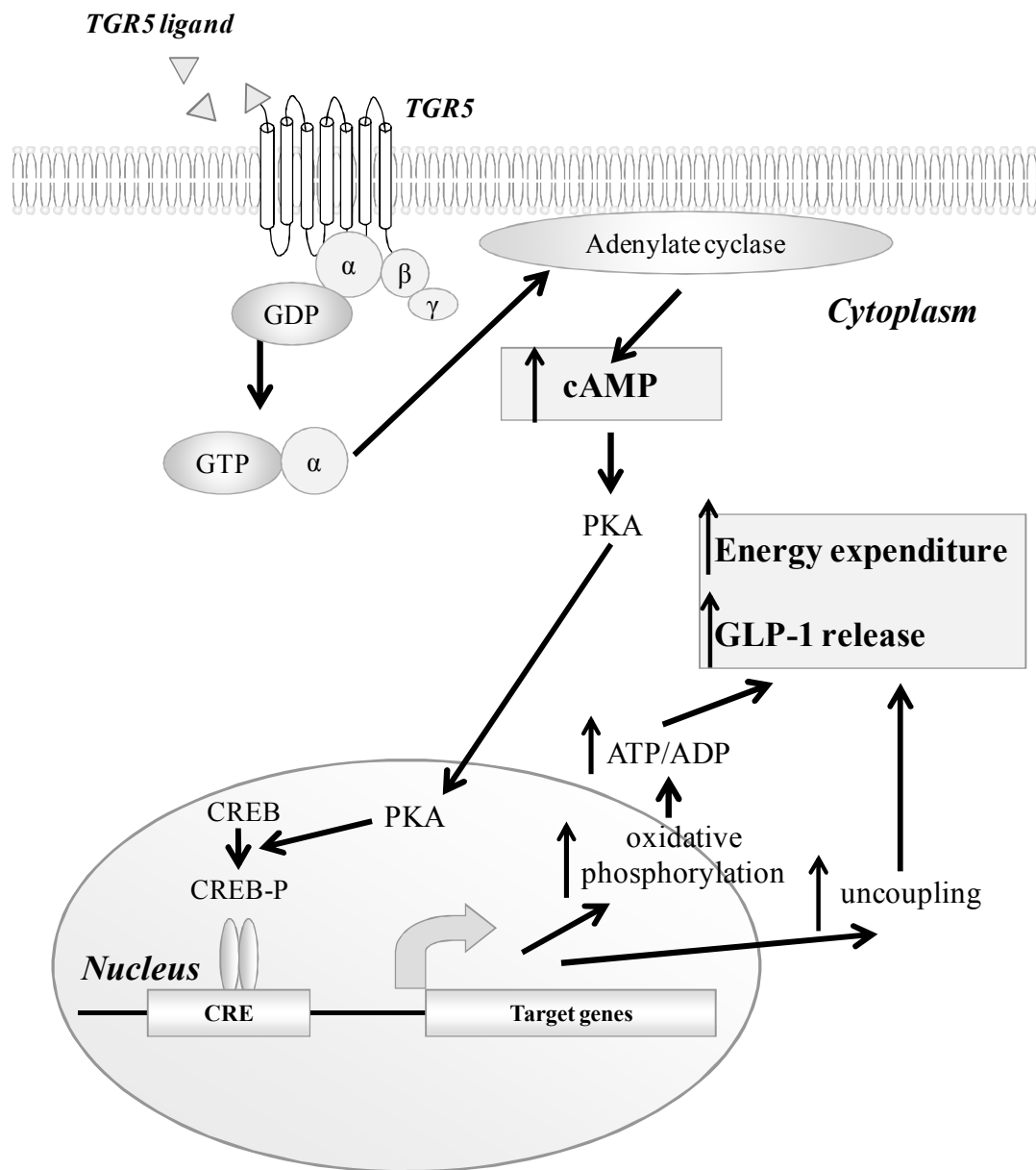


Fig.1-4 TGR5 によるシグナル伝達と転写制御

TGR5 は胆汁酸などのリガンドの結合によって活性化する。G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの放出に続いてアデニル酸シクラーゼが活性化し、細胞内 cAMP が上昇する。cAMP 濃度の上昇により PKA の活性化が引き起こされ、リン酸化を受けた CREB が CRE に結合することで酸化的リン酸化や脱共役に関与する遺伝子群の発現を亢進する。これによりエネルギー消費や GLP-1 分泌が促進される。

**A**

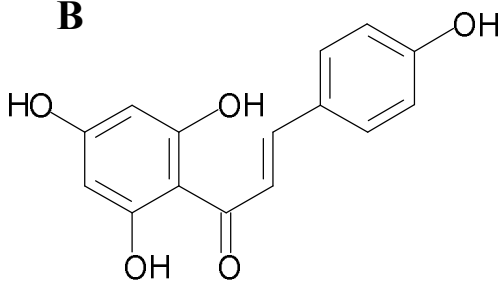


ピンク系トマト  
(主に生食用)

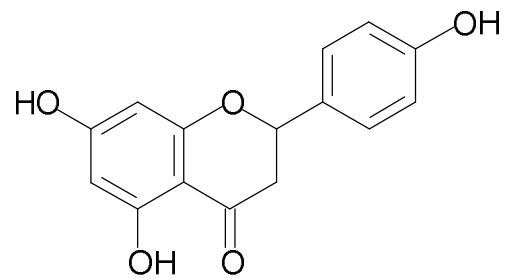


赤系トマト  
(主に加工用)

**B**



*naringenin chalcone*



*naringenin*

Fig.1-5 トマトの系統とナリンゲニカルコンの構造

**A.** トマトは色による分類ではピンク系トマトと赤系トマトに大別できる。日本ではピンク系トマトは主に生食用とされ、赤系トマトはケチャップやペーストなどに加工されて消費される。

**B.** ナリンゲニカルコンはカルコンイソメラーゼにより分子内閉環され、ナリンゲニンへと変換される。トマト中ではこれらのフラボノイドは配糖体ではなくアグリコンで存在する。

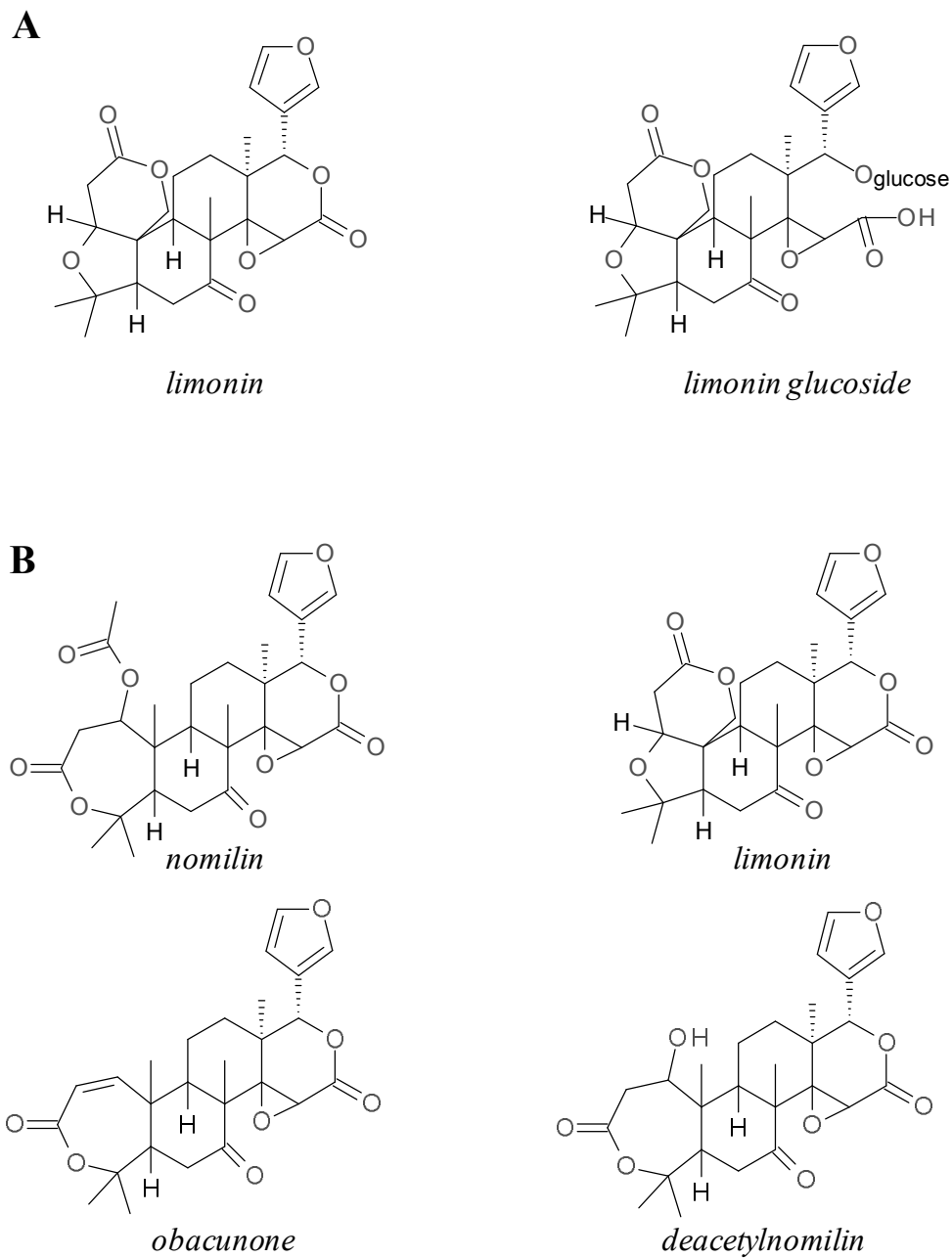


Fig.1-6 柑橘中の主要リモノイドの構造

**A.** リモノイドは柑橘類に存在するトリテルペン誘導体の総称であり、水に不溶で苦味を呈するリモノイドアグリコン、及びその配糖体が種子や果肉部に蓄積することが知られている。リモノイドは配糖体となることで水溶性となり苦味も呈さないようになる。**B.** 柑橘の品種により多少の変動はあるものの、主要なリモノイドはリモニンとノミリンであり、それらに次いでデアセチルノミリン、オバクノンが存在している。

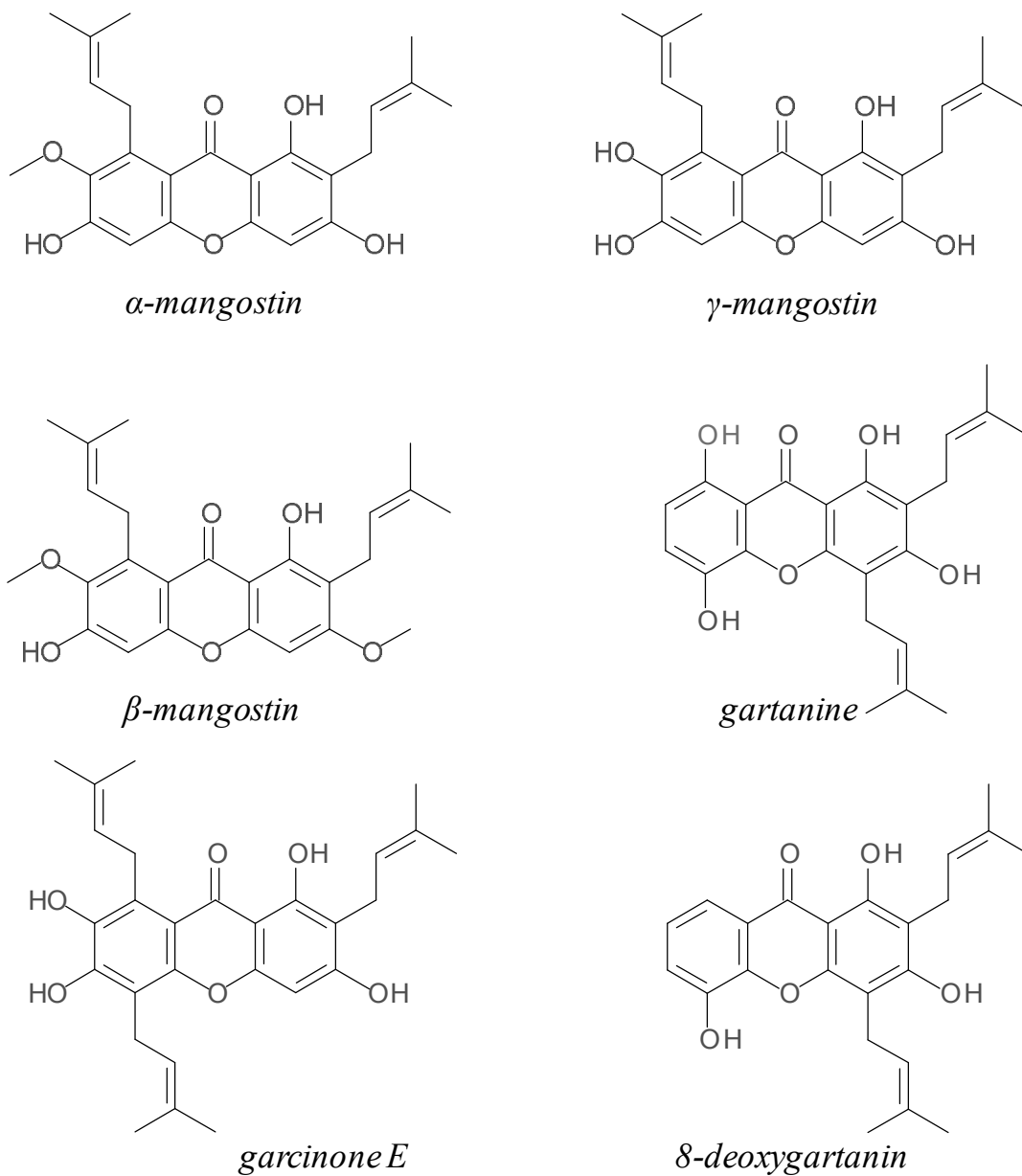


Fig.1-7 キサントン骨格とマンゴスチンに含まれる主要なキサントン

キサントンはマンゴスチンなど、一部の高等植物に認められる2次代謝産物で、特有の3環構造がその生理活性に大きく影響している。マンゴスチンに含まれる主要なキサントンには $\alpha$ -マンゴスチン、 $\gamma$ -マンゴスチン、ガルシノンE、8-デオキシガルタニン、ガルタニンなどがあるが、とりわけ $\alpha$ -マンゴスチンについてはその生理活性について多くの知見が蓄積している。

## 第2章

# トマト果皮に含まれるナリンゲニンカルコンによる 脂肪細胞代謝プロファイル調節機能



## 第1節 緒言

ナリングニンカルコンは主にトマト果皮に蓄積が認められるフラボノイド類であり、ヒスタミン遊離抑制を介したアレルギー抑制作用 (Yamamoto T et al, 2004) や、炎症性サイトカインの産生抑制作用 (Hirai S et al, 2007) などの生理活性を有することが報告されている。一方、多くのフラボノイド類が脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌調節機能を有することが明らかとなってきた。脂肪組織における慢性炎症が冠動脈性心疾患などの代謝性疾患リスクと密接に関連しているという近年の知見を上記の報告と照らし合わせて考えると、ナリングニンカルコンが脂肪組織においてアディポサイトカイン分泌調節を介し、その機能を調節している可能性が考えられる。しかし、ナリングニンカルコンが脂肪組織に及ぼす代謝への影響や遺伝子発現制御への影響について検討した報告はなく、その詳細は不明であった。そこで、本章ではナリングニンカルコンが、脂肪組織の構成単位である脂肪細胞において、アディポサイトカイン分泌を含む代謝制御プロセスに及ぼす影響を明らかとすることを目的として検討を行った。

## 第2節 実験方法

### 実験材料

ナリングニンカルコンは山本らの方法に従ってトマト果皮より単離した (Yamamoto T et al, 2004)。乾燥させたトマト果皮を 60% (v/v) の含水エタノールを用いて 60°C、2 時間処理し、ポリフェノールを含む抽出物を得た。その後、HPLC によりナリングニンカルコンを分離し、標品との比較にて 90%以上の純度であることを確認したものをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、200 mM のストック溶液を調製した。その他の試薬は特に指定の無い限り、Sigma のものを使用した。

### 細胞培養

NIH-3T3 細胞は 10% FBS、4500 mg/ml グルコースを含むダルベッコ変法イー

グル培地 (DMEM) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。3T3-L1 前駆脂肪細胞は 10% BS、4500 mg/ml グルコースを含む DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。脂肪細胞への分化誘導の際 (誘導開始時を day 0 とする) には、コンフルエントになった細胞に分化誘導培地 (10% FBS、4500 mg/ml グルコース、0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、1 μM デキサメタゾン、10 μg/ml インスリンを含む DMEM) を加え、2 日間分化誘導を行った。誘導開始 2 日後、分化促進培地 (10% FBS、4500 mg/ml グルコース、10 μg/ml インスリンを含む DMEM) に交換し、以降 2 日ごとに分化促進培地の培地交換を行い、脂肪細胞へと分化させた。Day 8 に培地と細胞を回収し、培地中のアディポネクチン量を ELISA 法により測定するとともに、細胞から total RNA を抽出した。これらはすべて n = 3 で実施した。

#### アディポネクチン測定

アディポネクチンの測定は adiponectin ELISA kit (大塚) を用いて、付属のマニュアルに従って行った。

#### RNA 抽出

Total RNA は TRIzol (Invitrogen) と、RNeasy mini Kit (Qiagen) を用い、付属のマニュアルに従って抽出、精製した。A260 nm/A280 nm の値が 1.6-2.0 となるサンプルのみ、リアルタイム RT-PCR 及び DNA マイクロアレイに用いた。

#### リアルタイム定量 RT-PCR

アディポネクチンと AdipoR2 の遺伝子発現は SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用い、付属のマニュアルに従って行った。簡単には、PrimeScript® RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて total RNA を cDNA へと逆転写し、SYBR® Premix Ex Taq™ (タカラバイオ) を用い、リアルタイム定量 RT-PCR を実施した。リアルタイム反応とデータ解析は Mx3000P QPCR system (Stratagene) と、MxPro software (Stratagene) を用いて行った。標準化に用いるハ

ウスキーピング遺伝子は cyclophilin とした。プライマー配列は本節の最後に表 2-1 として記載した。

#### ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは定法に基づいて実施した (Arimura N et al, 2004; Kanayama T et al, 2007)。具体的な手順は下記の通りである。アディポネクチン及びペリリピンの評価を行う際には、pGL4-adiponectin (アディポネクチン遺伝子レポータープラスミド)、あるいは pGL3-perilipin (ペリリピン遺伝子レポータープラスミド) と、pCMX-PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  発現プラスミド)、pRL-CMV (内部コントロール用プラスミド) を、12 well plate 上の NIH-3T3 細胞にトランスフェクションした。PPAR $\gamma$  の転写活性の評価を行う際には、pG5-Luc (GAL4 結合領域を持つレポータープラスミド)、pM-PPAR $\gamma$  (GAL4 DNA 結合領域と、PPAR $\gamma$  リガンド結合領域の融合タンパク質発現プラスミド)、pRL-CMV を、12 well plate 上の NIH-3T3 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは、Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を使い、付属のマニュアルに従って行った。トランスフェクション 24 時間後、表記の濃度 (0-100  $\mu$ M) のナリングニンカルコンを含む培地に交換し、さらに 24 時間培養後、細胞を回収した。比検化合物の vehicle には DMSO を使い、細胞の回収、及びルシフェラーゼレポーター活性の評価は Dual-Luciferase<sup>TM</sup> reporter assay system (Promega) を使い、付属のマニュアルに従って行った。これらはすべて n=3 で実施した。

#### DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を使い、付属のマニュアルに従って行った。簡単には、2  $\mu$ g の total RNA を cDNA に逆転写した後に dsDNA へと変換し、これを鋳型にしてビオチン化 cRNA を合成した。この cRNA を断片化した後、45°C で 16 時間アレイにハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたアレイを洗浄した後、ストレプトアビジン-フィコエリスリンで染色し、Affymetrix GeneChip System を用いてスキャンし、データを得た。

## DNA マイクロアレイデータ解析

スキャンしたアレイイメージを CEL ファイルに変換し、各プローブ強度を得るのに、Affymetrix の GCOS ソフトウェアを用いた。スキャンにより得られた CEL ファイルは、統計ソフト R と Bioconductor により、distribution free weighted (DFW) 法を用いて正規化を行った後、サンプル間の階層的クラスタリングを行った。コントロール群とナリングニンカルコン群の間で発現に差がある遺伝子セット [Differentially Expressed Genes, (DEGs)] の選抜は、Rank Product 法にて行った。False discovery rate (FDR) < 0.05 となる遺伝子を有意に発現が異なるものとみなした。DEGs を Mouse Genome 430 2.0 Array バックグラウンド (GeneChip に搭載されている全遺伝子) と比較し、どのような機能を持った遺伝子セットが濃縮されてきているかについて、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の functional annotation chart を用いて解析を行い、有意に濃縮された Gene Ontology (GO) を抽出した。FDR < 0.01 となる GO を有意に濃縮されたものとみなした。

## 統計解析

測定値は平均±標準偏差の形で表した。コントロール群との 2 群比較では、対応のない t 検定を用いた。3 群以上の比較では、一元配置分散分析の後、Fisher's protected least significant difference test を用いた。p 値が 0.05 より小さい場合を有意な変化があるとみなした。

cyclophilin (標準化用)

5'-TGGTGACTTTACACGCCATA-3'

5'-CAGTCTTGGCAGTGCAGATA-3'

adiponectin

5'-GATGGCAGAGATGGCACTCC-3'

5'-CTTGCCAGTGCTGCCGTCAT-3'

AdipoR2

5'-CTGTAACCCACAACCTTGCT-3'

5'-GGAACCCTTCTGAGATGACA-3'

表 2-1 リアルタイム定量 RT-PCR に用いたプライマー一覧

### 第3節 結果

ナリングニンカルコンは 3T3-L1 脂肪細胞のアディポネクチン発現を上昇させ、分泌を亢進する。

はじめに、ナリングニンカルコンが 3T3-L1 脂肪細胞のアディポネクチン発現、及び産生に及ぼす影響について検討を行った。3T3-L1 前駆脂肪細胞を、0-50  $\mu\text{M}$  のナリングニンカルコンの存在下で脂肪細胞へと 8 日間分化させ、培地中のアディポネクチンを測定するとともに、アディポネクチン遺伝子発現量を測定した。ナリングニンカルコンは、濃度依存的にアディポネクチンの遺伝子発現を促進し (Fig.2-1 A)、培地中への分泌を亢進した (Fig.2-1 B)。

ナリングニンカルコンは PPAR $\gamma$  の転写活性を上昇させる。

次に、ナリングニンカルコンがアディポネクチン遺伝子の転写を亢進するかを調べる目的で、PPRE を含んだアディポネクチンの 5'上流域を組み込んだレポータープラスミドを用い、レポーターアッセイを行った。NIH-3T3 細胞にアディポネクチンレポータープラスミドと、アディポサイトカインの発現制御に重要な役割を果たしていることが知られている、PPAR $\gamma$  発現プラスミドをトランスフェクションし、0-100  $\mu\text{M}$  のナリングニンカルコン存在下で 24 時間培養を行い、細胞を回収して測定を行った。ナリングニンカルコンは濃度依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させた (Fig.2-2 A)。同じく PPRE を含むペリリピンレポータープラスミドを用いた際にも同様の結果が得られた (Fig.2-2 B)。これらの結果は、ナリングニンカルコンが PPAR $\gamma$  の標的遺伝子の発現を上昇させることを示唆している。ここでさらに、ナリングニンカルコンが PPAR $\gamma$  の転写活性に直接与える影響を検討するために、Gal4-UAS 系を用いて実験を行った。本実験系では、ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、他の転写共役因子を含まない、コンセンサス Gal4 結合領域を含むプロモーターにより制御される。NIH-3T3 細胞にレポータープラスミド、及び、PPAR $\gamma$  のリガンド結合領域と Gal4 の DNA 結合領域の融合タンパク質の発現プラスミドをトランスフェクションし、上記と同様の条件でナリングニンカルコンを作用させ測定を行った。ナリングニンカルコ

ンは濃度依存的にレポーター遺伝子の活性を上昇させていた (Fig.2-2 C)。これらの結果は、ナリングニンカルコンが PPAR $\gamma$  の転写活性を上昇させることによってアディポネクチンの転写を亢進していることを示していると考えられた。

### DNA マイクロアレイ解析

ナリングニンカルコンが脂肪細胞のアディポサイトカイン発現調節に影響を与えることが示唆されたため、次に、ナリングニンカルコンが脂肪細胞の機能に及ぼす影響を包括的に調べるため、DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を使用し、得られたデータを DFW 法により正規化、階層的クラスタリングを行い、コントロール群とナリングニンカルコン群でクラスターが分かれていることを確認した (Fig. 2-3) 後、コントロール群とナリングニンカルコン群で発現の異なる遺伝子セットを Rank Product 法にて抽出した。FDR 0.05 未満を満たすものを有意に発現が異なるとみなした時、コントロール群と比較し、ナリングニンカルコン群で有意に発現上昇が認められた遺伝子は 1153 個であり、有意に発現低下が認められた遺伝子は 1031 個であった。これら有意な発現変動が認められた遺伝子群について、どのような機能を持った遺伝子が有意に濃縮されてきているのか、DAVID の gene-annotation enrichment analysis によって、GO biological process のアノテーションに基づき解析を行った。この解析では、バックグラウンド (GeneChip に搭載されている全遺伝子) に対し、発現変動遺伝子セット中に特定の機能 (GO term) をもった遺伝子が有意に濃縮されている場合、それらが GO term のリストとして抽出される。発現上昇が認められた遺伝子群に対しては、抽出された GO term が多かったため、metabolic process 及び cellular process に大別し、さらにそれらに属する下層の GO term について整理することとし、それぞれ Fig.2-4 A, Fig.2-4 B に示した。また、発現低下が認められた遺伝子群については Fig.2-4 C に示した。

GO の階層構造においては、より具体的な特定の機能を表す term ほど、より下層に位置付けられるため、こうした下層の term は、遺伝子発現変動によって引き起こされた、生物学的に重要な意味のある変化を捉える手がかりとなりう

る。有意な発現上昇が認められた遺伝子群においては、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生に関わる term ("ubiquinone biosynthetic process"、"mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone"、"ATP synthesis coupled proton transport"、"mitochondrial membrane organization") のほか、"glucose catabolic process"、"fatty acid beta-oxidation"、"tricarboxylic acid cycle"などが下層の term で有意に濃縮されていた。一方、有意な発現低下が認められた遺伝子群においては、"cell adhesion"、"regulation of developmental process"などが有意に濃縮されていた。これらの term に含まれていた遺伝子の一覧はそれぞれ Fig.2-5, Fig.2-6 に示した。こうした一連の遺伝子発現変動から、ナリングニンカルコンは脂肪細胞において、グルコース異化や脂肪酸の  $\beta$  酸化に関わる遺伝子群の発現を上昇させ、エネルギー産生を亢進させていることが示唆された。さらに、個々の遺伝子の変化に着目すると、ナリングニンカルコンによるアディポネクチンの発現上昇が DNA マイクロアレイでも再現されていることが確認できたのみならず、アディポネクチンの受容体である AdipoR2 の遺伝子発現も合わせて上昇していることが確認された (Fig.2-5 A, Fig.2-7)。このことは、ナリングニンカルコンが、脂肪細胞においてアディポネクチンのオートクライン/パラクライン経路をサポートすることで、その作用を増強させている可能性を示唆していると考えられた。



#### 第4節 考察

本章の検討では、ナリングニンカルコンが 3T3-L1 脂肪細胞におけるアディポネクチンの遺伝子発現を上昇させ、その分泌を亢進していることを見出した。アディポネクチンの 5'上流域には PPRE が存在しており、その遺伝子発現は PPAR $\gamma$  により制御されていることが報告されている (Iwaki M et al, 2003)。レポータージーンアッセイの結果、ナリングニンカルコンは PPAR $\gamma$  を介したアディポネクチン遺伝子の転写を上昇させていることが確認された。さらに、DNA マイクロアレイ解析の結果、ナリングニンカルコン処理によって発現上昇が認められた 1153 個の遺伝子の中には PPAR $\gamma$  が含まれていた。ナリングニンカルコンを脂肪細胞に作用させた際、顕微鏡下の観察において脂肪細胞の分化、及びそのトリグリセライド (TG) 蓄積の亢進が認められており、これらの結果はナリングニンカルコンによる PPAR $\gamma$  の発現増加とその転写活性亢進を裏付けるものと推察される。また、3T3-L1 脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン量の上昇は、ナリングニンカルコンによって引き起こされる、脂肪細胞でのアディポネクチン遺伝子発現の亢進を反映したものであると考えられる。本章での検討で明らかにしたように、ナリングニンカルコンはアディポネクチンの発現を亢進する一方で、TNF- $\alpha$  や MCP-1 といった、インスリン抵抗性の惹起に関与している炎症性サイトカインの分泌を阻害することが報告されている (Hirai S et al, 2007)。これらの報告を合わせて考えると、ナリングニンカルコンは、脂肪組織における種々のアディポサイトカインの発現、及び分泌を制御することにより、インスリン感受性を増加させているのではないかと考えられる。

DNA マイクロアレイ解析の結果、ナリングニンカルコンにより、エネルギー代謝に関わる様々な遺伝子群の発現が同時に上昇する一方で、細胞接着や発生過程などの機能区分に関与する遺伝子群の発現低下が認められた (Fig.2-4, Fig.2-6)。現在までに、細胞接着に関連する遺伝子群の発現は、PPAR $\gamma$  の活性化により低下することが報告されている (Galli A et al, 2002)。このことは、ナリングニンカルコンが PPAR $\gamma$  の活性化により脂肪細胞の分化を促進させ、これに伴う細胞の形態変化 (繊維芽細胞から脂肪細胞への変化) がより促進されている

ことを反映している可能性が考えられる。

興味深いことに、ナリングニンカルコン存在下で分化させた脂肪細胞では、酸化リン酸化に関与している遺伝子群の発現が大きく増加していた (Fig.2-4, Fig.2-5)。酸化リン酸化は、NADH、あるいは FADH<sub>2</sub> から O<sub>2</sub> へと、電子伝達系を介して電子を受け渡す過程で生まれるエネルギーを用いて ATP を合成する過程である。この反応はミトコンドリアで進められ、好気性生物にとって主要な ATP 供給源となっている。以前の研究から、インスリン抵抗性患者において、ミトコンドリア活性が低下していること (Morino K et al, 2005; Kelley DE et al, 2002; Petersen KF et al, 2005) や、ミトコンドリアの酸化代謝に関わる遺伝子群の発現が低下していること (Mootha VK et al, 2003; Patti ME et al, 2003) が明らかとなっている。また、形質が異なる一卵性双生児での比較において、肥満している双生児は肥満ではない方の双生児に比べてインスリン感受性が低く、脂肪組織におけるミトコンドリアの酸化リン酸化の構成因子の遺伝子発現が有意に低下していることが示されている (Mustelin L et al, 2008)。これらの報告は、ミトコンドリアの機能不全や、酸化リン酸化に関与している遺伝子群の発現欠失が、インスリン抵抗性の特徴であることを示唆している。本章での DNA マイクロアレイ解析の結果は、ナリングニンカルコンが脂肪細胞におけるミトコンドリアのエネルギー代謝を改善することにより、インスリン感受性を高め得る可能性を示唆していると考えられる。

現在までに、アディポネクチンの受容体として、AdipoR1、AdipoR2 の 2 種の受容体が同定されており (Yamauchi T et al, 2003)、*in vivo* における主要なアディポネクチン受容体として機能していることが確認されている (Yamauchi T et al, 2007)。AdipoR1 は骨格筋で同定されている一方で、AdipoR2 は肝臓で最大の発現が認められている。マウスの脂肪組織においても AdipoR の発現は確認されており、インスリン抵抗性を示すマウスではその発現が低下していることが報告されている (Tsuchida A et al, 2004)。本章での DNA マイクロアレイ解析の結果、及びリアルタイム定量 RT-PCR の結果から、AdipoR2 の発現はナリングニンカルコンにより上昇していることが確認されたが、このことは、ナリングニンカル

コンが、アディポネクチンのオートクライン/パラクライン作用を亢進することにより、脂肪細胞の機能に影響を与えることを示唆していると考えられる。例えば、ナリングニンカルコン処理によって脂肪酸のベータ酸化に関わる遺伝子群の発現上昇が認められたが、この遺伝子発現変動は、上記のアディポネクチン経路の亢進を反映したものであると考えられる。

AdipoR2 の発現は PPAR $\gamma$  のアゴニストである rosiglitazone により亢進することが報告されている一方で (Sun X et al, 2006)、同じく PPAR $\gamma$  のアゴニストである pioglitazone によって影響を受けないという報告もあり (Li W et al, 2007)、ナリングニンカルコン処理で認められた AdipoR2 の発現亢進が、ナリングニンカルコンによる PPAR $\gamma$  のアゴニスト作用の寄与のみで説明できるのかは、本章での検討により得られたデータだけでは十分に考察ができない。上記のような合成アゴニストとナリングニンカルコンの影響を DNA マイクロアレイ解析で比較することによって、AdipoR2 の転写制御を含めたナリングニンカルコンによる脂肪細胞の遺伝子発現プロファイル変動が、主にナリングニンカルコンの PPAR $\gamma$  アゴニスト作用により起こるのか、あるいは、ナリングニンカルコン特異的な別の制御系を介して起こるものであるのか明らかにされることが期待される。

一方で、AdipoR2 は小胞体ストレスによって誘導される activating transcription factor 3 (ATF3) により発現が負に制御されることが報告されている (Koh IU et al, 2010)。小胞体ストレスは食事誘導性肥満状態で認められること (Ozcan U et al, 2004)、インスリン抵抗性の病態に関与していること (Ozcan U et al, 2006) が報告され、代謝恒常性の制御に関与していることが明らかとされつつある。また、近年、ナリングニンを含むポリフェノールなどの食品成分が小胞体ストレスの緩和に寄与することが報告され始めている (Karuppagounder V et al, 2015; Rodriguez J et al, 2015)。こうした食品成分による小胞体ストレス軽減は、ATF3 の発現抑制を誘導するものであるか、現時点では十分に検討がなされておらず未知の点が多いものの、小胞体ストレスを緩和するポリフェノール類は AdipoR2 の発現亢進に寄与する可能性がある。

近年の研究から、カロリー制限、アディポサイトカイン制御、そして脂質代

謝の間に密接な関係があることが明らかとなりつつある。成長ホルモントランスジェニックマウスを用いた検討において、カロリー制限を施すと、マウス血漿中のアディポネクチンを上昇させ、脂質代謝を改善させることが報告されている (Wang Z et al, 2007) ほか、カロリー制限により脂肪組織中のアディポネクチン量の増加が認められ、脂肪酸酸化に関わる遺伝子群の発現亢進や、インスリン抵抗性の改善が認められた (Zhu M et al, 2007) との報告がある。これらの報告で認められた遺伝子発現変動の多くが、本章での検討において、ナリングニンカルコン処理をした脂肪細胞でも同様に認められていた。ここでの検討結果はナリングニンカルコンを経口摂取させた動物の脂肪組織を用いた検討ではなく、株化細胞を用いた検討であるという限界があるものの、本章で実施した DNA マイクロアレイ解析結果は、ナリングニンカルコンが脂肪組織において、カロリー制限の効果を一部模倣することによって脂肪細胞の機能を改善し、ヘルスベネフィットにつながる変化を引き起こしている可能性を示唆していると考えられる。

ナリングニンカルコンは、ラットに経口摂取させた際、血漿中でグルクロン酸抱合体として検出される (Yoshimura M et al, 2009)。一方、フラボノイド代謝産物は体内で脱抱合化された後、アグリコンの活性を発揮しうる (Kawai Y et al, 2008) ことが報告されている。これらの報告から、経口摂取したナリングニンカルコンも、下記のようなプロセスを経て、末梢の脂肪組織における遺伝子発現調節に寄与しうる可能性が考えられる。

1. 経口摂取したナリングニンカルコンが吸収され、グルクロン酸抱合体へと代謝・変換される。
2. 変換されたグルクロン酸抱合体は血流に乗り、脂肪組織のような末梢標的組織へと運ばれる。
3. 標的組織において脱抱合を受け、アグリコンへと変換されることにより、遺伝子発現調節に寄与する。

なお、予備的検討ではあるが、ナリングニンカルコンを、肥満・2型糖尿病モデル動物として用いられている KKAY マウスに経口摂取させたところ、血漿ア

ディポネクチン濃度の増加が起こることを確認しており (data not shown)、この観察結果からも、経口摂取したナリングニンカルコンが、生体内で上記プロセスを経て脂肪組織に作用することによって、本章での DNA マイクロアレイ解析において認められたものと同様の遺伝子発現調節を引き起こす可能性が期待できるのではないかと考えている。

本章の結果から、トマト由来のフラボノイドの一種であるナリングニンカルコンは、脂質代謝のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  の転写活性化を介して脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子発現を亢進させ、また、同時に脂肪組織におけるアディポネクチン受容体 AdipoR2 の発現を亢進することにより、アディポネクチンのリガンド作用、及び、受容体の両面からアディポネクチンの作用を増強させていることが示唆された (Fig.2-7)。さらに、DNA マイクロアレイ解析の結果から、ナリングニンカルコンは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関わる遺伝子群の発現を増加させており、既に報告されている、インスリン抵抗性惹起因子である TNF- $\alpha$  や MCP-1 の産生抑制作用とあわせて、インスリン感受性を改善させる可能性が示唆された。本章での検討により得られたこれらの知見は、ナリングニンカルコンの経口摂取が、代謝性疾病のリスクファクターの一つである、脂肪組織におけるインスリン抵抗性の予防、改善に有用であることを示唆するものであると考えられる。

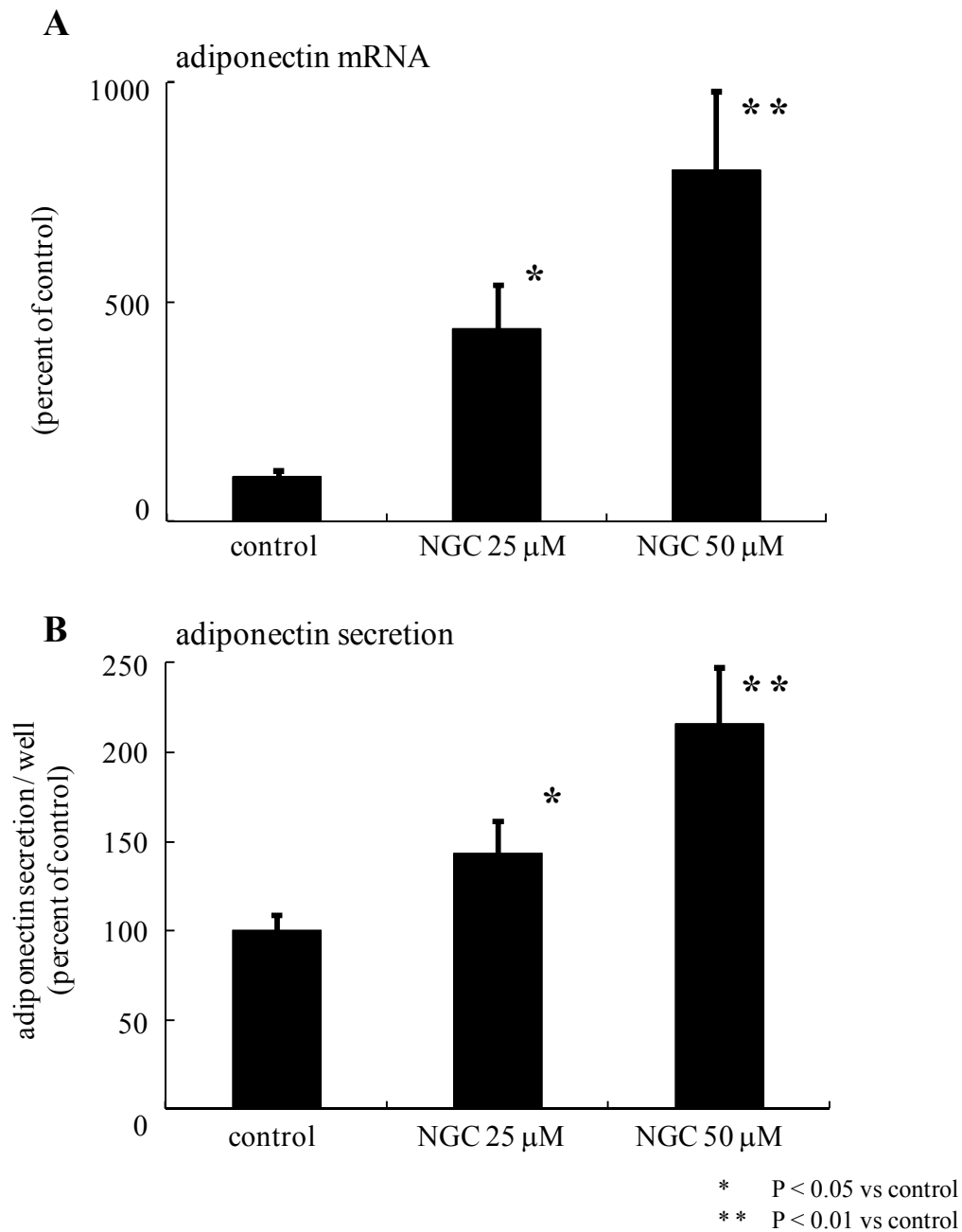


Fig.2-1 ナリンゲニンカルコンが脂肪細胞のアディポネクチン遺伝子発現及び分泌に及ぼす影響

3T3-L1 脂肪細胞における **A.** アディポネクチンの遺伝子発現及び **B.** アディポネクチンの分泌。3T3-L1 前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる過程でナリンゲニンカルコンを 0 - 50  $\mu$ M で作用させ、分化 8 日後のアディポネクチン遺伝子発現を定量 RT-PCR で、培養上清中に分泌されたアディポネクチンを ELISA で測定した。

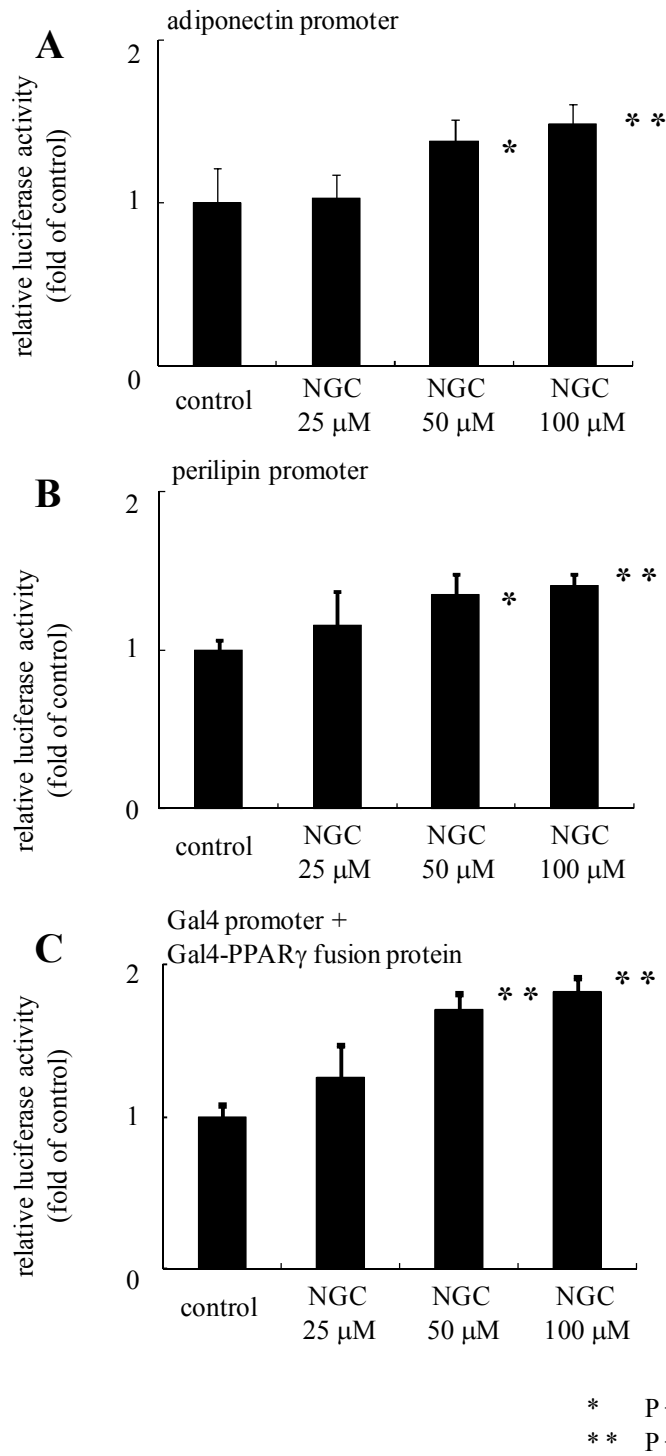


Fig.2-2 ナリンゲニンカルコンが PPAR $\gamma$  の転写活性に及ぼす影響

NIH-3T3 細胞に表記のレポーター遺伝子をトランスフェクションし、0-100  $\mu$ M のナリンゲニンカルコン含有培地で 24 時間培養後細胞を回収し、レポータージーンアッセイを行った。

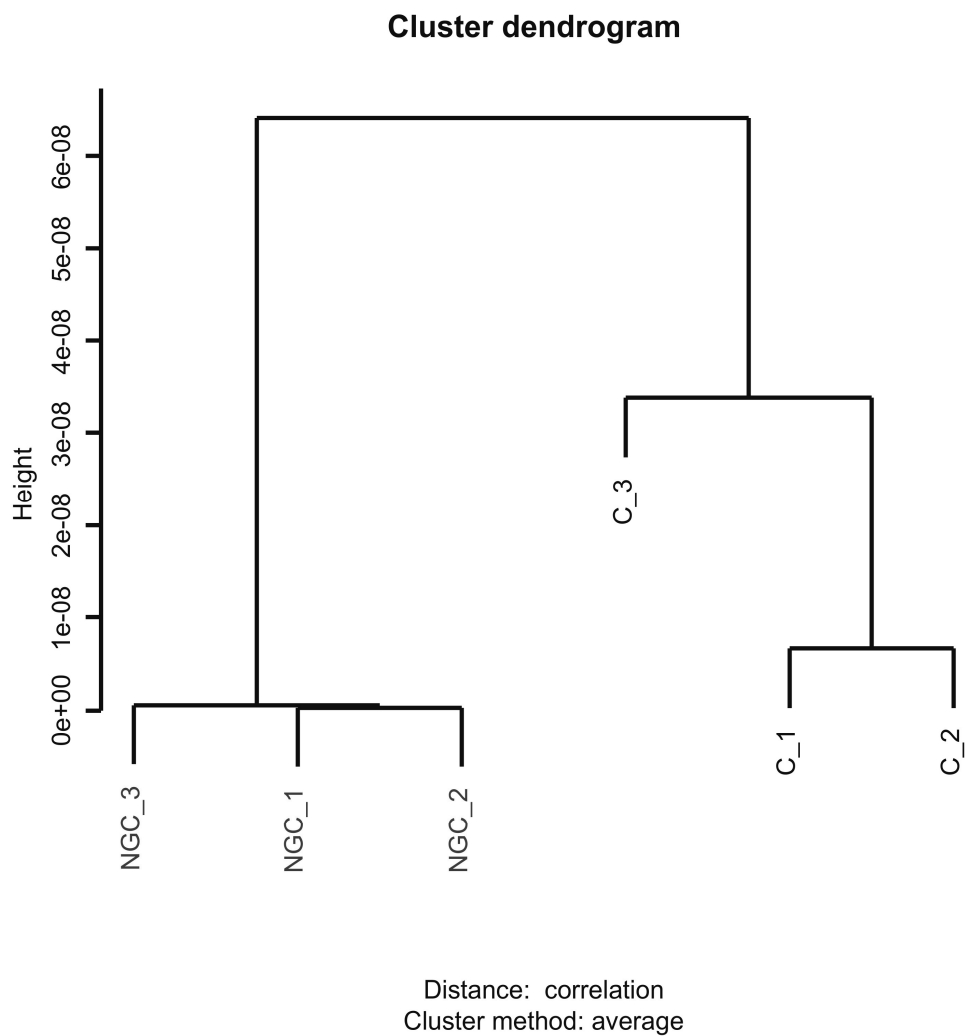


Fig.2-3      DFW により正規化した DNA マイクロアレイデータの階層的クラスタリングデンドログラム

DNA マイクロアレイチップをスキャンして得られた生データを DFW により正規化し、階層的クラスタリングを行った。C\_1-\_3 はコントロール群、NGC\_1-\_3 はナリンゲニンカルコン群を示す。



**A**

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
8152	metabolic process	1.28E-14
19748	secondary metabolic process	5.35E-03
9058	biosynthetic process	1.36E-16
8610	lipid biosynthetic process	7.64E-06
44249	cellular biosynthetic process	2.16E-14
16125	sterol metabolic process	4.25E-03
6744	ubiquinone biosynthetic process	1.99E-03
44237	cellular metabolic process	1.73E-07
51186	cofactor metabolic process	4.49E-29
6099	tricarboxylic acid cycle	4.41E-14
6091	generation of precursor metabolites and energy	1.10E-25
6119	oxidative phosphorylation	2.02E-10
6120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	7.29E-05
44255	cellular lipid metabolic process	8.81E-15
6720	isoprenoid metabolic process	3.43E-03
19395	fatty acid oxidation	4.92E-04
6635	fatty acid beta-oxidation	3.73E-03
44248	cellular catabolic process	1.01E-11
6007	glucose catabolic process	2.00E-03
9117	nucleotide metabolic process	6.31E-05
6739	NADP metabolic process	5.41E-03
15986	ATP synthesis coupled proton transport	5.01E-03

**B**

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
9987	cellular process	
22613	ribonucleoprotein complex biogenesis	6.97E-03
42254	ribosome biogenesis	2.67E-04
7005	mitochondrion organization	5.05E-07
7006	mitochondrial membrane organization	1.10E-03
65002	intracellular protein transmembrane transport	7.06E-03
6605	protein targeting	1.62E-04

Fig.2-4 発現上昇が認められた遺伝子群に対する  
gene functional enrichment analysis の結果

ナリングニンカルコンにより有意に発現上昇が認められた 1153 遺伝子の中で、有意に濃縮されている GO term を **A. metabolic process**、**B. cellular process** について階層状に表記した。最下層に位置する term の *p*-value は網かけ表記した。

**C**

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
22610	biological adhesion	6.27E-06
7155	cell adhesion	6.27E-06
32502	developmental process	5.50E-07
48513	organ development	9.66E-05
50793	regulation of developmental process	7.74E-05
32989	cellular component morphogenesis	2.82E-05
7411	axon guidance	2.36E-03
9987	cellular process	3.66E-03
6928	cell motion	1.62E-03
16477	cell migration	4.17E-04
43062	extracellular structure organization	7.65E-03
30198	extracellular matrix organization	2.30E-03
8283	cell proliferation	5.87E-03
42127	regulation of cell proliferation	7.84E-03
50789	regulation of biological process	7.97E-03
48522	positive regulation of cellular process	4.40E-03
48523	negative regulation of cellular process	4.30E-03

Fig.2-4 発現低下が認められた遺伝子群に対する  
gene functional enrichment analysis の結果 (biological process)

ナリングニンカルコンにより有意に発現低下が認められた 1031 遺伝子の中で、有意に濃縮されている GO term について階層状に表記した。最下層に位置する term の *p*-value は網かけ表記した。

## A ubiquinone biosynthetic process

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1428159_s_at, 1447919_x_at, 1428160_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1; predicted gene 4459
1417566_at, 1417565_at	abhydrolase domain containing 5
1423797_at, 1456081_a_at	acetoacetyl-CoA synthetase
1455061_a_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)
1450643_s_at, 1423883_at, 1460316_at, 1422526_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
1418911_s_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
1448987_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain
1415984_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain
1460216_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain
1424184_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
1416409_at	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
1434329_s_at, 1437864_at	adiponectin receptor 2
1422651_at	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
1417008_at	carnitine acetyltransferase
1416772_at	carnitine palmitoyltransferase 2
1416727_a_at	cytochrome b-5
1418321_at	dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)
1425676_a_at	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1
1452341_at	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
1448491_at	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal
1448499_a_at	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
1425809_at, 1424155_at, 1417023_a_at, 1451263_a_at	fatty acid binding protein 4, adipocyte
1423828_at	fatty acid synthase
1419499_at	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
1455972_x_at	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
1452173_at	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
1417369_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
1419692_a_at	leukotriene C4 synthase
1452592_at	microsomal glutathione S-transferase 2
1417098_s_at	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase
1417768_at	patatin-like phospholipase domain containing 8
1422471_at, 1422472_at	peroxisomal biogenesis factor 13
1426522_at, 1437172_x_at	predicted gene 13910; similar to Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; predicted gene 9108
1417591_at	prostaglandin E synthase 2
1430640_a_at, 1456475_s_at, 1438664_at	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta
1421469_a_at, 1450259_a_at	signal transducer and activator of transcription 5A
1415964_at	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
1423078_a_at	sterol-C4-methyl oxidase-like
1451457_at	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)
1452927_x_at, 1415918_a_at, 1435659_a_at	triosephosphate isomerase 1; similar to triosephosphate isomerase 1

Fig.2-5 細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子 (1)

発現上昇が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## B

### mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1448198_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8
1455036_s_at, 1460506_s_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2; similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2
1416366_at	
1423159_at	dihydrolipoamide dehydrogenase

### ATP synthesis coupled proton transport

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1416829_at	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit
1426742_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1; predicted gene 12231
1454661_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 3
1423111_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1
1456580_s_at, 1423716_s_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
1417632_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A1
1437013_x_at, 1416769_s_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit B
1415814_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B2
1419546_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit C1
1416020_a_at	predicted gene 12337; predicted gene 10039; predicted gene 4479; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1
1434053_x_at	predicted gene 2972; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e
1437164_x_at, 1416278_a_at	predicted gene 5436; similar to ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit

### mitochondrial membrane organization

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1448560_at, 1417045_at	BH3 interacting domain death agonist
1415710_at	COX18 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)
1436416_x_at, 1417916_a_at	fractured callus expressed transcript 1; dynein heavy chain domain 1
1425969_a_at	huntingtin
1422470_at	predicted gene 14506; BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3; predicted gene 6532; similar to E1B 19K/Bcl-2-binding protein homolog
1416346_at, 1416345_at	predicted gene 9797; translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a1 (yeast); similar to small zinc finger-like protein
1448131_at	similar to mitofusin 2; mitofusin 2
1449214_a_at	similar to optic atrophy 1 (autosomal dominant); optic atrophy 1 homolog (human)
1417499_at, 1455211_a_at	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)
1455456_a_at	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (yeast)

Fig.2-5 細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子 (2)

発現上昇が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## C

### glucose catabolic process

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1416921_x_at, 1439375_x_at, 1434799_x_at, 1433604_x_at	aldolase A, fructose-bisphosphate; predicted gene 8767; predicted gene 7556
1426265_x_at, 1426264_at, 1452005_at	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)
1422612_at	hexokinase 2
1434499_a_at, 1448237_x_at, 1455235_x_at, 1416183_a_at	lactate dehydrogenase B; predicted gene 5514
1454925_x_at, 1436834_x_at, 1438338_at, 1448172_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
1433984_a_at, 1416478_a_at	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
1451274_at	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)
1416069_at	phosphofructokinase, platelet
1436771_x_at, 1438627_x_at, 1437380_x_at, 1423706_a_at	phosphogluconate dehydrogenase
1426554_a_at	phosphoglycerate mutase 1
1435967_s_at, 1423780_at	predicted gene 11225; 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
1425129_a_at	transaldolase 1
1452927_x_at, 1415918_a_at, 1435659_a_at	triosephosphate isomerase 1; similar to triosephosphate isomerase 1

### fatty acid beta-oxidation

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1415984_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain
1416409_at	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
1422651_at	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
1418321_at	dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)
1452173_at	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
1417369_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
1426522_at, 1437172_x_at	predicted gene 13910; similar to Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; predicted gene 9108

Fig.2-5 細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子 (3)

発現上昇が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## D

### tricarboxylic acid cycle

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1423644_at, 1456728_x_at	aconitase 1
1451002_at, 1436934_s_at	aconitase 2, mitochondrial
1450667_a_at, 1422577_at, 1422578_at	citrate synthase
1423710_at	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)
1424828_a_at	fumarate hydratase 1
1419821_s_at, 1422433_s_at	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
1422500_at, 1432016_a_at, 1422501_s_at	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
1418886_s_at, 1418885_a_at	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
1416788_a_at, 1416789_at	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma
1454925_x_at, 1436834_x_at, 1438338_at, 1448172_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
1433984_a_at, 1416478_a_at	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
1426689_s_at	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
1418005_at	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip); similar to succinate dehydrogenase Ip subunit
1435986_x_at, 1448630_a_at	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein
1428235_at	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein
1415891_at	succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit
1452206_at	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit

Fig.2-5 細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子 (4)

発現上昇が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞での異化やミトコンドリアでのエネルギー産生に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## A

### cell adhesion (1)

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1422514_at, 1450637_a_at	AE binding protein 1
1435448_at, 1456006_at, 1435449_at, 1456005_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
1425622_at, 1433474_at	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
1459749_s_at	FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)
1455056_at	LIM domain only 7
1424950_at, 1451538_at	SRY-box containing gene 9
1448593_at, 1448594_at	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
1426301_at	activated leukocyte cell adhesion molecule
1420621_a_at, 1444705_at, 1458525_at	amyloid beta (A4) precursor protein
1426869_at	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein
1450757_at, 1446048_at	cadherin 11
1456937_at	cadherin-like 26
1430533_a_at	catenin (cadherin associated protein), beta 1
1416740_at, 1434479_at, 1416741_at	collagen, type V, alpha 1
1419703_at	collagen, type V, alpha 3
1455627_at, 1447819_x_at, 1418440_at	collagen, type VIII, alpha 1
1449154_at, 1418599_at	collagen, type XI, alpha 1
1427986_a_at	collagen, type XVI, alpha 1
1418237_s_at, 1426955_at	collagen, type XVIII, alpha 1
1429549_at	collagen, type XXVII, alpha 1
1457823_at, 1438133_a_at, 1442340_x_at	cysteine rich protein 61
1418511_at	dermatopontin
1455688_at, 1422738_at	discoidin domain receptor family, member 2
1437218_at	fibronectin 1
1416164_at	fibulin 5
1427489_at, 1454966_at	integrin alpha 8

Fig.2-6 細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子 (1)

発現低下が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## B

### cell adhesion (2)

AFFYMETRIX 3PRIME IVT ID	Gene Name
1452784_at, 1421198_at	integrin alpha V
1417533_a_at, 1456133_x_at, 1417534_at, 1456195_x_at	integrin beta 5
1425039_at	integrin, beta-like 1
1424114_s_at, 1451241_at, 1424113_at	laminin B1 subunit 1
1424807_at	laminin, alpha 4
1416513_at	laminin, beta 2
1424010_at	microfibrillar-associated protein 4
1429841_at	multiple EGF-like-domains 10
1443037_at	neuroplastin
1423516_a_at	nidogen 2
1431375_s_at	parvin, alpha
1423606_at	periostin, osteoblast specific factor
1419309_at	podoplanin
1426794_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S
1422890_at, 1422889_at	protocadherin 18
1437360_at	protocadherin 19
1437442_at, 1456214_at	protocadherin 7
1422640_at	protocadherin beta 9
1438103_at, 1458721_at	protocadherin gamma subfamily A, 8; protocadherin gamma subfamily A, 9; protocadherin gamma subfamily B, 4; protocadherin gamma subfamily C, 3; protocadherin gamma subfamily C, 5; protocadherin gamma cluster; protocadherin gamma subfamily C, 4; protocadherin gamma subfamily A, 2; protocadherin gamma subfamily A, 3; protocadherin gamma subfamily A, 11; protocadherin gamma subfamily A, 12
1449254_at	secreted phosphoprotein 1
1418424_at	similar to TNF-stimulated gene 6 protein; tumor necrosis factor alpha induced protein 6
1419182_at	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
1423135_at	thymus cell antigen 1, theta
1448123_s_at, 1415871_at, 1437463_x_at, 1456250_x_at	transforming growth factor, beta induced
1421694_a_at, 1427256_at, 1427257_at	versican

Fig.2-6 細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子 (2)

発現低下が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子を示した。



## C

### regulation of developmental process (1)

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1435448_at, 1456006_at, 1435449_at, 1456005_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
1424376_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
1422642_at, 1450700_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
1452163_at	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain
1417558_at	Fyn proto-oncogene
1417394_at	Kruppel-like factor 4 (gut)
1454960_at	MAD homolog 3 (Drosophila)
1418634_at	Notch gene homolog 1 (Drosophila)
1424950_at, 1451538_at	SRY-box containing gene 9
1417818_at, 1437155_a_at	WW domain containing transcription regulator 1
1437785_at	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9
1448460_at	activin A receptor, type 1
1427584_at, 1454890_at	angiomin
1426869_at	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein
1430533_a_at	catenin (cadherin associated protein), beta 1
1448698_at, 1417419_at, 1417420_at	cyclin D1
1427683_at, 1427682_a_at	early growth response 2
1443117_at	eyes absent 1 homolog (Drosophila)
1422243_at	fibroblast growth factor 7
1425911_a_at, 1424050_s_at	fibroblast growth factor receptor 1
1437218_at	fibronectin 1
1450112_a_at	growth arrest specific 2
1442019_at, 1457270_at	growth arrest specific 7

Fig.2-6 細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子 (3)

発現低下が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

## D

### regulation of developmental process (2)

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1455729_at	guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide
1437664_at	homeo box D3
1437401_at	insulin-like growth factor 1
1434070_at	jagged 1
1424807_at	laminin, alpha 4
1448416_at	matrix Gla protein
1456524_at	neuregulin 1
1443037_at	neuroplastin
1420996_at	plexin A3
1419309_at	podoplanin
1454896_at	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
1424704_at	runt related transcription factor 2
1420416_at, 1449865_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A; hypothetical protein LOC100044161
1425840_a_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F
1454974_at	similar to Netrin-1 precursor; netrin 1
1437689_x_at, 1454849_x_at	similar to clusterin; clusterin
1423349_at, 1423350_at	suppressor of cytokine signaling 5
1460077_at	tetratricopeptide repeat domain 3
1423135_at	thymus cell antigen 1, theta
1454677_at, 1420924_at, 1460287_at, 1450040_at, 1433662_s_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
1417455_at	transforming growth factor, beta 3
1418733_at	twist homolog 1 (Drosophila)
1419417_at	vascular endothelial growth factor C
1448818_at, 1437673_at	wingless-related MMTV integration site 5A

Fig.2-6 細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子 (4)

発現低下が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞接着や発生過程に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

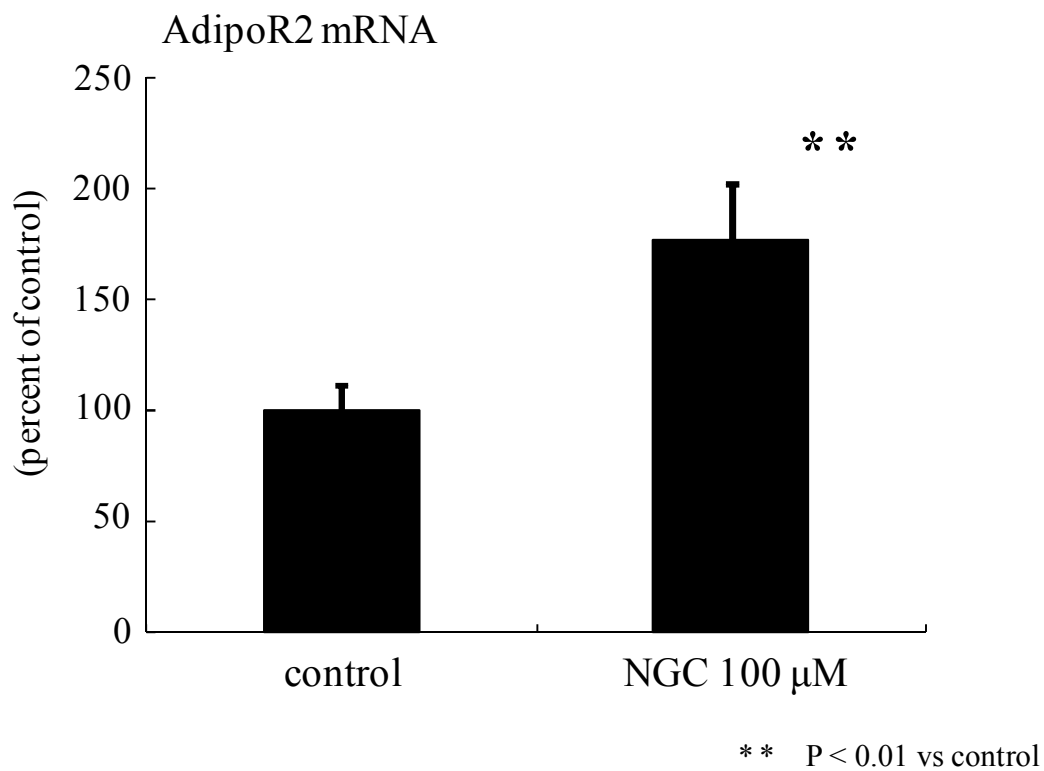


Fig.2-7 ナリンゲニンカルコンが脂肪細胞の AdipoR2 遺伝子発現に与える影響

3T3-L1 前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる過程でナリンゲニンカルコンを 100  $\mu$ M で作用させ、分化 8 日後の AdipoR2 遺伝子発現を定量 RT-PCR で測定した。

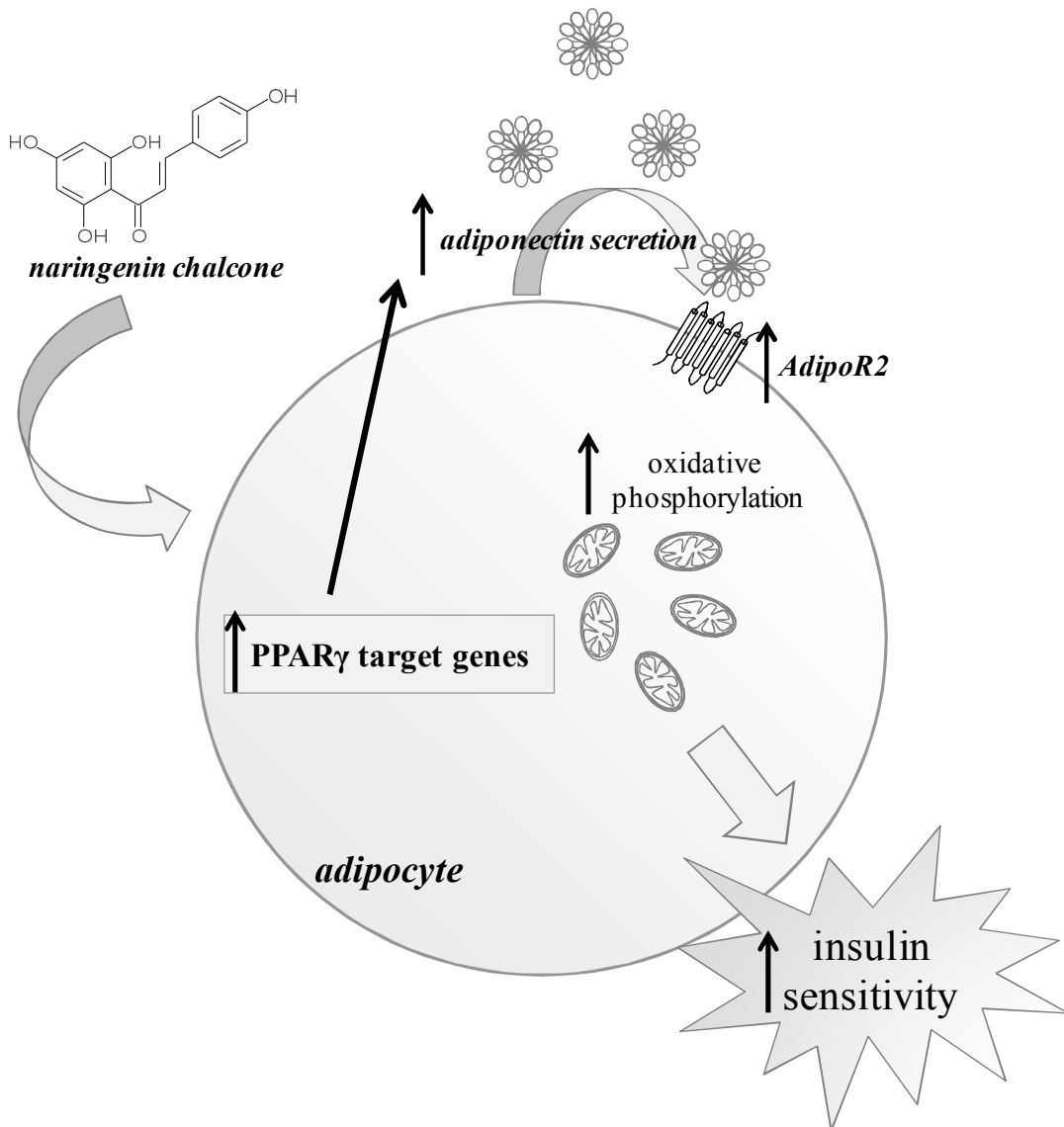


Fig.2-8 ナリンゲニンカルコンによる脂肪細胞の代謝制御

ナリンゲニンカルコンは脂肪細胞において PPAR $\gamma$  のアゴニストとして作用し、アディポネクチンの発現を亢進する一方、酸化リン酸化に関わる遺伝子群をはじめとした、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を上昇させる。また、AdipoR2 発現を上昇させ、リガンドであるアディポネクチンの作用をより効果的に発現させるようにする。これらの作用により、脂肪細胞のインスリン抵抗性が改善するものと推察される。

### 第3章

## ユズ種子に含まれるオバクソンの肥満、 高血糖改善作用

## 第1節 緒言

オバクノン<sup>®</sup>は柑橘類に存在するトリテルペン誘導体であるリモノイド類に属する化合物であり、アグリコン、あるいは配糖体の形で柑橘の種子に多量に蓄積することが知られている。柑橘の中でも香酸柑橘のユズは、果実中に多く種子を含み、種子そのものは多くの場合廃棄されているのが現状であることから、ユズの種子は比較的低コストで継続的に供給が可能なリモノイド類の有力なソースであると考えられる。

リモノイド類の生理活性については現在までに抗ガン、抗マラリア、抗菌作用などが報告されており (Roy A and Saraf S, 2006; Manners GD, 2007)、オバクノンもまた、ガン細胞のアポトーシスやカスパーゼ 3/7 の活性を誘導し、その増殖を阻害することで抗ガン作用を示すことが報告されている (Chidambara Murthy KN et al, 2011; Poulouse SM et al, 2006)。一方で、同じくリモノイド類に属しているノミリンは、胆汁酸受容体としてクローニングされた TGR5 に対してリガンド活性を示すこと、及び、高脂肪食負荷時における摂取が食事誘導性肥満や高血糖の予防に有効であることが報告されている (Ono E et al, 2011)。オバクノンが上記のような代謝性疾病に及ぼす影響については不明であったが、オバクノンが高コレステロール負荷マウスにおいて、血管内皮機能を高める (Yoon J et al, 2014) という最近の報告を考慮すると、オバクノンの経口摂取が序論で述べた代謝性疾病の改善に寄与する可能性が考えられる。そこで、本章ではリモノイドのソースとして有力と考えられるユズ種子に比較的多く含まれるオバクノンに着目し、肥満、2型糖尿病モデル動物である KK<sup>AY</sup> マウスにオバクノンを経口摂取させたときの機能性について解析を行うこととした。

## 第2節 実験方法

### 実験材料

ユズをオバクノン源として用いる柑橘として選抜し、ユズ種子を丸共青果間屋より購入した。オバクノン標準品は ChromaDex より購入した。ピオグリタゾン塩酸塩は和光純薬のものを使用した。その他の試薬は特に指定の無い限り、

Sigma のものを使用した。培養細胞での試験に用いるサンプルは DMSO に溶解させ、オバクノンは 100 mM、ピオグリタゾン塩酸塩は 5 mM のストック溶液とした。

## 細胞培養

HEK293 細胞は 10% FBS、4500 mg/ml グルコースを含む DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。3T3-L1 前駆脂肪細胞の培養法は第 2 章に記載の方法に準じた。脂肪細胞への分化誘導の際 (誘導開始時を day 0 とする) には、コンフルエントになった細胞に分化誘導培地 (5 μM ピオグリタゾン塩酸塩を添加) を加え、2 日間分化誘導を行った。誘導開始 2 日後、分化促進培地 (5 μM ピオグリタゾン塩酸塩を添加) に交換し、以降 2 日ごとに分化促進培地の培地交換を行い、脂肪細胞へと分化させた。100 μM オバクノン有無の条件下で上記の通り脂肪細胞を分化させ、分化への影響を確認した。Day 8 に分化した脂肪細胞の顕微鏡写真を撮影し (顕微鏡:オリンパス IMT-2、倍率 40 倍、カメラ:オリンパス SP350)、TG を抽出・測定した。これらはすべて n = 3 で実施した。

## TG 測定

分化した脂肪細胞の TG の抽出は、ヘキサン-イソプロピルアルコール (3:2、v/v) により行った。抽出した TG は、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬) を用い、付属のマニュアルに従って測定を実施した。また、抽出を実施した細胞のタンパク質量を、BCA protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) を用い、付属のマニュアルに従って定量した。測定した TG 量をタンパク質量で除し、標準化を行った。測定はすべて n = 3 で実施した。

## ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは定法に基づき (Sato R et al, 1999; Ono E et al, 2011)、第 2 章に記載の方法に準じて実施した。具体的な手順は下記の通りである。TGR5 リガンド活性の評価を行う際には、pCRE-Luc [cAMP response element (CRE) を

持つレポータープラスミド]、pcDNA-TGR5 (TGR5 発現プラスミド)、pEF- $\beta$ -Gal (内部コントロール用プラスミド) を、12 well plate 上の HEK293 細胞にトランスフェクションした。PPAR $\gamma$  の転写活性の評価を行う際には、pG5-Luc (GAL4 結合領域を持つレポータープラスミド)、pM-PPAR $\gamma$  (GAL4 DNA 結合領域と、PPAR $\gamma$  リガンド結合領域の融合タンパク質発現プラスミド)、pRL-CMV を、12 well plate 上の HEK293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは、Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用い、付属のマニュアルに従って行った。トランスフェクション 4 時間後、10%のデキストラン・活性炭処理 FBS を添加した DMEM に培地交換し、その 20 時間後に DMSO (vehicle)、あるいは被検化合物を添加した。比検化合物添加 5 時間後 (TGR5 リガンド活性評価時)、あるいは 24 時間後 (PPAR $\gamma$  転写活性評価時)、細胞を回収し、測定を行った。細胞の回収、及びルシフェラーゼレポーター活性の評価は Dual-Luciferase<sup>TM</sup> reporter assay system (Promega) を用い、付属のマニュアルに従って行った (Sato R et al, 1999; Ono E et al, 2011)。測定はすべて n = 3 で実施した。

#### 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィー (TLC) は TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (EMD Millipore) を用い、展開溶媒にはジクロロメタン-酢酸エチル (19:1、v/v) を用いて実施した。スポットの検出は 5%硫酸エタノール溶液をスプレーした後ホットプレート上で加熱することにより行った。

#### ユズ種子からのオバクノンの調製

動物試験に用いるオバクノンはユズ種子より調製した。ユズ種子を 100°C で乾燥させた後、フードプロセッサーで粉碎した。種子粉碎物にエタノールを加え、室温で 2 時間抽出した後ろ過し、ろ液を減圧濃縮した。濃縮した抽出物を double distilled water (ddw) で分散させ、沈殿を 5000 rpm、20 分遠心することで収集した。得られた沈殿を氷冷エタノールにて 2 回洗浄し、シリカゲルカラムを用いた分画に供した。分画の展開溶媒にはジクロロメタン-酢酸エチル (19:1、



v/v) を用い、得られたフラクシオンパターンを TLC により分析し、オバクノンフラクシオンを得た。得られたオバクノンは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、下記の条件で分析して標品と比較し、90%以上の純度であることを確認した。システム; Shimadzu SIL-10A auto injector、SPD-10A UV spectrophotometric detector、CBM-20A communications bus module、LC-10AD pump: カラム; Shiseido CAPCELL PAK C18 MGIII (4.6 mm ID × 250 mm): 溶媒; アセトニトリル-水 (1:1、v/v): 流速; 1 ml/min: 検出波長; 210 nm。

### 動物試験

試験プロトコールはキッコーマン株式会社の動物実験委員会により承認され (承認番号 2013-Y24)、日本実験動物学会のガイドラインに則って試験を実施した。全ての外科的処置はイソフルラン麻酔下で実施し、動物の苦痛軽減のための処置を行った。

3 週齢、雄性の KKAy マウスを日本クレアから購入し、4 週齢の時点で平均体重及び HbA1c が等しくなるように各群 8 匹、2 群 (コントロール群、0.1%オバクノン群) に割り付けた (コントロール体重 22.5 g、HbA1c 2.84%、0.1%オバクノン群体重 22.1 g、HbA1c 2.83%)。マウスは 22°C、湿度 60%、12 時間サイクルの明暗期、SPF 環境の動物飼育室にて個別に飼育した。水は自由摂取とし、摂餌はペアフィードにより実施した。餌は AIN-93G をコントロール食としてコントロール群に投与し、0.1%オバクノン群にはオバクノンを 0.1%となるように AIN-93G に均一に混合・調製した飼料を投与した。体重は毎日測定を実施し、HbA1c と血糖値は毎週測定を実施した。摂餌開始 28 日後に、マウスを 16 時間絶食の後イソフルラン麻酔下で屠殺し、褐色脂肪組織、白色脂肪組織、腓腹筋、大腿筋重量を測定した。血液サンプルは採取後直ちにジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP4) 阻害剤 (EMD Millipore) を添加し、血清を採取した。血清は測定まで -80°C にて保管した。

### HbA1c 及び血糖値測定

HbA1c及び血糖値はDCA2000 (バイエルメディカル) 及びアントセンス III (堀場製作所) を用いて測定した。

#### 血清パラメーター測定

血清中の GLP-1 は Lbis GLP-1 (active) ELISA Kit (シバヤギ) を用いて測定した。また、血清中のインスリンは Lbis Insulin-mouse-T ELISA Kit (シバヤギ) を用いて測定した。

#### 統計解析

測定値は平均±標準偏差の形で表した。動物試験におけるコントロール群との 2 群比較では、対応のない t 検定を用いた。3 群以上の比較では、一元配置分散分析の後、Bonferroni/Dunn 法を用いた。p 値が 0.05 より小さい場合を有意な変化があるとみなした。

### 第3節 結果

KKAy マウスにおけるオバクノン経口摂取は体脂肪重量を減少させ、骨格筋重量を増加させる。

最初に、オバクノンの経口摂取が代謝性疾患に関与するパラメーターに及ぼす影響を評価する目的で、肥満・2型糖尿病モデル動物である KKAy マウスにコントロール食及び 0.1%オバクノン食を 28 日間摂取させた。リモノイドアグリコンはその強い苦味により、混餌することによってマウスの摂餌量が低下する可能性が過去の予備的な検討結果から懸念されたため、その影響を最小限に抑えるためにペアフィードにより摂餌量が等しくなるように試験を実施した。試験終了時の体重は両群で差が認められなかった (Fig.3-1 A) が、オバクノンの経口摂取により、皮下脂肪及び内臓脂肪組織重量比 (体重に対する比率) が有意に低くなっていることが確認された (Fig.3-1 B)。これら白色脂肪組織で認められた変化とは異なり、褐色脂肪組織重量比については両群間で有意な差が認められなかった。大腿筋、及び、腓腹筋重量比 (体重に対する比率) は 0.1%オバクノン群でコントロール群に比べ有意な増加が認められた (Fig.3-1 C)。これらの結果は、オバクノンの継続的な経口摂取が代謝性疾患に関わるパラメーターの改善に寄与する可能性を示唆していると考えられた。

KKAy マウスにおけるオバクノン経口摂取は糖代謝の増悪を予防する。

次に、KKAy マウスに 28 日間 0.1%オバクノン食を摂取させて飼育した際に糖代謝に現れる影響を評価した。Fig.3-2 A に示したように、0.1%オバクノン群はコントロール群と比べて有意に低い空腹時血糖値と HbA1c 値を示した。統計学的に有意な水準には達していないものの、0.1%オバクノン群ではコントロール群に比べ血清インスリンレベルが低く、血清 GLP-1 レベルが高くなっていた (Fig.3-2 B)。GLP-1 は摂食直後に血中に分泌される腸由来のペプチドで、摂食後の糖代謝を制御し、血糖を低下させる。これらの結果は、オバクノンの継続的な経口摂取が高血糖を予防することを示唆するとともに、オバクノンの摂取による GLP-1 分泌がオバクノンの高血糖抑制作用に寄与している可能性を示すも

のと考えられた。

#### オバクノンは TGR5 の転写活性を上昇させる。

上記の結果は、オバクノンが GLP-1 分泌を亢進することにより糖尿病の進展を抑制する可能性を示すものと考えられた。そこで、オバクノンによる TGR5-GLP-1 経路の刺激・増強が、代謝性疾患関連のパラメーターにオバクノンが及ぼす好ましい効果に寄与しているのではないかと考え、これについて検証を行うこととした。まず TGR5 発現プラスミドと、CRE を有するレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより、オバクノンが TGR5 による転写に与える影響を評価した。HEK293 細胞に上記のプラスミドをトランスフェクションし、5 時間の 0-100  $\mu$ M オバクノン処理の後、細胞を回収して測定を行ったところ、オバクノンはポジティブコントロールとして用いた胆汁酸の一種であるタウロコール酸 (TLCA) と同様、TGR5 発現プラスミド存在下でレポーター活性を増大させた (Fig.3-3 A)。さらに、この転写活性の上昇はオバクノンの濃度依存的に認められ (Fig.3-3 B)、オバクノンが TGR5 のアゴニストとして作用し、その転写活性を上昇させていることが示唆された。

#### オバクノンは PPAR $\gamma$ をアンタゴナイズし、脂肪細胞の TG 蓄積を阻害する。

KKAy マウスを用いた動物試験において、オバクノンの継続経口摂取により脂肪組織重量比の増加が抑制されていたことから、オバクノンが脂質代謝におけるマスターレギュレーターである核内受容体 PPAR $\gamma$  の転写活性に影響を及ぼしている可能性を考え、第 2 章の検討でも用いた Gal4-UAS のレポーターアッセイ系により評価した。Fig.3-4 A に示すように、合成リガンドであるピオグリタゾンにより活性化された PPAR $\gamma$  の転写活性は、オバクノンを共存させることで有意に抑制されることが明らかとなった。さらに、脂肪細胞をピオグリタゾン存在下で分化させたとき、オバクノンを共存させることにより、TG の蓄積が大きく抑制されることも確認された (Fig.3-4 B, 3-4 C)。これらの結果から、オバクノンは PPAR $\gamma$  をアンタゴナイズすることでその転写活性を抑制することが示唆さ

れた。このことは、動物試験で確認されたオバクノンの継続経口摂取による抗肥満効果の少なくとも一部は、ここで確認されたオバクノンの PPAR $\gamma$  アンタゴニスト活性が寄与している可能性を示唆していると考えられた。

#### 第4節 考察

本章での検討により、オバクノンの継続的な経口摂取が、肥満・2型糖尿病モデル動物である KKAY マウスにおいて、その体重に影響を与えることなく、白色脂肪組織における脂肪蓄積を抑制し、同時に、骨格筋重量を増加させることが明らかとなった。さらに、オバクノンを摂取させたマウスはコントロール食を与えたマウスに比べ、有意に血糖値と HbA1c が低く抑えられていることも確認された。レポーターアッセイの結果からは、オバクノンが TGR5 による転写を活性化させる一方で、PPAR $\gamma$  をアンタゴナイズし、脂肪細胞の TG 蓄積を抑制することが示唆された。これらの結果は、オバクノンの継続的な経口摂取が、高血糖や肥満の予防、あるいは、骨格筋量の維持・増大を介した代謝性疾患のリスク低減に有用である可能性を示唆するものであると考えられる。

GLP-1 は消化管ホルモンのインクレチンの一種であり、小腸上皮の腸内分泌細胞である L 細胞で合成される前駆体から活性型へと変換されるペプチドである (Holst JJ, 2007)。摂食の直後、GLP-1 は血中に分泌され、摂食後のグルコース代謝に様々な影響を及ぼす内分泌効果を発揮する。GLP-1 の分泌は、TGR5 の活性化により促進されることが腸内分泌細胞の細胞株である STC-1 細胞を用いた実験により確認されている (Katsuma S et al, 2005)。また、TGR5 の活性化による小腸での GLP-1 分泌促進は、肥満マウスにおける耐糖能を高めることが報告されている (Thomas C et al, 2009)。統計学的に有意な水準には至らなかったものの、本章で実施した動物試験において、0.1%オバクノン群の血清 GLP-1 濃度は、コントロール群に比べて高くなっている傾向が認められた (Fig.3-2 B)。オバクノンが TGR5 による転写活性を上昇させること (Fig.3-3) を考慮すると、オバクノンによる血糖低下作用の少なくとも一部は、TGR5-GLP-1 経路の活性化を介して発揮されている可能性が考えられる。血清 GLP-1 レベルに群間の有意差がつかず、傾向が認められる程度の変化に留まった理由として、血液のサンプリングタイミングが要因の 1 つではないかと考えられる。今回の試験では、血液を一晩以上絶食させた後のマウスから採取している。一般的に、GLP-1 は摂食直後に分泌され、速やかに DPPIV により分解されるため、その半減期は非常に短く

数分とされている。このため、本試験で用いた血液は、サンプリングの時点で GLP-1 レベルが定常状態に近いレベルまで戻っていた可能性があると考えられる。オバクノンの継続的な経口摂取で TGR5 活性が持続的に刺激されることにより、上記の血液サンプルにおいても 0.1%オバクノン群で GLP-1 の上昇傾向が認められたのではないかと考えられる。

興味深いことに、オバクノンの経口摂取は糖代謝を改善するのみならず、腓腹筋や大腿筋の骨格筋重量比を増加させることが確認された(Fig.3-1 B)。近年の研究から、糖代謝の恒常性維持において、TGR5-AKT-mTOR シグナル経路が、脂肪組織におけるマクロファージの機能を制御することによって重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた (Perino A et al, 2014)。また、AKT-mTOR 経路は多くのタンパク質合成に関わる経路を協調的に制御することから、通常の骨格筋の発達や筋肥大の主要な制御因子であると考えられている (Bodine SC et al, 2001; Glass DJ, 2003; Parkington JD et al, 2003; Leger B et al, 2006)。これらの報告は、経口摂取したオバクノンが骨格筋において TGR5-AKT-mTOR シグナル経路を制御し、骨格筋肥大を増強する可能性があることを示唆していると考えられる。一方で、ある種の GPCR は骨格筋肥大を誘導することが知られている (Berdeaux R and Stewart R, 2012)。GPCR のこうした効果は、ホスホジエステラーゼ活性の阻害が骨格筋委縮を減弱させる (Hinkle RT et al, 2005; Baviera AM et al, 2007) ことから、骨格筋における選択的な cAMP シグナルの活性化に起因していると考えられる。TGR5 が Gas と共役し、アデニル酸シクラーゼの活性化とそれに引き続く cAMP 合成を誘導することを考慮すると、オバクノンによる TGR5 活性化は、細胞内 cAMP シグナルの制御を介して骨格筋肥大にも寄与しているのではないかと考えられる。経口摂取したオバクノンがどのようなメカニズムにより筋肥大経路を刺激しているのかについては、今後より詳細な検討を行い、明らかにしてゆく必要がある。

本章で実施したレポーターアッセイにより、オバクノンは TGR5 の転写活性を上昇させるのみならず、リガンド依存的な PPAR $\gamma$  の転写活性をアンタゴナイズすることが確認された (Fig.3-4 A)。PPAR $\gamma$  は核内受容体スーパーファミリー

に属する転写因子であり、糖・脂質代謝恒常性に関わる複雑な転写制御ネットワークにおいて中心的な役割を担っている。チアゾリジン誘導体は、PPAR $\gamma$  リガンドとして機能する化合物群であり、インスリン抵抗性の改善を介して血糖値を低下させることが知られている。しかしながら、これらの化合物群は、同時に脂肪組織重量増加リスクを増大させることが報告されており (Burkey BF et al, 2000; Wang Q et al, 1997; Kelly IE et al, 1999)、糖尿病治療薬として処方される際、こうした副作用に留意する必要がある。一方で、PPAR $\gamma$  の転写活性亢進ではなく、逆にその転写活性を一部抑制することがインスリン抵抗性や肥満の予防に寄与することも複数の研究から示唆されている。別の研究では、PPAR $\gamma$  のヘテロ欠損マウスは高脂肪食負荷時においてもインスリン抵抗性や脂肪組織蓄積に対して抵抗性を示すことが報告されている (Kubota N et al, 1999)。さらに、PPAR $\gamma$  のアンタゴニストは、脂肪細胞の分化と脂肪合成を阻害することも明らかとなっている (Wright HM et al, 2000; Camp HS et al, 2001)。Fig.3-4 の結果が示すように、オバクノンがピオグリタゾンによる PPAR $\gamma$  の活性化をアンタゴナイズすること、及び、分化中の脂肪細胞における脂質蓄積を阻害することを考慮すると、Fig.3-1 B で認められた、オバクノンを経口摂取したマウスにおける脂肪組織重量の減少は、オバクノンによる PPAR $\gamma$  の転写活性の部分的な抑制に起因するのではないかと考えられる。同様に、オバクノンの糖代謝改善作用に関しても、TGR5 の活性化だけでなく、PPAR $\gamma$  のアンタゴナイズが寄与している可能性が推察される。今までに PPAR $\gamma$  をアンタゴナイズする天然由来の化合物として、アスタキサンチンとレスベラトロールが報告されている (Jia Y et al, 2012; Calleri E et al, 2014)。アスタキサンチンは PPAR $\gamma$  の ligand binding domain (LBD) に直接結合することによってアンタゴニストとして作用する一方、レスベラトロールは、自身とその代謝産物であるグルクロニドが PPAR $\gamma$  と結合することによりアンタゴニストとして作用する。これらの化合物とオバクノンは基本骨格が異なっており、オバクノンがこれらの化合物と同様に PPAR $\gamma$  の LBD に結合することによってアンタゴニスト活性を発揮しているかどうかは定かではないが、PPAR $\gamma$  との相互作用の有無など、アンタゴナイズの様式についての検討は今後



の課題としたい。

本章では、アグリコン状態のリモノイドであるオバクノンを用いて、KKAyの代謝性疾患関連のパラメーターに及ぼす影響を評価した。一般に、リモノイドは水に不溶で強い苦味を呈するアグリコンとして存在する一方で、水溶性で無味の配糖体も成熟した柑橘種子や果肉に存在する (Hasegawa S et al, 1989; Fong CH et al, 1989)。柑橘類の果汁には、アグリコンに比べて配糖体のリモノイドが多い (Fong CH et al, 1989; Herman Z et al, 1990) ことから、通常の食生活においては、リモノイド配糖体が主要なリモノイド類の供給源になると考えられる。こうした背景から、リモノイド配糖体がアグリコンと同等の活性を示すことができるかどうかは、食を通じた機能性の発現を考える上で重大な関心事である。リモノイド配糖体とアグリコンの抗酸化活性について比較した最近の研究では、その活性が異なることが報告されており (Minamisawa M et al, 2014)、リモノイド配糖体とアグリコンの生理活性は一般的には異なることが予想される。しかし、リモニン配糖体をヒトが経口摂取した際に、アグリコンであるリモニンが血漿中で検出されたという報告 (Manners GD et al, 2003) から、経口摂取したリモノイド配糖体は消化管でアグリコンに変換され、体内でアグリコンの活性を発揮できる可能性が推察される。経口摂取したリモノイド配糖体が本章で認められたようなアグリコンと同等の機能性を示すことができるのかどうかについては、今後検討を進め、明らかにする必要がある。

本章の結果から、柑橘のユズ種子由来のリモノイドの一種であるオバクノンは、肥満・2型糖尿病モデル動物である KKAy マウスに継続的に経口摂取させることにより、高血糖の抑制や骨格筋量の増大などの効果を発揮することが示された。これらの効果は、少なくとも部分的には TGR5 が関与する様々なシグナル経路をオバクノンが活性化することによって引き起こされていることが示唆された。また、オバクノンが PPAR $\gamma$  のアンタゴニストとして作用し、それが動物試験での脂肪蓄積阻害効果に寄与していることも示された。これらの結果は、オバクノンの継続的な経口摂取が、高血糖や肥満の予防や骨格筋量の増大など、代謝性疾患の改善を考える上で有用な変化をもたらさうる可能性を示している

と考えられる。

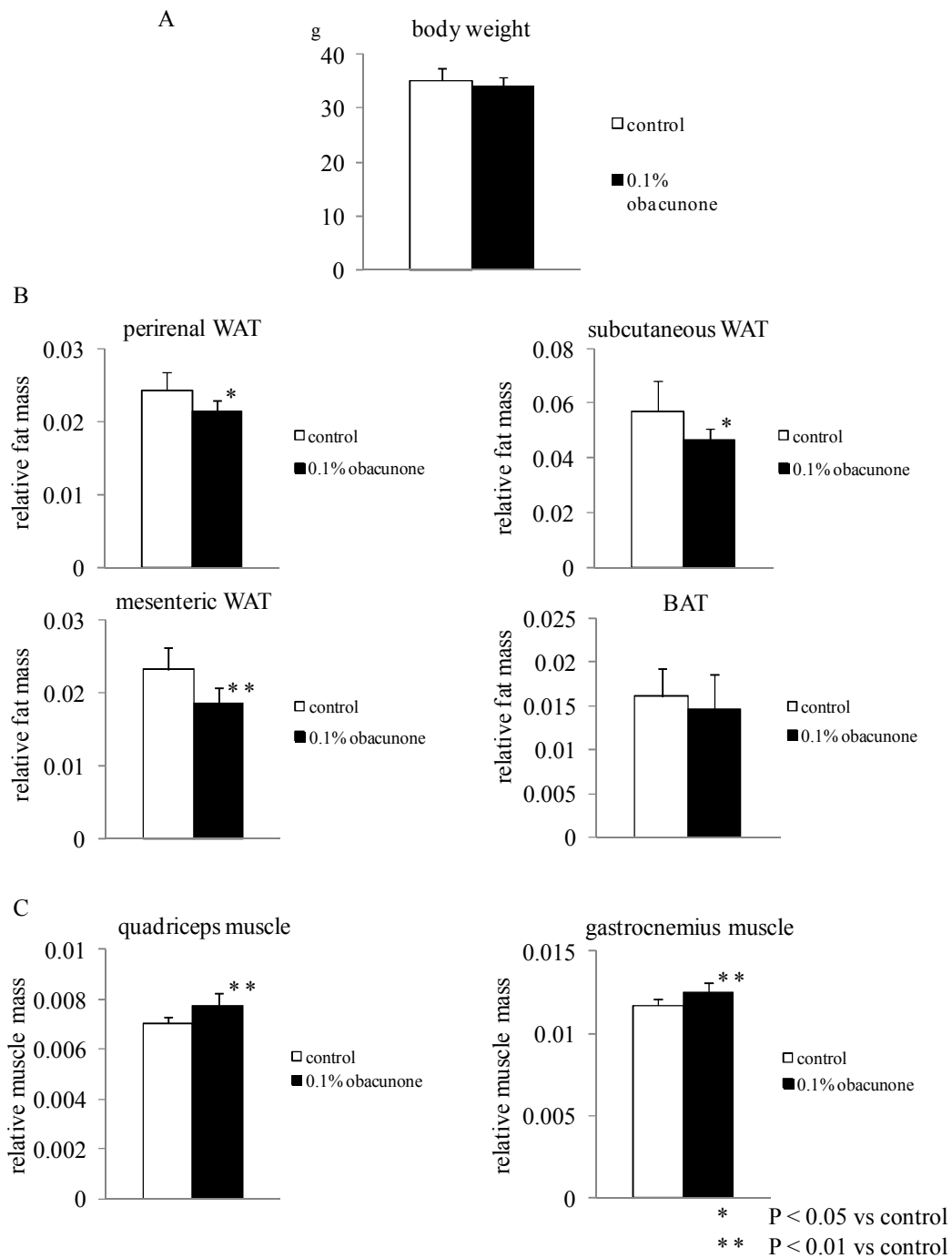


Fig.3-1 オバクノン摂取による KKAY マウスの組織重量の変化

オバクノンを 28 日間摂取させた KKAY マウスの、**A.** 体重、**B.** 脂肪組織重量、**C.** 骨格筋重量。KKAY マウスに AIN-93G、あるいは 0.1%オバクノンを含む AIN-93G を 28 日間ペアフィードにより摂取させ、16 時間絶食後に体重及び各組織重量を測定した。

WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue

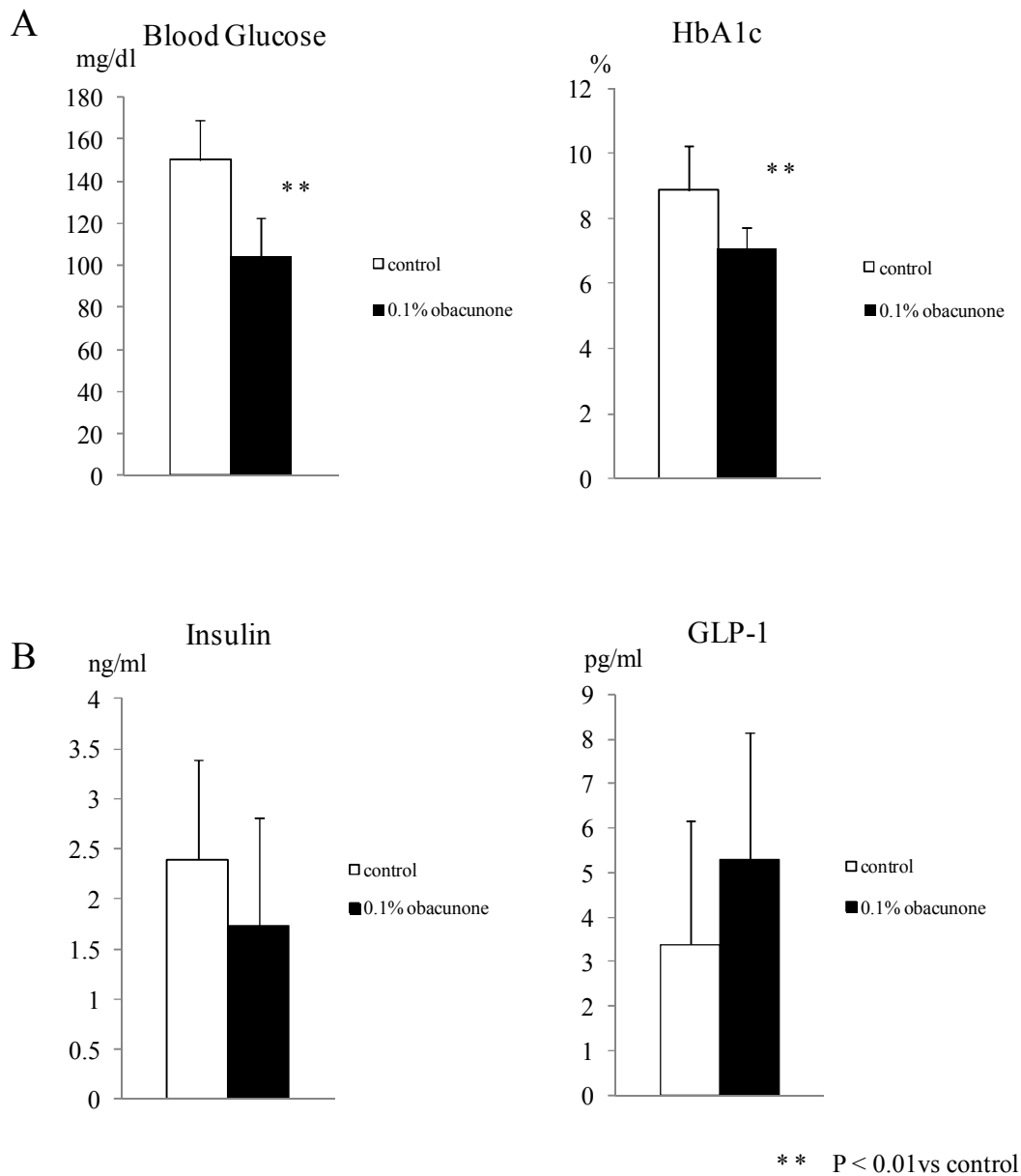


Fig.3-2 オバクノン摂取による KKAY マウスの糖代謝関連パラメーターへの影響

0.1%オバクノンを含む餌を28日間摂取させた KKAY マウスの、**A.** 空腹時血糖及び HbA1c、**B.** 血清インスリン及び GLP-1 値。KKAY マウスに AIN-93G、あるいは 0.1%オバクノンを含む AIN-93G を28日間ペアフィードにより摂取させ、16時間絶食後に採血し、空腹時血糖及び HbA1c を測定すると同時に血清を採取した。血清中のインスリン及び GLP-1 は ELISA 法にて測定した。

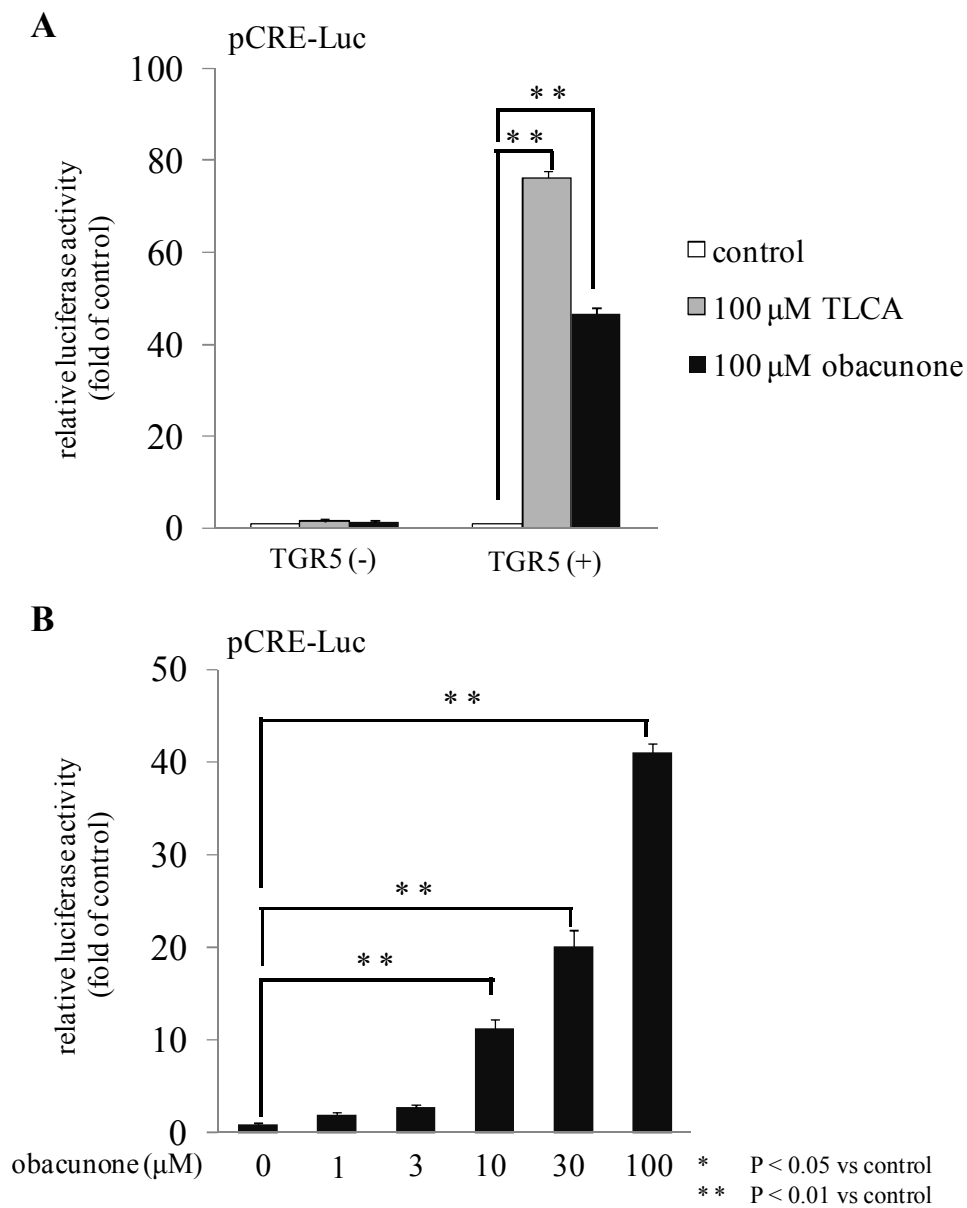
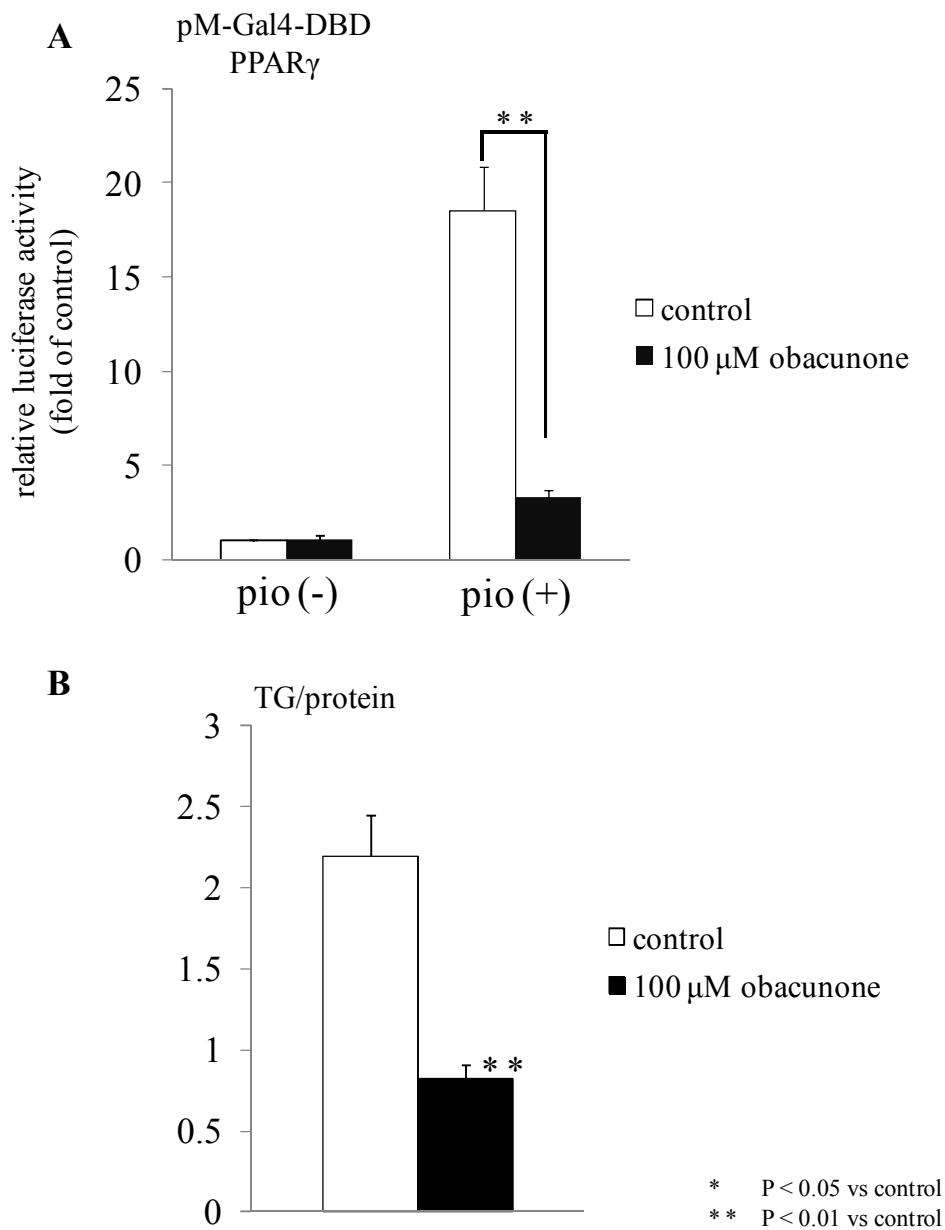


Fig.3-3 オバクノンが TGR5 の転写活性に及ぼす影響

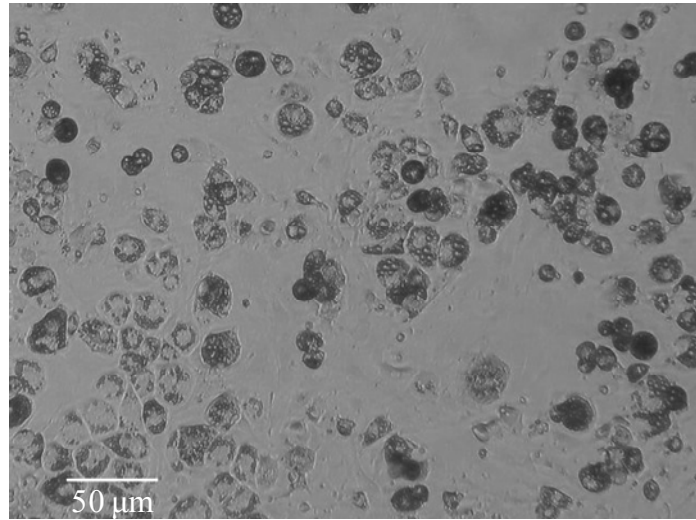
HEK293 細胞に表記のレポーター遺伝子をトランスフェクションし、100  $\mu$ M の TLCA、あるいは 0–100  $\mu$ M のオバクノン含有培地で 24 時間培養した。その後細胞を回収し、レポーター遺伝子アッセイを行った。



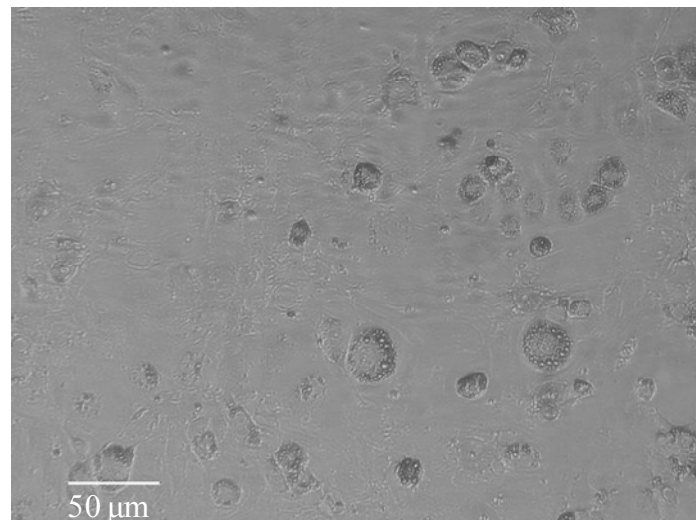
**Fig.3-4** オバクノンが PPAR $\gamma$  の転写活性に及ぼす影響と脂肪細胞分化に伴う TG 蓄積に及ぼす影響

**A.** HEK293 細胞に表記のレポーター遺伝子及び TGR5 発現プラスミドをトランスフェクションし、100  $\mu$ M のオバクノン含有培地で 24 時間培養後細胞を回収し、レポータージーンアッセイを行った。**B.** ピオグリタゾン存在下で 3T3-L1 細胞を分化させ、この過程で 100  $\mu$ M のオバクノンを共存させた時の TG 蓄積に及ぼす影響を評価した。分化誘導 8 日後に TG 抽出測定、タンパク質量の測定を実施した。

C



control



obacunone

Fig.3-4 オバクノンが PPAR $\gamma$  の転写活性に及ぼす影響と脂肪細胞分化に伴う TG 蓄積に及ぼす影響

C. ピオグリタゾン存在下で 3T3-L1 細胞を分化させ、この過程で 100  $\mu$ M のオバクノンを共存させた時の TG 蓄積に及ぼす影響を評価した。分化誘導 8 日後の細胞の様子を顕微鏡下で写真撮影した。

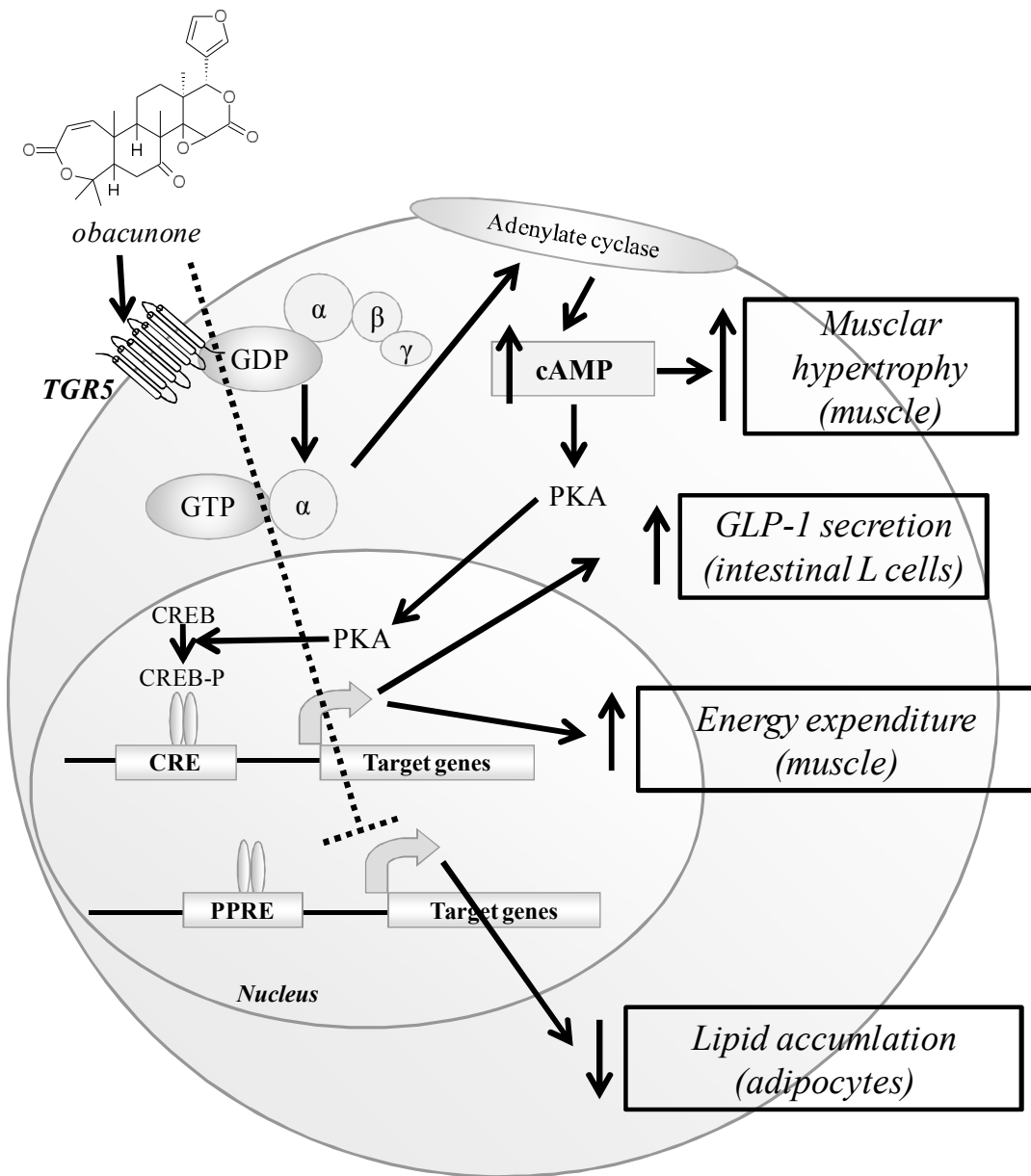


Fig.3-5 オバクノンの作用メカニズム

オバクノンは TGR5 のリガンドとして作用することで細胞内 cAMP 濃度の上昇を介してシグナルを伝達し、標的遺伝子の転写活性化を介してエネルギー消費を亢進させる一方、小腸の L 細胞では GLP-1 分泌を促して糖代謝の改善に寄与しているものと考えられる。骨格筋重量の増加は、TGR5-mTOR 経路の活性化や cAMP 濃度上昇を介しているものと推察されるが、メカニズム解明に向けさらなる検討が必要である。オバクノンは PPAR $\gamma$  のアンタゴニストとしても作用し、脂肪細胞における TG 蓄積阻害により抗肥満効果を発揮しているものと考えられる。



#### 第4章

## マンゴスチンに含まれる $\alpha$ -マンゴスチンの 筋分化促進作用

## 第1節 緒言

$\alpha$ -マンゴスチンは、東南アジア原産の熱帯性常緑樹であるマンゴスチンに豊富に含まれるキサントン類に属するポリフェノールの一種である。キサントン類は特にマンゴスチンの果皮に多く蓄積が認められ、その主要なキサントンは  $\alpha$ -マンゴスチンと  $\gamma$ -マンゴスチンである (Walker EB, 2007)。 $\alpha$ -マンゴスチンについてはその生理活性について多くの知見が蓄積しており、抗アポトーシス効果、抗腫瘍効果、抗炎症効果、抗酸化効果などが報告されている (Gutierrez-Orozco F and Failla ML, 2013)。マンゴスチンの果皮や果実は東南アジアにおいて伝統薬として下痢、赤痢、皮膚感染症、炎症、高熱などの治療に用いられてきており (Pedraza-Chaverri J et al, 2008; Obolskiy D et al, 2009)、マンゴスチンに豊富に含まれるキサントン類が上記用途における薬理作用に大きく寄与しているものと考えられる。しかし、上記以外のキサントン類の生理活性、とりわけ、本研究の対象としている代謝性疾患に関わる機能性についての研究報告はなく、骨格筋に及ぼす影響については不明であった。そこで本章では、含量が多く、主要なキサントンである  $\alpha$ -マンゴスチンが骨格筋分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、筋管形成に関わる生化学的プロセスの解析実験に用いる細胞株として確立されたモデルである C2C12 細胞 (Yaffe D and Saxel O, 1977) が  $\alpha$ -マンゴスチン存在下で分化する際の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析した。

## 第2節 実験方法

### 実験材料

$\alpha$ -マンゴスチンは ChromaDex より購入し、DMSO に溶解させることで 5 mM のストック溶液を調製した。その他の試薬は特に指定の無い限り、Sigma のものを使用した。

### 細胞培養

C2C12 細胞は 10% FBS、4500 mg/ml グルコースを含む DMEM を用い、37°C、

5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。筋管細胞への分化誘導の際 (誘導開始時を day 0 とする) には、細胞がコンフルエントに達した後、分化培地 (2% FBS、4500 mg/ml グルコースを含む DMEM) に交換し、以降 2 日ごとに分化培地の交換を行い、筋管細胞へと分化させた。Day 4 に分化した筋管細胞の顕微鏡写真を撮影し (顕微鏡: オリンパス IMT-2、倍率 40 倍、カメラ: オリンパス SP350)、細胞から total RNA を抽出した。これらはすべて n = 3 で実施した。

## RNA 抽出

Total RNA は TRIzol (Invitrogen) と、PureLink® RNA Mini Kit (Life technology) を使い、付属のマニュアルに従って抽出、精製した。A260 nm/A280 nm の値が 1.6-2.0 となるサンプルのみ、リアルタイム RT-PCR 及び DNA マイクロアレイに用いた。

## リアルタイム定量 RT-PCR

Myl2、titin-cap、follistatin の遺伝子発現は SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (タカラバイオ) を使い、付属のマニュアルに従って行った。簡単には、PrimeScript® RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて total RNA を cDNA へと逆転写し、SYBR® Premix Ex Taq™ (タカラバイオ) を使い、リアルタイム定量 RT-PCR を実施した。リアルタイム反応とデータ解析は Mx3005P QPCR system (Stratagene) と、MxPro software (Stratagene) を用いて行った。標準化に用いるハウスキーピング遺伝子は cyclophilin とした。プライマー配列は本節の最後に表 2-1 として記載した。

## DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を使い、付属のマニュアルに従って行った。簡単には、100 ng の total RNA を cDNA に逆転写した後に dsDNA へと変換し、これを鋳型にしてビオチン化 cRNA を合成した。この cRNA を断片化した後、45°C で 16 時間アレイにハイブリダイズさせた。ハ

イブリダイズさせたアレイを洗浄した後、ストレプトアビジン-フィコエリスリンで染色し、Affymetrix GeneChip System を用いてスキャンし、データを得た。

#### DNA マイクロアレイデータ解析

スキャンしたアレイイメージを CEL ファイルに変換し、各プローブ強度を得るために、Affymetrix の GCOS ソフトウェアを用いた。スキャンにより得られた CEL ファイルは、統計ソフト R と Bioconductor により、Factor Analysis for Robust Microarray Summarization (qFARMS) 法を用いて正規化を行った後、サンプル間の階層的クラスタリングを行った。コントロール群と  $\alpha$ -マンゴスチン群の間で発現に差がある遺伝子セット (DEGs) の選抜は、Rank Product 法にて行い、FDR < 0.01 となる遺伝子を有意に発現が異なるものとみなした。DEGs を Mouse Genome 430 2.0 Array バックグラウンド (GeneChip に搭載されている全遺伝子) と比較し、どのような機能を持った遺伝子セットが濃縮されてきているかについて、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の functional annotation chart を用いて解析を行い、有意に濃縮された Gene Ontology (GO) を抽出した。FDR < 0.05 となる GO を有意に濃縮されたものとみなした。

#### 統計解析

測定値は平均 $\pm$ 標準偏差の形で表した。コントロール群との 2 群比較では、対応のない t 検定を用いた。p 値が 0.05 より小さい場合を有意な変化があるとみなした。

cyclophilin (標準化用)

5'-TGGTGACTTTACACGCCATA-3'

5'-CAGTCTTGGCAGTGCAGATA-3'

Myl2

5'-CCCTAGGACGAGTGAACGTG-3'

5'-TCCCGGACATAGTCAGCCTT-3'

titin-cap

5'-AAGAGGGATGCTCCTTGCAC-3'

5'-GGTATTCCTGTAGCCCACGG-3'

follistatin

5'-GTGACAATGCCACATACGCC-3'

5'-TCCGAGATGGAGTTGCAAGA-3'

表 4-1 リアルタイム定量 RT-PCR に用いたプライマー一覧

### 第3節 結果

#### $\alpha$ -マンゴスチンは C2C12 筋芽細胞の分化を促進する

はじめに、 $\alpha$ -マンゴスチンが C2C12 筋芽細胞の分化に及ぼす影響を評価した。C2C12 筋芽細胞を、 $\alpha$ -マンゴスチン 5  $\mu$ M 存在下で分化誘導し、誘導 4 日後まで分化させた。4 日後、 $\alpha$ -マンゴスチン存在下で分化させた細胞は、コントロール群の細胞に比べ、筋管の形成が促進されていた (Fig.4-1 A)。また、この時点の細胞から total RNA を回収し、骨格筋合成のマーカー因子の一つである Myl2 の発現を測定したところ、 $\alpha$ -マンゴスチン群での発現はコントロール群と比較し有意に上昇していた (Fig.4-1 B)。これらの結果から、 $\alpha$ -マンゴスチンは筋芽細胞の分化を促進することが示唆された。

#### DNA マイクロアレイ解析

次に、 $\alpha$ -マンゴスチンが筋芽細胞の分化に際し、遺伝子発現にどのように影響を与えているのかを包括的に調べるため、DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を使用し、得られたデータを qFARMS 法により正規化、階層的クラスタリングを行い、コントロール群と  $\alpha$ -マンゴスチン群でクラスターが分かれていることを確認した (Fig. 4-2) 後、コントロール群と  $\alpha$ -マンゴスチン群で発現の異なる遺伝子セットを Rank Product 法にて抽出した。 $\alpha$ -マンゴスチン添加によって、より強く影響を受けた遺伝子群に着目して解析を行うため、このステップでは FDR 0.01 未満を満たすものを有意に発現が異なるとみなし、遺伝子の抽出を実施した。コントロール群と比較し、 $\alpha$ -マンゴスチン群で有意に発現上昇が認められた遺伝子は 213 個であり、有意に発現低下が認められた遺伝子は 375 個であった。

第 2 章の解析と同様に、これらの有意な発現変動が認められた遺伝子群について、どのような機能を持った遺伝子が有意に濃縮されてきているのか、DAVID の gene-annotation enrichment analysis によって、GO biological process、及び cellular component のアノテーションに基づき解析を行い、GO の階層構造表示としてまとめた。 $\alpha$ -マンゴスチンにより発現上昇が認められた遺伝子群について、

biological process、及び cellular component の下層の GO term について整理したものをそれぞれ Fig.4-3 A, B に示した。また、発現低下が認められた遺伝子群について、同様に整理したものをそれぞれ Fig.4-4 A, B に示した。

$\alpha$ -マンゴスチンにより発現上昇が認められた遺伝子群のなかで有意に濃縮されていた GO terms には、biological process については、"heart development"、"muscle cell fate commitment"、"BMP signaling pathway"などが認められた。また、cellular component については"actin cytoskeleton"、"anchored to plasma membrane"、"sarcoplasmic reticulum"などが認められた。これらの term に含まれていた遺伝子の一覧を Fig.4-5 に示した。これらの GO term には、筋分化に関与するもの、骨格筋の構成因子に関わるものが多く含まれていた。一方、 $\alpha$ -マンゴスチンにより有意な発現低下が認められた遺伝子群においては、"fibrillar collagen"、"extracellular space"、"focal adhesion"などの term が認められた。これらの term に含まれていた遺伝子の一覧は Fig.4-6 に示した。このことから、 $\alpha$ -マンゴスチン処理によって、骨格筋の分化、及び、それに伴って起こる細胞の形態変化に関与している遺伝子群の発現が制御されている可能性が示唆された。

#### $\alpha$ -マンゴスチンがミオスタチン経路に及ぼす影響

DNA マイクロアレイ解析において、 $\alpha$ -マンゴスチンにより有意な発現上昇が認められた遺伝子群のなかには、ミオスタチン経路を負に制御する因子 (titin-cap、follistatin) が確認された (Fig. 4-5)。ミオスタチンは骨格筋の成長を負に制御し、MyoD の発現を負に制御することで筋芽細胞の分化を阻害することが報告されており (Langley B et al, 2002)、廃用性筋萎縮やカヘキシアなど、筋萎縮を伴う多くの病態でミオスタチンの発現及び血清ミオスタチンレベルの亢進が認められている (Schakman O et al, 2009; Zachwieja JJ et al, 1999)。titin-cap は、ミオスタチンと相互作用することでその分泌を阻害することが (Nicholas G et al, 2002)、follistatin は直接の相互作用を介してミオスタチンをアンタゴナイズすることが (Amthor H et al, 2004)、それぞれ報告されている。DNA マイクロアレイ解析で認められたこれらの遺伝子の発現変動について、リアルタイム定量 PCR

を実施して確認したところ、titin-cap、follistatin ともに  $\alpha$ -マンゴスチン群ではコントロール群に比べ有意に発現が上昇していることが確認された (Fig.4-7)。これらの結果は、 $\alpha$ -マンゴスチン処理を行った細胞において、筋管形成が促進されていたという Fig.4-1 A の観察結果と合致するものであった。



#### 第4節 考察

本章では、C2C12 筋芽細胞の分化中に  $\alpha$ -マンゴスチン进行处理することで、筋管の形成が促進されることを見出した。Fig.4-1 に示したように、 $\alpha$ -マンゴスチン进行处理した細胞は通常条件で分化させた細胞に比べてより太い筋管を形成しており、骨格筋合成のマーカ因子である Myl2 の発現は、コントロール群に比べおよそ 2.5 倍に上昇していることが確認された。

DNA マイクロアレイ解析の結果からは、 $\alpha$ -マンゴスチンにより、筋分化に関する遺伝子群 (muscle cell fate commitment) や、骨格筋の構成因子 (actin cytoskeleton、sarcoplasmic reticulum) となっている遺伝子群の発現が同時に上昇している一方で、細胞外骨格や細胞接着に関与している遺伝子群 (fibrillar collagen、extracellular space、focal adhesion) の発現が低下していることが明らかとなった (Fig.4-3, Fig.4-4)。細胞接着に関わる遺伝子群の発現は、筋芽細胞の分化開始時 (day 0) にピークに達し、その後、分化が進行するにつれて減衰していくことが報告されている (Tomczak KK et al, 2004)。これを本章の結果と合わせて考えると、 $\alpha$ -マンゴスチンは、筋芽細胞における分化中の遺伝子発現バランスを、より分化の進んだ状態にシフトさせるように調節していると考えられる。

骨格筋合成、分化の過程においては、細胞周期に関連した遺伝子群の大きな発現変動が惹起される。いくつかの研究から、細胞周期制御に関わる遺伝子群は C2C12 細胞の分化に伴って協調的に発現制御を受けることが明らかとなってきている (Moran JL et al, 2002; Shen X et al, 2003; Tomczak KK et al, 2004)。しかしながら、本章での DNA マイクロアレイ解析の結果においては、筋芽細胞分化に関与している多種多様な遺伝子群が  $\alpha$ -マンゴスチンにより発現制御を受けている一方で、細胞周期制御に関わる遺伝子群の発現は  $\alpha$ -マンゴスチン処理の有無で差が認められなかった。こうした結果は、 $\alpha$ -マンゴスチンが、筋芽細胞の分化とそれに引き続く筋管形成の過程を、通常条件下で認められる細胞周期制御には影響を与えることなく促進している可能性を示唆しているものと考えられる。他の天然物由来化合物の例として、レスベラトロールもまた、筋芽細胞の増殖、筋合成を制御することが報告されている (Montesano A et al, 2013)。レスベラト

ールは、特定の細胞周期制御因子や筋合成制御因子の発現に影響を及ぼすことで、筋芽細胞の分化制御に関与している。 $\alpha$ -マンゴスチン処理が通常の筋芽細胞分化における細胞周期制御に関わる遺伝子群の発現に影響を与えていないという本章の結果を考慮すると、 $\alpha$ -マンゴスチン処理による筋芽細胞の分化促進と筋管形成の亢進は、レスベラトロールにより制御を受ける経路とは異なる制御系を介して引き起こされている可能性がある。

興味深いことに、BMP signaling pathway の遺伝子群の発現が  $\alpha$ -マンゴスチン処理された細胞で上昇していた。BMP は TGF- $\beta$  スーパーファミリーの中でさらに 3 つに分類されるサブファミリーのうちの 1 つに属しており、ラットの筋に注入することで骨形成を誘導する因子として初めて同定された (Urist MR, 1965)。こうした BMP の骨形成能については、現在までに C2C12 細胞を用いて広く研究されており、BMP で刺激した C2C12 細胞は筋ではなく、骨芽細胞へと分化することが報告されている (Katagiri T et al, 1994)。したがって、BMP 経路の活性化は筋芽細胞の分化経路を骨芽細胞の分化経路へとシフトさせ、骨格筋量の維持という観点から見ると、マイナスの影響を及ぼす可能性が考えられる。今回の解析では、BMP signaling pathway の遺伝子リストの中に BMP 経路の阻害因子である repulsive guidance molecule family member B (RGMB) と follistatin が認められた (Fig.4-5)。RGMB は C2C12 筋芽細胞において BMP 経路を阻害していることが (Kanomata K et al, 2009)、follistatin は BMP と直接結合することによりその活性を抑制していること (Iemura S et al, 1998) が、それぞれ報告されている。このことから、 $\alpha$ -マンゴスチンは BMP signaling pathway を阻害するように遺伝子発現を調節し、筋分化促進作用を発揮している可能性が考えられる。

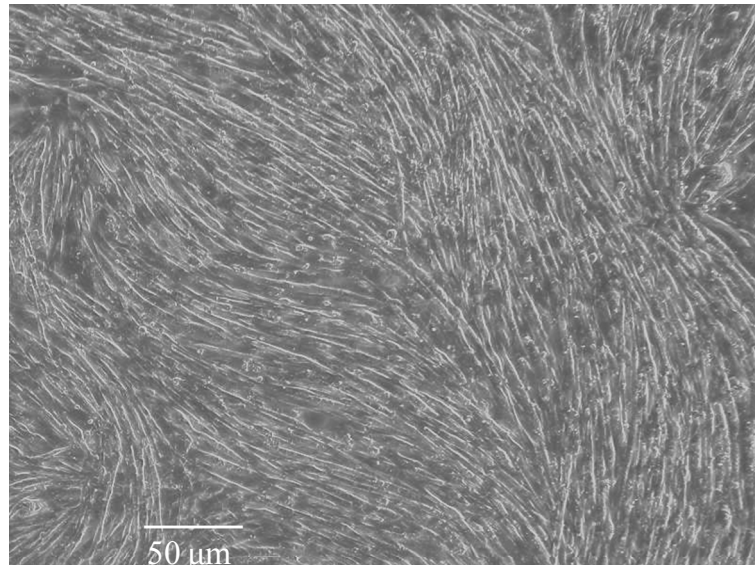
$\alpha$ -マンゴスチンによる筋分化促進には、ミオスタチン経路が関与している可能性も考えられる。ミオスタチンは主として骨格筋に発現が認められており、哺乳類において、ミオスタチン経路が負に制御されることで骨格筋重量が増大することが報告されている (Clop A et al, 2006; McPherron AC et al, 1997)。また、健康人では血清ミオスタチン量と骨格筋量に逆相関が認められること (Gonzalez-Cadavid NF et al, 1998)、高齢者では血清ミオスタチン量が高くなって

いること (Szulc P et al, 2012) も報告されている。こうした知見から、ミオスタチンの発現や機能、シグナル経路の阻害は骨格筋量減少に対する治療手段として有望であると考えられている (Liu CM et al, 2008; Dumonceaux J et al, 2010)。本章の DNA マイクロアレイ解析及びリアルタイム定量 PCR の結果から、ミオスタチンインヒビターである titin-cap と follistatin の発現が  $\alpha$ -マンゴスチン処理を行った細胞において上昇していることが確認された (Fig. 4-5, Fig.4-7)。これらの発現上昇は、 $\alpha$ -マンゴスチン処理により発現上昇が認められた 213 個の遺伝子のうちに含まれる、転写調節因子の働きにより誘導されているものと推察される。titin-cap の 5' 上流域には myocyte enhancer factor 2 (MEF2) 結合領域が存在し、myogenic regulatory factors (MRFs) に属する myogenin や MyoD により発現が上昇することが報告されている (Zhang S et al, 2011) が、興味深いことに、 $\alpha$ -マンゴスチン処理により発現上昇が認められた遺伝子の中に myogenin や MyoD といった MRFs は認められなかった一方で、濃縮が認められた term には含まれていないものの、MEF2A や MEF2C といった MEF2 ファミリーに属する転写因子が認められた (data not shown)。MEF2 ファミリーに属する転写因子は MRFs と同様、骨格筋分化時の様々な転写調節イベントで重要な役割を果たしていると考えられている (Gossett LA et al, 1989) が、それ自体を繊維芽細胞にトランスフェクションしても骨格筋の合成を誘発せず、MRFs と共存することによって骨格筋合成を非常に強く誘導することが報告されている (Molkentin JD et al, 1995)。これらの報告を考慮すると、 $\alpha$ -マンゴスチン処理によって発現上昇した MEF2A、MEF2C が、骨格筋分化に伴い発現してくる MRFs と協調的に働くことによって titin-cap の強い発現上昇が誘導されたものと推察される。一方、follistatin はその 5' 上流域に TCF/LEF1 binding elements (TBEs) を持ち、TBE に  $\beta$ -catenin/TCF4 転写因子複合体が結合することにより発現が亢進することが報告されている (Han XH et al, 2014)。 $\alpha$ -マンゴスチン処理によって発現増加が認められた遺伝子群には、濃縮が認められた term には含まれていないものの、TCF4 も含まれており (data not shown)、これによる転写調節が follistatin の発現上昇に寄与しているものと推察される。

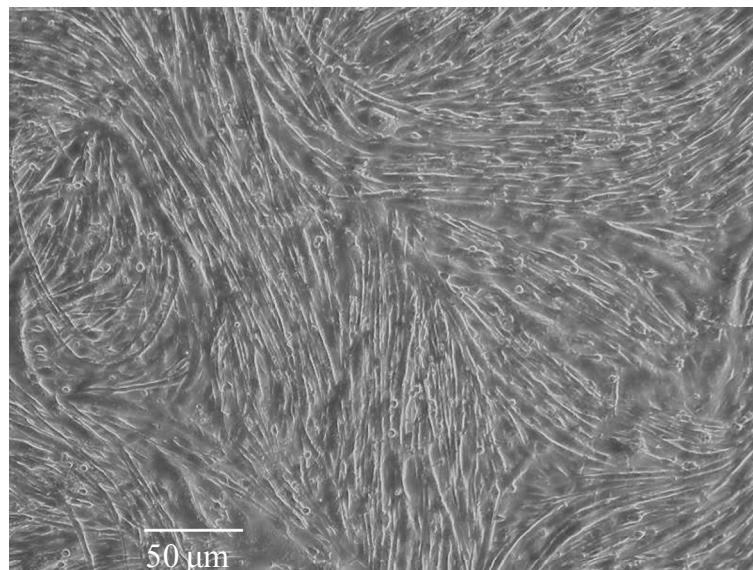
この結果は、 $\alpha$ -マンゴスチンがミオスタチン経路を阻害することにより、骨格筋の発達を促す可能性を示唆するものであると考えられる。本章で実施した試験系において、実際にミオスタチンによる骨格筋減少作用が発揮されているのかについては評価を行っていないため、上記の可能性は推論の域を出ないが、今後、ミオスタチンの一過性のノックダウンや、ミオスタチン中和抗体を用いて検証することにより、ミオスタチン経路阻害の寄与について明らかとしたい。ここで言及したミオスタチンと、上述した BMP はともに TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属していることから、 $\alpha$ -マンゴスチンは TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル経路を制御することにより、C2C12 細胞の骨格筋合成プロセスに影響を与えているのではないかと考えられる。

本章の結果から、 $\alpha$ -マンゴスチンは骨格筋構成因子の発現を亢進することにより C2C12 筋芽細胞の分化を促進すること、及び、筋管形成を亢進させることが示唆された。また、DNA マイクロアレイ解析の結果から、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する BMP 経路の阻害、及びミオスタチン経路の阻害を介して筋管の形成を促していることが示唆された (Fig.4-8)。これらの生理活性は、今までに検証されてきた、抗炎症作用をはじめとした  $\alpha$ -マンゴスチンの生理活性とは全く異なるものであり、 $\alpha$ -マンゴスチンをはじめとしたキサントン類を含むマンゴスチンの新たな機能性、及び用途開発の端緒となり得る知見であると考えられる。 $\alpha$ -マンゴスチンを経口摂取した際のバイオアベイラビリティや、生体内での代謝、及び、 $\alpha$ -マンゴスチン以外のキサントン類の生理活性の検証は、上述した応用面を進める上での今後の課題として重要であり、さらなる検討が望まれる。

A



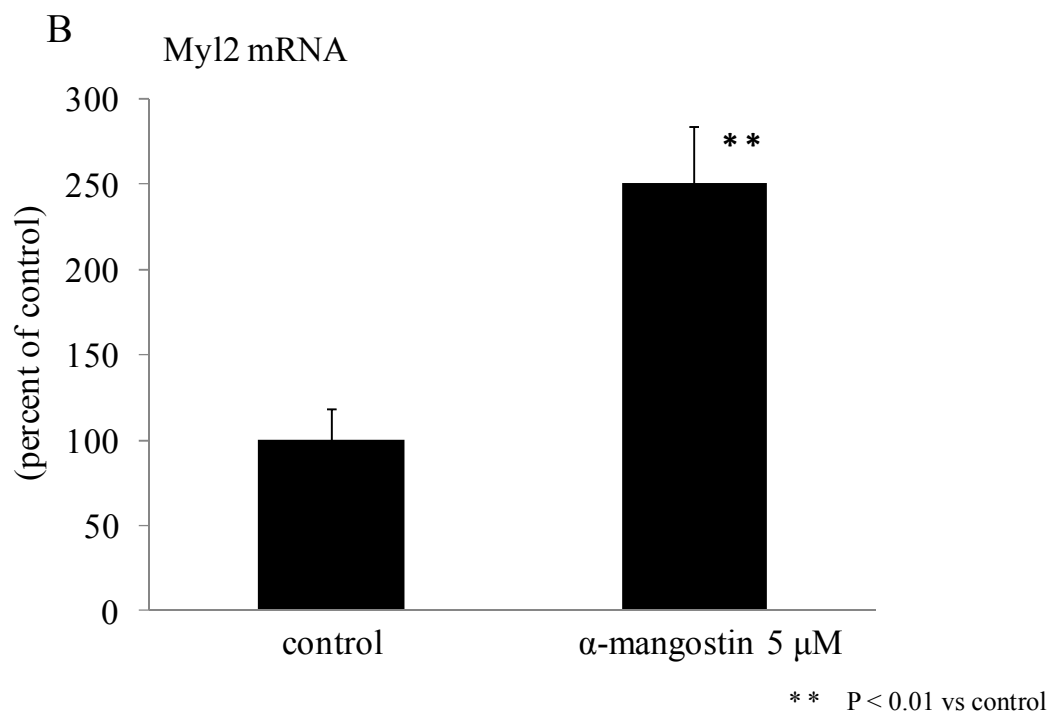
control



$\alpha$ -mangostin 5  $\mu$ M

Fig.4-1  $\alpha$ -マンゴスチンが C2C12 細胞の筋管への分化に及ぼす影響

A. C2C12 細胞が筋管へと分化する際に  $\alpha$ -マンゴスチンが及ぼす影響を評価した。C2C12 細胞を分化させる過程で  $\alpha$ -マンゴスチンを 5  $\mu$ M で作用させ、分化誘導 4 日後の細胞の様子を顕微鏡下で写真撮影した。



**Fig.4-1** α-マンゴスチンが C2C12 細胞の筋管への分化に及ぼす影響

**B.** C2C12 細胞が筋管へと分化する際に α-マンゴスチンが及ぼす影響を評価した。C2C12 細胞を分化させる過程で α-マンゴスチンを 5 μM で作用させ、分化誘導 4 日後の Myl2 の遺伝子発現を定量 RT-PCR により測定した。

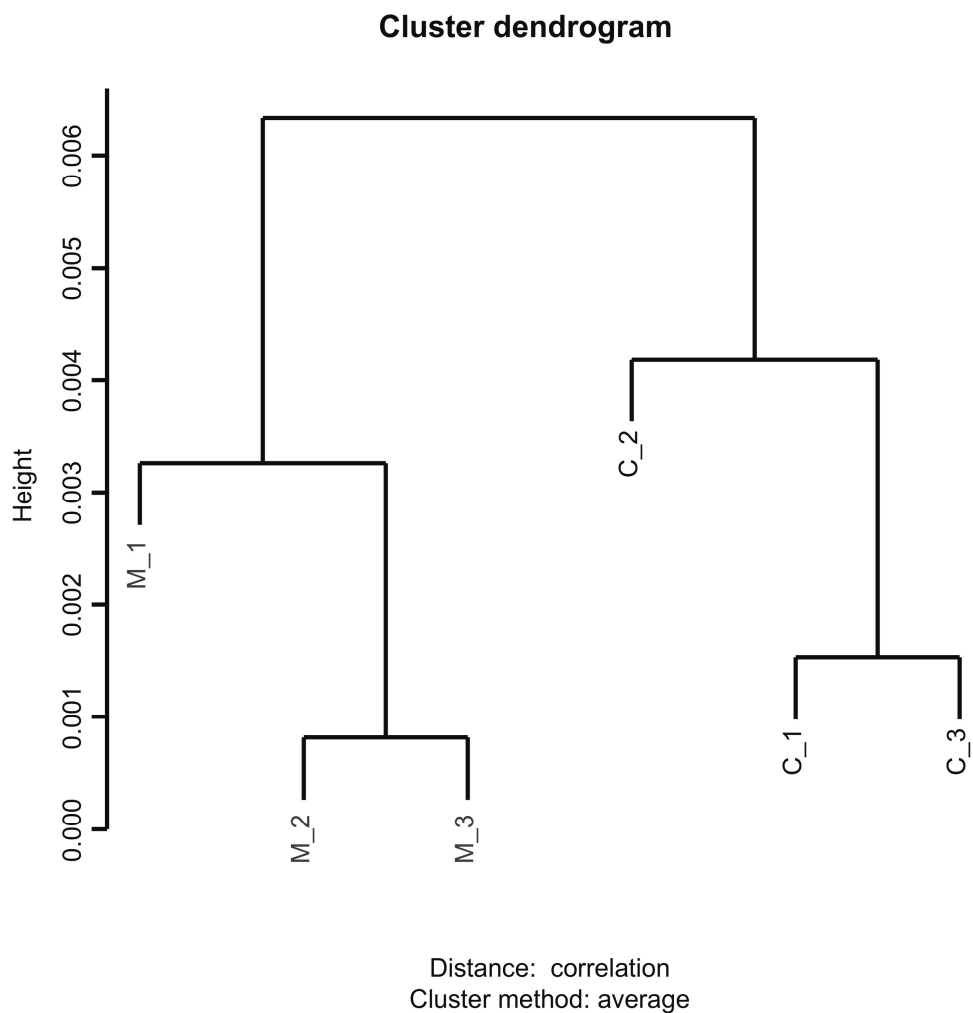


Fig.4-2            qFARMSにより正規化したDNAマイクロアレイデータの階層的クラスタードエンドログラム

DNAマイクロアレイチップをスキャンして得られた生データをqFARMSにより正規化し、階層的クラスタリングを行った。C\_1-\_3はコントロール群、M\_1-\_3は $\alpha$ -マンゴスチン群を示す。

**A**

GO-ID	GO term	modified Fisher Exact P-Value
GO:0032501	Multicellular organismal process	9.67E-03
GO:0007275	└─ Multicellular organismal development	7.42E-03
GO:0048731	└─└─ System development	4.57E-03
GO:0048513	└─└─└─ Organ development	5.91E-03
GO:0007507	└─└─└─└─ Heart development	2.96E-03
GO:0009791	└─└─└─ Post-embryonic development	3.50E-02
GO:0032502	Developmental process	1.41E-02
GO:0048856	└─ Anatomical structure development	5.95E-03
GO:0009653	└─ Anatomical structure morphogenesis	3.72E-02
GO:0042693	└─ Muscle cell fate commitment	3.37E-02
GO:0010941	Regulation of cell death	1.68E-02
GO:0043067	└─ Regulation of programmed cell death	1.64E-02
GO:0042981	└─ Regulation of apoptosis	3.75E-02
GO:0007178	Transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	2.53E-02
GO:0030509	└─ BMP signaling pathway	1.36E-02
GO:0040037	Negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	4.20E-02

**B**

GO-ID	GO term	modified Fisher Exact P-Value
GO:0045121	Membrane raft	3.70E-02
GO:0043228	Non-membrane-bounded organelle	4.67E-02
GO:0043232	└─ Intracellular non-membrane-bounded organelle	4.67E-02
GO:0005856	└─ Cytoskeleton	2.49E-02
GO:0015629	└─ Actin cytoskeleton	3.15E-02
GO:0031226	Intrinsic to plasma membrane	4.29E-02
GO:0046658	└─ Anchored to plasma membrane	7.53E-03
GO:0016528	Sarcoplasm	4.00E-02
GO:0016529	└─ Sarcoplasmic reticulum	3.61E-02
GO:0044441	Cilium part	4.21E-02

Fig.4-3 発現上昇が認められた遺伝子群に対する  
gene functional enrichment analysis の結果

$\alpha$ -マンゴスチンにより有意に発現上昇が認められた 213 遺伝子の中で、有意に濃縮されている GO term を **A. metabolic process**、**B. cellular process** について階層状に表記した。最下層に位置する term の *p*-value は網かけ表記した。



**A**

GO-ID	GO term	modified Fisher Exact P-Value
GO:0030324	Lung development	6.69E-03
GO:0001568	Blood vessel development	3.73E-03
GO:0048771	Tissue remodeling	2.20E-03
GO:0050880	Regulation of blood vessel size	1.24E-02
GO:0002474	Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	1.82E-04
GO:0010811	Positive regulation of cell-substrate adhesion	1.64E-02
GO:0030199	Collagen fibril organization	5.98E-04
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	3.52E-02
GO:0006790	Sulfur metabolic process	3.34E-02
GO:0055114	Oxidation reduction	1.83E-03
GO:0030574	Collagen catabolic process	4.42E-03
GO:0006979	Response to oxidative stress	7.63E-03
GO:0009636	Response to toxin	1.99E-02
GO:0006954	Inflammatory response	2.47E-02
GO:0001666	Response to hypoxia	3.58E-02
GO:0006695	Cholesterol biosynthetic process	1.05E-02
GO:0006693	Prostaglandin metabolic process	3.12E-02
GO:0006564	L-serine biosynthetic process	1.19E-03
GO:0009258	10-formyltetrahydrofolate catabolic process	3.98E-02
GO:0042180	Cellular ketone metabolic process	3.09E-06
GO:0050678	Regulation of epithelial cell proliferation	3.77E-02
GO:0007338	Single fertilization	1.15E-02
GO:0007040	Lysosome organization	9.30E-03
GO:0010332	Response to gamma radiation	4.49E-02
GO:0030203	Glycosaminoglycan metabolic process	3.77E-02
GO:0009309	Amine biosynthetic process	5.40E-04
GO:0044106	Cellular amine metabolic process	4.40E-03
GO:0051493	Regulation of cytoskeleton organization	4.91E-02
GO:0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	2.44E-02
GO:0043627	Response to estrogen stimulus	2.38E-02

Fig.4-4 発現低下が認められた遺伝子群に対する  
gene functional enrichment analysis の結果 (biological process)  
 $\alpha$ -マンゴスチンにより有意に発現低下が認められた 375 遺伝子の中で、有意に濃縮されて  
いる、biological process の最下層に位置する GO term を表記した。

## B

GO-ID	GO term	modified Fisher Exact P-Value
GO:0031012	Extracellular matrix	2.81E-18
GO:0044420	└─ Extracellular matrix part	1.18E-09
GO:0005581	└─└─ Collagen	2.34E-05
GO:0005583	└─└─└─ Fibrillar collagen	7.23E-03
GO:0005604	└─└─└─ Basement membrane	3.47E-04
GO:0005578	└─└─ Proteinaceous extracellular matrix	6.65E-18
GO:0044421	└─ Extracellular region part	1.05E-19
GO:0005576	Extracellular region	2.68E-21
GO:0009986	Cell surface	4.47E-02
GO:0005912	Adherens junction	4.82E-02
GO:0005924	└─ Cell-substrate adherens junction	2.80E-02
GO:0005615	└─└─ Extracellular space	2.01E-05
GO:0005925	└─└─ Focal adhesion	2.24E-02
GO:0030055	Cell-substrate junction	3.44E-02
GO:0005773	Vacuole	1.56E-03
GO:0000323	└─ Lytic vacuole	6.47E-03
GO:0005764	└─ Lysosome	6.47E-03
GO:0044448	Cell cortex part	4.54E-02
GO:0030863	└─ Cortical cytoskeleton	4.37E-02
GO:0030864	└─└─ Cortical actin cytoskeleton	7.20E-03
GO:0032437	└─└─ Cuticular plate	3.80E-02
GO:0048770	Pigment granule	2.37E-02
GO:0042470	└─ Melanosome	2.37E-02

Fig.4-4 発現低下が認められた遺伝子群に対する  
gene functional enrichment analysis の結果 (cellular component)  
 $\alpha$ -マンゴスチンにより有意に発現低下が認められた 375 遺伝子の中で、有意に濃縮されて  
いる GO term を cellular component について階層状に表記した。最下層に位置する term の  
 $p$ -value は網かけ表記した。

## heart development

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1447878_s_at, 1451912_a_at	fibroblast growth factor receptor-like 1; similar to fibroblast growth factor receptor 5 beta
1424852_at, 1451507_at,	
1421028_a_at, 1421027_a_at,	myocyte enhancer factor 2C
1451506_at	
1451203_at	myoglobin
1448394_at	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow
1427266_at, 1426878_at	polybromo 1
1429348_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
1423145_a_at	titin-cap
1420895_at	transforming growth factor, beta receptor I

## muscle cell fate commitment

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1424852_at, 1451507_at,	
1421028_a_at, 1421027_a_at,	myocyte enhancer factor 2C
1451506_at	
1448394_at	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow

## BMP signaling pathway

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1433586_at, 1428429_at	RGM domain family, member B
1437382_at	activin receptor IIA
1421365_at, 1434458_at	folistatin

## actin cytoskeleton

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1451867_x_at	Rho GTPase activating protein 6
1455736_at	myosin binding protein C, fast-type
1448394_at	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow
1449996_a_at, 1449997_at	predicted gene 7848; predicted gene 7839; predicted gene 4157; similar to tropomyosin 3, gamma;
1423452_at, 1430165_at,	
1450997_at	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
1436737_a_at	sorbin and SH3 domain containing 1

## anchored to plasma membrane

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1416034_at, 1437502_x_at,	
1448182_a_at	CD24a antigen
1433586_at, 1428429_at	RGM domain family, member B
1417496_at	ceruloplasmin

## sarcoplasmic reticulum

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1451372_a_at	ADP-ribosyltransferase 1
1433643_at, 1449999_a_at	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1
1426142_a_at, 1426143_at,	
1426144_x_at	triadin

Fig.4-5 骨格筋への分化、骨格筋構成因子に関わる term  
に含まれる遺伝子

発現上昇が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、骨格筋への分化、骨格筋構成因子に関わる term に含まれる遺伝子を示した。

### fibrillar collagen

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1423110_at, 1450857_a_at	collagen, type I, alpha 2
1427884_at, 1427883_a_at	collagen, type III, alpha 1
1419703_at	collagen, type V, alpha 3

### extracellular space

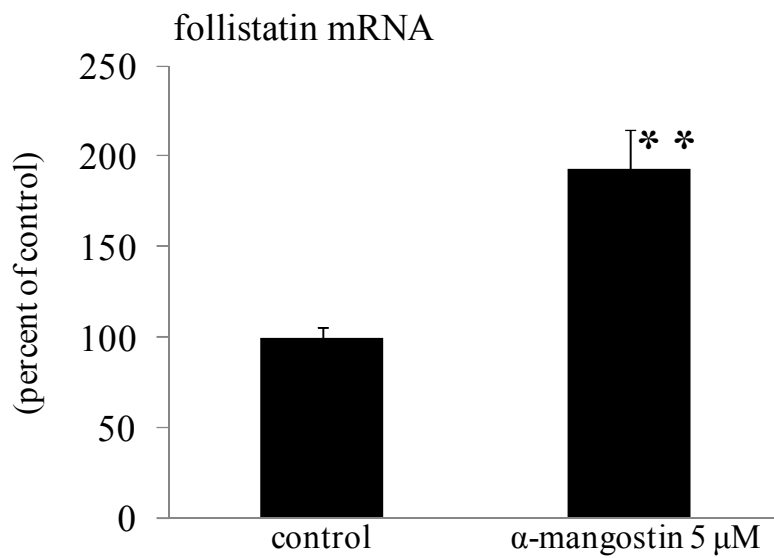
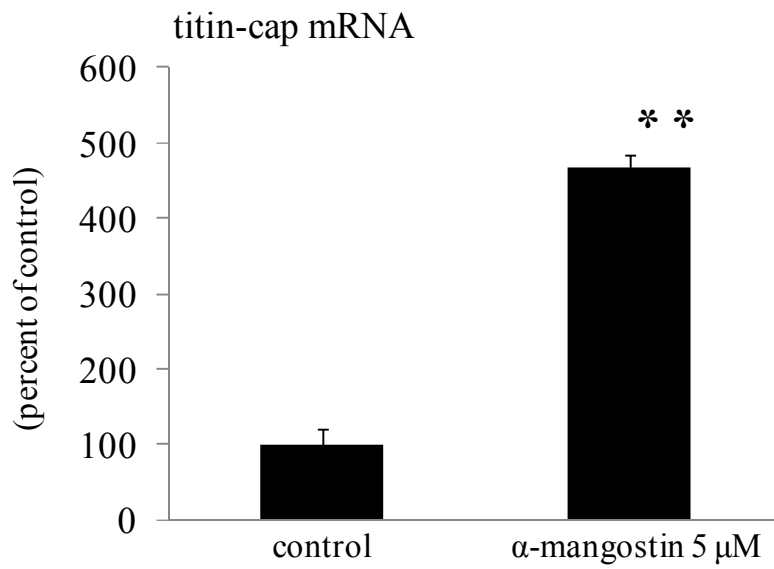
AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1460346_at	arylsulfatase A
1426238_at	bone morphogenetic protein 1
1456170_x_at, 1433806_x_at	calreticulin
1417574_at, 1448823_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
1424131_at	collagen, type VI, alpha 3
1440339_at, 1419276_at,	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
1459546_s_at	
1448613_at	extracellular matrix protein 1
1438629_x_at, 1448148_at	granulin
1425357_a_at	gremlin 1
1418949_at	growth differentiation factor 15
1454159_a_at	insulin-like growth factor binding protein 2
1437405_a_at	insulin-like growth factor binding protein 4
1416676_at	kininogen 1
1421821_at	low density lipoprotein receptor
1448228_at	lysyl oxidase
1418269_at	lysyl oxidase-like 3
1425985_s_at, 1438602_s_at	mannan-binding lectin serine peptidase 1
1439364_a_at, 1416136_at	matrix metalloproteinase 2
1420911_a_at	milk fat globule-EGF factor 8 protein
1416168_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
1416625_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1
1417633_at	superoxide dismutase 3, extracellular
1450377_at, 1460302_at	thrombospondin 1; similar to thrombospondin 1
1434465_x_at	very low density lipoprotein receptor

### focal adhesion

AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID	Gene Name
1450070_s_at	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
1456135_s_at	paxillin
1455333_at	tensin 3
1452264_at	tensin like C1 domain-containing phosphatase
1460378_a_at	testis derived transcript

Fig.4-6 細胞外骨格や細胞接着に関わる term に含まれる遺伝子

発現低下が認められた遺伝子中に有意に濃縮されていた、細胞外骨格や細胞接着に関わる term に含まれる遺伝子を示した。



\*\* P < 0.01 vs control

Fig.4-7 α-マンゴスチンがミオスタチン阻害因子の発現に及ぼす影響

C2C12 細胞が筋管へと分化する際に α-マンゴスチンがミオスタチン阻害因子の発現に及ぼす影響を評価した。C2C12 細胞を分化させる過程で α-マンゴスチンを 5 μM で作用させ、分化誘導 4 日後の titin-cap 及び follistatin の遺伝子発現を定量 RT-PCR により測定した。

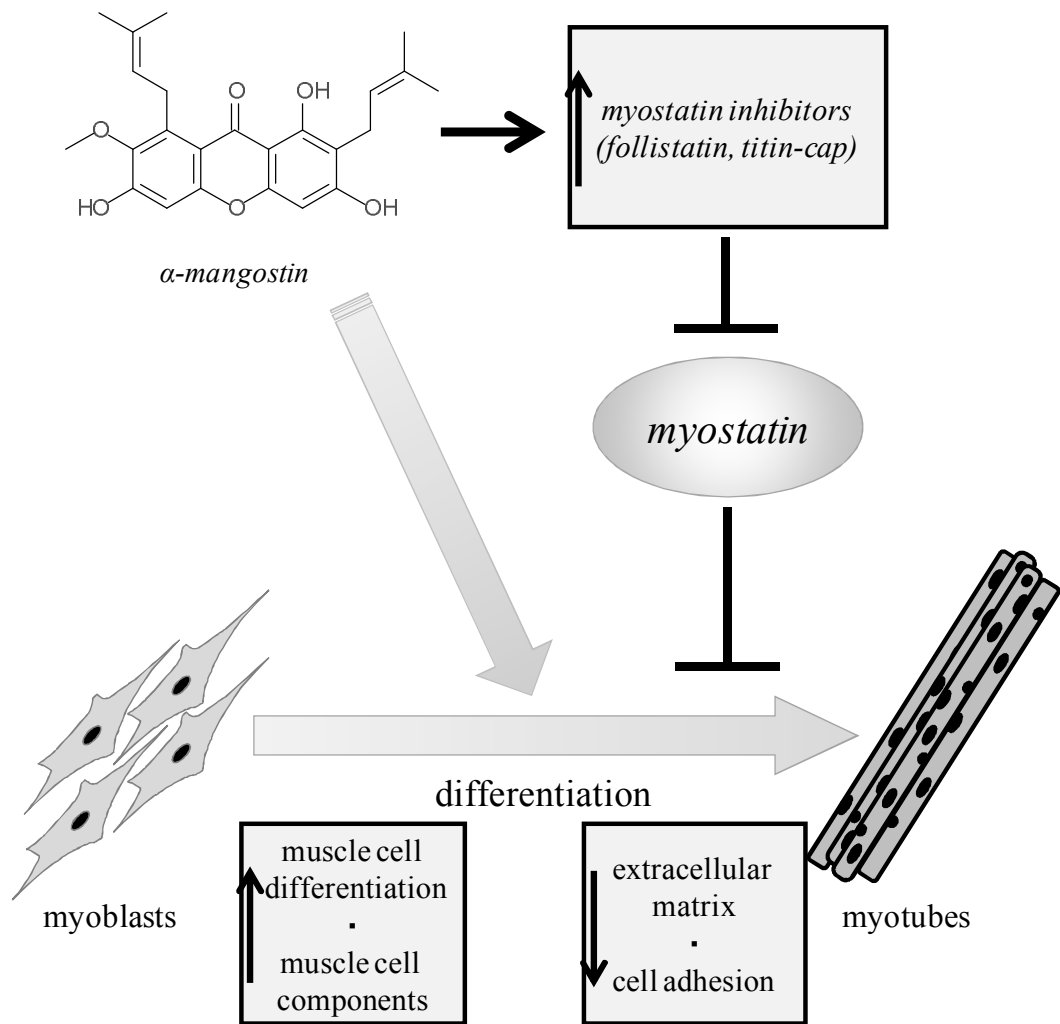


Fig.4-8  $\alpha$ -マンゴスチンが筋管分化に及ぼす影響

$\alpha$ -マンゴスチンは筋分化に関与する遺伝子群や骨格筋の構成因子の発現を上昇させる一方で、細胞外骨格や細胞接着に関与する遺伝子群の発現を低下させ、筋分化中の遺伝子発現バランスを、より分化の進んだ状態にシフトさせるように調節していると考えられる。また、骨格筋萎縮に関わるミオスタチンの阻害因子の発現を上昇させることで、骨格筋萎縮への抵抗性を同時に付与しており、これらが複合的に作用して Fig.4-1 で認められたような筋管の発達が促されたものと推察される。

第5章  
総合討論

本研究は、超高齢社会を迎えようとしている日本において、代謝性疾患のリスクに対し、食の機能性を活用してその低減に向けて介入することが、医療費増大などの社会的負担を抑制しながら一定の効果が期待できるアプローチへとつながるのではないかという期待の下、メタボリックシンドロームやロコモティブシンドロームなどの代謝性疾患リスクのコントロールに関わる機能性に着目し、それらの機能性を発揮するポテンシャルの期待できる食素材の機能解析を行った。第2章ではトマトに含まれるナリングニンカルコンについて、脂肪組織の構成要素たる脂肪細胞の機能に及ぼす影響に焦点を当て、その作用を検証した。分化過程の脂肪細胞にナリングニンカルコンを作用させることで、アディポネクチンのパラクライン経路を活性化させ、同時に、ミトコンドリア関連遺伝子群をはじめとした、エネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を亢進することにより、脂肪細胞の代謝機能や、インスリン感受性を高めることが示唆された (Horiba T et al, 2010)。第3章ではユズ種子に含まれるオバクノンについて、肥満・2型糖尿病モデルマウスに経口摂取させたときの影響を検討し、糖代謝の改善作用や骨格筋重量の増加作用、脂肪蓄積抑制作用を示すことを確認した。また、これらの作用は、胆汁酸受容体として知られる TGR5 の活性化、及び、脂質代謝のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  のアンタゴニズを介して発揮されている可能性が示唆された (Horiba T et al, 2015)。第4章ではマンゴスチン果皮に含まれる  $\alpha$ -マンゴスチンが筋芽細胞の分化に及ぼす影響について検討し、筋芽細胞からの筋管形成・分化を促進することを確認するとともに、ミオスタチンをはじめとした TGF $\beta$  スーパーファミリーのシグナル経路を制御することによって筋合成プロセスに影響を与えていることを明らかとした (Horiba T et al, 2014)。本章では、これらを含む食品の機能を活かした代謝性疾患のリスク低減に向けた今後のアプローチについて述べる。

第2章で脂肪細胞の代謝プロファイルに及ぼす影響を検討したナリングニンカルコンは、日本で主に生食用とされているピンク系トマトにはほとんど含まれず、加工用に用いられている赤系トマトのトマト果皮に主に蓄積し (Horiba T et al, 2010)、その他の部位にはほとんど蓄積が認められない。ナリングニンカル



コンは、フラボノイド類の生合成経路において、カルコンイソメラーゼによりナリングニンに変換され、各種フラボノイドへと代謝されてゆく際の間体として存在している (Fig.5-1)。このため、トマト中にはナリングニンカルコンだけでなく、ナリングニンや、フラボノイド類が多量に含まれている (Stewart AJ et al, 2000)。ナリングニンは、トマト以外の植物体、例えば柑橘由来のものは一般的に配糖体のナリンジンとして存在しているのに対し、トマトに含まれるものはアグリコンのナリングニンとして存在しているのが大きな特徴であり、ヒトにおける吸収がトマトペーストを経口摂取させる試験により確認されている (Bugianesi R et al, 2002)。この報告では、同じくトマトペースト中に含まれるフラボノイド配糖体であるルチンの吸収も合わせて評価しているが、ナリングニンと同等以上の含量であるにも関わらず、ルチン及び代謝産物のケルセチンの血中での検出は認められておらず、アグリコンの形態で植物体内に存在していることが、経口摂取した時の優れたバイオアベイラビリティにつながっていることが示唆される。このことから、ある種のトマトペーストのような、果皮を含んだトマト加工品を摂取することによって、ナリングニン、及びその前駆体であるナリングニンカルコンのアグリコンが体内に吸収され、機能発現が期待できるものと考えられる。トマトの日常的な摂取は代謝性疾患や発ガンのリスク低減に寄与することが示唆されているが (Pandey DK et al, 1995; Canene-Adams K et al, 2005)、果皮を含むトマト加工品を積極的に摂取することは、本研究で新たにその機能が明らかになったナリングニンカルコンの摂取につながり、ナリングニンをはじめとしたその他のフラボノイドとともに機能することによって、トマト摂取により得られるヘルスベネフィットをより確かなものとする事ができるものと期待される。

第 3 章で機能解析を実施したリモノイド類を豊富に含む柑橘類は、栄養価に優れるだけでなく、フラボノイド、カロテノイド、クマリンなどといった多様な生理活性物質に富む上に、特徴的な味、香りを示し、世界中の食卓で広く親しまれている。柑橘の果汁が搾汁後、遅れて苦みを呈するようになる **delayed bitterness** という現象は、特にオレンジやレモン、グレープフルーツなど、主要

な柑橘の加工・利用を考える上で大きな問題となっている。この **delayed bitterness** は、柑橘におけるリモノイド生合成経路 (Fig.5-2) における中間体である、limonate A-ring lactone がリモノイドアグリコンであるリモニンへと変換され、リモニンが苦味を呈することが原因であると推察されている (Roy A and Saraf S, 2006)。一方、柑橘中のリモノイドアグリコンは、成熟が進むにつれてリモノイドグルコシルトランスフェラーゼの作用により糖を付加され、無味で水溶性のリモノイド配糖体へと変換されることが明らかとなっており、これが、成熟により柑橘類の苦味が低減する理由であると考えられている (Roy A and Saraf S, 2006)。このように、柑橘中のリモノイドアグリコン - 配糖体の存在比は、その呈味性に大きく影響を与え、食品としての美味しさという観点から評価した際の商業的価値に深く関わる要素であると考えられる。第 3 章の考察に記したとおり、リモノイド配糖体は、アグリコンとは発揮する機能性が異なる可能性が高いと考えられ、オバクノンの糖・脂質代謝改善作用や、骨格筋の増量作用をはじめとした代謝疾病リスク低減の機能性を期待するには、アグリコンの比率が高い状態で摂取することが望ましいと考えられる。その一方で、上述したような食品の美味しさや、水溶性などの加工特性を考慮すると、配糖体の比率が高い状態の方が望ましいと考えられ、美味しさや利用上の利便性と、機能性のバランスがとれるような柑橘類のアプリケーション提案が、その機能性を活用した健康維持・疾病リスク低減の恩恵を社会にスムーズに還元する上で重要になってくると思われる。ヒトにおけるリモノイド配糖体の経口摂取時の挙動を検討した報告 (Manners GD et al, 2003) において、摂取した配糖体はアグリコンとなって血中で検出されていたが、これは多くのポリフェノール配糖体が吸収される時のプロセス、即ち、ナトリウム依存性グルコーストランスポーター1 (SGLT1) による細胞内への取り込みの後、細胞内  $\beta$  グルコシダーゼにより加水分解を受ける、あるいは、腸管表面のラクターゼフロリジンヒドロラーゼにより加水分解を受けることにより生じたアグリコンが単純拡散により吸収されるプロセスと同様の形で吸収されている可能性が高いと考えられる。ここで見たように、ポリフェノール配糖体の吸収プロセスには腸管内での代謝が

深く関与しているが、腸管内での代謝には上述の酵素反応のみならず、腸内細菌叢も影響を及ぼすことが知られている。例えば、ダイゼイン配糖体であるダイジンは、腸内細菌叢による代謝を受け、エクオールと呼ばれる、生理活性の高い化合物へと変換されることが報告されている (Bowey E et al, 2003)。このことから、腸内細菌叢のバランスを調節することは、配糖体の形で摂取したりモノイドをアグリコンへと変換する効率を上昇させ、生体利用率向上や、より効果的な機能発現を可能にするための有効なアプローチになる可能性があると考えられる。

マンゴスチンは日本では生食用としての歴史が浅く、なじみ深い食品とはいえないが、東南アジアでは広く生食されているほか、伝統薬としても用いられており、欧米ではキサントン類の抗酸化作用に着目したサプリメントとしての用途が拡大している。本研究で着目した、マンゴスチン中の主要なキサントンである  $\alpha$ -マンゴスチンは、ポリフェノール類のなかでも高度にプレニル化されているという点でユニークな存在であるといえる。プレニル化されたポリフェノールには様々な生理活性を有するものが報告されており、イカリチンが細胞周期の進行を阻止することによりガン細胞の成長を阻害する (Huang X et al, 2007) ほか、ルテオリンがプレニル化を受けることでチロシナーゼ活性が増強され、メラニン生成が阻害されること (Arung ET et al, 2010) や、プレニル化されたナリングeninではエストロゲン様活性が増強されること (Kretschmar G et al, 2010)、及び、骨格筋萎縮を予防する効果を発揮すること (Mukai R et al, 2012) が報告されている。興味深いことに、プレニル化を受けたフラボノイド類は、プレニル基の高い疎水性ゆえ、プレニル化を受けていないものに比べ、細胞の脂質 2 重膜とより強く相互作用することが示唆されており (Hendrich AB et al, 2002)、それが生理活性の発現に影響を及ぼしているものと推察される。プレニル化を受けたナリングeninやケルセチンは、結腸細胞から血流への移行が非プレニル時に比べ低下するため、摂取直後の血中濃度は低くなるものの、細胞からの排出速度もまた非プレニル化時より低下するため、結果として組織に蓄積されやすく、長期にわたり比較低濃度で血中に存在することが示唆されている

(Mukai R et al, 2012; Mukai R et al, 2013)。本研究では  $\alpha$ -マンゴスチンが筋芽細胞において、骨格筋構成因子の発現亢進によって筋管形成を亢進させることを明らかとしたが、こうした生理活性の発現には、上述したプレニル基の特性により、 $\alpha$ -マンゴスチンが細胞と相互作用しやすくなっていることが寄与している可能性がある。 $\alpha$ -マンゴスチンに次いでマンゴスチンに多く含まれる主要なキサントンである  $\gamma$ -マンゴスチンもまた  $\alpha$ -マンゴスチンと同様にプレニル化されており、細胞に対する挙動や生理活性が類似していることが予想される。この 2 種はマンゴスチンに含まれるキサントンの大部分を占めており ( $\alpha$ -マンゴスチンと  $\gamma$ -マンゴスチンの比率はばらつきが認められるものの 4:1 程度である)、マンゴスチンを定期的に食することにより、組織で長期間作用すると考えられるキサントンを効率よく摂取できることが期待される。プレニル化された生理活性物質は、上述したような性質のため機能発現の点で有利であると考えられるが、同時に、過剰な蓄積による副作用の潜在的なリスクも高くなる可能性も考えられる。マンゴスチンは、東南アジアを中心とした地域において食経験は長く、通常の摂取の範囲内においては重篤な副作用の心配は少ないと考えられるが、本研究で新たに明らかとなった筋管形成促進作用をはじめとした、様々なヘルスベネフィットを期待して積極的に摂取をするケースを考えると、過剰な摂取により体内の特定部位への蓄積が起こらないか、また、それに起因する副作用が生じないかなどの安全性について十分に検討を進めることが必須課題であろう。

ここまで、本研究で新たに食の 3 次機能を見出した機能性成分について述べたが、表現型として現れる機能性に一部重複する可能性のある部分や、逆に競合する可能性が考えられる部分が認められた。例えば、第 4 章の結果から示唆された  $\alpha$ -マンゴスチンによる骨格筋分化促進、筋管形成促進作用は、骨格筋重量の視点から見れば、第 3 章の検討で認められたオバクノンによる骨格筋増量作用と同じ表現型が期待される機能ということができる。オバクノンは、TGR5 の活性化を介したシグナルの影響により骨格筋増量作用を示している可能性があることを第 3 章にて考察したが、一方で、第 4 章で実施した C2C12 細胞を用

いた試験系では、オバクノン<sup>®</sup>は骨格筋の分化促進や筋管形成の促進作用を示さないことを予備的な検討にて確認しており (data not shown)、オバクノンと  $\alpha$ -マンガスチンは異なる作用機序で骨格筋増量作用を示す可能性が高いと考えられる。このような場合には、お互いの成分を組み合わせることで相乗作用が発揮され、単一の成分だけでは期待できない、より多くのヘルスベネフィットを享受できる可能性が考えられる。これとは逆に、機能性成分の作用が競合する可能性が考えられる例の一つとして、PPAR $\gamma$  に対する作用が挙げられる。第 2 章においてナリングニンカルコンは脂肪細胞のアディポネクチン分泌・発現を亢進することを確認し、その作用機序の一部は PPAR $\gamma$  の転写活性化を介したものであることが示唆されたが、第 3 章において、オバクノンは逆に PPAR $\gamma$  をアンタゴナイズすることで脂肪蓄積を抑制していることが確認された。PPAR $\gamma$  のアゴニストはアディポネクチン分泌の亢進などを介してインスリン抵抗性を改善すると考えられていることは既に述べたが、近年になり、この作用は PPAR $\gamma$  のアゴニスト活性そのものより、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) による PPAR $\gamma$  Ser273 のリン酸化阻害の寄与が大きいことが報告された(Choi JH et al, 2010; Choi JH et al, 2011)。第 2 章で認められたナリングニンカルコンの機能性も、上記のメカニズムと同様に、ナリングニンカルコンの PPAR $\gamma$  アゴニスト活性そのものが寄与しているのではなく、PPAR $\gamma$  Ser273 のリン酸化阻害を介して発揮されているのであるとするならば、PPAR $\gamma$  をアンタゴナイズするオバクノンとは必ずしも競合するわけでない可能性も考えられる。これらの例のような、複数の機能性成分を組み合わせることで摂取した際の作用の重複・競合の影響を明らかにするためにも、さらに作用機序の解析を深めることが肝要であると考えられる。作用機序解析の深耕によって機能性成分の相互作用についての知見を蓄積し、安全性、有効性の両面に配慮した適切な摂取につなげることが期待される。

本研究で取り上げた成分を疾病のリスク低減が期待できるように通常の食生活から継続的に摂取することは、全体の栄養バランスや嗜好性など、食に求められる 1 次、2 次機能やコストまでもを鑑みると現実的に難しい点が少ない。

通常の食生活の中でこうした機能性成分を無理なく継続的に摂取できるような施策を模索していくことの重要性は今後ますます大きくなるものと考えられる。本研究で対象とした機能性成分について見ると、ナリングニンカルコンが蓄積されるトマト果皮などの搾汁粕は、一般的にはトマトジュースなどのトマト加工品の製造時、搾汁の過程において果実の約 1~5%程度相当が発生する。ユズをはじめとした香酸柑橘はリモノイドアグリコンを多量に含む種子、果皮の割合がその他の柑橘に比べて多く、搾汁後大量に生じる種子や果皮の処理負担は、産業上の課題の一つになっている。マンゴスチンの外殻部の果皮は食用とされる果肉部より多量のキサントンを含むが、ジュースなどへの加工の際に廃棄されている。このように、現在は産業上利用されていないが、機能性成分を多量に含むものを機能性食素材のソースとして活用することで、疾病リスク低減の観点から見ても費用対効果が高く、より実効性のある社会への還元策の一つになりうるのではないかと考えられる。実際にトマト果皮の抽出物を主成分としたサプリメントは既に上市されており、こうした食の 3 次機能性成分の有用性を還元してゆく動きは、今後より活発になることが期待される。一方で、今までの食の 3 次機能研究においては、1つの機能性成分について、ヒトでの臨床試験を多数実施し、その有効性のエビデンスを積み重ねるというアプローチは、ヒト臨床試験の実施が経済的に大きな負担を伴うという側面があることも手伝って、動物を用いた基礎的検討と比較し、手薄であった。しかし、最終的な 3 次機能性の有用性評価のためには、ヒトでのエビデンス蓄積は必須であると考えられる。本研究で対象とした機能性成分についても、ヒトでのエビデンス蓄積は今後の重要課題の一つであると認識している。今後、食の 3 次機能について、作用メカニズムをはじめとした機能性についての基礎的知見とともに、ヒトでのエビデンス蓄積がさらに精力的に推進され、到来がせまる超高齢社会における疾病リスク低減策として、より実効性のある選択肢の一つとなることが期待される。

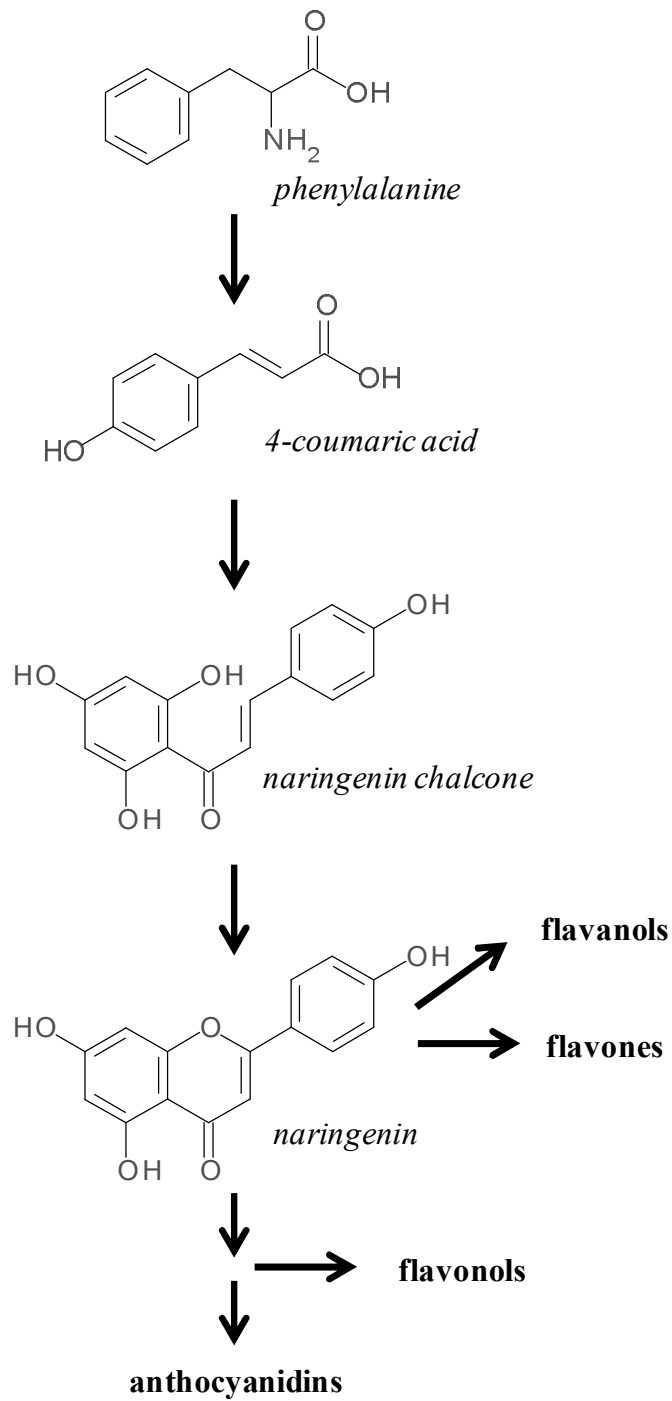


Fig.5-1 フラボノイド生合成経路

植物体内でのフラボノイド生合成経路。フェニルアラニンを起点として、4-クマル酸を経由し、カルコンシンターゼによりナリングニンカルコンが合成される。ナリングニンカルコンはカルコンイソメラーゼによりナリングニンへと変換され、これがさらにフラボン、フラバノール、フラボノールやアントシアニンなどへと代謝されていく。

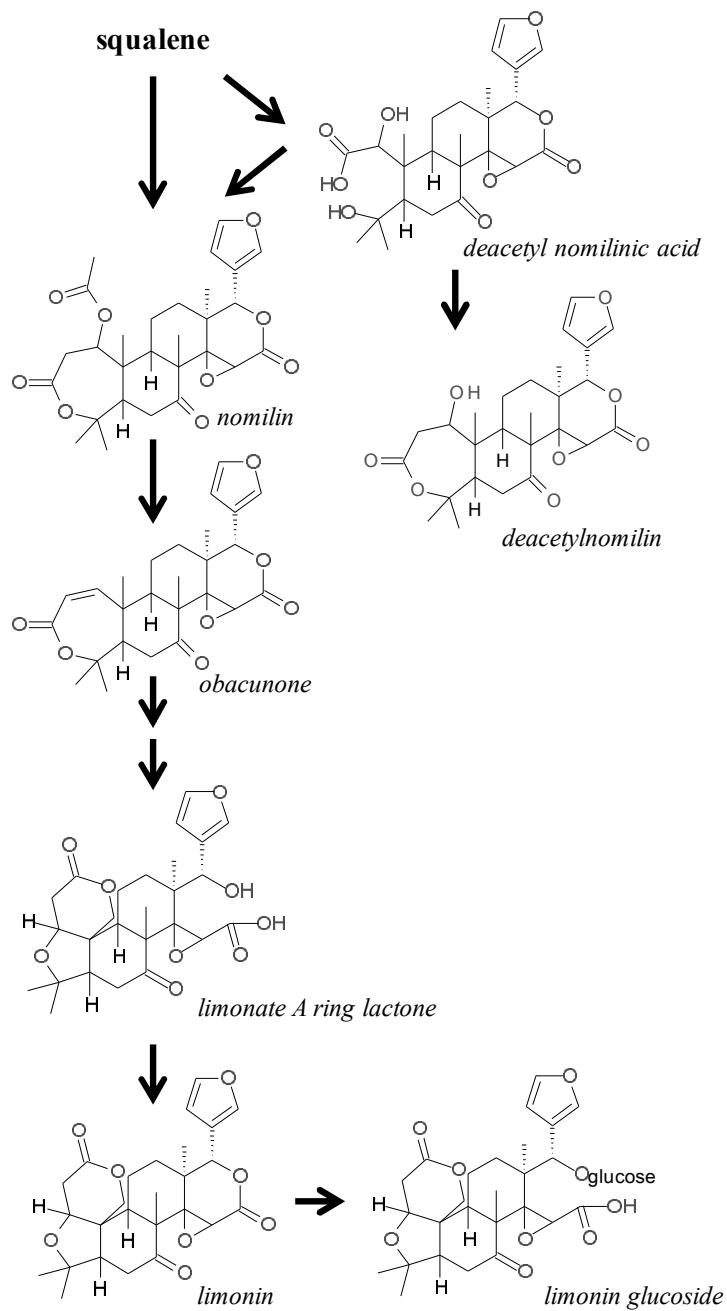


Fig.5-2 リモノイド生合成経路

柑橘におけるリモノイド生合成経路の一部。スクアレンの酸化によりリモノイド骨格を有する化合物が生合成される。柑橘の成熟が進むにつれ、各リモノイドアグリコンは水溶性で無味のリモノイド配糖体へと変換されてゆくが、柑橘中の **limonate A ring lactone** が経時的に **limonin** に変換されてゆくことにより **delayed bitterness** が発生し、柑橘類の味を損なう原因となっている。



## 引用文献

- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K: Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol* 270:19-30, 2004
- Amthor H, Hoogaars WM: Interference with myostatin/ActRIIB signaling as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther* 12:245-259, 2012
- Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R: The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem* 279:10070-10076, 2004
- Arung ET, Shimizu K, Tanaka H, Kondo R: 3-Prenyl luteolin, a new prenylated flavone with melanin biosynthesis inhibitory activity from wood of *Artocarpus heterophyllus*. *Fitoterapia* 81:640-643, 2010
- Attisano L, Wrana JL: Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646-1647, 2002
- Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I: Pentoxifylline inhibits  $Ca^{2+}$ -dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E702-8, 2007
- Berdeaux R, Stewart R: cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E1-17, 2012
- Bik W, Baranowska B: Adiponectin - a predictor of higher mortality in cardiovascular disease or a factor contributing to longer life? *Neuro Endocrinol Lett* 30:180-184, 2009
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD:

Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014-1019, 2001

Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I: Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol* 41:631-636, 2003

Bugianesi R, Catasta G, Spigno P, D'Uva A, Maiani G: Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J Nutr* 132:3349-3352, 2002

Burkey BF, Dong M, Gagen K, Eckhardt M, Dragonas N, Chen W, Grosenstein P, Argentieri G, de Souza CJ: Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism* 49:1301-1308, 2000

Calleri E, Pochetti G, Dossou KS, Laghezza A, Montanari R, Capelli D, Prada E, Loiodice F, Massolini G, Bernier M, Moaddel R: Resveratrol and its metabolites bind to PPARs. *Chembiochem* 15:1154-1160, 2014

Camp HS, Chaudhry A, Leff T: A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology* 142:3207-3213, 2001

Canene-Adams K, Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, Erdman JW Jr: The tomato as a functional food. *J Nutr* 135:1226-1230, 2005

Chambers RL, McDermott JC: Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol* 21:155-184, 1996

Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS: Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. *Food Chem Toxicol* 49:1616-1625, 2011

Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Bluhner M, Griffin PR, Spiegelman BM: Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by

Cdk5. *Nature* 466:451-456, 2010

Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, Kuruvilla DS, Shin Y, He Y, Bruning JB, Marciano DP, Cameron MD, Laznik D, Jurczak MJ, Schurer SC, Vidovic D, Shulman GI, Spiegelman BM, Griffin PR: Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477:477-481, 2011

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M: A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38:813-818, 2006

Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P: Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71:731-740, 2002

Diez JJ, Iglesias P: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300, 2003

Dumonceaux J, Marie S, Beley C, Trollet C, Vignaud A, Ferry A, Butler-Browne G, Garcia L: Combination of myostatin pathway interference and dystrophin rescue enhances tetanic and specific force in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 18:881-887, 2010

Fasshauer M, Paschke R: Regulation of adipocytokines and insulin resistance.. *Diabetologia* 46:1594-1603, 2003

Ferre P: The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1:S43-S50, 2004

Fong CH, Hasegawa S, Herman Z, Ou P: Limonoid glucosides in commercial citrus juices. *J Food Sci* 54:1505-1506, 1989

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM: 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte

determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812, 1995

Gallagher D, Belmonte D, Deurenberg P, Wang Z, Krasnow N, Pi-Sunyer FX, Heymsfield SB: Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass. *Am J Physiol* 275:E249-58, 1998

Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A: Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 122:1924-1940, 2002

Genet C, Strehle A, Schmidt C, Boudjelal G, Lobstein A, Schoonjans K, Souchet M, Auwerx J, Saladin R, Wagner A: Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J Med Chem* 53:178-190, 2010

Genet C, Schmidt C, Strehle A, Schoonjans K, Auwerx J, Saladin R, Wagner A: Redefining the TGR5 triterpenoid binding pocket at the C-3 position. *ChemMedChem* 5:1983-1988, 2010

Glass DJ: Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5:87-90, 2003

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S: Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14938-14943, 1998

Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN: A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9:5022-5033, 1989

Gutierrez-Orozco F, Failla ML: Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: a critical review of the current evidence. *Nutrients* 5:3163-3183, 2013

Han XH, Jin YR, Tan L, Kosciuk T, Lee JS, Yoon JK: Regulation of the

follistatin gene by RSPO-LGR4 signaling via activation of the WNT/beta-catenin pathway in skeletal myogenesis. *Mol Cell Biol* 34:752-764, 2014

Hasegawa S, Bennett RD, Herman Z, Fong CH, Ou P: Limonoid glucosides in citrus. *Phytochemistry* 28:1717-1720, 1989

Hendrich AB, Malon R, Pola A, Shirataki Y, Motohashi N, Michalak K: Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers. *Eur J Pharm Sci* 16:201-208, 2002

Herman Z, Fong CH, Ou P, Hasegawa S: Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *J Agric Food Chem* 38:1860-1861, 1990

Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ: Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 32:775-781, 2005

Hirai S, Kim YI, Goto T, Kang MS, Yoshimura M, Obata A, Yu R, Kawada T: Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sci* 81:1272-1279, 2007

Hogan BL: Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432-438, 1996

Holst JJ: The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87:1409-1439, 2007

Horiba T, Nishimura I, Nakai Y, Abe K, Sato R: Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol Cell Endocrinol* 323:208-214, 2010

Horiba T, Katsukawa M, Abe K, Nakai Y: Alpha-mangostin promotes myoblast differentiation by modulating the gene-expression profile in C2C12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1923-1929, 2014

Horiba T, Katsukawa M, Mita M, Sato R: Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPAR $\gamma$  pathway. *Biochem Biophys Res Commun*

463:846-852, 2015

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993

Huang X, Zhu D, Lou Y: A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Eur J Pharmacol* 564:26-36, 2007

Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N: Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9337-9342, 1998

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I: Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655-1663, 2003

Jia Y, Kim JY, Jun HJ, Kim SJ, Lee JH, Hoang MH, Hwang KY, Um SJ, Chang HI, Lee SJ: The natural carotenoid astaxanthin, a PPAR- $\alpha$  agonist and PPAR- $\gamma$  antagonist, reduces hepatic lipid accumulation by rewiring the transcriptome in lipid-loaded hepatocytes. *Mol Nutr Food Res* 56:878-888, 2012

Kadowaki T, Yamauchi T: Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-451, 2005

Kanayama T, Arito M, So K, Hachimura S, Inoue J, Sato R: Interaction between sterol regulatory element-binding proteins and liver receptor homolog-1 reciprocally suppresses their transcriptional activities. *J Biol Chem* 282:10290-10298, 2007

Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T, Katagiri T: DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells* 14:695-702, 2009

Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar

R, Afrin R, Harima M, Suzuki H, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K: Naringenin ameliorates daunorubicin induced nephrotoxicity by mitigating AT1R, ERK1/2-NFkappaB p65 mediated inflammation. *Int Immunopharmacol* 28:154-159, 2015

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T: Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127:1755-1766, 1994

Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G: Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 329:386-390, 2005

Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K, Terao J: Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 283:9424-9434, 2008

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M: A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278:9435-9440, 2003

Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950, 2002

Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME: Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288-293, 1999

Kingsley DM: The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146, 1994

Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A

prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819, 1995

Koh IU, Lim JH, Joe MK, Kim WH, Jung MH, Yoon JB, Song J: AdipoR2 is transcriptionally regulated by ER stress-inducible ATF3 in HepG2 human hepatocyte cells. *FEBS J* 277:2304-2317, 2010

Kretzschmar G, Zierau O, Wober J, Tischer S, Metz P, Vollmer G: Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118:1-6, 2010

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al.: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609, 1999

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R: Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277:49831-49840, 2002

Lazarus SA, Bowen K, Garg ML: Tomato juice and platelet aggregation in type 2 diabetes. *JAMA* 292:805-806, 2004

Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP: Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 576:923-933, 2006

Li W, Tonelli J, Kishore P, Owen R, Goodman E, Scherer PE, Hawkins M: Insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones are not linked to adiponectin receptor expression in human fat or muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1301-E1307, 2007

Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R, Sun LQ: Myostatin



antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther* 15:155-160, 2008

Liu W, Thomas SG, Asa SL, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S, Ezzat S: Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5490-5496, 2003

Manners GD, Jacob RA, Breksa AP 3rd, Schoch TK, Hasegawa S: Bioavailability of citrus limonoids in humans. *J Agric Food Chem* 51:4156-4161, 2003

Manners GD: Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *J Agric Food Chem* 55:8285-8294, 2007

Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K: Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 298:714-719, 2002

Massague J: TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791, 1998

Massague J: How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178, 2000

Matsuzawa Y: The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 580:2917-2921, 2006

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90, 1997

Min K, Ha SC, Hasegawa PM, Bressan RA, Yun DJ, Kim KK: Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins* 54:170-173, 2004

Minamisawa M, Yoshida S, Uzawa A: The functional evaluation of waste yuzu (*Citrus junos*) seeds. *Food Funct* 5:330-336, 2014

Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN: Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83:1125-1136, 1995

Montesano A, Luzi L, Senesi P, Mazzocchi N, Terruzzi I: Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. *J Transl Med* 11:310, 2013

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003

Moran JL, Li Y, Hill AA, Mounts WM, Miller CP: Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiol Genomics* 10:103-111, 2002

Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI: Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587-3593, 2005

Mukai R, Horikawa H, Fujikura Y, Kawamura T, Nemoto H, Nikawa T, Terao J: Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice. *PLoS One* 7:e45048, 2012

Mukai R, Fujikura Y, Murota K, Uehara M, Minekawa S, Matsui N, Kawamura T, Nemoto H, Terao J: Prenylation enhances quercetin uptake and reduces efflux in Caco-2 cells and enhances tissue accumulation in mice fed long-term. *J Nutr* 143:1558-1564, 2013

Mustelin L, Pietilainen KH, Rissanen A, Sovijarvi AR, Piirila P, Naukkarinen J, Peltonen L, Kaprio J, Yki-Jarvinen H: Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E148-E154, 2008

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM: Oxidized LDL regulates

macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93:229-240, 1998

Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA: Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol Cell* 17:171-180, 2005

Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R: Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol* 193:120-131, 2002

Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M: *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytother Res* 23:1047-1065, 2009

Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR: Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 9:282-289, 2007

Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T: A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503:493-499, 2013

Ono E, Inoue J, Hashidume T, Shimizu M, Sato R: Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 410:677-681, 2011

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461, 2004

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS: Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137-1140, 2006

Pandey DK, Shekelle R, Selwyn BJ, Tangney C, Stamler J: Dietary vitamin C and beta-carotene and risk of death in middle-aged men. The Western Electric Study. *Am J Epidemiol* 142:1269-1278, 1995

Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK, Fielding RA: Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1086-90, 2003

Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471, 2003

Pedraza-Chaverri J, Cardenas-Rodriguez N, Orozco-Ibarra M, Perez-Rojas JM: Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol* 46:3227-3239, 2008

Perino A, Pols TW, Nomura M, Stein S, Pellicciari R, Schoonjans K: TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBPbeta differential translation. *J Clin Invest* , 2014

Perry RL, Rudnick MA: Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5:D750-67, 2000

Petersen KF, Dufour S, Shulman GI: Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med* 2:e233, 2005

Poulose SM, Harris ED, Patil BS: Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 56:103-112, 2006

Rodriguez J, Gilson H, Jamart C, Naslain D, Pierre N, Deldicque L, Francaux M: Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *Eur J Nutr* 54:377-389, 2015

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM: PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617, 1999

Roy A, Saraf S: Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol Pharm Bull* 29:191-201, 2006

Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7265-7270, 2003

Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, Mioskowski C, Auwerx J, Saladin R: Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun* 362:793-798, 2007

Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M: Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 274:24714-24720, 1999

Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP: Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res* 72 Suppl 1:36-41, 2009

Shen X, Collier JM, Hlaing M, Zhang L, Delshad EH, Bristow J, Bernstein HS: Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation. *Dev Dyn* 226:128-138, 2003

Shi Y, Massague J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700, 2003

Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean ME, Crozier A: Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agric Food Chem* 48:2663-2669, 2000

Sun X, Han R, Wang Z, Chen Y: Regulation of adiponectin receptors in hepatocytes by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Diabetologia* 49:1303-1310, 2006

Swellam M, Sayed Mahmoud And M, Abdel-Fatah Ali A: Clinical implications of adiponectin and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes mellitus. *Dis*

Markers 27:269-278, 2009

Szulc P, Schoppet M, Goettsch C, Rauner M, Dschietzig T, Chapurlat R, Hofbauer LC: Endocrine and clinical correlates of myostatin serum concentration in men--the STRAMBO study. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3700-3708, 2012

Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:2045-2055, 2002

Tanaka T, Maeda M, Kohno H, Murakami M, Kagami S, Miyake M, Wada K: Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin. *Carcinogenesis* 22:193-198, 2001

Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakci C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K: TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10:167-177, 2009

Tomczak KK, Marinescu VD, Ramoni MF, Sanoudou D, Montanaro F, Han M, Kunkel LM, Kohane IS, Beggs AH: Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J* 18:403-405, 2004

Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T: Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279:30817-30822, 2004

Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965

Walker EB: HPLC analysis of selected xanthenes in mangosteen fruit. *J Sep Sci* 30:1229-1234, 2007

Wang Q, Dryden S, Frankish HM, Bing C, Pickavance L, Hopkins D, Buckingham R, Williams G: Increased feeding in fatty Zucker rats by the

thiazolidinedione BRL 49653 (rosiglitazone) and the possible involvement of leptin and hypothalamic neuropeptide Y. *Br J Pharmacol* 122:1405-1410, 1997

Wang Z, Masternak MM, Al-Regaiey KA, Bartke A: Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology* 148:2845-2853, 2007

Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484-489, 2006

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al.: The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766, 1991

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003

Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM: A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:1873-1877, 2000

Yaffe D, Saxel O: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270:725-727, 1977

Yamamoto T, Yoshimura M, Yamaguchi F, Kouchi T, Tsuji R, Saito M, Obata A, Kikuchi M: Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1706-1711, 2004

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived

hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T: Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13:332-339, 2007

Yamauchi T, Kadowaki T: Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab* 17:185-196, 2013

Yoon J, Park M, Lee Jh, Min BS, Ryoo S: Endothelial nitric oxide synthase activation through obacunone-dependent arginase inhibition restored impaired endothelial function in ApoE-null mice. *Vascul Pharmacol* 60:102-109, 2014

Yoshimura M, Sano A, Kamei J, Obata A: Identification and quantification of metabolites of orally administered naringenin chalcone in rats. *J Agric Food Chem* 57:6432-6437, 2009

Yu HY, Park SW, Chung IM, Jung YS: Anti-platelet effects of yuzu extract and its component. *Food Chem Toxicol* 49:3018-3024, 2011

Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S: Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol* 6:11-15, 1999

Zhang S, Londhe P, Zhang M, Davie JK: Transcriptional analysis of the titin cap



gene. *Mol Genet Genomics* 285:261-272, 2011

Zhu M, Lee GD, Ding L, Hu J, Qiu G, de Cabo R, Bernier M, Ingram DK, Zou S: Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp Gerontol* 42:733-744, 2007

Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ: Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296:1486-1488, 2002

## 原著論文

1. Horiba T, Nishimura I, Nakai Y, Abe K, Sato R: Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol Cell Endocrinol* 323:208-214, 2010
2. Horiba T, Katsukawa M, Abe K, Nakai Y: Alpha-mangostin promotes myoblast differentiation by modulating the gene-expression profile in C2C12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1923-1929, 2014
3. Horiba T, Katsukawa M, Mita M, Sato R: Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPAR $\gamma$  pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 463:846-852, 2015

## 論文内容の要旨

論文題目 代謝性疾患リスク低減への応用を目指した食品成分の機能解析

氏 名 堀場 太郎

健康状態を示す包括的指標のひとつとして考えられる平均寿命は、日本において、感染症の激減と、生活習慣病の増加といった疾病構造の変化を背景として戦後急速に延伸し、世界トップクラスの水準を維持している。平均寿命が延伸する一方で、出生率は低下することで高齢化が進展し、高齢化にともなって発症する疾病、機能障害の増大に対する社会的負担が極めて大きくなってゆくであろうことが懸念されている。このような高齢化に伴う疾病や機能障害による社会的負担を軽減するためには、個人が継続的に生活習慣を改善することで積極的に健康を増進してゆくことが肝要であると考えられ、生活習慣改善の一環として「食」が寄与するところは大きいと考えられる。食の機能性の中でも、健康維持・疾患リスク低減に関わる 3 次機能は、薬剤に比べて単回での摂取における効果が大きくなくとも、毎日の食事の積み重ねにより機能発現することが期待できることから、これを活用した健康維持・疾患リスクの低減は、上記のような個人の生活習慣・行動変容を介した生活習慣病や高齢化に伴う機能障害の予防・改善策として有力なアプローチの一つとなることが期待される。中でも、脳血管疾患や高血圧性疾患などの生活習慣病や代謝性疾患は推計患者数が多く、要介護となる原因としても大きな割合を占めており、疾患リスクコントロールによる社会的負担軽減を考える上で主要なターゲットとして考える必要がある。

そこで、本研究では、メタボリックシンドローム、ロコモティブシンドロームをはじめとした代謝性疾患リスクのコントロールに関わる食の機能性に着目し、その機能を発揮しうる食素材として、トマトに含まれるフラボノイドのナリンゲニンカルコン、ユズ種子に含まれるリモノイドのオバクノン、マンゴス

チン果皮に含まれるキサントンの $\alpha$ -マンゴスチンに着目し、それらの機能解析を行うこととした。

### トマト果皮に含まれるナリンゲニンカルコンによる脂肪細胞代謝プロファイル調節機能

ナリンゲニンカルコンはトマトの果皮に蓄積が認められるフラボノイド類の一種で、炎症性サイトカインの産生抑制作用を示すことが報告されている。脂肪組織における慢性的な炎症が冠動脈性心疾患などの代謝性疾患リスクと密接に関連しているという近年の知見から、ナリンゲニンカルコンが脂肪組織において上述の炎症性サイトカインを含むアディポサイトカイン分泌調節を介し、その機能を調節している可能性が考えられるが、ナリンゲニンカルコンが脂肪組織に及ぼす代謝への影響などの詳細は今まで不明であった。そこで、ナリンゲニンカルコンが脂肪組織の構成単位である脂肪細胞において、アディポサイトカイン分泌を含む代謝制御プロセスに及ぼす影響を明らかとすることを目的として検討を行った。

3T3-L1 前駆脂肪細胞をナリンゲニンカルコンの存在下で脂肪細胞へと 8 日間分化させたところ、濃度依存的なアディポネクチンの遺伝子発現、分泌の亢進が認められた。レポーター遺伝子アッセイによる検討の結果、ナリンゲニンカルコンは PPAR $\gamma$  の転写活性を上昇させることによりアディポネクチンの転写を亢進していることが示された。

ナリンゲニンカルコン存在下で脂肪細胞へと分化させた脂肪細胞と、非存在下で分化させた脂肪細胞をサンプルとした DNA マイクロアレイ解析の結果、ナリンゲニンカルコンにより、エネルギー代謝に関わっている様々な遺伝子群の発現が一斉に上昇する一方で、細胞接着や発生過程等の機能に関与する遺伝子群の発現低下が認められることが明らかとなった。細胞接着に関連する遺伝子群の発現は、PPAR $\gamma$  の活性化により低下することが報告されていることから、これらの遺伝子発現変動は、ナリンゲニンカルコンが PPAR $\gamma$  による転写の活性化により脂肪細胞の分化を促進させ、これに伴う細胞の形態変化（繊維芽細胞か

ら脂肪細胞への変化) がより促進されていることを反映した結果である可能性が考えられた。また、エネルギー代謝に関わる遺伝子群の中でも、酸化リン酸化に関与する遺伝子群がナリングニンカルコン処理により発現上昇しており、ナリングニンカルコンが、脂肪細胞におけるミトコンドリアの酸化リン酸化の活性化を介した、インスリン抵抗性改善作用を示す可能性が示唆された。

さらに、DNA マイクロアレイ解析及びリアルタイム定量RT-PCRの結果から、ナリングニンカルコンはアディポネクチンの遺伝子発現を亢進するのみならず、その受容体である AdipoR2 の発現をも亢進しており、アディポネクチンのオートクライン/パラクライン作用を高めている可能性が示された。

#### ユズ種子に含まれるオバクノンの肥満、高血糖改善作用

オバクノンはリモノイド類に属する化合物であり、アグリコン、あるいは配糖体の形で柑橘の種子に蓄積することが知られている。リモノイド類は抗ガン、抗マラリア、抗菌作用など多様な生理活性を示すことが報告されているが、オバクノンが代謝性疾患に及ぼす影響について検討した報告はなく、その影響は未知であった。そこで、肥満、2型糖尿病モデル動物である KKAy マウスにユズ種子由来のオバクノンを経口摂取させたときに発揮される機能性に着目して解析を行った。

肥満・2型糖尿病モデル動物である KKAy マウスにコントロール食 (AIN-93G) 及び0.1%オバクノン食を28日間ペアフィードにて摂取させたところ、体重には両群間で有意な差が認められなかったものの、オバクノン摂取群で皮下脂肪及び内臓脂肪組織重量比が有意に低くなっていること、大腿筋及び腓腹筋重量比が有意に高くなっていることが確認された。血中パラメーターでは、オバクノン摂取群で有意な随時血糖値とHbA1cの低下が認められ、こうした変化を反映するかのよう、インスリンの低値傾向とGLP-1の高値傾向が認められた。さらに、レポータージーンアッセイによる検討の結果、オバクノンはTGR5の転写活性を上昇させること、及び、PPAR $\gamma$ をアンタゴナイズすることが示され、合わせて、オバクノンがPPAR $\gamma$ リガンド存在下における脂肪細胞の分化に伴うトリグリセ

ライド蓄積を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、オバクノン  
は、TGR5の転写活性化を介した糖・脂質代謝改善及び骨格筋重量増加作用と、  
PPAR $\gamma$ のアンタゴニズを介した糖・脂質代謝改善作用を発揮している可能性が  
示唆された。

#### マンゴスチンに含まれる $\alpha$ -マンゴスチンの筋分化促進作用

$\alpha$ -マンゴスチンはキサントン類に属するポリフェノール的一种である。東南ア  
ジア原産の熱帯性常緑樹であるマンゴスチンの、特に果皮部に豊富に含まれて  
いることが知られており、抗アポトーシス効果、抗腫瘍効果、抗炎症効果、抗  
酸化効果など多様な生理活性を示すことが報告されている。しかし、上記以外  
の生理活性、とりわけ、本研究の対象としている代謝性疾患に関わる機能性  
についての研究報告はなく、骨格筋に及ぼす影響については不明であった。そ  
こで、 $\alpha$ -マンゴスチンが骨格筋分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、  
C2C12細胞が $\alpha$ -マンゴスチン存在下で分化する際の遺伝子発現変動をDNAマイ  
クロアレイにより解析した。

C2C12筋芽細胞を、 $\alpha$ -マンゴスチン 5  $\mu$ M 存在下で分化誘導し、誘導 4 日後ま  
で分化させたところ、コントロール群の細胞に比べ、筋管の形成促進が認めら  
れ、骨格筋合成のマーカー因子の一つである Myl2 の発現上昇が認められた。

$\alpha$ -マンゴスチン存在下で分化させた筋管細胞と、非存在下で分化させた筋管細  
胞をサンプルとした DNA マイクロアレイ解析の結果、筋分化に関与する遺伝子  
群、骨格筋の構成因子に関わる遺伝子群の発現が  $\alpha$ -マンゴスチン処理により一  
斉に上昇しており、 $\alpha$ -マンゴスチンによる筋管形成の促進を反映する結果が確認  
された。一方で、細胞外骨格や接着に関与する遺伝子群の発現は低下しており、  
骨格筋の分化、及び、それに伴って起こる細胞の形態変化への関わりが大きい  
遺伝子群が  $\alpha$ -マンゴスチンによる発現制御を受けていることが明らかとなった。  
発現上昇の認められた遺伝子の中には、ミオスタチンの働きを阻害する titin-cap  
と follistatin が認められ、リアルタイム定量 PCR によっても  $\alpha$ -マンゴスチンによ  
る発現上昇が確認された。ミオスタチンは骨格筋の成長を負に制御する機能が

報告されていることから、 $\alpha$ -マンゴスチンはミオスタチン経路を阻害することにより、骨格筋の合成プロセスを促進し、筋管形成を促している可能性が推察された。

以上、本研究で新たに食の 3 次機能を見出した機能性成分について概観したが、これらの成分を疾病のリスク低減が期待できるように通常の食生活から継続的に摂取することは、全体の栄養バランスや嗜好性など、食に求められる 1 次、2 次機能やコストまでをも鑑みると現実的に難しい点が少なくない。また、ヒトでのエビデンス蓄積は今後の最重要課題の一つであろう。こうした課題の解決に向けて検討を継続することにより、食の 3 次機能を活用した疾病リスク低減が、費用対効果に優れ、より実効性のある選択肢の一つとなることが期待される。

## 謝辞

本研究全体を通じて、細かな点までご指導下さり、本論文をまとめる上で多くのご助言を下された、東京大学農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 佐藤隆一郎 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えて下さり、様々な局面でのご助言を通じて研究を支えて下さった、キッコーマン株式会社 常務執行役員 松山旭 博士に厚く御礼申し上げます。

第2章、第4章の研究を行うにあたり、DNA マイクロアレイ実験からデータ解析、考察にわたるまで細やかなご指導を下さいました、弘前大学食料科学研究所 中井雄治 先生に厚く御礼申し上げます。

第2章、第4章の研究を行うにあたり、DNA マイクロアレイ解析を中心に指導下さいました、東京大学農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 阿部啓子 先生に厚く御礼申し上げます。

第2章の研究を行うにあたってご協力頂きました西村郁子 博士、第3章の研究を行うにあたってご協力頂きました三田萌子 氏、第3章及び第4章の研究を行うにあたってご協力頂きました勝川雅裕 氏に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、様々な面でご協力頂きましたキッコーマン株式会社 研究開発本部の皆様感謝いたします。

最後に、常日頃より支えてくれた友人と家族に深く感謝いたします。