

●論文

ビワ葉水抽出物による脂肪細胞分化促進作用

平井 静・神田尚幸・高橋麻子
大江靖雄・江頭祐嘉合

千葉大学大学院園芸学研究科

Water extract of *Eriobotrya japonica* enhances adipocyte differentiationShizuka Hirai, Naoyuki Kanda, Asako Takahashi,
Yasuo Ohe and Yukari Egashira

Graduate school of Horticulture, Chiba University

Abstract

Obesity is a major risk factor for diabetes, hyperlipidemia, hypertension, and atherosclerosis, so-called metabolic syndrome. Hypertrophied adipocytes, which increase as the progression of obesity, secrete various adipokines leading to metabolic syndrome. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), the master regulator of adipocyte differentiation, increase the number of small-sized adipocytes with high insulin sensitivity; therefore, they suppress metabolic syndrome. In the present study, water extract of the leaves of *Eriobotrya japonica* dose-dependently enhanced both PPAR γ transactivation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. These results suggest that the leaves of *Eriobotrya japonica* contain hydrophilic PPAR γ agonists which may promote adipocyte differentiation.

Key words : *Eriobotrya japonica*, PPAR γ , 3T3-L1, leaves
キーワード : ビワ, PPAR γ , 3T3-L1, 葉

corresponding author: E-mail: egashira@faculty.chiba-u.jp (Y.Egashira)

背 景

現在、我が国では、肥満やそれに伴って発症するメタボリックシンドロームが社会問題となっている。肥満の原因は遺伝因子の他に環境因子である過食、高脂肪食、運動不足が大きく関与しており、特に内臓脂肪蓄積型肥満はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常、動脈硬化などのメタボリックシンドロームを発症する基盤となるため注意が必要である (Matsuzawa, 2006; Mathieu et al., 2008)。

肥満が進行すると脂肪細胞が肥大化し、メタボリックシンドロームの原因となる tumor necrosis factor- α や plasminogen activator inhibitor-1 等の各種アディポサイトカインが分泌されることが知られている (Hotamisligil et al., 1993; Funahashi et al., 1999)。一方、抗糖尿病薬として使用されているチアゾリジン誘導体は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られる peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) のリガンドとなることで脂肪細胞分化を促進し、小型の脂肪細胞を増加させるため、メタボリックシンドロームの抑制作用を有する (Okuno et al., 1998; Kubota et al., 1999; Yamauchi et al., 2001)。しかしこのような薬剤は、脂肪細胞分化を強力に促進し脂肪細胞数を増加させることで肥満を誘発するなどいくつかの副作用が報告されているため (Yamauchi et al., 2001; Mudaliar

et al., 2003)、穏やかに脂肪細胞分化を促進する副作用のない食品由来成分が注目されている。

ビワ (*Eriobotrya japonica* L.) はバラ科ビワ属に属する常緑高木で、その果実は甘く、生食される他はジャム、果実酒、缶詰などに加工され食されている。一方、ビワ葉は、古来よりインドや中国では漢方薬として、また我が国でも「枇杷葉湯」などの飲料として夏ばてや食中毒予防の民間薬として利用されてきたが、その果実に比べて大部分は廃棄されあまり利用されていないのが現状である。またビワ葉の機能性に関しては、その抽出物が抗炎症 (Cha et al., 2011)、抗糖尿病 (Li et al., 2007)、高脂血症予防 (Shih et al., 2010) 作用などを有することが報告されているが、それらはいずれも有機溶媒による抽出物の効果であり、水抽出物の機能性に関する科学研究はあまり進んでいない。

そこで本試験では、ビワ葉の茶としての利用を考え、ビワ葉の水抽出物が PPAR γ 活性や脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

供試材料

ビワ葉は千葉県南房総市の「道の駅とみうら枇杷倶楽部」より7月に提供を受けた。ビワ葉は、提供後すぐに水道水で

洗浄後、凍結乾燥機 (FDU-2100, EYELA) を用いて 4 日間凍結乾燥を行った。小型協力粉碎機 (FM-1, 大阪ケミカル株式会社) を用いて破碎した乾燥ビワ葉7.5gに蒸留水150mLを加え、80°Cの湯浴中で3時間振盪した。遠心分離 (室温, 15,000rpm, 10分) により上清を回収し、凍結乾燥後、100mg/mLとなるように蒸留水を加え、超音波破碎器 (QSonica Q55, ワケンビーテック) を用いて抽出物の粘度を下げた後、2.2 μ m 孔のシリンジフィルター (Millipore) を通し、これをビワ葉水抽出物とした。

PPAR γ レポーターアッセイ

アフリカミドリザル腎臓由来のCV1細胞 (American Type Culture Collectionより購入) を6cm プレートに10%FBS含有培地を用いて4.5 \times 10⁴ cells/mLで播種し、CO₂インキュベーターにて、37°C, 相対湿度100%, 5% CO₂環境下で24時間培養した。OPTI-MEM培地 (Life Technologies) に0.5 μ g pM-PPAR γ , 2.5 μ g p4 \times UASg-tk-luc, 50ng pRL-CMVを混合して250 μ Lとし、ここに125 μ L Multifectum (Promega) を混合して室温で30分静置した。その後125 μ L OPTI-MEMを加えて室温で5分反応させたあと、さらに2 mL OPTI-MEMを加えてからCV1細胞に添加し、4時間CO₂インキュベーター内で培養し、プラスミドのトランスフェクトを誘導した。

96well plateに各濃度のビワ葉水抽出サンプルを添加した10%FBS含有DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) (日本製薬株式会社) を50 μ Lずつ入れ、トランスフェクトの終了したCV1細胞を10 \times 10⁴ cells/mLで同様に50 μ Lずつ加えて100 μ L/wellとし、CO₂インキュベーター内で24時間培養を行った。

PBSでCV1細胞を洗浄した後、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて以下の手順でレポーター活性の測定を行った。Lysis Bufferを25 μ L/wellで加え5分間振とうして細胞を破碎後、この細胞溶解液20 μ Lを96 wellルミヌクプレート (Thermo Scientific) に移し、Dual-Glo Luciferase Reagentを50 μ L/wellで加え、室温で10分間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (Infinite 200Pro; TECAN) を用いて、ホタルルシフェラーゼの活性を測定した後、Dual-Glo Stop & Glo Reagentを50 μ L/wellで加え、室温で10分間インキュベートし、同様にウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

3T3-L1細胞の培養

マウス由来前駆脂肪細胞株である3T3-L1 (ヒューマンサイエンス振興財団より分譲) を10%FBS含有DMEM培地を用いて、2 \times 10⁴ cells/mLで24 well plateに播種しコンフルエントになるまでCO₂インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達した2日後に、0.25 μ M DEX (dexamethasone) (Wako), 1 μ g/mL insulin (Sigma), 0.5mM IBMX (Wako) を含む10%

FBS含有DMEM培地を添加し、分化誘導を行った。48時間後、insulinのみを含む10%FBS含有DMEM培地に交換し、さらに5日間培養を行った。各濃度のビワ葉水抽出物の添加は、上記の培養期間を通して行った。

Oil Red O 染色

分化誘導後、7日間培養した3T3-L1細胞の培地を除去せずに冷10%ホルマリン/PBSを250 μ L/wellで添加し、20分間室温で放置した。その後、培地を除き、新たに冷10%ホルマリン/PBSを165 μ L/wellで加え、1時間室温で放置し、細胞の固定を行った。ホルマリンを除き、2~3回蒸留水で洗浄を行った後、濾過した0.5%オイルレッドO/2-プロパノール溶液を250 μ L/wellで細胞に加え、1時間室温で染色を行った。染色後は、蒸留水で洗浄後に風乾させ、2-プロパノールを150 μ L/wellで添加して20分間振とうさせ、Oil Red Oを溶出させた。96 well plateに各溶出サンプルを100 μ Lずつアブライシ、マイクロプレートリーダー (Infinite 200Pro) を用いて550nmの吸光度を測定した。

統計解析

結果は、平均値 \pm 標準誤差で表した。また、各測定値を比較するために、Excel統計ver 6.0 (株式会社エスミ) を用いて、等分散性を確認した後、ウィリアムズの検定により、5%または1%以下の危険率で有意差の有無を判定した。

結果と考察

PPAR γ はリガンド依存性受容体型転写因子で、retinoid X receptorとヘテロダイマーを形成することで (Spiegelman and Flier, 1996; Kersten et al., 2000), adipocyte protein 2やlipoprotein lipaseなどの脂肪蓄積に関わる遺伝子群の発現を制御し、脂肪細胞分化を促進することが知られている (MacDougald and Lane, 1995; Rosen et al., 1999)。従って、PPAR γ 活性化作用を有する食品成分の摂取は、インスリン感受性の良い小型の脂肪細胞を増加させることで、血糖値の低下を誘導する (Yamauchi et al., 2001)。

そこで我々は、まず、ヒト由来のPPAR γ リガンド結合ドメインと酵母由来のGAL4 DNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を合成するプラスミドpM-PPAR γ とGAL4応答配列を上流に持ち、前述のキメラタンパク質により発現を制御されるようデザインされたウミボタル由来ルシフェラーゼレポータープラスミドp4 \times UASg-tk-lucを導入したPPAR γ レポーターアッセイ系 (Takahashi et al., 2002) を用いて、ビワ葉水抽出物中にヒトPPAR γ の活性化作用を有する成分が存在するのか否かについて検討を行った。なお、導入効率の是正は、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ発現プラスミドであるpRL-CMVを細胞に同時に導入することで行った (Takahashi

et al., 2002).

その結果、ビワ葉水抽出物は濃度依存的にPPAR γ レポーター活性を上昇させた(図1)。このことより、ビワ葉水抽出物中にはPPAR γ の活性化作用を有する成分が含まれていることが示唆された。

そこで我々は次に、PPAR γ の活性化作用を示したビワ葉水抽出物が実際に脂肪細胞分化を促進するか否かについて検討するため、マウス由来前駆脂肪細胞株である3T3-L1細胞を用いて、ビワ葉水抽出物とその分化に及ぼす影響を調べた。その結果、ビワ葉抽出物は濃度依存的に3T3-L1細胞における脂肪滴の蓄積を増加させた(図2)。

以上の結果より、ビワ葉水抽出物中にはPPAR γ 活性化作用を有する成分が含まれており、これによって脂肪細胞分化促進作用を示す可能性が示唆された。

これまで、ビワ葉エタノール抽出物中にはtormentic acid, maslinic acid, corosolic acid, oleanolic acid, ursolic acidといったトリテルペン類が含まれており、マウスにおいては抗肥満作用やインスリン抵抗性および高脂血症の改善作用があることが報告されている(Shih et al., 2010)。アビエチン酸(Takahashi et al., 2003)やデヒドロアビエチン酸(Kang et al., 2008)などのテルペノイドは、PPAR γ のアゴニスト作用があることが報告されており、実際、oleanolic acid(Wei et al., 2014)およびursolic acid(Kim et al., 2013)はPPAR γ アゴニストとして作用することが報告されている。しかしながら、これらのテルペノイドは水には不溶性であることから、本試験でPPAR γ 活性化作用を示したビワ葉水抽出物中の成分とは異なると考えられる。これまで様々な食品由来成分にPPAR γ 活性化作用があることが見出されてきたが(Goto et al., 2013)、PPAR γ の活性を促進する水溶性の成分はほとんど見出されていないのが

現状である。従って、本試験で用いたビワ葉水抽出物中には新規のPPAR γ 活性化成分が含まれる可能性が考えられる。

一般に水溶性成分は細胞膜を透過することができないため、細胞膜上の受容体を介して作用すると考えられている。細胞膜上の受容体からPPAR γ 活性に影響を与え得るシグナルとしては、cAMP依存性シグナルやWnt/ β -cateninシグナルなどが知られている(Farmer, 2005)。従って、本試験においては、ビワ葉由来の成分が細胞外または細胞膜上からこれらのシグナル活性に影響を与えることで、PPAR γ の活性化や脂肪細胞分化を誘導した可能性が考えられる。

本試験の結果より、ビワ葉にはこれまでに見出されているいくつかの脂溶性のPPAR γ アゴニスト以外にも水溶性のPPAR γ 活性化成分が含まれ、それが脂肪細胞分化を促進することが示唆された。水溶性のPPAR γ 活性化成分は食品や飲料として利用しやすく、また食品由来PPAR γ 活性化成分の長期的な摂取は、インスリン感受性の良い小型の脂肪細胞を増加させることで抗糖尿病作用を発揮することが期待されるため、今後はビワ葉水抽出物中から新規のPPAR γ 活性化成分の同定が期待される。

和文抄録

肥満は、糖尿病や高脂血症、高血圧、動脈硬化症などのメタボリックシンドロームと呼ばれる病態の主要なリスクファクターとなっている。肥満が進行すると脂肪細胞が肥大化し、メタボリックシンドロームの原因となる各種アディポサイトカインが分泌される。一方、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られるperoxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)の活性化成分は脂肪細胞分化を促進し、

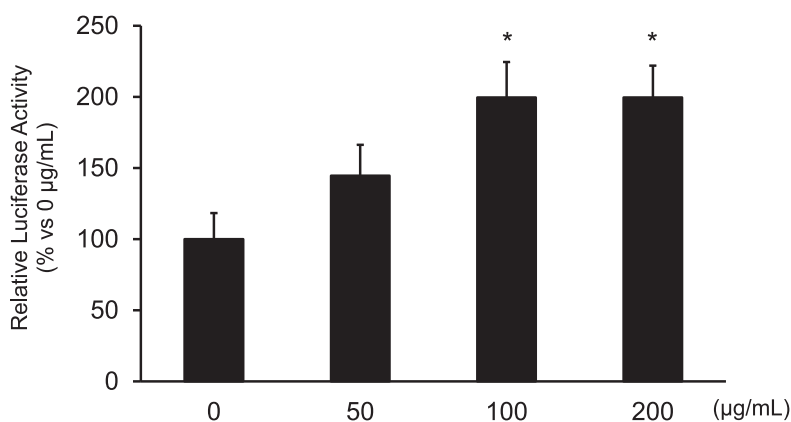


図1 ビワ葉水抽出物によるPPAR γ 転写活性の促進

ビワ葉水抽出物をPPAR γ レポーターベクターを導入したCV1細胞に24時間添加したところ、濃度依存的なルシフェラーゼレポーター活性の上昇が認められた。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。検定は、Williamsの多重比較法により行った($P^* < 0.05$)。

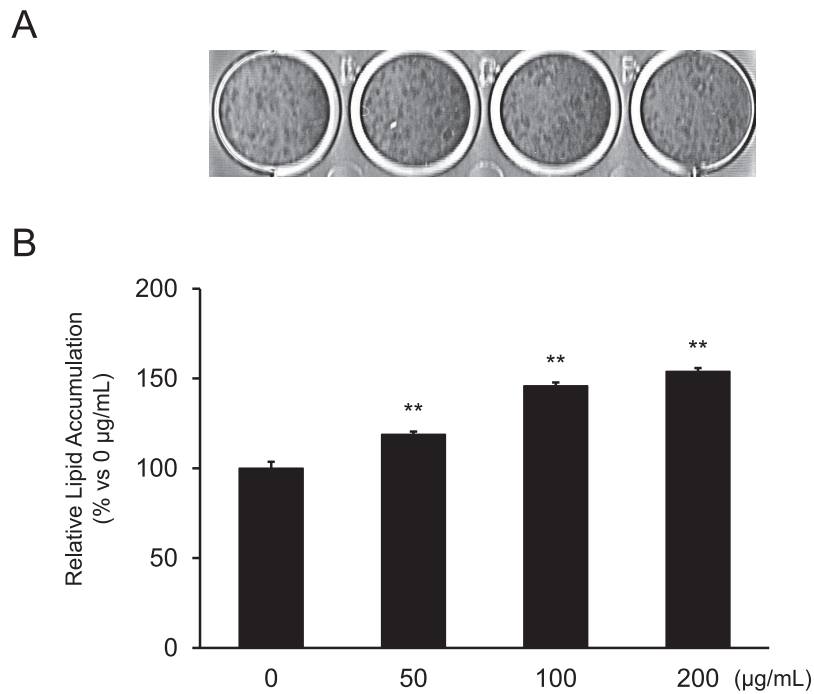


図2 ビワ葉水抽出物による3T3-L1前駆脂肪細胞分化の促進
 ビワ葉水抽出物を3T3-L1前駆脂肪細胞の分化過程に7日間添加した後、Oil Red O染色を行いプレートの写真撮影を行った (A)。その後、染色された細胞から2-プロパノールを用いてOil Red Oの溶出および定量を行ったところ、濃度依存的な脂肪蓄積が認められた (B)。結果は平均値±標準誤差で示した。検定は、Williamsの多重比較法により行った ($P^{**} < 0.01$)。

インスリン感受性の良い小型の脂肪細胞を増加させるため、メタボリックシンドロームの抑制作用を有する。本試験の結果より、ビワ (*Eriobotrya japonica* L.) 葉の水抽出物が濃度依存的にPPAR γ 転写活性を上昇させるとともに、3T3-L1前駆脂肪細胞の分化を促進することが明らかとなった。このことより、ビワ葉中には水溶性のPPAR γ 活性化成分が含まれ、それが脂肪細胞分化の促進作用を示すことが示唆された。

謝 辞

ビワの葉は千葉県南房総市の「道の駅とみうら枇杷倶楽部」より提供を受けた。本研究は南房総市が事業主体となる総務省「過疎地域等自立活性化推進事業」の助成により行った。関係各位に感謝申し上げます。

引用文献

- Cha, D.S., Eun, J.S. and Jeon, H. (2011) Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*, *J. Ethnopharmacol.*, 134, 305-312.
- Farmer, S.R. (2005) Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)*. Suppl 1, S13-16.

- Funahashi, T., Nakamura, T., Shimomura, I., Maeda, K., Kuriyama, H., Takahashi, M., Arita, Y., Kihara, S. and Matsuzawa, Y. (1999) Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity, *Intern. Med.*, 38, 202-206.
- Goto, T., Kim, Y.I., Takahashi, N. and Kawada, T. (2013) Natural compounds regulate energy metabolism by the modulating the activity of lipid-sensing nuclear receptors, *Mol. Nutr. Food. Res.*, 57, 20-33.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259, 87-91.
- Kang, M.S., Hirai, S., Goto, T., Kuroyanagi, K., Lee, J.Y., Uemura, T., Ezaki, Y., Takahashi, N. and Kawada, T. (2008) Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 333-338.
- Kersten, S., Desvergne, B. and Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405, 421-424.
- Kim, S.H., Hongm J.H. and Leem Y.C. (2013) Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma, *Eur. J. Pharmacol.*, 701, 131-143.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Kameda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M.,

- Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Nagai, R., Tobe, K., Kimura, S. and Kadowaki, T. (1999) PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance, *Mol. Cell*, 4, 597–609.
- Li, W. L., Wu, J. L., Ren, B. R., Chen, J. and Lu, C. G. (2007) Pharmacological studies on anti-hyperglycemic effect of folium eriobotryae, *Am. J. Chin. Med.*, 35, 705–711.
- MacDougald, O. A. and Lane, M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.*, 64, 345–373.
- Mathieu, P., Pibarot, P., Larose, E., Poirier, P., Marette, A. and Després, J. P. (2008) Visceral obesity and the heart, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 40, 821–836.
- Matsuzawa, Y. (2006) The metabolic syndrome and adipocytokines, *FEBS Lett.*, 580, 2917–2921.
- Mudaliar, S., Chang, A. R. and Henry, R. R. (2003) Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications, *Endocr. Pract.*, 9, 406–416.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesonu, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., Kadowaki, T. (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats, *J. Clin. Invest.*, 101, 1354–1361.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M. (1999) PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell*, 4, 611–617.
- Shih, C. C., Lin, C. H. and Wu, J. B. (2010) *Eriobotrya japonica* improves hyperlipidemia and reverses insulin resistance in high-fat-fed mice. *Phytother Res.*, 24, 1769–1780.
- Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, 87, 377–389.
- Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Kim, C. S., Taimatsu, A., Egawa, K., Yamamoto, T., Jisaka, M., Nishimura, K., Yokota, K., Yu, R. and Fushiki, T. (2003) Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism, *FEBS Lett.*, 550, 190–194.
- Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Yamamoto, T., Taimatsu, A., Matsui, N., Kimura, K., Saito, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Fushiki, T. (2002) Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes, *FEBS Lett.*, 514, 315–322.
- Wei, J., Zhu, H., Komura, K., Lord, G., Tomcik, M., Wang, W., Doniparthi, S., Tamaki, Z., Hinchcliff, M., Distler, J. H. and Varga, J. (2014) A synthetic PPAR- γ agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR- γ -independent suppression of fibrotic responses, *Ann. Rheum. Dis.*, 73, 446–454.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Kameda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S. and Kadowaki, T. (2001) The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance, *J. Biol. Chem.*, 276, 41245–41254.

(受付：2015年1月19日 受理：2015年3月4日)