

香辛料由来成分によるメタボリックシンドローム・
骨粗鬆症の同時予防に関する研究

2021年1月

千葉大学大学院園芸学研究科
環境園芸学専攻生物資源科学コース

高橋 麻子

(千葉大学審査学位論文)

香辛料由来成分によるメタボリックシンドローム・
骨粗鬆症の同時予防に関する研究

2021年1月

千葉大学大学院園芸学研究科
環境園芸学専攻生物資源科学コース

高橋 麻子

目次

I. 緒論.....	2
II. 骨粗鬆症・肥満を同時予防する香辛料由来成分の探索	9
1. 背景	10
2. 方法	13
3. 結果	24
4. 考察	44
III. エルカ酸高含有イエローマスタードオイルによる メタボリックシンドローム・骨粗鬆症の予防効果.....	47
1. 背景	48
2. 方法	51
3. 結果	60
4. 考察	75
IV. 総合考察.....	80
V. 謝辞	85
IV. 参考文献.....	87

I . 緒論

現在、世界人口は 77 億人であり、2060 年には約 100 億人になると見込まれ、増加し続けている (1)。これには、発展途上国での人口爆発だけでなく、先進国での医療の発達による寿命の延長も深くかかわっている。寿命の延長に伴い、世界総人口に占める 65 歳以上の人の割合（高齢化率）は、1950 年の 5.1%から 2015 年には 8.3%に上昇している。さらに 2060 年には 17.8%にまで上昇するものと見込まれており (2)、今後半世紀で高齢化が急速に進展することになる。

我が国における 65 歳以上の高齢者人口は、1950 年には総人口の 5%に満たなかったが、1970 年に 7%を超えた。さらに、1994 年にはその倍化水準である 14%を超え、高齢化率はその後も上昇を続け、2018 年時点で 28.1%に達しており (2)、我が国における高齢者人口の増加は世界的に類を見ないスピードで進行している。世界的な寿命の延長や高齢化が進むと同時に、高齢者における寝たきり、要介護者が増加している。それを受け、2000 年には世界保健機構（WHO）によって健康寿命が提唱された。健康寿命とは「健康上の理由で日常生活が制限されることなく自立した生活を送ることのできる期間」であり、これにより寿命の長さだけでなく、高齢者の生活の質（QOL）の向上を目指す必要性が示された。高齢者が要介護状態となる主な要因として、脳卒中や心臓病などの循環器系疾患、認知症、運動器障害が挙げられる (2)。このうち、循環器系疾患、運動器障害疾患に発展する恐れのある疾患にロコモティブシンドロームとメタボリッ

クシンドロームがある。

ロコモティブシンドロームは、2007年に日本整形外科学会によって提唱された、骨や筋肉、関節といった運動器に障害を起し、移動機能が低下した状態のことである。ロコモティブシンドロームの三大要因の一つとして骨粗鬆症が挙げられている(3)。骨粗鬆症とは、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し骨折の危険性が増加する疾患である(4)。我が国における患者数は1280万人(男性300万人、女性980万人)と推定されている(5)。骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を繰り返す骨代謝(骨のリモデリング)を絶えず行っている。何らかの原因で骨形成と骨吸収のバランスが崩れると、骨の脆弱性が増大し、骨粗鬆症を発症する。骨粗鬆症には、骨芽細胞の機能低下に伴う骨形成の減少によって引き起こされる低回転型と、破骨細胞の機能亢進に伴う骨吸収の増加によって引き起こされる高回転型がある。上述のとおり、骨粗鬆症患者の約8割が女性であるが、特に50歳前後における発症が多く、この多くは閉経による急激なエストロゲン分泌の減少が引き起こす高回転型骨粗鬆症である(5)。

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、高血圧、高血糖、脂質代謝異常の3つのうち2つ以上があてはまり、脳卒中や心臓病といった循環器系疾患を招きやすい状態を指す。我が国のメタボリックシンドローム該当者は

人口全体の約 19.1%、予備群者は約 14.2%と推定され、高齢になるほど該当者の割合が増加している (6)。メタボリックシンドロームは循環器系疾患を引き起こし、高齢者の QOL を低下させるだけでなく、我が国の死亡率の 25.9%を占めており (7)、対策が急務とされている。我が国においては、2008 年から特定健康診査として、ウエスト径の測定が義務化された (8)。

骨粗鬆症の発症には、骨髄内脂肪の増加が関与することが知られており、閉経後の女性において骨髄内の脂肪が増加するとともに、骨密度が低下することが報告されている (9)。骨芽細胞と脂肪細胞はともに、間葉系幹細胞から分化することが知られている (10)。女性ホルモンであるエストロジェンは破骨細胞の活性を低下して骨吸収を抑制するほか、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の促進、脂肪細胞への分化の抑制により、骨量の低下や脂肪組織の増加を抑制している (11)。

脂肪細胞の分化には様々な転写因子が関与している。核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド応答性の転写因子である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能することが知られている (12)。また脂肪細胞だけでなく、間葉系幹細胞分化においても PPAR γ は重要な役割を担っている。PPAR γ の下流に存在する

adipocyte fatty acid-binding protein 2 (aP2) と lipoprotein lipase (LPL) は脂肪細胞分化に伴い増加する (13, 14)。さらに、PPAR γ は骨芽細胞分化を誘導する転写因子で骨の基質を作る alkaline phosphatase (ALP) や collagen1 (Col1)、osteocalcin (OC) などの発現を誘導する Runt-related transcription factor 2 (Runx2) や osterix (15, 16) の発現を抑制することが知られている (17, 18)。PPAR γ 活性を上昇させるアゴニストである Pioglitazone などのチアゾリジン系薬剤は脂肪細胞の小型化を促すことで糖代謝を改善することから、糖尿病の治療薬として用いられているが (19)、投与により骨量を低下させることが問題となっている (20, 21)。反対に PPAR γ 活性を抑制するアンタゴニストの投与は、骨量を増加し肥満を抑制することが報告されている (22)。

間葉系幹細胞分化を調節するものは薬物だけでなく食品由来の成分においても確認されており、ウコンの黄色い色素成分であるクルクミンが間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが報告されている (23)。また、当研究室では、食品由来成分であるアスタキサンチンとカプサンチンによる間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進、脂肪細胞への分化抑制効果も見出している (24, 25)。カプサンチンはパプリカや唐辛子といった多くの香辛料中に存在している。香辛料とは、食品に特別な風味を与えることを目的とし、比較的少量使用される種々の植物の風味または芳香性の葉、茎、樹皮、

根、根茎、花、蕾、種子、果実、又は果皮等のことと我が国では定義されており、スパイスとハーブに大別されている (26)。近年の研究において香辛料には様々な生理活性があることが報告されており、天然由来の機能性成分の探索が盛んに行われている (27, 28)。ショウガに含まれる 6-ショウガオール (29)、シソ科植物に含まれるカルノシン酸やカルノソール (30) などの PPAR γ アゴニストとなる成分は香辛料を含む食品中より多数見出されてきたが、アンタゴニストとなる成分に関する報告は少ない (31)。これらのことから、PPAR γ アンタゴニストとなる香辛料由来の成分を新たに見出し、用いることによって、骨粗鬆症と肥満を同時に予防できる可能性が期待される。

そこで本稿第 II 章では 45 種類の香辛料中から PPAR γ アンタゴニストとなる成分を探索するため、PPAR γ レポーターアッセイを用いたスクリーニングを行い、中でも効果の高かったローズマリーに着目し、有効成分の絞り込み・同定を行った。また、同定された新規 PPAR γ アンタゴニスト候補であるエルカ酸が間葉系幹細胞分化に及ぼす影響とそのメカニズムの解明を行った。その結果、エルカ酸は PPAR γ の転写活性の抑制を介して間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが判明した。

第 III 章では第 II 章で見出した新規 PPAR γ アンタゴニストであるエルカ酸を豊富に含むイエローマスタードオイル (YMO) の機能性評価を行った。その結

果、エルカ酸標品と同様に YMO は PPAR γ 転写活性の抑制を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが判明した。そこで次に、YMO の生体内での肥満・骨粗鬆症への影響を検討するため、肥満・糖尿病モデルである KK-A y マウスを用いて機能性評価を行った。その結果、YMO 投与により脂肪蓄積の抑制、インスリン感受性の向上による糖代謝機能の改善、骨形成の増加による骨密度増加がもたらされた。

以上の結果より、YMO 中のエルカ酸は PPAR γ 活性の抑制を介して肥満・糖尿病・骨粗鬆症の改善に貢献する可能性があることが示唆された。

II. 骨粗鬆症・肥満を同時予防する 香辛料由来成分の探索

1. 背景

骨粗鬆症は骨が脆くなる疾患であり、加齢に伴って罹患率が増加する (32, 33)。中でも閉経後の女性において急激に増加することが知られている (34)。骨髄に存在する間葉系幹細胞は骨を作る骨芽細胞や脂肪を形成する脂肪細胞などの多様な細胞に分化可能である (35)。骨粗鬆症の発症には骨髄中脂肪の増加が関与することが報告されている (9)。また、閉経後の女性では卵巣からのエストロゲン分泌が急激に減少することに伴って間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化が減少し、脂肪細胞への分化が増加する (11)。これらのことから、加齢に伴う骨髄中での間葉系幹細胞の分化調節機構の変化が骨粗鬆症発症の一因とされている。

間葉系幹細胞の分化調節には様々な転写因子が関与している。骨芽細胞分化では Runx2 や Osterix といった転写因子によって分化が誘導された後、ALP や osteocalcin といった骨芽細胞に特徴的なタンパク質が発現する (15, 16)。核内受容体型転写因子である PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、aP2 や LPL といった脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導する (13, 14)。PPAR γ の合成アゴニストは、マウス由来間葉系幹細胞である C3H10T/2 細胞において PPAR γ の活性化を介して骨芽細胞への分化抑制および脂肪細胞への分化促進作用を示すことが報告されている (17)。同様の結果は動物実験においても報告されており、PPAR γ アゴニストの投与による骨量減少 (20, 21)、PPAR γ

アンタゴニストによる骨量の増加や骨髄中脂肪の減少(36)が報告されている。

また、間葉系幹細胞分化を調節するものは薬物だけでなく食品由来の成分においても確認されており、当研究室では食品由来成分であるアスタキサンチンとカプサンチンによる間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進、脂肪細胞への分化抑制効果を見出している(24, 25)。カプサンチンはパプリカや唐辛子といった多くの香辛料中に存在している。香辛料とは、食品に特別な風味を与えることを目的とし、比較的少量使用される種々の植物の風味または芳香性の葉、茎、樹皮、根、根茎、花、蕾、種子、果実、又は果皮等のことと我が国では定義されており、スパイスとハーブに大別されている(26)。近年の研究において香辛料にはさまざまな生理活性があることが報告されており、天然由来の機能性成分の探索が盛んに行われている(27, 28)。しかしながら、香辛料中より PPAR γ アゴニストとなる成分はショウガに含まれる 6-ショウガオール(29)、シソ科植物に含まれるカルノシン酸やカルノソール(30)など多数見出されてきたが、アンタゴニストとなる物質に関する報告は少ない(31)。そこで本研究では、香辛料中から新規 PPAR γ アンタゴニストを見出すため、45 種類の香辛料を用いて PPAR γ アンタゴニスト作用を有する香辛料のスクリーニングを行った。その結果、セロリシード、白胡椒、スペアミント、セージ、メース、ローズマリーの 6 種類の香辛料が PPAR γ アンタゴニスト作用を有することが判明し、中でもロー

ズマリーは最も強い効果を示した。

ローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) は地中海原産のシソ科植物であり (37)、ヨーロッパでは古くから香辛料として、肉料理の臭い消しや料理の風味づけとして利用されてきた。また、若返りや集中力の向上、鎮痛効果を持つとされ、ハーブティや化粧水・入浴剤・軟膏など様々な形で利用されてきた (38)。近年の研究では記憶力の改善 (39) や抗炎症作用 (40)、骨粗鬆症の予防効果 (41) などの様々な生理活性を有することも明らかとなっている。さらに、ローズマリーには PPAR γ アゴニストであるカルノシン酸やカルノソール (30)、糖代謝改善や抗炎症作用を示すロズマリニン酸 (42) などの様々な生理活性物質を含有していることが報告されているが、これまでに PPAR γ の転写活性を抑制する成分は報告されていない。そこで本研究では、ローズマリー中より PPAR γ の転写活性を抑制する新規成分の探索を行い、間葉系幹細胞の分化に及ぼす影響を調べた。その結果、ローズマリー中より新規 PPAR γ アンタゴニスト候補としてモノ不飽和脂肪酸であるエルカ酸を見出した。さらに、エルカ酸標品を用いた実験によって、エルカ酸が PPAR γ 転写活性の抑制作用を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが示唆された。

2. 方法

2-1 サンプル抽出、調製

ハウス食品グループ本社株式会社より提供された 45 種類の香辛料(Table 1)を使用した。提供された 45 種類の香辛料は真空凍結乾燥機 (FDU-2100、DRC-1100; TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて 2-3 日間凍結乾燥し、-20°C で保存した。

Table 1 45 種類の香辛料

1	オールスパイス	16	フェヌグリーク	31	チャイブ
2	ガーリック	17	フェンネル	32	バジル
3	カルダモン	18	ローレル	33	バニラビーンズ
4	クミン	19	デイル	34	パセリ
5	クローブ	20	セロリシード	35	ピンクペッパー
6	黒胡椒	21	白胡椒	36	ペパーミント
7	桂皮	22	アニス	37	花椒
8	コリアンダー	23	キャラウェイ	38	ポピー
9	ジンジャー	24	山椒	39	マジョラム
10	スターアニス	25	スペアミント	40	メース
11	ターメリック	26	セージ	41	マスタード
12	陳皮	27	セボリー	42	レモングラス
13	唐辛子	28	タイム	43	ローズマリー
14	ナツメグ	29	タラゴン	44	オレガノ
15	パプリカ	30	チャービル	45	フェヌグリーク葉

香辛料エタノール抽出物の調製

45 種類の香辛料の凍結乾燥物をミル (FM-1; OSAKA CHEMICAL Co., Ltd., Osaka, Japan) で破碎し香辛料粉末を得た。1 g の香辛料粉末に 80%エタノール 20 mL を加え、80°C、110 rpm のウォーターバスで 3 時間振盪した。得られた溶液を遠心エバポレータ (EC-57CS; Sakuma, Tokyo, Japan) で濃縮乾固後、Dimethyl sulfoxide (DMSO ; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) 300 μ L を加え、よく混合し、-20°C で保存した。細胞添加時にはこれを 1/2 倍希釈したもの、析出による細胞死が見られた場合には 1/4 または 1/8 倍希釈したものをサンプルとして使用した。

ローズマリーヘキサン、水分画物の調製

ローズマリーエタノール抽出物に 10 mL のヘキサンと 5 mL の水を加えて攪拌した後、上層のヘキサン画分と下層の水面分を回収し、遠心エバポレータ (EC-57CS) で濃縮乾固させた。エタノール抽出物とそのヘキサン画分の濃縮物には DMSO、水面分は Phosphate buffered saline (PBS) を溶媒として 100 または 200 mg/mL となるように調整し、-20°C で保存した。

エルカ酸の調製

エルカ酸 (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) は 100%エタノールに溶解し、各種濃度に希釈して細胞に添加した。

2-2 レポーターアッセイ

レポーターアッセイでは GAL4/PPAR γ キメラシステム (43) を使用した。アフリカミドリザルの腎臓由来の CV-1 細胞 (American Type Culture Collection, USA) を 10% Fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuallé, France)、100 U/mL ペニシリン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地 (Nissui, Tokyo, Japan) を含む培地に播種し、CO₂インキュベーター内で培養した。CV-1 細胞が 90% confluence に到達した後、p4×UASg-tk-Luc (レポータープラスミド, 6.25 μ g)、pM-hPPAR γ (GAL4 DNA 結合ドメインと PPAR γ リガンド結合ドメインを持つキメラタンパク質の発現プラスミド, 1.25 μ g)、pRL-CMV (形質転換効率の標準化のために用いる内部標準, 125 ng) (京都大学 河田 照雄教授より譲渡) を添加した Multifectam (Promega, WI, USA) 含有 OPTI-MEM (Thermo fisher scientific, NY, USA) 培地中で 4 時間インキュベートすることで形質転換を行

った。形質転換後、細胞を 96 well plate に 5×10^3 cells/well の密度で播種し、PPAR γ 合成アゴニストである 5 μ M troglitazone (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) および PPAR γ 合成アンタゴニストである 5 μ M GW9662 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) または各サンプルを加えた 10%FBS 含有 DMEM 培地を添加して、CO $_2$ インキュベーター内で培養した。24 時間後 Dual-Glo luciferase assay system (Promega) を用いてウミホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

PPAR γ 活性データの解析

各サンプルの PPAR γ 活性化能を Control 群に対する相対活性 (%) で評価するため、以下のような計算を行った。

ウミホタルルシフェラーゼ活性の値 (PPAR γ 活性) …A

ウミシイタケルシフェラーゼ活性の値 (内部標準) …B

各 well におけるトランスフェクション効率を補正するために、A/B の値を算出し、Control 群の A/B 値の平均値を 100 とした際のサンプルの A/B 値を相対値の平均値をそのサンプルがもつ相対 PPAR γ 活性化能とした。

2-3 間葉系幹細胞培養

マウス由来の C3H10T1/2 細胞（国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲）を 4.5×10^4 cells/mL に調整し、染色用として 24 well plate に 500 μ L/well、細胞生存率測定用として 96 well plate に 100 μ L/well、RNA 回収用として 12 well plate に 1 mL/well、ウエスタンブロッティング用として 10 cm シャーレに 10 mL/plate で播種し、細胞がコンフルエント状態になるまで CO₂インキュベーター内で培養した。コンフルエントになった後、サンプルを添加した培地に置換し、2 日毎に培地交換を行い、14 日間培養を行った。

2-4 アルカリフォスファターゼ染色

間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を評価するため、Alkaline Phosphatase Staining kit（Cosmo Bio Co., LTD, Tokyo, Japan）を用いてアルカリフォスファターゼ染色を行った。24 well plate の培地をデカンテーションによって除去し、500 μ L/well の PBS で 2 回洗浄した後、10%ホルマリン/PBS を 250 μ L/well 添加し、細胞を固定した。蒸留水で 2 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ染色液を 200 μ L/well 添加し、CO₂インキュベーター内で加温して染色を行った。染色後、各 well 底に 9×9 のグリッドシール（1806-009；AGC TECHNO

GLASS Co., Ltd, Shizuoka, Japan) を貼り、光学顕微鏡 (CKX41 ; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) 下で ALP 陽性骨芽細胞数をカウントした。

2-5 Oil Red O 染色

間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を評価するため、Oil Red O 染色を行った。24 well plate に冷 10%ホルマリン/PBS を 250 μ L/well 添加し、細胞を固定した。蒸留水で 2 回洗浄した後、Oil Red O 染色液 (0.5% Oil Red O/イソプロピルアルコール溶液と蒸留水を 3 : 2 で混合) を 250 μ L/well 添加し、60 分間室温に静置した。染色後、各 well 底に 9 \times 9 のグリッドシールを貼り、光学顕微鏡 (CKX41 ; Olympus Corporation) 下で Oil Red O 陽性脂肪細胞数をカウントした。

2-6 Real time PCR による遺伝子発現解析

12 well plate で培養した細胞の培地をデカンテーションした後、RNAiso Plus (Takara Bio inc., Tokyo, Japan) を 1 mL/well 加え、ピペッティングにより細胞を破碎した。RNA 抽出は製品プロトコルに従い行った。抽出した RNA は ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO CO., LTD. Life science Department, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、

cDNA を合成した。その後 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO CO., LTD. Life science Department) を用いて Biosystems® StepOnePlus real time PCR system (Thermo Fisher Science, MT, USA) により mRNA 発現量を測定した。Real time PCR による反応は holding stage : 90°C 10 min, cycling stage : 40 cycles (95°C, 10 sec and 60°C, 1 min) で行った。測定に使用したプライマーの配列は Table 2 に示した。

Table 2 プライマー配列

Genes	Accession number	Forward (5'→ 3')	Reverse (5'→ 3')
<i>Runx2</i>	DQ065175	CCCAGCCACTTTACCTACA	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG
<i>Osterix</i>	AF184902	ACTCATCCCTAATGGCTCGTG	GGTAGGGAGCTGGGTAAAGG
<i>Osteocalcin</i>	NM_007541.3	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TGCCAGAGTTTGGCTTTAGG
<i>ALP</i>	BC065175	GCTGATCATTCCCACGTTTT	CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT
<i>PPARγ</i>	NM_001127330	GGAGATCTCCAGTGATATCGACCA	ACGGCTTCTACGGATCGAAACT
<i>aP2</i>	NM_001122948	AAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT	TGACCAAATCCCCATTTACGC
<i>LPL</i>	NM_008509	GCCCAGCAACATTATCCAGT	GGTCAGACTTCCTGCTACGC
<i>36B4</i>	NM_007475.5	TGTGTGTCTGCAGARCGGGTAC	CTTTGGCGGGATTAGTCGAAG

2-7 HPLC による分画

HPLC (HITACHI L7000 system ; Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan) を使用して成分分離を行い、フラクションコレクター (SF-2100 ; Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて溶液を回収した。回収し

た溶液はフラクションごとにまとめ、遠心エバポレータ（EC-57CS）を用いて濃縮乾固後-20°Cで保存した。

2-8 Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS) による質量分析と Nuclear Magnetic Resonance (NMR) による構造解析

レポーターアッセイにおいて PPAR γ 活性の抑制効果が見られた R₄F1、R₄F4 の Electrospray ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (ESI-TOF MS) (Exacte ; Thermo Fisher Scientific, MT, USA) による分子量の推定および Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 解析 (JEOL JNM-ECA500 ; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を行った (測定は、千葉大学園芸学部生物有機化学研究室の土肥博史准教授に依頼した)。

2-9 Alizarin Red 染色

間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞の石灰化を評価するため、石灰化評価セット (PG research, Tokyo, Japan) を用いて Alizarin Red 染色を行った。24 well plate に冷 10%ホルマリン/PBS を 250 μ L/well 添加し、細胞を固定した。蒸留水で 2 回洗浄した後、アリザリンレッド溶液を 250 μ L/well 添加し、30 分間室温に静置した。染色後、アリザリンレッド溶出液を 250 μ L/well 添加し、10

分間ボルテックスミキサー (TWIN MIXER TM-282 ; AS ONE Corporation, Osaka, Japan) を用いて攪拌を行い、溶出液を得た。得られた溶出液を 96 well plate に 100 μ L ずつ取り、マイクロプレートリーダー (Infinit 200 pro ; Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) で 405 nm の吸光度を測定した。

2-10 細胞生存率の測定

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit (Promega) を用いて、エルカ酸が間葉系幹細胞の生存率に及ぼす影響を評価した。96 well plate で培養した細胞に 20 μ L/well CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent を添加し、CO₂インキュベーター内で加温して 1 時間反応させ、マイクロプレートリーダー (Infinit 200 pro) で 550 nm の吸光度を測定した。

2-11 ウェスタンブロット

10 cm シャーレで培養した C3H10T1/2 細胞の培地を吸引して除去し、PBS を 1 mL 加えてセルスクレーパーを用いて細胞を剥離した。4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して PBS を除去し、破碎バッファー (25 mM Tris-HCl、250 mM sucrose、1 mM EDTA) を 300 μ L 加え、ホモジナイザー (MT-2 ; NAKAMURA KAGAKUKOGYO CO., LTD., Aichi, Japan) で細胞を破碎した。4°C、3,000

rpm で 5 分間遠心分離して上清を取り除き、沈殿の核画分に RIPA バッファー (150 mM NaCl、0.5%デオキシコール酸、1% Triton X100、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、50mM Tris-HCL) を加え、ハンディー超音波装置 (Q55; Qsonica L.L.C, CT, USA) で破碎し、核タンパク質溶液を得た。核タンパク質溶液は DC™ プロテインアッセイ (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いてタンパク質含量を測定し、250 µg/15 µL となるよう希釈した。その後、4×sample buffer (0.25 M Tris-HCl、8% SDS、40% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、0.02% bromophenol blue) と 3:1 で混合し、100°C で 5 分間ボイルした後、10% 分離ゲル (10%アクリルアミド、25%分離ゲル緩衝液、1% APS、0.1% TEMED) を用いて SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に供した。ゲル上のタンパク質を PVDF 膜に写し取り、5%スキムミルクでブロッキングした後、Anti-mouse PPAR γ (81B8; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) (1:500) または内部標準である Anti-mouse Lamin B (sc-6217; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:250) を添加して室温で 1 晩、1 次抗体反応を行い、その後、Anti-Goat IgG HRP conjugate (sc-2020; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) (1:2000) または Anti-Rabbit IgG HRP conjugate (sc-2027; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) (1:2000) を添加して二次抗体反応を行った。検出は Immobilon Western 化学発光 HRP 基質 (Merck

KGaA, Darmstadt, Germany) を使用し、Light-Capture II (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて発光を検出した。

2-12 統計解析

各データは平均値±標準誤差で表した。統計には Bell Curve Excel 統計 (Social Survey Research Information Co., Tokyo, Japan) を使用した。2 群の検定では、Shapiro-Wilk test 検定によって正規性を確認した後、F 検定を行い、分散が等しいものはスチューデントの T 検定により、分散が等しくないものはウェルチの T 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。一方、正規分布でないと判定されたものは、マンホイットニ検定により、5%または 1%以下の危険率で有意差の有無を判定した。3 群以上の検定では、Shapiro-Wilk test 検定による正規性の検定、Bartlett's test による等分散性の検定を行った後、正規性及び等分散性が認められた場合は Dunnett の多重比較検定、認められない場合は Steel の多重比較検定を行い、5%または 1%以下の危険率で Control 群と各サンプル群のデータの比較を行った。

3. 結果

3-1 香辛料抽出物が PPAR γ 活性に与える影響

レポーターアッセイの結果、45種類の香辛料抽出物のうちセロリシード、白胡椒、スペアミント、セージ、メース、ローズマリーにおいて PPAR γ 活性の有意な低下が見られた。

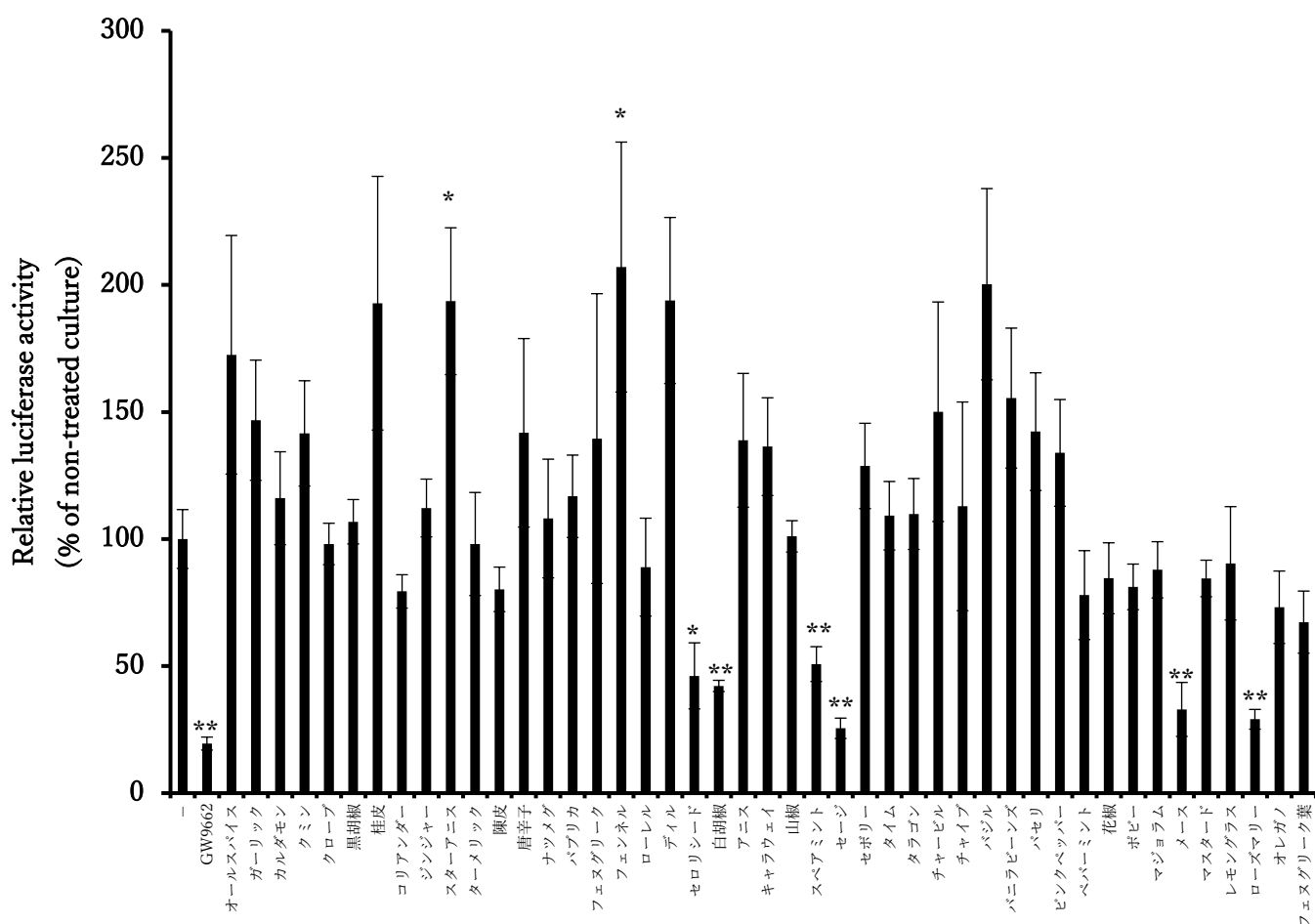


Fig. 1 45種類の香辛料抽出物が PPAR γ 転写活性に及ぼす影響
 溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100%とし、各サンプルの PPAR γ 転写活性を求めた。
 Values are means \pm SE. ** P <0.01, * P <0.05 vs non-treated culture.

3-2 ヘキサン画分と水面分が PPAR γ 活性・間葉系幹細胞分化に及ぼす影響

3-1 において PPAR γ 活性の抑制効果の高かったローズマリーエタノール抽出物からヘキサン画分と水面分を得た。これらを用いて、ローズマリーエタノール抽出物中で PPAR γ アンタゴニスト活性を示す成分の探索を行った。レポーターアッセイの結果、エタノール抽出物では濃度依存的な PPAR γ 活性の低下が見られた。エタノール画分をさらにヘキサンと水を用いて分画した画分のうち、ヘキサン画分では、濃度依存的ではないものの PPAR γ 活性の有意な低下が見られた。一方、水面分では濃度依存的なルシフェラーゼ活性の上昇傾向が見られた (Fig. 2A)。

また、各画分が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化および脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討した。その結果、14 日間培養を行った C3H10T1/2 細胞において、エタノール抽出物の添加では ALP 陽性骨芽細胞数の濃度依存的な増加、Oil Red O 陽性脂肪細胞数の有意な増加が見られた (Fig. 2B, C)。また、ヘキサン画分では ALP 陽性骨芽細胞数の濃度依存的な有意な増加、Oil Red O 陽性脂肪細胞数の濃度依存的な有意な減少が見られた。一方、水面分では ALP 陽性骨芽細胞数の変化は見られなかったものの、濃度依存的な Oil Red O 陽性脂肪細胞数の減少が見られた。

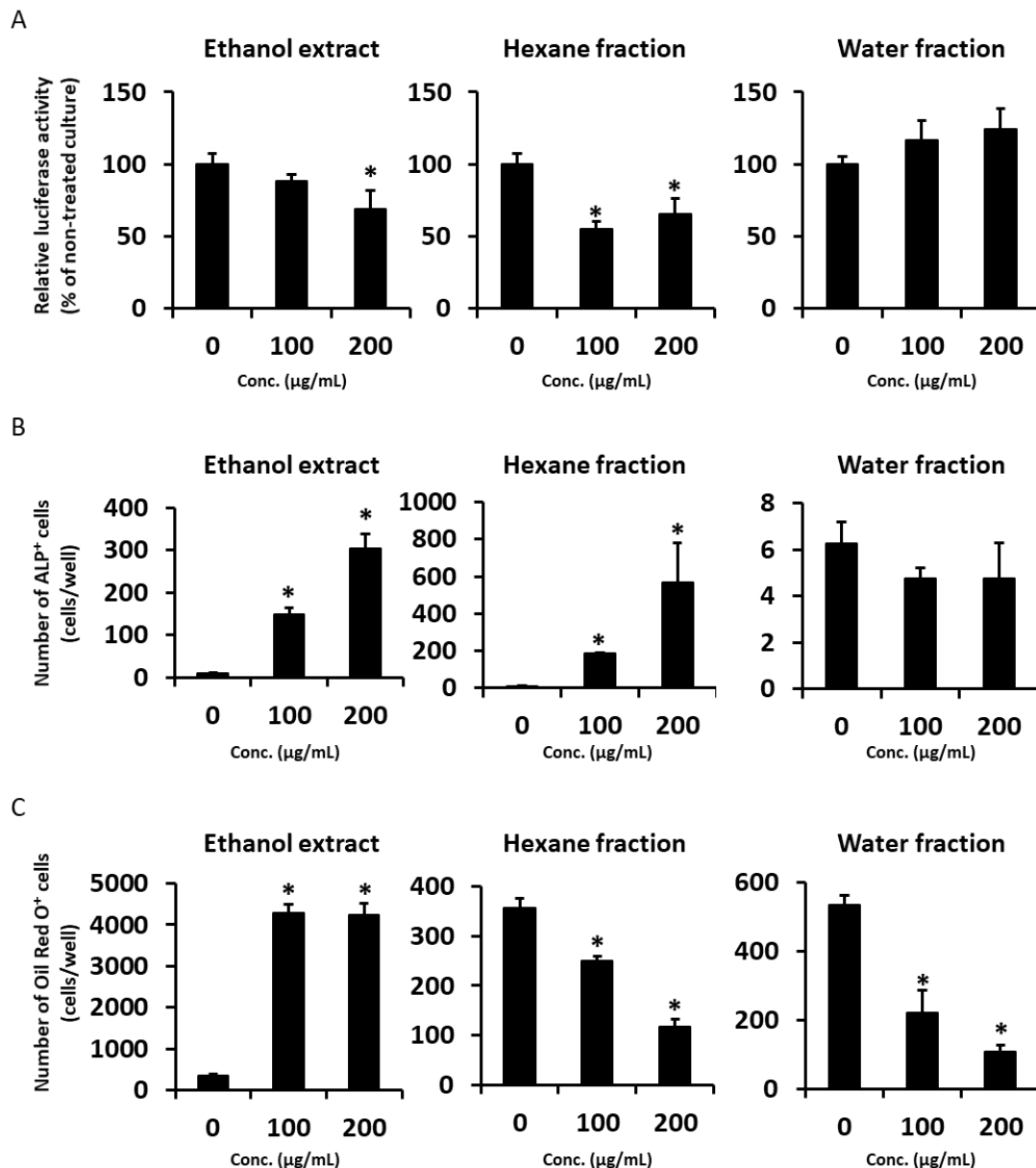


Fig.2 ローズマリーエタノール抽出物、水画分、ヘキサソ画分が PPAR γ 活性および C3H10T1/2 細胞の分化に及ぼす影響

(A) ローズマリーエタノール抽出物、水画分、ヘキサソ画分をレポーターアッセイに供し、PPAR γ 活性を測定した、サンプル 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PPAR γ 活性を 100 とし、各濃度の PPAR γ 活性の相対値を示した。(B, C) ローズマリーエタノール抽出物、ヘキサソ画分、水画分を C3H10T1/2 細胞に添加し、14 日間培養した後、ALP 染色 (B) と Oil Red O 染色 (C) を行い、各陽性細胞数を顕微鏡下でカウントした。Values are means \pm SE. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3-3 ヘキサン画分中の PPAR γ アンタゴニスト作用を示す成分の分離

ヘキサン画分の分画

3-2 では、ローズマリーエタノール抽出物のヘキサン画分による間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進と脂肪細胞への分化抑制効果が確認された。このことから、ローズマリーエタノール抽出物のヘキサン画分中に PPAR γ アンタゴニストが存在することが示唆された。そこで 3-3 では、ヘキサン画分中の成分を分離するために、逆相 HPLC によってヘキサン画分の分画を行った (Table 3, Fig. 3A)。得られた溶液を 16 のフラクション (F1~F16) にまとめ、レポーターアッセイに供したところ、F8 において PPAR γ 活性の抑制作用が確認された (Fig. 3B)。

Table 3 逆相 HPLC の分離条件 (ヘキサン画分)

カラム	Waters X Bridge C18 カラム 粒子径 5 μm \cdot 4.6 mm \times 250 nm
移動相	A 液 {超純水} B 液 {0.1%ギ酸含有アセトニトリル} A : B = 75 : 25 \Rightarrow 0 : 100 60 分間グラジエント、その後 0 : 100 で 43 分
流速	0.5 mL/min
カラム温度	20°C
測定波長	190-800 nm
サンプル	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したローズマリーヘキサン画分 200 μL

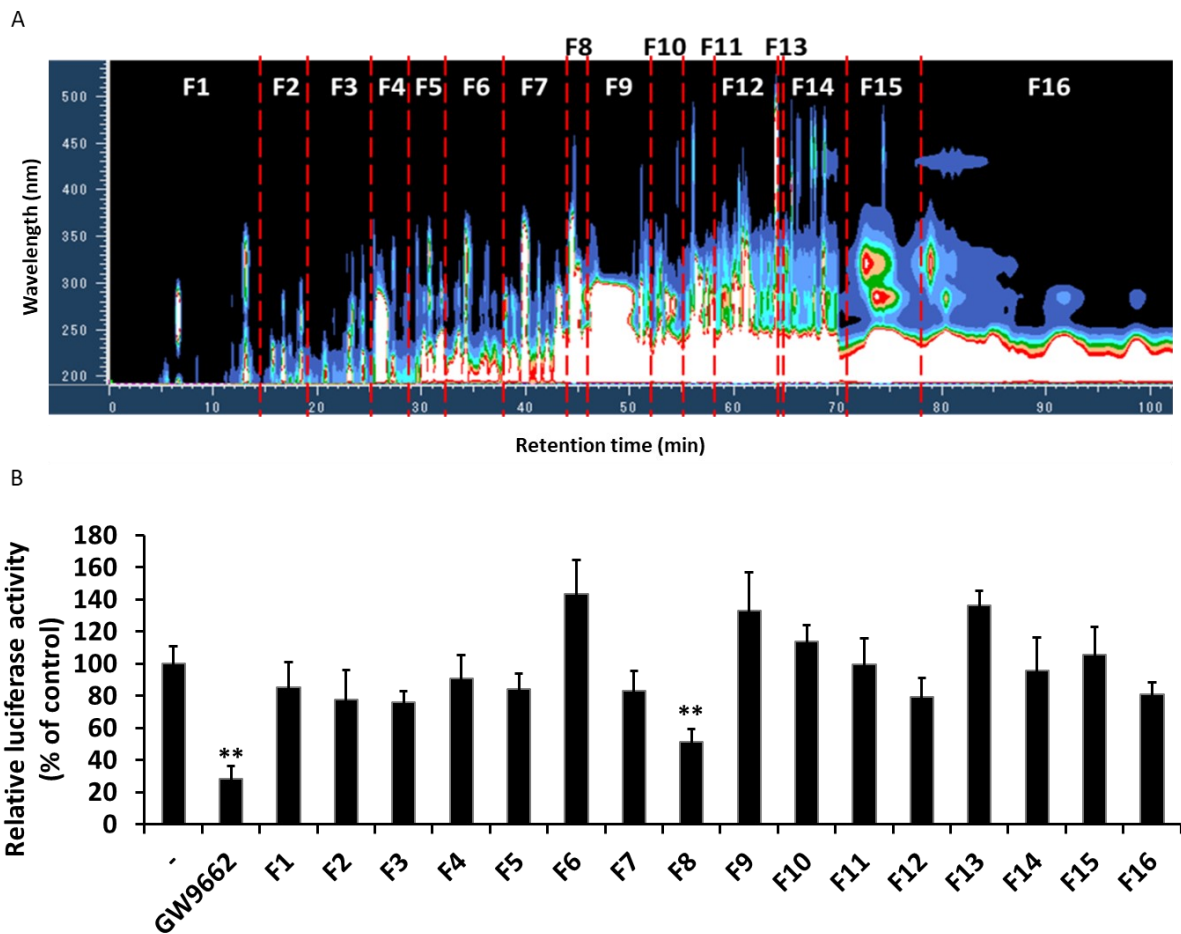


Fig. 3 ローズマリーヘキササン画分の HPLC クロマトグラムと PPAR γ 転写活性に及ぼす影響

(A) Table 3 の条件のもとヘキササン画分を HPLC で分離し、1 分毎に溶液を回収し、16 のフラクション (F1~F16) にまとめた。(B) HPLC により分離して得られた画分 (F1~F16) が PPAR γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100% とし、各サンプルの PPAR γ 転写活性を求めた。Values are means \pm SE. ** P <0.01 vs non-treated culture.

F8 の分画

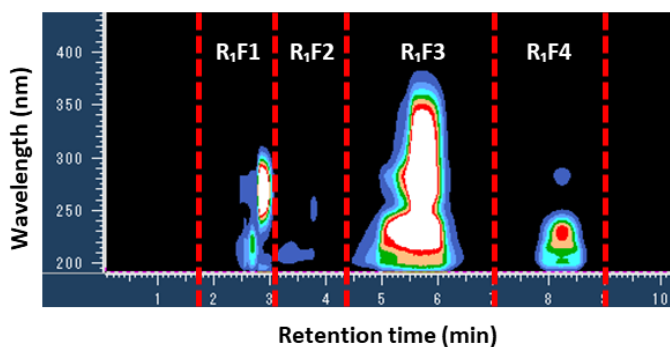
PPAR γ 活性の抑制作用が確認された F8 をさらに逆相 HPLC によって分離し、フラクションコレクターを用いて回収した (Table 4, Fig. 4A)。得られた溶液を 4 つのフラクション (R₁F1~R₁F4) にまとめ、レポーターアッセイに供し

たところ、R₁F3 において PPAR γ 活性の抑制作用が確認された (Fig. 4B)。

Table 4 逆相 HPLC の分離条件 (F8)

カラム	Waters X Bridge C18 カラム 粒子径 5 μ m \cdot 4.6 mm \times 250 nm
移動相	A 液 {超純水} B 液 {0.1%ギ酸含有アセトニトリル} A : B = 28 : 72 \Rightarrow 10 : 90 56 分間グラジエント
流速	1.0 mL/min
カラム温度	20°C
測定波長	190-800 nm
サンプル	F8 をアセトニトリル 200 μ L で溶解したもの 200 μ L

A



B

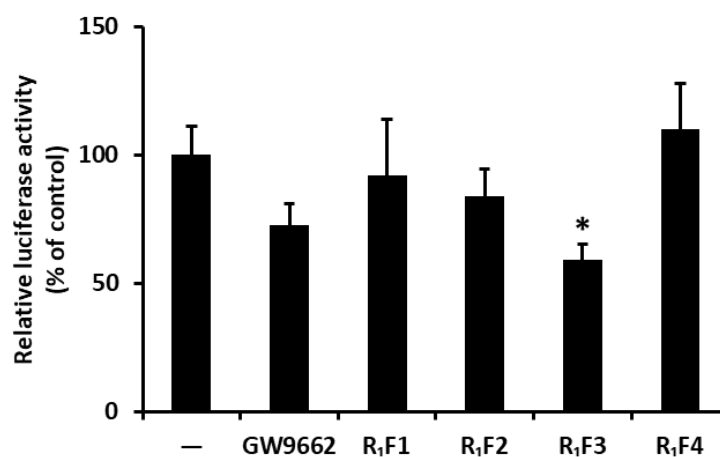


Fig. 4 F8 の HPLC クロマトグラムと PPAR γ 転写活性に及ぼす影響

(A) Table 4 の条件のもと F8 を HPLC で分離し、1 分毎に溶液を回収し、4 つのフラクション (R₁F1~ R₁F4) にまとめた。(B) HPLC により分離して得られた画分 (R₁F1~ R₁F4) が PPAR γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100% とし、各サンプルの PPAR γ 転写活性を求めた。Values are means \pm SE. * P <0.05 vs non-treated culture.

R₁F3 の分画

PPAR_γ 活性の抑制作用が確認された R₁F3 をさらに逆相 HPLC によって分画し、フラクションコレクターを用いて回収した。(Table 5, Fig. 5A)。得られた溶液を3つのフラクション (R₂F1~R₂F3) にまとめ、レポーターアッセイに供したところ、R₂F1、R₂F2 において PPAR_γ 活性の抑制作用が確認された (Fig. 5B)。

Table 5 逆相 HPLC の分離条件 (R₁F3)

カラム	日本分光 Crestopak C18T-5 カラム 粒子径 5 μm · 4.6 mm × 250 nm
移動相	A 液 {超純水} B 液 {0.1%ギ酸含有アセトニトリル} A : B = 40 : 60 103 分間
流速	0.2 mL/min
カラム温度	20°C
測定波長	190-800 nm
サンプル	R ₁ F3 をアセトニトリル 200 μL で溶解したもの 200 μL

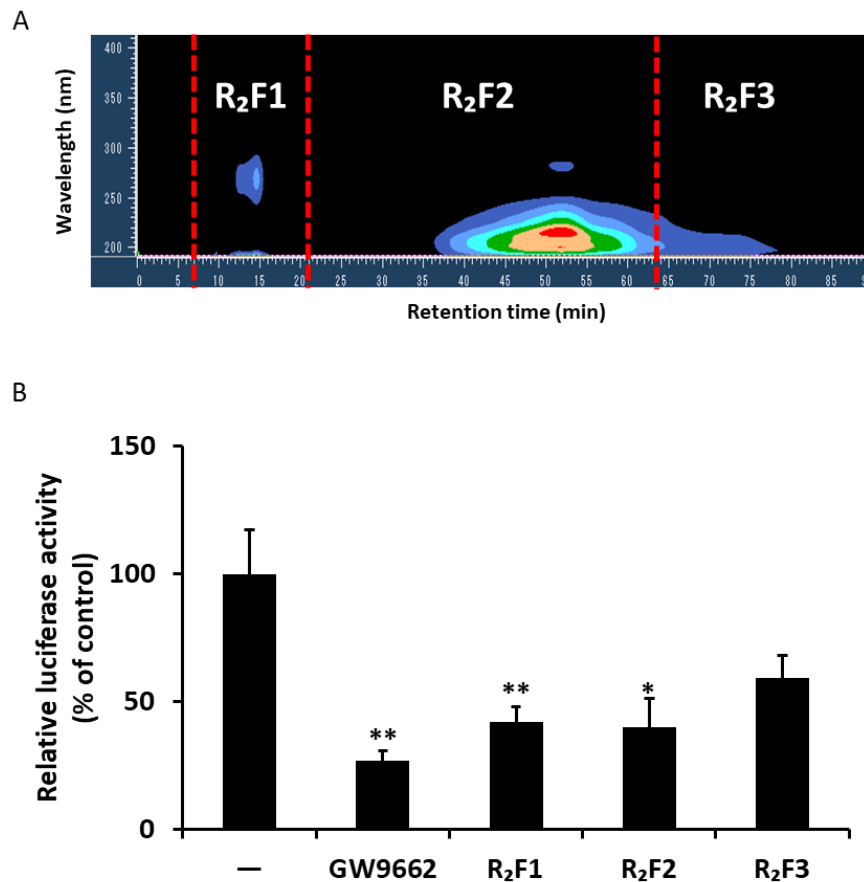


Fig. 5 R₁F3 の HPLC クロマトグラムと PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響

(A) Table 5 の条件のもと R₁F3 を HPLC で分離し、1 分毎に溶液を回収し、3 つのフラクション (R₂F1~R₂F4) にまとめた。(B) HPLC により分離して得られた画分 (R₂F1~R₂F3) が PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100% とし、各サンプルの PPAR_γ 転写活性を求めた。Values are means ± SE. ***P*<0.01, **P*<0.05 vs non-treated culture.

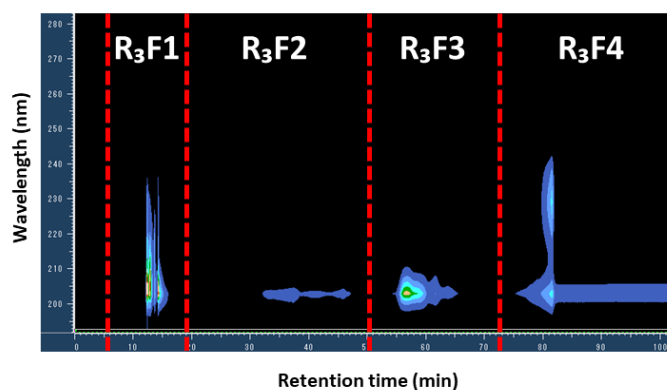
R₂F1 の分画

PPAR_γ 活性の抑制作用が確認された R₂F1 を順相 HPLC によって分画し、フラクションコレクターを用いて回収した (Table 6, Fig. 6A)。得られた溶液を 4 つのフラクション (R₃F1~R₃F4) にまとめ、レポーターアッセイに供したところ、R₃F3、R₃F4 において PPAR_γ の活性の抑制作用が確認された (Fig. 6B)。

Table 6 順相 HPLC の分離条件 (R₂F1)

カラム	Waters Spherisorb NH ₂ Analytical Column 粒子径 5 μm · 4.6 mm × 250 nm
移動相	A 液 {イソプロパノール} B 液 {ヘキサン} A : B = 5 : 95 103 分間
流速	0.2 mL/min
カラム温度	20°C
測定波長	190-800 nm
サンプル	R ₂ F1 をアセトニトリル 200 μL で溶解したもの 200 μL

A



B

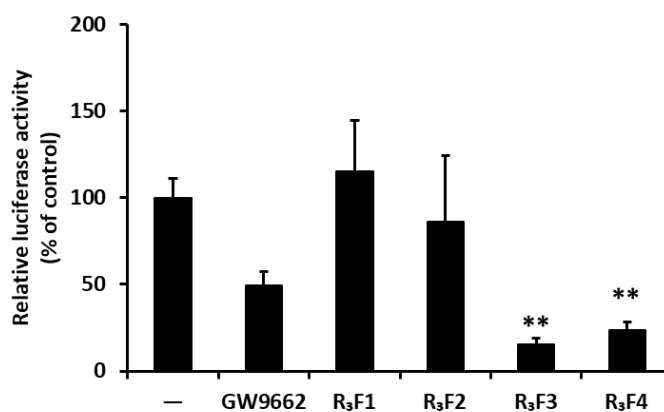


Fig. 6 R₂F1 の HPLC クロマトグラムと PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響

(A) Table 6 の条件のもと R₂F1 を HPLC に分離し、1 分毎に溶液を回収し、4 つのフラクション (R₃F1~R₃F4) にまとめた。(B) HPLC により分離して得られた画分 (R₃F1~R₃F4) が PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100% とし、各サンプルの PPAR_γ 転写活性を求めた。Values are means ± SE. ***P*<0.01 vs non-treated culture.

R₃F3 の分画

PPAR_γ 活性の抑制作用が確認された R₃F1 をさらに順相 HPLC によって分画し、フラクションコレクターを用いて回収した (Table 7, Fig. 7A)。得られた溶液を 4 つのフラクション (R₄F1~R₄F4) にまとめ、レポーターアッセイに供したところ、R₄F1、R₄F4 において PPAR_γ 活性の抑制作用が確認された (Fig. 7B)。

Table 7 順相 HPLC の分離条件 (R₃F3)

カラム	Tosoh Bioscience TSK GEL Silica-60 Column 粒子径 5 μm · 4.6 mm × 250 mm
移動相	A 液 {0.1% ギ酸含有アセトニトリル} · B 液 {メタノール} A : B = 95 : 5 35 分間
流速	0.2 mL/min
カラム温度	20°C
測定波長	190-800 nm
サンプル	R ₃ F3 をエタノール 10 μL で溶解後、アセトニトリルで 200 μL にメスアップしたもの 200 μL

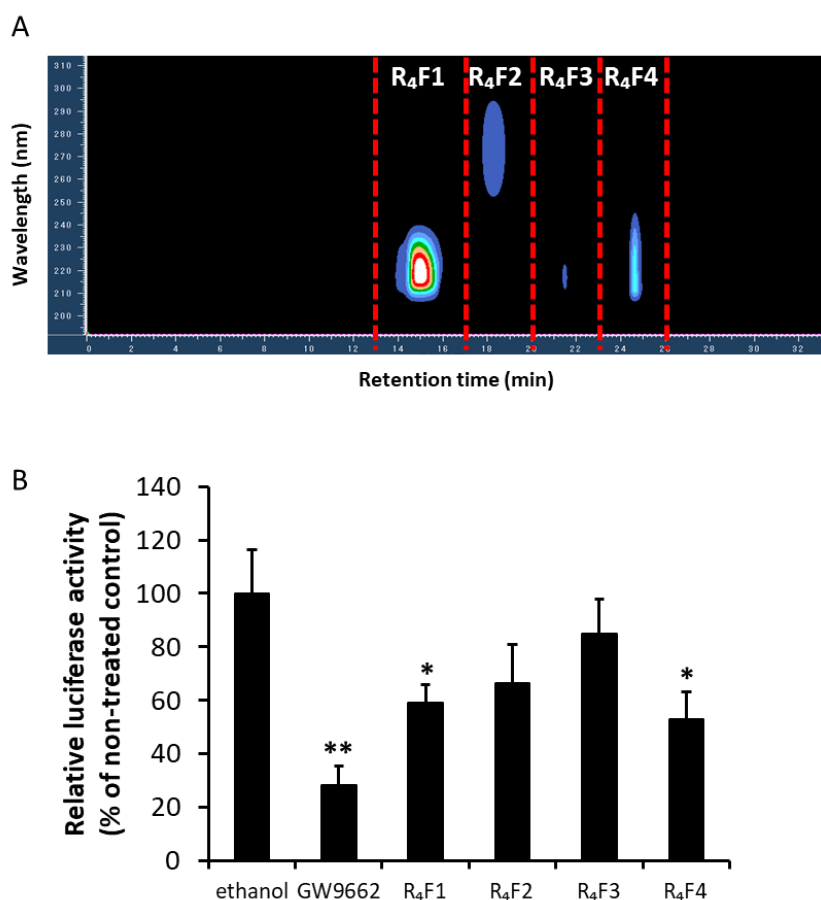


Fig. 7 R₃F₃ の HPLC クロマトグラムと PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響

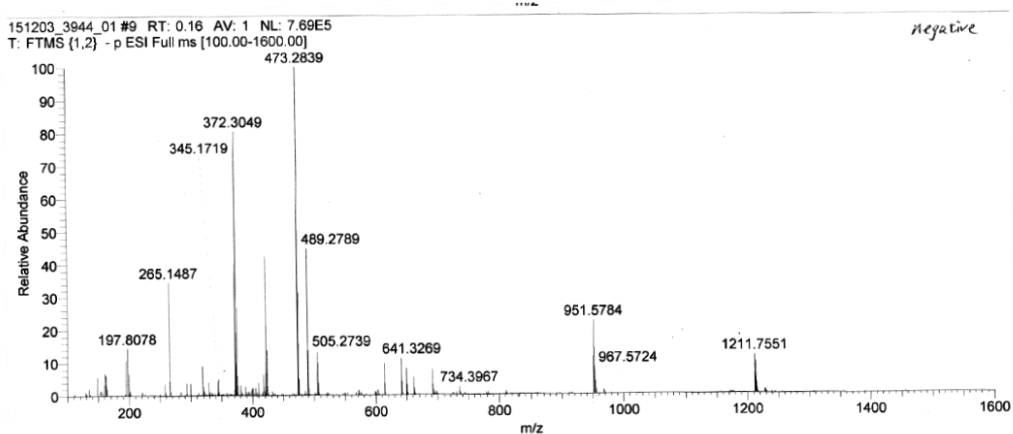
(A) Table 7 の条件のもと R₃F₃ を HPLC で分離し、0.5 分毎に溶液を回収し、4 つのフラクション (R₄F₁~R₄F₄) にまとめた。(B) HPLC により分離して得られた画分 (R₄F₁~R₄F₄) が PPAR_γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。溶媒 (-) のルシフェラーゼ活性値を 100% とし、各サンプルの PPAR_γ 転写活性を求めた。Values are means ± SE. ***P*<0.01, **P*<0.05 vs non-treated culture.

3-4 LC/MS による質量分析と NMR による構造解析

3-3 において PPAR_γ アンタゴニスト作用が確認された R₄F₁、R₄F₄ を LC/MS による質量分析に供した。その結果、R₄F₁ では $m/z=473.2839$ 、 372.3049 といった複数の大きなピークが確認された (Fig. 7A)。このうち $m/z=473.2839$ は

分子量 438 の物質に Cl^- (35.5) が付加し、カルボン酸の H が脱離したものと考えられた。R₄F4 では $m/z=372.3049$ といった顕著なピークが見られた (Fig. 7B)。 $m/z=372.3049$ は分子量 337 の物質に Cl^- (35.5) が付加した状態であると考えられた。これらの結果から、R₄F4 は単一の物質である可能性が示された。また、R₄F1 には複数の物質が存在することが示唆され、そのうちの 1 つは R₄F4 と同一の物質 ($m/z=372.3049$) であることが示唆された。

A



B

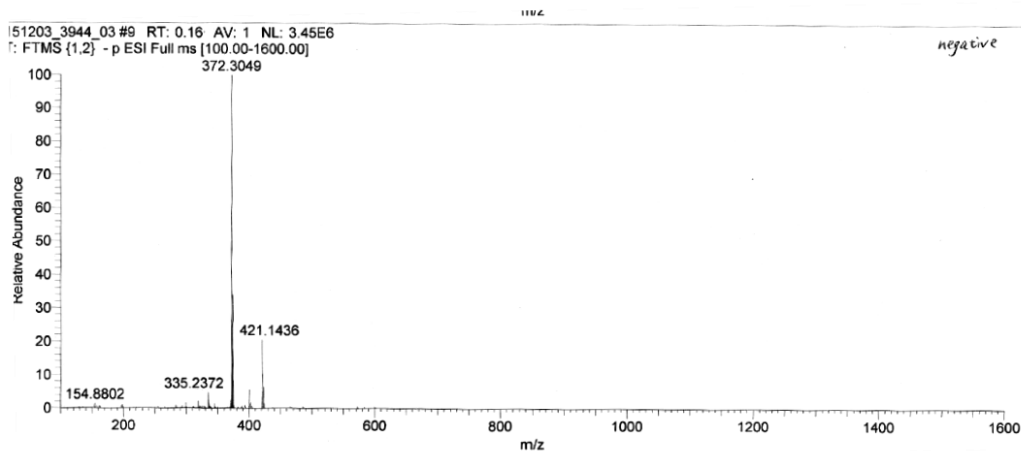


Fig. 8 LC-MS による分子量解析

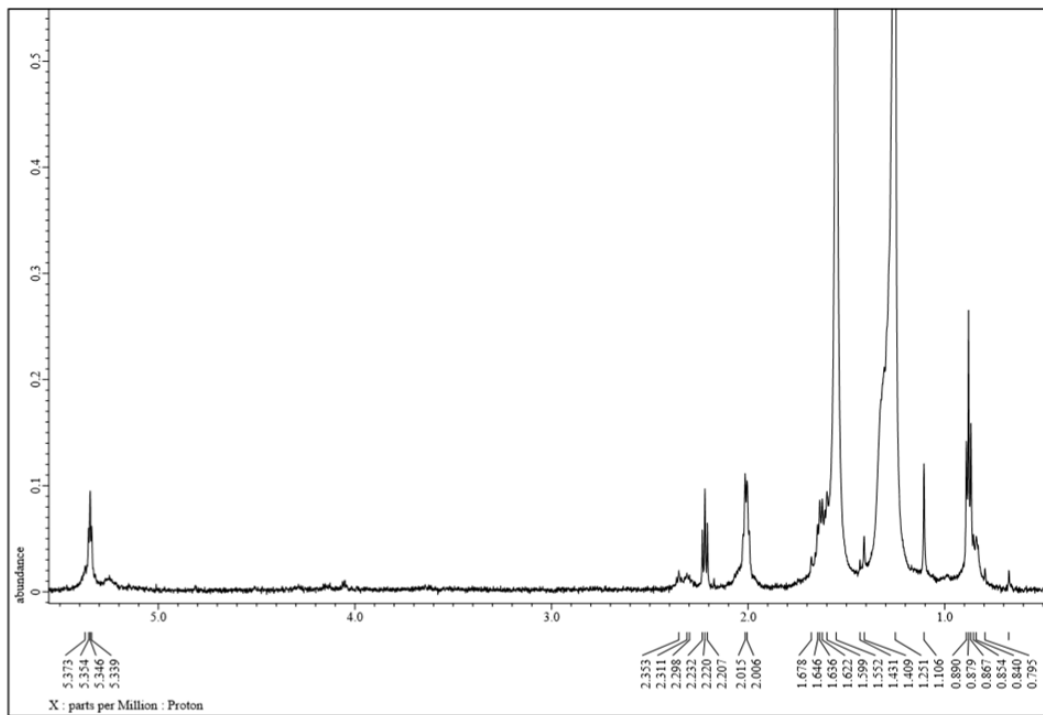
(A) R₄F1、(B) R₄F4

さらに $^1\text{H-NMR}$ による $\text{R}_4\text{F1}$ 、 $\text{R}_4\text{F4}$ の構造解析を行った。その結果、 $\text{R}_4\text{F1}$ はピークが不鮮明であり混合物である可能性が考えられたが (data not shown)、 $\text{R}_4\text{F4}$ は鮮明なピークが見られ、単一の物質であることが示唆された (Fig. 9A, Table 8)。 $^1\text{H-NMR}$ の結果と LC/MS で判明した分子量から、 $\text{R}_4\text{F4}$ は $m/z = 338.56768$ のモノ不飽和脂肪酸であるエルカ酸 (Fig. 9B) であることが判明した。さらに、 $\text{R}_4\text{F4}$ と市販のエルカ酸標品の $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルが一致したことにより $\text{R}_4\text{F4}$ がエルカ酸であることが確認された (Fig. 10, Table 9)。また、 $\text{R}_4\text{F1}$ と $\text{R}_4\text{F4}$ のピークの位置が類似していることから、 $\text{R}_4\text{F1}$ 中にはエルカ酸またはそれと類似の構造の物質が含まれる可能性が示唆された。

Table 8 $^1\text{H-NMR}$ による $\text{R}_4\text{F4}$ の構造解析の結果

Position	δ_{H}^1
A	5.35 (2H, t, $J = 5.0$ Hz)
B	2.01 (4H, dd, $J = 7.0$ Hz)
C	1.30 (28H, br, $J = 8.5$ Hz)
D	0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)
E	1.64 (2H, dt, $J = 7.0$ Hz)
F	2.22 (2H, t, $J = 7.5$ Hz)

A



B

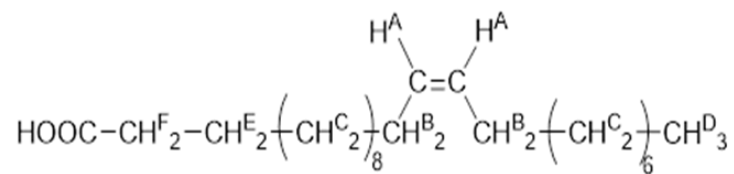


Fig. 9 R₄F₄ の構造解析

(A) ¹H-NMR による構造解析の結果、(B) R₄F₄ 中の成分として同定されたエルカ酸の構造式

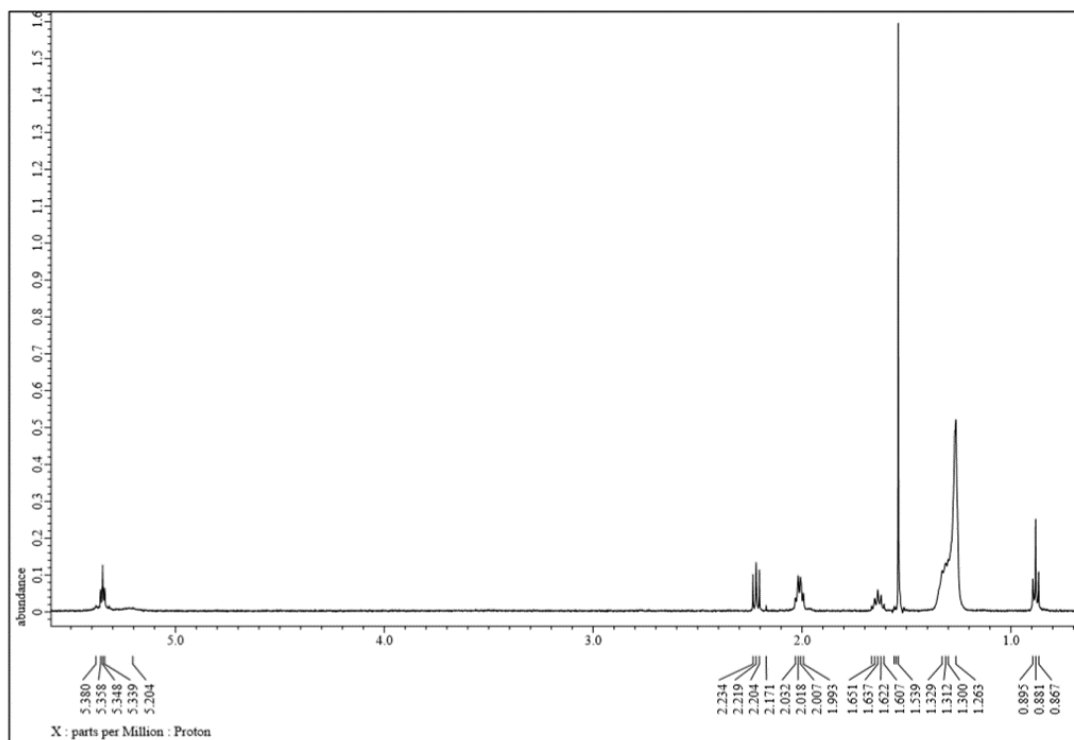


Fig. 10 エルカ酸標品の ^1H -NMR による構造解析

Table 9 ^1H -NMR によるエルカ酸標品の構造解析の結果

Position	$\delta^1\text{H}$
A	5.35 (2H, t, $J = 5.0$ Hz)
B	2.01 (4H, dd, $J = 7.0$ Hz)
C	1.30 (28H, br, $J = 8.5$ Hz)
D	0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)
E	1.64 (2H, dt, $J = 7.0$ Hz)
F	2.22 (2H, t, $J = 7.5$ Hz)

3-5 エルカ酸標品が PPAR γ 活性および C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞分化・脂肪細胞分化に及ぼす影響

続いて市販のエルカ酸標品を用いて PPAR γ 活性に及ぼす影響を調べたところ、25 μ M まではエルカ酸の添加濃度依存的に PPAR γ 活性は抑制されたものの、25 μ M 以上では濃度依存的に PPAR γ 活性が増加し、V 字のグラフを描いた (Fig. 11A)。また、間葉系幹細胞分化に及ぼす影響を調べたところ、ALP 陽性骨芽細胞数は 25 μ M まではエルカ酸添加濃度依存的に増加したが、25 μ M 以上では濃度依存的に減少する逆 V 字のグラフを描いた (Fig. 11B)。また、Oil Red O 陽性脂肪細胞数は 25 μ M まではエルカ酸の添加濃度依存的に減少したが、25 μ M 以上では濃度依存的に増加する逆 V 字のグラフを描いた (Fig. 11C)。さらに、エルカ酸 25 μ M において骨芽細胞の石灰化が促進されていた (Fig. 11D)。エルカ酸はいずれの濃度においても細胞生存率に影響を及ぼさなかった (Fig. 11E)。これらのことから、エルカ酸は PPAR γ 活性を抑制し、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進、脂肪細胞への分化を抑制していることが示された。

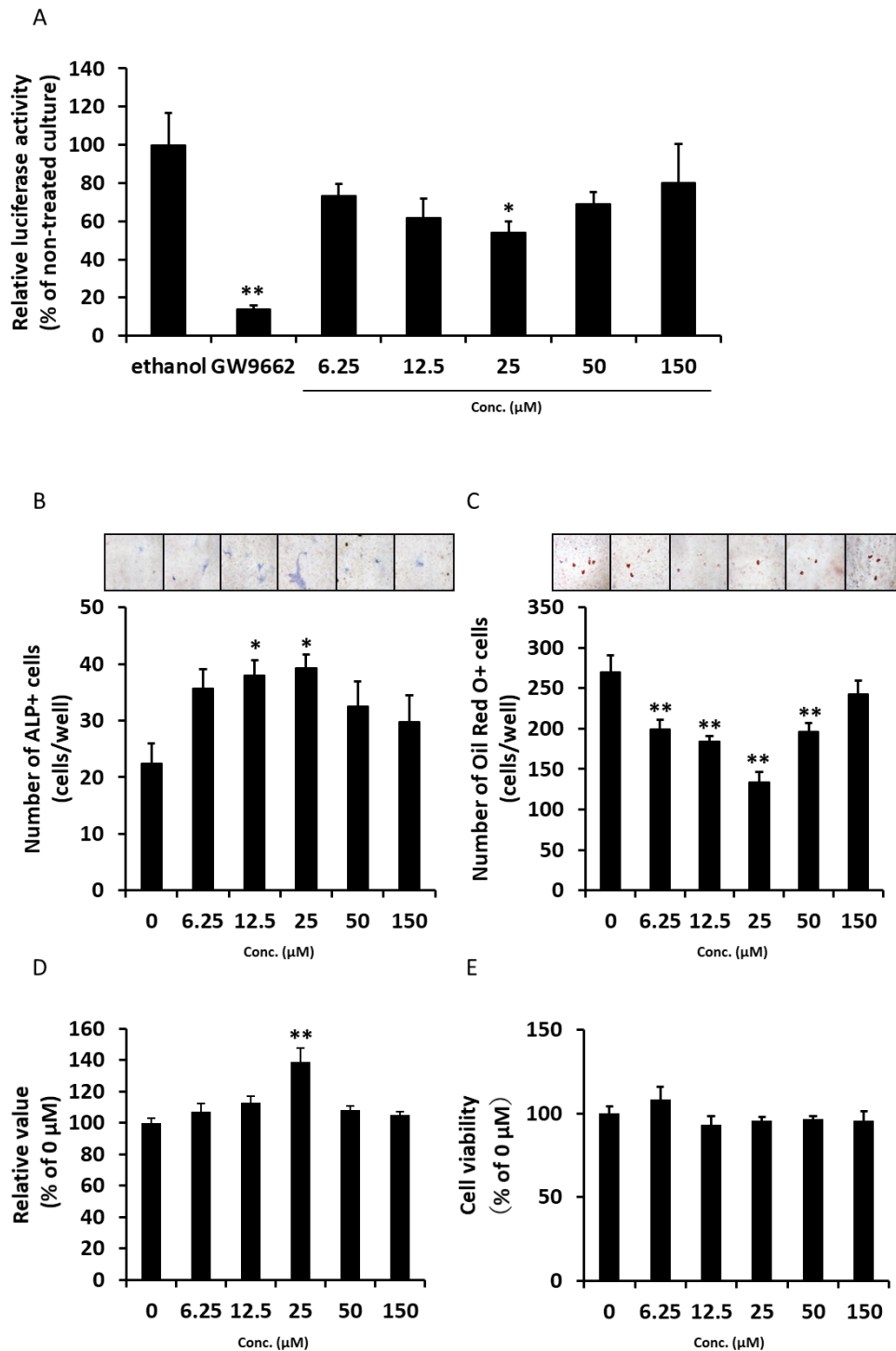


Fig. 11 エルカ酸標品が PPAR γ 活性および C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞分化・脂肪細胞分化に及ぼす影響

(A) エルカ酸標品をレポーターアッセイに供し、PPAR γ 活性を測定した。(B-E) エルカ酸を間葉系幹細胞に添加して 14 日間培養し、ALP 染色 (B) Oil Red O 染色 (C)、アリザリンレッド染色 (D)、細胞生存率の測定 (E) を行った。Values are means \pm SE. ** P <0.01, * P <0.05 vs non-treated culture.

続いて、エルカ酸による間葉系幹細胞分化調節のメカニズムを調べるため、骨芽細胞分化マーカーおよび脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現量を測定した。その結果、エルカ酸は骨芽細胞分化マーカーである *Runx2* (Fig. 12A) と *Osterix* (Fig. 12B) の発現に影響を与えないものの、その標的遺伝子である *ALP* (Fig. 12C) と *osteocalcin* (Fig. 12D) の発現を増加させた。さらに、エルカ酸は *PPAR γ* の遺伝子発現に影響を与えないものの (Fig. 12E)、その標的遺伝子で脂肪細胞マーカー遺伝子である *aP2* (Fig. 12F) と *LPL* (Fig. 12G) の遺伝子発現を増加させた。また、エルカ酸は Day 14 における *PPAR γ* のタンパク質発現をやや低下させたものの有意な影響を与えなかった (Fig. 13)。

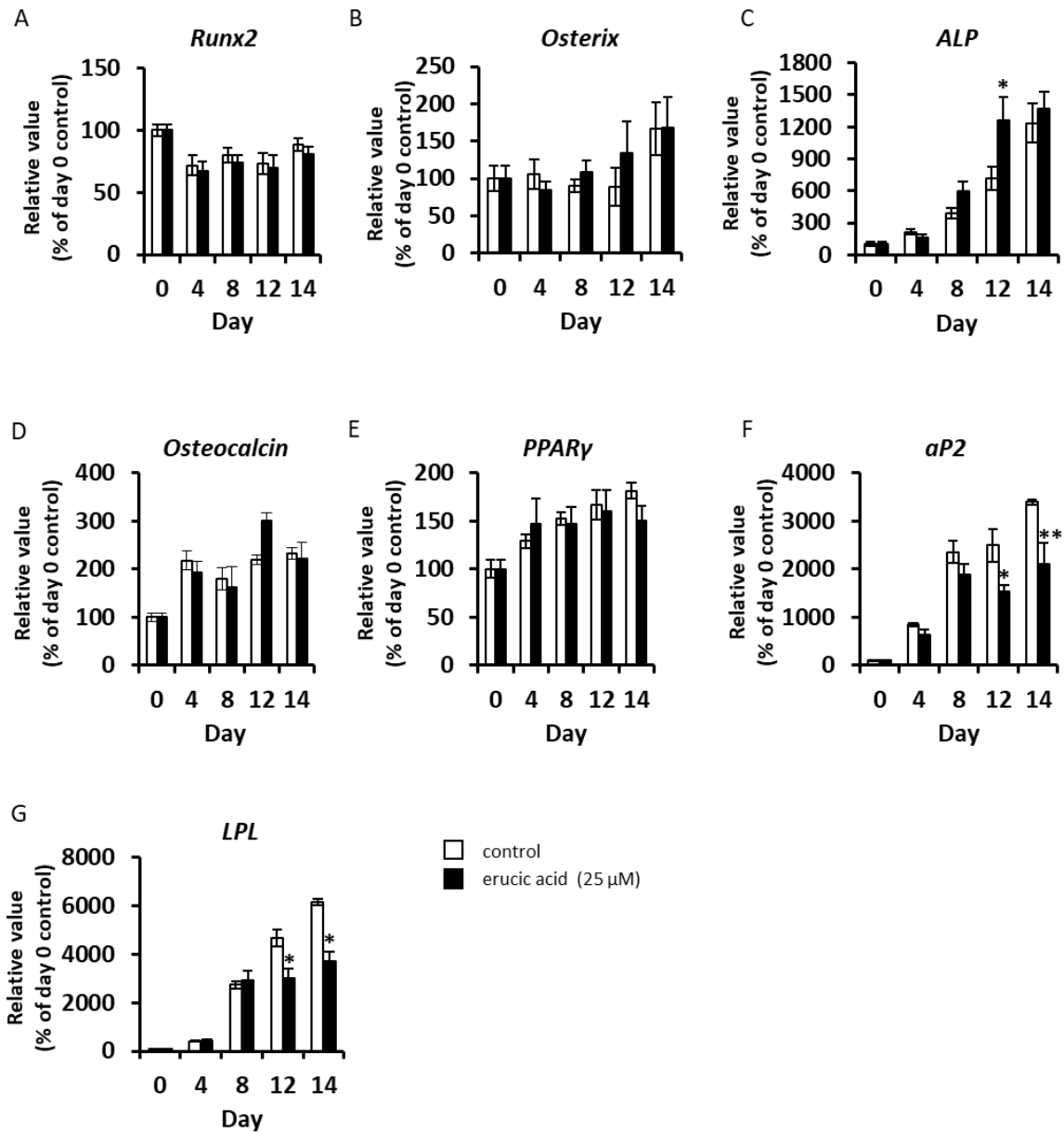


Fig. 12 エルカ酸標品が脂肪細胞分化マーカーおよび骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に及ぼす影響

(A-D) 骨芽細胞分化マーカー遺伝子、(E-G) 脂肪細胞分化マーカー遺伝子

Values are means \pm SE. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs each day control.

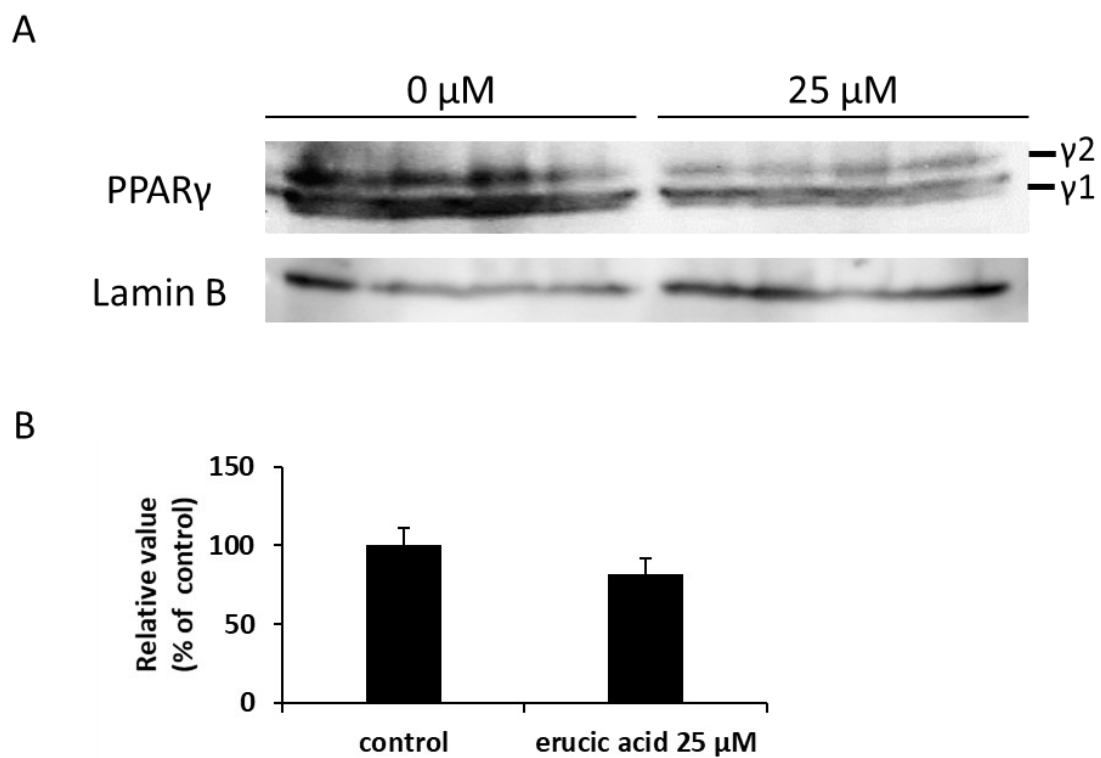


Fig. 13 エルカ酸標品が PPAR γ タンパク質発現に及ぼす影響

Day 14 の C3H10T1/2 細胞における control (エタノール) とエルカ酸標品 (25 μ M) 添加による PPAR γ タンパク質の発現量を評価した。

4. 考察

間葉系幹細胞から骨芽細胞と脂肪細胞への分化の決定には PPAR γ の活性化が関与している (44)。実際に合成 PPAR γ のアンタゴニストである GW9662 や bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) の添加により、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化が促進し、脂肪細胞への分化が抑制されることが報告されている (17)。しかしながら、天然由来の PPAR γ アンタゴニストが間葉系幹細胞分化に及ぼす影響についての報告は数例のみである (45, 46)。本研究ではセロリシード、白胡椒、スペアミント、セージ、メース、ローズマリーが PPAR γ 転写活性を抑制することが明らかとなった。中でも効果の高かったローズマリーに着目して成分分離を行ったところ、新規 PPAR γ アンタゴニスト成分としてローズマリー中よりエルカ酸が見出された (Fig. 9B)。エルカ酸は植物中に広く含まれるモノ不飽和脂肪酸の一種であり、特にアブラナ科の植物 (ナタネやマスタード) 中に多く含まれることが知られている (47, 48)。また、シソ科に属しローズマリーの近縁種であるバイカラーセージにおいても存在することが報告されている (49)。しかしながら、エルカ酸の生理的な作用についてはこれまであまり報告されていない。

本研究でエルカ酸は、間葉系幹細胞株である C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが見出された。また、エルカ酸

が *PPAR γ* 遺伝子発現には直接影響を与えずに、その標的遺伝子である骨芽細胞マーカー遺伝子発現の増加および脂肪細胞マーカー遺伝子発現の減少をもたらしたことから、エルカ酸による間葉系幹細胞分化の調節作用は *PPAR γ* 転写活性の抑制に起因することが示唆された。

ローズマリー抽出物中より HPLC を用いて分取した画分である R₄F1 と R₄F4 は共に *PPAR γ* 転写活性の抑制効果を示し、LC/MS および NMR 解析により、R₄F1 は R₄F4 と同じ成分を含有する混合物であることが判明した。しかし、R₄F1 は HPLC において R₄F4 とは異なるリテンションタイムを有していた。また、エルカ酸標品は 25 μ M 以下の濃度においては濃度依存的に *PPAR γ* 転写活性抑制効果を示すのに対し、25 μ M 以上では徐々にネガティブコントロールに近づく V 字のグラフを描いた。この現象は C3H10T1/2 細胞の分化においても観察された。これら結果は、エルカ酸を含む脂肪酸が濃度により異なる溶解性を示し、生理活性にも影響を及ぼすこと (50) に起因すると考えられる。エルカ酸の濃度と構造の変化および *PPAR γ* 転写活性に及ぼす影響の関係性については、さらなる研究が必要である。

まとめると、本試験において *PPAR γ* 転写活性抑制効果を持つ新規成分としてローズマリー中よりエルカ酸を見出した。さらに、エルカ酸は *PPAR γ* 転写活性の抑制を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化

を抑制することを明らかにした。これらの結果より、エルカ酸は間葉系幹細胞の分化調節を介して骨粗鬆症および肥満の予防において有効である可能性が示唆された。

Ⅲ. エルカ酸高含有イエローマスタートードオイル によるメタボリックシンドローム・ 骨粗鬆症の予防効果

1. 背景

肥満は脂肪細胞数の増加や肥大化に伴い脂肪組織が増大することによって引き起こされ (51)、アテローム性動脈硬化症や循環器系疾患、2 型糖尿病、高血圧などのメタボリックシンドロームの原因となる (52)。PPAR γ はリガンド依存性の核内受容体であり、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能している (12, 19)。一方、合成 PPAR γ アンタゴニストである GW9662 (22) や BADGE (53) も肥満やインスリン抵抗性の改善を介して糖代謝機能を回復させることが報告されている。さらに、PPAR γ 欠損マウスでは高脂肪食摂取による肥満や糖尿病の発症が抑制されることが報告されている (54)。それゆえ、PPAR γ の活性化のみならず PPAR γ の活性抑制によっても脂肪細胞の肥大化抑制やインスリン抵抗性の改善効果を発揮することができると考えられている (55)。

第 II 章の研究により、ローズマリーより見出したエルカ酸が PPAR γ 活性抑制を介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。エルカ酸はナタネやマスタードといったアブラナ科の植物に多く含有されるモノ不飽和脂肪酸の一種であり (47, 48)、中でもマスタードの種子油中に多く含まれることが知られている (56)。マスタードはアブラナ科に属し、種子に独特の風味と辛みを持つことから古くから香辛料とし

て用いられてきた (38)。また、種子油は古来よりヨーロッパにおいて食用としてのみならず、鎮痛・抗炎症・解毒剤としても重用されてきた (57, 58)。マスタードの一種であるイエローマスタード (*Sinapis alba* L.) は主に西洋やインドで食され、穏やかな辛みを持ち、料理のアクセントとして使用されている。イエローマスタードの種子には脂質が豊富に含まれており、種子から抽出されるイエローマスタードオイル (YMO) は食用とされる以外にも、近年ではバイオ燃料としての利用が期待されている (56)。YMO 中には多様な脂肪酸が含まれているが、中でもエルカ酸の含有量が多いことが報告されている (59)。これまでエルカ酸による生理機能はほとんど明らかにされておらず、エルカ酸や YMO 摂取による肥満や糖代謝、骨粗鬆症への影響の評価もなされていない。そこで本章では、エルカ酸を豊富に含む YMO を用いて、肥満、糖尿病、骨粗鬆症に対する機能性評価を行った。はじめに YMO を間葉系幹細胞に添加したところ、第 II 章で行ったエルカ酸標品での結果と同様に PPAR γ 活性抑制作用を示すとともに、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。次に、生体内での働きを調べるため動物実験を行った。本研究では骨芽細胞による骨形成への影響を調べるため、過去に骨芽細胞による骨形成の低下に伴う骨量減少が報告されている肥満・糖尿病モデルである KK-A y マウス (60) を使用した。KK-A y マウスに YMO を投与し、肥満、糖尿病およ

び骨粗鬆症への影響を評価した結果、YMO 投与により脂肪蓄積の抑制、インスリン感受性の亢進による糖代謝機能の改善、骨形成の増加による骨密度増加がもたらされた。

2. 方法

2-1 YMO 中の脂肪酸組成の解析

YMO および YMO 加水分解物はキューピー株式会社 (Tokyo, Japan) より提供された。YMO 中の脂肪酸組成の解析はキューピー株式会社により、以下の手順で行われた。50 mg の YMO および YMO 加水分解物を 5 mL の 0.5 M 水酸化ナトリウム-メタノール溶液に溶解し、沸騰水中で 5-10 分間加熱した。その後、7 mL の三フッ化水素 (Sigma-Aldrich Co.) を加えて 2 分間加熱し、5 mL のヘキサンを加えさらに 1 分間加熱した。加熱後 140 mL の飽和食塩水を加え、ヘキサン層を 1 mL 回収した。回収したヘキサン層に 0.2 g の硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸解析に供した。ガスクロマトグラフィーは Flame ionization detector (GC-FID) (GC-6890N, Agilent Technologies Inc., DE, USA)、Omegawax® 250 Intuvo Capillary GC Column (L×I.D. 30 m×0.25 mm, df 0.25 μm, Supelco, PA, USA) を使用した。検出された脂肪酸は Supelco® 37 Component FAME Mix (Supelco) によって定量化された。

2-2 レポーターアッセイ

第II章 2-2 と同様の手順で PPAR γ 活性評価を行った。細胞実験では脂肪酸が遊離脂肪酸型で存在する YMO 加水分解物を使用した。YMO 加水分解物は 100% エタノールに溶解したものを各種濃度に希釈し、細胞に添加した。

2-3 間葉系幹細胞培養

第II章 2-3 と同様の手順でマウス由来間葉系幹細胞である C3H10T1/2 細胞を 14 日間培養した。

2-4 Oil Red O 染色

第II章 2-5 と同様の手順で 14 日間培養した C3H10T1/2 細胞中の脂肪細胞を Oil Red O 染色により染色、計測を行った。

2-5 アルカリフォスファターゼ染色

第II章 2-4 と同様の手順で 14 日間培養した C3H10T1/2 細胞中の骨芽細胞をアルカリフォスファターゼ染色により染色、計測を行った。

2-6 動物実験

4 週齢の KK-A γ /TaJcl 雄マウスを日本クレア (Tokyo, Japan) より購入し、YMO はキューピー株式会社より提供されたものを使用した。マウスは 22 \pm 2°C、

湿度 50%、12 時間の明暗サイクル（明期 7:00-19:00、暗期 19:00-7:00）条件下で飼育した。マウスを 6 群（n=10-11）に分け、齧歯類用の標準飼料 AIN-93G の脂質を 10%に改変した飼料（コントロール食）（control 群）、コントロール食に PPAR γ 合成アンタゴニストである GW9662 を 0.005%混合した飼料（GW9662 群）、コントロール食中の大豆油 1.0%を YMO に置換した飼料（エルカ酸含量 37.0 g/kg）（1% YMO 群）、3.5%を YMO に置換した飼料（エルカ酸含量 129.5 g/kg）（3.5% YMO 群）、7.0%を YMO に置換した飼料（エルカ酸含量 259.0 g/kg）（7% YMO 群）いずれかの飼料を給餌した。各群の餌組成は Table 10 に示した。飼育期間中は各群の摂食量を合わせるためペアフェッドを施し、水は自由摂取させた。16 週目に、塩酸メドミジン 0.3 mg/kg (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、ミダゾラム注 10 mg 「サンド」 4 mg/kg (SANDOZ a Novartis company, Tokyo, Japan)、酒石酸ブトルファノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 5 mg/kg となるように調合した三種混合麻酔薬下で解剖を行い、皮下脂肪組織、腎臓周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、精巣周囲脂肪組織、大腿骨を採取した。全ての動物実験の処置は、千葉大学動物実験実施規定に従い、千葉大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：動 30-387）。

Table 10 餌組成

	control 群	GW9662 群	1.0% YMO 群	3.5% YMO 群	7.0% YMO 群
Casein	2000.00	2000.00	2000.00	2000.00	2000.00
L-Cystine	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
β -corn starch	3174.86	3174.36	3174.86	3174.86	3174.86
α -corn starch	1320.00	1320.00	1320.00	1320.00	1320.00
Sucrose	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Cellulose	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Soybean Oil	1000.00	1000.00	900.00	650.00	300.00
YMO	0.00	0.00	100.00	350.00	700.00
AIN93 Mineral Mix	350.00	350.00	350.00	350.00	350.00
AIN93 Vitamin Mix	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Choline Bitartrate	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Tert-butylhydroquinone	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
GW9662	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00
Total	10000.00	10000.00	10000.00	10000.00	10000.00

2-7 Real time PCR による遺伝子解析

KK-Ay マウスの解剖時に回収した腎臓周囲脂肪組織は 0.2 g に切り分け、RNAiso Plus (Takara Bio inc.) を 2 mL 加え、ポリトロンホモジナイザー (Disperser T 10 basic ; IKA-Werke GmbH & Co, Staufen im Breisgau, Germany) により組織片がなくなるまで、ホモジナイズした後、RNAiso の製品プロトコルに従い RNA 抽出を行った。マウス由来間葉系幹細胞である C3H10T1/2 細胞からは第 II 章 2-8 と同様の手順で細胞を回収し、RNA 抽出を行った。抽出した RNA は II 章 2-8 と同様の手順で cDNA 合成を行った後、Real time PCR に供した。測定に使用したプライマーの配列は Table 11 に示した。

Table 11 プライマー配列

<i>Genes</i>	Accession number	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<i>PPARγ</i>	NM_001127330	GGAGATCTCCAGTGATATCGACCA	ACGGCTTCTACGGATCGAAACT
<i>aP2</i>	NM_001122948	AAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT	TGACCAAATCCCCATTTACGC
<i>LPL</i>	NM_008509	GCCCAGCAACATTATCCAGT	GGTCAGACTTCCTGCTACGC
<i>Runx2</i>	DQ065175	CCCAGCCACTTTACCTACA	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG
<i>osterix</i>	AF184902	ACTCATCCCTAATGGCTCGTG	GGTAGGGAGCTGGGTTAAGG
<i>ALP</i>	BC065175	GCTGATCATTTCCACGTTTT	CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT
<i>Col1</i>	NM_007742.4	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC
<i>F4/80</i>	X93328.1	TTTCCTCGCCTGCTTCTTC	CCCCGTCTCTGTATTCAACC
<i>MCP-1</i>	NM_011333.3	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCTTCTTG
<i>IL-1β</i>	NM_008361.4	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
<i>CD11c</i>	NM_007482	TGGGTTTGTCTTGTCTTG	GCCTGTGTGATAGCCACATTT
<i>TNF-α</i>	NM_013693	ACACTCAGATCATCTTCTCAAATTCG	GTGTGGGTGAGGAGCACGTAGT
<i>CD206</i>	NM_008625	GCGCTGCGTGACGCTCTAA	ACAGGGTGACGGAAGCCAGT
<i>Ym1</i>	NM_009892	AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT	GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA
<i>Arg1</i>	NM_007482	CAGTTGGAAGCATCTCTGGC	GTGAGCATCCACCCAAATGAC
<i>36B4</i>	NM_007475.5	TGTGTGTCTGCAGARCGGGTAC	CTTTGGCGGGATTAGTCGAAG

2-8 経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test : OGTT)

飼育 15 週目に、16 時間の絶食の後に 1.5 g/kg body weight のグルコース溶液を経口投与し、0、15、30、60、120 分後に尾静脈採血を行った。採取した血液は 4°C、10,000 rpm で 5 分間遠心し、血漿を回収した。回収した血漿は 2-9 に示した方法でグルコース濃度とインスリン濃度を測定した。

2-9 血漿中糖代謝パラメーター測定

グルコース濃度測定にはグルコース C-II-テストワコー (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いた。血漿を 2 倍希釈したサンプルを 4 μ L 用いてキットに付属の説明書に従って行い、マイクロプレートリーダー (Infinit 200 pro) で 492 nm の吸光度を測定した。インスリン濃度測定には Morinaga Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いた。血漿および検量線サンプル 5 μ L を用いてキットに付属の説明書に従って行い、マイクロプレートリーダー (Infinit 200 pro) で 450 nm の吸光度を測定した。インスリン抵抗性の指標である Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) は $HOMA-IR = 0$ 分時の血漿中グルコース濃度 (mmol/L) \times 0 分時の血漿中インスリン濃度 (mU/L) \times 22.5 の式 (61) を用いて求めた。インスリン感受性の指標である Quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) は $QUICKI = 1 \div \{ \text{Log} [0 \text{ 分時の血漿中グルコース濃度 (mg/dL)] + \text{Log} [0 \text{ 分時の血漿中インスリン濃度 (mU/L)] \}$ の式 (62) を用いて求めた。

2-10 腎臓周囲脂肪組織の組織化学的分析

解剖時に回収した腎臓周囲脂肪組織を 10%ホルマリン/PBS に 1 晩浸して組

織を固定した。組織固定後は PBS に置換し、4°C で保存した。保存しておいたサンプルをパラフィン包埋し、Leica SR 2000 Microtome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて 0.5 μm のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン (Hematoxylin Eosin ; HE) 染色または免疫染色に供した。HE 染色にはマイヤーヘマトキシリン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で 2 分間染色した後、0.25% Eosin Y (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で 5 分間染色した。免疫染色では 10% Normal Serum block (SIG-31172 ; BioLegend, Inc., SD, USA) と 2% BSA (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) によりブロッキングをした後、anti-F4/80 (Rat anti mouse F4/80 antibody, clone Cl:A3-1, MCA497G, Bio-Rad Laboratories, Inc.) (1:200)、anti-CD11c (Anti CD11c/Integrin α X, 17342-1-AP, Proteintech Group, Inc., IL, USA) (1:500) または anti-CD206 (Anti-Mannose Receptor antibody, ab64693, abcam, Cambridge, UK) (1:5000) を用いて 4°C で一晩、一次抗体反応を行い、biotinylated anti-rat IgG antibody (Rabbit Anti-Rat IgG Antibody, BA-4001, Vector Laboratories, CA, USA) または biotinylated anti-rabbit IgG antibody (Biotin-Conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Boster Immunoleader, CA, USA) を用いて二次抗体反応を行った。streptavidin-horseradish peroxidase (abcam)、DAB (Dojindo Molecular

Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) により標識した後、マイヤーヘマトキシリン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) により核を染色した。染色後の各切片は光学顕微鏡 (CKX41) 下で観察し、Win-ROOF ver. 7.2 (MITANI Corporation, Tokyo, Japan) を用いて解析を行った。

2-11 骨密度測定

100%エタノールを用いて大腿骨の脱脂を行った。3日間毎日エタノールを交換し、脱脂した大腿骨は城西大学の君羅好史助教に依頼して peripheral Quantitative CT (pQCT) (LaTheta LCT-100; ALOKA, Tokyo, Japan) による骨密度 (Bone mineral density; BMD) の測定を行った。

2-12 血中骨代謝パラメーター測定

解剖時に回収した血漿を用いて血中骨代謝パラメーター測定を行った。ALP 活性は Labo assay™ ALP (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 活性は TRACP & ALP Assay Kit (Takara Bio inc.) を使用し、各製品プロトコルに従って測定を行った。

2-13 統計解析

各データは平均値±標準誤差で表した。統計には Bell Curve Excel 統計

(Social Survey Research Information Co.) を使用した。2 群の検定では Kolmogorov–Smirnov test 検定による正規性の検定と F 検定によって等分散性確認し、分散が等しいものはスチューデントの T 検定により、分散が等しくないものはウェルチの T 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。また、正規分布でないと判断されたものはマンホイットニ検定により、5%または 1%以下の危険率で有意差の有無を判定した。3 群以上の検定では Kolmogorov–Smirnov test 検定による正規性の検定と Bartlett's test による等分散性の検定を行った後、正規性および等分散性が認められた場合は Dunnett の多重比較検定、認められない場合は Steel の多重比較検定を行い、5%または 1%以下の危険率で control 群と各群のデータの比較を行った。また、YMO 投与群は用量依存性を調べるため、Williams または Shirley Williams の検定を行った。

3. 結果

3-1 YMO 中の脂肪酸組成の解析

ガスクロマトグラフィーによる YMO および YMO 加水分解物中の脂肪酸解析の結果、エルカ酸が最も多く約 37%存在し、次いでオレイン酸、エイコセン酸、リノレン酸などが含まれていることが判明した (Table 12, 13)。

Table 12 YMO の脂肪酸組成

脂肪酸		割合
C16:0	パルミチン酸	2.61%
C18:0	ステアリン酸	1.05%
C18:1	オレイン酸	24.35%
C18:2	リノール酸	8.92%
C18:3 n3	リノレン酸	10.49%
C20:1	エイコセン酸	10.88%
C22:1	エルカ酸	36.97%
Other	-	4.73%

Table 13 YMO 加水分解物の脂肪酸組成

脂肪酸		割合
C16:0	パルミチン酸	2.55%
C18:0	ステアリン酸	1.04%
C18:1	オレイン酸	24.36%
C18:2	リノール酸	8.95%
C18:3 n3	リノレン酸	10.61%
C20:1	エイコセン酸	10.87%
C22:1	エルカ酸	36.89%
Other	-	4.73%

3-2 YMO が PPAR γ 転写活性と間葉系幹細胞分化に及ぼす影響

はじめにルシフェラーゼレポーターアッセイにより YMO が PPAR γ 転写活性に及ぼす影響を調べた。その結果、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YMO と 5 μM GW9662 添加によって PPAR γ 転写活性はそれぞれ有意に抑制された (Fig. 14A)。また、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは YMO の添加濃度依存的に PPAR γ 転写活性が抑制されたが、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では PPAR γ 転写活性が増加し、V 字のグラフを描いた。PPAR γ 転写活性の抑制によって間葉系幹細胞の分化が調節されることが報告されていることから (13)、次に、YMO が間葉系幹細胞分化に及ぼす影響を調べた。その結果、いずれの YMO 添加濃度においても Oil Red O 陽性脂肪細胞数の有意な減少 (Fig. 14B) および ALP 陽性骨芽細胞数の有意な増加が観察された (Fig. 14C)。しかし、Oil Red O 陽性脂肪細胞数は 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは YMO の添加濃度依存的に減少し、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度依存的に増加した (Fig. 14B)。ALP 陽性骨芽細胞数では 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは YMO の添加濃度依存的に増加し、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度依存的に減少していた (Fig. 14C)。

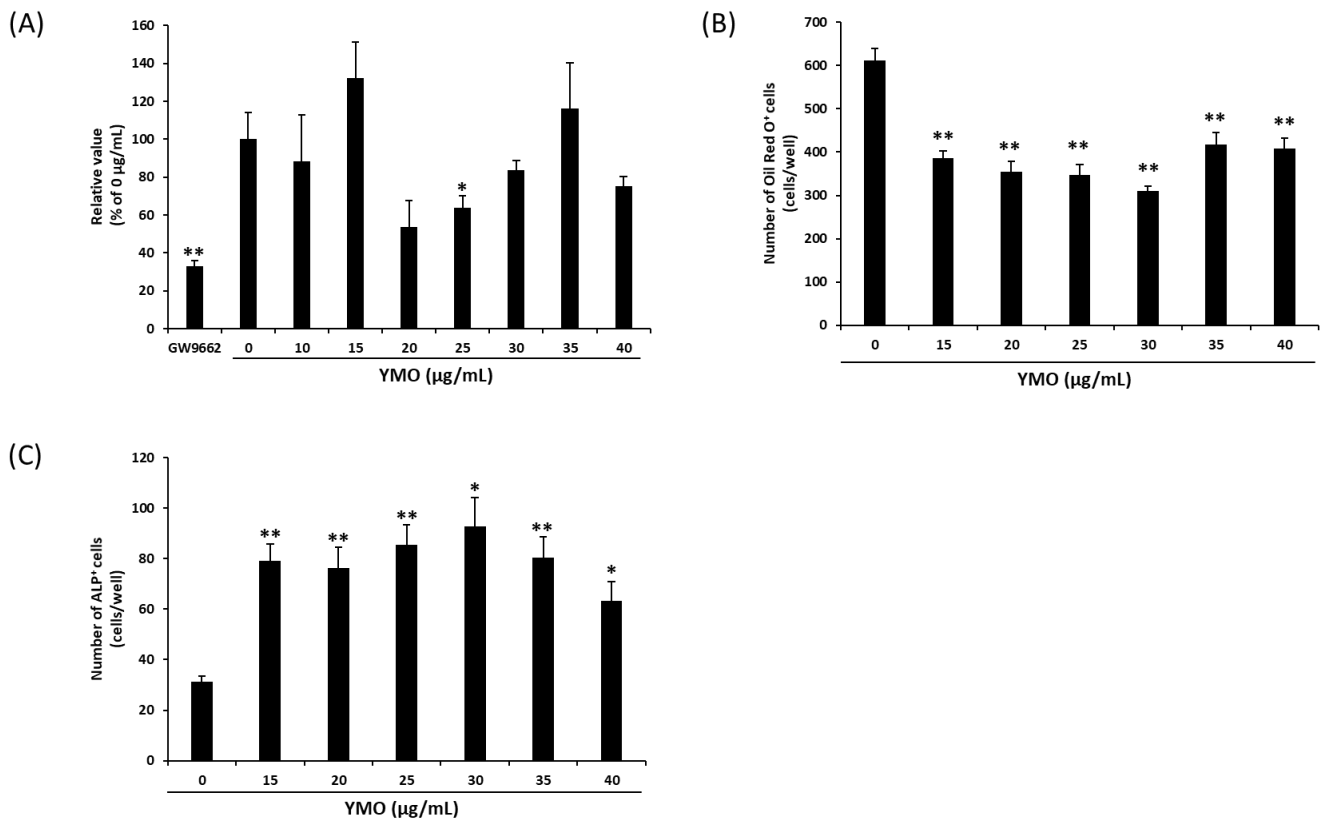


Fig. 14 YMO が PPAR γ 転写活性と C3H10T/2 細胞の分化に及ぼす影響

(A) 0-40 $\mu\text{g/mL}$ YMO が PPAR γ 転写活性に及ぼす影響、(B, C) 0-40 $\mu\text{g/mL}$ YMO が C3H10T/2 細胞の分化に及ぼす影響、Oil Red O⁺細胞数 (B)、ALP⁺細胞数 (C) は光学顕微鏡下で計測を行った。Values are mean \pm SE, n=4-5. ** P < 0.01, * P < 0.05 vs 0 $\mu\text{g/mL}$

次に、YMO による脂肪細胞への分化抑制、骨芽細胞への分化促進作用の分子メカニズムを調べるため、脂肪細胞分化マーカー遺伝子と骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を Real time PCR を用いて測定した。25 $\mu\text{g/mL}$ の YMO 添加により、PPAR γ mRNA 発現は day 12 と 14 において有意に抑制された (Fig. 15A)。しかし、PPAR γ の標的遺伝子で脂肪細胞マーカーである *aP2* と *LPL* の mRNA 発現は PPAR γ の発現が抑制されるより前の分化段階から YMO による

抑制が認められた (Fig. 15B, C)。一方で骨芽細胞分化マーカー遺伝子に関しては、*Runx2* や *Osterix* といった転写因子の mRNA 発現には YMO による影響が見られなかったものの (Fig. 15D, E)、その標的遺伝子である *ALP* と *Col1* mRNA は YMO によって有意に発現が促進されていた (Fig 15F, G)。

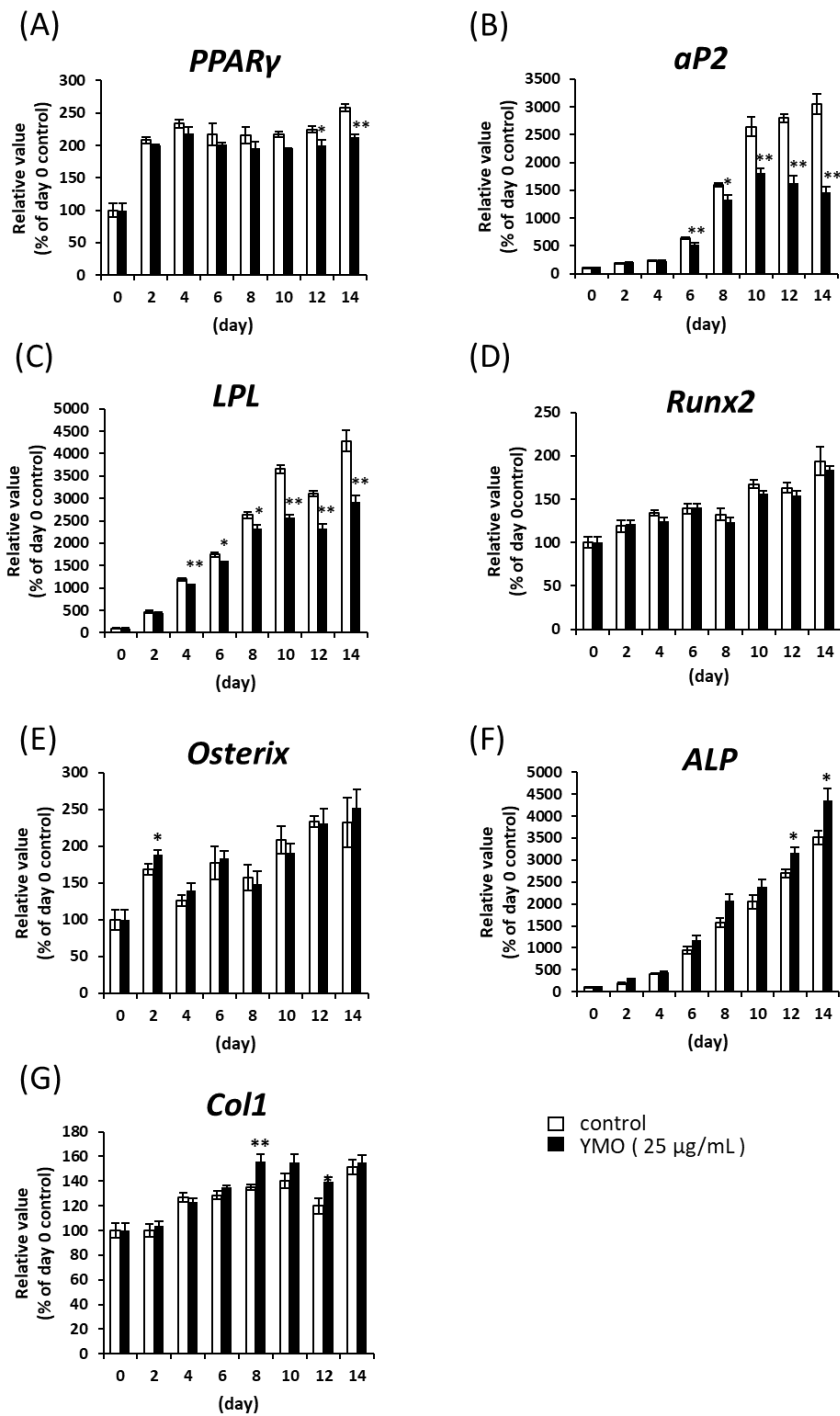


Fig. 15 YMO が脂肪細胞および骨芽細胞分化マーカー発現に及ぼす影響
 C3H10T/2 細胞にエタノール (control) または YMO (25 µg/mL) を添加し、14 日間培養した。脂肪細胞分化マーカーの発現 (A-C)、骨芽細胞分化マーカーの発現 (D-G) は Real time PCR を用いて測定し、day 0 の control に対する相対値 (%) を求めた。Values are mean \pm SE, n=4-5. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs each day control

3-3 YMO の KK-A γ マウスにおける抗肥満効果

PPAR γ アンタゴニストは高脂肪食誘導性肥満を抑制することが報告されている (22, 61)。本研究では YMO 投与による肥満への影響を調べるため、肥満・糖尿病モデルである KK-A γ マウスを使用した。その結果、3.5% YMO 投与によって体重および皮下脂肪組織重量の増加が有意に抑制された (Table 14)。また、7.0% YMO 投与により腎臓周囲脂肪組織重量の増加が有意に抑制され (Table 14)、PPAR γ の mRNA 発現には有意な差が見られなかったものの PPAR γ の標的遺伝子である *aP2* と *LPL* の mRNA 発現が有意に抑制されていた (Fig. 16)。しかしながら、GW9662 による体重、脂肪組織重量、脂肪細胞分化マーカー遺伝子発現への影響は見られなかった (Table 14, Fig. 16)。

Table 14 体重・白色脂肪組織重量

	control	GW9662	1.0% YMO	3.5% YMO	7.0% YMO
Final body weight (g)	42.29 \pm 0.70	40.16 \pm 0.95	41.98 \pm 1.36	39.59 \pm 0.68*	41.41 \pm 0.84
Subcutaneous adipose tissue (g)	1.62 \pm 0.08	1.41 \pm 0.05	1.63 \pm 0.10	1.21 \pm 0.10*	1.47 \pm 0.07
Perirenal adipose tissue (g)	0.91 \pm 0.09	0.94 \pm 0.07	0.88 \pm 0.10	0.66 \pm 0.06	0.59 \pm 0.08*
Mesenteric adipose tissue (g)	1.09 \pm 0.04	0.99 \pm 0.05	1.21 \pm 0.03	0.96 \pm 0.06	1.12 \pm 0.05
Epididymal adipose tissue (g)	1.04 \pm 0.04	0.98 \pm 0.03	1.03 \pm 0.03	0.96 \pm 0.04	1.05 \pm 0.06

Values are mean \pm SE, n=10-11. * P < 0.05 vs control

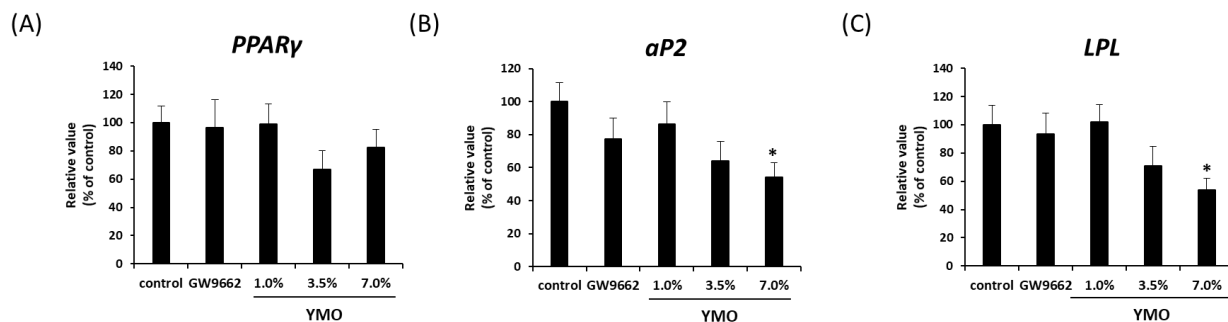


Fig. 16 YMO が KK-A γ マウスの腎臓周囲脂肪組織において脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現に及ぼす影響

遺伝子発現解析には飼育開始 16 週間後に回収した腎臓周囲脂肪組織を用いた。*PPAR γ* (A)、*aP2* (B)、*LPL* (C) の mRNA 発現量を Real time PCR を用いて測定し、control 群の値に対する相対値 (%) で表した。Values are mean \pm SE, n=10-11. * $P < 0.05$ vs control

3-4 YMO の KK-A γ マウスにおける抗糖尿病効果

YMO 投与による肥満に伴う糖尿病への影響を調べるため、経口糖負荷試験を実施した (Fig. 17)。その結果、血漿中グルコース濃度は control 群と比較して GW9662 群は 0, 15, 30, 60, 120 分の全地点において有意に低値を示し (Fig. 17A)、血漿中グルコース濃度曲線下面積も有意に低下していた (Fig. 17B)。YMO 投与群では 7.0% YMO 群が 0 分において有意に低値を示し、その他の地点においても有意ではないが control 群と比較して低い値を示した (Fig. 17A)。YMO 投与による血漿中グルコース濃度曲線下面積には影響は認められなかったものの、YMO 濃度依存的に低下傾向を示した (Fig. 17B)。また、血漿中インスリン濃度は GW9662 群と 7.0% YMO 群が 15 分において有意に低値を示した (Fig. 17C)。血漿中インスリン濃度曲線下面積は GW9662 群および 3.5%、7.0%

YMO 群において有意に低下していた (Fig. 17D)。さらに、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR が GW9662 と 7.0% YMO 群において有意に低下し (Fig. 17E)、インスリン感受性の指標である QUICKI が有意に増加していた (Fig. 17F)。これらの結果から、GW9662 と YMO はインスリン感受性を亢進することが示唆された。

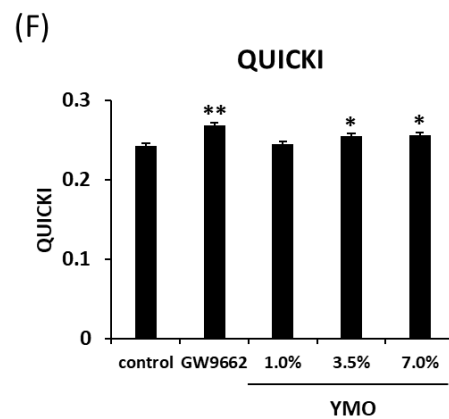
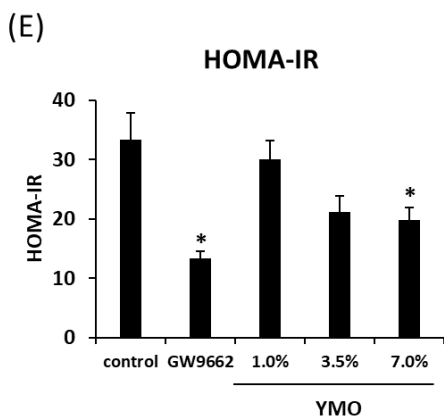
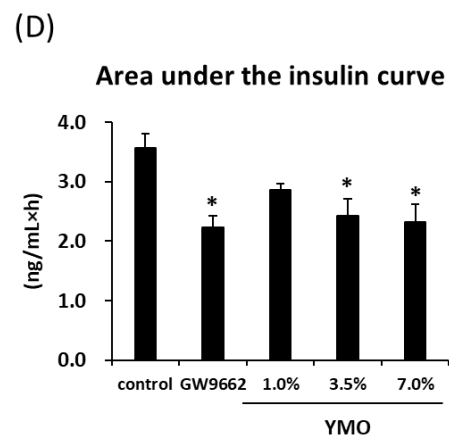
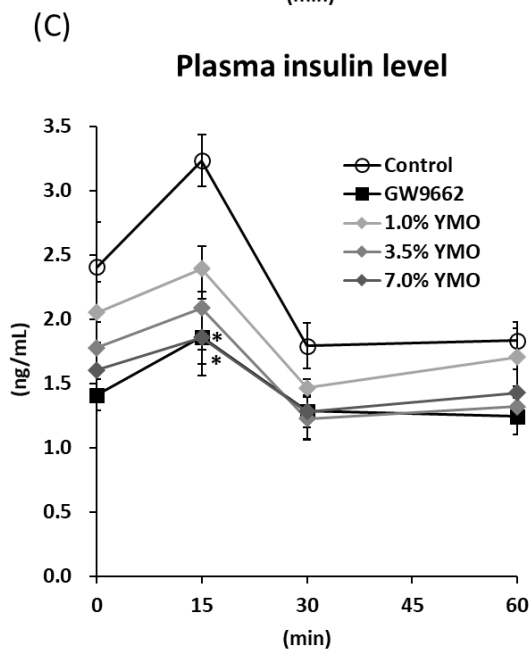
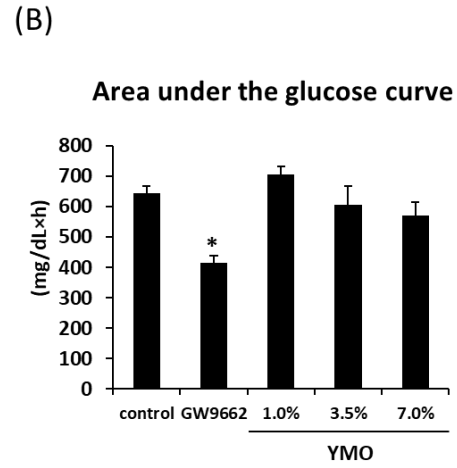
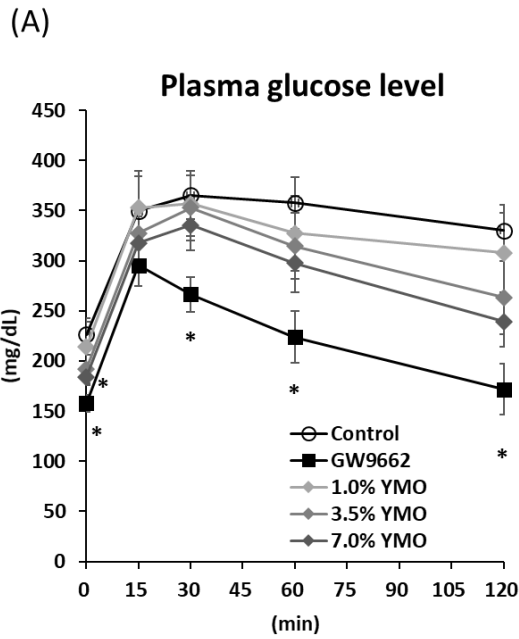


Fig. 17 YMO が KK-A^y マウスの経口糖負荷試験における血漿中グルコース及びインスリン濃度に及ぼす影響

経口糖負荷試験は 15 週目に実施し、血漿中グルコース濃度変化 (A)、血漿中グルコース濃度変化の曲線下面積 (B)、血漿中インスリン濃度変化 (C)、血漿中インスリン濃度変化の曲線下面積 (D) を求めた。インスリン抵抗性の指標として Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) (E)、インスリン感受性の指標として Quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) (F) を求めた。Values are mean \pm SE, n=7-10 (A and C) and n=5-7 (B, D, E, and F). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control.

肥満によって誘導されるインスリン抵抗性には脂肪組織における脂肪細胞の肥大化や炎症が関与することが知られている (63, 64)。脂肪細胞は肥大化すると monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を産生し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を促進する (63)。マクロファージには炎症性の M1 型マクロファージと抗炎症性の M2 型マクロファージが存在し、脂肪組織炎症が誘導されると M1 型マクロファージが増加し (65)、M2 型マクロファージが減少することが報告されている (66)。そこで、YMO によるインスリン感受性向上のメカニズムを調べるため、腎臓周囲脂肪組織の組織化学的解析を行った。GW9662 および YMO によって脂肪細胞サイズや数には影響が見られなかったが (Fig. 18A-C)、脂肪細胞を取り囲む免疫細胞の集合体である crown-like structure (CLS) (67) 面積 (Fig. 18A, D) およびマウスマクロファージに共通の表面抗原である F4/80 (65) 陽性面積 (Fig. 18A, E) が有意に減少していた。また、M1 型マクロファージマーカーである CD11c 陽性面積 (Fig. 18A, F) と

M2型マクロファージマーカーである CD206 陽性面積 (Fig. 18A, G) も同様に有意に減少していた。一方で CD206⁺/CD11c⁺比は GW9662 と YMO によって増加していた (Fig. 18H)。mRNA 発現解析において GW9662 と YMO 投与群において腎臓周囲脂肪組織における *F4/80* およびマクロファージの脂肪細胞への浸潤を促進する *MCP-1* 発現には影響が見られなかったものの (Fig. 19A, B)、M1型マクロファージマーカーである *CD11c*、*Interleukin-1β* (*IL-1β*)、*Tumor Necrosis Factor-α* (*TNF-α*) (Fig. 19C-E) と M2型マクロファージマーカーである *CD206* (Fig. 19F) は有意に減少していた。YMO は M2 マクロファージマーカーである *Ym1* mRNA 発現も有意に抑制したものの (Fig. 19G)、*arginase-1* (*Arg1*) mRNA 発現には影響を与えなかった (Fig. 19H)。

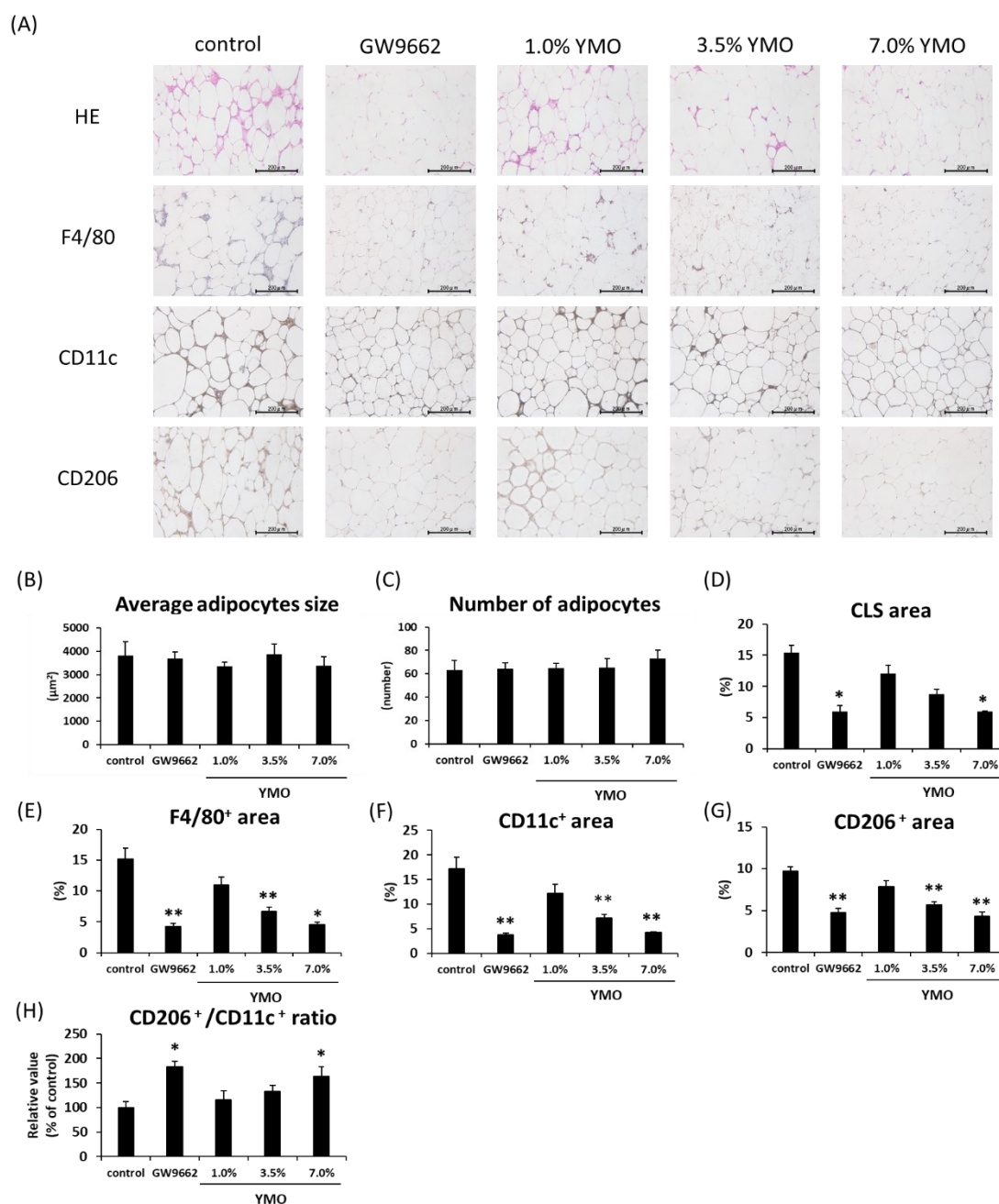


Fig. 18 YMO が KK-A^y マウスの脂肪組織におけるマクロファージ浸潤に及ぼす影響
飼育開始 16 週間後に KK-A^y マウスから回収した腎臓周囲脂肪組織を用いてパラフィン切片を作成し、HE 染色、F4/80、CD11c、CD206 抗体を用いた免疫染色を行った。(A) HE 染色および免疫染色後の組織化学的解析の画像、(B) 平均脂肪細胞サイズ、(C) 脂肪細胞数、(D) Crown like structure (CLS)、(E) F4/80⁺面積、(F) CD11c⁺面積、(G) CD206⁺面積、(H) CD206⁺/CD11c⁺面積比 Values are mean \pm SE, n=7. ** P < 0.01, * P < 0.05 vs control

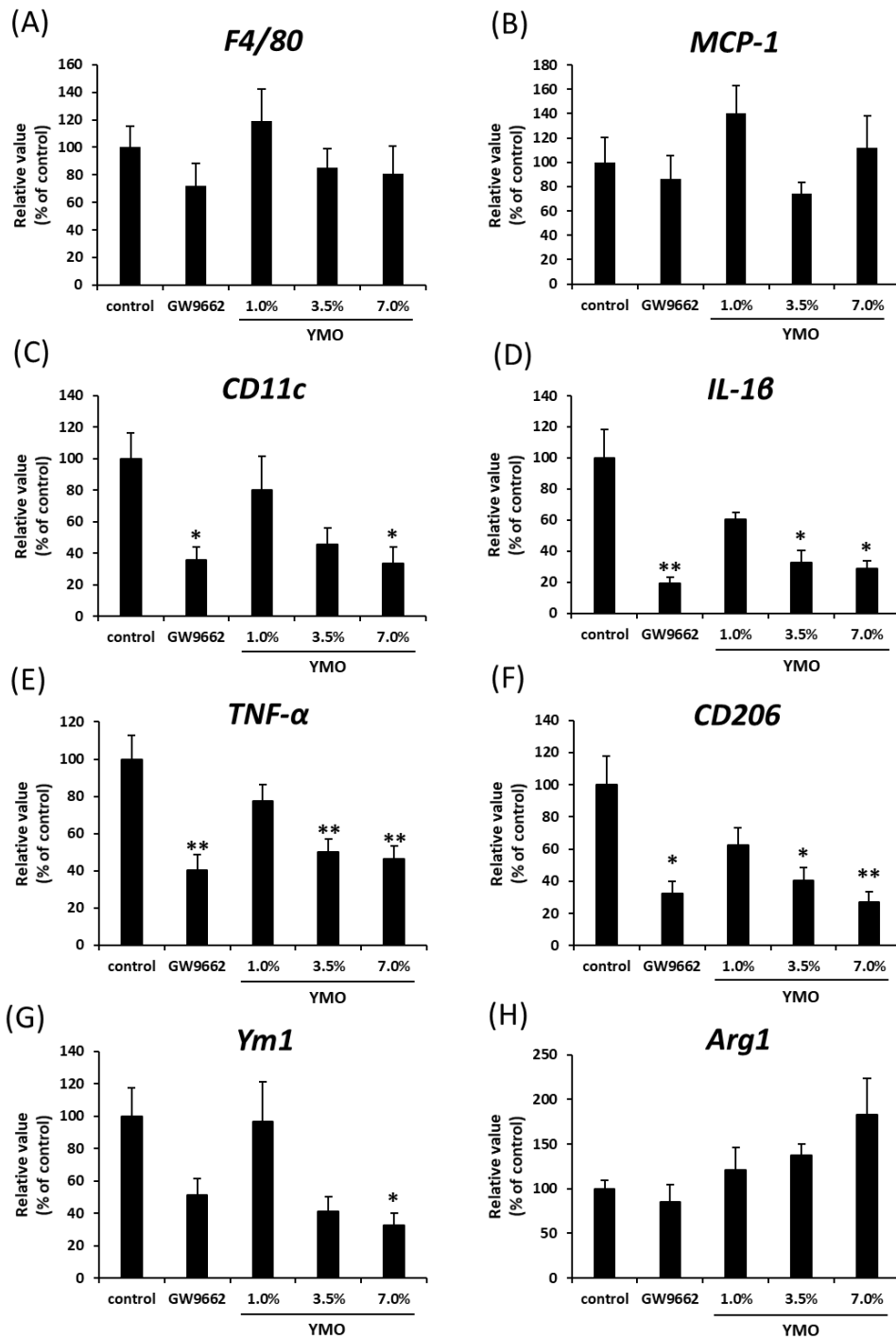


Fig. 19 YMO が KK-Ay マウスの腎臓周囲脂肪組織におけるマクロファージマーカー遺伝子発現に及ぼす影響

F4/80 (A)、 *MCP-1* (B)、 M1 型マクロファージマーカー (C-E)、 M2 型マクロファージマーカー (F-H) 発現は Fig. 16 と同様の手順で求めた。 Values are mean \pm SE, n=10-11.

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control.

3-5 YMO の KK-A^y マウスにおける抗糖尿病効果

3-2 の細胞実験において YMO は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制したことから、動物においても骨芽細胞による骨形成を促進し、骨量を増加する可能性が示唆された。過去に KK-A^y マウスにおいて肥満と糖尿病が進行することにより BMD が減少することが報告されている (60)。本実験において右大腿骨 BMD を測定したところ、GW9662 群では影響が認められなかったにも関わらず、7.0% YMO 投与群において全骨密度 (Fig. 20A)、皮質骨密度 (Fig. 20B)、海綿骨密度 (Fig. 20C) の有意な増加が認められた。また、左大腿骨においても同様の結果が得られた (Fig. 20D-F)。さらに、血漿中の骨形成パラメーターである ALP 活性を測定したところ、YMO 7.0%投与群において有意に増加していた (Fig. 20G)。一方で骨吸収マーカーである TRAP 活性には GW9662 および YMO 投与による影響は見られなかった (Fig. 20H)。

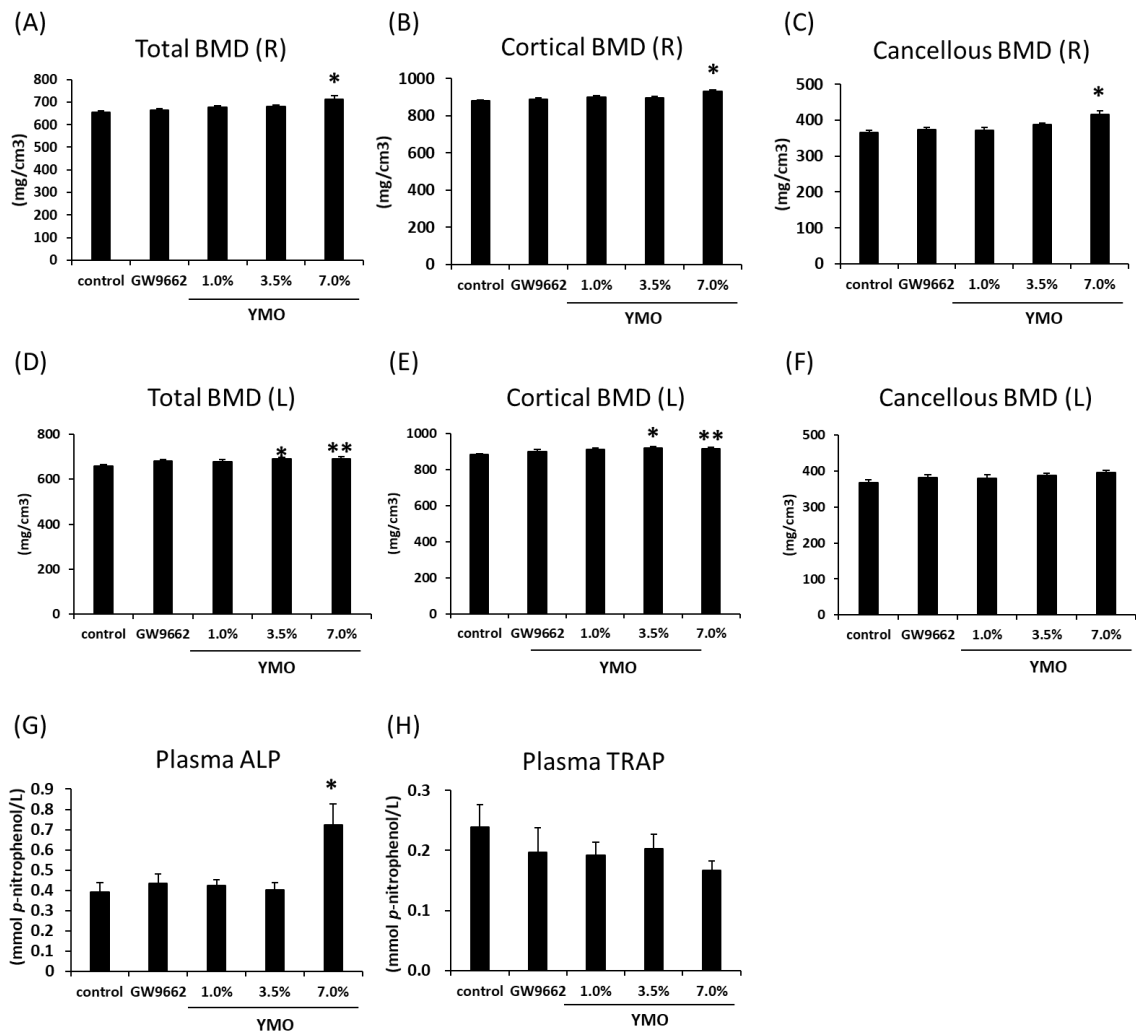


Fig. 20 YMO が KK-Ay マウスの大腿骨骨密度、血中骨代謝マーカに及ぼす影響
飼育開始 16 週後に KK-Ay マウスの右大腿骨を回収した。pQCT により全骨密度 (A)、皮質骨密度 (B)、海綿骨密度 (C) を測定した。同様に左大腿骨の全骨密度 (D)、皮質骨密度 (E)、海綿骨密度 (F) を測定した。血漿中 ALP 活性 (G) と TRAP 活性 (H) は方法 2-12 に従い行った。Values are mean \pm SE, n=9-11. * $P < 0.05$ vs control.

4. 考察

脂肪組織は全身の糖代謝調節において重要な役割を果たしている。これまでに、合成 (68, 69) および天然 (70, 71) の PPAR γ アゴニストによってインスリン感受性の高い小型脂肪細胞への分化促進を介した糖代謝機能の改善効果が多数報告されている。一方で PPAR $\gamma^{+/+}$ マウスや PPAR γ 活性抑制剤による脂肪細胞数の増加を伴わないインスリン感受性の亢進効果も報告されている (22, 53, 72)。しかしながら、PPAR γ 活性抑制作用を示す天然物に関する報告は少ない (45, 46)。

第 II 章において PPAR γ 転写活性の抑制作用を有する天然由来成分としてエルカ酸を見出した。生体内でのエルカ酸の機能性を解明するため、本章ではエルカ酸高含有 YMO を用いた実験を行った。YMO および YMO 加水分解物中にはエルカ酸が約 37%含まれている (Table 12, 13)。PPAR γ 転写活性を有意に抑制した 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の YMO 加水分解物中にはエルカ酸が 27.24 μM 含まれており、このエルカ酸濃度は第 II 章 3-5 で示したエルカ酸標品の実験において有意に PPAR γ 転写活性を抑制した濃度 (25 μM) と類似していた (Fig. 10)。また、これらの YMO による効果は 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において低下した。この傾向は第 II 章のエルカ酸標品を用いた実験の結果と同様であり、エルカ酸の濃度に応じた構造変化に伴う生体利用性の変化に起因すると考えられる (50)。

YMO を KK-A^y マウスに投与した結果、脂肪組織重量の低下およびインスリン感受性の亢進が認められた。また、脂肪組織の解析により、YMO は脂肪細胞数や脂肪細胞サイズに影響を与えずに、PPAR γ の標的遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。これらの結果により、YMO は PPAR γ 活性の抑制による脂肪細胞分化抑制を介してインスリン感受性を亢進したことが示唆された。一方で GW9662 は、OGTT において血漿中グルコースレベルを YMO よりも強力に低下させたが、体重や脂肪組織重量の有意な減少はもたらさなかった。C57/BL6J マウスを使用した過去の研究では 0.1% の GW9662 投与が抗肥満作用を示すことが報告されている (22)。したがって、本実験において GW9662 投与によって抗肥満作用が認められなかったのは、GW9662 投与濃度が 0.005% と低かったことが原因であると考えられた。

肥満によって誘導されるインスリン抵抗性は脂肪組織へのマクロファージの浸潤が関与している (63)。肥満動物では肥大化脂肪細胞より細胞遊走作用のある MCP-1 が分泌されることで脂肪組織へのマクロファージ浸潤が誘導される。脂肪細胞へと浸潤したマクロファージは過剰な MCP-1 や炎症性サイトカインを分泌し、さらなる炎症とインスリン抵抗性を誘導する (64)。また、肥満状態は脂肪組織におけるマクロファージ表現型の変化も誘導することが知られている。M1 型マクロファージは高脂肪食摂取に伴う肥満によって増加し、TNF- α

などの炎症性サイトカイン分泌を介してインスリン抵抗性を誘導する (65)。一方で M2 型マクロファージは非肥満動物の脂肪組織に多く存在し、抗炎症性のサイトカインを分泌する (66)。GW9662 はヒトのマクロファージや LPS 誘導性炎症モデルマウスにおいて M1 型マクロファージマーカーの発現を抑制することが報告されている (73)。本実験では YMO と GW9662 はいずれも、CLS (67) の面積および F4/80 (66) 陽性面積を減少させた。また、YMO と GW9662 はいずれも、M1 型特異的マーカーである CD11c も M2 型特異的マーカーである CD206 も、その遺伝子発現および陽性面積を減少させた。しかし、M2/M1 比は YMO と GW9662 投与によって有意に増加していた。このことから、YMO と GW9662 はマクロファージの脂肪組織への浸潤抑制と M2/M1 比の増加を介してインスリン感受性を亢進したことが示唆された。また、PPAR γ のリガンドによるインスリン感受性の亢進には古典的なアゴニストとしての作用のみならず、cyclin-dependent kinase (CDK) 5 による PPAR γ の Ser²⁷³ のリン酸化の抑制 (74, 75, 76) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 転写活性の抑制を介して抗炎症作用を示すことが報告されている (77)。PPAR γ アンタゴニストである Gleevec においても PPAR γ の Ser²⁷³ のリン酸化や NF- κ B 転写活性の抑制による抗炎症作用が報告されている (78)。これらの報告より、本章において YMO と GW9662 は Gleevec と同様に Ser²⁷³ のリン酸化や NF- κ B 転写活性の抑制を

介して脂肪組織炎症を抑制した可能性がある。

ヒトにおいて、2型糖尿病患者には骨粗鬆症を合併する患者が多いことが知られている (79)。また、肥満・糖尿病状態にある KK-A^y マウスでは健康な状態の C57BL/6J マウスと比較して骨密度が低く、血中の骨形成マーカー濃度も低いことが報告されている (60)。さらに、*in vitro* において高血糖条件下では骨芽細胞の生存率や石灰化が抑制されることが報告されている (80, 81)。したがって、糖尿病の改善は骨芽細胞機能の改善にもつながる可能性がある。さらに、本実験において YMO が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進したことから、YMO は KK-A^y マウスにおいて糖尿病の改善もしくは骨芽細胞分化を直接促進することによって、骨密度を増加しうると予想した。実験の結果、7.0% YMO 投与によって大腿骨骨密度が有意に増加し、血中骨吸収パラメーターである TRAP 活性には影響がなかったものの、血中骨形成マーカーである ALP 活性は有意に増加した。一方で、合成 PPAR_γ アンタゴニストである GW9662 は KK-A^y マウスの骨密度および血中骨代謝パラメーターには影響を与えなかった。これらの結果より、YMO は破骨細胞ではなく、直接、骨芽細胞分化や骨形成に作用し、糖尿病による骨密度低下を抑制した可能性が高いと考えられた。Beekman ら (82) は、GW9662 投与は卵巣摘出マウスにおける骨量減少に影響を与えないことを報告している。卵巣摘出モデルは閉経後の女性に多く見られる高回転型骨粗鬆

症であり (83)、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を著しく上回る
ことによって骨量減少が引き起こされる。一方で本実験のような糖尿病動物に
おいて引き起こされる骨粗鬆症は低回転型骨粗鬆症であり、骨形成と骨吸収の
両方が正常よりも減少することによって引き起こされる (84)。したがって、骨
芽細胞による骨形成を活性化する成分は、高回転型骨粗鬆症に影響がなくても、
糖尿病モデルのような低回転型骨粗鬆症には効果を発揮する可能性がある。
YMO による骨密度の増加メカニズムを明らかにするためには、今後 GW9662
をより高濃度で投与し、GW9662 と YMO 投与による骨への影響の違いについ
てより詳しく調べる必要がある。

本章では、エルカ酸高含有 YMO が PPAR γ の転写活性抑制を介して脂肪組織
炎症とインスリン抵抗性を改善することを示した。さらに YMO は糖尿病動物
において骨形成の促進を介して骨密度を増加させることを明らかにした。これ
らの結果から、YMO は肥満および糖・骨代謝異常の改善に貢献することが示唆
された。

IV. 総合考察

現在、骨粗鬆症の治療には合成薬やホルモン剤が用いられているが、様々な副作用が報告されており (85, 86)、副作用の起こりにくい天然由来の治療薬が求められている。PPAR γ は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を抑制し、脂肪細胞への分化を促進することが知られている (17)。PPAR γ アゴニストは脂肪細胞分化の促進により、インスリン感受性の高い小型脂肪細胞を増やす作用を有するため、2型糖尿病の治療薬として用いられているが (68, 69)、副作用として肥満や骨量減少が誘導されることが知られている (20, 21)。糖代謝における PPAR γ の作用に関する研究が盛んであった 2005 年、PPAR γ 欠損動物に高脂肪食を与える実験が行われた。PPAR γ 欠損は野生型と比較して糖代謝機能が低下すると予想されたものの、実際には標準食摂取と同等の糖代謝機能が維持され、同時に肥満の誘導も抑制された (54)。さらに、PPAR γ のアンタゴニスト投与では、インスリン感受性が亢進し糖代謝異常が改善されるだけでなく、肥満の改善や骨量増加も認められることが報告されている (22, 60)。これらのことから、PPAR γ アンタゴニストは肥満・糖尿病・骨粗鬆症の同時予防効果を発揮する可能性が期待された。しかしながら、これまで食品中より PPAR γ アゴニストは多数見出されているものの (69, 70)、PPAR γ アンタゴニストの報告は少なかった (45, 46)。そこで本研究では、長い食経験を有し、民間薬としても使用され、様々な機能性が報告されている香辛料を用いて、新規 PPAR γ アンタゴニストの

探索とその生理機能の解明を試みた。

第II章では45種類の香辛料を用いて PPAR γ アンタゴニストのスクリーニングを行い、セロリシード、白胡椒、スペアミント、セージ、メース、ローズマリーの6種類の香辛料が PPAR γ 活性の抑制効果を示すことを明らかにした。中でも効果の高かったローズマリーを用いて PPAR γ アンタゴニストの探索を行った結果、新規 PPAR γ アンタゴニスト候補としてモノ不飽和脂肪酸のエルカ酸を見出した。さらにエルカ酸が間葉系幹細胞において PPAR γ 転写活性の抑制を介して骨芽細胞分化の促進および脂肪細胞分化の抑制作用を示すことを明らかにし、エルカ酸は肥満および骨粗鬆症の同時予防に有用である可能性が示唆された。

第III章では第II章で見出した新規 PPAR γ アンタゴニスト候補であるエルカ酸を豊富に含む YMO を用いた機能性評価を行った。YMO はエルカ酸標品と同様に間葉系幹細胞において PPAR γ 転写活性の抑制を介して間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制した。さらに、肥満・糖尿病モデルである KK-A y マウスに YMO を投与したところ、脂肪蓄積の抑制および脂肪組織炎症抑制を介したインスリン感受性の亢進が認められ、大腿骨骨密度が増加した。これらのことから、エルカ酸高含有 YMO は肥満・糖尿病・骨粗鬆症を同時に改善することが示された。YMO 中にはエルカ酸以外の脂肪酸も 63%

含有されているものの、第III章において PPAR γ 転写活性の抑制および間葉系幹細胞分化において有効性を示した YMO 中のエルカ酸濃度が、第II章で有効性を示したエルカ酸標品の濃度と類似していたことから、YMO 中の他の脂肪酸はエルカ酸による PPAR γ 転写活性の抑制作用に影響を与えないと考えられる。したがって YMO 投与によって認められた肥満・糖尿病・骨粗鬆症の改善効果は、YMO 中のエルカ酸によるものである可能性が非常に高いと考えられる。

本研究においてエルカ酸は PPAR γ 転写活性を抑制したが、それが真に PPAR γ アンタゴニストとしての作用であるかは不明である。今後は、エルカ酸と PPAR γ の結合の有無を競合結合アッセイ (87) や NMR を使用した結晶構造解析 (88) によって明らかにする必要がある。また、PPAR γ のリガンド結合部位は他のリガンド結合部位と比較して大きく (89, 90)、類似の化合物が同様の働きを示すことが報告されており、中でも脂肪酸の大部分は PPAR γ アゴニストとして働くことが知られている (91-94)。しかしながら、本研究においてエルカ酸は PPAR γ アゴニストである他の脂肪酸と構造が類似しているにも関わらず PPAR γ 転写活性を抑制した。このように逆の作用を示した理由として、エルカ酸と他の脂肪酸における炭素鎖長や不飽和度などの僅かな構造の違いによる結合様式の変化が考えられる。今後エルカ酸と構造の類似した脂肪酸の PPAR γ への結合様式と転写活性調節能力を比較し、その関係性を明らかにすることによって、新規

PPAR γ アンタゴニストの探索が容易になることや PPAR γ 転写活性の調節を介した治療法の発展が期待される。

本研究により、食品由来の新規 PPAR γ アンタゴニスト候補が同定され、肥満・糖尿病・骨粗鬆症の同時改善の可能性が提示された。今後、本研究成果がヒトにおける肥満・糖尿病・骨粗鬆症の同時予防・改善に用いられ、人々の健康維持・増進に寄与することを期待したい。

V. 謝辭

本論文を終えるにあたり、終始指導してくださった江頭祐嘉合教授ならびに平井静准教授、ご多忙のなか主査および副査をお引き受けくださった土肥博史准教授、天知誠吾教授、小川幸春准教授、日々の研究室生活を支えてくださった食品栄養学研究室の皆様へ深く御礼申し上げます。また、実験において土肥博史准教授には LC-MS・NMR 解析だけでなく、成分分離の条件検討の相談にもものっただき大変お世話になりました。さらに、レポーターベクターを譲渡していただいた京都大学の河田照雄教授、骨構造解析を行っていただいた城西大学の君羅好史助教、香辛料サンプルを提供していただいたハウス食品グループ本社株式会社様、YMO の提供・脂肪酸解析をしていただいたキューピー株式会社様に心より感謝を申し上げます。

IV. 参考文献

1. United Nations. World Population Prospects 2019. <https://population.un.org/wpp> (2020.10.04 閲覧)
2. 内閣府. 令和元年度高齢社会白書
3. 日本整形外科学会. 新概念「ロコモティブシンドローム (運動器症候群)」. <https://www.joa.or.jp/public/locomo/index.html> (2020.10.04 閲覧)
4. World Health Organization. Prevention and Management of Osteoporosis. WHO Technical Report Series, 2013, No 921.
5. 日本骨粗鬆症学会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年度版
6. 厚生労働省. 平成 29 年度国民健康・栄養調査
7. 厚生労働省. 平成 30 年度人口動態統計
8. 厚生労働省. e-ヘルスネット メタボリックシンドローム. <https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/metabolic> (2020.10.04 閲覧)
9. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res.*, 1971, 80, 147-154.
10. Vanella L, Sanford C jr, Kim DH, Abraham NG, Ebraheim N. Oxidative Stress and Heme Oxygenase-1 Regulated Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation. *Int j hypertens.*, 2012, Article ID 890671, 10.
11. Dafna B, Irena S, Shamgar B. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem.*, 2000, 79, 407-415.
12. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPAR gamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.*, 2010, 584, 3242-3249.
13. Kageyama H, Hirano T, Okada K, Ebara T, Kageyama A, Murakami T, Shioda S, Adachi M. Lipoprotein lipase mRNA in white adipose tissue but not in skeletal muscle is increased by pioglitazone through PPAR- γ . *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, 305, 22-27.
14. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.*, 1995, 15, 351-357.
15. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.*, 1999, 13, 1025-1036.
16. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 148, 17-29.

17. David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor γ in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*, 2007, 148, 2553-2562.
18. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.*, 2004, 113, 846-855.
19. Picard F, Auwerx J. PPAR γ and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr.*, 2002, 22, 167-197.
20. Sottile V, Seuwen K, Kneissel M. Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPAR γ agonist BRL49653 (rosiglitazone). *Calcif Tissue Int.*, 2004, 75, 329-337.
21. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*, 2005, 146, 226-235.
22. Nakano R, Kurosaki E, Yoshida S, Yokono M, Shimaya A, Maruyama T, Shibasaki M. Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma prevents high-fat diet-induced obesity in vivo. *Biochem Pharmacol.*, 2006, 72, 42-52.
23. Gu Q, Cai Y, Huang C, Shi Q, Yang H. Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacogn Mag.*, 2012, 8, 202-208.
24. 鰐淵彩花. 肥満および骨粗鬆症予防作用を有する香辛料由来成分の探索. 平成 25 年度千葉大学園芸学部卒業論文
25. 鈴木祐介. アスタキサンチンによる間葉系幹細胞の分化調節に関する研究. 平成 24 年度千葉大学園芸学部卒業論文
26. 厚生労働省. 食品衛生法等の一部を改正する法律による改正後の食品衛生法第 11 条第 3 項の施行に伴う関係法令の整備について
27. Rubió L, Motilva MJ, Romero MP. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2013, 53, 943-953.
28. Opara EI, Chohan M. Culinary herbs and spices: their bioactive properties, the contribution of polyphenols and the challenges in deducing their true health benefits. *Int J Mol Sci.*, 2014, 15, 19183-19202.
29. Isa Y, Miyakawa Y, Yanagisawa M, Goto T, Kang MS, Kawada T, Morimitsu Y, Kubota K, Tsuda T. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF- α

- mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2008, 373, 429-434.
30. Rau O, Wurglics M, Paulke A, Zitzkowski J, Meindl N, Bock A, Dingermann T, Abdel-Tawab M, Schubert-Zsilavecz M. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Med.*, 2006, 72, 881-887.
 31. Tsukahara T. The Role of PPAR in the Transcriptional Control by Agonists and Antagonists. *PPAR Res.*, 2012, 12, Article ID 362361.
 32. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.*, 1998, 13, 763-773.
 33. Riggs BL, Melton III LJ 3rd, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM, Rouleau PA, McCollough CH, Bouxsein ML, Khosla S. Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.*, 2004, 19, 1945-1954.
 34. Slemenda C, Longcope C, Peacock M, Hui S, Johnston CC. Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *J Clin Invest.*, 1996, 97, 14-21.
 35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 289, 143-147.
 36. Duque G, Li W, Vidal C, Bermeo S, Rivas D, Henderson J. Pharmacological inhibition of PPAR γ increases osteoblastogenesis and bone mass in male C57BL/6 mice. *J Bone Miner Res.*, 2013, 28, 639-648.
 37. De Raadt P, Wirtz S, Vos E, Verhagen H. Short review of extracts of rosemary as a food additive. *Eur J Nutr.*, 2015, 5, 126-137.
 38. 荻野善之. スパイス&ハーブの使いこなし事典. 主婦の友社, 2009.
 39. Farr SA, Niehoff ML, Ceddia MA, Herrlinger KA, Lewis BJ, Feng S, Welleford A, Butterfield DA, Morley JE. Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiol Behav.*, 2016, 15, 328-338.
 40. Ho CT, Wang M, Wei GJ, Huang TC, Huang MT. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors*, 2000, 13, 161-166.
 41. Elbahnasawy AS, Valeeva ER, El-Sayed EM, Rakhimov II. The Impact of Thyme

- and Rosemary on Prevention of Osteoporosis in Rats. *J Nutr Metab.*, 2019, 1431384.
42. Han J, Wang D, Ye L, Li P, Hao W, Chen X, Ma J, Wang B, Shang J, Li D, Zheng Q. Rosmarinic Acid Protects against Inflammation and Cardiomyocyte Apoptosis during Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Front Pharmacol.*, 2017, 8, 456.
 43. Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K, Fushiki T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Lett.*, 2002, 514, 315-322.
 44. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *J Cell Biochem.*, 1999, 74, 57-71.
 45. Kennedy A, Chung S, LaPoint K, Fabiyi O, McIntosh MK. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPAR γ activity in primary cultures of human adipocytes. *J Nutr.*, 2008, 138, 455-461.
 46. Platt ID, El-Sohehy A. Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem.*, 2009, 20, 956-964.
 47. Ishaq M, Razi R, Khan SA. Exploring genotypic variations for improved oil content and healthy fatty acids composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Sci Food Agric.*, 2016, 97, 1924-1930.
 48. Wendlinger C, Hammann S, Vetter W. Various concentrations of erucic acid in mustard oil and mustard. *Food Chem.*, 2014, 153, 393-397.
 49. Ibrahim TA. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules.*, 2012, 17, 11315-11334.
 50. Smith RH, Powell GL. The critical micelle concentration of some physiologically important fatty acyl-coenzyme A's as a function of chain length. *Arch Biochem Biophys.*, 1986, 244, 357-360.
 51. Salans LB, Cushman SW, Weismann RE. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest.*, 1973, 52, 929-941.
 52. Astrup A, Finer N. Redefining Type 2 Diabetes: 'Diabesity' or 'Obesity Dependent Diabetes Mellitus'? *Obes Rev.*, 2000, 1, 57-59.
 53. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K,

- Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest.*, 2001, 108, 1001-1013.
54. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2005, 102, 6207-6212.
 55. Choi SS, Kim ES, Jung JE, Marciano DP, Jo A, Koo JY, Choi SY, Yang YR, Jang HJ, Kim EK, Park J, Kwon HM, Lee IH, Park SB, Myung KJ, Suh PG, Griffin PR, Choi JH. PPAR γ Antagonist Gleevec Improves Insulin Sensitivity and Promotes the Browning of White Adipose Tissue. *Diabetes*, 2016, 65, 829-839.
 56. Ciubota-Rosie C, Macoveanu M, Fernàndez CM, Ramos MJ, Pérez A, Moreno A. *Sinapis alba* seed as a prospective biodiesel source. *Biomass Bioenergy*, 2013, 53, 83-90.
 57. A Correspondent. The Uses of Mustard in Medicine. *Ind Med Gaz.*, 1932, 67, 27-28.
 58. Yabanoglu H, Akbulut S, Karakayali F. Phytocontact Dermatitis due to Mustard Seed Mimicking Burn Injury: Report of a Case. *Case Rep Med.*, 2012, 519215.
 59. Javidfar F, Cheng B. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of erucic acid content and glucosinolate components in yellow mustard (*Sinapis alba* L.). *BMC Plant Biol.*, 2013, 13, 142.
 60. Xu F, Dong Y, Huang X, Li M, Qin L, Ren Y, Guo F, Chen A, Huang S. Decreased osteoclastogenesis, osteoblastogenesis and low bone mass in a mouse model of type 2 diabetes. *Mol Med Rep.*, 2014, 10, 1935-1941.
 61. Takasawa K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Impact of increased PPAR γ activity in adipocytes in vivo on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment. *Endocr J.*, 2008, 55, 767-776.
 62. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.*, 1998, 101, 1354-1361.
 63. Kassem M, Philippe F, Isabelle W. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.*, 2013, 139239.
 64. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant

- protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.*, 2006, 281, 26602-26614.
65. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 2009, 58, 2574-2582.
 66. Hill AA, Reid Bolus W, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol Rev.*, 2014, 262, 134-152.
 67. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.*, 2005, 46, 2347-2355.
 68. Takasawa K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Impact of increased PPAR γ activity in adipocytes in vivo on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment. *Endocr J.*, 2008, 55, 767-776.
 69. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.*, 1998, 101, 1354-1361.
 70. Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR γ transcriptional activity in adipocytes. *J Nutr Biochem.*, 2010, 21, 941-947.
 71. Takahashi N, Goto T, Taimatsu A, Egawa K, Katoh S, Kusudo T, Sakamoto T, Ohyane C, Lee JY, Kim YI, Uemura T, Hirai S, Kawada T. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009, 390, 1372-1376.
 72. Gumbilai V, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Ebihara C, Zhao M, Yamamoto Y, Mashimo T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Fat Mass Reduction With Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance in Heterozygous PPAR γ Mutant Rats. *Diabetes*, 2016, 65, 2954-2965.
 73. Bei Y, Chen J, Zhou F, Huang Y, Jiang N, Tan R, Shen P. BZ-26, a novel GW9662 derivate, attenuated inflammation by inhibiting the differentiation and activation of inflammatory macrophages. *Biomed Pharmacother.*, 2016, 84, 730-739.
 74. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Blüher M, Griffin PR, Spiegelman BM. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature* 2010,

466, 451-456.

75. Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, Kuruvilla DS, Shin Y, He Y, Bruning JB, Marciano DP, Cameron MD, Laznik D, Jurczak MJ, Schürer SC, Vidović D, Shulman GI, Spiegelman BM, Griffin PR. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 2011, 477, 477-481.
76. Banks AS, McAllister FE, Camporez JP, Zushin PJ, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, Shulman GI, Gygi SP, Spiegelman BM. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature* 2015, 517, 391–395.
77. Lu Y, Zhou Q, Zhong F, Guo S, Hao X, Li C, Wang W, Chen N. 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 Modulates Lipopolysaccharide-Induced Chemokine Expression by Blocking Nuclear Factor- κ B Activation via Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ -Independent Mechanism in Renal Tubular Epithelial Cells. *Nephron Exp Nephrol.* 2013, 123, 1-10.
78. Choi SS, Kim ES, Jung JE, Marciano DP, Jo A, Koo JY, Choi SY, Yang YR, Jang HJ, Kim EK, Park J, Kwon HM, Lee IH, Park SB, Myung KJ, Suh PG, Griffin PR, Choi JH. PPAR γ Antagonist Gleevec Improves Insulin Sensitivity and Promotes the Browning of White Adipose Tissue. *Diabetes* 2016, 65, 829-839.
79. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.*, 2017, 13, 208-219.
80. Abbasi N, Khosravi A, Aidy A, Shafiei M. Biphasic Response to Luteolin in MG-63 Osteoblast-Like Cells under High Glucose-Induced Oxidative Stress. *Iran J Med Sci.*, 2016, 41, 118-125.
81. Huang KC, Chuang PY, Yang TY, Huang TW, Chang SF. Hyperglycemia inhibits osteoblastogenesis of rat bone marrow stromal cells via activation of the Notch2 signaling pathway. *Int J Med Sci.*, 2019, 16, 696-703.
82. Beekman KM, Veldhuis-Vlug AG, van der Veen A, den Heijer M, Maas M, Kerckhofs G, Parac-Vogt TN, Bisschop PH, Bravenboer N. The effect of PPAR γ inhibition on bone marrow adipose tissue and bone in C3H/HeJ mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2019, 316, E96-E105.
83. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.*, 1988, 43, 179-183.
84. Leslie WD, Rubin MR, Schwartz AV, Kanis JA. Type 2 diabetes and bone. *J Bone Miner Res.*, 2012, 27, 2231-2237.
85. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman

- AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 2001, 344, 1434-1441.
86. Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95, 1555-1565.
87. Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2005, 102, 2340-2345.
88. Shang J, Brust R, Mosure SA, Bass J, Munoz-Tello P, Lin H, Hughes TS, Tang M, Ge Q, Kamenekca TM, Kojetin DJ. Cooperative cobinding of synthetic and natural ligands to the nuclear receptor PPAR γ . *Elife.*, 2018, 7, e43320.
89. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 1998, 395(6998), 137-143.
90. Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *J Biol Chem.*, 1998, 273(47), 31108-31112.
91. Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Neutr Res.*, 2002, 22, 817-824.
92. Johnson TE, Holloway MK, Vogel R, Rutledge SJ, Perkins JJ, Rodan GA, Schmidt A. Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 1997, 63(1-3), 1-8.
93. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1997, 94(9), 4318-4323.
94. Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem.*, 1995, 270(41), 23975-23983.