

# ヨクイニン含有水酸化モノおよびジ不飽和脂肪酸の 脂質代謝に及ぼす影響

～リポドミック解析を介した外来性および内在性核内受容体リガンドの探索～

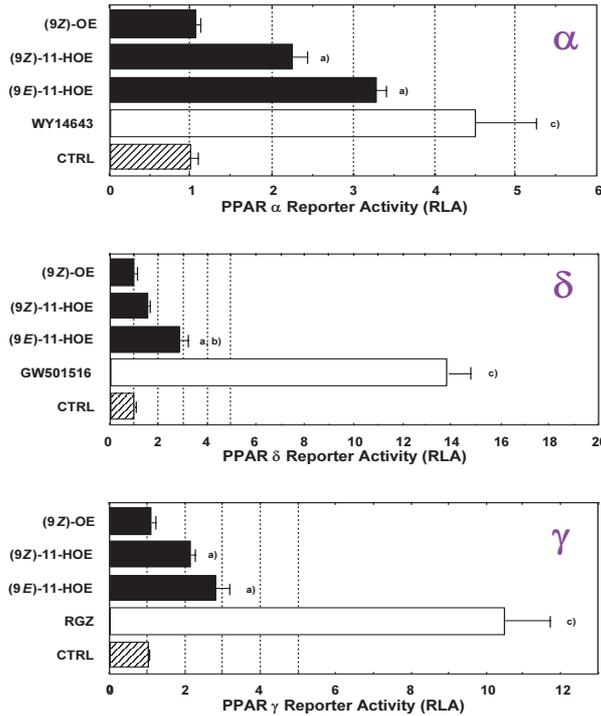
申請代表者	井上 誠	愛知学院大学大学院薬科学研究科	教授
所外共同研究者	田邊 宏樹	愛知学院大学大学院薬科学研究科	講師
〃	小谷 仁司	愛知学院大学大学院薬科学研究科	助教
所内共同研究者	渡辺 志朗	臨床科学部門 臨床利用分野	准教授

## ■背景・目的

ヨクイニンは、基原植物であるイネ科ハトムギの種皮を取り除いた種子を用部とする生薬である。古くから利尿、鎮痛、健胃薬として用いられている。我々はこれまでにヨクイニンより PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ) アゴニストとして、6種類の水酸化不飽和脂肪酸を単離同定してきた。しかし、ヨクイニンの薬効とそれらの水酸化不飽和脂肪酸との関係は明らかでない。PPARは核内受容体スーパーファミリーに属しているリガンド応答性転写因子であり、 $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ の3種類のサブタイプが知られている。主に、PPAR $\alpha$ は肝臓における脂肪酸代謝で、PPAR $\delta$ は骨格筋における脂肪酸酸化で、PPAR $\gamma$ は脂肪細胞分化で重要な役割を果たしている。これらのPPARsは糖・脂質代謝に深く関与しており、肥満、糖尿病、インスリン抵抗性の改善薬の開発ターゲットとして盛んに研究がされてきた。しかし、それぞれのPPARアゴニストとして開発、臨床応用されてきた薬剤には重篤な副作用が報告され、臨床現場での使用が禁止、あるいは、制限されている。特に、PPAR $\gamma$ アゴニストであるチアゾリジン系薬剤には、体重増加、体液貯留、浮腫、鬱血性心不全、骨折などの副作用が報告され、新たな薬剤の開発が望まれている。この様な状況の中で、選択的PPAR $\gamma$ モジュレーターやpanPPARアゴニストの有用性が指摘されている。そこで今回我々は、ヨクイニンに含有されている各種の水酸化不飽和脂肪酸のPPARアゴニストとしての特徴を調べ、それらがヨクイニンが示す薬効の基盤になっているかを明らかにすることを目的として本実験を行った。

## ■結果・考察

ヨクイニンより単離・同定した水酸化モノ・ジ不飽和脂肪酸が、PPARの3つのサブタイプに対してどのような作用を及ぼすか、HEK293細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系で調べた。使用した6種類の水酸化不飽和脂肪酸は、PPAR $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ それぞれに対して活性の強弱はあったが5~20  $\mu$ Mの濃度でアゴニスト活性を示した。そこで、さらに水酸化不飽和脂肪酸のPPARアゴニスト活性を解析するために、各種の水酸化モノ不飽和脂肪酸を合成し、それらのPPARアゴニストとしての特徴を調べた。その結果、オレイン酸 ((9Z)-octadecenoic acid) は20 $\mu$ Mの濃度ではPPARアゴニスト活性は殆ど示さなかったが、オレイン酸の水酸化体である11-hydroxy-(9Z)-octadecenoic acidと11-hydroxy-(9E)-octadecenoic acidはPPAR $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ アゴニスト活性を示した。そして、二重結合のトランス-シス異性体を比較すると、トランス型の11-hydroxy-(9E)-octadecenoic acidの方が



水酸基の有無と二重結合の配置

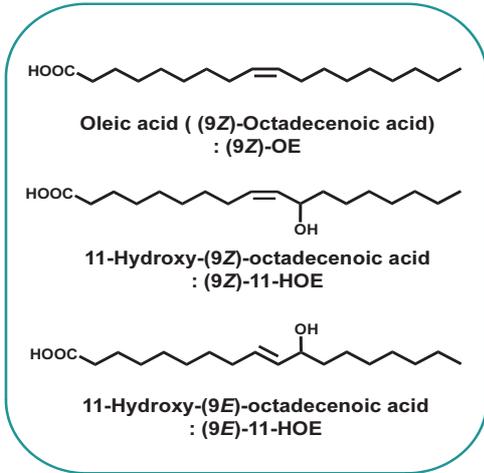
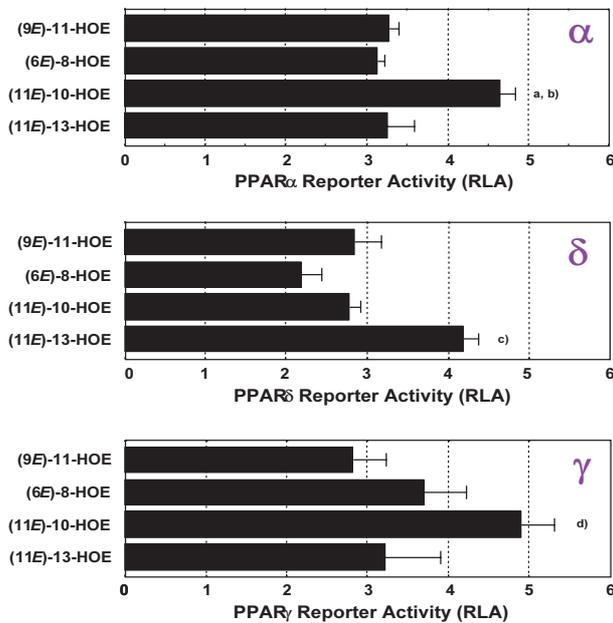


Fig.1. 水酸化モノ不飽和脂肪酸のPPARアゴニスト活性

Fatty acid concentrations; 20  $\mu$ M for PPAR $\alpha$  and  $\delta$ , 50  $\mu$ M for PPAR $\gamma$ .  
 a)  $p < 0.01$  vs. (9Z)-OE, b)  $p < 0.01$  vs. (9Z)-11-HOE, c)  $p < 0.01$  vs. CTRL.



水酸基と二重結合の位置の違い

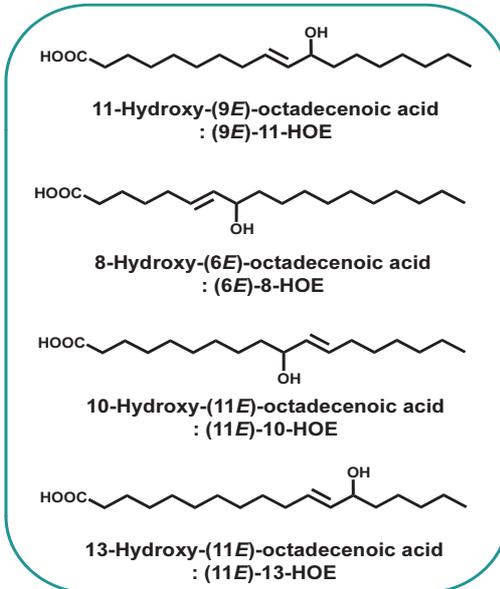


Fig.2. 水酸化モノ不飽和脂肪酸のPPARアゴニスト活性

Fatty acid concentrations; 20  $\mu$ M for PPAR $\alpha$  and  $\delta$ , 50  $\mu$ M for PPAR $\gamma$ . a)  $p < 0.05$  vs. (9Z)-11-HOE or (11E)-13-HOE, b)  $p < 0.01$  vs. (6E)-8-HOE, c)  $p < 0.01$  vs. (9E)-11-HOE, (6E)-8-HOE, or (11E)-10-HOE, d)  $p < 0.05$  vs. (11E)-13-HOE.

炭素鎖の長さ和水酸基の位置の違い

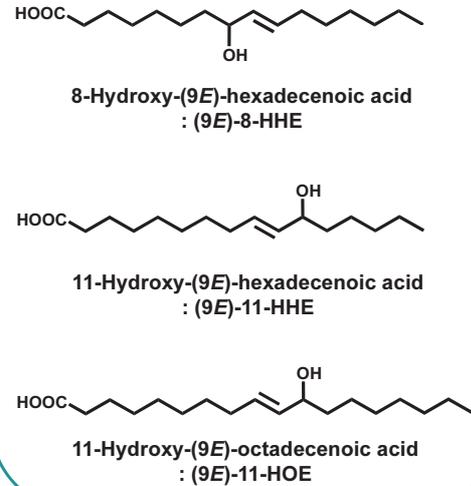
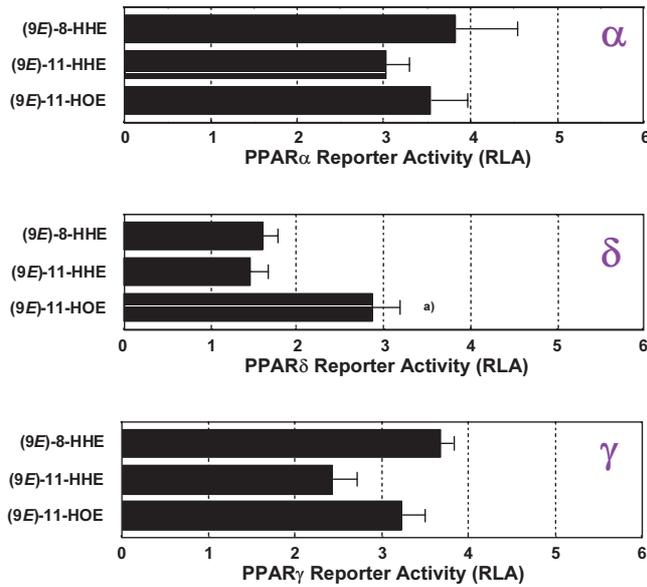


Fig.3. 水酸化モノ不飽和脂肪酸のPPARアゴニスト活性  
 Fatty acid concentrations; 20  $\mu$ M for PPAR $\alpha$  and  $\delta$ , 50  $\mu$ M for PPAR $\gamma$ .  
 a)  $p < 0.01$  vs. (9E)-8-HHE or (9E)-11-HHE.

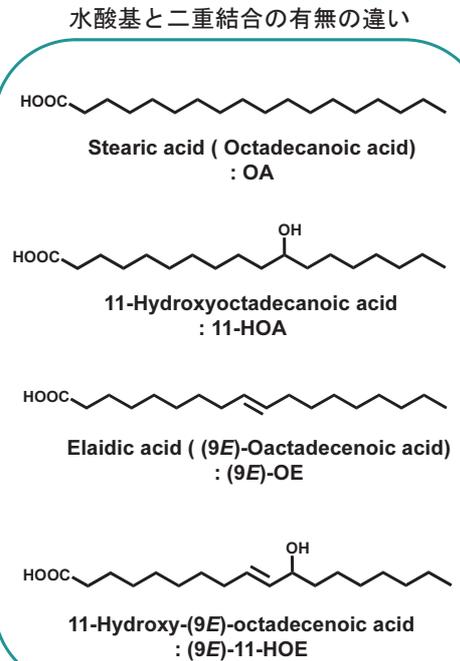
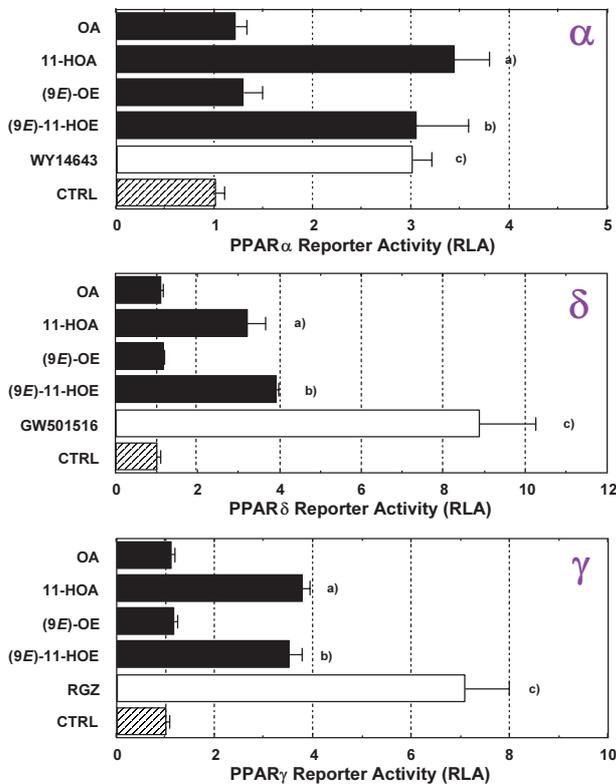


Fig.4. 水酸化モノ不飽和脂肪酸のPPARアゴニスト活性  
 Fatty acid concentrations; 20  $\mu$ M for PPAR $\alpha$  and  $\delta$ , 50  $\mu$ M for PPAR $\gamma$ .  
 a)  $p < 0.01$  vs. OA, b)  $p < 0.01$  vs. (9E)-OE, c)  $p < 0.01$  vs. CTRL.

より強い活性を示した (Fig. 1)。次に、水酸化モノ不飽和脂肪酸の二重結合の位置と水酸基の位置の違いが、PPAR アゴニスト活性に及ぼす影響を検討した。その結果、11-hydroxy-(9*E*)-octadecenoic acid, 8-hydroxy-(6*E*)-octadecenoic acid, 10-hydroxy-(11*E*)-octadecenoic acid, 13-hydroxy-(11*E*)-octadecenoic acid の中で、10-hydroxy-(11*E*)-octadecenoic acid が PPAR $\alpha$ と $\gamma$ に対して最も高い活性を、13-hydroxy-(11*E*)-octadecenoic acid が PPAR $\delta$ に対して最も高い活性を示した (Fig. 2)。この結果は、水酸化不飽和脂肪酸の二重結合はカルボキシル基から遠い位置にある方が活性が高くなるようであり、一方、水酸基の位置はサブタイプ選択性に影響を与えているようであったが、化合物の数が少ないため今後のさらなる検討が必要である。次に、水酸化モノ不飽和脂肪酸の鎖長が PPAR アゴニスト活性に影響を検討した。その結果、8-hydroxy-(9*E*)-hexadecenoic acid, 11-hydroxy-(9*E*)-hexadecenoic acid, 11-hydroxy-(8*E*)-octadecenoic acid は PPAR $\alpha$ と $\gamma$ に対しては同等のアゴニスト活性を示したが、PPAR $\delta$ に対しては鎖長の長い 11-hydroxy-(8*E*)-octadecenoic acid が最も強いアゴニスト活性を示した (Fig. 3)。

次に、水酸化モノ不飽和脂肪酸の二重結合の有無が PPAR アゴニスト活性に及ぼす影響を検討した。その結果、ステアリン酸とエライジン酸は 20  $\mu$ M で活性は全く示さなかったが、それらの水酸化体である 11-hydroxyoctadecanoic acid と 11-hydroxy-(9*E*)-octadecenoic acid は同等な panPPAR アゴニスト活性を示した (Fig. 4)。すなわち、二重結合の存在は PPAR アゴニスト活性に必須ではなく、水酸基の存在が重要であることがわかった。以上の結果をまとめると、脂肪酸は水酸基が導入されることにより、対応する不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸より強い panPPAR アゴニスト活性を獲得することが明らかになった。さらに、二重結合の位置、水酸基の位置、及び、脂肪酸鎖長は、アゴニスト活性に極めて大きな影響を与えることはないが、脂肪酸が示す PPAR サブタイプ選択性に若干の影響を与えるようであった。

これまでに脂肪酸が PPARs アゴニストとして作用することは報告されているが、脂肪酸による PPARs の活性化には 100 $\mu$ M 程度の濃度が必要である。しかし、それらの脂肪酸に何らかの機序により水酸基が導入されることにより低濃度で PPARs を活性化することが可能になり、その結果、生体内の糖・脂質代謝の調節を行っている可能性が考えられる。また、ヨクイニンなどの外来性の水酸化不飽和脂肪酸が、生体内の糖・脂質代謝に及ぼす影響が考えられる。データは示していないが、ヨクイニンメタノール抽出エキスには、PPAR $\gamma$  アゴニストであるチアゾリジン系薬物であるロジグリタゾンと同様な、前駆脂肪細胞の分化誘導作用と中性脂質の蓄積促進作用が観察された。

そこで、糖尿病・肥満研究用高脂肪飼料 (Quick Fat) で飼育したマウスの脂質代謝に及ぼすヨクイニンの効果を検討した。今回は、一つの水酸化不飽和脂肪酸の効果を *in vivo* で検討することはせず、幾種類かの水酸化モノ・ジ不飽和脂肪酸を含有するヨクイニンの効果を検討した。ヨクイニンはミルで粉末にしたものを、2.5%あるいは5% (w/w) の濃度で高脂肪飼料に混和して、雄性 C57BL/6 マウス (6 週齢) に摂取させた。16 週間飼育し、ヨクイニンが糖・脂質代謝に及ぼす効果を経時的に調べた。高脂肪飼料で飼育したコントロール群のマウスでは、体重、及び、血清コレステロール、血糖、内臓脂肪量の増加と、血清中性脂質の初期における上昇と後期における低下が観察された。また、血清 GOT, GPT 値の若干の上昇が観察された。一方、ヨクイニンの低用量及び高用量摂取群において、高脂肪飼料摂取によって変動した糖・脂質代謝を著しく改善する作用は観察されなかった (Fig. 5)。ただし、コントロール群で観察された肝臓中性脂質含量の低下をヨクイニン投与群では抑制しており、ヨクイニンが肝臓の脂質代謝に何らかの影響を与えていることが推察された (Fig. 6)。今回の

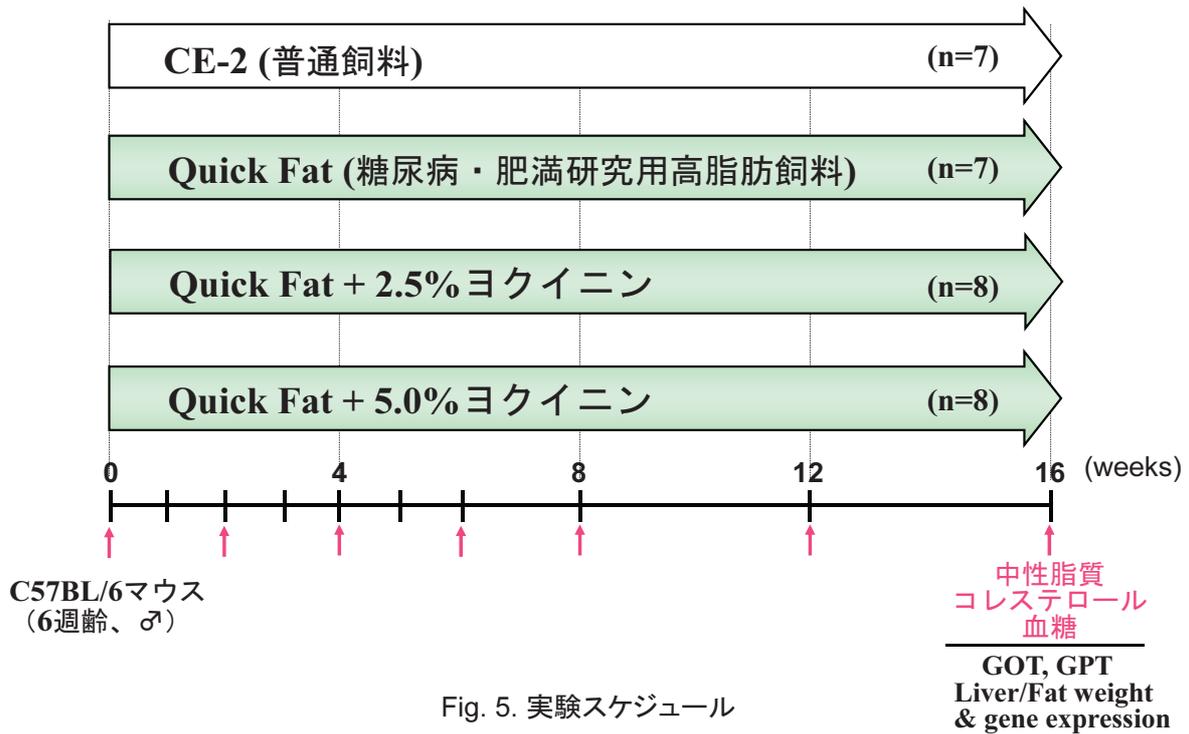


Fig. 5. 実験スケジュール

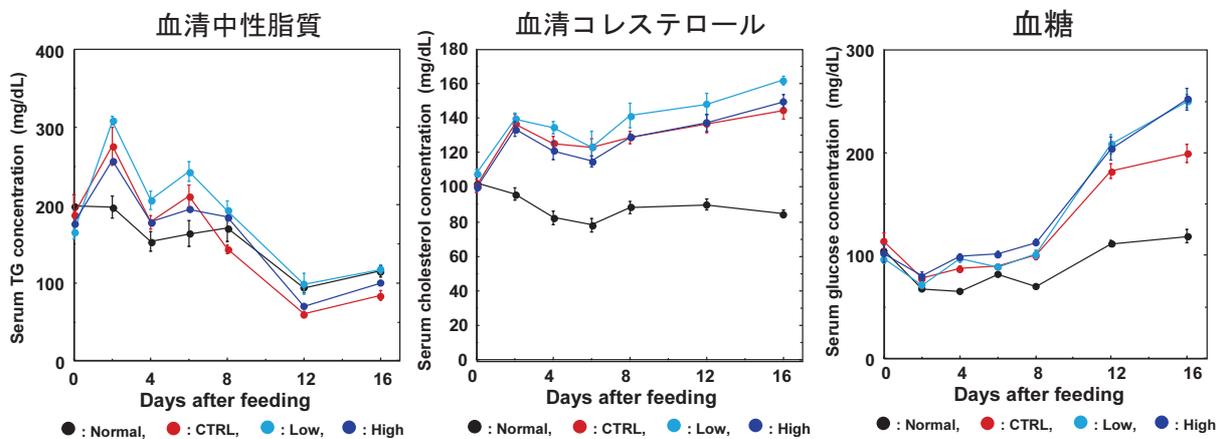


Fig. 6. ヨクイニンの糖・脂質代謝に及ぼす影響

実験では、ヨクイニンの糖・脂質代謝に及ぼす影響は観察されなかったために、当初計画をしていた生体内、あるいは、細胞膜の中性脂質、リン脂質などへの水酸化不飽和脂肪酸の取り込みのリポドミックス解析は行わなかった。一般に、ヨクイニンは薬効を期待するためには、かなりの高用量を使用するが、今回使用した飼料に混和した2.5%あるいは5% (w/w)の量は充分ではなかった可能性が考えられる。但し、飼料に占めるヨクイニンの割合をこれ以上増やすことは難しいため、今後は水酸化不飽和脂肪

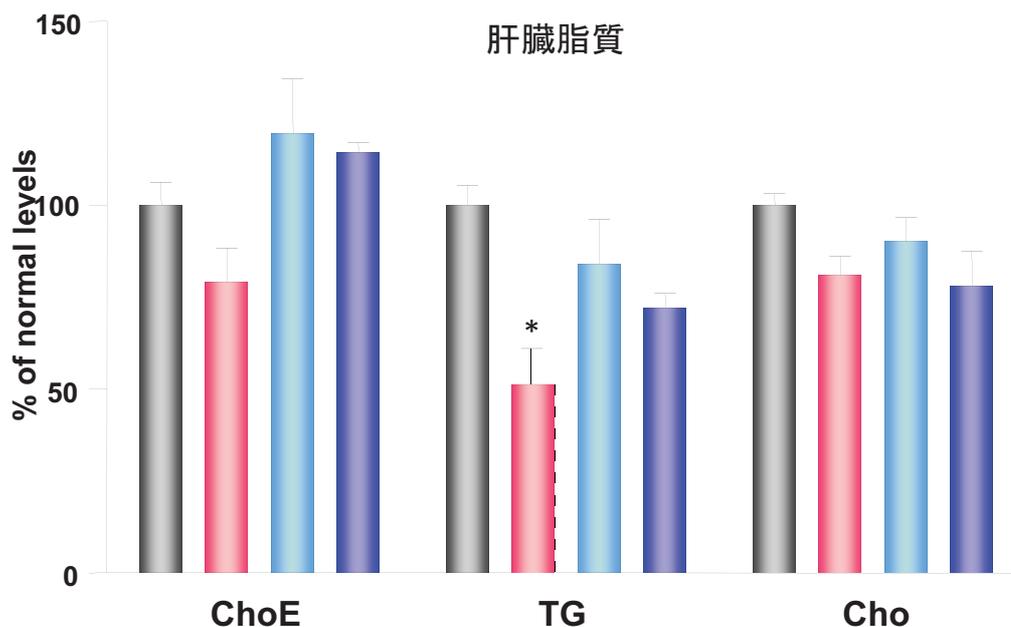


Fig. 7. ヨクイニンの糖・脂質代謝に及ぼす影響

■ : normal, ■ : control, ■ : low, ■ : high

\*  $p < 0.01$  vs. normal

酸を高用量含有するヨクイニンのメタノールエキスなどを使用して飼料を調製し、マウスの水酸化不飽和脂肪酸摂取量を大幅に増加させることが必要であると考えられる。また、合成水酸化不飽和脂肪酸を使用して、その生体内での動態を調べることも必要であると考えられる。

本研究では、漢方方剤に繁用される生薬の一つであるヨクイニンに、メタボリックシンドロームの改善薬の可能性が期待される panPPAR アゴニストの候補になりうる複数の水酸化モノ・ジ不飽和脂肪酸が含有されることを見出した。今後、さらに水酸化不飽和脂肪酸の薬物としての有用性と生体における役割の解明によって、新規 panPPAR アゴニストの開発への新しい道を開くと共に、脂肪酸の生理学的または病態生化学的な新たな役割が解明されていくことが期待される。

## ■ 結論

1. 水酸化モノ不飽和脂肪酸は、panPPAR アゴニスト活性を示した。
2. 水酸化モノ不飽和脂肪酸の二重結合の位置、水酸基の位置、及び、脂肪酸鎖長（16と18）は PPAR アゴニスト活性に大きく影響しなかったが、サブタイプ選択性に影響を及ぼしているようであった。
3. 脂肪酸は水酸基が導入されることにより、強い panPPAR アゴニスト活性を獲得することが明らかになった。
4. ヨクイニンは糖尿病・肥満研究用高脂肪飼料の摂取により変動した糖・脂質代謝を改善する作用は示さなかった。しかし、ヨクイニンは肝臓中性脂質の減少を抑制しており、ヨクイニンが脂質代謝系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。