平成二十六年度　博士論文

サルカケミカンから単離した aculeatin の
抗糖尿病効果及び toddaculin の骨代謝改善効果

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻

渡辺　章夫

指導教員　宮澤　陽夫　教授

目次

序論

近年、我が国では生活が豊かになり、食生活も欧米化したことで糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病を発症する人々が急増している[1]。生活習慣病は、日本人の死亡原因の３分の２を占めており、生活習慣病への対応は我が国にとって重要な課題である[2]。生活習慣病である糖尿病の有病者とその予備群は、平成 24 年「国民健康・栄養調査」では約 2,050 万人と推計され、平成9年以降の調査から初めて減少したが、依然として高水準である[3]。糖尿病を大別すると、Ⅰ型糖尿病とⅡ型糖尿病に分類される[4]。糖尿病患者のほとんどがⅡ型糖尿病であると言われている[5]。Ⅰ型糖尿病は、膵 β 細胞からインスリンが分泌されない糖尿病であり、Ⅱ型糖尿病は、インスリンの分泌が低下またはインスリン抵抗性による糖尿病である。Ⅱ型糖尿病の最大の原因は、生活習慣に起因したインスリン抵抗性にある[6, 7]。脂肪細胞に脂肪が蓄積して肥大化すると、アディポサイトカインである TNFα や MCP-1 などの分泌が増加し、インスリン抵抗性を発症させるとともに脂肪組織の炎症を誘導する[8]。つまり、内臓脂肪の過剰蓄積が糖尿病の発症やインシュリン抵抗性に深く関係していると考えられている[9]。インスリン抵抗性は、インスリン刺激下において血中グルコースを細胞に取り込む機能が低下していることが原因であるが、現在、インスリン抵抗性を改善する薬剤として、経口糖尿病治療薬であるピオグリタゾンなどのチアゾリジン系薬剤が用いられている[9, 10]。チアゾリジン系薬剤は強力な peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR-γ）のアゴニストであり、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導を転写レベルで促進する[11]。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進することにより、血中グルコースを効率よく取り込むことが可能な脂肪細胞が増殖し、血糖値が低下すると考えられている[12]。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導を効率よく促進できれば、インスリン抵抗性の予防または改善作用が期待できる。しかし、チアゾリジン系薬剤はインスリン抵抗性を有するⅡ型糖尿病患者全てに有効ではなく、また、浮腫、心不全、体重増加などの副作用も報告されていることから[13, 14]、より

副作用の少ない糖尿病治療薬及びインスリン抵抗性改善薬の開発が望まれている。

一方、骨粗鬆症患者は日本国内で 1000 万人を超えており、大きな社会的問題となっている[15, 16]。今後も急速な高齢化により、骨粗鬆症患者が増加の一途を辿ることが推測されている。骨は絶えず骨吸収と骨形成を繰り返しており、骨形成に関与する細胞が骨芽細胞、骨吸収に関与する細胞が破骨細胞である[17]。骨代謝はこれらの細胞による骨形成と骨吸収のバランスに依存しており、そのバランスが崩れることにより、骨吸収が骨形成を上回り、骨粗鬆症などの骨代謝疾患がもたらされることが知られている[18 - 20]。よって骨形成が骨吸収を下回らないようにすることが重要である。骨吸収を抑制し、骨形成を促進する化合物が得られれば、骨粗鬆症などの骨代謝疾患に有効である。

以上のように、糖尿病や骨粗鬆症の予防及び改善に有効な化合物を天然から新たに探索することは重要である。そこで、沖縄県に自生しているサルカケミカンに着目した。サルカケミカン（*Toddalia asiatica* (L.) Lam.）は沖縄を始め、熱帯及び亜熱帯に広く分布しているミカン科の植物である[21]。サルカケミカンは、糖尿病やリウマチに効果があることが知られており、第３類医薬品（生薬及び動植物成分）に分類されているが、その作用成分は詳しくは研究されていない[22 - 25]。そこで、サルカケミカンに含まれる化合物の抗糖尿病作用及び骨代謝改善作用に対する効果に焦点をあて、その作用機序の解明を含めて明らかにすることを目的として本研究を行った。

第１章　沖縄産サルカケミカンに含まれる抗糖尿病成分の検索

緒言

近年、我が国では生活が豊かになるとともに、食生活の欧米化、運動量の低下さらに精神的ストレスなどが原因とされる生活習慣病が深刻な問題となっている[1 - 3]。その代表例である糖尿病は、インスリンの分泌不全やインスリン抵抗性が生じることで高血糖状態となり、様々な病態が引き起こされる慢性疾患である[4 - 7]。糖尿病は血糖値が上昇するだけでなく、時に生死に関わる動脈硬化症などの合併症も引き起こすため、その予防及び治療は非常に重要である。近年、食品科学分野での研究において、普段の食生活により糖尿病発症・進行を予防することが推奨され、食事からの糖質や脂質の吸収抑制作用を持つ健康食品や特定保健用食品が注目されている[26]。これまで様々な食品や生薬などを対象に血糖値上昇抑制作用を有する新素材の探索を行ってきたが、本研究では、サルカケミカンに着目した。サルカケミカンは沖縄を始め、東南アジア、中国、インド、マダガスカルなど亜熱帯から熱帯かけて広く分布しているミカン科の植物である。欧米では「Wild Orange Tree」または「Forest Pepper」、中国では「飛龍掌血」、日本の沖縄地方では「サラカチ」、「サラカキ」または「サラチャー」と呼ばれている。近年、サルカケミカンから抽出したエキスがストレプトゾドシンで誘導した糖尿病モデルラットにおいて血糖値上昇抑制作用を有することが明らかにされた[25]。しかし、具体的な作用成分は明らかになっていない。そこで、本章では、サルカケミカンから有機溶媒を用いた液-液分配及びオープンカラムで分画し、分取 HPLC で活性成分を単離することを目的とした。

第 1 節　3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化促進効果を指標とした作用成分の分画

1-1-1　目的

血中の血糖値を下げるには糖を取り込むための脂肪細胞を増やすか、インスリン抵抗性を緩和しインスリンが効きやすい状態にする必要がある[6, 7]。3T3-L1 前駆脂肪細胞は通常培養条件下においては線維芽細胞様の形態を示すが、インスリン刺激を与えることにより、細胞内に脂肪滴を形成しながら、効率的に脂肪細胞へと分化するため、抗糖尿病作用を有する成分をスクリーニングすることが可能である[27 - 29]。サルカケミカンは、糖尿病に効果があることが古くから知られており[22, 24]、近年、糖尿病モデルラットにおいて血糖値上昇抑制作用を有することが明らかにされたが[25]、具体的な作用成分は明らかになっていない。そこで、サルカケミカンに含有する作用成分の単離に取り組むこととした。天然成分の抽出には有機溶媒や樹脂を用いた分画が一般的である。そこで、サルカケミカンから有機溶媒と逆相系カラムを用いた手法で活性成分抽出法の確立を目的とした。

1-1-2　方法

1-1-2-1　試薬成分

マウス 3T3-L1 前脂肪細胞は、Health Science Research Resources Bank（Osaka, Japan）から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）培地及びペニシリン-ストレプトマイシンは、Sigma-Aldrich（Tokyo, Japan）から購入した。ウシ胎児血清（FBS）は Life Technologies Japan（Tokyo, Japan）から入手した。インスリン及びピオグリタゾンは Wako Pure Chemical（Osaka, Japan）から購入した。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

1-1-2-2　サルカケミカンから活性成分の分画及び単離・精製

サルカケミカン（乾燥茎）を沖縄県薬草協同組合から入手し、ミルで粉砕後、100 g を 1 L のメタノール（MeOH）中に懸濁させ、80℃で 2 時間加熱還流抽出した。MeOH 抽出液を回収し、残渣に再び 1 L の MeOH を加え、抽出を繰り返した。MeOH 抽出液を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。MeOH 抽出エキスを 100 mL の水で懸濁し、100 mL のヘキサン（Hex）を加えて、振とう抽出した。これを 4 回繰り返し、Hex 抽出液を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。残った水層に 100 mL の酢酸エチル（EtOAc）を加えて、振とう抽出した。これを 4 回繰り返し、EtOAc 抽出液を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。残った水層に 100 mL のブタノール（BuOH）を加えて、振とう抽出した。これを 4 回繰り返し、BuOH 抽出液を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。残った水層を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。最も活性のあった画分を、20% アセトニトリル（ACN）50 mL に懸濁し、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体の逆相系樹脂である Diaion HP-20（Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan）を充填したオープンカラム（内径 3.0 × 高さ 14 cm）に通液し、200 mL の 20% ACN、40% ACN、60% ACN、80% ACN、100% ACN で溶出した。それぞれの溶出液を減圧下で濃縮乾固後、重量を測定した。最も活性のあった画分を 50% ACN 10 mL に溶解し、ODS カラムを用いた分取 HPLC により精製し、各化合物を得た。

HPLC の構成及び操作条件は以下のとおりである。

・HPLC 構成

ポンプ：LC-20AP（島津製作所）

オートサンプラー：SIL-20AC（島津製作所）

システムコントローラー：CBM-20A（島津製作所）

検出器：SPD-20A（島津製作所）

フラクションコレクター：FRC-10A（島津製作所）

・分析 HPLC 条件

カラム : Wakosil-Ⅱ 5C18 RS-Prep, 4.6 × 250 mm, 5 µm （Wako Pure Chemical）

移動相：アセトニトリル－水（50：50）

流速：1 mL/min

温度：室温

波長：210 nm

・分取 HPLC 条件

カラム : Wakosil-Ⅱ 5C18 RS-Prep, 20 × 250 mm, 5 µm （Wako Pure Chemical）

移動相：アセトニトリル－水（50：50）

流速：12 mL/min

温度：室温

波長：210 nm

1-1-2-3　3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いたオイルレッド O 染色法によるサルカケミカン分画物の評価

3T3-L1 脂肪前駆細胞はトリプシン処理により回収し、4 ℃、1,000 rpm、2 分間遠心分離を行った後、10% FBS（牛胎児血清）、ペニシリン（100 単位/mL）、

ストレプトマイシン（100 μg/mL）及び高グルコース（4,500 mg/L）を含有したDMEM培地で、5.0×10^4 細胞/mL となるよう調製し、24 ウェルマルチウェルプレートに 0.5 mL/well で播種した。プレートは、37 ℃、5% CO_2 存在下で 72 時間培養後、各ウェルに 1 μM インスリンからなる分化誘導剤とサンプルを添加した。また、比較対照として、インスリン感受性を高める作用を有するチアゾリン系薬剤であるピオグリタゾンを 1 μM になるように添加した。72 時間培養後、培地を交換し、インスリンとサンプルを再度、同濃度で添加した。その後、さらに 4 日間培養を行った。培地を除去した後、細胞を洗浄し、Adipogenesis Assay Kit（Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA）付属の固定液 0.2 mL で細胞を固定した。その後、洗浄液で洗浄し、オイルレッド O 染色液 0.2 mL を加え、20 分間静置した。水及び洗浄液で洗浄した後、光学顕微鏡下でオイルレッド O による染色像を観察し、細胞溶解液を加えて細胞を溶解した後、プレートリーダー（520 nm）で測定した。

1-1-2-4　統計処理

値は平均値±標準誤差（n = 3）で示した。GraphPad Prism 5.2 を用いて解析し、各群の有意差検定は Dunnett 検定を用いて評価した。$P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

1-1-3　結果

1-1-3-1　サルカケミカンの有機溶媒及び HP-20 カラム分画

サルカケミカン 100 g をメタノールで還流抽出し、有機溶媒で分画したところ、ヘキサン画分に最も強い活性が確認された（**Fig. 1-1A**）。次に、逆相系樹脂である Diaion HP-20 カラムで分画したところ、60% ACN で溶出した画分に最も強い活性が見られた（**Fig. 1-1B**）。

1-1-3-2　60% ACN 活性画分の分取 HPLC による化合物精製

最も活性のあった 60% ACN 画分を HPLC に注入し、210 nm の波長で分析したところ、特徴的な 3 本のピークが確認された（**Fig. 1-2A**）。60% ACN 画分（400 mg）を 10 mL の 50% ACN に溶解し、分取 HPLC を用いて、component **1**（35 mg）、component **2**（199 mg）及び component **3**（13 mg）の 3 つの化合物を得た。

1-1-4　考察

サルカケミカンは世界各地で古くから民間薬として使用されてきた歴史がある[22, 24]。そのため、多くの研究者により、化合物の研究が盛んに行われ、抗腫瘍作用のある nitidine などのアルカロイド系化合物や toddanol や toddanone などのクマリン系化合物が含有していることが明らかにされてきた[30 - 34]。近年、サルカケミカンが血糖値上昇抑制作用を有することが明らかにされたが[25]、具体的な作用成分は明らかになっていなかった。そこで、我々はサルカケミカンに含有する抗糖尿病作用成分の検索を試みた。サルカケミカン 100 g からメタノールで還流抽出し、抽出成分を有機溶媒で分画したところ、ヘキサン画分に最も強い活性が確認され、活性物質は比較的極性の低い物質である事が分かった。次に、逆相系樹脂である Diaion HP-20 カラムで分画したところ、60% ACN で溶出する画分に最も強い活性が見られ、活性成分が多く含有していると考えられた。そこで、60% ACN 画分を HPLC に注入したところ、210 nm の波長において特徴的な 3 本のピークが確認された（**Fig. 1-2A**）。分取 HPLC に注入し、component **1**（35 mg）、component **2**（199 mg）及び component **3**（13 mg）の 3 つの化合物を単離することができた（**Fig. 1-2B**）。含有量から component **2** が脂肪蓄積促進作用の主成分であると推察された。

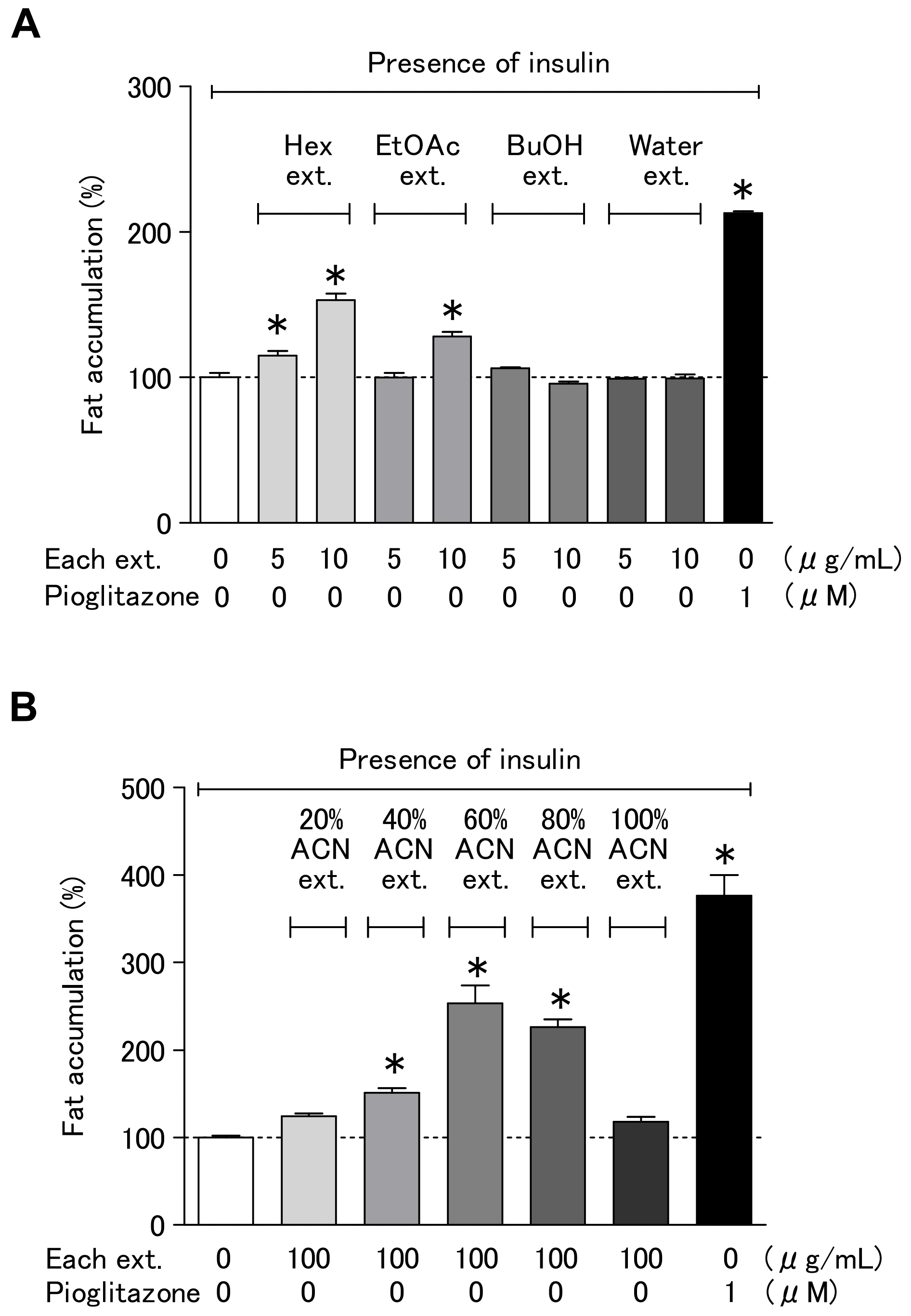


Fig. 1-1 The effects of each organic solvent extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells (A). The effects of each extract by Diaion HP-20 column chromatography (B). Values are expressed as means ± SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with the control in the presence of insulin.

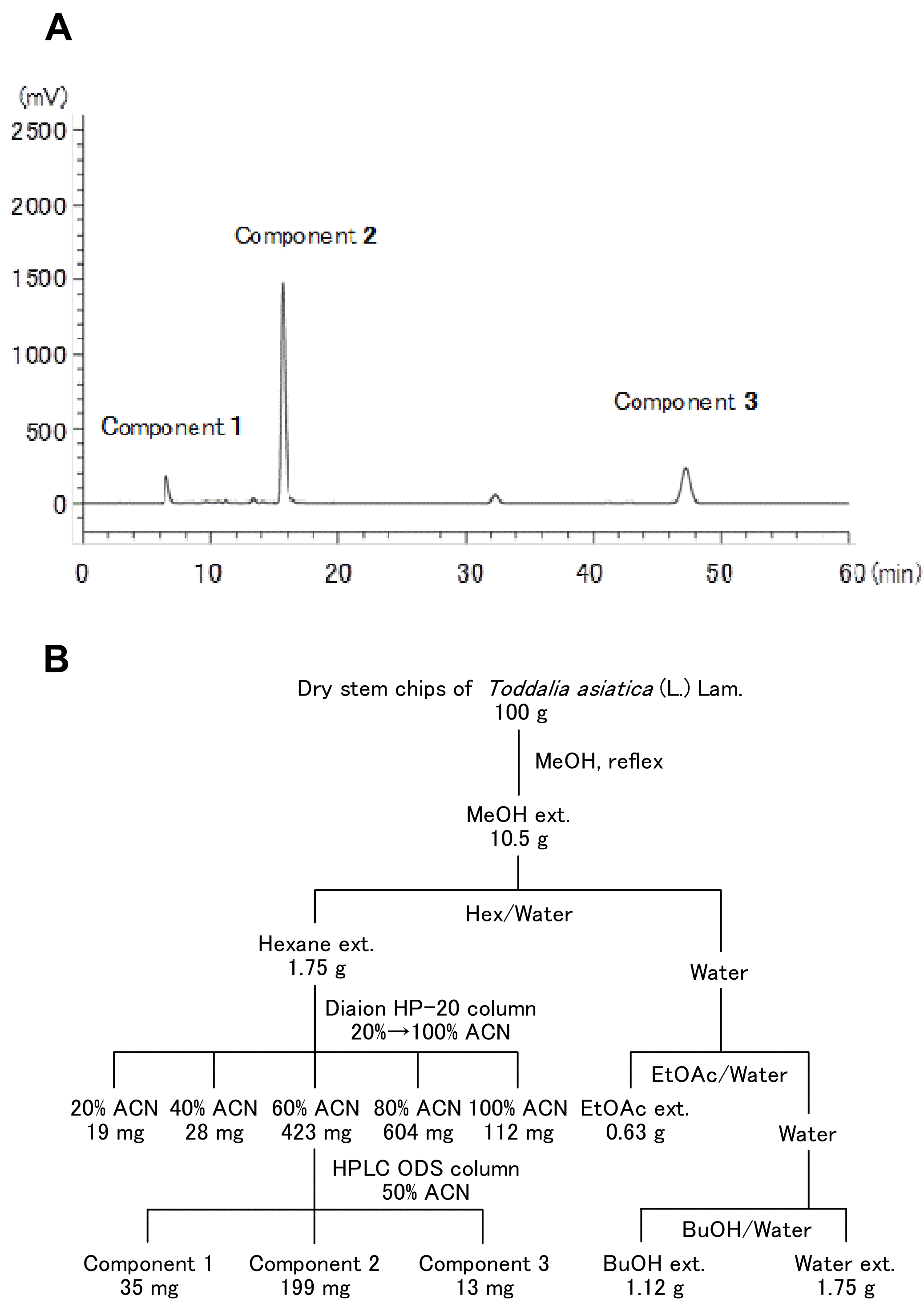


Fig. 1-2 The components were analyzed by LC-UV at 210 nm, and a typical chromatogram was shown in (A). Scheme for separation of the components from *Toddalia asiatica* (L.) Lam. (B).

第２節　糖尿病作用成分の構造解析的知見の収集

1-2-1　目的

第 1 節でサルカケミカンから component **1**、component **2** 及び component **3** の 3 つの化合物を得た。含有量から component **2** が主成分であると推定されたが、各化合物の構造情報を明らかにする必要がある。そこで、フーリエ変換質量分析計（FT-MS）、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）及び核磁気共鳴装置（NMR）を用い、化合物の構造情報を解析することを目的とした。

1-2-2　方法

1-2-2-1　FT-MS、FT-IR 及び NMR 測定

精密質量測定は各化合物を 50% ACN に溶解し、ベンチトップ型フーリエ変換質量分析計 Q-Exactive（Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan）に注入し精密質量を測定した。赤外吸収（IR）スペクトルの測定は、顕微透過ユニット IRT-5000 を装着した FT/IR-4100（Jasco, Tokyo, Japan）を用いて、顕微透過法により測定した。一次元及び二次元核磁気共鳴スペクトルは、component **1** 及び **3** は重水素化ジメチルスルホキシド（Merck, Tokyo, Japan）、component **2** は重水素化クロロホルム（Merck）に溶解し、Varian NMR System 500（水素核 500 MHz、炭素核 125 MHz）（Varian, CA, USA）を用いて測定した。得られたスペクトルの化学シフト（δ）は、重水素化ジメチルスルホキシドに溶解した場合では残存プロトンのシグナルを、水素核（^{1}H）では δ 2.50 ppm、また、炭素核（^{13}C）では δ 40.66 ppm として補正した。一方、重水素化クロロホルムに溶解した場合では、残存プロトンのシグナルを、^{1}H では δ 7.27 ppm として、また、^{13}C では δ 76.99 ppm として補正した。

1-2-2-2　不飽和度の計算

FT-MS 分析による精密質量から各元素の組成を以下の式に挿入し、不飽和

度を求めた。

$$（2C+2-H-X+N）\div 2$$

C は炭素の個数、H は水素の個数、X はハロゲンの個数、N は窒素の個数

1-2-3　結果

1-2-3-1　Component 1 の構造解析

MS スペクトルの実測値から component **1** の組成式は $C_{16}H_{20}O_6$ であった。不飽和度を算出したところ、不飽和度は 7 であった。IR スペクトルを解析した結果、component **1** のスペクトルには 3600～3200 cm^{-1} に水酸基に由来するものと考えられる吸収が認められた（**Fig. 1.3A**）。次に、水素核及び炭素核一次元核磁気共鳴スペクトル(1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C)を測定した（**Fig. 1.4A** 及び **B**）。この結果、1D-^{1}H スペクトルでは各シグナルの面積強度比の和から、component **1** のプロトンの数は 20 であると推察した。一方、1D-^{13}C では観察されたシグナル数から炭素核の数は 16 であると推察された。したがって、両スペクトルから導かれたプロトン及び炭素核数は FT-MS の組成式に一致した。二次元核磁気共鳴スペクトル（HMBC、HMQC、1H-1H-COSY 及び ROESY）（データ省略）を用いて、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C スペクトルで認められた各シグナルを帰属し（**Table. 1-1** 及び **1-2**）、構造を推定した。

1-2-3-2　Component 2 の構造解析

MS スペクトルの実測値から component **2** の組成式は $C_{16}H_{18}O_5$ であった。不飽和度を算出したところ、不飽和度は 8 であった。IR スペクトルを解析した結果、スペクトルには、3600～3200 cm^{-1} 付近に水酸基に由来する幅広い吸収が認められなかったことから、この物質は水酸基を持たないものと推察された（**Fig. 1.3B**）。次に、水素核及び炭素核一次元核磁気共鳴スペクトル（1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C）を測定した（**Fig. 1.5A** 及び **B**）。この結果、1D-^{1}H スペクトルでは各シグナルの面積強度比の和から、component **2** のプロトンの数は 18 であると推察した。一

方、1D-^{13}C では観察されたシグナル数から炭素核の数は 16 であると推察された。したがって、両スペクトルから導かれたプロトン及び炭素核数は FT-MS の組成式に一致した。二次元核磁気共鳴スペクトル（HMBC 及び COSY）（データ省略）を用いて、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C スペクトルで認められた各シグナルを帰属し（**Table. 1-1** 及び **1-2**）、構造を推定した。

1-2-3-3　Component 3 の構造解析

MS スペクトルの実測値から component **3** の組成式は $C_{16}H_{18}O_4$ であった。不飽和度を算出したところ、不飽和度は 8 であった。IR スペクトルを解析した結果、スペクトルには、3600～3200 cm^{-1} 付近に水酸基に由来する幅広い吸収が認められなかったことから、この物質は水酸基を持たないものと推察された（**Fig. 1.3C**）。次に、水素核及び炭素核一次元核磁気共鳴スペクトル（1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C）を測定した（**Fig. 1.5A** 及び **B**）。この結果、1D-^{1}H スペクトルでは各シグナルの面積強度比の和から、component **2** のプロトンの数は 18 であると推察した。一方、1D-^{13}C では観察されたシグナル数から炭素核の数は 16 であると推察された。したがって、両スペクトルから導かれたプロトン及び炭素核数は FT-MS の組成式に一致した。二次元核磁気共鳴スペクトル（HMBC、COSY 及び ROESY ）（データ省略）を用いて、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C スペクトルで認められた各シグナルを帰属し（**Table. 1-1** 及び **1-2**）、構造を推定した。

1-2-4　考察

本節では第 1 節で単離した component **1**、component **2** 及び component **3** の 3 つの化合物を、FT-MS、FT-IT 及び NMR を用いた手法で構造解析を行った。component **1** の推定構造は既知物質である toddalolactone と一致し、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C の帰属データ（**Table. 1-1**）は toddalolactone の文献の帰属データと一致した[34]。これらの結果から、component **1** は toddalolactone であると同定した（**Fig. 1-7A**）。component **2** の推定構造は既知物質である aculeatin と一致し、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C の帰属データ（**Table. 1-1**）は aculeatin の文献の帰属データと一致した

[34]。これらの結果から、cmponent **2** は aculeatin であると同定した（**Fig. 1-7B**）。component **3** の推定構造は既知物質である toddaculin と一致し、1D-^{1}H 及び 1D-^{13}C の帰属データ（**Table. 1-1**）は toddaculin の文献の帰属データと一致した[34]。以上の結果から、component **3** は toddaculin であると同定した（**Fig. 1-7C**）。

結論として、component **1** は toddalolactone、component **2** は aculeatin、component **3** は toddaculin であり、クマリン化合物であることが明らかになった。それぞれの化合物は核磁気共鳴スペクトルから不純物の含量は僅かであり、高純度であると考えられた。

Table. 1-1 ^{1}H-NMR of components **1-3**

Carbon	Component **1**	Component **2**	Component **3**
2			
3	6.26 d	6.26 d	6.27 d
4	7.99 d	7.88 d	7.99 d
4a			
5			
6			
7			
8	6.85 s	6.66 s	6.86 s
8a			
1′	2.64-2.76 m	2.8-3.0 m	3.26 d
2′	3.53 m	2.8-3.0 m	5.09 m
3′			
Me-3′	1.13 s	1.43 s	1.62 s
Me-3′	1.13 s	1.31 s	1.72 s
OMe	3.84 s	3.88 s	3.87 s
OMe	3.86 s	3.92 s	3.90 s
OH	4.13 s		
OH	4.16 s		

Table. 1-2 ^{13}C-NMR of components **1-3**

Carbon	Component **1**	Component **2**	Component **3**
2	161.37	161.08	160.60
3	112.87	112.55	112.49
4	140.79	138.88	139.85
4a	107.69	107.24	107.04
5	157.07	156.09	155.37
6	120.23	116.81	119.77
7	163.02	161.79	161.66
8	96.47	95.48	96.11
8a	155.33	155.22	154.73
1′	26.94	23.58	22.69
2′	76.81	63.19	122.64
3′	73.04	59.15	131.65
Me-3′	26.36	18.94	18.11
Me-3′	26.81	24.78	25.87
OMe	57.46	56.09	56.90
OMe	64.16	63.63	63.56

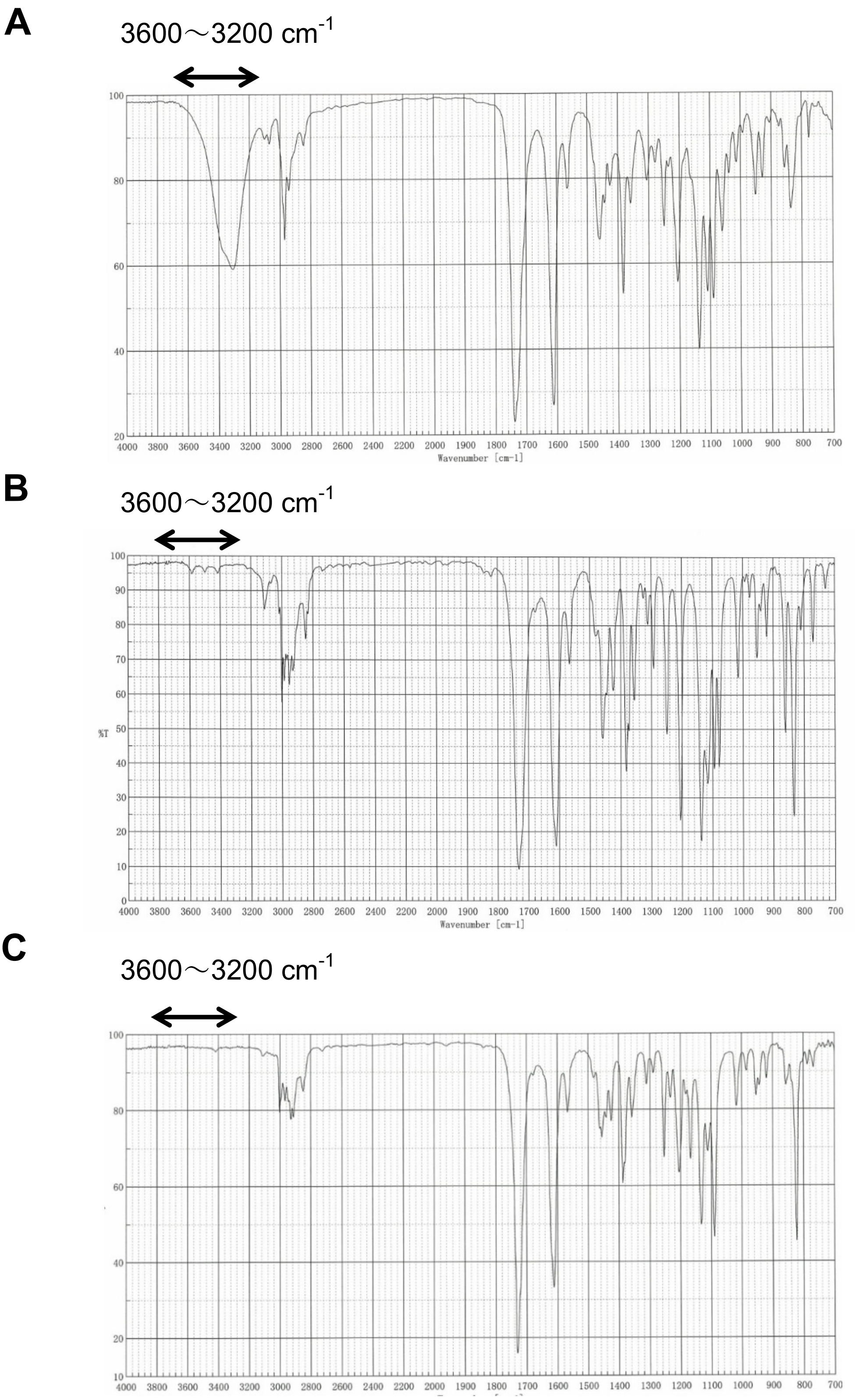
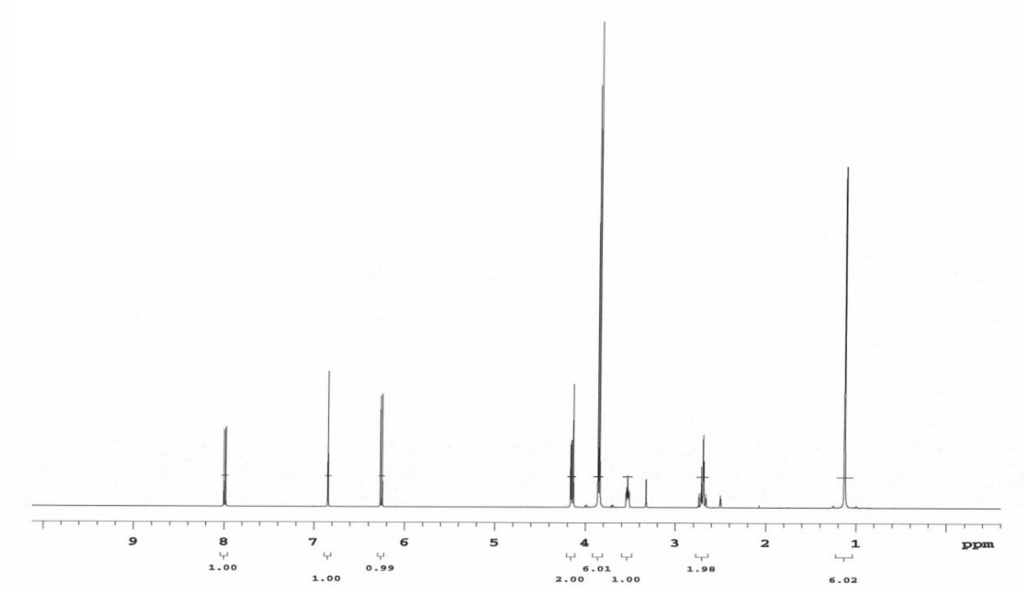


Fig. 1-3　FT-IR spectra of component **1** (A), **2** (B), and **3** (C)

A



B

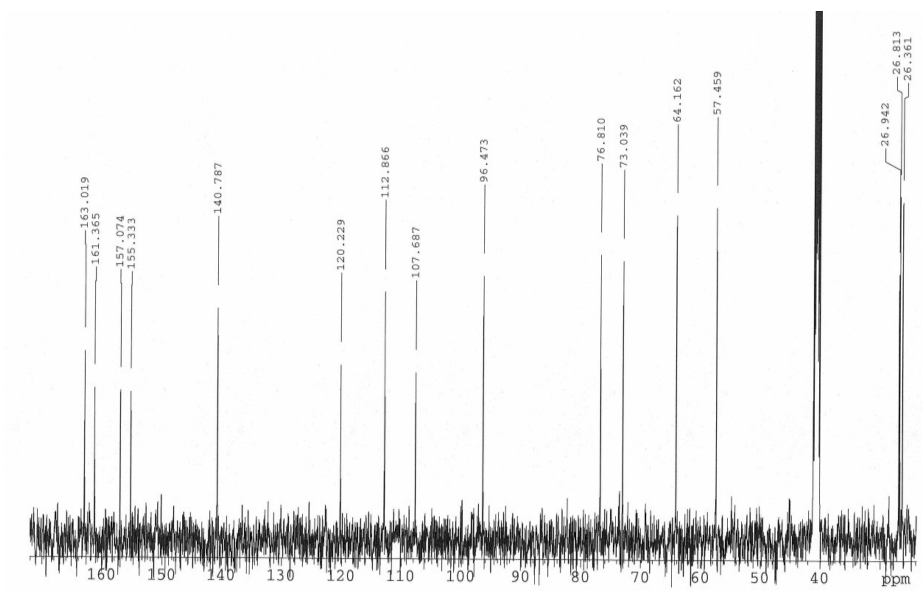
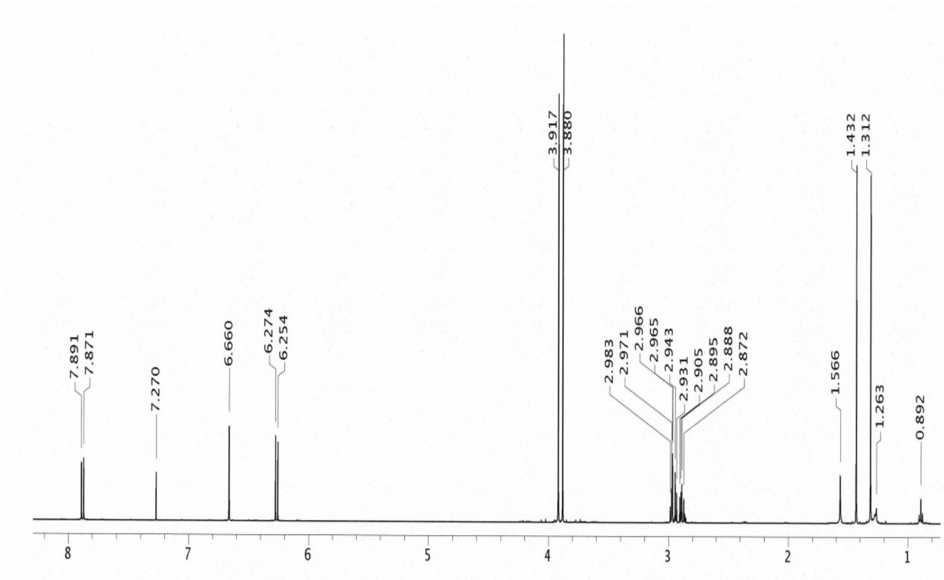


Fig. 1-4 Parts of the ^{1}H-NMR (A) and ^{13}C-NMR (B) spectrum of component **1**

A



B

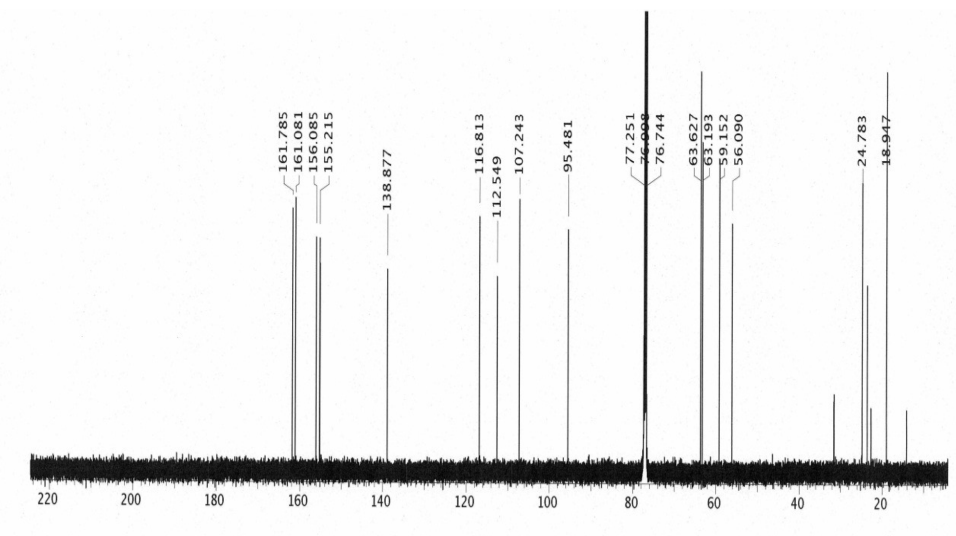
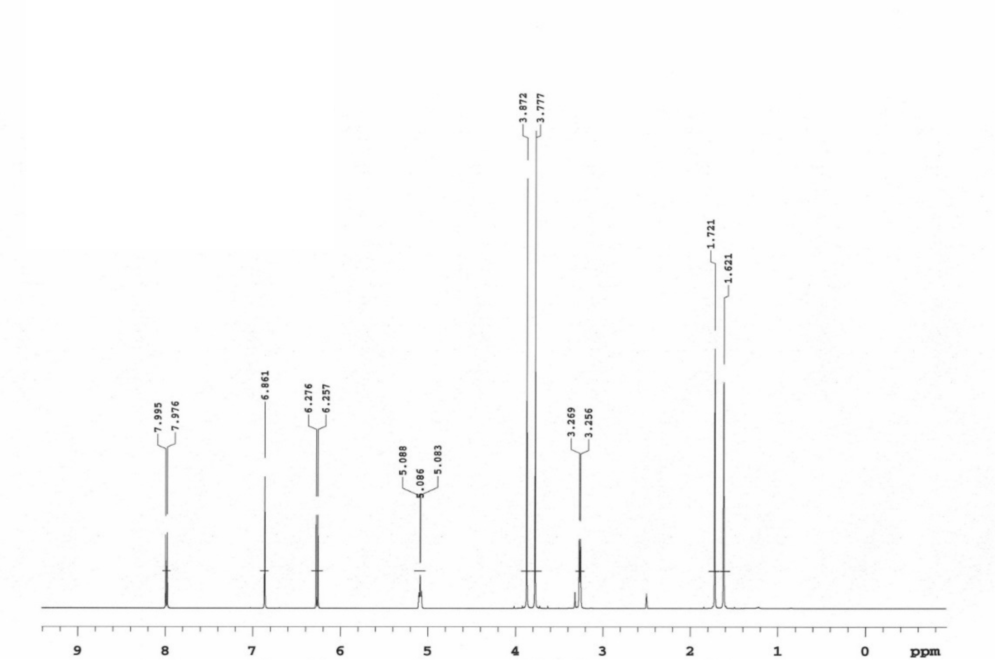


Fig. 1-5 Parts of the ^{1}H-NMR (A) and ^{13}C-NMR (B) spectrum of component **2**

A



B

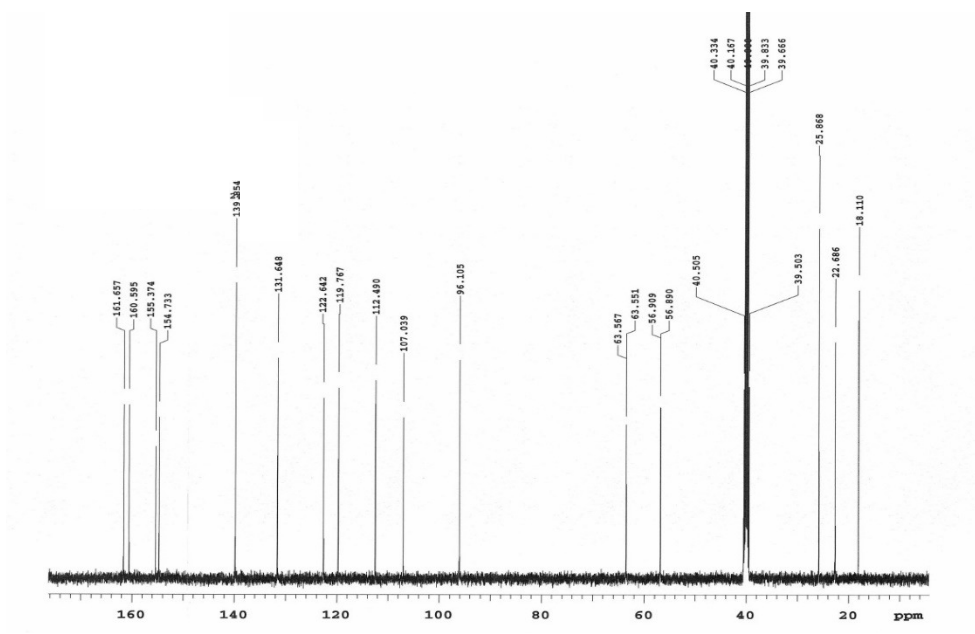
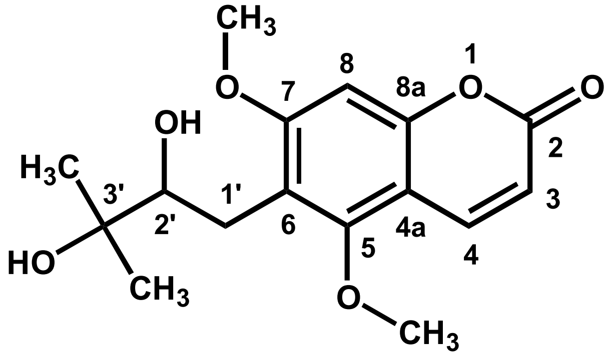


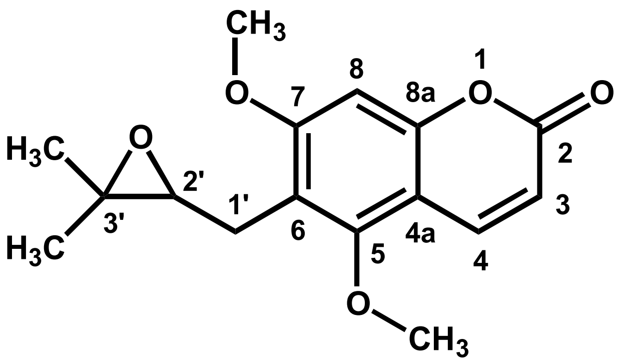
Fig. 1-6 Parts of the ^{1}H-NMR (A) and ^{13}C-NMR (B) spectrum of component **3**

A



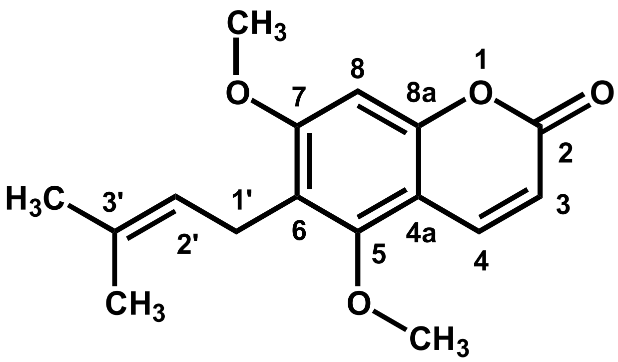
Component **1**
(Toddalolactone)

B



Component **2**
(Aculeatin)

C



Component **3**
(Toddaculin)

Fig. 1-7 Chemical structures of component **1** (toddalolactone), component **2** (aculeatin), and component **3** (toddaculin).

第３節　抗糖尿病作用成分の脂肪細胞分化促進効果

1-3-1　目的

第２節では、サルカケミカンから単離した component **1**、component **2** 及び component **3** の各化合物を、FT-MS、FT-IT 及び NMR を用いた手法で構造解析を行い、それぞれ toddalolactone、aculeatin 及び toddaculin のクマリン系化合物であることを明らかにした。含有量から aculeatin が主成分と考えられるが、本節では各化合物の脂肪細胞分化促進効果における活性を調べることを目的とした。

1-3-2　方法

1-3-2-1　試薬成分

1-1-2-1 と同様の試薬を用いた。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

1-3-2-2　3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いたオイルレッド O 染色法による各化合物のの評価

1-1-2-3 と同様の試験法で実施し、各ウェルに 1 μM インスリンからなる分化誘導剤と 50 μM の各化合物（component **1**、toddalolactone ; component **2**、aculeatin ; component **3**、toddaculin）を添加した。また、比較対照として、インスリン感受性を高める作用を有するチアゾリン系薬剤であるピオグリタゾンを 1 μM になるように添加した。72 時間培養後、培地を交換し、1 μM インスリンからなる分化誘導剤と 50 μM の各化合物を再度、同濃度で添加し、さらに 4 日間培養を行った。光学顕微鏡下でオイルレッド O による染色像を観察し、細胞溶解液を加えて細胞を溶解した後、プレートリーダー（520 nm）で測定した。

1-3-2-3　統計処理

1-1-2-4 と同様の統計処理を行った。

1-3-3　結果

1-3-3-1　オイルレッド O 染色法による各化合物の評価

各化合物（component **1**、toddalolacotone；component **2**、aculeatin；component **3**、toddaculin）で刺激した 3T3-L1 脂肪細胞分化促進試験の結果を **Fig. 1-8A** 及び光学顕微鏡の観察像を **Fig. 1-8B** に示した。各化合物において有意な脂肪蓄積促進作用が確認され、aculeatin に最も強い促進作用が認められた。

1-3-4 考察

3T3-L1 前駆脂肪細胞は通常培養条件下においては線維芽細胞様の形態を示すが、インスリン刺激を与えることにより、細胞内に脂肪滴を形成しながら、効率的に脂肪細胞へと分化することが知られている[27 - 29]。各化合物（component **1**、toddalolacotone ; component **2**、aculeatin ; component **3**、toddaculin）を 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いたオイルレッド O 染色法による各化合物で評価したところ、aculeatin に最も強い脂肪蓄積促進作用が見られ、含有量及び活性の強さからサルカケミカン抽出物における脂肪蓄積促進作用の主成分であると考えられた。

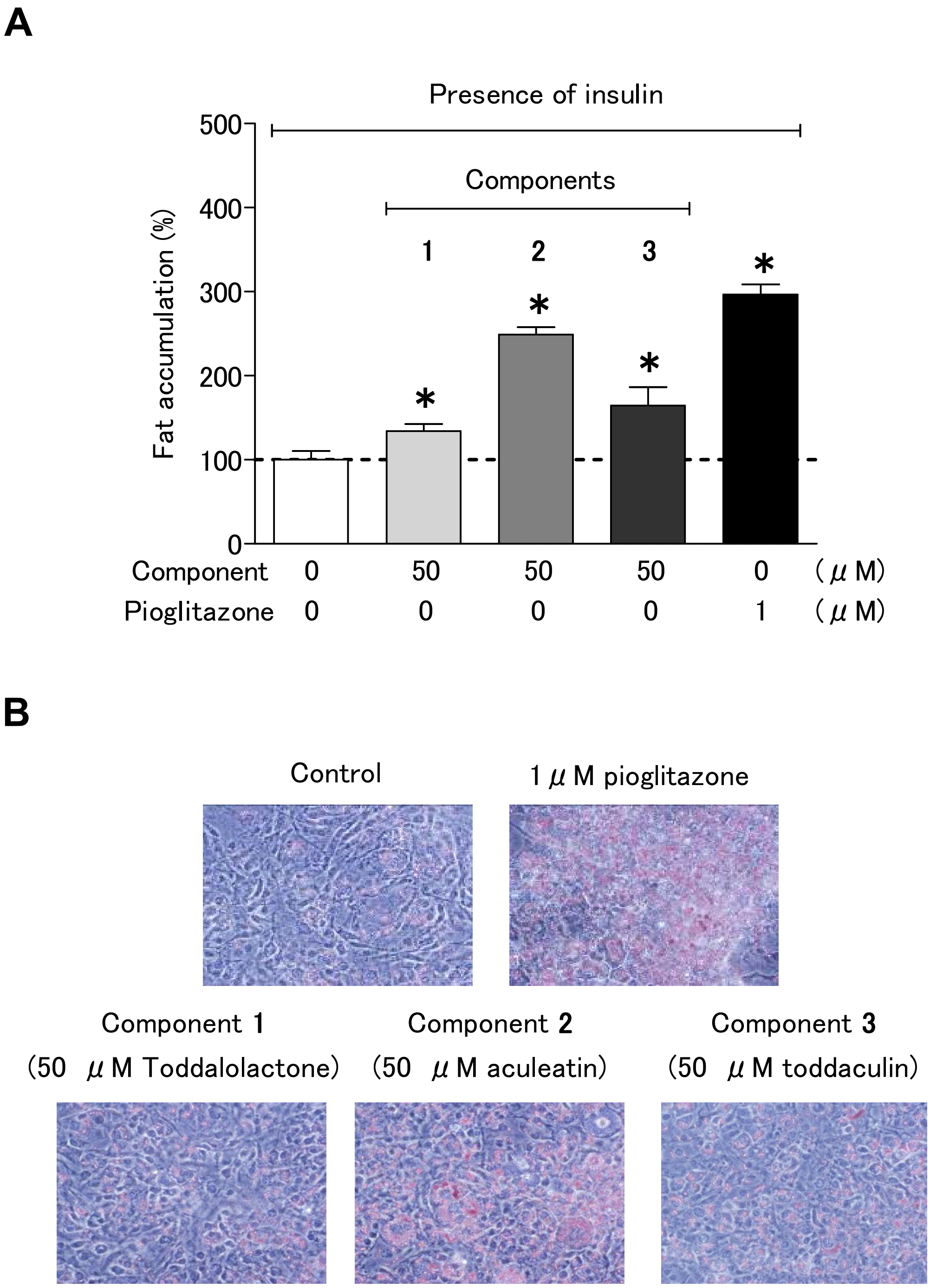


Fig. 1-8 The effects of isolated component **1** (toddalolactone), component **2** (aculeatin), and component **3** (toddaculin) are shown in (A) and light microscope images stained with Oil Red O are shown in (B) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Values are expressed as means ± SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with the control in the presence of insulin.

第１章　小括

サルカケミカンは世界各地で古くから民間薬として使用されてきた歴史を持つため[22, 24]、多くの研究者達によって、機能性や含有成分の研究が盛んに行われ、多くのアルカロイド系化合物やクマリン系化合物に関する報告がされてきた[30 - 34]。近年、サルカケミカンが血糖値上昇抑制作用を有することが明らかにされたが[25]、具体的な作用成分は明らかになっていなかった。そこで、我々はサルカケミカンに含有する抗糖尿病作用成分の検索を試みた。沖縄産のサルカケミカン茶（乾燥茎）100 g から有機溶媒で分画したところ、ヘキサン画分に最も強い活性が確認され、活性物質は比較的極性の低い物質である事が分かった。次に、逆相系カラムである Diaion HP-20 カラムで分画したところ、60% ACN で溶出する画分に最も強い活性が見られた。60% ACN 画分を HPLC に注入したところ、210 nm の波長において特徴的な 3 本のピークが確認された。分取 HPLC に注入し、component **1**（35 mg）、component **2**（199 mg）及び component **3**（13 mg）の 3 つの化合物を得た。単離した component **1**、component **2** 及び component **3** の各化合物を FT-MS、FT-IT 及び NMR を用い構造解析を行ったところ、それぞれクマリン骨格を持つ toddalolacotone、aculeatin 及び toddaculin であった。それぞれの活性を調べたところ、aculeatin に最も強い脂肪蓄積促進作用が見られた。主成分は活性及び含有量から aculeatin であると考えられた。また、サルカケミカン 100 g には約 200 ㎎の aculeatin が含有していた。本研究でサルカケミカンから純度の高い３種類のクマリン系化合物を単離・精製できる抽出法を確立することができた。しかし、aculeatin はエポキシ環を持つため、メタノールで還流抽出している際に、エポキシ環の開環が起こり、toddalolactone が生成している可能性も考えられた。データには示していないが、直接 Hex で還流抽出する手法も検討したところ、エポキシの開環が抑えられ、より効率的に aculeatin を回収できる事が分かった。これらの標準品は一般的に市販されておらず、機能性も詳しく調べられていない。そこで、抗糖尿病作用（第２及び３章）及び抗骨粗鬆症作用（第４章）に着目し、調べる事とした。

第２章　サルカケミカンから単離した aculeatin が 3T3-L1 脂肪細胞に及ぼす影響

緒言

第１章ではサルカケミカンに含有する抗糖尿病作用成分を検索する為、有機溶媒を用いた液-液分配法及びオープンカラムで分画し、分取 HPLC にて化合物を単離し、構造情報を調べた。その結果、活性の主成分は aculeatin であることを明らかにした。第２章では、3T3-L1 脂肪前駆細胞を用い、aculeatin の脂肪蓄積促進作用のメカニズムを DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR を用いて解析する。また、成熟脂肪細胞におけるグルコール取り込み促進作用、成熟脂肪細胞における脂肪分解促進作用などの aculeatin が 3T3-L1 脂肪細胞に及ぼす影響を検討することとした。

2-1-1　目的

サルカケミカンから有機溶媒を用いた液-液分配法およびオープンカラム及び分取 HPLC を用いて、toddalolacotone、aculeatin 及び toddaculin を単離し、活性の主成分は aculeatin であることが分かった。そこで、DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR を用いて脂肪蓄積促進作用のメカニズムを解析する。また、成熟脂肪細胞におけるグルコール取り込み促進作用及び成熟脂肪細胞における脂肪分解促進作用の検討を実施し、aculeatin が 3T3-L1 脂肪細胞に及ぼす影響を調べることを目的とした。

2-1-2　方法

2-1-2-1　3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いたオイルレッド O 染色法による aculeatin の評価

1-1-2-3 と同様の試験法で実施し、2-デオキシグルコース、フロレチン及びイソプロテレノールは Wako Pure Chemical（Osaka, Japan）から購入した。各ウェルに 12.5 - 100 μM aculeatin と 1 μM インスリン存在下または非存在下における脂肪蓄積促進作用をオイルレッド染色法で評価した。

2-1-2-2　トリグリセリド（TG）蓄積及びグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GPDH）活性の測定

1-1-2-3 と同様の試験法で実施し、3T3-L1 脂肪細胞は、氷冷した PBS で 2 回洗浄し氷冷した後、1 mM EDTA 含有 25 mM Tris-HCl（pH 7.5）を加え超音波処理によって細胞を溶解した。細胞溶解液の TG 蓄積レベルはトリグリセライドＥーテストワコー（Wako Pure Chemical）を用い、付属の説明書に従って測定し、mg/mg タンパク質として表した。GPDH 活性は、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素（GPDH）活性測定キット（Takara Bio, Shiga, Japan）を用い、付属の説明書に従って測定し、mU/mg タンパク質として表した。タンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用い、付属の説明書に従って測定

した。

2-1-2-3　遺伝子発現解析試験

1-1-2-3 と同様の試験法で実施し、培養終了後の細胞を TRIzol Reagent（Life Technologies Japan, Tokyo, Japan）で溶解した後、RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Tokyo, Japan）を用いて Total RNA を抽出し、Biotin 標識 RNA を作製した後、DNA マイクロアレイ（Genopal Mouse Custum Chip, Mitsubishi Rayon, Tokyo, Japan）で遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイ解析は単回しか行っていない。そこで、有意に変動した遺伝子を選択し、定量 RT-PCR 法による mRNA 発現量の測定を行った。cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix（Takara Bio）を使用し、mRNA 発現量の測定には Fast SYBR Green Master Mix（Life Technologies Japan）を用いた StepOnePlus 装置リアルタイム PCR システム（Life Technologies Japan）を使用した。定量 RT-PCR 法により測定した遺伝子は *Pparg*、*Ap2*、*Cd36*、*Adipoq*、*Glut4*、*Mcp1*、*Ccl6*、*Il6* 及び *Actb* であり、プライマーは Takara Bio より *Pparg*（MA029808）、*Ap2*（MA117397）、*Cd36*（MA157745）、*Adipoq*（MA152022）、*Glut4*（MA077105）、*Mcp1*（MA066003）、*Ccl6*（MA153825）、*Il6*（MA152279）及び *Actb*（MA050368）を購入した。

PCR 条件は以下のように設定した。

1：初期変性　サイクル数：1

95°C　20 秒

2：PCR 反応サイクル数：40

95°C　3 秒

60°C　30 秒

3：メルティングカーブ

反応終了後、融解曲線分析により反応産物が単体であることを確認した。各遺伝子発現量は、SYBR Green の蛍光強度から Threshold cycle（Ct）値を求め、

内部標準である *Actb* と比較することで相対定量を行った。

2-1-2-4　PPAR-γ アゴニスト活性測定

ピオグリタゾンなどのチアゾリジン誘導体は、脂肪細胞の核内受容体型転写因子 PPARγ に結合し、脂肪細胞の分化を促進する。aculeatin の PPAR-γ アゴニスト活性を調べるため、EnBio RCAS 核内受容体コファクターアッセイシステム（EnBio RCAS for PPAR-γ; EnBioTec Laboratories, Tokyo, Japan）を用い、付属の説明書に従って測定した。

2-1-2-5　2-デオキシグルコースの取り込み試験

3T3-L1 脂肪前駆細胞を、5.0×10^4 細胞/mL となるよう調製し、24 ウェルマルチウェルプレートに 0.5 mL/well で播種した。37 ℃、5% CO_2 存在下で 3 日間培養後、各ウェルに Adipogenesis Assay Kit（Cayman）付属のインスリン、デキサメタゾン及びイソブチルメチルキサンチンからなる分化誘導剤を添加し、3 及び 6 日後に培地を交換し、さらに 3 日間培養することで成熟脂肪細胞に分化させた。9 日目に 100 µM aculeatin または 1 µM ピオグリタゾンを添加し、24 時間培養した。24 時間後に FBS を含まない DMEM と交換し、6 時間インキュベートした。2% BSA 含有 KPRH 緩衝液（25 mM HEPES pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$ 及び 1 mM KH_2PO_4）で洗浄した後、細胞を、1 µM インスリン含有 KPRH 緩衝液でインキュベートした。18 分後、KRPH 緩衝液に溶解した 0.1 mM 2-デオキシグルコースを添加した。20 分後、細胞を 200 µM フロレチン含有 PBS で洗浄し、10 mM Tris-HCl（pH8.0）に溶解した。2-デオキシグルコースの取り込みを、2-デオキシグルコース代謝速度測定キット（Cosmobio、Tokyo、Japan）を用い、付属の説明書に従って測定した。

2-1-2-6　脂肪分解促進試験

3T3-L1 前脂肪細胞を 5.0×10^4 細胞/mL となるよう調製し、24 ウェルマルチウェルプレートに 0.5 mL/well で播種した。37 ℃、5% CO_2 存在下で 3 日間培養

後、各ウェルに Adipogenesis Assay Kit（Cayman）付属のインスリン、デキサメタゾン及びイソブチルメチルキサンチンからなる分化誘導剤を添加し、3 日後に培地を交換し、さらに 3 日間培養することで成熟脂肪細胞に分化させた。6 日目に 25-200 µM aculeatin、1 µM ピオグリタゾンまたは 10 µM イソプロテレノールを添加し、6 時間培養した後、培地中の遊離グリセロール量を Free glycerol reagent 及び Glycerol standard（Sigma-Aldrich）を用いて測定した。

2-1-3　結果

2-1-3-1　Aculeatin の脂肪蓄積促進効果

インスリン非存在下及び存在下における aculeatin の脂肪蓄積促進効果を、**Fig. 2-1A** に示した。aculeatin に濃度依存的な脂肪蓄積促進効果が認められ、インスリン非存在下と比較し、インスリン存在下で蓄積効果が高かった。次に、蓄積 TG 及び GPDH 活性を調べたところ、同様に濃度依存的な有意な増加を示した（**Fig. 2-1B** 及び **C**）。これらの結果は、aculeatin は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化促進効果を有し、特にインスリンの存在下において増強していることを示した。

2-1-3-2　遺伝子発現解析及び PPAR-γ アゴニスト活性

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化を増強するメカニズムを調べるために、遺伝子発現解析を行ったところ、DNA マイクロアレイ解析は aculeatin（50 µM）処理後の特定の遺伝子の発現の変化を示した。具体的には、*Pparg*、*Ap2*、*Cd36*、*Glut4*、*Adipoq* 遺伝子が発現上昇し、*Mcp1*、*Ccl6* 遺伝子に対し、発現抑制効果を示した。DNA マイクロアレイは単回しか実施していない。そこで、より詳細な遺伝子発現を解析するため、定量 RT-PCR 法を行ったところ、*Pparg*、*Ap2*、*Cd36*、*Glut4* 及び *Adipoq* 遺伝子の発現レベルが濃度依存的に発現上昇し（**Fig. 2-2A-E**）、*Ccl6*、*Il6* 及び *Mcp1* が濃度依存的に発現抑制していた（**Fig. 2-2F-H**）。一方、PPAR-γ アゴニスト活性を測定したところ、その効果は弱かった（**Fig. 2-3A**）。

2-1-3-3　2-デオキシグルコースの取り込み促進試験及び脂肪分解促進試験

Aculeatin の成熟脂肪細胞における糖取り込みに与える影響を調べるため、インスリン存在下で 2-デオキシグルコース取り込み能を測定したところ、aculeatin は、2-デオキシグルコースの取り込みを増強した（**Fig. 2-3B**）。この結果は、aculeatin がグルコーストランスポーター（GLUT）の膜移行を促進していることが示唆された。次に、成熟脂肪細胞における脂肪分解促進試験を行ったところ、aculeatin はイソプロテレノールと同様に遊離グルセロールの増加を示した（**Fig. 2-3C**）。これらの結果は、aculeatin がイソプロテレノールと同様に、β アドレナリン受容体（β-AR）アゴニストとして作用している可能性が示唆された。一方、ピオグリタゾンには脂肪分解促進作用は見られなかった。

2-1-4 考察

本研究で aculeatin に脂肪前駆細胞の分化を促進する効果が明らかになった。脂肪細胞への分化及び脂肪蓄積には、さまざまな転写因子及び脂肪細胞に特徴的な遺伝子の発現上昇を伴う。我々は、DNA マイクロアレイ分析及び RT-PCR を用いて、遺伝子発現を解析したところ、aculeatin によって PPAR-γ の遺伝子発現及び PPAR-γ の標的遺伝子である *Ap2*、*Cd36*、*Glut4* 及び *Adipoq* の遺伝子発現が増加していた[35, 36]。インスリン抵抗性は、組織の炎症と関連しており、肥満に関連する脂肪組織は、MCP-1、IL-6 を含むさまざまな炎症性タンパク質を産生するマクロファージの浸潤を増強することを特徴とする[8]。aculeatin は、これら炎症性遺伝子（*Mcp1*、*Ccl6* 及び *Il6*）の発現を減少していた。したがって、aculeatin が脂肪生成及び炎症応答の両方に重要な遺伝子の発現を調節することにより、3T3-L1 細胞の分化を促進している可能性が考えられた。また、フラボノイドなどのいくつかの天然化合物は、PPAR-γ のリガンドとして作用することが報告されている[37]。そこで、aculeatin の PPAR-γ リガンド活性を調べたところ、その効果は弱いことが分かった。これらの結果から、aculeatin は、別の機構を介して PPAR-γ の標的遺伝の発現を高めている可能性が考えられた。詳細なメ

カニズムの解明は今後の研究課題としたい。

一方、aculeatin は、成熟脂肪細胞においてインスリンの存在下で 2-デオキシグルコースの取り込みを促進した。インスリンは脂肪細胞を感作し、GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションを促進する[38]。これら結果から aculeatin がインスリン抵抗性を緩和し、GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションを促進する可能性が示唆された。また、aculeatin は成熟脂肪細胞において遊離グリセロールの放出を増加させた。イソプロテレノールなどの β-AR のアゴニストは、cAMP で誘発される脂肪分解を促進することが知られている[39]。また、β-AR のアゴニストによる脂肪分解促進効果は β-AR のアンタゴニスト（プロプラノロール及びピンドロール）によって阻害されることが知られている。データに示していないが、β-AR のアンタゴニストであるプロプラノロール及びピンドロールを添加したところ、aculeatin の脂肪分解促進効果が阻害されたため、aculeatin は β-AR 経路を介して 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪分解を促進していることが明らかとなった。

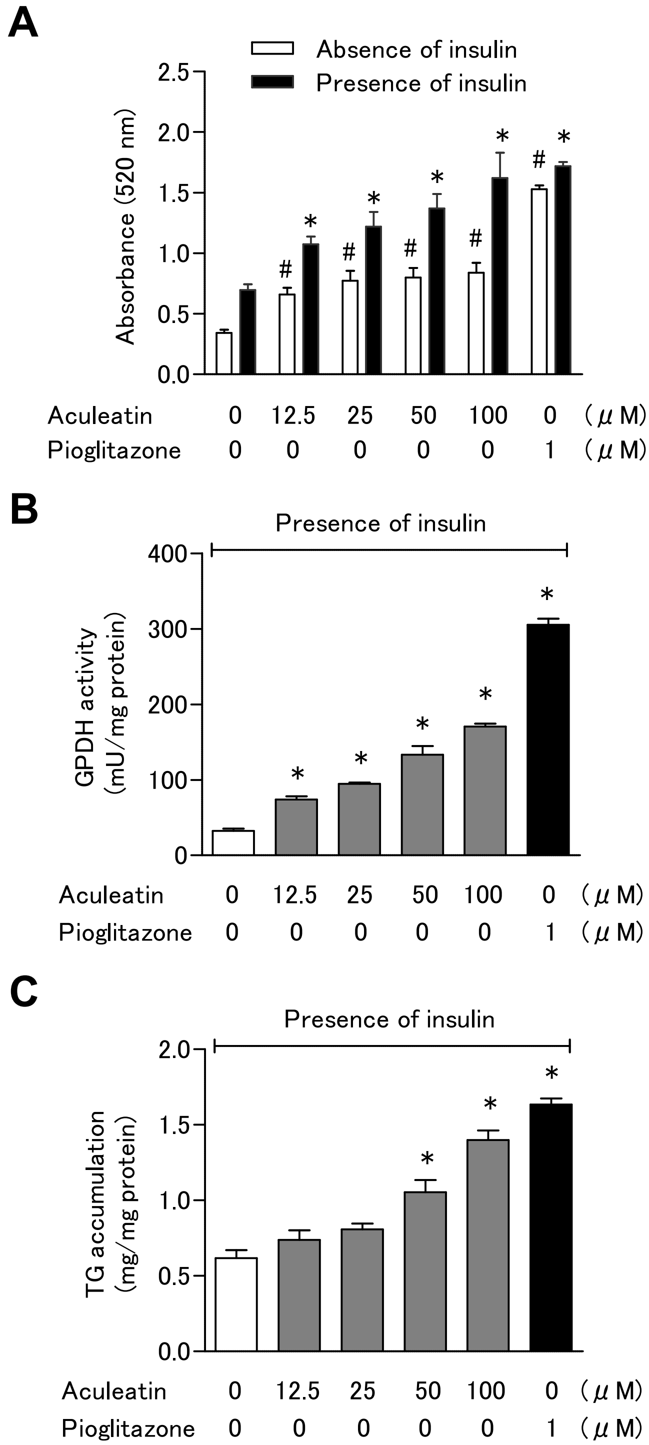


Fig. 2-1 Effects of aculeatin on (A) GPDH activity and (B) TG levels during adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Values are expressed as means ± SEM (n = 3). # P < 0.05 compared with the control in the absence of insulin. * $P < 0.05$ compared with the control in the presence of insulin.

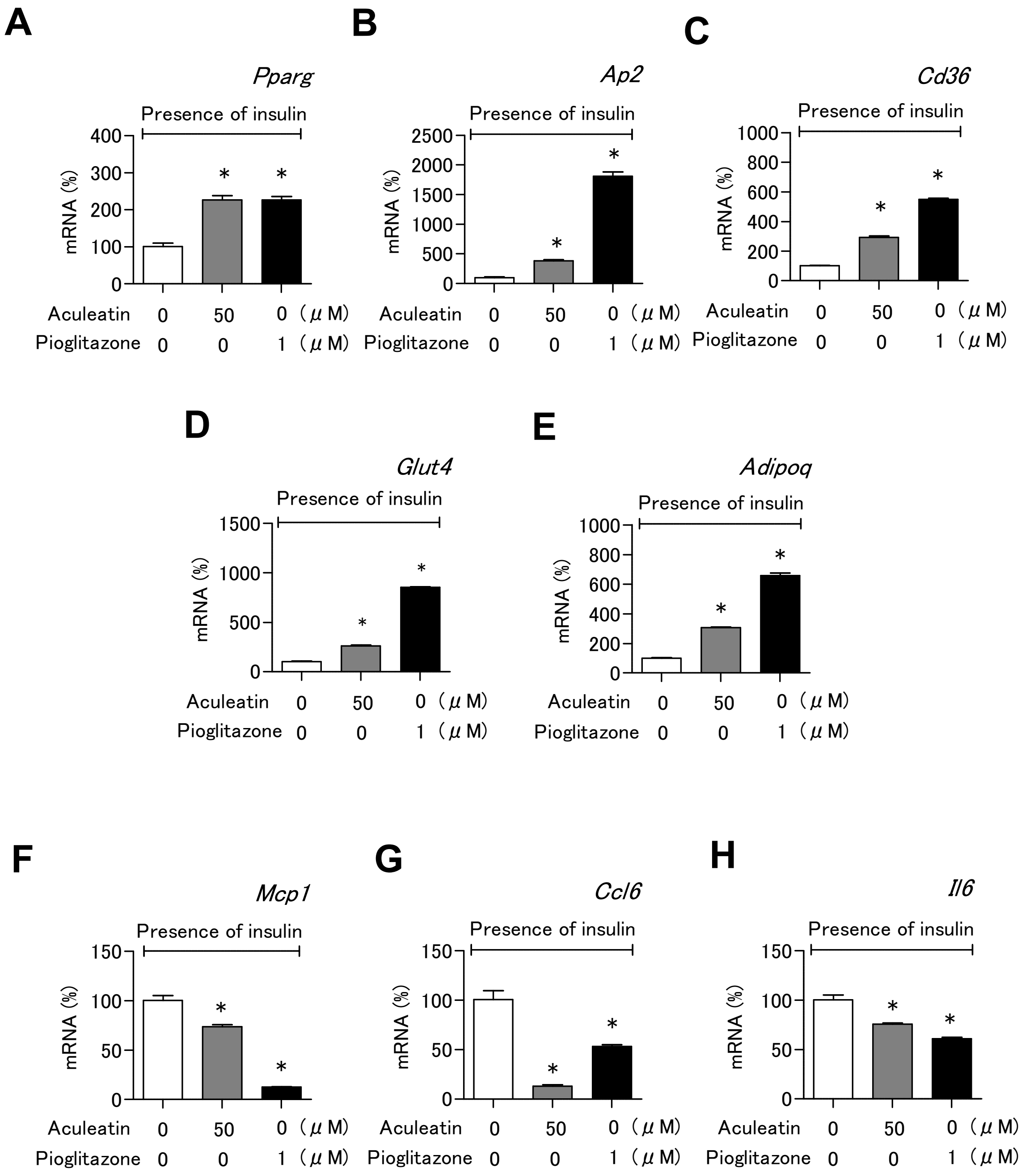


Fig. 2-2 Effects of aculeatin and Pio on mRNA expression ((A) *Pparg*, (B) *Ap2*, (C) *Cd36*, (D) *Glut4*, (E) *Adipoq*, (F) *Mcp1*, (G) *Ccl6*, and (H) *Il6*) related to adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Values are expressed as means ± SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with the control in the presence of insulin.

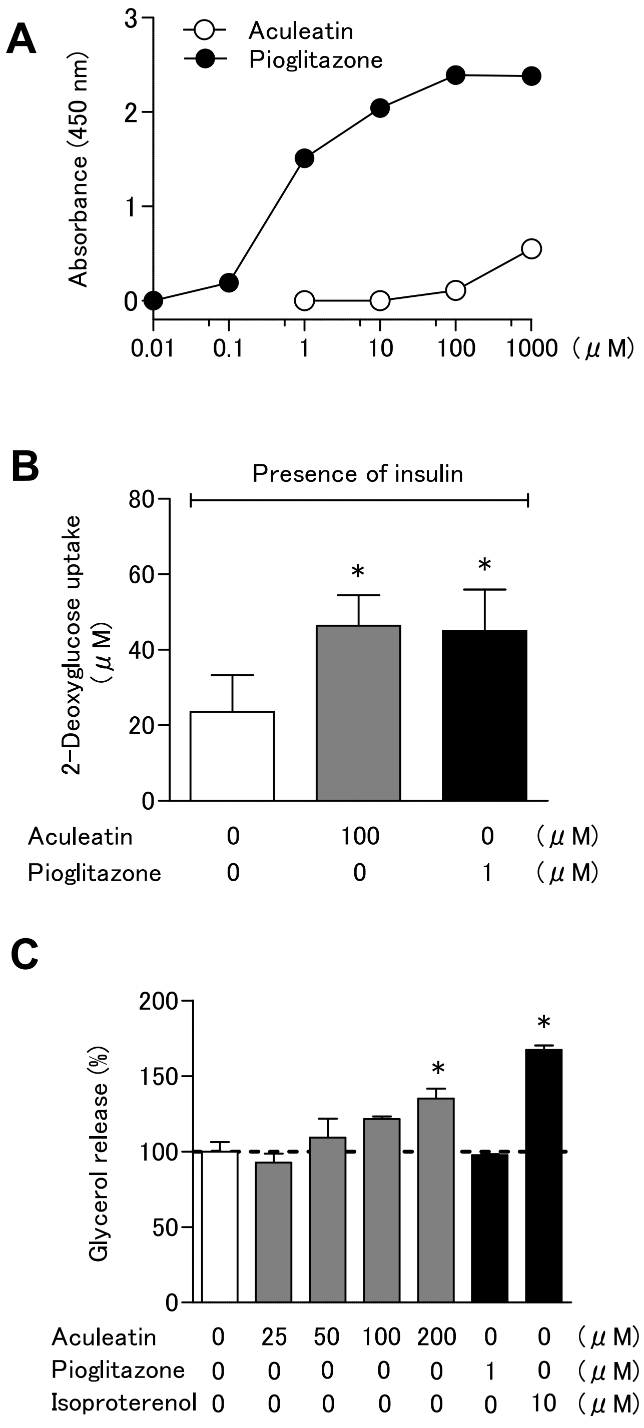


Fig. 2-3 (A) Effect of aculeatin on PPAR-γ ligand activity. (B) Effect of aculeatin on insulin-stimulated glucose uptake in mature 3T3-L1 adipocytes. * $P < 0.05$ compared with the control in the presence of insulin. (C) Effect of aculeatin on lipolysis in mature 3T3-L1 adipocytes. Analysis of PPAR-γ ligand activity was performed in duplicate. For the other data, values are expressed as means ± SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with the non-treatment control.

第２章　小括

　サルカケミカンから単離したaculeatinが脂肪細胞に及ぼす影響を調べたところ、aculeatinは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導を顕著に促進した。遺伝子発現解析の結果、*Ap2*、*Glut4*、*Adipoq*など脂肪細胞分化マーカーの発現上昇、*Ccl2*、*Il6*などの炎症関連遺伝子の減少が確認された。また、aculeatinで刺激した成熟脂肪細胞において2-デオキシグルコースの取り込み量が有意に上昇し、糖取り込み促進効果が認められた。さらに、aculeatinで刺激した成熟脂肪細胞において有意な脂肪分解促進効果を示した。したがって、aculeatinに脂肪前駆細胞の分化を促進する効果、インスリン存在下で血糖値の取り込みを促進する効果、成熟脂肪細胞において脂肪分解促進する効果が認められた。これらの結果から、aculeatinは脂肪前駆細胞の分化を促進して糖取り込みを促進するだけでなく、脂肪分解促進効果もあることから、ピオグリタンなどの薬剤に見られるような体重増加の副作用が少ないことが期待できる。同様な効果を有する化合物として、メトキシフラボン類であるノビレチンがある。近年、斎藤らがノビレチンの脂肪蓄積促進効果及び脂肪分解促進効果を報告している[41]。また、Leeらはノビレチンが、動物試験において高血糖及びインスリン抵抗性を改善することを示している[42, 43]。ノビレチンと同様の作用を有するaculeatinも脂質異常症ならびに糖尿病の治療に有用であると考えられた。

第３章　糖尿病モデル **KK-A^{y}** マウスを用いた **aculeatin** の血糖値上昇抑制評価

緒言

3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた実験系で、aculeatin に脂肪前駆細胞の分化を促進する効果、インスリン存在下で血糖値の取り込みを促進する効果、成熟脂肪細胞において脂肪分解促進する効果が認められた。aculeatin は、実験動物においても同様の効果があると考えられた。そこで、**KK-A^{y}** マウス（高血糖・糖尿病モデルマウス）を用いた動物試験を実施することとした。**KK-A^{y}** マウスは、インシュリン非依存型のⅡ型を自然発症する糖尿病モデルマウスであり、肥満遺伝子の導入により、早期から高血糖を発症するのが特徴である[44, 45]。本章では高血糖・糖尿病モデル **KK-A^{y}** マウスを用いて aculeatin の長期摂取が血糖値に与える影響を検討することを目的とした。

3-1-1 目的

第２章で報告したように aculeatin は 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた実験系で、aculeatin に脂肪前駆細胞の分化を促進する効果、インスリン存在下で血糖値の取り込みを促進する効果を有し、血糖値抑制効果が期待できる素材である事が分かった。そして、aculeatin には脂肪分解促進効果もある事から、ピオグリタンなどの薬剤に見られるような体重増加の副作用が少ないことも期待できる。そこで、高血糖・糖尿病モデルマウスを用いた動物試験を実施することとした。実験動物は 5 週齢の KK-A^y マウスを購入し、ピオグリダゾンまたは aculeatin を含んだ飼料を長期間自由摂食させることで、高血糖改善効果を検討することを目的とした。

3-1-2 方法

3-1-2-1　動物及び飼育方法（血糖値上昇抑制試験）

実験動物は 5 週齢の KK-A^y マウスを日本クレアより購入し、1 週間の予備飼育後、摂餌量調査を行った後、実験に供した。彩都バイオインキュベーター（大阪）動物舎のクリーンな条件下で飼育し、7～8 匹ずつ 4 群に分けた。全飼育期間において各マウスの陰性対照群（コントロール群）には CE-2 粉末飼料を、陽性対照群には 0.01% ピオグリダゾンを、試験群には 0.05% または 0.1% aculeatin を自由摂食で投与した。なお、aculeatin の投与量は、C57BL/6J マウスを用いた OECD 急性経口毒性試験（固定用量法）に準拠して実施した急性経口毒性試験より、IC50 が 300 mg/kg 以上 2,000 mg/kg 未満との結果を得たことに基づき、投与量に問題がないことを確認した上で設定した。飼育期間は 42 日間とし、1 日に 1 度、体重測定、摂餌量測定及び摂水量測定を行った。絶食時の血糖値は 0、3、4、5 週目に 1 晩絶食後に測定を行った。試験開始から 25 日目に、一晩絶食させた後、グルコース負荷試験を行った。試験開始から 42 日間後にペントバルビタール麻酔下で剖検を行った。全ての動物実験は「一般財団法人 日本食品分析センター動物実験規定」に従って実施した。

3-1-2-2　解剖及び採取試料の処理

試験期間終了後、心臓から採血し、肝臓、腎臓、膵臓、腎周囲白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織及び精巣周囲白色脂肪組織を採取し、重量を測定した。ヘパリン処理チューブに採取した血液は、遠心分離（4℃、3,000rpm、20 分間）して、血漿を得て、血液サンプルとした。採取した臓器は速やかに重量を測定し、冷凍した。

3-1-2-3　血漿の脂質パラメーター及び生理活性物質の測定

脂質代謝に与える影響を知るために、血漿の脂質パラメーターの測定を実施した。血糖値の測定はアキュチェックアビバ（Roshe Diagnostics, Tokyo, Japan）を用いた。トリアシルグリセロール（TG）濃度はトリグリセライド E-テストワコー（Wako）、総コレステロール（TC）はコレステロール E-テストワコー（Wako）、遊離脂肪酸（FFA）は NEFA C-テストワコー（Wako）を用い、付属の説明書に従って測定した。生理活性物質であるインスリンは Mouse Insulin ELISA Kit（Shibayagi, Gunma, Japan）を用い、付属の説明書に従って測定した。

3-1-2-4　空腹時血糖値の測定

2 週間に 1 度、絶食させ空腹時血糖を測定した。血糖値の測定にはアキュチェックアビバを用いた。

3-1-2-5　グルコース負荷試験

試験開始から 25 日目に、 1 晩絶食させた後、グルコースを 1,000 mg/kg の用量で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与前並びに投与後 30、60 及び 120 分に尾静脈より採血を行い、血糖値測定を行った。

3-1-2-6　統計処理

値は平均値±標準誤差（n = 7-8）で示した。1-1-2-4 と同様の統計処理を行った。

3-1-3 結果

3-1-3-1　体重、餌量及び摂水量の変動（Table. 3-1）

試験期間を通じて、体重については 0.01% ピオグリタゾン投与群において有意な増加が見られた。一方、0.1% aculeatin 投与群において有意差はなかったが体重増加の傾向は見られた。摂餌量では、0.01% ピオグリタゾン投与群において有意な増加が見られた。摂水量では、0.05% aculeatin 投与群において有意な増加が見られた。

3-1-3-2　臓器重量の測定（Table. 3-2）

採取した臓器重量を測定し、体重 100 g 当たりに補正して評価したところ、肝臓については 0.01% ピオグリタゾン投与群において有意な増加が見られ、剖検時の所見から脂肪肝になっていることが確認された。腎臓については 0.01% ピオグリタゾン投与群及び 0.1% aculeatin 投与群において有意な減少が見られた。

3-1-3-3　血漿パラメーターの測定（Table. 3-3）

血漿パラメーターを測定したところ、血糖値で 0.01% ピオグリタゾン投与群、0.05% aculeatin 投与群、0.1% aculeatin 投与群においてコントロール群と比較して有意な減少が見られた。

3-1-3-4　空腹時血糖値の測定

試験開始から 3 週目まではいずれの群においても血糖値は 120 mg/dL 前後であり、各群間に差は見られなかったが、4 週目より血糖値が上昇し、5 週目に 0.1% aculeatin 投与群がコントロール群と比較して血糖値が有意な減少を示した（**Fig. 3-1**）。

3-1-3-5　グルコース負荷試験

グルコース経口投与から 60 分後において、0.1% aculeatin 投与群がコントロール群と比較して有意に血糖値が低下した。一方、ピオグリタゾン群には有意差は見られなかった（**Fig. 3-2**）。

3-1-3-6　インスリン抵抗性の評価

血糖値とインスリン値から下式であらわされるインスリン抵抗性の指標とされる HOMA-IR（homeostasis model assessment insulin resistane index）値を算出したところ[46]、0.01% ピオグリタゾン投与群及び 0.05% aculeatin 投与群で有意な HOMA-IR 値の低下が認められた（**Fig. 3-3**）。

HOMA - IR = 空腹時血糖（mg/dL）× 空腹時インスリン値（μU/mL）/ 405

3-1-4 考察

肥満・糖尿病モデルマウスである KK-A^y マウスに aculeatin 及びピオグリタゾンを投与したところ、0.01% ピオグリタゾン投与群において有意な体重増加が見られた。aculeatin 投与群では、有意差はつかないものの体重上昇と脂肪組織重量の上昇傾向が見られた。これは血中のグルコースが脂肪細胞に取り込まれているためだと考えられた。腎臓については 0.01% ピオグリタゾン投与群及び 0.1% aculeatin に有意な減少が見られたが、全ての群で腎臓そのものの重量には差がなかった。組織重量は 100 g 当たりに補正しており、0.01% ピオグリタゾン投与群及び 0.1% aculeatin で体重増加が起こった為、重量に変動の無かった腎臓に付いた有意差であると考えられた。摂餌量において、0.01% ピオグリタゾン投与群において有意な増加が見られた。また、摂水量において、0.05% aculeatin 投与群において有意な増加が見られた。これらの摂餌量及び摂水量における有意差については不明である。空腹時血糖は、試験開始から 5 週目において、aculeatin に有意な血糖値の上昇抑制効果が認められた。糖尿病を発症する前から aculeatin を投与していることから、aculeatin には糖尿病の発症を遅らせる効果があると考えられた。グルコース負荷試験において aculeatin に血糖値の上昇抑制

効果が認められた。これらのことから aculeatin は血糖値上昇抑制効果を有することが明らかとなった。インスリン抵抗性の指標とされる HOMA-IR 値においても aculeatin に有意差が認められたため、インシュリン抵抗性を緩和していることが示唆された。一方、ピオグリタゾンは PPAR-γ の強力なアゴニストとして知られており[11, 12]、副作用として体重増加などが報告されている[13, 14]。本実験でも体重増加が見られた。一方、ピオグリタゾンは耐糖能を改善する効果が報告されているが[47]、本実験では改善効果を示さなかった。また、ピオグリタゾンはⅡ型糖尿病患者の脂肪肝を改善させるという報告もあるが[48]、今回の結果では脂肪肝が増悪していた。このことは長野らも報告しているように、投与量、種差、性差または摂餌期間の違いによるものだと考えられた[49]。

これらの結果から、aculeatin は血糖値抑制作用を有し、ピオグリタンなどの薬剤に見られるような体重増加の副作用が少ないことが示された。よって、aculeatin は糖尿病の改善・予防に有効であることが明らかとなった。

Table. 3-1 Body weight, daily diet intake and water intake for 42 days

	Control	0.01% Pioglitazone	0.05% Aculeatin	0.1% Aculeatin
Initial body weight (g)	24.8 ± 0.5	24.2 ± 0.6	24.5 ± 0.5	25.2 ± 0.6
Final body weight (g)	41.2 ± 1.4	45.3 ± 1.1 *	40.6 ± 0.8	43.4 ± 0.7
Dayly diet intake (g)	5.6 ± 0.1	6.1 ± 0.1 *	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1
Daily water intake (g)	11.2 ± 0.4	10.4 ± 0.3	12.9 ± 0.4 *	10.7 ± 0.4

Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P <0.05 compared with the control.

Table. 3-2 Body weight and organ weight for 42 days

	Control	0.01% Pioglitazone	0.05% Aculeatin	0.1% Aculeatin
Body weight (g)	41.2 ± 1.4	45.3 ± 1.1 *	40.6 ± 0.8	43.4 ± 0.7
Liver weight (g/100g body weight)	4.19 ± 0.16	4.92 ± 0.13 *	4.44 ± 0.10	4.38 ± 0.12
Kidney weight (g/100g body weight)	1.42 ± 0.03	1.28 ± 0.04 *	1.42 ± 0.03	1.28 ± 0.03 *
Pancreas weight (g/100g body weight)	0.78 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.05	0.66 ± 0.05
Mesenteric white adipose tissue weight (g/100g body weight)	1.81 ± 0.13	1.58 ± 0.09	1.82 ± 0.13	1.99 ± 0.16
Perinephric white adipose tissue weight (g/100g body weight)	1.36 ± 0.09	1.35 ± 0.10	1.16 ± 0.15	1.39 ± 0.13
Testicular white adipose tissue weight (g/100g body weight)	3.71 ± 0.14	3.23 ± 0.20	3.53 ± 0.21	3.83 ± 0.23

Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P <0.05 compared with the control.

Table. 3-3 Plasma lipid composition, glucose and insulin for 42 days

	Control	0.01% Pioglitazone	0.05% Aculeatin	0.1% Aculeatin
Troglyceride (mg/dL)	1.10 ± 0.16	1.25 ± 0.15	1.28 ± 0.11	1.49 ± 0.10
Total cholesterol (mg/dL)	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Feee Fatty Acid (mEq/L)	0.60 ± 0.06	0.63 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.69 ± 0.07
Glucose (mg/dL)	168.7 ± 9.2	128.0 ± 6.8 *	124.4 ± 7.5 *	128.3 ± 5.9 *
Insulin (ng/mL)	1.58 ± 0.19	1.14 ± 0.23	1.25 ± 0.20	1.50 ± 0.18

Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P <0.05 compared with the control.

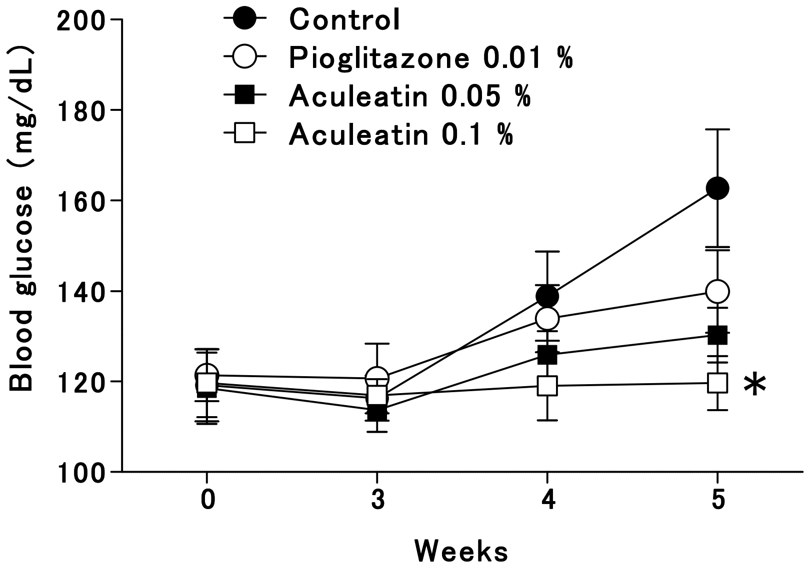


Fig. 3-1 Effects of aculeatin on fasting blood glucose levels in KK-A^y mice. Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P < 0.05 compared with the control.

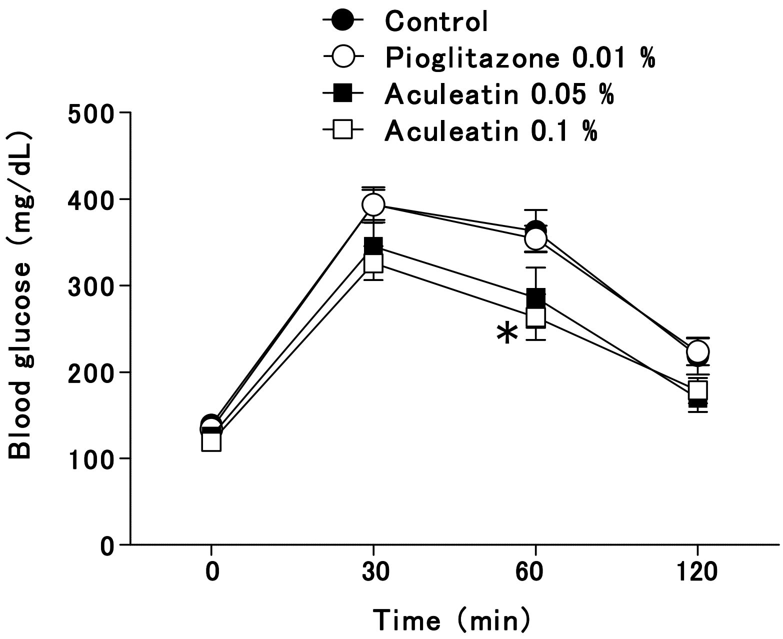


Fig. 3-2 Effects of aculeatin on glucose tolerance test in KK-A^y mice. Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P < 0.05 compared with the control.

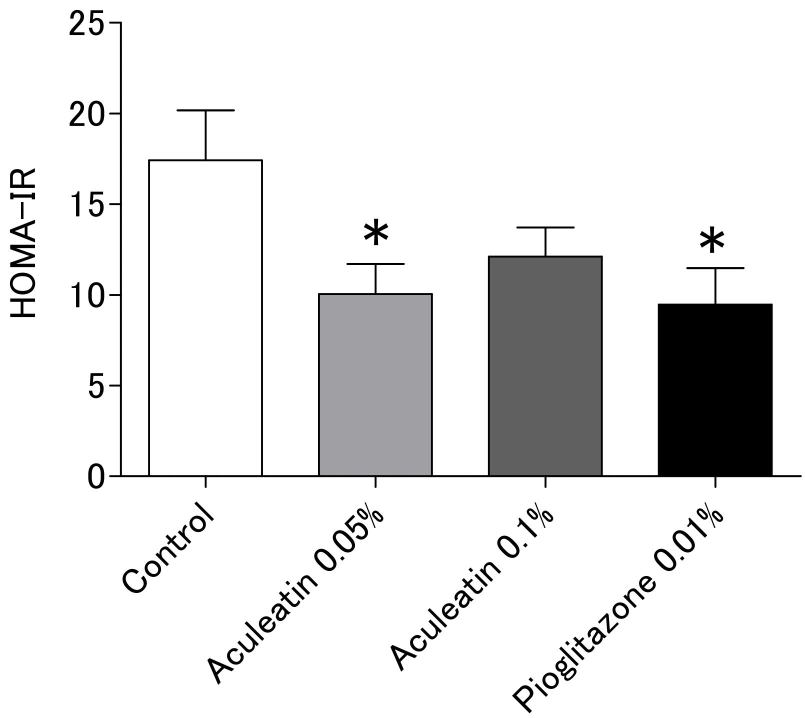


Fig. 3-3 Effect of aculeatin on HOMA-IR in KK-A^y mice. Values are expressed as means ± SEM (n = 7-8). *P < 0.05 compared with the control.

第３章 小括

第１章、第２章の 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた *In Vitro* 実験系において、aculeatin に脂肪前駆細胞の分化を促進する効果、インスリン存在下で血糖値の取り込みを促進する効果、成熟脂肪細胞において脂肪分解促進する効果が認められた。実験動物においても同様の効果があると考えられた。そこで、**KK-A^{y}** マウス（高血糖・糖尿病モデルマウス）を用い、aculeatin の長期摂取が血糖値に与える影響を検討した。KK-A^{y} マウスに aculeatin 及びピオグリタゾンを投与したところ、aculeatin 投与群では、有意差はつかないものの体重上昇と脂肪組織重量の上昇傾向が見られた。これは血中のグルコースが脂肪細胞に取り込まれているためだと考えられた。また、試験開始から 5 週目における空腹時血糖において、aculeatin に有意な空腹時血糖値の抑制効果が認めら、糖尿病を発症する前から aculeatin を投与していることから、aculeatin には糖尿病の発症を遅らせる効果が認められた。グルコース負荷試験において aculeatin に血糖値上昇抑制効果が認められた。これらのことから aculeatin は糖尿病の発症を遅らせ、血糖値上昇を抑制する効果を有することが明らかとなった。また、インスリン抵抗性の指標とされる HOMA-IR 値において aculeatin に有意差が認められ、インシュリン抵抗性を緩和していることが示唆された。現在のところ、aculeatin が示すグルコース取り込み促進作用について、細胞内でどのようなメカニズムによって行われているか不明だが、3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた実験と同様に、グルコーストランスポーターを介したグルコース取り込みを促進していると考えられた。

これらの結果から、aculeatin には血糖値抑制作用を有し、ピオグリタンなどの薬剤に見られるような体重増加の副作用が少ないことが明らかとなった。よって、aculeatin は糖尿病の改善・予防に有効な化合物であると考えられる。aculeatin の持つ抗糖尿病作用について、遺伝子レベル及び分子レベルでどのように関与しているのか明らかにすることは今後の検討課題である。

第４章　サルカケミカンから単離した toddaculin の抗骨粗鬆症作用

緒言

骨組織は、成長が終わった後も常に古い骨組織が吸収され、新しい骨が形成されるという過程が繰り返される。これを骨リモデリング（骨再構築）と言う[50]。この骨吸収と骨形成を主に担っているのが破骨細胞及び骨芽細胞であり、この両者のバランスの崩壊が骨粗鬆症などの様々な骨代謝疾患の原因になると考えられている[17 - 20]。よって骨形成が骨吸収を下回らないことが骨量の維持や増強に重要である。骨量の維持・増強には運動が有効であるが[51]、負荷のかかる運動を高齢者に課すのは難しい。そのため、骨吸収率を減少させる骨吸収抑制作用を有し、骨形成率を高める骨形成促進作用を有する化合物が得られれば、骨粗鬆症に有効である。従来では、ビタミン D、ビタミン K、カルシトニン、エストロゲンなどの薬剤が臨床応用されてきたが、これらによる治療法は充分とはいえず、より優れた治療薬が求められている[52 - 54]。破骨前駆細胞は Receptor activator of nuclear factor kappa B（NF-κB）ligand（RANKL）刺激により、破骨細胞に分化し[55]、その活性化には NF-κB の転写活性が関わっていることが知られている[56]。中村らはリポポリサッカライドで炎症誘導した RAW264 細胞において、toddaculin（**Fig. 4.1A**）が抗炎症作用を有することを報告しており[57]、Vazquez らは toddaculin が U-937 細胞で ERK 1/2（extracellular signal-regulated kinases 1 and 2）mitogen-activated protein kinase（MAPK）のリン酸化を抑制することを報告している[58]。また、河野らは ERK 1/2 は、骨基質石灰化の負の調節因子であることを報告している[59]。これらの研究を考慮すると、toddaculin は過剰な破骨細胞活性を抑制するだけでなく、骨芽細胞の分化誘導及び石灰化を増強する可能性が考えられる。しかし､骨関連疾患に対する toddaculin の効果についてこれまでに報告はない。そこで、RAW264 細胞および MC3T3-E1 細胞を用い、toddaculin が骨吸収阻害作用及び骨形成促進作用を有しているかどうかを調べるため、本研究を実施した。

第１節　toddaculin が RAW264 細胞の破骨細胞分化に及ぼす影響

4-1-1　目的

破骨細胞の分化を制御する因子の 1 つに RANKL がある[60]。RAW264 細胞は、通常培養条件下においては単球細胞様の形態を示すが、RANKL 刺激を与えることにより、多核細胞を形成しながら、効率的に破骨細胞へと分化する事が知られている[55, 56]。成熟破骨細胞へと分化が促進すると、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）、カテプシン K、またカルシトニン受容体などといった破骨細胞特異的遺伝子の発現が誘導される[60 - 62]。破骨細胞の分化マーカーの 1 つである TRAP 活性を測定することで、化合物による骨吸収抑制作用を評価することが可能である[63 - 65]。まず、RANKL 刺激した RAW264 細胞における toddaculin の影響を、分化マーカーである TRAP 活性を測定することで評価する。次に、DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR 法により、遺伝子発現解析及びレポータージーンアッセイにより NF-κB 転写活性抑制作用を測定する。最後に、ウェスタンブロッティング法により、MAPK リン酸化パスウェイを解析し、作用メカニズムを解明することを目的とした。

4-1-2　方法

4-1-2-1　試薬成分

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 は RIKEN BRC（Ibaraki, Japan）から購入した。Albumin from bovine serum （BSA）、Hanks' Balanced Salt Solution（HBSS）、Minimum Essential Medium Eagle α（α-MEM)、Phosphate Buffered Saline（PBS）、Triton X-100 及びペニシリン-ストレプトマイシン溶液は Sigma-Aldrich から購入した。牛胎児血清（FBS）、0.25% Trypsin-EDTA、Opti-MeM 培地及び GlutaMAX は Life Technologies Japan から購入した。Mouse RANK Ligand, Soluble Recombinant （RANKL）は R&D Systems（Minneapolis, USA）より購入した。1M Tris-HCl（pH 7.5）は Nippon Gene（Tokyo, Japan）、TRACP/ALP assay kit は Takara

Bio より購入した。水酸化ナトリウムは Wako Pure Chemical より購入した。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

4-1-2-2　細胞培養

細胞はフリーザーストックから解凍後、培地（10% FBS、1% GlutaMAX 及び 1 % Pen/Str を含む α-MEM 培地）に懸濁し、1,000 rpm で 2 分遠心した。上清を除いた後、細胞ペレットに培地 5 mL を加え、細胞数をカウントした。次に、細胞濃度が 5.0×10^4 細胞/mL となるよう調製した。**4-1-2-3** では、96 ウェルプレートに 100 µL/well で播種、**4-1-2-4** 及び **4-1-2-5** では、24 ウェルプレートに 0.5 mL/well で播種し、細胞試験に使用した。

4-1-2-3　細胞生存率評価試験

細胞増殖試験は Cell Counting Kit 8（Dojindo, Kumamoto, Japan）を用いて行った。生細胞中の脱水素還元酵素により生成される水溶性ホルマザンの色素量を吸光度で測定し、細胞増殖への影響を評価することが可能である。96 ウェルプレートに 100 µL/well で播種し、24 時間培養した後、各ウェルの培地を除去し、各ウェルに 10 µM RANKL からなる分化誘導剤と toddaculin が最終濃度 0 - 20 µM になるように調製した培地を 100 µL/well で添加し、破骨細胞への分化を誘導した。分化誘導から 48 時間後、各ウェルの培地を除去し、培地と Cell Counting Kit-8 を 10：1 で混合した Cell Counting Kit-8 を 110 µL 加え、37℃反応で 60 分間培養した後、マイクロプレートリーダーにより各ウェルの吸光度（450 / 650 nm)を測定し、未処置対象に対する細胞増殖率を求めた。

4-1-2-4　TRAP 活性測定

RAW 細胞に RANKL を添加すると、高い TRAP 活性を有する破骨細胞様に分化することが知られている[63 - 65]。TRACP/ALP assay kit（Takara Bio）を用いて、TRAP により生成される p-nitro-phenol（pNP）の量を吸光度で測定することで、TRAP 活性を評価し、骨吸収抑制作用を評価することが可能である。分化

誘導から 72 時間後、顕微鏡観察を行った。次いで、培地を抜き取り、生理食塩水で 2 回洗浄後、細胞溶解液を 1 mL 添加し、超音波処理することにより、細胞を溶解した。細胞溶解液を 10,000 rpm で 3 分間遠心した後、上清を 100 µL を 96 ウェルプレートに分注した。TRACP & ALP assay kit 付属の酸性フォスファターゼ基質を添加し、37℃で 60 分間反応させた。30 分経過後、0.5 M NaOH を 50 µL 添加することにより、反応を停止させ、TRAP 活性をプレートリーダーで測定し、未処置対象に対する TRAP 活性率を求めた。

4-1-2-5　Total RNA の抽出及び遺伝子発現解析

分化誘導から 48 時間経過した RAW264 細胞を、RNeasy Mini Kit を用いて Total RNA を抽出し、Biotin 標識 RNA を作製した後、DNA マイクロアレイ（Genopal Mouse Bone Metabolism Chip, Mitsubishi Rayon, Tokyo, Japan）で遺伝子解析を行った。DNA マイクロアレイ解析は単回しか行っていない。そこで、有意に変動した遺伝子を選択し、定量 RT-PCR 法による mRNA 発現量の測定を行った。cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix を使用し、mRNA 発現量の測定には Fast SYBR Green Master Mix を用いた StepOnePlus 装置リアルタイム PCR システムを使用した。プライマーは Takara Bio より *Trap*（MA148369）、*Oscar*（MA145726）、*Ctsk*（MA115288）、*Fols1*（MA102503）、*Mmp9*（MA031311）、*Hyal1*（MA127583）、*Pdgfb*（MA102465）及び *Actb*（MA050368）を購入した。補正には *Actb*（MA050368）を用いた。

PCR 条件は、2-1-2-3 と同様の条件で実施した。

4-1-2-6　Toddaculin の NF-κB 転写活性抑制試験

NF-κB は、免疫反応や炎症反応などに関与する種々の遺伝子を発現・制御することが知られている転写因子である[66]。RANKL は NF-κB に作用し、破骨細胞の活性化をすることが知られている[61]。NF-κB の転写活性を測定するため、RAW264 細胞を 3.0×10^5 細胞/ mL となるように調製し、これを 60 mm ディッシュに 5.0 mL/dish で播種し、37℃ 5% CO_2 存在下で 24 時間培養した。その後、各

ウェルの培地を除去し、pNFκB-Luc プラスミド（2.0 μg）及び pRL-SV40 プラスミド（0.5 μg）（Promega, Tokyo, Japan）を Lipofectamin LTX（Life Technologies Japan）を用いて、RAW264 細胞にトランスフェクションし、6 時間培養した。培地を抜き取り、5.0×10^6 細胞/mL となるよう調製した。これを 96 ウェルプレートに 100 μL/well で播種し、24 時間培養した。一晩培養した。翌日、各ウェルに 10 μM RANKL からなる分化誘導剤と toddaculin が最終濃度 0 - 20 μM になるように添加し、破骨細胞への分化を誘導した。6 時間培養後、Dual-Glo Luciferase Assay System 及び蛍光ルミノメーター（Promega）を用いて、ホタルのルシフェラーゼ活性で NF-κB の転写活性を、ウミシイタケのルシフェラーゼの活性を測定して遺伝子導入効率の補正を行った。試験操作はキット付属の取扱説明書に従って実施した。

4-1-2-7 Toddaculin の MAPK リン酸化パスウェイ解析

破骨細胞の活性化には NF-κB と別の経路として、MAPK リン酸化カスケードが知られている。特に、p38、ERK 1/2 及び c-Jun N-terminal protein kinase（JNK）の MAPK カスケードが破骨細胞の活性化に関与していることが知られている[61, 66]。そこで、RANKL 存在下において toddaculin で刺激した RAW264 細胞における MAPK リン酸化に与える影響をウェスタンブロッティング法にて解析した。

4-1-2-8 統計処理

1-1-2-4 と同様の統計処理を行った。

4-1-3　結果

4-1-3-1　toddaculin が細胞増殖に与える影響

toddaculin が細胞増殖に与える影響を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。未処置対象における生細胞数を 100%として toddaculin を処理した場合における各濃度の RAW 細胞の細胞増殖率を求めた。その結果、未処置対象と toddaculin

を処理したものでは、20 μM までの濃度では差が見られなかった（**Fig. 4.1B**）。

4-1-3-2　toddaculin が破骨細胞の TRAP 活性及び多核形成に与える影響

TRAP 活性測定において toddaculin を添加した場合、濃度依存的に TRAP 活性の低下が確認された（**Fig. 4.2A**）。顕微鏡観察により RANKL 刺激により未処置対象は多核細胞を形成したが、toddaculin を添加した場合では、多核細胞の形成阻害が認められた（**Fig. 4.2B**）。この結果は、toddaculin が破骨細胞への分化及び多核化を抑制していることを示している。

4-1-3-3　遺伝子発現解析結果

DNA マイクロアレイ解析により、RANKL 刺激により分化マーカーとして知られている *Trap*、*Oscar* 及び *Ctpk* などの遺伝子発現上昇が顕著であった。一方、toddaculin の添加によって、それらマーカー遺伝子の発現減少が認められた。さらに、定量 RT-PCR 法により、特徴的に上昇した遺伝子について遺伝子発現を測定したところ、それぞれ toddaculin 処理により濃度依存的に抑制していることが認められた（**Fig. 4.3**）。このことから破骨細胞への分化を遺伝子レベルで抑制していることが示唆された。

4-1-3-4　toddaculin が NF-κB 転写活性に与える影響

レポーターアッセイ法を用いて、toddaculin が NF-κB 転写活性に及ぼす影響を検討したところ、toddaculin に濃度依存的な NF-κB 転写活性抑制作用が認められた（**Fig. 4.4A**）。toddaculin は NF-κB 転写活性を減少させることで、破骨細胞への分化及び活性化を抑制していることが示唆された。

4-1-3-5　toddaculin が MAPKs リン酸化に与える影響

toddaculin が MAPKs リン酸化に与える影響を、ウェスタンブロッティング法により調べた。RANKL 刺激から 0.5、1、2、4 時間後のタンパクを回収してタンパク発現を調べたところ、RANKL 刺激により p38 及び ERK のリン酸化が

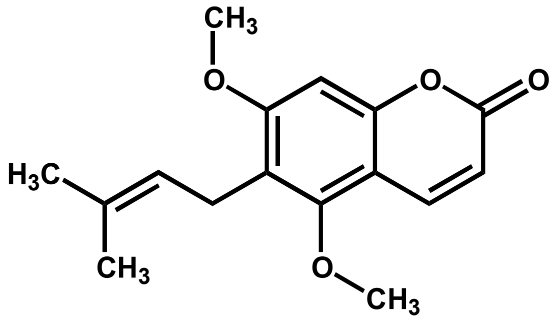
促進され、toddaculin 刺激によって p38 及び ERK のリン酸化を抑制する効果が認められた。一方、toddaculin の添加によって JNK のリン酸化の促進が確認された。これらの結果から、RANKL 刺激によって促進される p38 及び ERK 1/2 のリン酸化を toddaculin が抑制することにより、破骨細胞への分化及び活性化を抑制している事が示唆された。

4-1-4 考察

RAW264 細胞は RANKL 刺激を与えることにより、多核細胞を形成しながら、効率的に破骨細胞へと分化する[55, 56]。成熟破骨細胞へと分化が促進すると、破骨細胞特異的な TRAP、カテプシン K またカルシトニン受容体などの発現が誘導される[60 - 62]。破骨細胞の分化マーカーの 1 つである TRAP 活性を測定することで、化合物による骨吸収抑制作用を評価することが可能である[65]。そこで、RANKL 刺激した RAW264 細胞における toddaculin の影響を、TRAP 活性を測定することで評価したところ、濃度依存的な破骨細胞分化抑制作用が認められた。顕微鏡観察においても toddaculin に多核細胞形成の阻害作用が認められた。破骨細胞の分化マーカーとして *Trap*、*Oscar* 及び *Ctsk* など遺伝子が知られている[60-62]。そこで、DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR 法により、遺伝子発現解析を行ったところ、*Trap*、*Oscar* 及び *Ctsk* などの遺伝子群を特徴的に抑制していたことから、toddaculin は破骨細胞への分化及び活性化を遺伝子レベルで抑制していることが示唆された。RANKL による破骨細胞への分化及び活性化には NF-κB 及び MAPKs リン酸化カスケード（p38、ERK 1/2 及び JNK）が知られている[61, 67, 68]。NF-κB 転写活性及び MAPKs のリン酸化を調べたところ、toddaculin は NF-κB の転写活性を抑制し、さらに p38 及び ERK 1/2 のリン酸化を抑制していた。一方、JNK のリン酸化は促進していた。

これらの結果より、toddaculin は上流の NF-κB 転写活性及び MAPK リン酸化シグナル（p38 及び ERK 1/2）を抑制することにより、破骨細胞への分化及び活性化を抑制している可能性が示唆された。現在のところ、JNK リン酸化の促進については不明だが、今後の検討課題としたい。

A



B

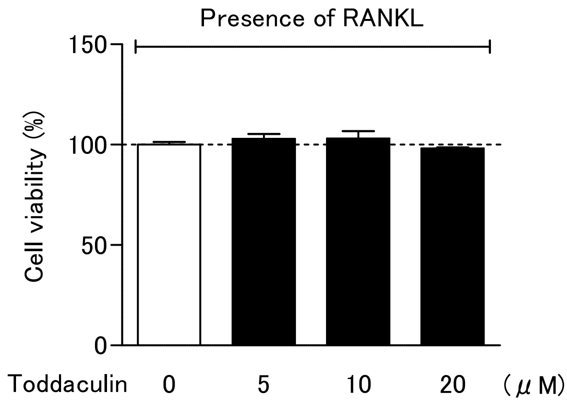
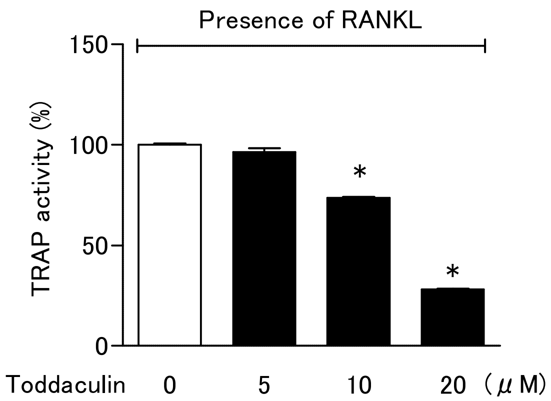


Fig. 4-1 Chemical structure of toddaculin (A) and its effects on cell proliferation in RANKL-induced RAW 264 cells (B). Values are expressed as means ± SEM (n = 3). * P < 0.05 compared with control.

A



B

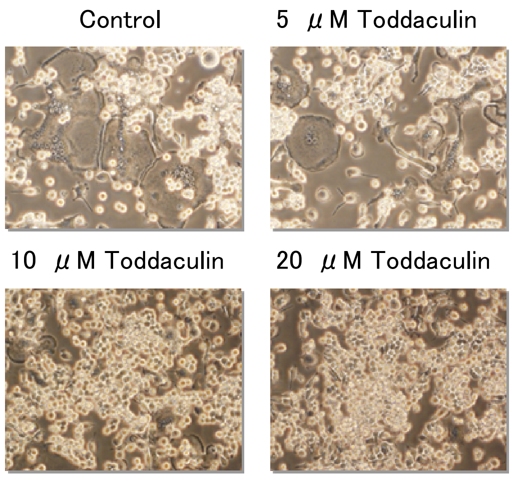


Fig. 4-2 Effect on TRAP activity in RANKL-induced RAW 264 cells (A). Light microscope analysis of osteoclast formation is shown in (B). Values are expressed as means ± SEM (n = 3). * $P < 0.05$ compared with control.

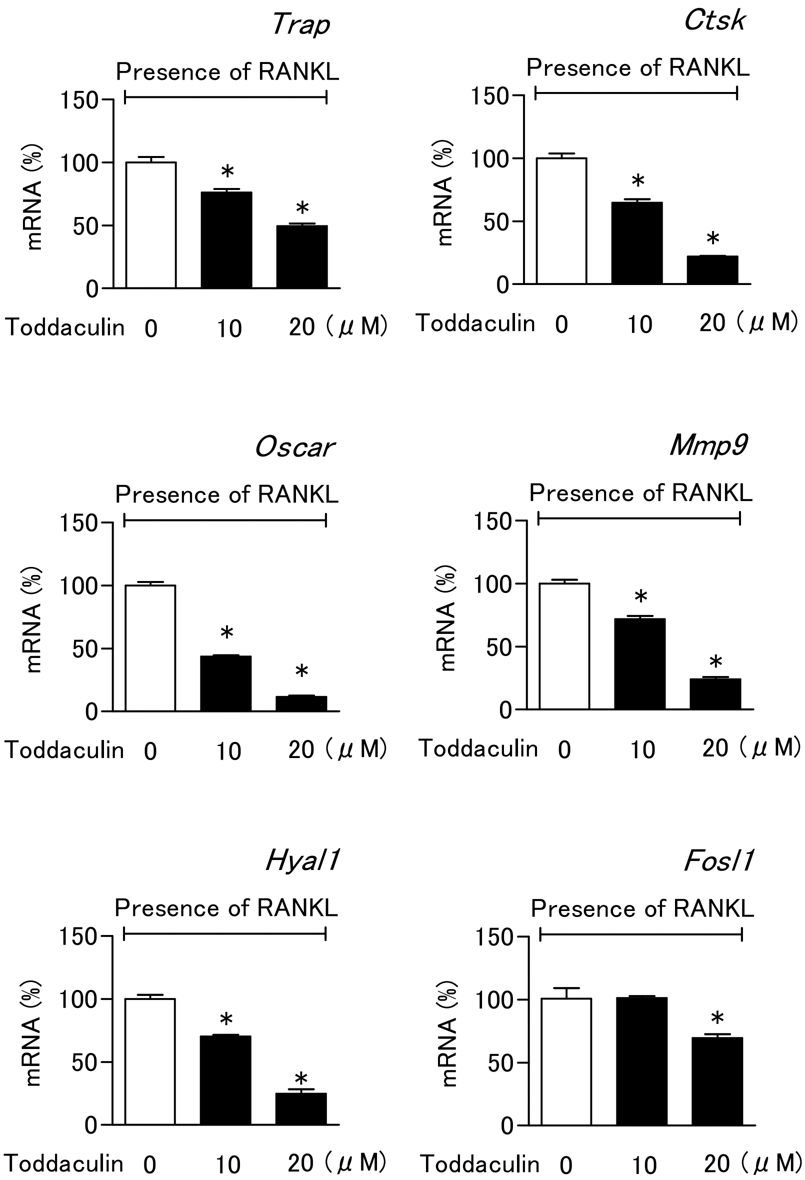


Fig. 4-3 Effect of toddaculin on mRNA expression of osteoclast-related genes (*Trap*, *Ctsk*, *Oscar*, *Mmp9*, *Hyal1*, and *Fosl1*) in RANKL-treated RAW 264 cells. Values are expressed as means ± SEM (n = 3). *$P < 0.05$ compared with control.

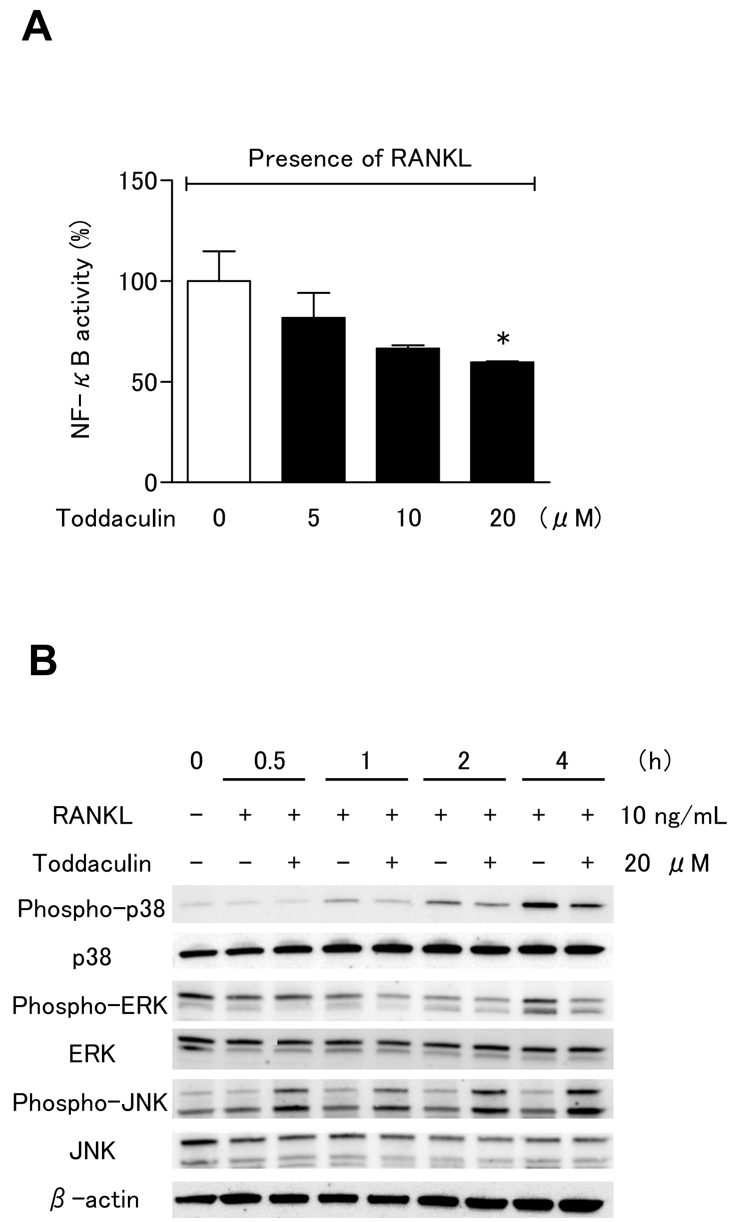


Fig. 4-4 Effect of toddaculin on RANKL-induced NF-κB activation (A) and MAPKs phosphorylation (B) in RAW 264 cells. Values are expressed as means ± SEM (n = 3). *P < 0.05 compared with control.

第２節　toddaculin が MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

4-2-1　目的

骨芽細胞は、間葉系幹細胞を起源とし、種々の転写因子（Runx2、osteocalcin 及び Osterix 等）の働きにより分化が決定され、成熟骨芽細胞へと成長する[69, 70]。骨芽細胞の分化成熟度を示すマーカーの 1 つにアルカリ性ホスファターゼ（ALP）がある[71]。ALP は骨芽細胞膜に結合して存在し、ヒドロキシアパタイト形成を阻害するピロリン酸の分解や、有機リン酸エステルを分解し、無機リン酸濃度を上げることにより、骨形成を促進する働きを持つ[72, 73]。骨芽細胞の分化マーカーの 1 つである ALP 活性を測定する。次に、DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR 法により、遺伝子発現解析を実施する。次に、長期間培養することでカルシウム沈着させ、アリザリンレッド染色によりカルシウム沈着による石灰化を確認し、骨形成促進効果を検討することを目的とする。

4-2-2　方法

4-2-2-1　試薬成分

マウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 は RIKEN BRC から購入した。アスコルビン酸及び β-グロセロフォスフェートは Wako Pure Chemical から購入した。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

4-2-2-2　細胞培養

MC3T3-E1 細胞は数週間、継代を続けてコンフルエントになった細胞を用いた。細胞をトリプシンで剥離後、培地（10% FBS、1% GlutaMAX 及び 1 % Pen/Str を含む α-MEM 培地）に懸濁し、1,000rpm で 2 分間遠心した。上清を除いた後、細胞ペレットに培地 5 ml を加え、細胞数をカウントした。次に、細胞濃度が 5.0 x 10^4 細胞/mL となるよう調製した。**4-2-2-3** では、96 ウェルプレートに 100 µL/well で播種、**4-2-2-4**、**4-2-2-5** 及び **4-2-2-6** は、24 ウェルプレートに 1.0 mL/well で播種し、細胞試験に使用した。

4-2-2-3　細胞生存率評価試験

細胞生存率評価試験は Cell Counting Kit-8 を用いて行った。96 ウェルプレートで 2 日間培養した後、各ウェルの培地を除去し、各ウェルに 50 µg/mL アスコルビン酸からなる分化誘導剤と toddaculin が最終濃度 0 - 40 µM になるように調製した培地を 100 µL/well で添加し、骨芽細胞への分化を誘導した。分化誘導から 2 日後、各ウェルの培地を除去し、培地と Cell Counting Kit-8 を 10:1 で混合した Cell Counting Kit-8 を 110 µL 加え、37℃反応で 60 分間培養した後、マイクロプレートリーダーにより各ウェルの吸光度（450 / 650 nm)を測定し、未処置対象に対する細胞増殖率を求めた。

4-2-2-4　ALP 活性測定

MC3T3-E1 細胞をコンフルエント状態で培養し、アスコルビン酸を加えることで骨芽細胞様に分化させることができる。TRACP & ALP assay kit を用いて、骨芽細胞分化マーカーの 1 つである ALP により生成された pNP（p-nitro-phenol）の量を吸光度で測定し、ALP 活性を評価することで骨形成促進作用を評価することが可能である[72]。96 ウェルプレートで 2 日間培養した後、各ウェルの培地を除去し、各ウェルに 50 µg/mL アスコルビン酸からなる分化誘導剤と toddaculin が最終濃度 0 - 40 µM になるように調製した試験培地を 1 mL/well で添加し、骨芽細胞への分化を誘導した。分化誘導から 2 日後、各ウェルの培地を除去し、再び各ウェルに 50 µg/mL アスコルビン酸からなる分化誘導剤と toddaculin が最終濃度 0 - 40 µM になるように調製した試験培地を 1 mL/well で添加した。次いで、培地を抜き取り、生理食塩水で 2 回洗浄後、細胞溶解液を 1 mL 添加し、超音波処理することにより、細胞を溶解した。細胞溶解液を 10,000 rpm で 3 分間遠心した後、上清を 100 µL を 96 ウェルプレートに分注した。TRACP & ALP assay kit 付属のアルカリ性フォスファターゼ基質を添加し、37 ℃で 30 分間反応させた。30 分経過後、ALP 活性をプレートリーダーで測定し、未処置対象に対する ALP 活性率を求めた。

4-2-2-5　Total RNA 回収及び遺伝子発現解析

分化誘導から 4 日間経過した MC3T3-E1 細胞を、TRIzol Reagent で溶解した後、RNeasy Mini Kit を用いて Total RNA を抽出し、Biotin 標識 RNA を作製した後、DNA マイクロアレイ（Genopal Mouse Bone Metabolism Chip, Mitsubishi Rayon, Tokyo, Japan）で遺伝子解析を行った。DNA マイクロアレイ解析は単回しか行っていない。そこで、有意に変動した遺伝子を選択し、定量 RT-PCR 法による mRNA 発現量の測定を行った。cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix を使用し、mRNA 発現量の測定には Fast SYBR Green Master Mix を用いた StepOnePlus 装置リアルタイム PCR システムを使用した。プライマーは Takara Bio より *Alp*（MA127137）を購入し、osteocalcin（*Bglap*）についてはカスタム合成（Forward - TCTCTGACCTCACAGATGCCAAG、Reverse - AGCGCCGGAGTCTGTTCACTA）（Takara Bio）した。補正には *Actb*（MA050368）を用いた。

PCR 条件は、2-1-2-3 と同様の条件で実施した。

4-2-2-6　MC3T3-E1 細胞におけるアリザリンレッド染色

MC3T3-E1 細胞をアスコルビン酸及び β-グロセロフォスフェートからなる分化誘導培地で 10 日間以上培養すると、細胞外マトリクスへのカルシウム沈着（石灰化）が認められるようになる[69]。この石灰化は、アリザリンレッド染色法によって、目視でも評価することが可能である。アリザリンレッドは、キレート反応によってカルシウムに吸着するため、石灰化が進んでいるほど、細胞は濃く染色される。MCT3-E1 細胞のアリザリンレッド染色は、以下の方法で行った。MC3T3-E1 細胞を用いて 5.0×10^4 細胞/mL となるよう調製し、これを 24 ウェルプレートに 1.0 ml/well で播種した。培養プレートは、各ウェルに 50 μg/mL アスコルビン酸及び 10 mM β-グロセロフォスフェートからなる分化誘導剤と toddaculin を最終濃度が 50 μM になるように添加した。以降、2～3 日おきに培地を交換し、14 日経過後に培地を抜き取り、HBSS で細胞を洗浄した後、エタノールで固定後、20 mmol/L アリザリンレッド染色（pH 4.8）液で石灰化マトリッ

クスを染色し、HBSS で洗浄した。染色後のプレートを顕微鏡にて観察した。プレート内のアリザリンレッド色素を、10 %セチルピリジニウムクロライドで溶解し、波長 562 nm の吸光を測定した。

4-2-2-7　統計処理

1-1-2-4 と同様の統計処理を行った。

4-2-3　結果

4-2-3-1　Toddaculin が MC3T3-E1 細胞の増殖に与える影響

Toddaculin が細胞増殖に与える影響を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。未処置対象における生細胞数を 100%として toddaculin を処理した場合における各濃度における MC3T3-E1 細胞の細胞増殖率を求めた。その結果、未処置対象と toddaculin を処理したものでは、40 μM までの濃度では差が見られなかった（**Fig. 4.5A**）。

4-2-3-2　Toddaculin が ALP 活性化に与える影響

ALP 活性測定の結果を **Fig. 4.5B** に示した。アスコルビン酸存在下で toddaculin を添加した場合、濃度依存的に ALP 活性の上昇が確認された。この結果は、toddaculin が骨芽細胞に分化している事を示している。

4-2-3-3　遺伝子発現解析結果

DNA マイクロアレイ解析により、骨芽細胞の分化マーカーとして知られている *Alp* 及び *Bglap* の遺伝子発現上昇が顕著であった。さらに、定量 RT-PCR 法により、特徴的に上昇した *Alp* 及び *Bglap* の遺伝子について遺伝子発現を測定したところ、濃度依存的に抑制していることが確認された（**Fig. 4.5C**）。このことから toddaculin は骨芽細胞への分化を遺伝子レベルで促進していることが示唆された。

4-2-3-4　toddaculin がカルシウム沈着による石灰化に与える影響

アスコルビン酸及び β-グロセロフォスフェート存在下で MC3T3-E1 細胞を toddaculin で刺激し、カルシウム沈着をアリザリンレッド染色法により評価したところ、濃度依存的なカルシウム沈着作用を示した（**Fig. 4.6A** 及び **B**）。

4-2-4 考察

骨芽細胞は、種々の因子（ALP、Osteocalcin、Runx2 及び Osterix 等）の働きにより成熟骨芽細胞へと成長する[69 - 71]。ALP は骨芽細胞の分化成熟度を示すマーカーの１つとして利用される[72]。MC3T3-E1 細胞はコンフルエント状態で培養し、アスコルビン酸を加えることで骨芽細胞様に分化させることができる。そこで、アスコルビン酸存在下で MC3T3-E1 細胞を toddaculin で刺激し、ALP 活性を評価したところ、toddaculin に濃度依存的な ALP 活性促進作用が認められた。DNA マイクロアレイ及び qRT-PCR 法により、遺伝子発現解析を行ったところ、*Alp* 及び *Bglap* の遺伝子を特徴的に促進していたことから、toddaculin は骨芽細胞への分化及び活性化を遺伝子レベルで促進している可能性が示唆された。最後に、アスコルビン酸及び β-グロセロフォスフェート存在下で MC3T3-E1 細胞を toddaculin で長期間刺激し、カルシウム沈着をアリザリンレッド染色法により評価したところ、40 μM toddaculin で強力なカルシウム沈着作用を示した。

本研究で、toddaculin は骨芽前駆細胞から骨芽細胞への分化を促進し、さらに細胞外マトリクスへの強力なカルシウム沈着作用を示した。これらの結果から toddaculin は骨形成を強く促進する作用を有することが明らかとなった。

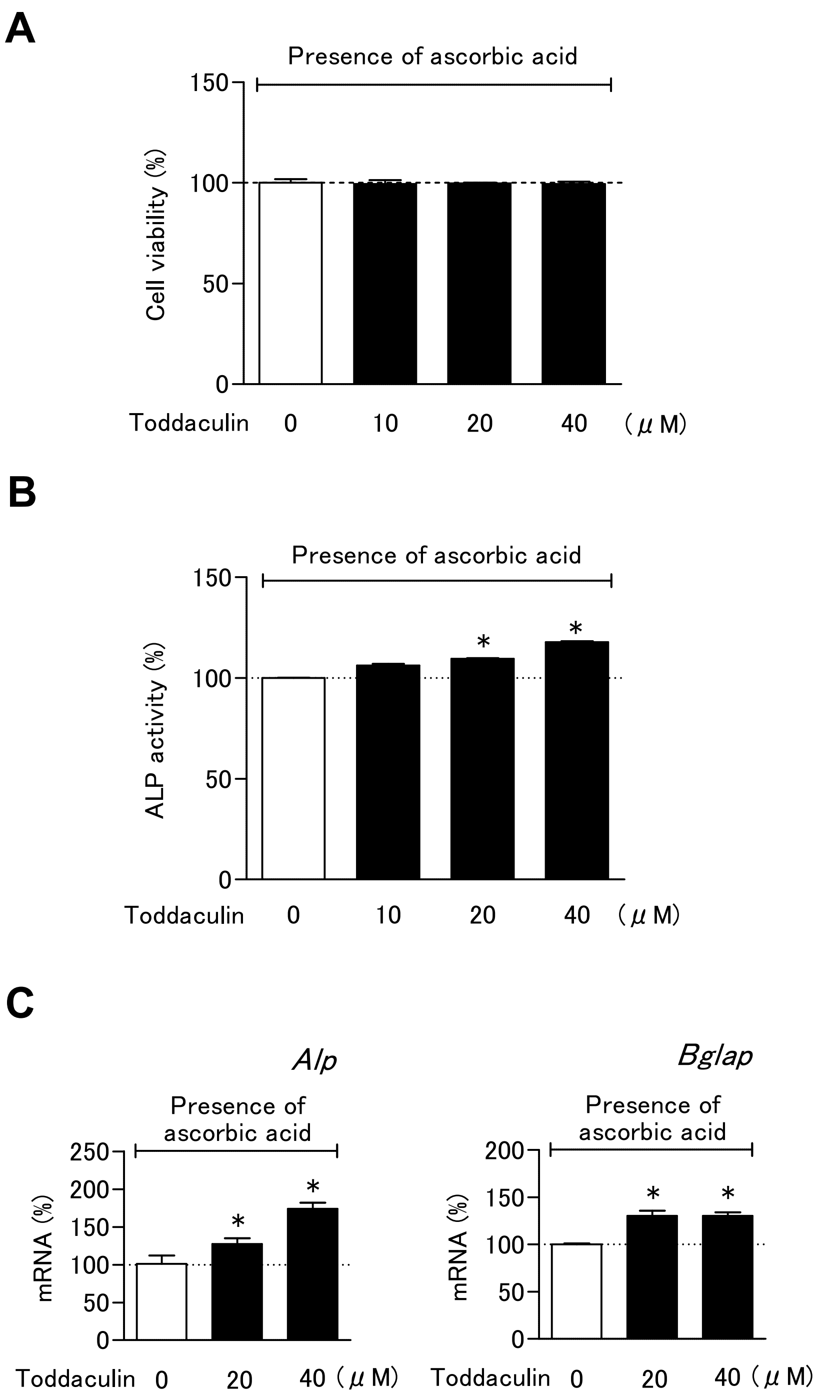


Fig. 4-5 Effects on cell proliferation (A), effect on ALP activity (B) and osteoblast-related genes (*Alp* and *Bglap*) (C) in ascorbic acid-treated MC3T3-E1 cells. Values are expressed as means ± SEM ($n = 3$). *$P < 0.05$ compared with control.

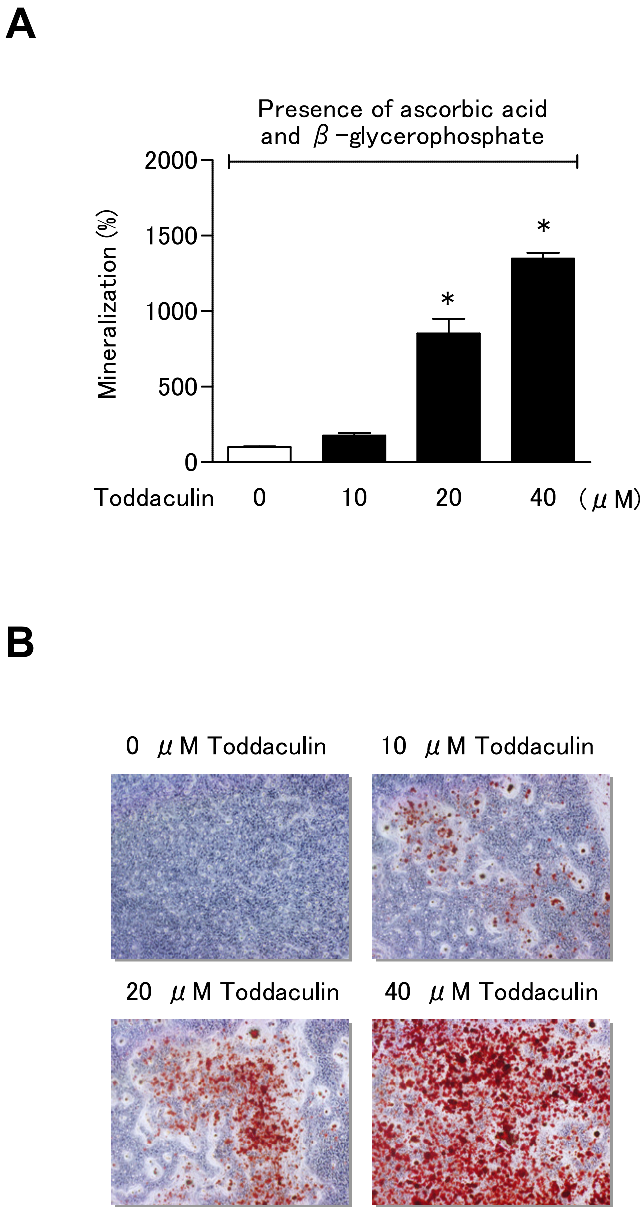


Fig. 4-6 Effect of toddaculin on osteoblast mineralization in ascorbic acid and β-glycerophosphate-treated MC3T3-E1 cells, which were evaluated by Alizarin red S staining (A) and light microscope analysis (B). Values are expressed as means ± SEM (n = 3). *$P < 0.05$ compared with control.

第４章 小括

サルカケミカンから単離したtoddaculinに濃度依存的なTRAP活性抑制作用が認められた。遺伝子発現解析の結果から分化マーカーとして知られている遺伝子群（*Trap*、*Ctsk* 及び *Oscar* など）を特徴的に抑制していたことから、toddaculinは破骨細胞への分化及び活性化を遺伝子レベルで抑制していることが確認された。さらにその上流におけるメカニズム解析として NF-κB 転写活性と MAPK リン酸化シグナルを調べたところ、toddaculin は NF-κB の転写活性を抑制し、さらに p38 及び ERK のリン酸化を抑制していたため、上流で破骨細胞への分化及び活性化を抑制していることが明らかとなった。

一方、toddaculin に濃度依存的な ALP 活性促進作用が認められた。遺伝子発現解析の結果から分化マーカーとして知られている *Alp* や *Bglap* の遺伝子を特徴的に促進していたことから、toddaculin は骨芽細胞へのの分化及び活性化を遺伝子レベルで促進していることが認められた。また、アスコルビン酸及び β-グロセロフォスフェート存在下で MC3T3-E1 細胞を toddaculin で長期間刺激し、アリザリンレッド染色法によりカルシウム沈着による石灰化を確認したところ、toddaculin は強力なカルシウム沈着作用を示した。

以上のことから、toddaculin は骨破壊を抑制し、さらに骨形成を促す優れた抗骨粗鬆症素材となりうることが示された。現在、動物試験での検討準備を進めているが、骨形成促進作用のメカニズムの解明はまだ一部分に過ぎない。今後、より詳細にメカニズム解析を進めていく必要がある。

総括

本博士論文の目的は、脂質代謝改善作用及び骨代謝改善作用を有する化合物を天然から単離し、新たな知見を得ることである。本研究では沖縄に自生しているサルカケミカンに着目し、機能性作用を有する化合物として aculeatin 及び todaculin を単離した。

サルカケミカンから単離した aculeatin には 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた実験で、脂肪前駆細胞の分化を促進する効果、インスリン存在下で血糖値の取り込みを促進する効果、そして成熟脂肪細胞において脂肪分解を促進する効果が認められた。また、実験動物 KK-Ay マウスを用いた血糖値上昇抑制試験を行ったところ、aculeatin に血糖値の上昇を抑制する効果が認められ、チアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンよりも体重増加が少なかった。よって aculeatin は糖尿病の改善・予防に有効であり、チアゾリジン系薬剤とは違った新たな糖尿病治療剤、インスリン改善剤となる可能性がある。本研究成果は脂肪蓄積促進剤として特許出願済である（特願 2014-163758）。また、サルカケミカンから単離した toddaculin に骨破壊を抑制し、骨形成を促進する効果が認められた。現在、骨粗鬆症の治療で使われる骨吸収を抑える薬剤は、骨形成まで抑制してしまうケースがあったが、toddaculin は、骨吸収をする破骨細胞を抑制し、骨形成に関わる骨芽細胞を増やすことができるため、結果として骨量増量が期待できる。toddaculin は、骨を作らせ、骨を壊させないという二通りの働きをする優れた抗骨粗鬆症薬剤として注目すべき化合物である（特願 2014-203374）。今後、動物試験を実施し、より深く知見を深めていく予定である。

本研究では、サルカケミカンから aculeatin 及び todaculin を単離することに成功し、aculeatin に抗糖尿病効果、toddaculin に骨代謝改善効果を有することを初めて見出した。そして、一部ではあるが、作用メカニズムを明らかにすることができた。生活習慣病の増加及び骨粗鬆症患者の増加は大きな社会問題である。これらの疾患に対し有効な化合物が得られたことは意義の大きい研究成果である。将来的に薬剤としてヒトに応用していくと共に、生活習慣病及び骨粗鬆症の発症メカニズムをより詳細に解明していきたいと考えている。

引用文献

[1] **津田謹輔, 清野 裕** (1998) 特集 生活習慣病としての糖尿病 食事との関連性. 糖尿病 **41:** 959-962

[2] **厚生統計協会** (2010) 人口動態. 2.死亡. 国民衛生の動向. **57:** 43-56

[3] **厚生労働省** 平成 24 年度国民・健康栄養調査.

[4] **糖尿病診断基準に関する調査検討委員会** (2010) 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病 **53:** 450-467

[5] **葛谷 健** (2000) 2 型糖尿病. 臨床薬理 **31:** 537-538

[6] **下村 裕子, 三家 登喜夫** (2001) 特集 2 型糖尿病成因の分子機構 インスリン抵抗性の遺伝子. 糖尿病 **44:** 307-308

[7] **小川 渉 (2001)** 特集 2 型糖尿病成因の分子機構 インスリン抵抗性の分子機構. 糖尿病 **44:** 303-305

[8] **Daniele G, Mendoza R G, Winnier D, Fiorentino T V, Pengou Z, Cornell J, Andreozzi F, Jenkinson C, Cersosimo E, Federici M, Tripathy D and Folli F** (2014) The inflammatory status score including IL-6, TNF-α, osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica.* **51:** 123-131

[9] **春日 雅人, 船曳 あゆみ, 森田 須美春** (1999) インスリン抵抗性の成因と治療. 日本内科学会雑誌 **88:** 1860-1864

[10] **岩本 安彦** (1998) 特集 経口糖尿病薬の最新情報 インスリン抵抗性改善剤. 糖尿病 **41:** 233-236

[11] **Yu J G, Javorschi S, Hevener A L, Kruszynska Y T, Norman R A, Sinha M and Olefsky J M** (2002) The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type diabetic subjects. *Diabetes* **51:** 2968-2974

[12] **山内 敏正, 門脇 孝** (2003) 特集 脂肪細胞とインスリン抵抗性 PPARγ. 糖尿病 **46:** 723-726

[13] **Lago R M, Singh P P and Nesto R W** (2007) Congestive heart failure and

cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomized clinic trials. *The Lancet* **370:** 1129–1136

[14] **Fonseca V** (2003) Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med*. **115:** 42-48

[15] **Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K and Akune T** (2009) Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J. Bone Miner. Metab.* **23:** 620-628.

[16] **骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会** 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版. ライフサイエンス出版

[17] **池田 恭治** (2008) 骨細胞と骨粗しょう症. 化学と生物 **46:** 786-790

[18] **Manolagas S C** (2000) Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews.* **21:** 115–137

[19] **Hikiji H, Ishii S, Shindou H, Takato T and Shimizu T** (2004) Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *J Clin Invest.* **114:** 85–93

[20] **Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nisikawa T and Koshihara T** (1997) A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis : synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **240:** 279-286

[21] **田代 安定** (1893) 八重山列島各屬島ノ植物 (續キ第二). 植物学雑誌 **82:** 380-386

[22] **Duraipandiyan V, Ayyanar M and Ignacimuthu S** (2006) Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC*

Complement Altern Med. **6:** 35

[23] **Duraipandiyan V and Ignacimuthu S** (2009) Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. *J Ethnopharmacol.* **123:** 494–498

[24] **Orwa J A, Jondiko I J O, Minja R J A and Bekunda M** (2008) The use of *Toddalia asiatica* (L) Lam. (Rutaceae) in traditional medicine practice in East Africa. *Journal of Ethnopharmacology* **115:** 257–262

[25] **Irudayaraj S S, Sunil C, Duraipandiyan V and Ignacimuthu S** (2012) Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in Streptozotocin induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. **143:** 515–523

[26] **藤井 淳子, 近藤 恭士, 山藤 知宏, 須田 尚子, 小林 広明, 青山 沙絵, 福島 光夫, 安田 浩一朗** (2011) 糖尿病患者における特定保健用食品の利用と食事療法への効果. 糖尿病 **54:** 837-841

[27] **Green H and Kehinde O** (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1:** 113–116

[28] **Green H and Meuth M** (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3:** 127–133

[29] **Green H and Kehinde O** (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5:** 19–27

[30] **石井永, 小林純一, 石川宗一, 萩庭丈寿, 石川勉** (1991) ミカン科植物成分の研究 (第 66 報) 沖縄産サルカケミカン, *Toddalia asiatica* (L.) LAM.(T. aculeata PERS.), の成分 その 1 根皮の成分. 藥學雜誌 **111:** 365-375

[31] **石井永, 丹昭治, 王建平, 陳益昇, 石川勉** (1991). ミカン科植物成分の研究 (第 67 報) 台湾産サルカケミカン, *Toddalia asiatica* (L.) LAM.(T. aculeata PERS.), の成分 超臨界流体並びにソックスレー抽出法を用いた含有クマリンの検討. Toddalolactone は真の天然産クマリンか? . 藥學雜誌 **111:** 376-385

[32] **Jain S C, Pandey M K, Upadhyay R K. Kumar R, Hundal G and Hundal M S** (2006). Alkaloids from *Toddalia aculeata*. *Phytochemistry* **67:** 1005-1010

[33] **Sharma P N, Shoeb A, Kapil R S, and Popli S P** (1981). Toddanol and toddanone, two coumarins from Toddalia asiatica. *Phytochemistry*, **20:** 335-336

[34] **Nyahanga T, Jondiko J I, Mangro L O A and Orwa J A** (2013) Antiplasmodial and larvicidal compounds of Toddalia asiatica root bark. *J. Chem Sci.* **125:** 1115-1121

[35] **春日雅人, 阪上浩, 森要之** (2003) 脂肪細胞分化の転写制御. 第 124 回日本医学会シンポジウム記録集 84-91

[36] **田守義和, Tamori, Y., 春日雅人, Kasuga M** (2005) PPAR-γ/peroxisome-proliferator-activated receptor-γ (PPARG). 生体の科学 **56:** 414-415

[37] **Matsuda H, Kogami Y, Nakamura S, Sugiyama T, Ueno T and Yoshikawa M** (2011) Structural requirements of flavonoids for the adipogenesis of 3T3-L1 cells *Bioorg Med Chem.* **19:** 2835–2841

[38] **蛯名 洋介** (1996) インスリンによる細胞内へのグルコース取り込み促進機構 インスリン反応性グルコーストランスポーターのトランスロケーション. 化学と生物 **34:** 11-12

[39] **Gokmen-Polar Y, Coronel E C, Bahouth S W and Fain J N** (1996) Insulin sensitizes beta-agonist and forskolin-stimulated lipolysis to inhibition by 2',5'-dideoxyadenosine. *Am J Physiol.* **270:** 562-569.

[40] **Hedberg A, Gerber J G, Nies A S, Wolfe B B, Molinoff P B** (1986) Effects of pindolol and propranolol on beta adrenergic receptors on human lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **239:** 117-123

[41] **Saito T, Abe D and Sekiya K** (2007) Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357:** 371–376

[42] **Lee Y S, Cha B Y, Saito K, Yamakawa H, Choi S S, Yamaguchia K, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K and Woo J T** (2010) Nobiletin improves hyperglycemia

and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice. *Biochem Pharmacol.* **79:** 1674–1683

[43] **Lee Y S, Cha B Y, Choi S S, Choi B K, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K and Woo J T** (2012) Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem.* **24:** 156–162

[44] **Iwatsuka M, Shino A and Suzuoki Z** (1970) General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol. Japan.* **17:** 23-35

[45] **武冨滋久** (2002) 肥満 2 型糖尿病モデル動物 肥満２型糖尿病モデル動物（KK マウスおよび Wistar fatty ラットなど）．日本臨床 **60:** 38-44

[46] **Matthews D R, Hosker J P, Rudenski A S, Naylor B A, Treacher D F and Turner R C** (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28:** 412-419

[47] **左右田隆，川松豊，藤田 剛，目黒 寛司，池田 衡** (2002) インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの創製. 薬學雑誌 **122:** 909-918

[48] **Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies L J, Pratipanawatr W, Glass L and DeFronzo R A** (2003). Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52:** 1364-1370

[49] **長野 正信, 上野 知子, 藤井 暁, 侯 徳興, 藤井 信** (2010) 黒酢もろみ末の II 型糖尿病モデルマウス KK‐A^y に対する高血糖抑制効果. 日本食品科学工学会誌 **57:** 346-354

[50] **Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley J M, Martin T J and Suda T** (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123:** 2600-2602

[51] **松原 建史, 酒井 由美子, 柳川 真美, 肘井 千賀, 沼田 信, 江上 薫, 山口 靖子, 峰 祐子, 前田 龍, 田中 宏暁, 進藤 宗洋, 小池 城司** (2013) ベンチステップ運動でのトレーニングが閉経女性の骨密度，骨塩量と骨代謝に及

ぼす影響. 体力科学 **62:** 95-103

[52] **折戸 芳紀, 榎本 誠, 前田 剛, 奥田 均** (2003) 骨粗鬆症に対する薬物療法に関して. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 **46:** 917-918

[53] **Putnam S E, Scutt A M, Bicknell K, Priestley C M and Williamson E M** (2007) Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. *Phytother Res.* **21:** 99-112

[54] **腰原 康子** (1996) ビタミン K と骨代謝. 日本油化学会誌 **45:** 435-443

[55] **Boyle W J, Simonet W S and Lacey D L** (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423:** 337-342

[56] **Miyamoto T** (2011) Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio Journal of Medicine* **60:** 101–105

[57] **Nakamura T, Kodama N, Oda M, Tsuchiya S, Arai Y, Kumamoto T, Ishikawa T, Ueno K and Yano S** (2009) The structure-activity relationship between oxycoumarin derivatives showing inhibitory effects on iNOS in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J Nat Med.* **63:** 15-20

[58] **Vazquez R, Riveiro M E, Vermeulen M, Mondillo C, Coombes P H, Crouch N R, Ismail F, Mulholland D A, Baldi A, Shayo C and Davio C** (2012) Toddaculin, a natural coumarin from Toddalia asiatica, induces differentiation and apoptosis in U-937 leukemic cells. *Phytomedicine* **19:** 737-746

[59] **Kono S, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald L F, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H and Tanaka S** (2007) Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone* **40:** 68-74

[60] **Feng X** (2005) RANKing intracellular signaling in osteoclasts. *IUBMB Life* **57:** 389-395

[61] **高柳広** (2005) 骨吸収がわかる. 羊土社

[62] **Motyckova G, Weilbaecher K N, Horstmann M, Rieman D J, Fisher D Z and Fisher D E** (2001) Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA **98:** 5798-5803

[63] **Reddy S V, Hundley J E, Windle J J, Alcantara O, Linn R, Leach RJ, Boldt D H and Roodman G D** (1995) Characterization of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gene promoter. *J. Bone Miner. Res.* **10:** 601-606

[64] **Quinn J M, Elliott J, Gillespie M T and Martin T J** (1998) A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* **139:** 4424-4427

[65] **古賀慎太郎** (2009) 骨代謝関連細胞の機能評価系の確立. 福岡県工業技術センター研究報告 **19:** 41-44

[66] **Hayden M S and Ghosh S** (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* **2:** 344-362

[67] **Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Okada H, and Tsujimoto M** (2000) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-κB ligand (RANKL). *J Biol Chem.* 275: 31155–31161

[68] **Lee Se, Woo K M, Kim S Y, Kim H M, Kwack K, Lee Z H, and Kim H H** (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* **30**: 71–77

[69] **Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng J M, Behringer R R and de Crombrugghe B** (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**:17-29

[70] **Kitahara K, Ishijima M, Rittling S R, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt D T and Noda M** (2003) Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* **144**: 2132-2140

[71] **Aubin J E, Liu F, Malaval L and Gupta A K** (1995) Osteoblast, chondroblast differentiation. *Bone* **17**: 77-83

[72] **Beck G J, Sullivan E C, Moran E and Zerler B** (1998) Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem.* **68:** 269-280

[73] **三木 隆己, 嶋田 裕之** (2005) 骨代謝マーカーによる評価. 日本内科学会雑誌 **94:** 675-681

謝辞

本研究は、終始、宮澤陽夫教授、仲川清隆准教授のもとで行われたものであることを記すとともに、博士課程後期課程の修了に臨み、懇切なご指導とご鞭撻を賜ったことに心より感謝の意を表します。

本研究を遂行していくにあたり、適切な指導、助言を頂きました木村ふみ子助教ならびに本論文を校閲して頂きました桑原教授ならびに此木准教授に心より感謝いたします。

進学の機会を与えて頂き、常に有形無形の後押しをくださいました一般財団法人日本食品分析センターの齋藤文一前理事長、丹野憲二前専務理事、佐藤秀隆理事長ならびに渡井正俊所長をはじめ理事の皆様に感謝いたします。同じく藤田和弘部長、松尾安人所長、小木曽基樹課長、河野洋平課長、猪之鼻修一課長、吉田幹彦課長、加藤毅エキスパート、吉田泉主任研究員、三嶋隆課長補佐、鈴木芽課長補佐、小泉慶子副主任研究員、近宗雅人主任、成相舞子主任、原田哲平様、伊藤祐介様、熊谷百慶様、分析化学課、応用試験課、機能性成分分析課、動薬試験課ならびに仙台事務所の皆様には研究に関して助言とサポートを頂き、感謝いたします。

また、温かい雰囲気で研究室に迎え入れ、様々な面で交流をして下さった機能分子解析学研究室の加藤俊治博士ならびに伊藤隼哉修士をはじめ多くの仲間に感謝いたします。

そして、不在にすることが多かった家庭を支え、精神的・経済的に多大な支援をしていただいた妻 綾子ならびに私にいつも最高の元気を与えてくれた長男 悠太、長女 千晴、次男 涼太に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究活動のために尊い命を捧げてくれた動物たちの御霊に深い感謝と追悼の意を表します。

平成 27 年 2 月