

# 東北医科薬科大学

## 審査学位論文（博士）要旨

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- $\alpha$ 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 $\gamma$ 活性化を介したインスリン抵抗性の改善及び TNF- $\alpha$ 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

生薬学教室 金野 太亮

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、及び生薬として、その美的要素と多くの機能性に由来する様々な用途が知られている。当研究室では Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) リガンド活性を示す化合物のスクリーニングを行っているが、タデ藍 *Persicaria tinctoria* に含まれる Indirubin, 及び Tryptanthrin が PPAR  $\gamma$  リガンド活性を有することに着目し、タデ藍の機能性の解明と新たな治療薬としての可能性について、第 1 章ではマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞株を用いた Indirubin のインスリン抵抗性改善作用について、第 2 章ではヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$  誘導性炎症モデルを用いた潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis ; UC)における Tryptanthrin の抗炎症メカニズムを検討した。

## 【第 1 章】タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 Indirubin による PPAR $\gamma$ 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

【背景】インスリン感受性の亢進に寄与する Adipokine は、正常に成熟した成熟脂肪細胞により産生されるが、脂肪細胞の分化障害や過度に肥大化した脂肪細胞により産生される炎症惹起物質はインスリン抵抗性を引き起こす (Fig. 1)。PPAR  $\gamma$  は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、インスリン感受性に関与する重要な因子である。PPAR  $\gamma$  を活性化することは、脂肪前駆細胞を成熟

脂肪細胞へと細胞分化を促進させると共に、成熟脂肪細胞における糖脂質代謝能を亢進させることで脂肪細胞の正常な機能を増強し、インスリン抵抗性の改善に寄与できる可能性がある。

このことから、Indirubin の PPAR  $\gamma$  リガンド活性を介したインスリン抵抗性改善作用について検討した。

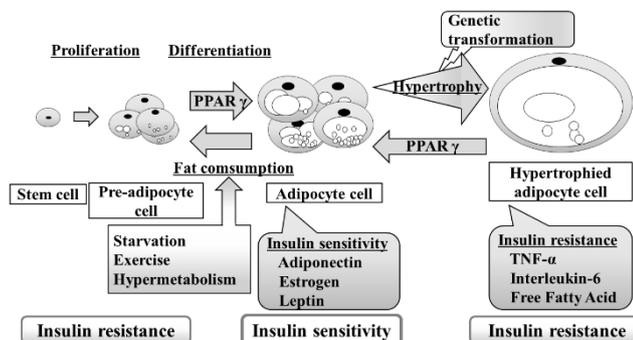


Fig. 1 Differentiation process of adipocytes and insulin sensitivity.

**【方法】** Indirubin の PPAR  $\gamma$  リガンド活性は、ELISA 法で評価した。また、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞株を用いて脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への細胞分化促進作用に対する影響と、成熟脂肪細胞における Glucose 消費量、GLUT4、Adiponectin、及び Estrogen の定量を行い、Indirubin のインスリン抵抗性改善作用を評価した。

**【結果】** 50 nM Indirubin は、同濃度の Pioglitazone と比較し 1.35 倍強い PPAR  $\gamma$  リガンド活性を示した。この結合活性は、PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 (100 nM - 1 nM) により濃度依存的に有意に抑制された。脂肪前駆細胞に対する Indirubin (1  $\mu$ M - 1 nM) の影響を検討したところ、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依存的に増強された。次に、成熟脂肪細胞に対する Indirubin の影響を検討した。Indirubin (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、Rosiglitazone 処理群 (1  $\mu$ M - 1 nM) と同様に脂肪滴サイズの縮小と多数の微細な脂肪滴の分散を認める細胞分化の適正化による過剰な脂肪蓄積を有意に抑制した。また、Indirubin 処理により培地中 Glucose 濃度の有意な低下を示し、最も低下した 1  $\mu$ M Indirubin 処理群ではコントロール群と比較し 13.7 % の低下が見られた。このとき、GLUT4 発現量は、Indirubin 処理群でコントロール群と比較して、最大で 1.48 倍の有意な増加を示

し、その影響は用量依存的であった。この影響は 1  $\mu$ M Indirubin は同濃度の Rosiglitazone と比較して約 1.2 倍強いものであった。さらに、Indirubin 処理した細胞における Adiponectin, 及び Estrogen 分泌量は、コントロール群と比較して各々最大 1.85 倍, 及び 1.64 倍の有意な分泌量亢進を示し、その影響には明確な濃度依存性を認めた。

**【考察】** PPAR  $\gamma$  は細胞の核内受容体として機能性維持を司る重要な調節因子であり、その生理機能発現はリガンド結合部位へのリガンド結合により活性化された PPAR  $\gamma$  が、PI3K/Akt 系, Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) 系, 及び AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) 系等の複数のシグナル伝達系に対する多彩な調節, 及びクロストークを介して制御されることに起因する。特に、PI3K/Akt シグナル系は細胞分化, Glucose 輸送, 及び脂質代謝等の多彩な生理機能発現に関与することが示されていることから、GLUT4 発現量増加に伴う糖消費量の亢進, 及び Adipokine 分泌量増加は Indirubin が PPAR  $\gamma$  を介し本経路に作用した可能性が推察される。また、Indirubin 処理した細胞には特徴的な形態学的変化が観察されたが、これは脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴い脂質代謝能を獲得する過程において、PPAR  $\gamma$  活性化を介した脂質合成関連遺伝子発現やその活性調節, さらに脂質代謝関連タンパク質等に対し影響を与えたものと推察できる。今後、より詳細な検討が必要ではあるが、以上のことから Indirubin はインスリン抵抗性を改善する可能性があることが示唆されたものと考えられる。

**【第 2 章】** ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$  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

**【背景】** TNF- $\alpha$  は、UC の炎症誘導において最も重要なメディエーターの 1 つであり、大腸上皮の炎症に反応し COX-2 をはじめとした炎症誘発性シグナルを刺

激する. この COX-2 発現を起点としたプロスタノイドシグナル伝達は, 粘膜治癒だけではなく, 炎症を誘導し相乗的に TNF- $\alpha$  誘導性炎症反応を増幅させると共に, PG 類により惹起された炎症を増悪する正のフィードバック機構を介し最終的に UC の重篤化を引き起こす. さらに, これらの刺激で誘導された Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)は, 炎症亢進, 及び粘膜損傷を引き起こすことで病態形成に関与する. PPAR  $\gamma$  発現量低下は UC 発症の一因であり, UC 治療における Key Drug 5-aminosalicylic acid (5-ASA) は PPAR  $\gamma$  を介した抗炎症作用を示すこと, またタ

デ藍は臨床試験により難治性症例に著効を示す「青黛」の起原植物であることに着目し, PPAR  $\gamma$  を標的とした Tryptanthrin の抗炎症作用を検討した (Fig. 2).

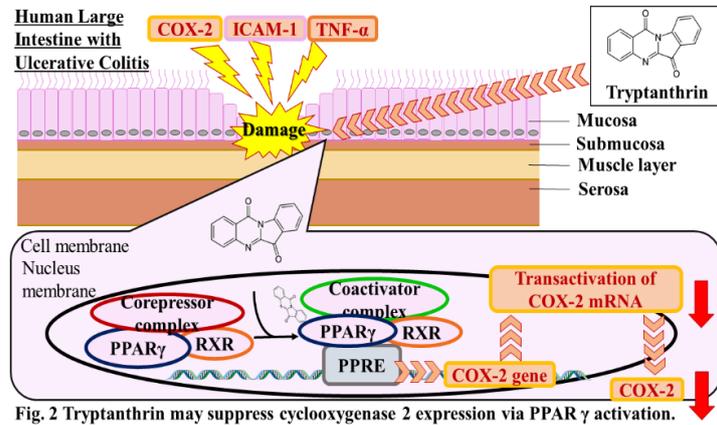


Fig. 2 Tryptanthrin may suppress cyclooxygenase 2 expression via PPAR  $\gamma$  activation.

**【方法】** Tryptanthrin の PPAR  $\gamma$  リガンド活性は, ELISA 法で評価した. ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$  誘導炎症モデルを用いて COX-2, 及び ICAM-1 を発現させ, その発現量を定量し Tryptanthrin による抗炎症効果の評価した.

**【結果】** 5 nM Tryptanthrin は, 5 nM 5-ASA と同様の PPAR  $\gamma$  リガンド活性を示し, PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 (100 nM-1 nM) 併用により, その結合活性は濃度依存的に有意に抑制された. また, Tryptanthrin 処理した細胞の COX-2 発現量は濃度依存的に有意な低下を示したが, ICAM-1 発現量には影響を与えなかった.

**【考察】** Tryptanthrin は, ICAM-1 発現に影響を与えずに, COX-2 発現量を抑制

したが、これは COX-2 プロモーターが PPAR  $\gamma$  シグナル伝達系の下流領域に位置する PPRE の一部に含まれていることにより制御されたためと考えられる。PPAR  $\gamma$  により制御を受けたものと考えられる。PPAR  $\gamma$  リガンドによる COX-2 のダウンレギュレーションは、COX-2 プロモーターに対する転写因子 Activator Protein-1 (AP-1) 活性化の抑制により発揮される。このことから、COX-2-PGE<sub>2</sub> シグナルは粘膜治癒、及び粘膜損傷 2 つの相反する作用を有しているため、炎症条件下における本シグナル伝達系の適正化は大腸上皮細胞の恒常性維持において重要である。炎症時には、TNF- $\alpha$  は大腸上皮細胞において過剰に p21 Activated Kinase (PAK1) を発現させ、NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することで炎症反応を増強する。このとき PPAR  $\gamma$  アゴニストは、過剰発現した PAK1 を阻害し PPAR  $\gamma$  発現量を回復させることで、NF- $\kappa$ B のダウンレギュレーションを誘導し炎症反応を抑制する。したがって、Tryptanthrin は 5-ASA と同様の機序をもつことに加え、I $\kappa$ B $\alpha$  分解抑制作用による p65 の核内移行量も制限することで、複合的な抗炎症効果を発揮することが推察される。

〔総括〕PPAR  $\gamma$  活性化を介し Indirubin はインスリン抵抗性改善作用, Tryptanthrin は抗炎症作用を示すこと示唆されたことから、タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有機能性成分は新たな治療薬開発の一助になるものと考えられる。

#### <参考文献> 主論文 (原著論文)

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