

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	コノ 太亮 金野 太亮（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 13 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	タデ藍 <i>Persicaria tinctoria</i> 含有機能性成分の PPAR 活性化を介したインスリン抵抗性の改善及び TNF- α 誘導炎症モデルにおける抗炎症作用の研究
論文審査委員	主査 教授 丹野 孝一
	副査 教授 内田 龍児
	副査 教授 佐々木 健郎

タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有機能性成分の PPAR γ 活性化
を介したインスリン抵抗性の改善及び
TNF- α 誘導炎症モデルにおける抗炎症作用の研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程

生薬学教室

金野太亮

目次

略語一覧	5
緒言	7
本論	
第1章 タデ藍 <i>Persicaria tinctoria</i> 含有成分 Indirubin による PPAR γ 活性化と 脂肪細胞におけるインスリン抵抗性改善作用の検討	
第1節 序	11
第2節 実験材料及び実験方法	
1. 試薬・材料	15
2. PPAR γ リガンド活性の測定	15
3. 使用細胞および細胞培養	16
4. 細胞生存率の測定	16
5. Oil Red O 染色	17
6. 脂肪前駆細胞における分化能促進効果の検討	17
7. 成熟脂肪細胞における脂肪滴量減少効果の検討	17
8. 成熟脂肪細胞における glucose 消費量の測定	18
9. 成熟脂肪細胞における GLUT4 発現量の測定	18
10. 成熟脂肪細胞における adiponectin 発現量の測定	18
11. 成熟脂肪細胞における estrogen 分泌量の測定	19
12. 統計解析	19

第3節 結果

1. Indirubin の PPAR γ リガンド活性 19
2. 細胞生存率に対する indirubin, 及び rosiglitazone の影響 20
3. 脂肪前駆細胞の細胞分化に対する indirubin の影響 21
4. 成熟脂肪細胞における肥大化脂肪滴量
 に対する indirubin の影響 26
5. 成熟脂肪細胞における glucose 消費量
 に対する indirubin の影響 28
6. 成熟脂肪細胞における GLUT4 発現量
 に対する indirubin の影響 30
7. 成熟脂肪細胞における adiponectin 分泌量
 に対する indirubin の影響 31
8. 成熟脂肪細胞における estrogen 分泌量
 に対する indirubin の影響 32

第4節 考察 34

第2章 ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導炎症モデルを用いたタデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 Tryptanthrin の抗炎症メカニズムの検討

第1節 序 38

第2節 実験材料及び実験方法

1. 試薬・材料 40
2. PPAR γ リガンド活性の測定 40

3. 使用細胞および細胞培養	40
4. 細胞生存率の測定	40
5. COX-2, 及び ICAM-1 発現量の測定	41
6. 統計解析	41
第3節 結果	
1. Tryptanthrin の PPAR γ リガンド活性	41
2. 細胞生存率に対する tryptanthrin の影響	43
3. ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導性 COX-2 発現量に対する tryptanthrin の影響	44
第4節 考察	47
総括	50
謝辞	52
引用文献	53
論文目録	67

略語一覧

以下の略語を本文，及び図表中において使用した。

AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

AP-1 : Activator Protein-1

5-ASA : 5-Aminosalicylic Acid

ALP : Alkaline Phosphatase

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

BSA : Bovine Serum Albumin

cAMP : cyclic AMP

CBP : CREB-Binding Protein

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

COX-2 : Cyclooxygenase-2

DDS : Drug Delivery System

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

D-PBS : D-Phosphate-Buffered Saline

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase

FBS : Fetal Bovine Serum

GLUT4 : Glucose Transporter 4

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IL : Interleukin

I κ B : Inhibitor κ B

LD : Lipid Droplet

LT : Leukotriene

MAdCAM-1 : Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

NF- κ B : Nuclear Factor- κ B

NSAIDs : Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug

ORO : Oil Red O

PAK-1 : p21 Activated Kinase

PG : Prostaglandin

PI3K : Phosphatidylinositol-3 Kinase

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PPRE : Peroxisome Proliferators Response Elements

QOL : Quality of Life

RXR : Retinoid X Receptor

TG : Triglyceride

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TX : Thromboxane

UC : Ulcerative Colitis

緒言

タデ藍 *Persicaria tinctoria* は、タデ科イヌタデ属の一年生植物であり、古来より藍染めの染料や食用、及び生薬¹⁾として活用することで我々は様々な恩恵を享受してきた。特に本邦では植物の「藍」は「藍染め」が広く普及して様々な染料の基本としての利用があったことから、染料としての認識が強い。染料としての歴史は世界的にも古く、現存する最古のものは古代エジプトの紀元前2000年頃のミイラに巻かれた藍染めの麻布とされている²⁾ことから、藍染めは長年にわたって人間のくらしと密接に関わってきた。

藍染めがこれほどまでに普及したのは、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る。藍葉には無色の配糖体である *indican* が大量に含有されており、これが植物液胞中に存在する β -glucosidase で分解される際に非常に不安定な中間生成体 *indoxyl* を生成する。³⁾ この *indoxyl* が空气中で酸化されることで安定な二量体へと重合し、普段我々が良く目にする藍染めの染料 *indigo* が生成する。この藍染め染色液を作る発酵過程で *indigo* の 3,2'-bisindole 異性体である赤色色素 *indirubin* (Fig. 1A) は生成するが、この *indirubin* は抗真菌活性⁴⁾、抗がん作用^{5,6)}、免疫調整作用⁷⁾、抗ウイルス作用⁸⁾、及び抗 *trypanosoma* 活性⁹⁾ 等の多彩な生物活性を有することが報告されている。また、タデ藍含有成分に着目すると、特に天然植物成分としては希少な *indoloquinazoline* 骨格を有する黄色色素 *tryptanthrin* (Fig. 1B) は、抗菌活性¹⁰⁾、抗真菌活性¹¹⁾、抗炎症作用¹²⁾、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患改善作用¹³⁾、及び抗がん剤としての可能性^{14,15)} 等、*indirubin* と同様に極めて多彩な生物活性が認められている。この2つの成分は、タデ藍に含まれる機能性成分の一部に過ぎないが、これらの知見はタデ藍の優れた有用性を科学的に裏付ける根拠である。

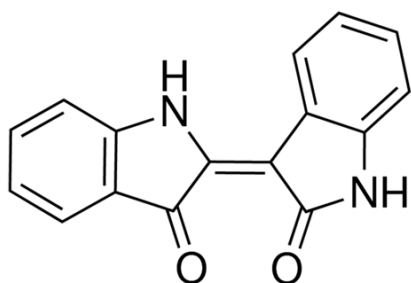
このようにタデ藍は我々の豊かなくらしの創出と伝統文化の継承に大きく貢献したものの、1880年ドイツ人化学者 Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer が indigo の合成に成功した¹⁶⁾のを皮切りに、天然 indigo は合成 indigo によって変わられ研究分野における関心事からも遠のいてしまった。しかし、我々人類が古くからタデ藍と関わってきた史実を紐解き、先人の知恵を礎に新たな可能性や価値を創造することも生薬学、漢方薬をはじめとした天然物由来の医薬品研究においては非常に重要である。また、indirubin, 及び tryptanthrin の生物活性に関する知見は、最近明らかとなったものがほとんどであることから、分析技術の進歩によって、タデ藍に対する興味と期待が高まってきている。

PPAR は核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、転写調節因子として遺伝子発現、及び転写制御を介して多彩な生体機能調節を行う。現在、PPAR は大きく PPAR α , PPAR β/δ , 及び PPAR γ の3種類のサブタイプが同定され、これらはサブタイプ毎に特異的な組織発現パターンを有しており、標的遺伝子も同一のものから特徴的なものまで多岐にわたる。¹⁷⁾なかでも PPAR γ は、細胞分化、糖脂質代謝、炎症、及び免疫応答等の様々な生理機能を司ることから、2型糖尿病、がん、炎症性疾患等の発症機序解明、及び治療薬開発における分野で注目されている。^{18,19)}これは PPAR γ が司る生理機能発現に係る一連の制御機構が非常に複雑、かつ厳密でありながらも、主作用のみを発揮する適切なリガンド部位への結合を介した著効を示す新たな治療薬創出の可能性を秘めている。PPAR γ の分子構造はN末端側よりリガンド非依存的に転写調節を行う A/B ドメイン、DNA 結合領域である C ドメイン、ヒンジ領域である D ドメイン、及びリガンド依存的に転写調節を行う E/F ドメインの4つのドメインからなるが、このうち E/F ドメインには12個の α -helix 構造をもつリガンド結合領域が存在する。²⁰⁾この部位にリガンドが結合することで分子間相互作用により α -helix 構

造を含む E/F ドメインの立体構造変化が起こり、coactivator、及び RXR との複合体形成を経て、PPRE に結合することで転写活性化を誘導する。²¹⁾ この一連の反応において、重要な役割をもつ PPAR γ リガンドは数多く知られており内因性のものとしては長鎖脂肪酸、エイコサノイド、及びリポタンパク質²²⁾、外因性のものとしては thiazolidinedione 系 2 型糖尿病治療薬、angiotensin 受容体拮抗薬²³⁾、及び一部の NSAIDs 等があげられる。この様な多種多様な化合物が PPAR γ という同一たんぱく質を標的にしているにも関わらず、多彩な生理活性を示すということは、結合したリガンドにより誘導された立体構造変化、及びそこにさらに結合する coactivator の種類や親和性が影響する²¹⁾ ことで、最終的に PPAR γ リガンド複合体が取り得る立体構造に基づき、結合できる DNA 領域が異なることに起因するものと考えられる。結合する DNA 領域が異なれば、それに伴って発現する標的遺伝子にも差異がみられるため、結果として多彩な生理機能や薬効を示す。この厳密、かつ複雑に制御されているプロセスに着目することで、各疾患に応じた強力な主作用を有しながらも副作用が非常に少ない治療薬開発に貢献できる可能性がある。

当研究室では多くのサンプルに対して PPAR γ リガンド活性のスクリーニングを行っているが、タデ藍エタノール抽出エキスにおいて極めて強い PPAR γ リガンド活性を認めた。これより更なるスクリーニングを行ったところ indirubin、及び tryptanthrin の 2 種類の成分が PPAR γ リガンド活性を示したことに着目し、新規治療薬になり得る可能性とその作用機序について検討した。第 1 章では、3T3-L1 脂肪細胞株を用いた indirubin のインスリン抵抗性改善作用の検討を行い、その作用メカニズムを明らかにした。第 2 章では、ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導炎症モデルを用いて UC における tryptanthrin の抗炎症メカニズムの検討を行った。

A)



B)

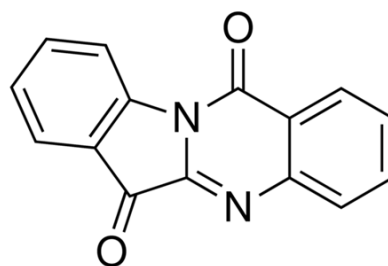


Fig. 1 Structures of compounds.

A) Indirubin, B) Tryptanthrin.

本論

第 1 章

タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 Indirubin による PPAR γ 活性化と 脂肪細胞におけるインスリン抵抗性改善作用の検討

第 1 節 序

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のひとつであり、遺伝的素因に肥満、運動不足、過食やストレス等の環境因子^{24,25)}、及び加齢²⁶⁾や喫煙²⁷⁾等の多様な因子が複雑に関与することで発症する。発症原因は完全に明らかにはなっていないが、KCNQ2²⁸⁾やTCF2L7²⁹⁾等の遺伝子多型も発症、及び進展に強く関連することが示されている。また、本疾患の初期段階では自覚症状が乏しく、罹患者が症状を自覚した際には糖尿病 3 大合併症である糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、及び末梢神経障害に加え、高血圧やアテローム性動脈硬化症等の循環器疾患も多数認められる³⁰⁾ことから、ほとんどの患者が一生涯治療を要する。近年、糖尿病はこれらの合併症だけにはとどまらず、ガン³¹⁾、認知症³²⁾、骨粗鬆症³³⁾や歯周病³⁴⁾など多岐に渡る疾患との関連性も明らかとなっているため、本疾患は世界的にみても公衆衛生問題といえることができる。現在、糖尿病患者数は全世界で 4 億 2,200 万人以上と推計されているが 2045 年までには 6 億 9,300 万人^{35,36)}と 1.6 倍に急増するという予測がなされていることから、糖尿病を含む合併症、及び関連疾患に対する医療費が激増していく現状³⁷⁾を鑑みると、早期発見、早期治療以上に発症予防が喫緊の課題である。

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と考えられており、インスリンのはたら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。³⁸⁾このとき生体内では、glucose や fructose などの糖分子が

amadori 転位反応や imino 転位反応など複雑な多段階反応過程を経て 3-deoxyglucosone や methylglyoxal 等のアルデヒド基を有する化合物が生成し、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、及び脂質中のヒドロキシ基に対し非酵素的糖化反応、所謂 maillard 反応が進行する。^{39,40)} この現象は carbonyl stress として知られており、膵β細胞内で生じた場合に膵β細胞数やインスリン分泌量の低下に起因した膵β細胞機能障害を誘発する^{41,42)} だけではなく、過剰な血中 glucose を glycogen として蓄える肝臓や骨格筋、及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、更なるインスリン抵抗性の増悪を引き起こす。^{43,44)}

成熟脂肪細胞は adiponectin や leptin などの adipokine、及び estrogen を産生しインスリン感受性の亢進に寄与する⁴⁵⁾ が、脂肪細胞の分化障害は adipokine の産生に多大な影響を与える (Fig. 2)。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共に、TNF- α ⁴⁶⁾、IL-6⁴⁷⁾、及び resistin⁴⁸⁾ 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、及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。⁴⁹⁾ 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する⁵⁰⁾ ことから、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。⁵¹⁾ 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 carbonyl stress、及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 γ は、核内で RXR とヘテロ二

量体を形成し、標的遺伝子の promoter 領域に存在する PPRE へ結合することで、coactivator, 及び corepressor と協調しながら標的遺伝子発現を調節する。⁵²⁾ PPAR γ は脂肪細胞分化の master regulator 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⁵³⁾として注目されている。このため、PPAR γ リガンド活性を有する pioglitazone や rosiglitazone 等の thiazolidinedione 系誘導体は、脂肪細胞に発現する PPAR γ に結合し細胞分化を促進すると共に、apoptosis 誘導を通してインスリン抵抗性を惹起する TNF- α , 及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。⁵⁴⁻⁵⁶⁾ さらに、GLUT4 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^{57,58)}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⁵⁹⁾, 膀胱がん⁶⁰⁾, 及び骨折⁶¹⁾等の罹患リスク上昇も問題視されているため、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。

近年、タデ藍に含まれる新規フラボノイド配糖体が HMG-CoA reductase 阻害作用を示す⁶²⁾ことが明らかとなったことで、タデ藍を食用として用いることも広まってきている。このことは、タデ藍含有成分が脂質代謝への影響を介して脂肪毒性の軽減に寄与するものと考えられるが、糖代謝、及びインスリン感受性に対する影響を評価した研究は極わずかである。今日、2型糖尿病に対する薬物療法には主に経口血糖降下薬、インスリン注射製剤、及び合併症に対する治療薬も含めるとその選択肢は多岐にわたる⁶³⁾が、これらの手段をもってしても依然として全症例に対し満足いく治療成績を得られていない症例も存在することを踏まえ、本研究ではタデ藍含有成分 indirubin のインスリン抵抗性改善作用、及び新規2型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。

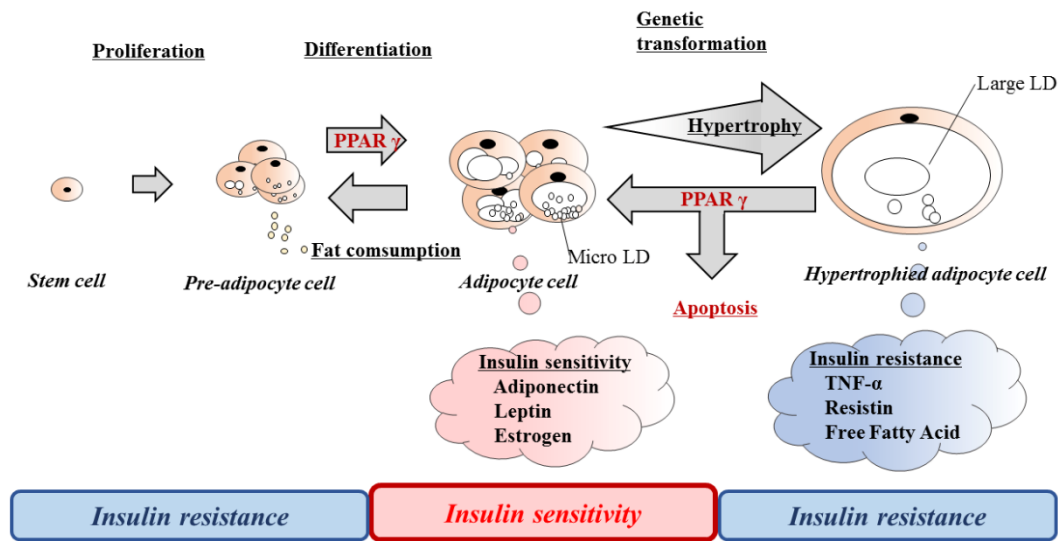


Fig. 2 Differentiation process of adipocytes and insulin sensitivity.

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 γ regulates the differentiation of pre-adipocytes and glucose and lipid metabolism in mature adipocytes, PPAR γ ligand may serve as a therapeutic target for type 2 diabetes mellitus.

第 2 節 実験材料及び実験方法

1. 試薬・材料

Penicillin, amphotericin B, SIGMAFAST™ (*p*-Nitrophenyl phosphate tablets), 及び tryptanthrin は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan) から, また PPAR γ 抗体 (Rabbit polyclonal), 及び 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, 特段言及が無ければ FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) より入手したものである.

2. PPAR γ リガンド活性の測定

PPAR γ の供給源として 7 週齢の雄性 ICR マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) を isoflurane 過剰吸入により安楽死させた後, 内臓脂肪を摘出した. この内臓脂肪 75 mg に D-PBS (-) 1 mL を加え超音波にて破碎しホモジネートを調製し, 遠心分離 (13,000 \times g, 15 分間)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 γ リガンドの PPAR γ 結合能を測定した. CBP を 37 °C, 1 時間 96-well plate (VIOLAMO, AS ONE, Osaka, Japan) に固定した後 D-PBS (-) 200 μ L で洗浄し, 調製したマウス内臓脂肪ホモジネート上清 (protein 量 : 1 mg/well), 及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% skim milk 200 μ L 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 γ 抗体 (Rabbit polyclonal), 2 次抗体として ALP 結合 IgG 抗体 (Goat anti-rabbit IgG) を各々 500 倍, 及び 40 倍希釈し順次 200 μ L/well 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 (MB100-2A, Hangzhou Allsheng Instruments Co.,Ltd., Hangzhou,

China) 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. また, PPAR γ antagonist GW9662 併用時は最終濃度が規定濃度になるように調製した GW9662 溶液 10 μ L を添加し 15 分間 600 rpm にて振とう後, 各サンプルを添加した. 尚, 本実験では positive control として thiazolidinedione 系 2 型糖尿病治療薬である pioglitazone を用いた.

3. 使用細胞および細胞培養

マウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞株は American Type Cell Culture Collection (VA, USA) より購入した. 本細胞は, 10% FBS (Gibco-BRL, MA, USA) を含む DMEM 70 mL を入れた接着細胞用フィルターキャップフラスコ (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo, Japan) 中で培養した. 培養中は培地に 100 U/mL penicillin, 25 μ g/mL amphotericin B を加え, 37 °C, 飽湿, 5% CO₂ 条件下で継代培養した.

4. 細胞生存率の測定

細胞生存率は, WST 法を用いて決定した. 未分化な本細胞を 96-well plate に 5.0×10^3 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 1 nM から 10 μ M となるように調製したサンプルを DMEM に加え, 更に 24 時間培養した. その後, 培地中に Cell Count Reagent SF (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を 10 μ 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. Oil Red O 染色

培地を除去し D-PBS (-) で洗浄後, 10% formaldehyde 200 μ L を加え, 1 時間室温静置した. 10% formaldehyde を除去し, D-PBS (-) で洗浄した. 次に ORO 染色液 (60% (v/v) 2-propanol 中に SdanIII を 3 mg/mL で溶解) 200 μ 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 μ 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

脂肪前駆細胞へ分化させる際は, 10% FBS (Gibco-BRL, MA, USA), 100 U/mL penicillin, 25 μ g/mL amphotericin B, 0.25 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone, 及び 1.7 μ M insulin を含む DMEM (分化誘導培地, MDI 培地) を用いて, 未分化 3T3-L1 細胞 5.0×10^3 cells/well を 96-well plate に播種できるように細胞懸濁液を調製し播種後, 7 日間分化誘導した. サンプルは 100% DMSO に溶解後, 培地で希釈し目的濃度に調製した. PPAR γ antagonist GW9662 添加時は, 先に GW9662 処理を行った後サンプルを添加した. 尚, 本実験では positive control として thiazolidinedione 系糖尿病治療薬である rosiglitazone を用いた. 2 日間おきに培地交換, 及びサンプル添加を行い, 培養終了後に ORO 染色液にて脂肪滴を染色し Nikon ECLIPSE Ts2 を用いて観察, 並びに撮影した.

7. 成熟脂肪細胞における脂肪滴量減少効果の検討

未分化な細胞を 96-well plate に 5.0×10^3 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 penicillin, 25 μ g/ml amphotericin B, 0.425 μ M insulin) 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 ORO 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% 2-propanol 100 μ 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 glucose 消費量の測定

完全に分化させた成熟脂肪細胞を、indirubin (1 nM-1 μ M)、及び rosiglitazone (1 nM-1 μ M) 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、及び 3 時間経過後の培地を回収し経時的な培地中 glucose 濃度を測定した。Glucose 濃度は、Glucose Assay KIT (CELL BIOLABS INC, CA, USA) で測定した。

9. 成熟脂肪細胞における GLUT4 発現量の測定

完全に分化させた成熟脂肪細胞を、indirubin (10 nM-1 μ M)、及び rosiglitazone (10 nM-1 μ M) の存在下で 4 日間培養した細胞を D-PBS (-) で洗浄し回収後、RIPA Buffer に懸濁し超音波処理した細胞ホモジネート液をサンプルとした。このサンプルを 96-well plate に播種し 4°C、24 時間インキュベートした。洗浄後、5% skim milk 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 GLUT4 抗体 (Rabbit polyclonal ; BIOSS ANTIBODY, MA, USA)、2 次抗体として ALP 結合 IgG 抗体を各々 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、405 nm における吸光度を測定した。

10. 成熟脂肪細胞における adiponectin 発現量の測定

完全に分化させた成熟脂肪細胞を、indirubin (10 nM-1 μ M)、及び rosiglitazone (10 nM-1 μ M) の存在下で 4 日間培養し、LBIS® 高分子 adiponectin 測定キットを

使用して培地中の adiponectin 濃度を測定した。

11. 成熟脂肪細胞における estrogen 分泌量の測定

完全に分化させた成熟脂肪細胞を, indirubin (1 nM-1 μ M) の存在下で 4 日間培養し, 17 β -Estradiol ELISA kit (Enzo Biochem, Inc, NY, USA) を使用して培地中の estrogen 濃度を測定した。

12. 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) を使用した。全ての結果は, 平均値 \pm 標準偏差で表記した。

第 3 節 結果

1. Indirubin の PPAR γ リガンド活性

Indirubin (5 nM-500 nM) の PPAR γ リガンド結合活性を測定した。50 nM pioglitazone と比較し, 50 nM indirubin は 1.35 倍強い活性を示した ($p < 0.001$) (Fig. 3A)。この結果より, indirubin は pioglitazone と同様に PPAR γ リガンド結合活性を有することが示された。次に, 5 nM の indirubin と PPAR γ antagonist GW9662 (1 nM-100 nM) 併用時における indirubin 結合活性を測定した。Fig. 3B に示すように, 1 nM または 10 nM の GW9662 併用により, 結合活性は濃度依存的に有意に抑制された。これらの結果より, indirubin は PPAR γ リガンド結合ドメインへ結合する PPAR γ agonist であることが示された。

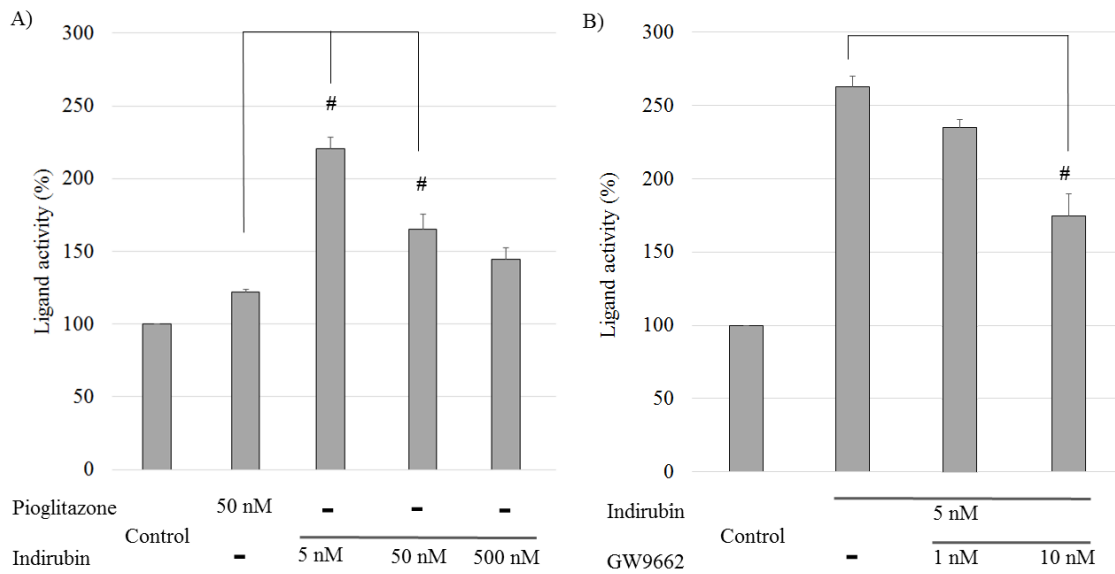


Fig. 3 PPAR γ ligand activity of indirubin.

A) PPAR γ ligand-binding activity of indirubin. $^{\#}P < 0.001$ vs. 50 nM pioglitazone. B) The ligand activity of indirubin was suppressed in a dose-dependency manner by the PPAR γ antagonist GW9662. $^{\#}P < 0.001$ vs. 5 nM indirubin. All values are presented as means \pm S.D. (n = 3).

2. 細胞生存率に対する indirubin, 及び rosiglitazone の影響

Indirubin, 及び rosiglitazone の脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞株) に対する細胞毒性を WST 法で評価した. Fig. 4 に示すように, 1 μ M までは細胞生存率に全く影響を及ぼさないが, 10 μ M を超える indirubin と rosiglitazone の両方が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 μ M を除いた 1 nM から 1 μ M における測定・評価を行った.

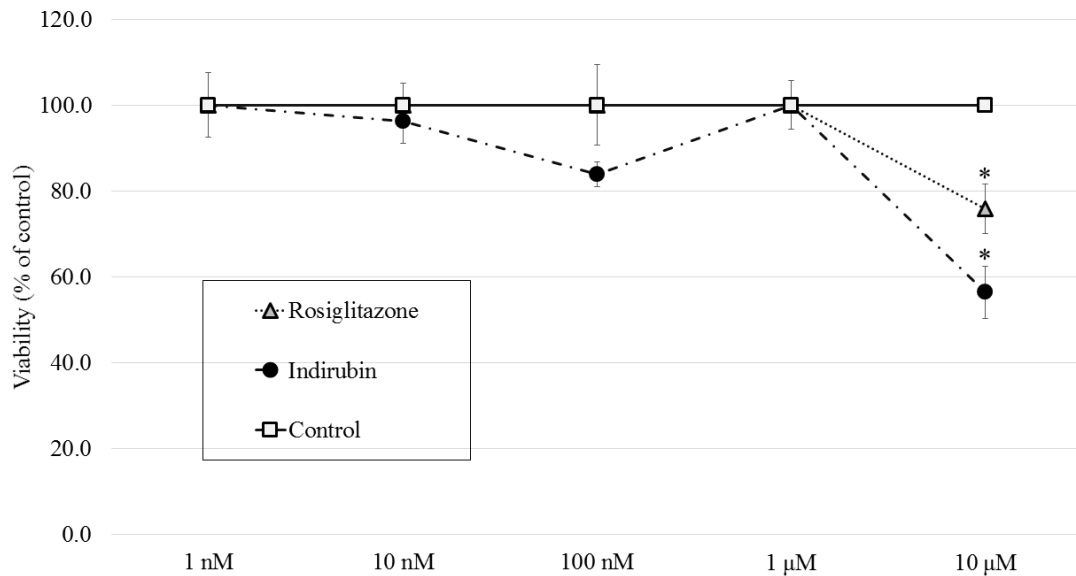


Fig. 4 The cytotoxicity of indirubin and rosiglitazone in 3T3-L1 preadipocytes.

Compared to vehicle control, both indirubin and rosiglitazone groups significantly decreased survival at 10 μM (*P < 0.05 vs. control). The cells were treated with samples (1 nM-10 μM) for 24 h. All values are presented as means ± S.D. (n = 3).

3. 脂肪前駆細胞の細胞分化に対する indirubin の影響

Indirubin は PPAR γ リガンド活性を示したことから、LD の生成、及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 indirubin、及び rosiglitazone 添加後 7 日間培養し、LD を ORO 染色した。

1) 脂肪前駆細胞に対する indirubin、及び rosiglitazone の影響 Fig. 5A に示すように、indirubin (1 nM-1 μM) で処理した細胞は control 群と比較し成熟脂肪細胞に分化したことが ORO 染色から明らかになったが、その分化刺激作用はインスリン非依存的であり、明確な濃度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, indirubin 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 large LD 断片が小さな micro LD に分散していることを認めた. 一方, インスリン非存在下では, indirubin 処理した細胞は control 群と比較して脂肪細胞分化を促進したが, インスリン存在下と比較し細胞の成熟度は低かった. このことから, indirubin 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. また, rosiglitazone (1 nM-1 μ M) で処理した細胞は, control 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, indirubin の結果と同様に明確な濃度依存性は示さなかった(Fig. 5B). しかし, インスリン存在下では, rosiglitazone 処理した脂肪前駆細胞は, indirubin と同様に形態学的変化, 及び micro LD を認めた. このことから, インスリン非存在下では rosiglitazone 処理した細胞は control 群と比較すると細胞分化を促進したが, 細胞分化, 及び成熟度は indirubin に比較して低いことが示唆された.

2) PPAR γ antagonist GW9662 併用時における indirubin, 及び rosiglitazone の脂肪前駆細胞に対する影響 未熟 3T3-L1 細胞を PPAR γ antagonist GW9662 (1 nM-1 μ M) の非存在下, 及び存在下で 1 μ M indirubin, 及び rosiglitazone 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. 6B, 及び 6D に示す. GW9662 (1 nM-1 μ M) 併用下において indirubin で処理した細胞では, indirubin 単独群と比較して LD の生成, 及び成熟脂肪細胞分化に低下が認められた (Fig. 6A, 6C). すなわち, 1 μ M GW9662 処理した細胞ではインスリン非依存的に強い生育障害が認められ, GW9662 (1 nM-100 nM) で処理した細胞は脂肪細胞分化に伴う large LD, 及び micro LD の分散が認められ, インスリン存在下では, indirubin で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, indirubin 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 indirubin は PPAR γ を介して LD 生成、及び成熟脂肪細胞分化作用を示すことが示唆された。また、Fig. 6D に示すように、GW9662 (1 nM-1 μ M) 併用下において rosiglitazone で処理した細胞では、rosiglitazone による LD の生成、及び成熟脂肪細胞分促進作用に抑制が認められた。Indirubin に対する影響と同様に、1 μ 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、GW9662 1 μ M を除くその他のでは LD の分散が観察された。また、インスリン存在下では、rosiglitazone 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、細胞の成熟度は同様に高かった。以上の結果より、indirubin は rosiglitazone と同様に PPAR γ 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, 及び 6C に示すように 1 μ M tryptanthrin で処理した細胞は、control 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。

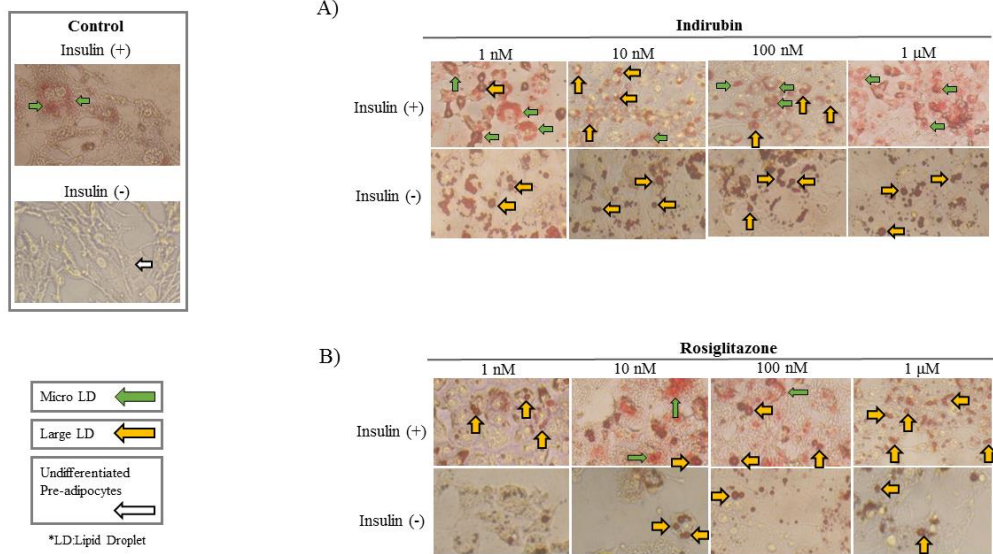


Fig. 5 The effects of indirubin on adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

Pre-adipocytes were cultured DMEM supplemented with 10 % FBS, antibiotic-antimycotic solution, 0.25 mM isobutyl-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, 1.7 μM insulin. After ORO staining, photographs of cells cultured without GW9662 were taken at Olympus CKX31 (magnification:×200). The treated group of 1 μM indirubin and rosiglitazone without GW9662 (1 nM-1 μM).

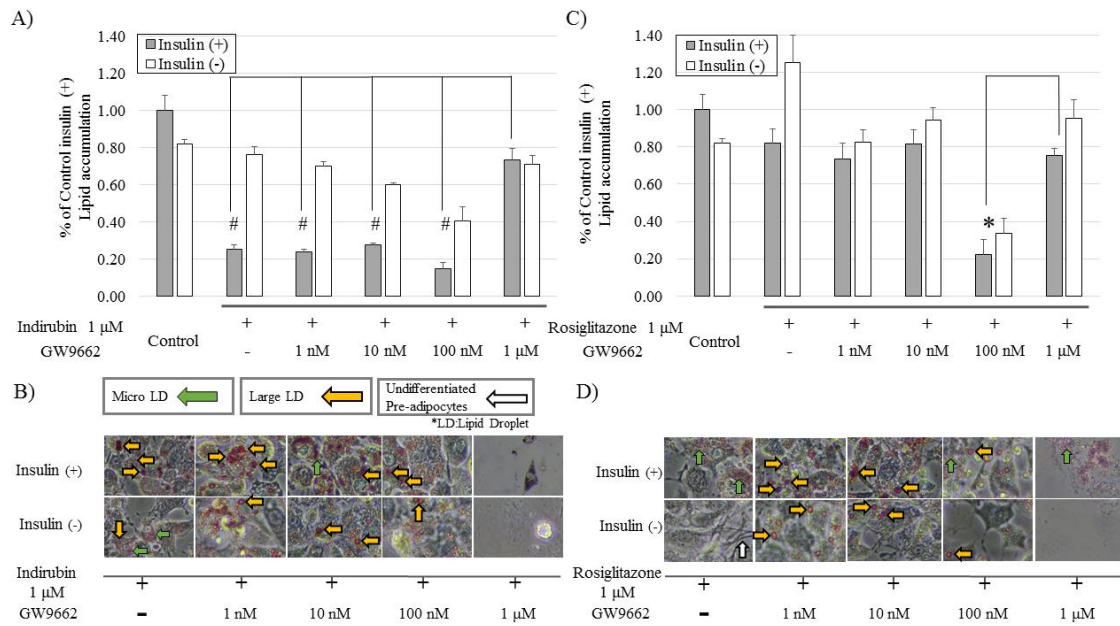


Fig. 6 The effects of rosiglitazone on adipocyte differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes.

Pre-adipocytes were cultured DMEM supplemented with 10 % FBS, antibiotic-antimycotic solution, 0.25 mM isobutyl-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, 1.7 μM insulin. Photographs of cells cultured with GW9662 were taken at Nikon ECLIPSE Ts2 (magnification:×200) . The treated group of 1 μM indirubin and rosiglitazone with GW9662 (1 nM-1 μM). After ORO staining, the ORO dye was eluted and quantified at 510 nm. All values are presented as means ± S.D. (n = 3, *P < 0.05 vs. 1 μM rosiglitazone).

4. 成熟脂肪細胞における肥大化脂肪滴量に対する indirubin の影響

3T3-L1 細胞を MDI 培地で 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 indirubin の影響を評価した。

Fig. 7C に示すように、indirubin (1 nM-1 μ M) は control 群と比較して、細胞分化を適正化し過剰な脂肪蓄積を濃度依存的に有意に抑制した。また、Fig. 7A に示すように、control 群では LD 蓄積量の増加に加え large LD が観察されたが、indirubin (1 nM-1 μ M) で処理した細胞では濃度依存性は見られなかったものの LD サイズの縮小と多数の micro LD の分散を認めた。

同様に、rosiglitazone (1 nM-1 μ M) においても control 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. 7D に示すように、rosiglitazone (1 nM-1 μ M) で処理した細胞でも濃度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、indirubin は PPAR γ 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。

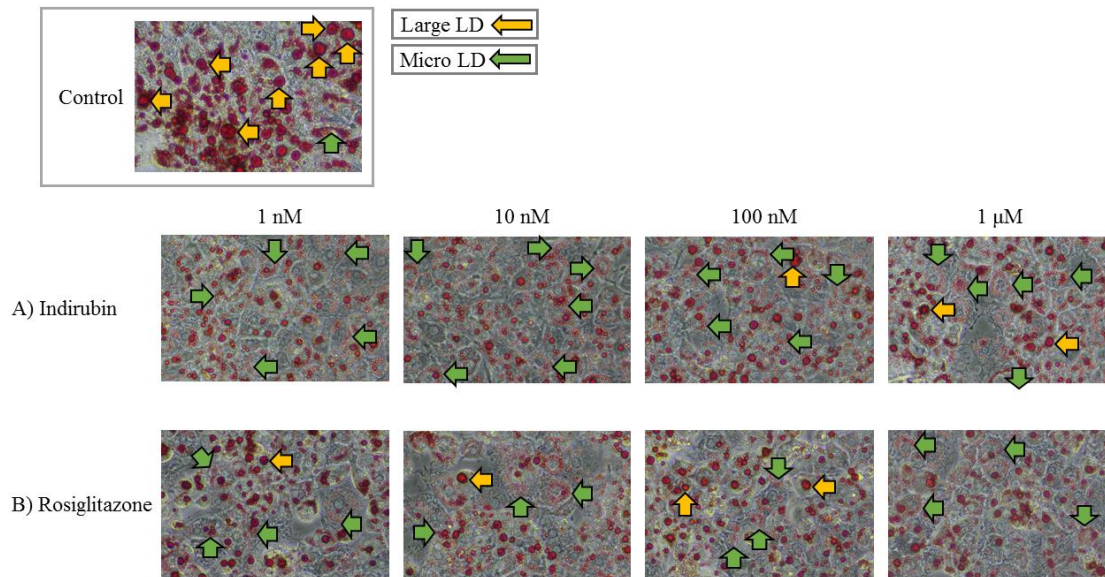


Fig. 7 The indirubin and rosiglitazone reduced lipid droplet size and accumulation in mature adipocytes.

After ORO staining, photographs of cells cultured were taken at Nikon ECLIPSE Ts2. A) Oil Red O staining of indirubin treated group (magnification: $\times 200$), B) Oil Red O staining of rosiglitazone treated group (magnification: $\times 200$).

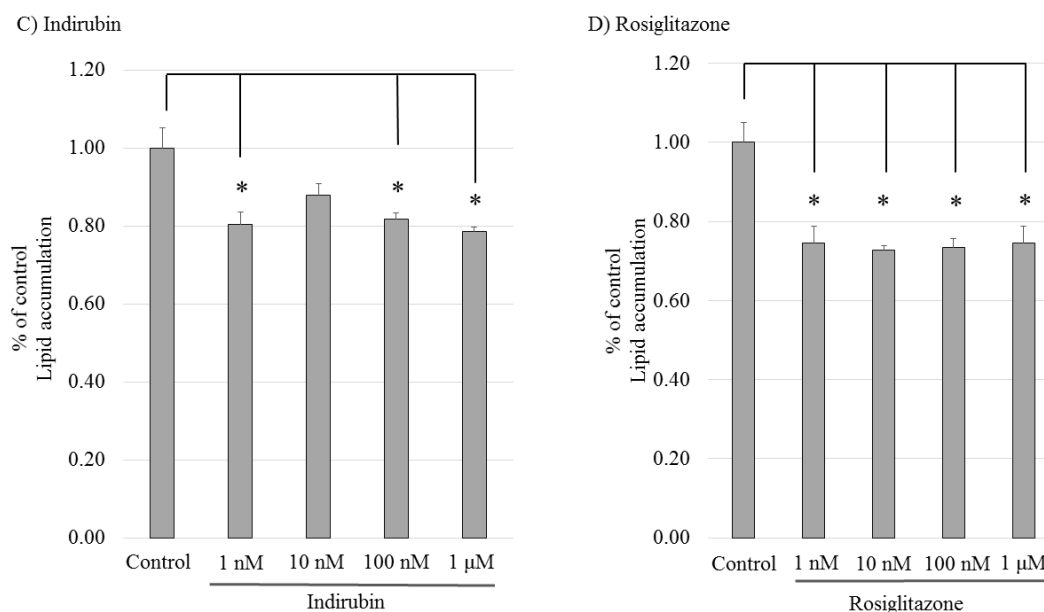


Fig. 7 The indirubin and rosiglitazone reduced lipid droplet size and accumulation in mature adipocytes.

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

5. 成熟脂肪細胞における glucose 消費量に対する indirubin の影響

Glucose 代謝系に対する indirubin, 及び rosiglitazone の影響を検討するにあたり, 成熟脂肪細胞における glucose 消費に与える影響を測定・評価した. Indirubin (1 nM-1 μM) で処理した細胞では, control 群と比較し測定開始 1 時間経過後には明確な濃度依存性は認められなかったものの全濃度で有意な glucose 濃度の低下を示した (Fig. 8A). また, glucose 濃度が最も低下した 1 μM indirubin で処理した細胞は, control 群と比較し glucose 濃度が 13.7% 低下した. 同様に rosiglitazone (1 nM-1 μM) で処理した細胞でも, 測定開始 1 時間経過後には明確な濃度依存性

は認められなかったが、1 nM を除く 10 nM, 100 nM, 及び 1 μ M で有意な glucose 濃度の低下を示した (Fig. 8B). このことから, indirubin は, rosiglitazone と同程度かそれ以上の glucose 消費を促進する作用を有することが示唆された.

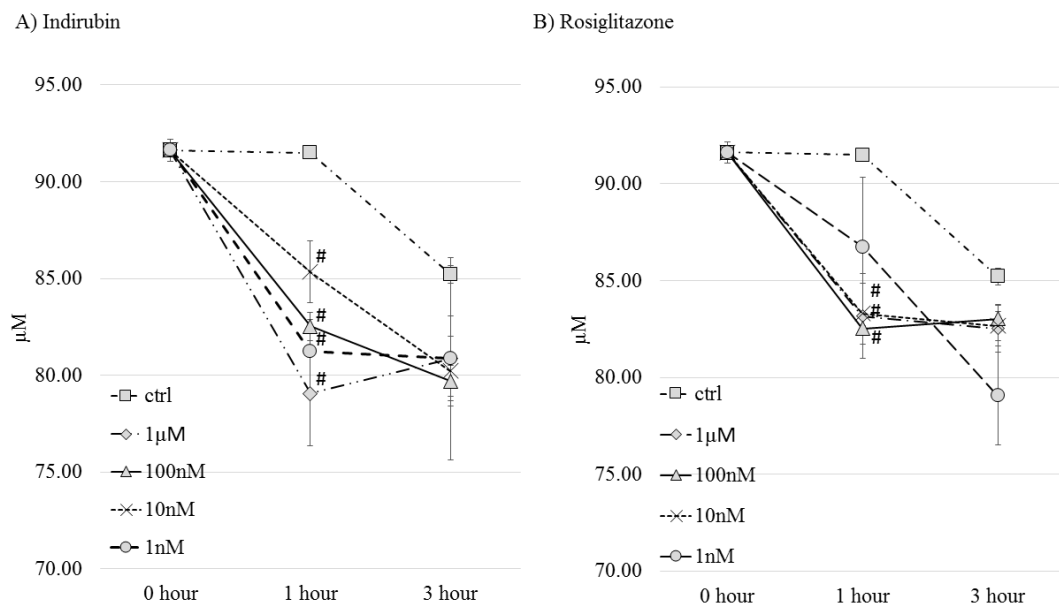


Fig. 8 Effects of indirubin on glucose consumption in 3T3-L1 mature adipocytes.

Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were incubated with samples for 96h. The glucose concentrations in the medium were determined by the glucose oxidase method. A) Effects of indirubin on glucose consumption. All indirubin treated groups indicated a significant difference. B) Effects of rosiglitazone on glucose consumption. The 10 nM, 100 nM and 1 μ M 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).

6. 成熟脂肪細胞における GLUT4 発現量に対する indirubin の影響

Glucose 消費量が亢進していたことから、3T3-L1 細胞を用いて glucose 取り込みに直接関与する GLUT4 発現量を定量した。Indirubin (10 nM-1 μ M) で処理した細胞では、control 群と比較し GLUT4 の発現量は 10 nM, 100 nM, 及び 1 μ M において各々 1.17 倍, 1.27 倍, 及び 1.48 倍の有意な増加を示し、明確な濃度依存性が認められた (Fig. 9)。同様に rosiglitazone (10 nM-1 μ M) で処理した細胞でも、GLUT4 の発現量は 10 nM を除いた 100 nM, 及び 1 μ M において各々 1.17 倍, 及び 1.22 倍の有意な増加を示し、明確な濃度依存性も認められた (Fig. 9)。また、1 μ M indirubin は同濃度の rosiglitazone と比較し GLUT4 発現量を 21.2% 増加させたことから、indirubin は GLUT4 の発現を効率良く誘導することが認められた。前項で示した糖取り込み量においても rosiglitazone で処置した細胞群と比較し、indirubin で処置した細胞群は glucose 濃度がより低値を示す傾向が認められたことから、indirubin は PPAR γ の活性化を介して GLUT4 発現量を増加させることで糖取り込みを促進する作用を有することが示唆された。

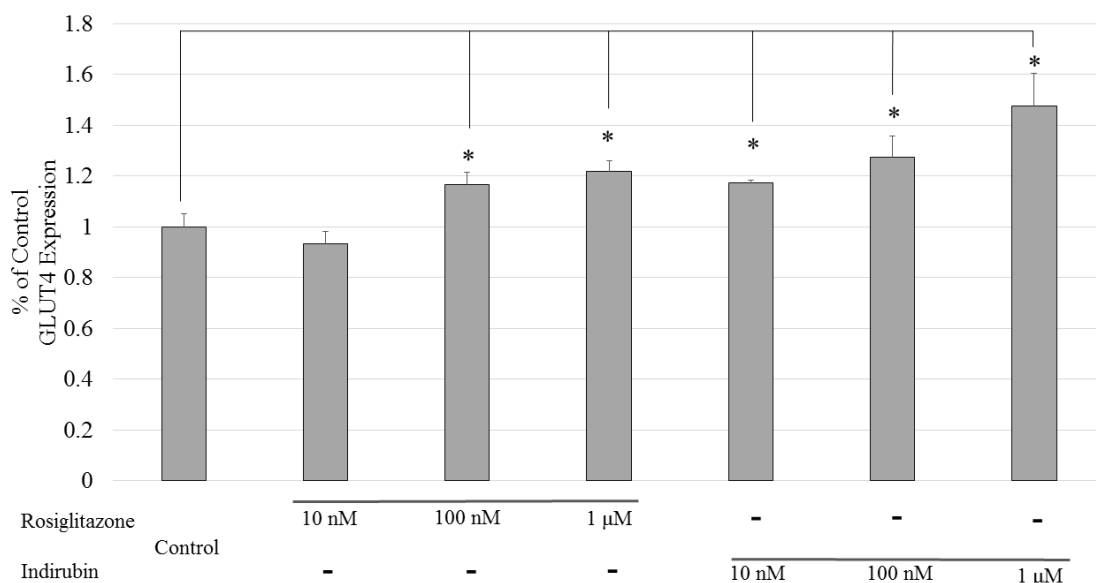


Fig. 9 Effects of indirubin on GLUT4 expression in 3T3-L1 mature adipocytes.

Mature 3T3-L1 adipocytes were obtained by culturing pre-adipocytes in MDI medium for seven days. The GLUT4 expression was quantified (*P < 0.05 vs. control). All values are presented as means ± S.D. (n = 5).

7. 成熟脂肪細胞における adiponectin 分泌量に対する indirubin の影響

Indirubin, 及び rosiglitazone が成熟脂肪細胞における adiponectin 分泌に与える影響を測定・評価した. Indirubin (10 nM-1 μM) で処理した細胞では, control 群と比較し adiponectin 分泌量は 10 nM を除いた 100 nM, 及び 1 μM において各々 1.75 倍, 及び 1.85 倍の有意な分泌量の亢進を示し, 明確な濃度依存性が認められた (Fig. 10). 同様に rosiglitazone (10 nM-1 μM) で処理した細胞でも, adiponectin 分泌量は 10 nM, 100 nM, 及び 1 μM において各々 1.87 倍, 1.98 倍, 及び 2.24 倍と有意な分泌亢進を示し, 明確な濃度依存性も認められた (Fig. 10). また, 1 μM rosiglitazone は同濃度の indirubin と比較し adiponectin を 21.2% 多く分泌したこと

から、rosiglitazone は adiponectin の発現を効率良く誘導することが認められた。これより、indirubin は PPAR γ の活性化を介して GLUT4, 及び adiponectin の発現を共に有意に促進するが、GLUT4 をより強力に誘導することが示された。

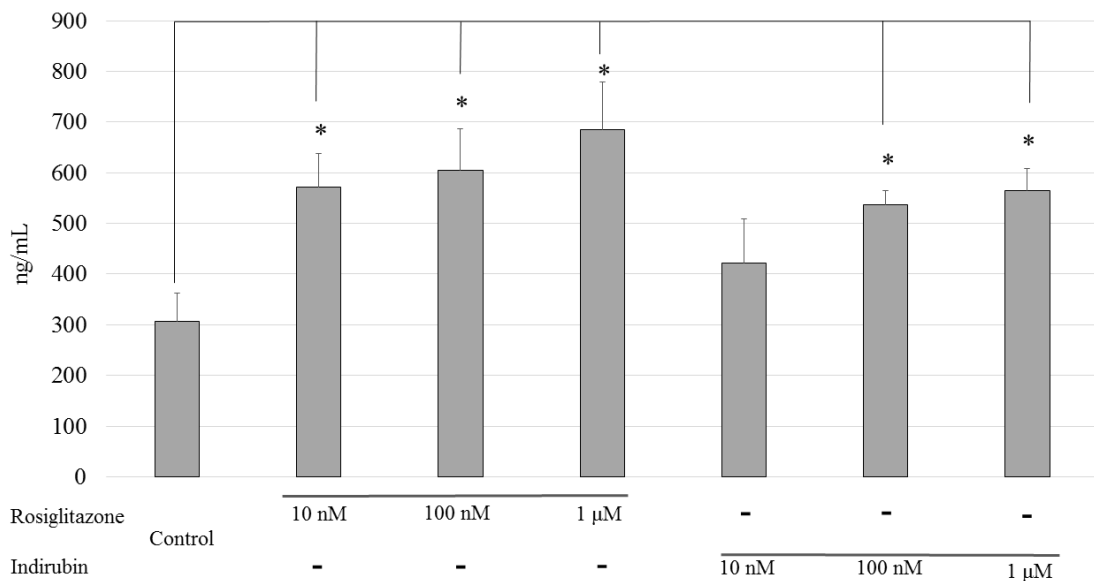


Fig. 10 Effect of indirubin on adiponectin secretion in 3T3-L1 mature adipocytes.

Mature 3T3-L1 adipocytes were obtained by culturing pre-adipocytes in MDI medium for seven days. The adiponectin expression was quantified (*P < 0.05 vs. Control). All values are presented as means \pm S.D. (n = 3).

8. 成熟脂肪細胞における estrogen 分泌量に対する indirubin の影響

Estrogen は、成熟脂肪細胞に存在する aromatase cytochrome P450 により androgen から生合成されることが、この Estrogen は脂肪細胞に対し glucose 取り込み、及び脂肪細胞分化を調節する⁶⁴⁾ことが知られている。これより glucose 消

費量の亢進, 及び GLUT4 発現量の亢進を認めた indirubin (1 nM-1 μ M) に対し, 3T3-L1 細胞の estrogen 分泌量に対する影響を測定・評価した. その結果, 1 μ M indirubin で処置した細胞群は, control 群と比較して estrogen 分泌量が 1.64 倍増加した (Fig. 11).

未分化の脂肪前駆細胞は estrogen 生合成経路を有さないことから, この結果は成熟脂肪細胞に細胞分化を促進したことを支持すると共に, indirubin は, 脂肪細胞中の aromatase 活性を調節することで, estrogen 生合成に影響を与えインスリン感受性を高める可能性が示唆された.

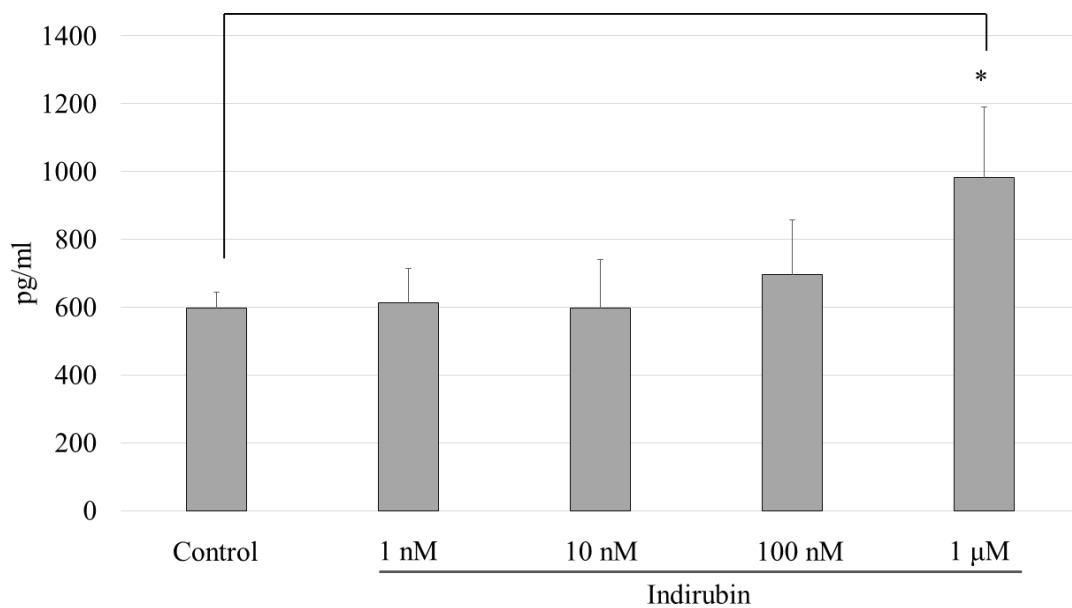


Fig. 11 The effects of indirubin on estrogen biosynthesis in 3T3-L1 mature adipocytes.

After cultured for a further 5 days, the estrogen concentration in the culture medium was quantified (* $P < 0.05$ vs. Control). All values are presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

第4節 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⁶⁵⁾しており、糖尿病に起因した高血糖状態は carbonyl stress 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 adiponectin, leptin などの adipokine, 及び estrogen などのホルモン分泌は、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。⁶⁶⁾ また、PPAR γ 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 γ 遺伝子の発現と共に adipokine 分泌も増加する⁶⁷⁾ 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 carbonyl stress, 及び脂質毒性の軽減に有効であると考えられる。

本研究では、インスリン非存在下において indirubin (1 nM-1 μ M) で処理した脂肪前駆細胞は control 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. 5A)。PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、細胞分化、glucose 輸送、及び脂質代謝など多様な生理機能を司るが、この PI3K/Akt 系は PPAR γ と密接に関与していることが明らかにされている。⁶⁸⁾ インスリンがインスリン受容体 (IR) に結合すると、インスリン受容体チロシンキナーゼの活性化によりインスリン受容体基質 (IRS) のリン酸化を誘導する。これにより IRS の PI3K 結合部位が露出することでトリガーとなり、活性化因子 PDK1 を介し Ser/Thr kinase である Akt の活性化が起こる⁶⁹⁾。活性化した Akt は、CDK 阻害因子 p21, 及び p27 を直接リン酸化することで細胞周期、及び細胞分裂を調節すると共に、mTOR シグナル伝達経路に作用して細胞増殖を調節する^{70,71)}。したがって、indirubin は PPAR γ 活性化を介した PI3K/Akt 系への調節だけでなく、CDK 阻害因子 p21 のシグナル伝達を調節する GSK-3 β , 及び CDK に対する阻害活性を有する⁷²⁾ ことから Akt の作用を増強する可

能性がある。このことから、indirubin は、インスリンの有無に関係なく、PPAR γ 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、5 nM、及び 50 nM の低濃度の indirubin は強い PPAR γ リガンド活性を示したが、500 nM という高濃度 indirubin ではその活性は抑制された。これは、indirubin は複数のメカニズムが関与している二相性の PPAR γ リガンド活性を有していることを示唆している。Troglitazone などの PPAR γ リガンドは、濃度依存的に PPAR γ を介して ERK 経路を活性化する⁷³⁾ が、PPAR γ 特異的 agonist は、濃度非依存的に AMP 活性化キナーゼ (AMPK) を活性化する⁷⁴⁾ ことも報告されている。したがって、indirubin の二相性のリガンド活性は、PPAR γ 依存性、及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がある。また、不可逆的 antagonist GW9662 は PPAR γ リガンド結合部位の Cys285 残基に共有結合し、PPAR γ 活性自体は抑制せずにリガンドの結合を競合的に阻害する。⁷⁵⁾ Cys285 残基は脂肪酸等の多くのリガンドと同一の標的残基の 1 つであるが、10 nM GW9662 は indirubin のリガンド活性を完全に消失しなかったことから、indirubin の結合部位、及び結合様式は従来のリガンドとは異なる可能性が示唆された。PPAR γ は Y 字状の複数の結合ポケットを有するため比較的多くのリガンドが結合しやすい構造となっている⁷⁶⁾ が、それ故に多彩なリガンド毎の厳密、かつ複雑な段階を経た生理機能調節が行われているものと考えられる。この結果として、indirubin は PPAR γ 立体構造変化、及び転写制御機構を介し、脂肪蓄積量の増加を伴わずに細胞分化を促進させるという従来のリガンドにはない PPAR γ 依存的な新たな活性を有することも否定できない。

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、及び

生理学的特性を獲得する。つまり、脂肪細胞は各種 adipokine 分泌能だけではなく脂質分解、及び生成能も獲得する。⁷⁷⁾ 本研究では、indirubin (1 nM-1 μ M) で処理した脂肪前駆細胞 (Fig. 5A)、及び成熟脂肪細胞 (Fig. 7A) 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 adipophilin の一種 perilipin 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。⁷⁸⁾ Perilipin は、脂肪細胞の 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、perilipin、及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 indirubin は非同期性を示した。これより、PPAR γ により制御されている perilipin 発現、及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、更なる検討が必要である。

加えて、indirubin (1 nM-1 μ M) で処理した成熟脂肪細胞では control 群と比較して脂肪蓄積量の減少を認めた (Fig. 7C)。このことから、成熟脂肪細胞において PPAR γ を介した脂質合成関連の標的遺伝子を調節し acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, 及び glycerol-3-phosphate dehydrogenase 等の脂質生成、及び TG 合成関連酵素の活性の調節に indirubin は影響を及ぼした可能性^{79,80)} が推察される。その一方、PPAR γ 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、骨格筋や脂肪細胞に発現した GLUT4 によ

る glucose 取り込み障害も一因とされている。⁸¹⁾ 今回, indirubin (1 nM-1 μ M) で処理した成熟脂肪細胞は PPAR γ 活性化を介して glucose 消費量を増加させた。PPAR γ リガンドは glucose 代謝に直接関与する GLUT4 遺伝子発現を調節⁸²⁾し, 脂肪細胞における glucose 輸送を増加させることから, indirubin は GLUT4 発現量を up regulation したものと推測された。また, estrogen は脂肪細胞に対して estrogen receptor α を介したインスリンシグナル系の感受性亢進, GLUT4 発現量促進による glucose 取り込みの亢進, 細胞増殖抑制作用, 及び脂肪細胞サイズの縮小作用を示す。一方, estrogen receptor β は脂肪細胞サイズの拡張, PPAR γ 発現量減少, 及びその活性低下作用を介して glucose 取り込み, 及び脂肪細胞分化を調節する⁶⁴⁾ ことから, 多くのシグナル伝達系の介在により糖脂質代謝能に影響を与えているものと推察される。

PPAR γ , 及び 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, 及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。^{83,84)} これらの研究は, 細胞毒性を伴わず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, タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分である indirubin は, PPAR γ 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。

第2章

ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導炎症モデルを用いた タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 tryptanthrin の抗炎症メカニズムの検討

第1節 序

潰瘍性大腸炎(UC)は、大腸粘膜に潰瘍やびらんを形成することで慢性的な腹痛、下痢、及び貧血等の患者にとって耐え難い症状を呈する炎症性腸疾患である⁸⁵⁾。UC は特定疾患であり発症原因は未だ解明されていないものの、現在 5-ASA 製剤, steroid 製剤, 免疫抑制剤, 及び抗体製剤等の多種多様な薬剤の開発により、速やかに寛解導入でき、かつ長期にわたる寛解維持が以前と比べ容易になった⁸⁶⁾ ことから、多くの患者は QOL を維持したまま日常生活を送ることが出来る。しかし、これらの薬剤を長期間投薬することで steroid 依存や steroid 抵抗性を生じ、これらに起因した症状の増悪や免疫抑制剤も含めた感染症罹患も問題となる^{87,88)} ことから、副作用が少なく症状改善に有効な治療標的に強力に作用する薬剤の開発が必要不可欠である。

TNF- α は、UC の炎症誘導において最も重要な mediator の 1 つ⁸⁹⁾ であり、大腸上皮の炎症に反応し COX-2 の発現を誘導する。この COX-2 発現を起点とした大腸上皮細胞におけるプロスタノイドシグナル伝達は、炎症悪化、及び粘膜治癒に関係していると報告されている⁹⁰⁾。この COX-2-プロスタノイドシグナル伝達は TNF- α と相乗的に TNF- α 誘導性炎症反応を増幅させ、また PG 類により誘導された炎症を悪化させる正のフィードバック機構を有しているため、特に COX-2、及び PGE₂ 発現量は、UC の重症度に比例して増加し最終的に症状の重篤化に至る⁹¹⁾ ものと考えられる。さらに、これらの炎症性サイトカインによる大腸上皮細胞への刺激は、細胞間接着分子 ICAM-1 の誘導を介し白血球走化性

亢進, 及び粘膜損傷を引き起おこすことから, 病態形成に至る重要なメカニズムのひとつ⁹²⁾と考えられる.

タデ藍由来の生薬「青黛」は難治性 UC の治療に有効であり, そのメカニズムは AhR 活性化を介した IL-10, 及び IL-22 の up regulation とされ, 青黛の服用により著効を示すことが示されている⁹³⁾. しかし, 重篤な副作用報告⁹⁴⁾, 及び粗悪品の流通や不純物の混入による症状悪化や健康被害の可能性も指摘されている現状にある⁹⁵⁾ことから, 有効成分の同定とその作用機序解明は非常に意義深いものといえる.

5-ASA は, UC 患者の重篤度に関わらず寛解導入, 及び寛解維持療法の両者共に幅広く使用できることから, 本疾患における key drug とされており, 炎症性サイトカイン産生調節作用⁹⁶⁾, 及び PG や LT 類の生合成阻害作用⁹⁷⁾などの他, 主作用として PPAR γ を介した抗炎症作用⁹⁸⁾により症状軽減に寄与すると考えられている. また, PPAR γ は大腸粘膜における恒常性維持に関与するため, PPAR γ 発現量の減少は UC 発症との因果関係も認められている⁹⁹⁾ ことに加え, 一見 UC 治療とは無関係に見える抗糖尿病薬であっても PPAR γ を標的とする thiazolidinedione 系薬には UC 改善作用が報告されている^{100,101)}ことから, PPAR γ を標的とした治療薬開発は UC 治療における特効薬創出の一助となる可能性が非常に高い.

本研究では, 青黛の起原植物であるタデ藍含有成分 tryptanthrin に着目しヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導炎症モデルを使用した tryptanthrin の COX-2, 及び ICAM-1 を介した抗炎症作用に関する影響を評価した.

第 2 節 実験材料及び実験方法

1. 試薬・材料

Recombinant human TNF- α protein は R&D systems, Inc. (Minneapolis, USA)から, tryptanthrin は Sigma-Aldrich Ltd. (Tokyo, Japan)から購入したものを使用した. 1 次抗体 COX-2, 及び ICAM-1 は, Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) から, ALP 結合 2 次抗体は, Bio-Red Laboratories Inc. (CA, USA) から購入した. 特に言及が無ければ, 第 1 章, 第 2 節, 第 1 項と同一のものを使用した.

2. PPAR γ リガンド活性の測定

第 1 章, 第 2 節, 第 2 項で述べた手順に従い測定した. 尚, PPAR γ の供給源として 7 週齢の雄性 ICR マウスの大腸を使用した.

3. 使用細胞および細胞培養

ヒト結腸上皮細胞株 HT-29 細胞株は Public Health England (Porton Down, UK)より購入した. 本細胞は, 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 及び 25 μ g/mL amphotericin B を添加した RPMI1640 培地を用い, 37°C, 飽湿, 5% CO₂ の条件下で培養した. 最終濃度が 20 μ g/mL となるように調製した TNF- α , 及び 1 nM から 10 μ M となるように調製した tryptanthrin を培地に添加し, 更に 24 時間培養した.

4. 細胞生存率の測定

各サンプルを最終濃度が 1 nM から 100 μ M となるように調製したサンプルを用いて, 第 1 章, 第 2 節, 第 4 項で述べた手順に従い測定した.

5. COX-2, 及び ICAM-1 発現量の測定

Tryptanthrin (1 nM-10 μ M)を添加し培養した細胞を D-PBS (-) で洗浄し細胞固定を行ったのち回収し, RIPA Buffer に懸濁し超音波処理した細胞ホモジネート液をサンプルとした. 本サンプルを 96-well plate に添加し 4°C, 24 時間インキュベートした. 洗浄後, 5% skim milk を加え 37°C, 1 時間インキュベートした. その後, 1 次抗体, 並びに 2 次抗体 ALP 結合 IgG 抗体(Goat anti-rabbit IgG)を各々 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.

6. 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) を使用した. 全ての結果は, 平均値±標準偏差で表記した.

第 3 節 結果

1. Tryptanthrin の PPAR γ リガンド活性

Tryptanthrin (5 nM-500 nM), 及び 5-ASA の PPAR γ リガンド結合活性を測定した. 5 nM 5-ASA と比較し, 5 nM tryptanthrin は 1.20 倍強い活性を示した (Fig. 12). この結果より, tryptanthrin は 5-ASA と同様に PPAR γ リガンド結合活性を有することが示された. 次に, 5 nM tryptanthrin, 及び 5-ASA と PPAR antagonist GW9662 (1 nM-100 nM) 併用時における tryptanthrin, 及び 5-ASA のリガンド結合活性を測定した. Fig. 13 に示すように, 5-ASA は 10 nM, 及び 100 nM の

GW9662 併用により，結合活性は濃度依存的に有意に抑制された．また，tryptanthrin は，100 nM の GW9662 併用により結合活性は有意に抑制され，それは濃度依存性を示した．これらの結果より，tryptanthrin は PPAR γ リガンド結合ドメインへ結合する PPAR γ agonist であることが示された．

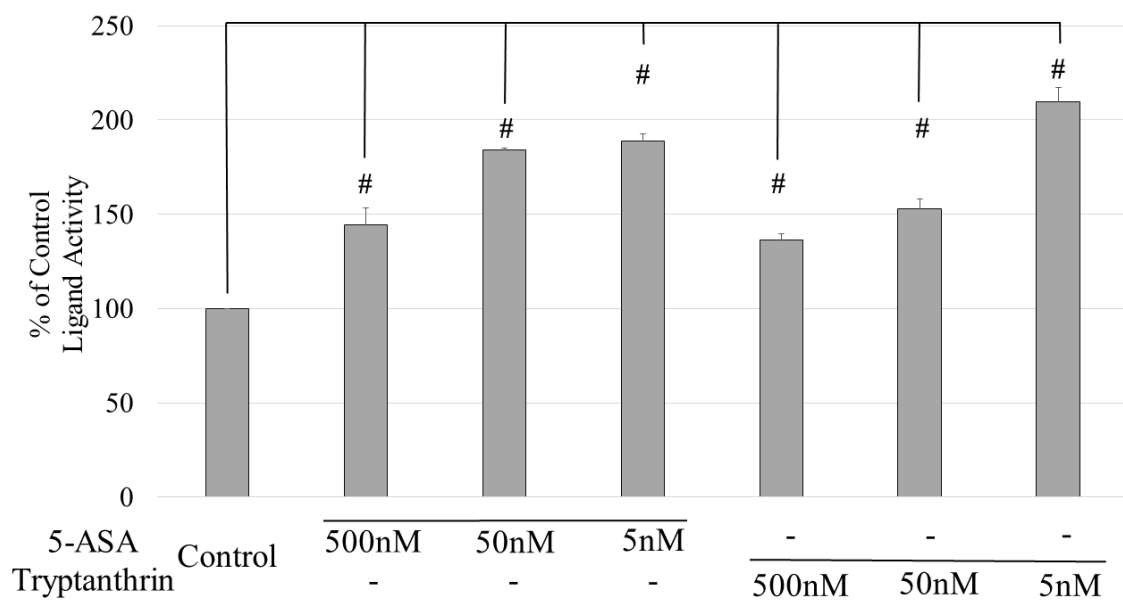


Fig. 12 PPAR γ ligand activity of 5-ASA and tryptanthrin.

The PPAR γ ligand activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as the means \pm S.D. (n=3, #P < 0.001 vs. control).

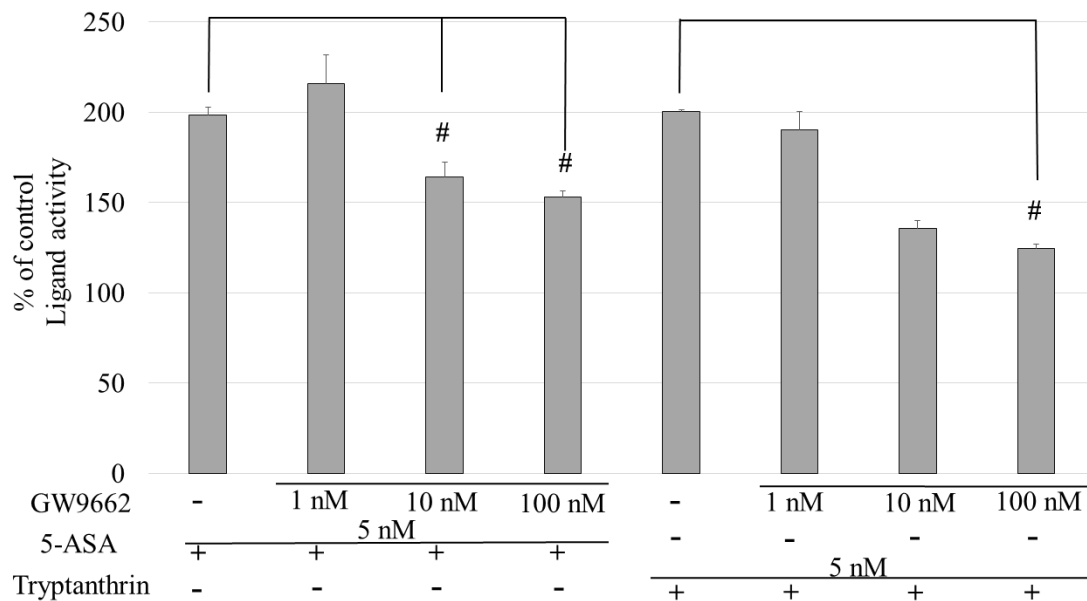


Fig. 13 PPAR γ antagonist GW9662 blocks its activation of 5-ASA and tryptanthrin.

The 5 nM of 5-ASA and tryptanthrin were treated with each concentration of GW9662 (1 nM, 10 nM, 100 nM). The PPAR γ ligand activity was analyzed by ELISA. The results were expressed as the means \pm S.D. (n=3, [#]P < 0.001 vs. 5 nM sample).

2. 細胞生存率に対する tryptanthrin の影響

Tryptanthrin (1 nM-100 μ M)のヒト結腸上皮細胞 (HT-29 細胞株) に対する細胞毒性を WST 法で評価した。Fig. 14 に示すように、1 nM から 1 μ M までは細胞生存率に全く影響を及ぼさないが、100 μ M では control 群と比較して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。この結果より、以下の実験では 100 μ M を除いた 1 nM から 1 μ M における測定・評価を行った。

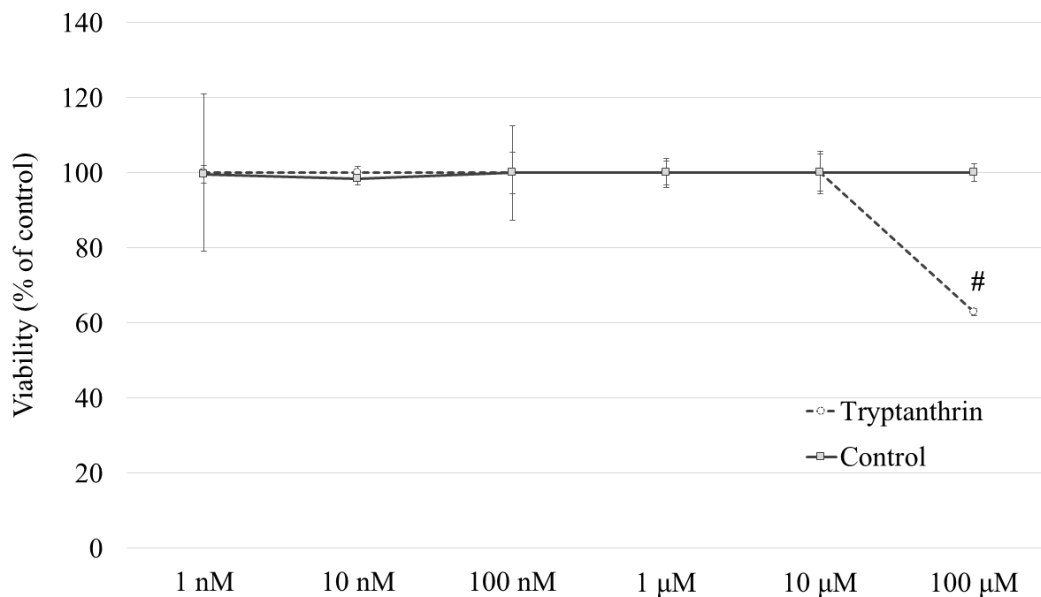


Fig. 14 Cytotoxicity of Tryptanthrin in HT-29 cell.

Compared to control, tryptanthrin treated group significantly decreased survival at 100 μM (#P < 0.001 vs. control). HT-29 cell was treated with various concentrations of tryptanthrin (1 nM-100 μM) for 24 h. Quantitative analysis of cell viability was performed using the MTT assay. This result was expressed as the means ±S.D. (n=3).

3. ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF-α 誘導性 COX-2 発現量に対する tryptanthrin の影響

Tryptanthrin は PPAR γ リガンド活性を示したことから、ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- α 誘導性大腸炎モデル対する影響を評価した。Fig. 15, 及び Fig. 16 に示すように、COX-2, 及び ICAM-1 の発現量は TNF- α (20 ng/mL) 添加により、TNF- α 非添加 control 群と比較し共に 2 倍程度の発現量増加を認められたことから、TNF- α 誘導性の炎症が起きていることが示された。はじめに、この条件下における COX-2 発現量は tryptanthrin で処理すると 10 nM, 及び 100 nM

で有意な低下が認められ 1 nM から 100 nM における濃度依存性を示した。また、比較的高濃度である 1 μ M, 及び 10 μ M では TNF- α 添加 control 群と比較し有意性は認められなかったものの COX-2 発現量の低下を示した。この結果より, tryptanthrin は COX-2 発現量を抑制する作用があることが明らかとなったが, この活性発現には至適濃度が存在する可能性が示されたと共に, PPAR γ リガンドが様々なシグナル伝達経路の調節を介して二相性を示すという仮説とも一致するものと考えられる。

一方, ICAM-1 発現量は tryptanthrin で処理することで発現量の低下を示したものの, 有意性は認められなかった。このことから, tryptanthrin は ICAM-1 の発現, 及び調節に対して大きな影響を与えないことが明らかとなった。したがって, tryptanthrin は ICAM-1 の発現, 及び調節に影響を与えることなく, PPAR γ の活性化を介して COX-2 発現量を抑制することが示された。

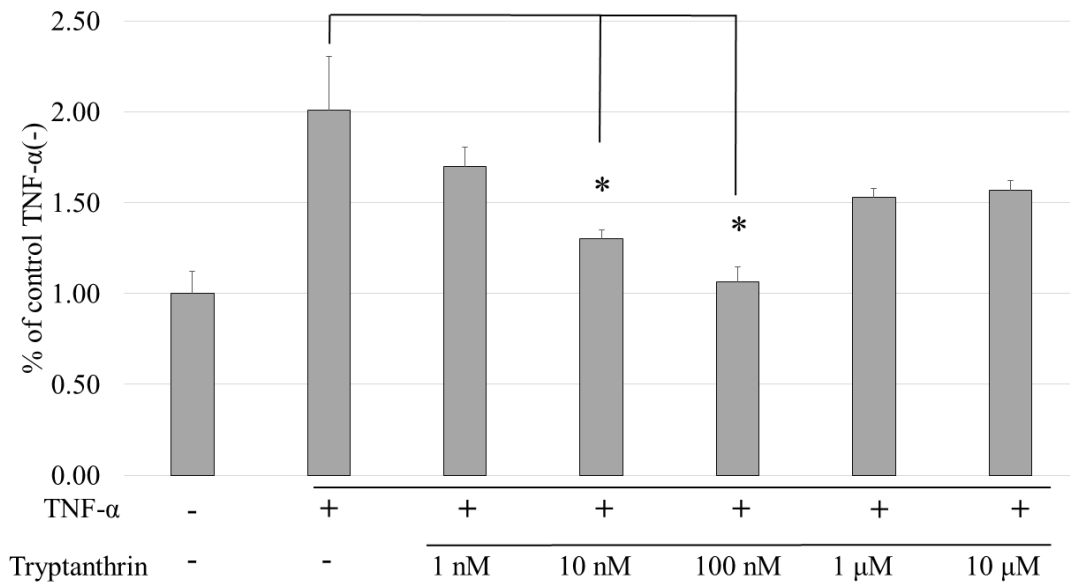


Fig. 15 Tryptanthrin suppressed TNF- α -induced COX-2 expression in HT-29 cells.

The COX-2 expression was analyzed by ELISA. The results were expressed as the means \pm S.D. (n=3, *P < 0.05 vs. TNF- α -treated group).

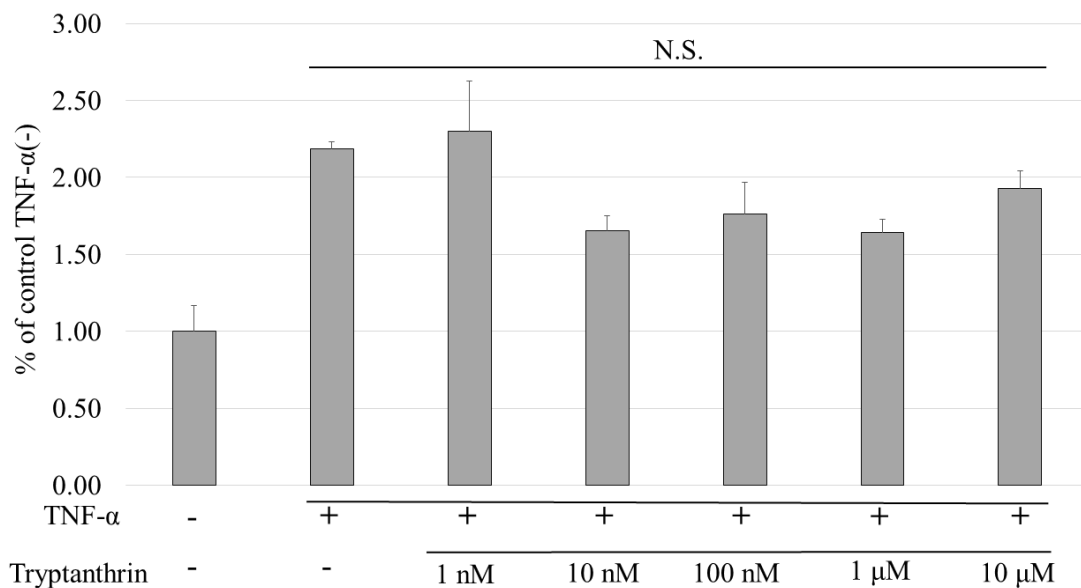


Fig. 16 Tryptanthrin suppressed TNF- α -induced ICAM-1 expression in HT-29 cells.

The ICAM expression was analyzed by ELISA. The results were expressed as the means \pm S.D. (n=3, *P < 0.05, #P < 0.001 vs. TNF- α -treated group).

第4節 考察

PPAR γ は多くの疾患の病因と密接に関係しており、UCを例にあげるとPPAR γ の過剰発現は複数の転写因子を負に調節、または転写因子 p65 の核外移行の促進を介した NF- κ B 転写阻害によって炎症を緩和する¹⁰²⁾ 一方、PPAR γ 発現量の減少、及び阻害は炎症に対する感受性を上昇させる¹⁰³⁾ ことが明らかとなっている。このことより、PPAR γ はUCの病態形成、及び治療薬開発において重要な役割を果たす。

本研究では、5 nM、及び50 nMの低濃度の tryptanthrin は強い PPAR γ リガンド活性を示したが、500 nM という高濃度 tryptanthrin ではその活性は抑制された (Fig. 12)。これは indirubin 同様に、tryptanthrin は複数のメカニズムが関与してい

る二相性の PPAR γ リガンド活性を有することが示唆された。Troglitazone などの PPAR γ リガンドは、濃度依存的に PPAR γ を介して ERK 経路を活性化する⁷³⁾ が、PPAR γ 特異的 agonist は、濃度非依存的に AMP 活性化キナーゼ (AMPK) を活性化する⁷⁴⁾ ことも報告されているため、tryptanthrin の二相性リガンド活性は、PPAR γ 依存性、及び非依存性メカニズムの両方に起因する可能性¹⁰⁴⁾ が示された。

PG, 及び TX などの COX-2 由来プロスタノイドは、その多彩な活性を持つことから UC をはじめとする多くの疾患との関連性が報告されている。特に、PGE₂ は UC における炎症と治癒に関与する重要な mediator であり、高発現した PGE₂ は炎症反応を悪化させる¹⁰⁵⁾ 一方、大腸上皮細胞の生存を維持し、損傷部位の再生を促進することで粘膜損傷から保護するはたらきを有する⁹⁰⁾。したがって、COX-2-PGE₂ シグナルは2つの相反する作用を有していることから、炎症条件下における本シグナル伝達系の最適化は大腸上皮細胞の恒常性維持に寄与できるものと考えられる。今回 PPAR γ リガンドである tryptanthrin は、ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株を用いた TNF- α 誘導炎症モデルにおける COX-2 発現を有意に抑制させたが、COX-2 promoter は PPRE の一部に含まれており、PPAR γ シグナル伝達系の下流領域に位置することから PPAR γ を介し直接制御を受ける^{106,107)}。また、PPAR γ リガンドによる COX-2 の down regulation は、COX-2 promoter に対する転写因子 AP-1 活性化を抑制することで発揮される¹⁰⁷⁾ ことから、tryptanthrin の COX-2 発現抑制はこれらの伝達系に作用したものと推察される (Fig. 17)。

炎症時、TNF- α は大腸上皮細胞において PAK1 の過剰発現を誘導し、NF- κ B の活性化を引き起こす¹⁰⁸⁾。活性化された PAK1 は PPAR γ 発現量低下をもたらすと共に、I κ B とは無関係に p65 の核内移行を促進することで炎症反応が増強され

る。このとき PPAR γ agonist である 5-ASA は、過剰発現した PAK1 を阻害し PPAR γ 発現量を回復させることで NF- κ B の down regulation を介し炎症反応を抑制する。PPAR γ agonist は PAK1 阻害活性を示す¹⁰⁹⁾ことから、tryptathrin は 5-ASA と同様の機序で抗炎症作用を示すことが示唆された。また、tryptathrin は I κ B α 分解抑制作用を有する¹¹⁰⁾ことから p65 の核内移行量を制限できるため、相乗効果が期待される。

現在、潰瘍性大腸炎の新規治療薬開発において、消化管粘膜の血管内皮細胞表面に存在する MAdCAM-1 への $\alpha_4\beta_7$ integrin の結合を阻害することで消化管粘膜へのリンパ球浸潤を阻害する vedolizumab¹¹¹⁾ や Janus kinase を標的とした tofacitinib¹¹²⁾ 等の抗体医薬や分子標的薬も使用され始めたが、高価であることに加え使用できる症例も限定的であることから UC 治療薬の選択肢は依然として限られたままである。今日の日本における 5-ASA 製剤による UC 治療は、製剤加工技術や DDS の進歩により多彩な投与経路や特徴をもつ Asacol[®], Pentasa[®], 及び Lialda[®] の 3 種類が使用されている。難治性症例や抗体医薬ばかりが取りざたされる本疾患ではあるが、過半数の症例は 5-ASA 製剤により寛解導入、及び寛解維持できるという報告^{113,114)}からも見て取れるように、長い歴史をもつ薬でありながらもその重要性と新たな可能性が再認識されている。以上のことより、tryptathrin の PPAR γ を介した COX-2 発現量の抑制は、UC に対して複合的な作用が見込まれることから、この知見により PPAR γ を標的とした効果的な治療薬開発と治療最適化の一助になることが大いに期待される。

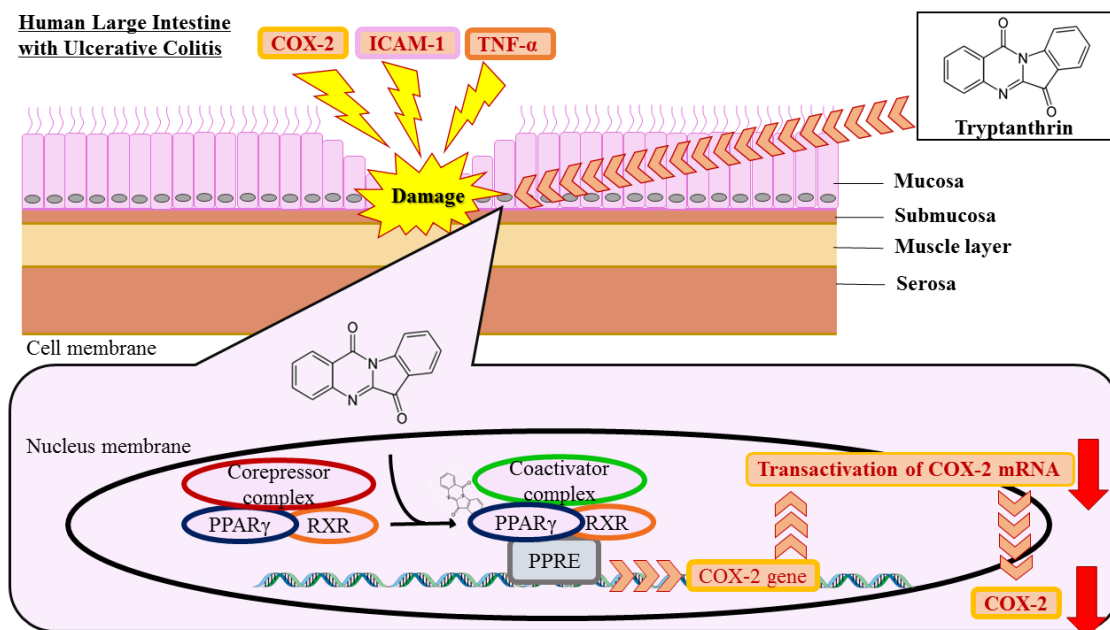


Fig. 17 Hypothesis of the mechanism by which tryptanthrin suppresses inflammation.

Tryptanthrin may suppress cyclooxygenase 2 expression via PPAR γ activation.

総括

本研究では、いにしえより続くタデ藍 *Persicaria tinctoria* と人類との長年にわたり築かれてきた史実を基に、その2つの機能性成分 indirubin, 及び tryptanthrin に着目し 2 型糖尿病, 及び潰瘍性大腸炎における新規治療薬になり得る可能性を検討した. 第 1 章では, indirubin が PPAR γ リガンド活性を示すことを明らかにしたのち, 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性改善の作用メカニズムの解明を目的として, マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞株を用いて評価を行った. その結果, indirubin は脂肪前駆細胞に対しては PPAR γ 活性化を介し成熟脂肪細胞への細胞分化を促進した. また, 成熟脂肪細胞に対しては過剰に蓄積した LD の蓄積量を有意に低下させたと共に, GLUT4 発現量を増加させることにより glucose

取り込みを促進した。さらに、adiponectin, 及び estrogen 分泌も亢進させたことから、脂肪細胞に複合的に作用することでインスリン抵抗性を改善する可能性があると示された。

第 2 章では、tryptanthrin が PPAR γ リガンド活性を示すことを明らかにした上で、UC における抗炎症作用の解明を目的として、ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株を用いた TNF- α 誘導炎症モデルにおける評価を行った。その結果、tryptanthrin は PPAR γ 活性化を示し COX-2 発現量を抑制したことから、UC の症状悪化のトリガーとなる COX-2-PGE₂ シグナル系の抑制、及び PAK1 阻害による PPAR γ 発現量を回復させることで抗炎症作用を発揮することが示唆された。

本研究の第 1 章、及び第 2 章において、2 型糖尿病、及び潰瘍性大腸炎を研究対象としたが、これら 2 つの疾患は一見すると全く異なるものの様に見受けられる。しかし、今回研究対象とした PPAR γ は、糖脂質代謝、免疫応答、及び炎症反応の制御等の生き物が生存するために必要不可欠な多くの生体内制御機構に対する調節、及び相互作用を司るが故に、むしろ疾患という枠にとらわれない多機能性、有効性をもつ治療薬開発における理想的なターゲットになると考える。現在、世界中で PPAR γ をターゲットとした医薬品開発が非常に盛んに行われており、本研究で陽性対照薬として使用した pioglitazone, 及び rosiglitazone に限って言及すれば、2 型糖尿病治療薬の他に、高血圧、心血管疾患、脂質異常症、肝疾患、慢性腎臓病、神経変性疾患、及び各種悪性腫瘍に対する治療薬としての可能性が日々検証されている¹¹⁵⁾。これらの知見は全て PPAR γ を介したものであるとされていることから、PPAR γ の有する多機能性の裏付けとなることと共に、indirubin, 及び tryptanthrin の更なる機能性が期待されるものである。Fig. 8, 及び Fig. 9 に示した様に、indirubin は rosiglitazone と同様に GLUT4, 及び adiponectin を共に増加させるものの、誘導するタンパク質ごとに発現量の差が

認められた。このことから、PPAR γ リガンド活性を示したとしても PPAR γ に対する結合様式、結合力、及び組織特異性によっても各カスケードに与える影響や最終的に誘導されるタンパク質は異なるため、化合物ごとの特性があるものと推察できることから、より詳細なメカニズムの解明に興味を持たれる。今後、タデ藍、及び含有成分に関する研究が進み、様々な疾患における治療戦略のひとつになることが大いに期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、本学薬学部生薬学教室 佐々木 健郎 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文を御校閲、ならびに御助言を賜りました本学薬学部薬理学教室 丹野 孝一 教授、本学薬学部天然物化学教室 内田 龍児 教授に深く感謝申し上げます。

また、研究中に有益な御助言、御協力を頂きました本学薬学部生薬学教室 小林 匡子 講師、村田 敏拓 講師をはじめとする生薬学教室の皆様は厚く感謝申し上げます。

細胞実験を行うに有益なる御助言、多大なる御協力を頂きました本学薬学部分子認識学教室 細野 雅祐 教授、菅原 栄紀 講師、立田 岳生 助教、ならびに本学薬学部薬物治療学教室 蓬田 伸 准教授に深く感謝申し上げます。さらに、本研究において、終始御支援を賜りました理事長・学長 高柳 元明 博士に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり終始支えてくださいました家族、友人をはじめとする皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 中薬大辞典, 上海科学技術出版社, 小学館編, 小学館 (1998).
- 2) 佐々木 健郎, 蓼藍の成分と機能性について —機能性を併せ持つ染料の科学—, 東北薬科大学研究誌, **62**, 25-37 (2015).
- 3) 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).
- 4) Gaitanis G., Magiatis P., Mexia N., Melliou E., Efstratiou MA., Bassukas ID., Velegaki A., Antifungal activity of selected *Malassezia* indolic compounds detected in culture, *Mycoses*, **62**, 597-603 (2019).
- 5) Chen L., Wang J., Wu J., Zheng Q., Hu J., Indirubin suppresses ovarian cancer cell viabilities through the STAT3 signaling pathway, *Drug Des. Devel. Ther.*, **12**, 3335-3342 (2018).
- 6) Xiao Z., Hao Y., Liu B., Qian L., Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China, *Leuk. Lymphoma.*, **43**, 1763-1768 (2002).
- 7) Zhao Y., Han P., Liu L., Wang X., Xu P., Wang H., Yu T., Sun Y., Li L., Sun T., Liu X., Zhou H., Qiu J., Wang L., Peng J., Xu S., Hou M., Indirubin modulates CD4+ T-cell homeostasis via PD1/PTEN/AKT signalling pathway in immune thrombocytopenia, *J. Cell Mol. Med.*, **23**, 1885-1898 (2019).
- 8) Mak NK., Leung CY., Wei XY., Shen XL., Wong RN., Leung KN., Fung MC., Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells, *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 167-174 (2004).
- 9) Efstathiou A., Meira CS., Gaboriaud-Kolar N., Bastos TM., Rocha VPC., Vougiannopoulou K., Skaltsounis AL., Smirlis D., Soares MBP., Indirubin derivatives are potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Virulence*, **9**, 1658-1668 (2018).

- 10) Honda G., Tabata M., Tsuda M., The antimicrobial specificity of Tryptanthrin, *Planta Med.*, **37**, 172-174 (1979).
- 11) Gaitanis G., Magiatis P., Mexia N., Melliou E., Efstratiou M.A., Bassukas I.D., Velegraki A., Antifungal activity of selected Malassezia indolic compounds detected in culture, *Mycoses*, **62**, 597-603 (2019).
- 12) Wang Z., Wu X., Wang CL., Wang L., Sun C., Zhang DB., Liu JL., Liang YN., Tang DX., Tang ZS., Tryptanthrin Protects Mice against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis through Inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 Pathways, *Molecules*, **23**, E1062 (2018).
- 13) Han NR., Moon PD., Kim HM., Jeong HJ., Tryptanthrin ameliorates atopic dermatitis through down-regulation of TSLP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **542**, 14-20 (2014).
- 14) Liao X., Zhou X., Mak NK., Leung KN., Tryptanthrin inhibits angiogenesis by targeting the VEGFR2-mediated ERK1/2 signalling pathway, *PLoS One*, **8**, e82294 (2013).
- 15) Yu ST., Chen TM., Tseng SY., Chen YH., Tryptanthrin inhibits MDR1 and reverses doxorubicin resistance in breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 79-84 (2007).
- 16) 上仲 博, 江崎正直, 化学史研究, **31**, 195 (2004).
- 17) Monsalve FA., Pyarasani RD., Delgado-Lopez F., Moore-Carrasco R., Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 549627 (2013).
- 18) Wang S., Dougherty EJ., Danner RL., PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics, *Pharmacol. Res.*, **111**, 76-85 (2016).
- 19) Yousefnia S., Momenzadeh S., Seyed Forootan F., Ghaedi K., Nasr Esfahani MH.,

- The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity, *Gene*, **649**, 14-22 (2018).
- 20) Kojetin DJ., Burris TP., Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery, *Mol. Pharmacol.*, **83**, 1-8 (2013).
- 21) Hughes TS., Chalmers MJ., Novick S., Kuruvilla DS., Chang MR., Kamenecka TM., Rance M., Johnson BA., Burris TP., Griffin PR., Kojetin DJ., Ligand and receptor dynamics contribute to the mechanism of graded PPAR γ agonism, *Structure*, **20**, 139-150 (2012).
- 22) Marion-Letellier R., Savoye G., Ghosh S., Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma, *Eur. J. Pharmacol.*, **785**, 44-49 (2016).
- 23) Shim CY., Song BW., Cha MJ., Hwang KC., Park S., Hong GR., Kang SM., Lee JE., Ha JW., Chung N., Combination of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist and an angiotensin II receptor blocker attenuates myocardial fibrosis and dysfunction in type 2 diabetic rats, *J. Diabetes Investig.*, **5**, 362-371 (2014).
- 24) Malone JL., Hansen BC., Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? , *Pediatr. Diabetes*, **20**, 5-9 (2019).
- 25) Ruth AH., Andrew S., Type 2 diabetes mellitus and psychological stress - a modifiable risk factor, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 547-560 (2017).
- 26) Halim M., Halim A., The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes), *Diabetes Metab. Syndr.*, **13**, 1165-1172 (2019).
- 27) Akter S., Goto A., Mizoue T., Smoking and the risk of type 2 diabetes in Japan: A systematic review and meta-analysis, *J. Epidemiol.*, **27**, 553-561 (2017).

- 28) 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 ES., Pedersen O., Kamatani N., Kadowaki T., Kikkawa R., Nakamura Y., Maeda S., SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations, *Nat. Genet.*, **40**, 1098-1102 (2008).
- 29) Scott LJ., Mohlke KL., Bonnycastle LL., Willer CJ., Li Y., Duren WL., Erdos MR., Stringham HM., Chines PS., Jackson AU., Prokunina-Olsson L., Ding CJ., Swift AJ., Narisu N., Hu T., Pruim R., Xiao R., Li XY., Conneely KN., Riebow NL., Sprau AG., Tong M., White PP., Hetrick KN., Barnhart MW., Bark CW., Goldstein JL., Watkins L., Xiang F., Saramies J., Buchanan TA., Watanabe RM., Valle TT., Kinnunen L., Abecasis GR., Pugh EW., Doheny KF., Bergman RN., Tuomilehto J., Collins FS., Boehnke M., Association of chromosome 9p21 SNPs with cardiovascular phenotypes in morbid obesity using electronic health record data, *Science*, **316**, 1341-1345 (2007).
- 30) Zhuo X., Zhang P., Hoerger TJ., Lifetime direct medical costs of treating type 2 diabetes and diabetic complications, *Am. J. Prev. Med.*, **45**, 253-261 (2013).
- 31) Park Y., Colditz GA., Diabetes and adiposity: a heavy load for cancer, *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **6**, 82-83 (2018).
- 32) Li W., Huang E., An Update on Type 2 Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Dementia, *J. Alzheimers Dis.*, **53**, 393-402 (2016).
- 33) Paschou SA., Dede AD., Anagnostis PG., Vryonidou A., Morganstein D., Goulis DG., Type 2 Diabetes and Osteoporosis: A Guide to Optimal Management, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **102**, 3621-3634 (2017).

- 34) Pérez-Losada FL., Jané-Salas E., Sabater-Recolons MM., Estrugo-Devesa A., Segura-Egea JJ., López-López J., Correlation between periodontal disease management and metabolic control of type 2 diabetes mellitus. A systematic literature review, *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **21**, e440-446 (2016).
- 35) Beagley J., Guariguata L., Weil C., Motala AA., Global estimates of undiagnosed diabetes in adults, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **103**, 150-160 (2014).
- 36) Cho NH., Shaw JE., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes JD., Ohlrogge AW., Malanda B., IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **138**, 271-281 (2018).
- 37) Yan Z., Sylvia HL., Frank BH., Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 88-98 (2018).
- 38) Stumvoll M., Goldstein BJ., van Haeften T.W., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet*, **365**, 1333-1346 (2005).
- 39) Thornalley PJ., Langborg A., Minhas HS., Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, *Biochem. J.*, **15**, 109-116 (1999).
- 40) Thorpe SR., Baynes JW., Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives, *Amino Acids*, **25**, 275-281 (2003).
- 41) Robertson RP., Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 42351-42354 (2004).
- 42) Marc P., Christopher JN., Islet β cell failure in type 2 diabetes, *J. Clin. Invest.*, **116**, 1802-1812 (2006).
- 43) Monika G., Gilles M., Fabienne R., Hepatic stress associated with pathologies characterized by disturbed glucose production, *Cell Stress*, **3**, 86-99 (2019).

- 44) Guilherme A., Virbasius JV., Puri V., Czech MP., Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 367-377 (2008).
- 45) Lihn AS., Pedersen SB., Richelsen B., Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity, *Obes. Rev.*, **6**, 13-21 (2005).
- 46) Uysal KT., Wiesbrock SM., Marino MW., Hotamisligil GS., Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function, *Nature*, **389**, 610-614 (1997).
- 47) Victoria R., Ivan N., Ulf S., Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects, *J. Biol. Chem.*, **278**, 45777-45784 (2003).
- 48) Stepan CM., Bailey ST., Bhat S., Brown EJ., Banerjee RR., Wright CM., Patel HR., Ahima RS., Lazar MA., The hormone resistin links obesity to diabetes, *Nature*, **409**, 307-312 (2001).
- 49) Okuno Y., Fukuhara A., Hashimoto E., Kobayashi H., Kobayashi S., Otsuki M., Shimomura I., Oxidative Stress Inhibits Healthy Adipose Expansion Through Suppression of SREBF1-Mediated Lipogenic Pathway, *Diabetes*, **67**, 1113-1127 (2018).
- 50) Brookheart RT., Michel CI., Schaffer JE., As a matter of fat, *Cell Metab.*, **10**, 9-12 (2009).
- 51) Brøns C., Grunnet LG., MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: a causal mechanism or an innocent bystander? , *Eur. J. Endocrinol.*, **176**, R67-R78 (2017).

- 52) Janani C., Ranjitha Kumari BD., PPAR gamma gene - a review, *Diabetes Metab. Syndr.*, **9**, 46-50 (2015).
- 53) Kang S., Tsai LT., Rosen ED., Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance Trends, *Cell Biol.*, **26**, 341-351 (2016).
- 54) Hauner H., The mode of action of thiazolidinediones, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **18**, S10-15 (2002).
- 55) Han L., Shen WJ., Bittner S., Kraemer FB., Azhar S., PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ , *Future Cardiol.*, **13**, 279-296 (2017).
- 56) Lee MJ., Jash S., Jones JEC., Puri V., Fried SK., Rosiglitazone remodels the lipid droplet and britens human visceral and subcutaneous adipocytes ex vivo, *J. Lipid Res.*, **60**, 856-868 (2019).
- 57) Martinez L., Berenguer M., Bruce MC., Le Marchand-Brustel Y., Govers R., Rosiglitazone increases cell surface GLUT4 levels in 3T3-L1 adipocytes through an enhancement of endosomal recycling, *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1300-1309 (2010).
- 58) Schreiber I., Dörpholz G., Ott CE., Kragesteen B., Schanze N., Lee CT., Köhrle J., Mundlos S., Ruschke K., Knaus P., BMPs as new insulin sensitizers: enhanced glucose uptake in mature 3T3-L1 adipocytes via PPAR γ and GLUT4 upregulation, *Sci. Rep.*, **7**, 17192 (2017).
- 59) Cheng D., Gao H., Li W., Long-term risk of rosiglitazone on cardiovascular events - a systematic review and meta-analysis, *Endokrynol. Pol.*, **69**, 381-394 (2018).
- 60) Tuccori M., Filion KB., Yin H., Yu OH., Platt RW., Azoulay L., Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study, *BMJ.*, **352**, i1541 (2016).
- 61) Hidayat K., Du X., Wu MJ., Shi BM., The use of metformin, insulin, sulphonylureas,

- and thiazolidinediones and the risk of fracture: Systematic review and meta-analysis of observational studies, *Obes. Rev.*, **20**, 1494-1503 (2019).
- 62) Kimura H., Tokuyama S., Ishihara T., Ogawa S., Yokota K., Identification of new flavonol O-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **108**, 102-112 (2015).
- 63) Sudlow A., le Roux CW., Pournaras DJ., Review of multimodal treatment for type 2 diabetes: combining metabolic surgery and pharmacotherapy, *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, **10**, 2042018819875407 (2019).
- 64) Barros RP., Gustafsson JÅ., Estrogen receptors and the metabolic network, *Cell Metab.*, **14**, 289-299 (2011).
- 65) Hammarstedt A., Gogg S., Hedjazifar S., Nerstedt A., Smith U., Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity, *Physiol. Rev.*, **98**, 1911-1941 (2018).
- 66) Pandey GK., Vadivel S., Raghavan S., Mohan V., Balasubramanyam M., Gokulakrishnan K., High molecular weight adiponectin reduces glucolipotoxicity-induced inflammation and improves lipid metabolism and insulin sensitivity via APPL1-AMPK-GLUT4 regulation in 3T3-L1 adipocytes, *Atherosclerosis*, **288**, 67-75 (2019).
- 67) Lehrke M., Lazar MA., The many faces of PPAR gamma, *Cell*, **123**, 993-999 (2005).
- 68) 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., Resistin up-regulates LPL expression through the PPAR γ -dependent PI3K / AKT signaling pathway impacting lipid accumulation in RAW264.7 macrophages, *Cytokine*, **119**, 168-174 (2019).

- 69) Brendan DM., Lewis CC., AKT / PKB Signaling: Navigating Downstream, *Cell*, **129**, 1261-1274 (2007).
- 70) Bhaskar PT., Hay N., The two TORCs and Akt, *Dev. Cell*, **12**, 487-502 (2007).
- 71) Bozulis L., Hemmings BA., PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 256-261 (2009).
- 72) Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis AL., Myriantopoulos V., Mikros E., Tarricone A., Musacchio A., Roe SM., Pearl L., Leost M., Greengard P., Meijer L., Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases, *J. Med. Chem.*, **47**, 935-946 (2004).
- 73) Bolden A., Bernard L., Jones D., Akinyeke T., Stewart LV., The PPAR Gamma Agonist Troglitazone Regulates Erk 1/2 Phosphorylation via a PPAR γ -Independent, MEK-Dependent Pathway in Human Prostate Cancer Cells, *PPAR Res.*, **2012**, 929052 (2012).
- 74) LeBrasseur NK., Kelly M., Tsao TS., Farmer SR., Saha AK., Ruderman NB., Tomas E., Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E175-181 (2006).
- 75) Leesnitzer LM., Parks DJ., Bledsoe RK., Cobb JE., Collins JL., Consler TG., Davis RG., Hull-Ryde EA., Lenhard JM., Patel L., Plunket KD., Shenk JL., Stimmel JB., Therapontos C., Willson TM., Blanchard SG., Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662, *Biochemistry*, **41**, 6640-6650 (2002).
- 76) Waku T., Shiraki T., Oyama T., Maebara K., Nakamori R., Morikawa K., The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites,

- EMBO J.*, **29**, 3395-3407 (2010).
- 77) Rosen ED., MacDougald OA., Adipocyte differentiation from the inside out, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 885-896 (2006).
- 78) Paar M., Jüngst C., Steiner NA., Magnes C., Sinner F., Kolb D., Lass A., Zimmermann R., Zumbusch A., Kohlwein SD., Wolinski H., Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 11164-11173 (2012).
- 79) Lee I., Kim J., Ryoo I., Kim Y., Choo S., Yoo I., Min B., Na M., Hattori M., Bae K., Lanostane triterpenes from *Ganoderma lucidum* suppress the adipogenesis in 3T3-L1 cells through down-regulation of SREBP-1c, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5577-5581 (2010).
- 80) Jiang L., Zhang NX., Mo W., Wan R., Ma CG., Li X., Gu YL., Yang XY., Tang QQ., Song HY., *Rehmannia* inhibits adipocyte differentiation and adipogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 185-190 (2008).
- 81) Zisman A., Peroni OD., Abel ED., Michael MD., Mauvais-Jarvis F., Lowell BB., Wojtaszewski JF., Hirshman MF., Virkamaki A., Goodyear LJ., Kahn CR., Kahn BB., Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance, *Nat. Med.*, **6**, 924-928 (2000).
- 82) Camp HS., Ren D., Leff T., Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes, *Trends Mol. Med.*, **8**, 442-447 (2002).
- 83) Balakrishnan BB., Krishnasamy K., Choi KC., *Moringa concanensis* Nimmo ameliorates hyperglycemia in 3T3-L1 adipocytes by upregulating PPAR- γ , C/EBP- α via Akt signaling pathway and STZ-induced diabetic rats, *Biomed. Pharmacother.*, **103**, 719-728 (2018).

- 84) Muthukumar P., Thiyagarajan G., Arun Babu R., Lakshmi BS., Raffinose from *Costus speciosus* attenuates lipid synthesis through modulation of PPARs / SREBP1c and improves insulin sensitivity through PI3K / AKT, *Chem. Biol. Interact.*, **284**, 80-89 (2018).
- 85) Høivik ML., Moum B., Solberg IC., Henriksen M., Cvancarova M., Bernklev T., Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study, *Gut*, **62**, 368-375 (2013).
- 86) Weisshof R., El Jurdi K., Zmeter N., Rubin DT., Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease, *Adv Ther.*, **35**, 1746-1762 (2018).
- 87) Ananthakrishnan, AN., Epidemiology and risk factors for IBD, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **12**, 205-217 (2015).
- 88) Kokkinidis DG., Bosdelekidou EE., Iliopoulou SM., Tassos AG., Texakalidis PT., Economopoulos KP., Kousoulis AA., Emerging treatments for ulcerative colitis: a systematic review, *Scand. J. Gastroenterol.*, **52**, 923-931 (2017).
- 89) Ruder B., Atreya R., Becker C., Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, E1887 (2019).
- 90) Li Y., Soendergaard C., Bergenheim FH., Aronoff DM., Milne G., Riis LB., Seidelin JB., Jensen KB., Nielsen OH., COX-2-PGE₂ Signaling Impairs Intestinal Epithelial Regeneration and Associates with TNF Inhibitor Responsiveness in Ulcerative Colitis, *EBioMedicine*, **36**, 497-507 (2018).
- 91) Aoki T., Narumiya S., Prostaglandin E₂-EP₂ signaling as a node of chronic inflammation in the colon tumor microenvironment, *Inflamm Regen.*, **37**, 4 (2017).
- 92) Ikeda Y., Ito M., Matsuu M., Shichijo K., Fukuda E., Nakayama T., Nakashima M., Naito S., Sekine I., Expression of ICAM-1 and acute inflammatory cell infiltration in

- the early phase of radiation colitis in rats, *J. Radiat. Res.*, **41**, 279-291 (2000).
- 93) Kawai S., Iijima H., Shinzaki S., Hiyama S., Yamaguchi T., Araki M., Iwatani S., Shiraishi E., Mukai A., Inoue T., Hayashi Y., Tsujii M., Motooka D., Nakamura S., Iida T., Takehara T., Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation, *J. Gastroenterol.*, **52**, 904-919 (2017).
- 94) Misumi K., Ogo T., Ueda J., Tsuji A., Fukui S., Konagai N., Asano R., Yasuda S., Development of Pulmonary Arterial Hypertension in a Patient Treated with Qing-Dai (Chinese Herbal Medicine), *Intern. Med.*, **58**, 395-399 (2019).
- 95) Kondo S., Araki T., Okita Y., Yamamoto A., Hamada Y., Katsurahara M., Horiki N., Nakamura M., Shimoyama T., Yamamoto T., Takei Y., Kusunoki M., Colitis with wall thickening and edematous changes during oral administration of the powdered form of Qing-dai in patients with ulcerative colitis: a report of two cases, *Clin. J. Gastroenterol.*, **11**, 268-272 (2018).
- 96) Bantel H., Berg C., Vieth M., Stolte M., Kruis W., Schulze-Osthoff K., Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF- κ B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis, *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 3452-3457 (2000).
- 97) Punchard NA., Greenfield SM., Thompson RP., Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid, *Mediators Inflamm.*, **1**, 151-165 (1992).
- 98) Rousseaux C., Lefebvre B., Dubuquoy L., Lefebvre P., Romano O., Auwerx J., Metzger D., Wahli W., Desvergne B., Naccari GC., Chavatte P., Farce A., Bulois P., Cortot A., Colombel JF., Desreumaux P., Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *J. Exp. Med.*, **201**, 1205-1215 (2015).

- 99) Ungaro R., Mehandru S., Allen PB., Peyrin-Biroulet L., Colombel JF., Ulcerative colitis, *Lancet*, **389**, 1756-1770 (2017).
- 100) Pedersen G., Brynskov J., Topical rosiglitazone treatment improves ulcerative colitis by restoring peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity, *Am. J. Gastroenterol.*, **105**, 1595-1603 (2010).
- 101) Lewis JD., Lichtenstein GR., Deren JJ., Sands BE., Hanauer SB., Katz JA., Lashner B., Present DH., Chuai S., Ellenberg JH., Nessel L., Wu GD.; Rosiglitazone for Ulcerative Colitis Study Group, Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial, *Gastroenterology*, **134**, 688-695 (2008).
- 102) Diamant G., Dikstein R., Transcriptional control by NF- κ B: elongation in focus, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1829**, 937-945 (2013).
- 103) Korbecki J., Bobiński R., Dutka M., Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors, *Inflamm. Res.*, **68**, 443-458 (2019).
- 104) Han M., Gao H., Ju P., Gao MQ., Yuan YP., Chen XH., Liu KL., Han YT., Han ZW., Hispidulin inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis through AMPK and ERK signaling mediated activation of PPAR γ , *Biomed. Pharmacother.*, **103**, 272-283 (2018).
- 105) Sheibanie AF., Yen JH., Khayrullina T., Emig F., Zhang M., Tuma R., Ganea D., The proinflammatory effect of prostaglandin E₂ in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23 - IL-17 axis, *J. Immunol.*, **178**, 8138-8147 (2007).
- 106) Meade EA., McIntyre TM., Zimmerman GA., Prescott SM., Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **274**, 8328-8334 (1999).

- 107) Han S., Inoue H., Flowers LC., Sidell N., Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **9**, 4627-4635 (2003).
- 108) Dammann K., Khare V., Gasche C., Tracing PAKs from GI inflammation to cancer, *Gut*, **63**, 1173-1184 (2013).
- 109) Dammann K., Khare V., Lang M., Claudel T., Harpain F., Granofszky N., Evstatiev R., Williams JM., Pritchard DM., Watson A., Gasche C., PAK1 modulates a PPAR γ / NF- κ B cascade in intestinal inflammation., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1853**, 2349-2360 (2015).
- 110) Wang Z., Wu X., Wang CL., Wang L., Sun C., Zhang DB., Liu JL., Liang YN., Tang DX., Tang ZS., Tryptanthrin Protects Mice against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis through Inhibition of TNF- α / NF- κ B and IL-6 / STAT3 Pathways, *Molecules*, **23**, E1062 (2018).
- 111) Rosario M., Dirks NL., Milch C., Parikh A., Bargfrede M., Wyant T., Fedyk E., Fox I., A Review of the Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of Vedolizumab, *Clin. Pharmacokinet.*, **56**, 1287-1301 (2017).
- 112) Suzuki Y., Watanabe M., Matsui T., Motoya S., Hisamatsu T., Yuasa H., Tabira J., Isogawa N., Tsuchiwata S., Arai S., Hibi T., Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy in Japanese Patients with Active Ulcerative Colitis, *Inflamm. Intest. Dis.*, **4**, 131-143 (2019).
- 113) Hanauer SB., Sandborn WJ., Kornbluth A., Katz S., Safdi M., Woogen S., Regalli G., Yeh C., Smith-Hall N., Ajayi F., Delayed-release oral mesalamine at 4.8 g / day (800 mg tablet) for the treatment of moderately active ulcerative colitis: the ASCEND II trial, *Am. J. Gastroenterol.*, **100**, 2478-2485 (2005).

- 114) Kruis W., Bar-Meir S., Feher J., Mickisch O., Mlitz H., Faszczyk M., Chowers Y., Lengyele G., Kovacs A., Lakatos L., Stolte M., Vieth M., Greinwald R., The optimal dose of 5-aminosalicylic acid in active ulcerative colitis: a dose-finding study with newly developed mesalamine, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **1**, 36-43 (2003).
- 115) Cheng HS., Tan WR., Low ZS., Marvalim C., Lee JYH., Tan NS., Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, E5055 (2019).

論文目録

本博士論文は以下の原著論文を基に作成した。

- 1) Taisuke Konno, Kenroh Sasaki, Kyoko Kobayashi, Toshihiro Murata
Indirubin Promotes Adipocyte Differentiation and Reduce Lipid Accumulation in 3T3-L1 cell via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation.
Molecular Medicine Reports, **21**, 1552-1560 (2020).