

## 5. アイヌ民族伝承有用植物における メタボリック症候群抑制・核内受容体PPAR活性の探索

小島弘幸（北海道立衛生研究所・健康科学部）

姉帯正樹（北海道立衛生研究所・食品薬品部）

兼俊明夫（北海道立衛生研究所・食品薬品部）

### 【 目 的 】

食生活の欧米化を伴う飽食や運動不足により、我が国の内蔵脂肪蓄積（肥満）によるメタボリック症候群は予備軍を含めると約 200 万人（厚生労働省 2007）と推定され社会問題となっている。核内受容体スーパーファミリーの 1 種である Peroxisome-proliferator activated receptor (PPAR) は、細胞内小器官であるペルオキシソームの増殖剤により活性化される受容体として 1990 年に発見され<sup>1)</sup>、現在までに $\alpha$ 、 $\beta(\delta)$ 、 $\gamma$  の 3 種類のサブタイプが存在し、それぞれ発現する組織が異なることが明らかにされている<sup>2)</sup>。PPAR $\alpha$  作動薬は高脂血症治療薬として、PPAR $\gamma$  作動薬は 2 型糖尿病治療薬として既に臨床で用いられており、PPAR $\beta$  は脂肪酸燃焼や HDL コレステロール増加に関与していることが明らかとなり最近注目されている。このように PPAR を介した作用は、メタボリック症候群を抑制するとともに、癌抑制や抗炎症などにも関与することから、世界的に広く PPAR 作動物質（アゴニスト）の探索が行われている。

北海道は北方系薬用植物の宝庫であり、特に自然と共に生活してきたアイヌ民族が利用した様々な植物について多くの報告がある<sup>3,4)</sup>。これらの植物成分を対象にいくつかの薬理学的研究が行われてきたが、PPAR を標的分子とした研究は行われていない。アイヌ文化と現代科学を融合させることは、新たな文化的資源価値を創造すると考えられ、アイヌ民族が食用あるいは薬用としてきた植物について、メタボ関連疾患に対する創薬としての有用性を評価することは、北海道の豊かな植物資源に付加価値をもたらすと考えられる。本研究では、アイヌ民族伝承有用植物の脂溶性抽出物（81 試料）を作製し、それらの PPAR $\alpha/\beta/\gamma$  に対する各アゴニスト活性をレポーター遺伝子アッセイ法により評価したので報告する。

### 【 方 法 】

#### 1. 植物試料

アイヌ民族博物館周辺（白老町）や当所薬用植物園で採取された 45 種類の植物を利用した。それぞれ部位別（地上部、地下部、果実・種子など）に分け、計 81 の植物試料とした。

#### 2. 植物抽出エキス及び試験溶液の調製

植物試料 10～35 g を細切し、70% アセトン 30～150 mL を加え、室温に一晩以上放置した。ろ過後、ろ液を減圧下で濃縮し粗抽出物を得た。次に、脂溶性画分を分取するため粗抽出

物約 20mg を精秤し、脱イオン水 2 mL を加えた後、エーテル 1 mL で 2 回抽出した。エーテル溶液をドラフト内に放置し、エーテルを蒸散させた後に真空ポンプで 20 分間程引いてエーテル可溶物を得た。エーテル可溶物は少量で正確な重量を求められなかったため、もとの粗抽出物 10.0mg に対し、ジメチルスルホキシド (DMSO) 100 $\mu$ L を加えて溶解し、試験試料とした。なお、試験試料は通し番号 (試料 No.1-81) で記し、その植物・部位名については未発表のため記述を控えた。

### 3. PPAR 活性を検出するためのレポーター遺伝子アッセイ

植物抽出エキスのヒト由来 PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  に対するアゴニスト作用を右図に示すサル腎臓由来 COS-7 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ法により測定した (図 1)。96 穴マイクロプレートに COS-7 細胞 (10,000 個) を播種し 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。PPAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$  の各発現プラスミド、PPRE レポータープラスミド及びコントロールプラスミドをロッシュ社製 FuGene6 トランスフェクション試薬により細胞内に導入した。3 時間培養後、陽性対照物質 (10 $^{-5}$ M) 及び植物抽出エキス

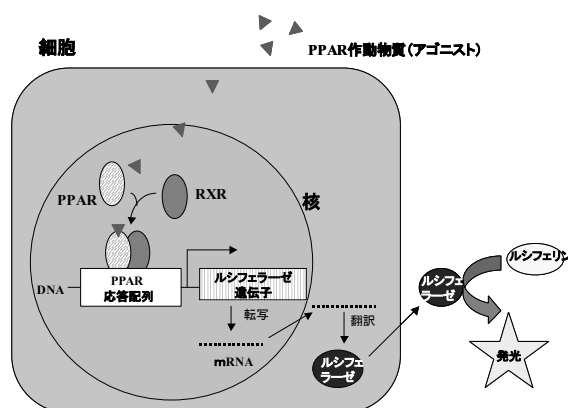


図 1 PPARアゴニスト検出のためのレポーター遺伝子アッセイ法

の試験試料 (0.3% v/v) を添加後、24 時間培養した。細胞内ルシフェラーゼ誘導活性についてプロメガ社製ルシフェラーゼアッセイシステムにより Perkin-Elmer 社製ルミノメーター (Wallac 1420 ARVO SX) を用いて測定した。また、細胞毒性等を補正するためのコントロールプラスミド由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性について、蛍光法<sup>5)</sup>により測定した。ルシフェラーゼ活性を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で除した値を PPAR アゴニスト活性とし、試験試料のアゴニスト活性は、陽性対照物質 (10 $^{-5}$ M) の活性を 100 とした場合の相対活性 (%) で表した。なお、陽性対照物質として、PPAR $\alpha$ アッセイの場合は Ciprofibrate、PPAR $\beta$ アッセイの場合は L-651,041、PPAR $\gamma$ アッセイの場合は Pioglitazone をそれぞれ使用した (図 2)。

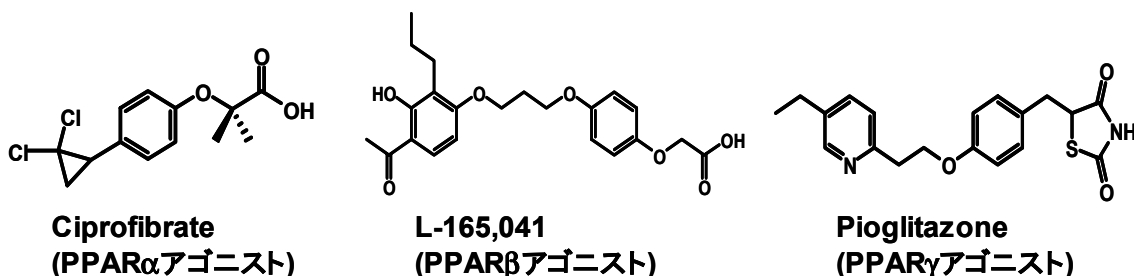


図 2 陽性対照物質の化学構造

## 【 結果及び考察 】

PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ の各アッセイ系における陽性対照物質の用量反応曲線を図 3 に示す。Ciprofibrate、L-651,041、Pioglitazone とともに良好な用量依存的 PPAR アゴニスト活性が認められ、最大濃度 ( $10^{-5}$ M) ではそれぞれ約 13 倍、8 倍、13 倍のアゴニスト活性を示した。このことから、PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ の各アッセイ系は、植物抽出エキスの PPAR 活性を探索するアッセイ法として有用であることが示唆された。

これらのアッセイ系を用いて 70%アセトン抽出後にエーテル抽出された 81 種の植物抽出エキスの PPAR アゴニスト活性を測定した。図 4 に示すように、81 種のエキスの中には、PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ の各アッセイにおいてアゴニスト活性を示すものが数多く認められた。特に、PPAR $\alpha$ アッセイ (図 4 A) では、PPAR $\beta$ 及び PPAR $\gamma$ アッセイ (図 4 B 及び C) に比べて、多くのエキスが活性を示した。このことは、PPAR $\alpha$ は PPAR $\beta$ / $\gamma$ に比べてリガンドに対する特異性が低いことを示唆しており、200 種類の農薬を用いた我々の研究結果<sup>6)</sup>を支持しているものと考えられた。

81 種のエキスの中で、相対的なルシフェラーゼ誘導活性が 20%を超える比較的活性の強いエキスは、PPAR $\alpha$ では 13 種 (試料 No.6, 10, 15, 16, 45, 47, 50, 53, 73, 75, 79)、PPAR $\beta$ では 1 種 (試料 No.47)、PPAR $\gamma$ では 2 種 (試料 No.47, 70) で認められた (図 4)。これらの中で、試料 No.47 は PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ の各アッセイでそれぞれ 74, 29, 22%の強いアゴニスト活性を示した。さらに、試料 No.47 による PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ に対するアゴニスト活性は用量依存的 (0.01 ~ 0.3% v/v) であることが明らかとなった (図 5)。最近の研究では、PPAR $\alpha$ と PPAR $\gamma$ の両方にアゴニスト作用を示すデュアル PPAR アゴニストも開発されている<sup>7)</sup>。試料 No.47 の抽出エキスを、PPAR サブタイプに反応する別々あるいは共通の物質が存在するか否かは明らかではないが、大変興味ある結果と考えられる。また、試料 No.70 のエキスは、PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

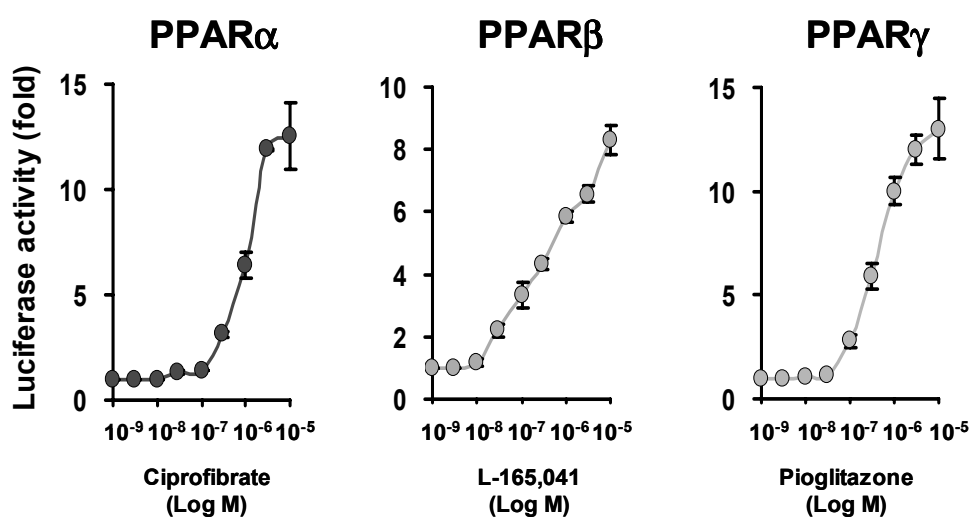


図3 陽性対照物質(PPARアゴニスト)の用量反応曲線

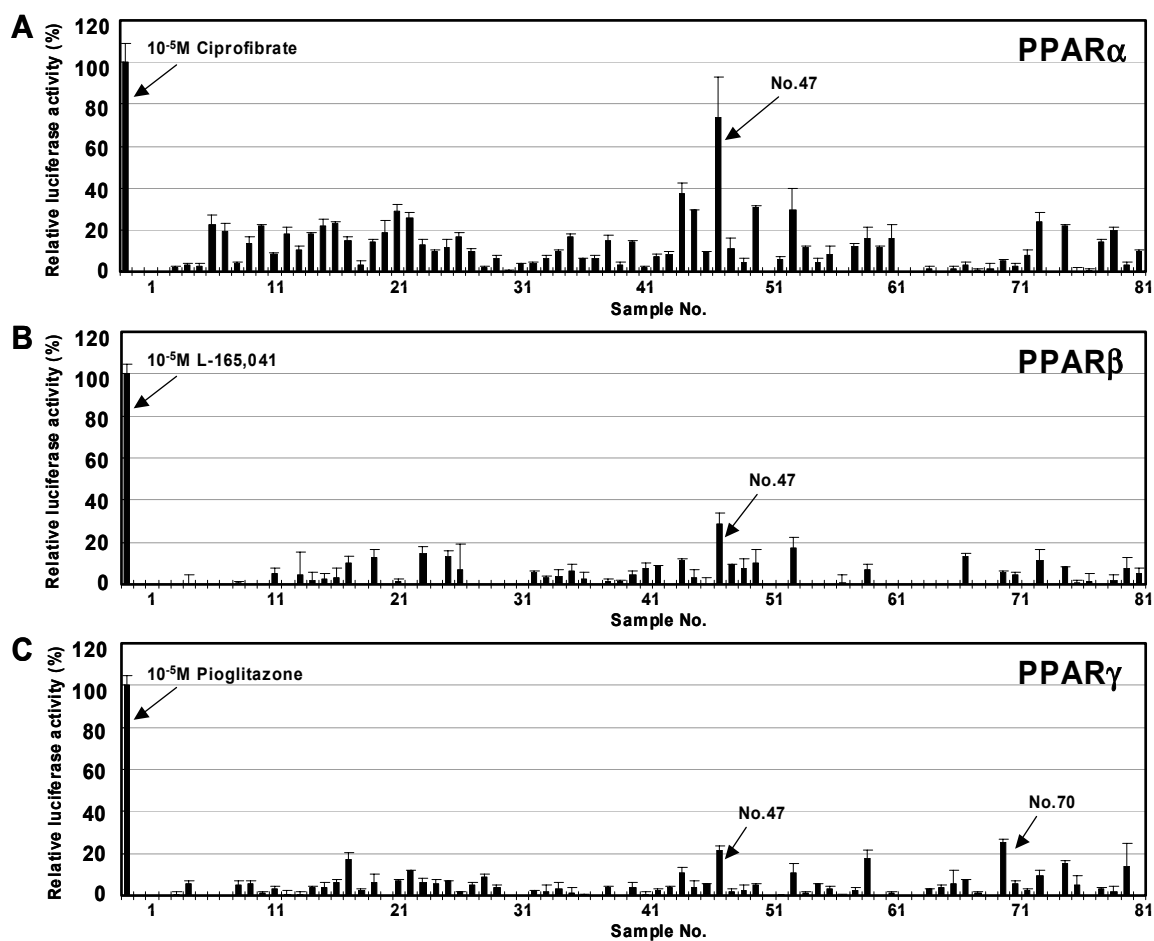


図4 植物抽出エキス(0.3% v/v)におけるPPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ アゴニスト活性の探索

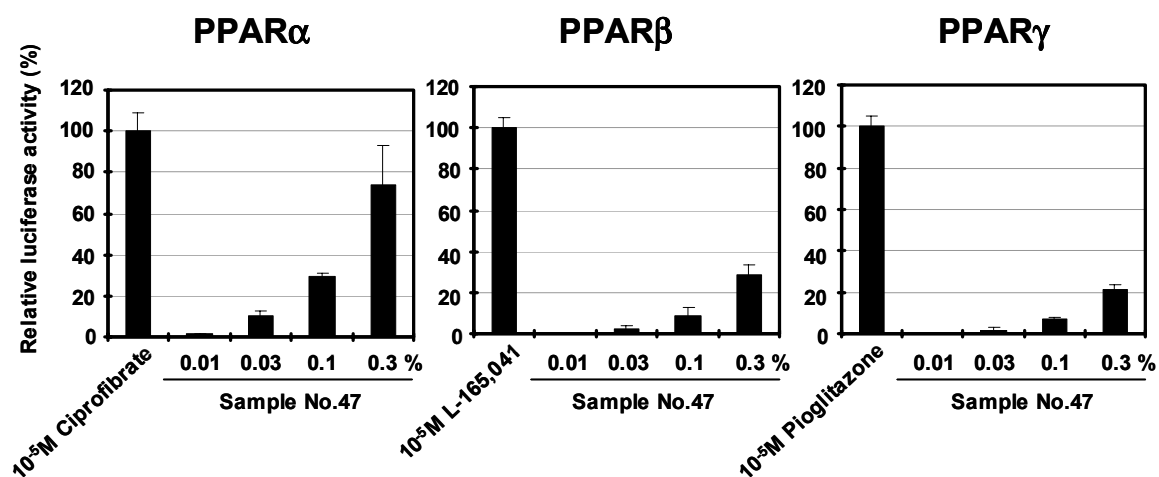


図5 試料No.47の用量依存的 PPAR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ アゴニスト活性

が26%と試験したエキスの中では最も高く、PPAR $\alpha$ / $\beta$ アゴニスト活性はそれぞれ5%程度と低かった。このように、PPAR $\gamma$ に特異的な活性エキスについても有用と考えられる。本研究では、81 試料について PPAR 活性の探索を行い、今後の研究において活性化合物を同定するための抽出・精製が必要ないいくつかの候補エキスを見出した。このようなエキス中の活性成分が新規の PPAR アゴニストである場合、健康食品や創薬に発展する可能性があると考えられる。

アイヌ民族は数多くの植物を利用し、特に食用植物は栄養源として日々欠かさず利用され、同時に健康を保つ薬の役割も果たしていたことが文献に記されている<sup>3,4)</sup>。メタボリック症候群は、動脈硬化症・糖尿病・高血圧・高脂血症など生活習慣病の発症リスクを高めるため、メタボリック症候群を抑制することは緊急課題となっている。今後の研究により、アイヌ民族の植物文化遺産を現代の生活習慣病対策に活かすことが期待できると考えられる。

## 【 文 献 】

- 1) Issemann I. *et al.*, Nature, 347:645-650 (1990)
- 2) Lemberger T. *et al.*, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 12:335-363 (1996)
- 3) 知里真志保：知里真志保著作集 別巻 分類アイヌ語辞典 植物編・動物編、平凡社、東京（1993）
- 4) 北海道立衛生研究所他：全道版アイヌ民族の有用植物 - 薬用・食用編 -、北海道立衛生研究所、札幌（1996）
- 5) Kojima H. *et al.*, Environ. Health Perspect., 117:1210-1218 (2009)
- 6) Takeuchi S. *et al.*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 217:235-244 (2006)
- 7) Staels B. and Fruchart J.C., Diabetes, 54:2460-2470 (2005)

## 【 経費使途明細 】

試薬（ciprofibrate, L-651,041 等）	97,690 円
細胞株及び保存液	84,600 円
培養液	18,610 円
ルシフェラーゼアッセイシステム及びリシスバッファー	79,280 円
トランスフェクション試薬 FuGene6	52,410 円
ピペット及びピペットチップ	29,380 円
アッセイチューブ及びマイクロプレート	112,810 円
ゲル電気泳動槽及びオリゴ DNA	25,220 円
合 計	500,000 円