

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：37604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790182

研究課題名(和文) 核内受容体 PPAR を分子標的とする食品因子と医薬品の相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Research on the food-drug interaction focused on the nuclear receptor PPAR gamma

研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：90469411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：身近な食品因子と糖尿病治療薬ピオグリタゾンのPPAR 活性化および糖尿病改善効果に対する相互作用を解析した。その結果、柑橘類フラボノイドのナリンゲニンが、培養細胞を用いたin vitro 実験においてピオグリタゾンによるPPAR 活性化を増強した。しかしながら、糖尿病モデルマウスを用いたin vivo 実験においては、ナリンゲニンはピオグリタゾンの効果を減弱させた。ナリンゲニンは、ピオグリタゾンの血中濃度に影響を与えなかったが、PPAR とコファクターの複合体形成に対してわずかながら影響を与えていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the interaction between ordinary food factors and anti-diabetic drug pioglitazone on the activation of PPAR gamma and the improvement of diabetes. Citrus flavonoid naringenin increased pioglitazone-induced PPAR gamma activation in vitro using a cell culture system. However, naringenin reduced the anti-diabetic effect of pioglitazone in vivo using a pathological mouse model. Naringenin did not affect serum pioglitazone concentration. In contrast, naringenin slightly affected the PPAR gamma-cofactors complex formation.

研究分野：生化学、医療薬科学

キーワード：核内受容体 PPAR 食品 医薬品 相互作用 ナリンゲニン ピオグリタゾン 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1)核内受容体 PPAR の機能

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors) は、糖・脂質代謝や細胞の分化に関与する遺伝子群の発現を調節する核内受容体であり、 α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームが存在する。その中で、PPAR α は、脂肪細胞分化およびエネルギー貯蔵のマスターレギュレータとしての役割を有しており、PPAR 標的薬(作動薬)であるピオグリタゾン(チアゾリジン系薬剤)は、脂肪細胞機能の正常化(TNF- α やアディポネクチンなどのアディポカインの分泌調節)を介してインスリン抵抗性を改善する2型糖尿病治療薬として臨床応用されている。

(2)食品因子の機能性評価

我々の身近に存在する食品因子の中にもポリフェノール類を中心として PPAR を活性化する(リガンド活性を持つ)分子が見出されており、生活習慣病の予防や改善に対する有効性が期待されている。例えば、ウコンに含まれるクルクミン、ぶどうの皮に含まれるレスベラトロール、大豆に含まれるゲニステイン、緑茶に含まれるカテキン類などの食品因子は、PPAR α や PPAR γ の活性化を介して抗炎症、肥満改善、脂質代謝改善などの作用を有することが明らかにされつつある。

我々もこれまでに、食品因子の生活習慣病予防・改善への応用を目的として、柑橘類フラボノイドによる脂肪細胞機能に対する影響と制御機構の解析を行ってきた。その結果、柑橘類フラボノイドのヘスペレチンとナリンゲニンが、脂肪細胞からの遊離脂肪酸を抑制することを見出し、その分子メカニズムの一端を明らかにした。遊離脂肪酸は、末梢における糖取り込みを阻害することで、インスリン抵抗性を惹起することが知られている。また、元来、宿主の自然免疫機構の制御因子でありながら、近年、肥満関連病態への関与が報告されている TLR2 (Toll-like receptor 2)の脂肪細胞における発現量を、ヘスペレチンとナリンゲニンが抑制することを明らかにした。これらの研究の過程で、我々は、ヘスペレチンとナリンゲニンが、脂肪細胞における PPAR α の発現量を増加させることを見出した。また近年、ナリンゲニンは PPAR α のリガンド活性を有するという研究結果も報告されており、ナリンゲニンによる PPAR α 活性化を介した病態改善効果のエビデンスが蓄積されつつある。しかしながら、詳細な PPAR 活性化制御機構の解析や PPAR 標的薬との相互作用に関する研究は十分に行われていない。

(3)社会的背景

近年、本邦では食生活の欧米化や運動不足といった生活環境の変化に伴って、肥満や糖尿病などの生活習慣病患者が増加しており、社会問題化している。また、国民医療費の増

大に関連し、予防医療の推進に伴うセルフメディケーションの意識向上において、国民が健康食品や機能性食品を利用する機会が増加している。しかしながら、これらの製品は利便性が良い反面、有効性や安全性に関する科学的根拠あるいは医薬品との相互作用に関する情報が不足している。

2. 研究の目的

身近な食品因子である柑橘類フラボノイドなどを用いて、単独または PPAR 標的薬との併用時における PPAR 活性化を測定する。その後、病態モデルマウスを用いて糖代謝異常に対する機能性評価を行うために、血糖値や組織中のアディポカイン発現量変動を測定する。また、PPAR 活性化機構に対する影響を検証するため、核内受容体とコファクターの複合体形成について解析する。これらの研究を通して、食品因子の有用性や医薬品との相互作用に関する科学的根拠の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1)PPAR 活性に与える影響を解析

PPAR 応答エレメントを導入した細胞に9種類の食品因子(ナリンゲニン、ヘスペレチン、カテキン、エピガロカテキンガレート、ゲニステイン、ダイゼイン、クルクミン、レスベラトロール、ノビレチン)(1~50 μ M)と PPAR 標的薬(糖尿病治療薬)ピオグリタゾン(0.5 μ M)をそれぞれ単独または併用して添加した後、レポーターアッセイを行って PPAR 活性を測定した。

(2)糖尿病モデルマウスにおける病態改善効果に与える影響を解析

TSOD マウス(雄、16 週齢)にピオグリタゾン(10 mg/kg、1日1回経口投与)を単独で投与または5種類の食品因子(ナリンゲニン、ヘスペレチン、ゲニステイン、ダイゼイン、レスベラトロール)(100 mg/kg、1日1回経口投与)をそれぞれ併用して4週間投与した後、経口ブドウ糖負荷試験を行って血糖値を測定した。また、NSY マウス(雄、26 週齢)を用いて同様の検討を行った。

(3)マウス脂肪組織のアディポカイン発現量変動の解析

ピオグリタゾン単独またはナリンゲニンと併用して4週間投与された TSOD マウスの精巢上体周囲脂肪組織を摘出し、タンパク質抽出を行った後、抗体アレイを用いてアディポカインの発現量を網羅的に測定した。

(4)血中ピオグリタゾン濃度に与える影響を解析

HPLC によるマウス血清中ピオグリタゾン濃度の測定系を構築した後、ピオグリタゾン単独またはナリンゲニンを併用して4週間投与された TSOD マウスの血清を用いて、ピオ

グリタゾンの血中濃度を測定した、また、C57BL/6J マウスを用いて、ピオグリタゾンとナリンゲニンの単回投与後の血中ピオグリタゾン濃度を経時的（15分～24時間）に測定した。

(5) PPAR γ -コファクター複合体形成に与える影響を解析

ピオグリタゾンとナリンゲニンをそれぞれ単独または併用した際の PPAR γ とコファクター（NcoR（コリプレッサー）および CBP（コアクチベーター））の複合体形成を ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) 食品因子による PPAR γ 活性化

9種類の食品因子を用いて、PPAR γ 活性化に対する影響をレポーターアッセイにより測定したところ、5種類（ナリンゲニン、ヘスペレチン、ゲニステイン、ダイゼイン、レスベラトロール）の食品因子が、濃度依存的に PPAR γ を活性化させた。ただし、PPAR γ 標的薬であるピオグリタゾンと比較して低い活性であった。また、食品因子とピオグリタゾンを併用した場合、8種類（ナリンゲニン、ヘスペレチン、カテキン、エピガロカテキンガレート、ゲニステイン、ダイゼイン、クルクミン、レスベラトロール）の食品因子が、ピオグリタゾンによる PPAR γ 活性化を増加させた。

(2) ピオグリタゾンによる病態改善効果に対する食品因子の影響

食品因子単独およびピオグリタゾンとの併用において PPAR γ 活性の増加を示した5種類（ナリンゲニン、ヘスペレチン、ゲニステイン、ダイゼイン、レスベラトロール）の食品因子を用いて、糖尿病モデルマウス（TSOD）におけるピオグリタゾンの病態改善効果（他耐糖能異常の改善）に対する影響を検証した。その結果、ナリンゲニンとヘスペレチンは、ピオグリタゾンの作用を減弱させた。一方、ゲニステイン、ダイゼイン、レスベラトロールはピオグリタゾンの作用に影響を与えなかった。また、別の種類の糖尿病モデルマウス（NSY）を用いて同様の検討を行ったところ、ナリンゲニンがピオグリタゾンの作用を減弱させることを確認した。

(3) ピオグリタゾンによるマウス脂肪組織のアディポカイン発現量変動に対するナリンゲニンの影響

肥満関連疾患の発症・進展に深く関与しているアディポカインの発現量変動が、ナリンゲニンによるピオグリタゾンの病態改善効果の減弱化と相関するのかが確認するために、TSOD マウスの精巢上体周囲脂肪組織を用いて抗体アレイを行った。その結果、ピオグリタゾンの単独投与は、CRP、MCP-1、M-CSFなどの炎症マーカーの発現量を低下させた。し

かしながら、ナリンゲニンの併用は、ピオグリタゾンによる炎症マーカーの発現量抑制効果を阻害した。これらの結果から、脂肪組織の炎症レベルと耐糖能異常が相関していることが確認された。

(4) 血中ピオグリタゾン濃度に対するナリンゲニンの影響

4週間の反復持続投与を行った TSOD マウスにおいて、ナリンゲニンはピオグリタゾンの血中濃度に影響を与えなかった。また、単回投与後の血中ピオグリタゾン濃度の経時変化においても影響を与えなかった。これらの結果から、糖尿病モデルマウスにおいて観察されたナリンゲニンによるピオグリタゾンの薬効減弱化の要因は、ピオグリタゾンの吸収や排泄などの薬物動態的な相互作用ではなく、細胞・組織レベルにおける薬力学的な相互作用の可能性が示された。

(5) PPAR γ -コファクター複合体形成に対するナリンゲニンの影響

PPAR γ の活性化には、リガンド（本研究においてはピオグリタゾン）の結合だけでなく、抑制因子（コリプレッサー）NcoR の解離と活性化因子（コアクチベーター）CBP の結合による複合体形成の状態変化が関与している。そこで、PPAR γ -NcoR 複合体と PPAR γ -CBP 複合体の形成におけるナリンゲニンとピオグリタゾンの影響を検証した。その結果、ナリンゲニンおよびピオグリタゾンは、濃度依存的に PPAR γ -NcoR 複合体の解離を促した。また、ナリンゲニンとピオグリタゾンの併用は、複合体の解離を増加させた。一方、PPAR γ -CBP 複合体形成においては、ナリンゲニンとピオグリタゾンは、濃度依存的に複合体形成を促したが、併用した場合、高濃度域ではわずかに複合体形成を阻害することが示された。

(6) まとめ

本研究により、疾病予防・改善を目的として利用される食品因子の中には、医薬品との併用により、かえって治療効果を減弱化させてしまう可能性が示された。このような作用が起こる詳細な機序については未だ不明な点が多い。今後、細胞内のナリンゲニンやピオグリタゾン濃度の変化や PPAR γ 活性化機構に対するより詳細な検討を行うことは、疾病予防・改善を目的とした食品因子の適性使用に繋がると考える。

<引用文献>

- Evans RM, Wang YX, et al. Nat Med. 2004 Apr;10(4):355-61. Review.
Kersten S. PPAR Res. 2008;2008:132960.
Lehmann JM, Kliewer SA, et al. J Biol Chem. 1995 Jun 2;270(22):12953-6.
Jacob A, Wang P, et al. PPAR Res. 2007;2007:89369.

Rayalam S, Baile CA, et al. *Phytother Res.* 2008 Oct;22(10):1367-71.
Kim S, Lee YS, et al. *J Nutr.* 2005 Jan;135(1):33-41.
Lee K. *J Vet Sci.* 2004 Dec;5(4):325-30.
Yoshida H, Kai H, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 9;394(3):728-32.
Yoshida H, Kurokawa M, et al. *J Nutr Biochem.* 2013 Jul;24(7):1276-84.
Goldwasser J, Nahmias Y, et al. *PLoS One.* 2010 Aug 25;5(8):e12399.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yoshida H, Watanabe H, Ishida A, Watanabe W, Narumi K, Atsumi T, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;454:95-101. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.038.

Yoshida H, Watanabe W, Oomagari H, Tsuruta E, Shida M, Kurokawa M. Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2013 Jul;24(7):1276-84. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.

〔学会発表〕(計7件)

吉田裕樹、渡部英明、石田晶子、渡辺 渡、鳴海恵子、渥美聡孝、杉田千泰、黒川昌彦：肥満初期の脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対するナリンゲニンの影響、日本薬学会第 135 年会、2015.3.25-28, 神戸サンボホール(兵庫県神戸市)。

津波古梨花、吉田裕樹、渥美聡孝、鳴海恵子、渡辺 渡、杉田千泰、黒川昌彦：柑橘類フラボノイドと糖尿病治療薬ピオグリタゾンの食品医薬品相互作用の解析、日本薬学会第 135 年会、2015.3.25-28, デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)。

吉田裕樹、渡辺 渡、鳴海恵子、渥美聡孝、杉田千泰、黒川昌彦：肥満関連疾患の予防法開発を目指した食品成分の機能性評価。第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2014.11.15-16, 熊本大学(熊本県熊本市)。

浜村奈理加、吉田裕樹、堀口 健、佐藤守、渡部英明、石田晶子、杉田千泰、渡辺 渡、黒川昌彦：肥満初期における脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対するナリンゲニンの影響。第 19 回日本フード

ファクター学会、2014.11.8-9, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)。
吉田裕樹、渥美聡孝、鳴海恵子、渡辺渡、渡部英明、石田晶子、佐野久弥、福永碧、森元智子、川畑英孝、杉田千泰、黒川昌彦：核内受容体 PPAR 活性化能を有する食品成分と糖尿病治療薬ピオグリタゾンの相互作用。日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市)。

堀口 健、吉田裕樹、渡部英明、石田晶子、杉田千泰、浜村奈理加、佐藤 守、是枝秀彦、山本彩佳、渡辺 渡、黒川昌彦：高脂肪食誘発性の脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対するナリンゲニンの影響。日本薬学会第 134 年会、2014.3.27-30, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市)。

吉田裕樹、渡部英明、石田晶子、佐野久弥、堀口 健、佐藤 守、浜村奈理加、渡辺 渡、黒川昌彦：食餌性肥満初期における脂肪組織へのマクロファージ浸潤に対するナリンゲニンの影響、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11-13, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

〔その他〕

アウトリーチ活動

吉田裕樹：生化学から見た病気 - 肥満関連疾患の病態メカニズムと新規予防法開発 - , 宮崎県立都城西高等学校 出前講座、2014.6.21, (宮崎県都城市)。

吉田裕樹：生化学から見た病気 - 肥満関連疾患の病態メカニズムと治療 - , 宮崎県立都城泉ヶ丘高等学校 大学出前講座、2013.6.15, (宮崎県都城市)。

ホームページ

<http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・講師
研究者番号：90469411

(2) 研究協力者

黒川 昌彦 (KUROKAWA, Masahiko)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号：80186527

渡辺 渡 (WATANABE, Wataru)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号：50399218

杉田 千泰 (SUGIRA, Chihiro)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：70632694

渥美 聡孝 (ATSUMI, Toshiyuki)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号：60453651

鳴海 恵子 (NARUMI, Keiko)
九州保健福祉大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号：40551304