

原 著

タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有 Tryptanthrin による PPAR $\gamma$  活性化と  
3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化の促進による細胞内脂肪滴蓄積の減少について

金野 太亮,\* 小林 匡子, 村田 敏拓, 佐々木健郎

Tryptanthrin Promotes Adipocyte Differentiation and Reduces Lipid  
Accumulation in 3T3-L1 Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$

Taisuke KONNO,\* Kyoko KOBAYASHI, Toshihiro MURATA, and Kenroh SASAKI

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2019)

The number of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients is increasing worldwide. T2DM is characterized by the decreasing of insulin sensitivity and insufficient insulin release from pancreatic  $\beta$ -cells caused by insulin resistance. In addition, impaired adipocyte differentiation enhances insulin resistance. As the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) plays an important role in insulin sensitivity and adipocyte differentiation, the thiazolidine drugs which are known to PPAR  $\gamma$  agonist can clinically improve insulin resistance. *Persicaria tinctoria* has been used as a dye and traditional Japanese medicine in Japan over the years. Tryptanthrin, which is an ingredient of this plant is reported to have a variety of bioactivity such as antibacterial, anti-cancer, and anti-inflammatory. Recently, *Persicaria tinctoria* is also used as edible food, and its usefulness has attracted attention. Thus, to investigate the effect of tryptanthrin on the cell differentiation and adipogenesis process in 3T3-L1 cells, 3T3-L1 cells were cultured to determine the effect of cell differentiation and glucose uptake with tryptanthrin. As a result, tryptanthrin enhanced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells similar to rosiglitazone. This effect was inhibited by cotreatment with GW9662, a PPAR  $\gamma$  antagonist. In mature 3T3-L1 adipocytes, the lipid droplet size and accumulation were reduced by this compound and observed micro lipid droplets. The glucose consumption were also significantly increased. In conclusion, this finding suggested that tryptanthrin is a potential anti-diabetic compound for T2DM by promoting adipocyte differentiation and glucose consumption via PPAR  $\gamma$ .

**Key words** — tryptanthrin, *Persicaria tinctoria*, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus (T2DM), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), 3T3-L1 cell

緒 言

2型糖尿病は、遺伝的素因と環境因子が関与する生活習慣病であり、遺伝的素因に肥満、運動不足、過食、ストレスなどの環境因子、<sup>1,2)</sup> および加齢<sup>3)</sup> や喫煙<sup>4)</sup> が加わり発症する。発症原因は完全に明らかにはなっていないが、KCNQ<sup>25)</sup> や TCF2L<sup>76)</sup> などの遺伝子多型も発症、および進展に強く関連することも示されている。また、本疾患の初期は自覚症状がなく、罹患者が自覚したときには糖尿病3大合併症である糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、および末梢神経障害に加え循環器疾患も認められる<sup>7)</sup> ことから、ほとんどの患者が長期間の治療を要する。完治が困難であり患者数が激増して

いる<sup>8)</sup> ことに加え、今後も糖尿病を含む合併症に対する医療費の増加が予想されている現状<sup>9)</sup> を鑑みると、早期発見、早期治療以上に発症予防が急務である。

2型糖尿病は、主にインスリン感受性の低下とインスリン分泌不全が原因のひとつとされ、インスリンの働きが相対的に低下することで持続的な高血糖状態を呈する。<sup>10)</sup> このとき生体内では、グルコースやフルクトースなどの糖分子がアマドリ転位反応やイミノ転位反応など複雑な反応過程を経て3-デオキシグルコソンやメチルグリオキサール等のアルデヒド基をもつ化合物が生成し、このアルデヒド基は非常に高い反応性を有することから生体内たんぱく質中のアミノ酸残基、および脂質中のヒドロキシ基に対し非酵素的糖化反応、所謂メイラード反応が進行する。<sup>11,12)</sup> この現象はカルボニルストレスとして知られており、 $\beta$ 細胞内で

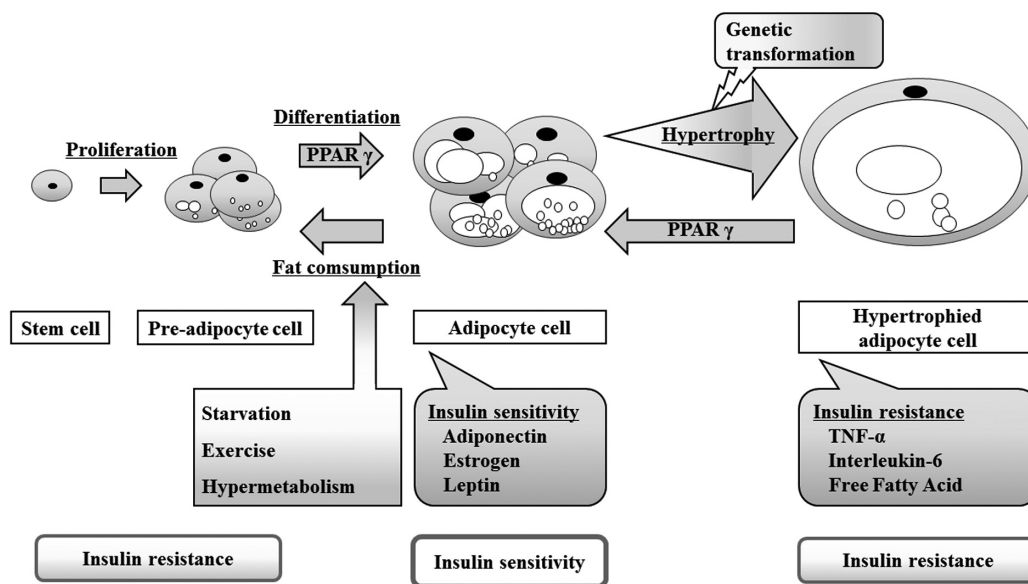


Fig. 1. Differentiation process of adipocytes and insulin sensitivity.

Lipid metabolism disorders result in excessive lipid accumulation, adipocyte hypertrophy, and insulin resistance. Typically, mature adipocytes increase insulin sensitivity and maintain glucose homeostasis. However, insulin resistance caused by adipocyte dysfunction impairs glucose homeostasis, further enhancing insulin resistance through a feedback loop. As PPAR $\gamma$  regulates the differentiation of pre-adipocytes and glucose and lipid metabolism in mature adipocytes, PPAR $\gamma$  ligand may serve as a therapeutic target for type 2 diabetes mellitus.

生じた場合に膵 $\beta$ 細胞数やインスリン分泌量の低下に起因した膵 $\beta$ 細胞機能障害を誘発する<sup>13,14)</sup>だけではなく、過剰な血中グルコースをグリコーゲンとして蓄える肝臓や骨格筋、および脂肪として蓄える脂肪組織に対しても同様に細胞障害性を与え、さらなるインスリン抵抗性の増悪を引き起こす。<sup>15,16)</sup>

成熟脂肪細胞はアディポネクチンやレプチンなどのアディポカインを産生しインスリン感受性の亢進に寄与する<sup>17)</sup>が、脂肪細胞の分化障害はアディポカインの産生に多大な影響を与える (Fig. 1)。また、過度に肥大化した脂肪細胞ではこれらの産生が抑制されるとともに、TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )<sup>18)</sup>、IL-6 (Interleukin-6)<sup>19)</sup> およびレジスチン<sup>20)</sup>等の炎症惹起物質を産生しインスリン抵抗性をさらに悪化させる原因となる。これらは主に皮下脂肪や内臓脂肪において起こるが、近年肝臓や膵臓などに脂肪が蓄積する異所性脂肪もインスリン抵抗性、およびインスリン分泌に影響を与えていることが明らかとなった。<sup>21)</sup> さらに脂肪細胞から遊離する過剰な遊離脂肪酸はミトコンドリアに対する酸化ストレスや耐糖能異常を惹起し<sup>22)</sup>カルボニルストレスと同様に、脂肪毒性によるインスリン抵抗性の悪化も重要である。<sup>23)</sup>したがって、脂肪前駆細胞を成熟脂肪細胞へ細胞分

化を促進させることに加え、成熟脂肪細胞における糖脂質代謝能を亢進することで脂肪細胞の正常な機能を増強させ、インスリン抵抗性の改善とカルボニルストレス、および脂肪毒性の軽減に寄与できると考えられる。

核内受容体スーパーファミリーに属するPPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) は、核内でRXR (Retinoid X receptor) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在するPPRE (Peroxisome proliferators response elements) へ結合することで、コアクチベーター、およびコリプレッサーと協調しながら標的遺伝子発現を調節する。<sup>24)</sup> PPAR $\gamma$ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、糖脂質代謝、インスリン抵抗性に関与する重要な因子<sup>25)</sup>として注目されている。このため、PPAR $\gamma$ リガンド活性を有するピオグリタゾンやロシグリタゾンなどのチアゾリジン系誘導体は、脂肪細胞に発現するPPAR $\gamma$ に結合し細胞分化を促進するとともに、アポトーシス誘導を通してインスリン抵抗性を惹起するTNF- $\alpha$ 、および遊離脂肪酸の分泌を抑制してインスリン抵抗性を改善する。<sup>26-28)</sup> 加えて、GLUT4 (Glucose transporter4) 発現量の回復と細胞膜への移行量を増加させることで、血糖降下作用を発揮する<sup>29,30)</sup>ことから抗糖尿病薬として使用されてい

る。しかし、これらの治療薬は循環器疾患、<sup>31)</sup> 膀胱がん、<sup>32)</sup> および骨折<sup>33)</sup> などの罹患リスク上昇も問題視されていることから、より安全性の高い経済的な治療薬のニーズは高まっている。

タデ藍 *Persicaria tinctoria* は古来より藍染めの染料や食用、および生薬<sup>34)</sup> として利用されてきており我々は様々な恩恵を享受してきた。藍葉には無色の配糖体であるインジカンが大量に含有されており、これが植物中の $\beta$ -グルコシダーゼで分解される際に非常に不安定な中間生成体インドキシルを生成する。<sup>35)</sup> このインドキシルが空气中で酸化されることで安定な二量体へと重合し、藍染めの染料のもとであるインディゴになる。一方、藍染めがこれほど普及したのは、美的要素に加え藍のもつ多くの機能性に由来するものと考えられ、特に天然植物成分としては希少なインドロキナゾリン骨格を有するトリプタンスリンは、抗菌活性、<sup>36)</sup> 抗真菌活性、<sup>37)</sup> 抗炎症作用、<sup>38)</sup> アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患改善作用、<sup>39)</sup> および抗がん剤としての可能性<sup>40,41)</sup> 等極めて多彩な生物活性が報告されている。さらに、近年はタデ藍に HMG-CoA レダクターゼ阻害作用を示す新規フラボノイド配糖体<sup>42)</sup> が発見され、食用として用いることも広まってきている。本研究では、トリプタンスリンのインスリン抵抗性改善作用、および新規糖尿病治療薬になりうる可能性を、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞株を用いて評価した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 試薬・材料

ペニシリン、アムホテリシン B、SIGMAFAST™ (*p*-Nitrophenyl phosphate tablets) およびトリプタンスリンは Sigma Aldrich (Tokyo, Japan) から、また PPAR $\gamma$  抗体 (Rabbit polyclonal)、および ALP 結合 IgG 抗体 (Goat anti-rabbit IgG) は Bio-Rad (CA, USA) から購入したものを使用した。それ以外の試薬類は、特段言及がなければ FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) より入手したものである。

### 2. PPAR $\gamma$ リガンド活性の測定

PPAR $\gamma$  の供給源として 7 週齢の雄性 ICR マウスの内臓脂肪を D-PBS と共にホモジネート後、遠心分離した上清をタンパク質アッセイキット (TaKaRa BCA Protein Assay Kit, Takara Bio, Inc.,

Otsu, Japan) にてタンパク質量を測定した。本ホモジネート上清を使用して ELISA 法により PPAR $\gamma$  リガンドの PPAR $\gamma$  結合能を測定した。cAMP 応答エレメント結合タンパク質結合タンパク質 (CBP) を 37°C, 1 時間 96 穴プレートに固定した後洗浄し、調製したマウス内臓脂肪ホモジネート上清、およびサンプルを添加し 4°C, 24 時間インキュベートした。洗浄後、5% スキムミルクを加え 37°C, 1 時間インキュベートした。1 次抗体として抗 PPAR $\gamma$  抗体 (Rabbit polyclonal)、2 次抗体として Alkaline phosphatase 結合 IgG 抗体 (Goat anti-rabbit IgG) を各々順次添加し 37°C, 1 時間インキュベートした。洗浄後、SIGMAFAST™ を添加し遮光下 600 rpm にて振とうし、Immuno Mini NJ-2300 (Biotech, Tokyo, Japan) を用いて 405 nm における吸光度を測定した。サンプルは 100% DMSO に溶解後、D-PBS で希釈した。なお、本実験ではポジティブコントロールとしてチアゾリジン系 2 型糖尿病治療薬であるピオグリタゾンを用いた。

### 3. 細胞培養

マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞株は American Type Cell Culture Collection (VA, USA) より購入した。本細胞は、10% 牛胎児血清アルブミン (FBS; Gibco-BRL, MA, USA) を含む Dulbecco 変法イーグル培地 (以下、DMEM) 中で培養した。また、培養中は培地に 100 U/mL ペニシリン、25  $\mu$ g/mL アムホテリシン B を加え、37°C、飽湿、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。また、脂肪前駆細胞を分化させる際は 0.25 mM 3-イソブチル 1-メチルキサンチン、1  $\mu$ M テキサメタゾン、および 1.7  $\mu$ M インスリンを添加し分化誘導した。サンプルは 100% DMSO に溶解後、培地で希釈した。PPAR $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 添加時は、先に GW9662 処理を行った後サンプルを添加した。なお、本実験ではポジティブコントロールとしてチアゾリジン系 2 型糖尿病治療薬であるロシグリタゾンを用いた。

### 4. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、WST-8 ホルマザン法を用いて決定した。本細胞を 96 穴プレートに  $5.0 \times 10^3$  cells/well になるように播種し、24 時間培養した。各サンプルを最終濃度が 10  $\mu$ M から 1 nM となるように調製したサンプルを培地中に加え、さらに 24 時間培養した。その後、培地中に Cell Count Reagent SF (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を 10  $\mu$ L/well 加え、

37°Cで1時間インキュベートした。反応終了後、405 nmにおける吸光度を測定した。

### 5. オイルレッド O 染色

培地を除去し D-PBS (-) で洗浄後、10%ホルムアルデヒド 200  $\mu$ L を加え、1時間室温静置した。10%ホルムアルデヒドを除去し、D-PBS (-) で洗浄した。次にオイルレッド O 染色液 (60% (v/v) 2-プロパノール中に Sdan III を 3 mg/mL で溶解) 200  $\mu$ L/well を加え、振とうさせながら 37°C で 20 分インキュベートした。染色液を除去し、D-PBS (-) 200  $\mu$ L で洗浄後、510 nm における吸光度を測定した。

### 6. 脂肪前駆細胞における分化能促進効果の検討

未分化 3T3-L1 細胞を 96 穴プレートに  $5.0 \times 10^3$  cells/well になるように播種し、サンプルを加えて 7 日間分化誘導培地 (MDI 培地; 10% FBS 添加 DMEM 培地, 100 IU/ml ペニシリン, 25  $\mu$ g/ml アムホテリシン B, 0.25 mM 3-イソブチル 1-メチルキサンチン, 1  $\mu$ M デキサメタゾン, 1.7  $\mu$ M インスリン) にて培養した。2 日間おきに培地交換を行い、培養終了後にオイルレッド O 染色液にて油滴を染色し Nikon ECLIPSE Ts2 を用いて観察、撮影した。

### 7. 成熟脂肪細胞における油滴量減少効果の検討

未分化な細胞を 96 穴プレートに  $5.0 \times 10^3$  cells/well になるように播種し、4 日間 MDI 培地にて培養した。続いて、6 日間維持培地 (10% FBS 添加 DMEM 培地, 100 IU/ml ペニシリン, 25  $\mu$ g/ml アムホテリシン B, 0.425  $\mu$ M インスリン) にて培養した。その後、サンプルを添加して 5 日間培養した。2 日間おきに培地交換を行い、培養終了後にオイルレッド O 染色液にて油滴を染色し Nikon ECLIPSE Ts2 を用いて撮影をした。その後、100%イソプロパノール 100  $\mu$ L を加え 5 分間振とうし、染色液を溶出させた後、510 nm における吸光度を測定した。

### 8. 成熟脂肪細胞におけるグルコース消費試験

完全に分化させた成熟脂肪細胞を、トリプタンスリン (1  $\mu$ M–1 nM), およびロシグリタゾン (1  $\mu$ M–1 nM) の存在下で 4 日間培養した。細胞を D-PBS (-) で洗浄後、D-PBS (-) で希釈した培地を新たに加え、測定開始直後、1 時間後、および 3 時間経過後の培地を回収し経時的な培地中グルコース濃度を測定した。グルコース濃度は、Glucose Assay KIT (CELL BIOLABS INC, CA, USA) で測定した。

## 9. 統計解析

統計解析は Sigma Stat Statistical Software ver. 2.03 (SPSS, CA, USA) を用い、多重比較検定として Dunnett's multiple range tests (\* $P < 0.05$  vs. Comparison group; # $P < 0.001$  vs. Comparison group,  $n = 3$ ) を使用した。全ての結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表記した。

## 結 果

### 1. トリプタンスリンの PPAR $\gamma$ リガンド活性

トリプタンスリン (500 nM–5 nM) の PPAR  $\gamma$  リガンド結合活性を測定した。50 nM ピオグリタゾンと比較し、50 nM, および 5 nM のトリプタンスリンは各々 1.29 倍, および 1.64 倍強い活性を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A)。この結果より、トリプタンスリンはピオグリタゾンと同様に PPAR  $\gamma$  リガンド結合活性を有することが示された。次に、5 nM のトリプタンスリンと PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 (100 nM–1 nM) 併用時におけるトリプタンスリン結合活性を測定した。Fig. 2B に示すように、100 nM または 10 nM の GW9662 併用により、結合活性は用量依存的に有意に抑制された。これらの結果より、トリプタンスリンは PPAR  $\gamma$  リガンド結合ドメインへ結合する PPAR  $\gamma$  アゴニストであることが示された。

### 2. 細胞生存率に対するトリプタンスリン, およびロシグリタゾンの影響

トリプタンスリン, およびロシグリタゾンの脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞株) に対する細胞毒性を MTT 法で評価した。Fig. 3 に示すように、1  $\mu$ M までは細胞生存率に全く影響を及ぼさないが、10  $\mu$ M ではトリプタンスリンとロシグリタゾン共に細胞生存率を有意に低下させたため、細胞毒性を示すものと判断した。したがって、以下の実験では 10  $\mu$ M を除いた 1  $\mu$ M から 1 nM における測定・評価を行った。

### 3. 脂肪前駆細胞の細胞分化に対するトリプタンスリンの影響

トリプタンスリンは PPAR  $\gamma$  リガンド活性を示したことから、脂肪滴の生成, および成熟脂肪細胞分化に対する影響を評価した。3T3-L1 脂肪前駆細胞は、インスリン存在下, または非存在下にてサンプル添加後 7 日間培養し、脂肪滴 (Lipid droplet; LD) をオイルレッド O (ORO) 染色した。

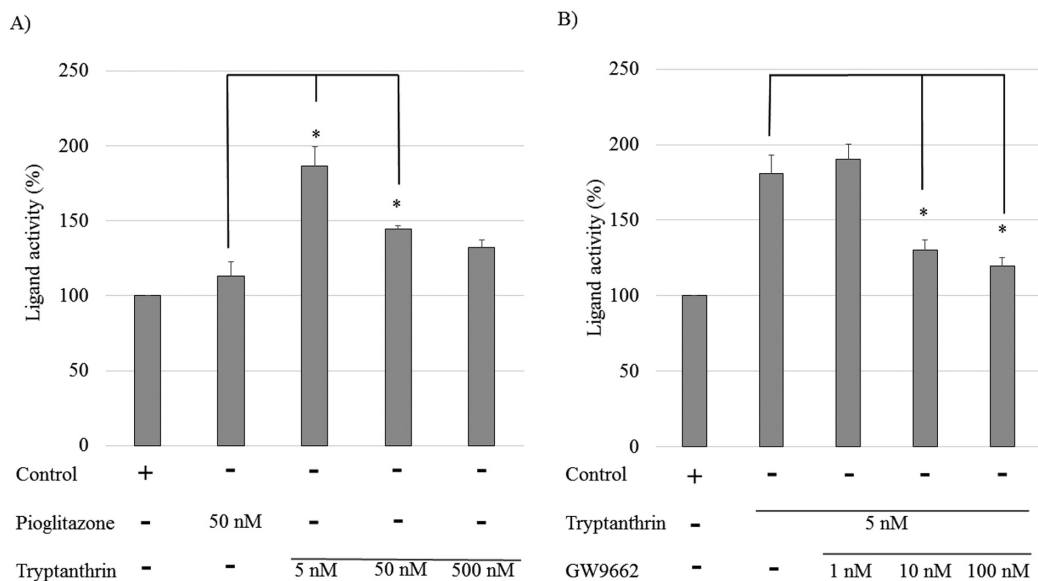


Fig. 2. PPAR $\gamma$  ligand activity of tryptanthrin.

A) PPAR $\gamma$  ligand-binding activity of tryptanthrin. \*P<0.05 vs. 50 nM pioglitazone. B) The ligand activity of tryptanthrin was suppressed in a dose-dependency manner by the PPAR $\gamma$  antagonist GW9662. \*P<0.05 vs. 5 nM tryptanthrin. All values are presented as means  $\pm$  S.D. (n=3).

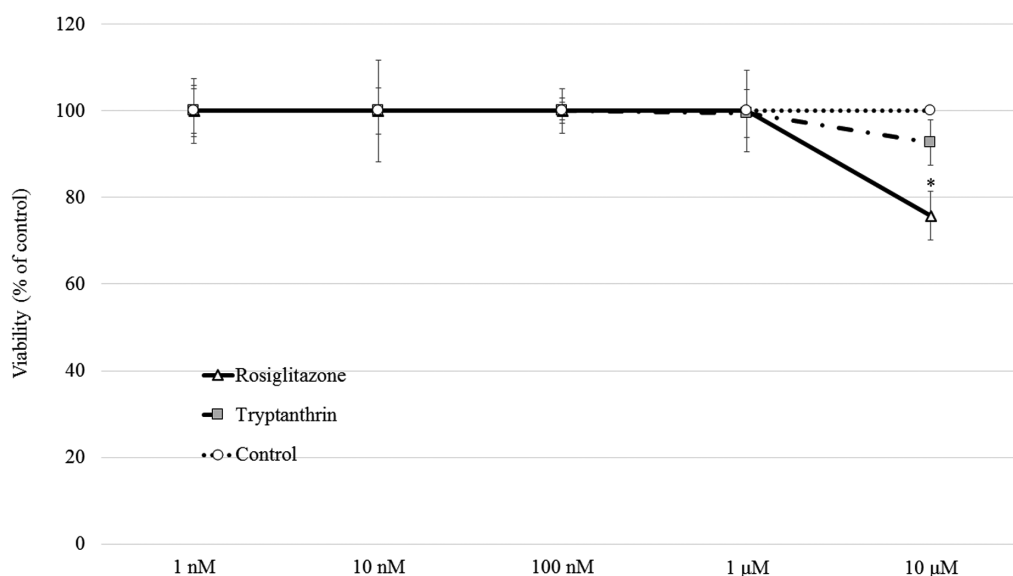


Fig. 3. The cytotoxicity of tryptanthrin and rosiglitazone in 3T3-L1 pre-adipocytes.

Compared to vehicle control, the rosiglitazone treated group significantly decreased survival at 10  $\mu$ M (\*P<0.05 vs. control). The cells were treated with samples (10  $\mu$ M–1 nM) for 24 h. All values are presented as means  $\pm$  S.D. (n=3).

### 1) 脂肪前駆細胞に対するトリプタンスリンの影響

Fig. 4 コントロール群インスリン (-) に示すように未分化な細胞は紡錘状の形態をとる (白矢印) が、トリプタンスリン (1  $\mu$ M–1 nM) で処理した細胞はコントロール群と比較し球状の丸い成熟脂肪細胞が示す形態に (Fig. 4A 黒丸印) 変化したこと認めたため、細胞分化を促進したことが ORO 染

色から明らかになった。その分化刺激作用はインスリン非依存的であり、明確な用量依存性は観察されなかった。しかし、インスリン存在下では、トリプタンスリン処理した細胞は、紡錘状からより丸い形状へ形態学的変化が観察され、さらに大きな LD 断片が小さな micro LD に分散している (黒矢印) ことを認めた。一方、インスリン非存在下では、インスリン存在下と比較し細胞の生育密

度, および脂肪蓄積を伴った成熟度は低かった. このことから, トリプタンスリンは脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への細胞分化を促進し, その作用はインスリンにより増強されることが示唆された.

## 2) PPAR $\gamma$ アンタゴニスト GW9662 併用時におけるトリプタンスリンの脂肪前駆細胞に対する影響

未熟 3T3-L1 細胞を PPAR $\gamma$  アンタゴニスト

GW9662 (1  $\mu$ M–1 nM) の非存在下, および存在下で 1  $\mu$ M トリプタンスリンと共に 7 日間培養し, 分化誘導後に細胞を観察, 撮影した結果を Fig. 5A に示す. GW9662 (1  $\mu$ M–1 nM) で処理した細胞では, トリプタンスリン単独群と比較して LD の生成, および成熟脂肪細胞分化に低下が認められた. すなわち, 1  $\mu$ M GW9662 処理した細胞ではインスリン非依存的に強い生育阻害が認められ,

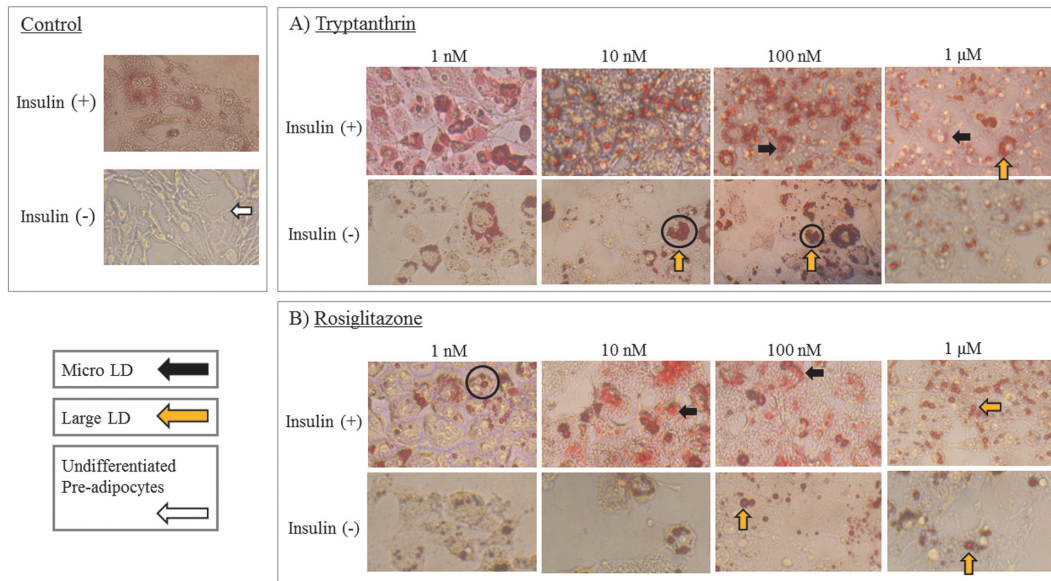


Fig. 4. The effects of tryptanthrin and rosiglitazone on adipocyte differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes.

Preadipocytes were cultured DMEM supplemented with 10% FBS, antibiotic-antimycotic solution, 0.25 mM isobutyl-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone, and 1.7  $\mu$ M insulin. Photographs of cells cultured were taken at Olympus CKX31 (magnification:  $\times$ 200). A) Tryptanthrin (1  $\mu$ M–1 nM). B) Rosiglitazone (1  $\mu$ M–1 nM).

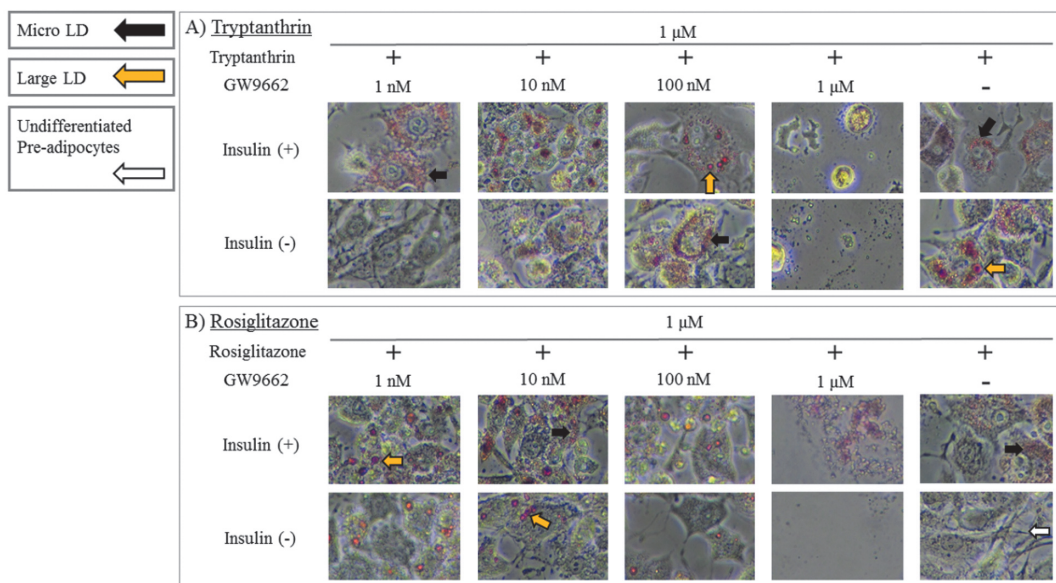


Fig. 5. The effects of tryptanthrin and rosiglitazone combined with GW9662 on adipocyte differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes.

Preadipocytes were cultured DMEM supplemented with 10% FBS, antibiotic-antimycotic solution, 0.25 mM isobutyl-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone, and 1.7  $\mu$ M insulin. Photographs of cells cultured with GW9662 were taken at Nikon ECLIPSE Ts2 (magnification:  $\times$ 200). After ORO staining, the ORO dye was eluted and quantified at 510 nm.

GW9662 (100 nM–1 nM) で処理した細胞は脂肪細胞分化に伴う large LD (Fig. 5A 黄色矢印), および micro LD (Fig. 5A 黒色矢印) の分散が認められ, インスリン存在下では, トリプタンスリン処理した細胞はインスリン非存在下と比較して脂肪細胞分化が促進され, 細胞の成熟度は同様に高かった. このことから, トリプタンスリンはインスリンによる脂肪細胞分化作用を増強することに加え, GW9662 併用時にはその作用が強く阻害されることからトリプタンスリンは PPAR $\gamma$  を介して LD 代謝, および成熟脂肪細胞分化作用を示すことが示唆された. 一方, Fig. 4B に示すようにロシグリタゾン (1  $\mu$ M–1 nM) で処理した細胞は, コントロール群と比較して強く染色されたことから成熟脂肪細胞に分化したが, トリプタンスリンの結果と同様に明確な用量依存性は示さなかった. しかし, インスリン存在下では, ロシグリタゾン処理した脂肪前駆細胞は, トリプタンスリンと同様に形態学的変化 (Fig. 4B 黒丸印), および micro LD (Fig. 4B 黒色矢印) を認めた. このことから, インスリン非存在下ではロシグリタゾン処理した細胞はコントロール群と比較すると細胞分化を促進したが, 細胞分化, および成熟度はトリプタンスリンに比較して低いことが示唆された. さらに, Fig. 5B に示すように, GW9662 (1  $\mu$ M–1 nM) で処理した細胞では, ロシグリタゾンによる LD の

生成, および成熟脂肪細胞分促進作用に抑制が認められた. トリプタンスリンに対する影響と同様に, 1  $\mu$ M GW9662 で処理した細胞は大幅な生育阻害が見られたものの, 1  $\mu$ M を除くその他の濃度では LD の分散が観察された. また, インスリン存在下では, ロシグリタゾン処理した細胞はインスリン非存在下と比較して脂肪細胞の分化を促進し, 生育密度, および脂肪蓄積を伴う細胞の成熟度は同様に高かった. 以上の結果より, トリプタンスリンはロシグリタゾンと同様に PPAR $\gamma$  の活性化を介して脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化を促進させることが明らかとなった. 脂肪前駆細胞は, 一般的に成熟脂肪細胞への細胞分化に伴い同時期に LD 蓄積の増加を伴うものと考えられているが, Fig. 6A に示すように 1  $\mu$ M トリプタンスリンで処理した細胞は, コントロール群と比較し脂肪蓄積量の低下を示したことから, 細胞分化と脂肪蓄積との間に非同期性があることを示唆した.

#### 4. 成熟脂肪細胞における肥大化脂肪滴量に対するトリプタンスリンの影響

3T3-L1 細胞を分化誘導培地 (以下, MDI) で 4 日間培養後, 維持培地で 6 日間培養し, 成熟脂肪細胞の LD を肥大化させた. 各サンプルを添加後, さらに 5 日間培養し, 成熟脂肪細胞に対するトリプタンスリンの影響を評価した.

Fig. 7A に示すように, トリプタンスリン

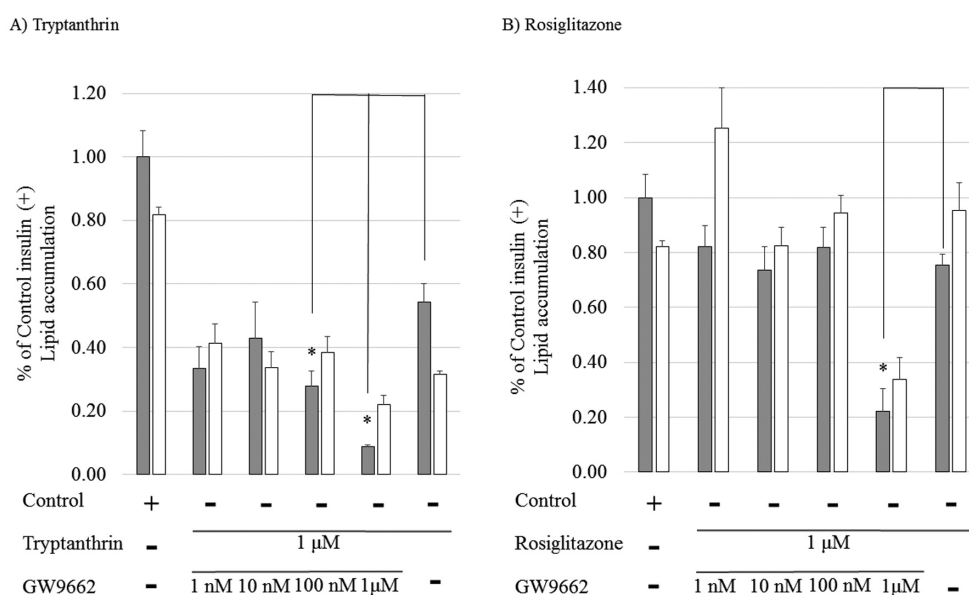


Fig. 6. The effects of tryptanthrin and rosiglitazone on lipid accumulation.

After ORO staining, the ORO dye was eluted and quantified at 510 nm. A) Lipid accumulation of tryptanthrin-treated group. B) Lipid accumulation of rosiglitazone-treated group. All values are presented as means  $\pm$  S.D. All values are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3, \*P < 0.05 vs. 1  $\mu$ M each samples).

(1  $\mu$ M–1 nM) はコントロール群と比較して、細胞分化を適正化し過剰な脂肪蓄積を用量依存的に有意に抑制した。また、Fig. 8A に示すように、コントロール群ではLD蓄積量の増加に加えLarge LDが観察されたが、トリプタンスリン(1  $\mu$ M–1 nM)で処理した細胞では用量依存性は見られなかったがLDサイズの縮小と多数のmicro LDの分散を認めた。

同様に、ロシグリタゾン(1  $\mu$ M–1 nM)においてもコントロール群と比較して、細胞分化を適正化し過剰な脂肪蓄積を有意に抑制した(Fig. 7B)。またFig. 8Bに示すように、ロシグリタゾン(1  $\mu$ M–1 nM)で処理した細胞でも用量依存性は認められなかったがLDサイズの縮小と多数のmicro LDの分散を認めた。これらの結果より、トリプタンスリンはPPAR  $\gamma$ の活性化を介して成熟脂肪細胞の肥大化脂肪滴量に対して抑制的に作用することが示唆された。

#### 5. 成熟脂肪細胞におけるグルコース消費に対するトリプタンスリンの影響

トリプタンスリン、およびロシグリタゾンが成熟脂肪細胞におけるグルコース消費に与える影響を測定・評価した。トリプタンスリン(1  $\mu$ M–1 nM)で処理した細胞では、コントロール群と比較し測定開始1時間経過後には明確な用量依存性は認められなかったものの全濃度で有意なグルコース濃度の低下を示した(Fig. 9A)。また、グルコース濃度が最も低下した1  $\mu$ Mトリプタンスリンで処

理した細胞は、コントロール群と比較しグルコース濃度が10.1%低下した。

同様にロシグリタゾン(1  $\mu$ M–1 nM)で処理した細胞でも、測定開始1時間経過後には明確な用量依存性は認められなかったが、1 nMを除く1  $\mu$ M, 100 nM, および10 nMで有意なグルコース濃度の低下を示した(Fig. 9B)。このことから、トリプタンスリンは、ロシグリタゾンと同程度のグルコース消費を促進する作用を有することから、グルコース取り込みを増強する可能性が示唆された。

## 考 察

脂肪細胞の分化障害は、肥満関連疾患である2型糖尿病とインスリン抵抗性に密接に関係<sup>43)</sup>しており、糖尿病に起因した高血糖状態はカルボニルストレスを惹起することでインスリン抵抗性により一層拍車をかける。成熟脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンやレプチンなどのアディポカインは、インスリン感受性を上昇させるために重要な役割を果たす。<sup>44)</sup> また、PPAR  $\gamma$ の活性化は、細胞分化や脂肪細胞の機能性維持に重要であり、PPAR  $\gamma$ 遺伝子の発現と共にアディポカイン分泌も増加する<sup>45)</sup>ので、脂肪前駆細胞の細胞分化を促進し成熟脂肪細胞に分化促進することは、インスリン抵抗性の改善と糖、および脂質毒性の軽減に有効であると考えられている。

本研究では、インスリン非存在下においてトリ

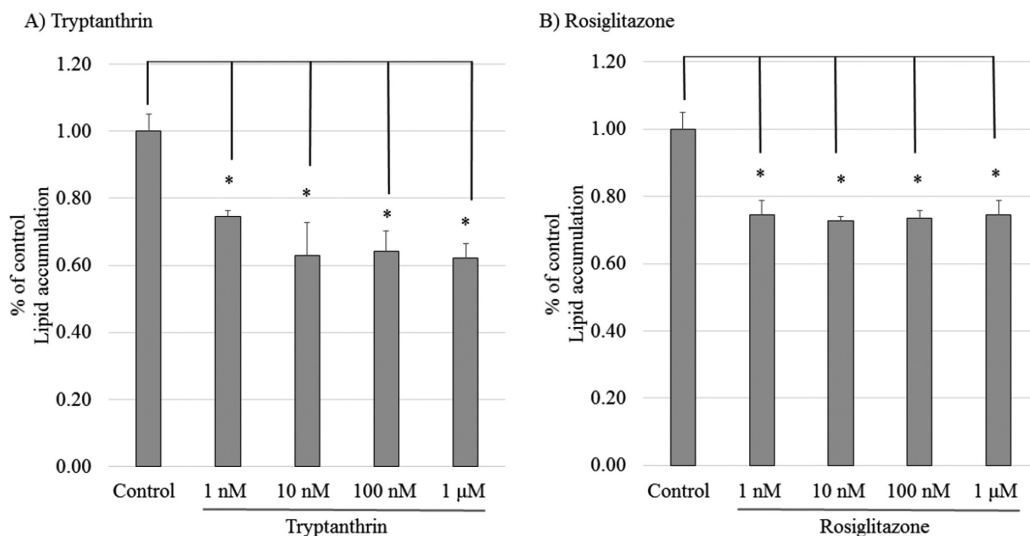


Fig. 7. The tryptanthrin and rosiglitazone reduced lipid droplet size and accumulation in mature adipocytes.

After ORO staining, the ORO dye was eluted and quantified at 510 nm. A) Lipid accumulation of tryptanthrin-treated group. All values are presented as means  $\pm$  S.D. (n=3, \*P<0.05 vs. control), B) Lipid accumulation of rosiglitazone-treated group. All values are presented as means  $\pm$  S.D. (n=3, \*P<0.05 vs. control).



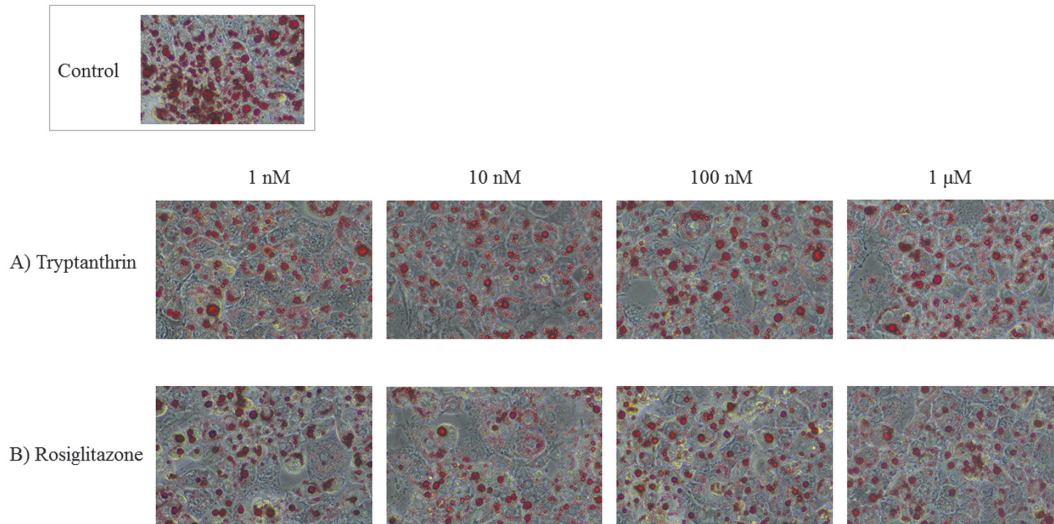


Fig. 8. The tryptanthrin and rosiglitazone reduced lipid droplet size and accumulation in mature adipocytes.

A) Oil Red O staining of tryptanthrin treated group (magnification:  $\times 200$ ), B) Oil Red O staining of rosiglitazone treated group (magnification:  $\times 200$ ).

プトアンスリン (1  $\mu\text{M}$ –1 nM) で処理した脂肪前駆細胞はコントロール群と比較し、弱い細胞分化が観察されたが、インスリン存在下ではインスリンはその細胞分化作用を増強した (Fig. 4A)。インスリンはインスリン受容体に結合し PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化させ、脂質代謝、グルコース輸送、および細胞分化など多様な生理機能を司るが、この PI3K/Akt 系は PPAR $\gamma$  と密接に関与していることが明らかにされている。<sup>46)</sup> このことから、トリプタンスリンはインスリンの有無に関係なく、PPAR $\gamma$  依存性 PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化を介して細胞分化を促進することで、インスリン感受性レベルを上昇させたことが推察される。

本研究では、50 nM、および 5 nM の低濃度のトリプタンスリンは強い PPAR $\gamma$  リガンド活性を示したが、500 nM という高濃度トリプタンスリンではその活性は抑制された。これは、トリプタンスリンは複数のメカニズムが関与している二相性の PPAR $\gamma$  リガンド活性を有していることを示唆している。PPAR $\gamma$  リガンドは、用量依存的に PPAR $\gamma$  を介して ERK 経路を活性化する<sup>47)</sup> が、トログリタゾンなどの PPAR $\gamma$  特異的アゴニストは、用量非依存的に AMP 活性化キナーゼ (AMPK) を活性化する<sup>48)</sup> ことも報告されている。したがって、トリプタンスリンの二相性のリガンド活性は、PPAR $\gamma$  依存性、および非依存性メカニズムの両方に起因する可能性があり、明確な濃度依存性が確

認できなかったことも加味すると、今後 *in vivo* における至適濃度を評価する必要性がある。

脂肪前駆細胞は細胞分化過程を通して、成熟脂肪細胞が有する形態学的、および生理学的特性を獲得する。つまり、脂肪細胞は各種アディポカイン分泌能だけではなく脂質分解、および生成能も獲得する。<sup>49)</sup> 本研究では、トリプタンスリン (1  $\mu\text{M}$ –1 nM) で処理した脂肪前駆細胞 (Fig. 4A)、および成熟脂肪細胞 (Fig. 8A) において micro LD が観察された。この LD の分散は、脂質代謝の主要な調節因子であるペリリピンとホルモン感受性リパーゼの局在化に影響するとされ、それに伴って生じる micro LD は large LD と比較して高い脂肪分解活性の結果により生じるものである。<sup>50)</sup> アジポフィリンの一種であるペリリピンは、脂肪細胞のトリグリセリド (TG) 液滴表面に存在するため LD 表面積/体積比を増加させることで、ペリリピン、および複数の脂質代謝酵素による効率的な TG 分解を誘導するものと考えられる。一方、成熟脂肪細胞に分化するに伴い脂肪蓄積量の増加も示す、いわゆる同期的な分化促進を示す知見が多く見受けられるが、本研究ではトリプタンスリンは非同期的性を示した。これより、PPAR $\gamma$  により制御されているペリリピン発現、および細胞分化に対し抑制的に作用することで脂肪生成阻害、または分化阻害を引き起こしている可能性も払拭できないことから、さらなる検討が必要である。

加えて、トリプタンスリン (1  $\mu\text{M}$ –1 nM) で処

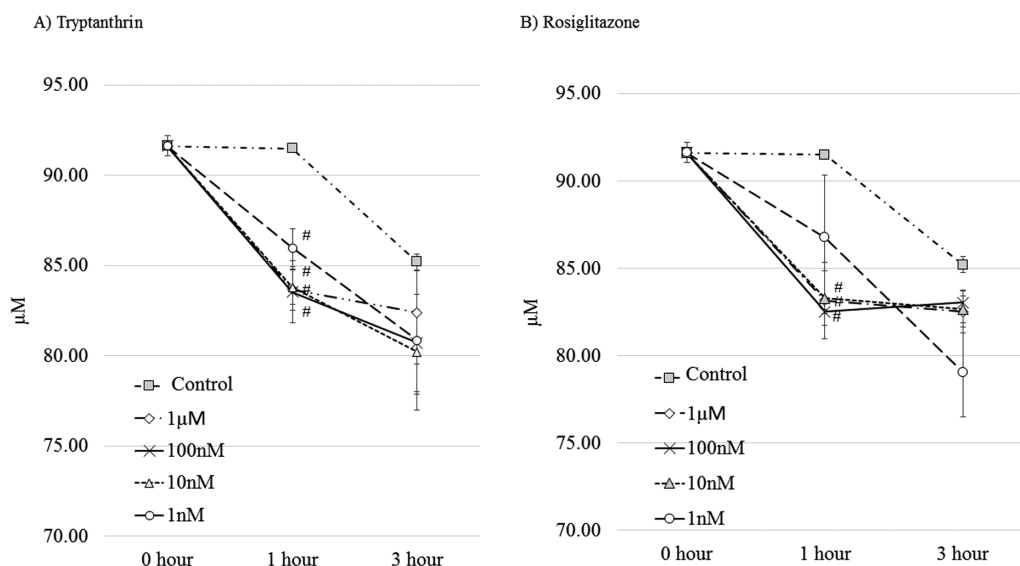


Fig. 9. Effects of tryptanthrin on glucose consumption in 3T3-L1 mature adipocytes.

Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were incubated with samples for 96 h. The glucose concentrations in the medium were determined by the glucose oxidase method. A) Effects of tryptanthrin on glucose consumption. All tryptanthrin treated groups indicated a significant difference. B) Effects of rosiglitazone on glucose consumption. The 1 µM, 100 nM and 10 nM rosiglitazone treated groups except 1 nM indicated a significant difference. All values are presented as means  $\pm$  S.D. (n=3, #P<0.001 vs. control).

理した成熟脂肪細胞ではコントロール群と比較して脂肪蓄積量の減少を認めた (Fig. 7A). このことから, 成熟脂肪細胞において PPAR $\gamma$  を介した脂質合成関連の標的遺伝子を調節し, アセチル CoA カルボキシラーゼ, 脂肪酸合成酵素, およびグリセロール 3 リン酸デヒドロゲナーゼ等の脂質生成, および TG 合成関連酵素の活性の調節<sup>51,52</sup>) にトリプタンスリンは影響を及ぼした可能性も推察される. その一方, PPAR $\gamma$  を介し細胞分化を抑制することによる分化阻害, もしくは脂質代謝系阻害に起因した LD 蓄積量の低下も否定できないことから, 糖脂質代謝に関わる遺伝子発現解析を行うことで, より詳細なメカニズム解明に寄与できるものと考えられる.

インスリン抵抗性の発現と増悪は, 脂肪細胞に発現した GLUT4 によるグルコース取り込み障害も一因とされている.<sup>53</sup>) 今回, トリプタンスリン (1 µM–1 nM) で処理した成熟脂肪細胞は PPAR $\gamma$  活性化を介して培地中グルコースの消費量を増加させた. PPAR $\gamma$  リガンドはグルコース代謝に直接関与する GLUT4 遺伝子発現を調節し, 脂肪細胞におけるグルコース輸送を増加させる<sup>54</sup>) ことから, トリプタンスリンは GLUT4 発現量をアップレギュレーションしたものと推測された.

PPAR $\gamma$ , および PI3K/Akt シグナル伝達経路は, 細胞分化と糖脂質代謝を司るため, 2 型糖尿病

治療薬, およびそのメカニズムを検討する上で多くの研究報告がなされている.<sup>55,56</sup>) これらの研究は, 細胞分化を促進し抗脂肪生成作用, または脂肪分解促進作用を増強することでインスリン抵抗性の改善が期待されるものである. したがって, *Persicaria tinctoria* 含有成分であるトリプタンスリンは, PPAR $\gamma$  を介して脂肪前駆細胞の細胞分化を促進し, 成熟脂肪細胞の糖脂質代謝能を亢進することでインスリン抵抗性の改善に寄与する新たな有用植物成分である可能性を有するものと考えられる.

## REFERENCES

- 1) Malone J. I., Hansen B. C., *Pediatr Diabetes*, **20**, 5–9 (2019).
- 2) Ruth A. H., Andrew S., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 547–560 (2017).
- 3) Halim M., Halim A., *Diabetes Metab. Syndr.*, **13**, 1165–1172 (2019).
- 4) Akter S., Goto A., Mizoue T., *J. Epidemiol.*, **27**, 553–561 (2017).
- 5) Unoki H., Takahashi A., Kawaguchi T., Hara K., Horikoshi M., Andersen G., Ng D.P., Holmkvist J., Borch-Johnsen K., Jørgensen T., Sandbaek A., Lauritzen T., Hansen T., Nurbaya S., Tsunoda T., Kubo M., Babazono T., Hirose H., Hayashi M.,

- Iwamoto Y., Kashiwagi A., Kaku K., Kawamori R., Tai E.S., Pedersen O., Kamatani N., Kadowaki T., Kikkawa R., Nakamura Y., Maeda S., *Nat. Genet.*, **40**, 1098–1102 (2008).
- 6) Scott L.J., Mohlke K.L., Bonnycastle L.L., Willer C.J., Li Y., Duren W.L., Erdos M.R., Stringham H.M., Chines P.S., Jackson A.U., Prokunina-Olsson L., Ding C.J., Swift A.J., Narisu N., Hu T., Pruim R., Xiao R., Li X.Y., Conneely K.N., Riebow N.L., Sprau A.G., Tong M., White P.P., Hetrick K.N., Barnhart M.W., Bark C.W., Goldstein J.L., Watkins L., Xiang F., Saramies J., Buchanan T.A., Watanabe R.M., Valle T.T., Kinnunen L., Abecasis G.R., Pugh E.W., Doheny K.F., Bergman R.N., Tuomilehto J., Collins F.S., Boehnke M., *Science*, **316**, 1341–1345 (2007).
- 7) Zhuo X., Zhang P., Hoerger T.J., *Am. J. Prev. Med.*, **45**, 253–261 (2013).
- 8) Beagley J., Guariguata L., Weil C., Motala A.A., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **103**, 150–160 (2014).
- 9) Yan Z., Sylvia H. L., Frank B.H., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 88–98 (2018).
- 10) Stumvoll M., Goldstein B.J., van Haefen T.W., *Lancet*, **365**, 1333–1346 (2005).
- 11) Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S., *Biochem. J.*, **15**, 109–116 (1999).
- 12) Thorpe S.R., Baynes J.W., *Amino Acids*, **25**, 275–281 (2003).
- 13) Robertson R.P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 42351–42354 (2004).
- 14) Marc P., Christopher J.N., *J. Clin. Invest.*, **116**, 1802–1812 (2006).
- 15) Monika G., Gilles M., Fabienne R., *Cell Stress*, **3**, 86–99 (2019).
- 16) Guilherme A., Virbasius J.V., Puri V., Czech M.P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 367–377 (2008).
- 17) Lihn A.S., Pedersen S.B., Richelsen B., *Obes. Rev.*, **6**, 13–21 (2005).
- 18) Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W., Hotamisligil G.S., *Nature*, **389**, 610–614 (1997).
- 19) Victoria R., Ivan N., Ulf S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 45777–45784 (2003).
- 20) Stepan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A., *Nature*, **409**, 307–312 (2001).
- 21) Okuno Y., Fukuhara A., Hashimoto E., Kobayashi H., Kobayashi S., Otsuki M., Shimomura I., *Diabetes*, **67**, 1113–1127 (2018).
- 22) Brookheart R.T., Michel C.I., Schaffer J.E., *Cell Metab.*, **10**, 9–12 (2009).
- 23) Brøns C., Grønnet L.G., *Eur. J. Endocrinol.*, **176**, R67–R78 (2017).
- 24) Janani C., Ranjitha Kumari B.D., *Diabetes Metab. Syndr.*, **9**, 46–50 (2015).
- 25) Kang S., Tsai L.T., Rosen E.D., *Trends Cell Biol.*, **26**, 341–351 (2016).
- 26) Hauner H., *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **18**, S10-15 (2002).
- 27) Han L., Shen W.J., Bittner S., Kraemer F.B., Azhar S., *Future Cardiol.*, **13**, 279–296 (2017).
- 28) Lee M.J., Jash S., Jones J.E.C., Puri V., Fried S.K., *J. Lipid Res.*, **60**, 856–868 (2019).
- 29) Martinez L., Berenguer M., Bruce M.C., Le Marchand-Brustel Y., Govers R., *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1300–1309 (2010).
- 30) Schreiber I., Dörpholz G., Ott C.E., Kragesteen B., Schanze N., Lee C.T., Köhrle J., Mundlos S., Ruschke K., Knaus P., *Sci. Rep.*, **7**, 17192 (2017).
- 31) Cheng D., Gao H., Li W., *Endokrynol. Pol.*, **69**, 381–394 (2018).
- 32) Tuccori M., Filion K.B., Yin H., Yu O.H., Platt R.W., Azoulay L., *BMJ*, **352**, i1541 (2016).
- 33) Hidayat K., Du X., Wu M.J., Shi B.M., *Obes. Rev.*, **20**, 1494–1503 (2019).
- 34) 中薬大辞典, 上海科学技術出版社, 小学館編, 小学館 (1998).
- 35) 南 善子, タデ科植物アイのインジカン代謝, 化学と生物, **39**, 202–207 (2001).
- 36) Honda G., Tabata M., Tsuda M., *Planta Med.*, **37**, 172–174 (1979).
- 37) Gaitanis G., Magiatis P., Mexia N., Melliou E., Efstratiou M.A., Bassukas I.D., Velegaki A., *Mycoses*, **62**, 597–603 (2019).
- 38) Wang Z., Wu X., Wang C.L., Wang L., Sun C., Zhang D.B., Liu J.L., Liang Y.N., Tang D.X., Tang Z.S., *Molecules*, **23**, E1062 (2018).
- 39) Han N.R., Moon P.D., Kim H.M., Jeong H.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **542**, 14–20 (2014).
- 40) Liao X., Zhou X., Mak N.K., Leung K.N., *PLoS One*, **8**, e82294 (2013).
- 41) Yu S.T., Chen T.M., Tseng S.Y., Chen Y.H., *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **358**, 79–84 (2007).
- 42) Kimura H., Tokuyama S., Ishihara T., Ogawa S., Yokota K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **108**, 102–1012 (2015).
- 43) Hammarstedt A., Gogg S., Hedjazifar S., Nerstedt A., Smith U., *Physiol. Rev.*, **98**, 1911–1941 (2018).
- 44) Pandey G.K., Vadivel S., Raghavan S., Mohan V., Balasubramanyam M., Gokulakrishnan K., *Atherosclerosis*, **288**, 67–75 (2019).
- 45) Lehrke M., Lazar M.A., *Cell*, **123**, 993–999 (2005).
- 46) Li B., Fang J., He T., Yin S., Yang M., Cui H., Ma X., Deng J., Ren Z., Hu Y., Ye G., Zhang M., Geng Y., Gou L., Zuo Z., *Cytokine*, **119**, 168–174 (2019).
- 47) Bolden A., Bernard L., Jones D., Akinyeke T., Stewart L.V., *PPAR Res.*, **2012**, 929052 (2012).
- 48) LeBrasseur N.K., Kelly M., Tsao T.S., Farmer S.R., Saha A.K., Ruderman N.B., Tomas E., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E175–181 (2006).
- 49) Rosen E.D., MacDougald O.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 885–896 (2006).
- 50) Paar M., Jüngst C., Steiner N.A., Magnes C., Sinner F., Kolb D., Lass A., Zimmermann R., Zumbusch A., Kohlwein S.D., Wolinski H., *J. Biol. Chem.*, **287**, 11164–11173 (2012).
- 51) Lee I., Kim J., Ryoo I., Kim Y., Choo S., Yoo I., Min B., Na M., Hattori M., Bae K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5577–5581 (2010).
- 52) Jiang L., Zhang N.X., Mo W., Wan R., Ma C.G., Li X., Gu Y.L., Yang X.Y., Tang Q.Q., Song H.Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 185–190 (2008).
- 53) Corrêa-Giannella M.L., Machado U.F., *Pharmacogenomics*, **14**, 847–850 (2013).
- 54) Kudo M., Sugawara A., Uruno A., Takeuchi K., Ito S., *Endocrinology*, **145**, 4948–4956 (2004).
- 55) Balakrishnan B.B., Krishnasamy K., Choi K.C., *Biomed. Pharmacother.*, **103**, 719–728 (2018).
- 56) Muthukumaran P., Thiyagarajan G., Arun Babu R., Lakshmi B.S., *Chem. Biol. Interact.*, **284**, 80–89 (2018).