マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用

新本洋士[§], 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之*, 山岸賢治*, 鈴木雅博*

独立行政法人食品総合研究所

* 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
東北農業研究センター福島研究拠点Suppressive Effect of Extract from *Phellodendri*
cortex on the Differentiation of 3T3-L1
Mouse PreadipocytesHiroshi Shinmoto[§], Keiko Iwashita, Masuko Kobori,
Toshiyuki Kimura*, Kenji Yamagishi*
and Masahiro Suzuki*National Food Research Institute,
Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan* National Agricultural Research Center for Tohoku
Region, Arai, Fukushima 960-2156 Japan

The effects of an extract from *Phellodendron amurense* Ruprecht (*Phellodendri* cortex) and its component berberine on the differentiation of 3T3-L1 mouse preadipocytes were studied. The extract and berberine suppressed both the accumulation of triglyceride and the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH). We concluded that berberine, a component of *Phellodendri* cortex, plays an important role in the differentiation of adipocytic cells.

(Received May 6, 2005 ; Accepted Jul. 22, 2005)

筆者らは東北地域で産生される農産物の生理機能性の検索を目的とし、約 400 種類の農産物試料から調製した抽出物の抗酸化性、抗変異原性、マウス白血病細胞に対する抗腫瘍性を検索してきた。これらの農産物には全国的に販売されているものから、近年栽培法が確立された比較的新しい農産物、生産量が少なく地域で限定的に販売されている農産物などが含まれている。検索の結果、山菜のコゴミ（クサソテツの若芽）に強い抗酸化性を見だし、新たな抗酸化性化合物カフェオイルホモセリンの単離に成功した¹⁾²⁾。また、カキの葉に強い抗変異原性を³⁾、さらに山菜のウルイに強い抗腫瘍性を⁴⁾見いだした。

続いて筆者らは、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を脂肪細胞に分化誘導後、細胞内への脂肪（トリグリセリド）の蓄積を上記の抽出物が抑制するか否かを検索した。このよう

な作用を持つ農産物には抗肥満作用が期待される。しかし、ほとんどの抽出物はトリグリセリドの蓄積を抑制しなかった。測定した農産物抽出物の中で唯一強いトリグリセリド蓄積抑制作用を持っていたのは、ミカン科樹木であるキハダ (*Phellodendron amurense*) 内皮からの抽出物であった。

本報告では、キハダおよびキハダに含まれる代表的なイソキノリンアルカロイドであるベルベリン (5,6-Dihydro-9,10-dimethoxy [1,3] dioxolo [4,5-g] isoquino [3,2-a] isoquinolin-7-ium) について、分化誘導したマウス脂肪前駆細胞へのトリグリセリド蓄積、およびトリグリセリド合成に関わる細胞内酵素グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性におよぼす影響について測定した結果を述べる。

1. 実験方法

(1) 試料

キハダ内皮は粉碎後、0.1 g を 5 mL のジメチルスルホキシド (DMSO) で 24 時間抽出した上清を抽出液として用いた。塩化ベルベリン (無水和 5,6-Dihydro-9,10-dimethoxy [1,3] dioxolo [4,5-g] isoquino [3,2-a] isoquinolin-7-ium chloride) は和光純薬株式会社より購入し、DMSO に溶解した。特に記載しない限り、試薬はシグマアルドリッチ株式会社より購入したものを用いた。

(2) 脂肪前駆細胞 3T3-L1 の分化誘導⁵⁾⁶⁾⁷⁾

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分与された) は 10% 牛胎児血清 (FCS, JRH バイオサイエンス) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日水製薬株式会社) に 1×10^4 細胞/mL の密度に浮遊させ、この 5 mL を 6 cm ディッシュ (ファルコン 3002, 日本ベクトン株式会社) に播種した。4 日間培養後、コンフレントになったことを顕微鏡下で確認した。脂肪細胞への分化を誘導するため培地を除去後、インスリン (牛由来, 1 mg/L), デキサメタゾン (0.25 μ mol/L) と 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (0.5 mmol/L) を含む 10% FCS-DMEM で 48 時間培養した。さらに培地を除去後、インスリンと FCS を含む DMEM にキハダ抽出液あるいはベルベリンを添加して 7 日間培養した。試料添加培地は 7 日の間に 2 回交換した。脂肪細胞への分化は細胞をオイルレッドによって染色するか、細胞に蓄積されたトリグリセリドを測定して判定した。脂肪細胞分化誘導試験は 3 連で行い、測定結果は平均値と標準偏差で表した。有意差検定はボンフェローニ補正法による多重 t 検定により行った。なお、抽出物最大添加濃度において、細胞内の脂肪滴には変化があったが、細胞の剥離、収縮など試料の細胞毒性を示すと考えられる形態変化は見られなかった。

(3) トリグリセリドの測定

ディッシュ上で脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-), カルシウムおよびマグネシウム不含) で 2 回洗浄し、氷冷した 1 mL のエチレン

[§] 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12* [†] 960-2156 福島県福島市荒井字原宿南 50[§] 連絡先 (Corresponding autore), shinmoto@affrc.go.jp

A B C

図 1 キハダ抽出物による 3T3-L1 細胞への脂肪蓄積の抑制

分化誘導刺激したマウス 3T3-L1 細胞にインスリンおよびキハダ抽出物を添加した培地で 7 日間培養し、細胞内に蓄積したトリグリセリドをオイルレッドで染色した。A: コントロール, B: 20 μ L/ディッシュ, C: 10 μ L/ディッシュ

ジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA, 1 mmol/L) を含む トリス-塩酸緩衝液 (25 mmol/L, pH 7.5) を加え、セルスクレーパーで剥離してマイクロチューブに回収した。回収した細胞は超音波処理により破碎、均一化し、その一部をトリグリセリド (中性脂質) の測定に用いた。トリグリセリド濃度はトリグリセライド E テストワコー (和光純薬株式会社) を用いて定量した。蛋白質濃度は DC プロテイン アッセイ (バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社) で測定した。

(4) グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 活性の測定⁵⁾⁶⁾⁷⁾

NADH (2.5 mmol/L), ジヒドロキシアセトンリン酸 (0.2 mmol/L), 2-メルカプトエタノール (0.1 mmol/L), EDTA (2.5 mmol/L) を含むトリエタノールアミン-塩酸緩衝液 (100 mmol/L, pH 7.5) 900 μ L に試料 100 μ L を添加し、25°C で 1 分間あたりの 340 nm の吸光度の減少を測定した。1 分間に 1 nmol の NADH を酸化する酵素量を 1 ユニットとした。

2. 実験結果および考察

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 はデキサメタゾンと 3-イソブチル-1-メチルキサンチンで刺激後、インスリン存在下で培養すると、トリグリセリドを合成して細胞内に脂肪滴として蓄積する。したがって、細胞内へのトリグリセリドの蓄積、あるいはトリグリセリドの合成に関与する酵素であるグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 活性を測定することによって、脂肪細胞への分化を抑制あるいは促進する物質の検定に用いることができる。東北地域で生産される農産物の抽出物について検索した結果、ほとんどの抽出物はトリグリセリドの蓄積を抑制しなかった

表 1 キハダ抽出物とともに培養した 3T3-L1 細胞内のトリグリセリド含量および GPDH 活性

キハダ抽出物添加量 (μ L/ディッシュ)	トリグリセリド量* (mg/mg蛋白質)	GPDH 活性* (ユニット/mg蛋白質)
0	0.500 $\pm$ 0.039	5352 $\pm$ 711
10	0.210 $\pm$ 0.011	1307 $\pm$ 237
20	0.182 $\pm$ 0.011	1679 $\pm$ 157

*測定値は 3 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。トリグリセリド, GPDH とも、抽出物を添加しないものに比べ添加群において危険率 0.05 で有意であった。

が、唯一強いトリグリセリド蓄積抑制作用を示したのはキハダ抽出物であった。

脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞にキハダ抽出液を加えて培養したディッシュを、オイルレッドで脂肪染色した結果を図 1 に示す。コントロールではディッシュ全体が濃く染色され、細胞内に脂肪滴を含む細胞が観察された。キハダ抽出液をディッシュあたり 20 μ L 添加して培養すると、ディッシュ上の細胞は薄く染色されるにとどまった。

この時の細胞のトリグリセリド量を表 1 に示す。抽出液中の蛋白質あたりのトリグリセリド量で示した。キハダ抽出物をディッシュあたり 20 μ L 添加して培養すると、細胞のトリグリセリド量はコントロールの約 3 分の 1 に減少した。また、同時に測定した蛋白質あたりの GPDH 活性もキハダ抽出物を添加することによって、コントロールの 3 分の 1 に減少していた。したがって、キハダ抽出物を添加して培養した 3T3-L1 細胞では、トリグリセリドを合成する酵素の誘導が抑制されることによって細胞へのトリグリセリドの蓄積が抑えられたと考えられる。

キハダはミカン科落葉高木であり、健康補助食品としても葉、実、根などが用いられているが、最も薬効の強いのは黄色をした内皮である。これを乾燥したものはオウバクと呼ばれる生薬であり、静菌整腸作用をもつ⁸⁾⁹⁾。有効成分はベルベリンおよびオウバクノン (Obacunoic acid ϵ -lactone) とされており、単離精製されたベルベリンは塩化ベルベリンなどの形で止瀉薬の原料成分として使われている。

キハダ抽出物を用いた実験と同様に、塩化ベルベリンを添加して培養した 3T3-L1 細胞のトリグリセリド量および GPDH 活性を表 2 に示す。塩化ベルベリンの添加濃度とともにトリグリセリド蓄積、GPDH 活性ともに著しく減少した。塩化ベルベリンを 2 μ g/mL 添加して培養すると、細胞内へのトリグリセリドの蓄積は 5 分の 1 以下に減少した。また、この時の細胞内 GPDH 活性は 60 分の 1 以下であり、ベルベリンは非常に強力な脂肪細胞分化誘導抑制作用を持つことが判明した。

キハダ中のベルベリン濃度は 0.4~4% (w/w) と報告されている¹⁰⁾。今回用いたキハダ抽出液中のベルベリン濃度は測定していないが、図 1 および表 1 における培養液中の

表 2 塩化ベルベリンとともに培養した 3T3-L1 細胞内のトリグリセリド含量および GPDH 活性

塩化ベルベリン添加量 ($\mu\text{g/mL}$)	トリグリセリド量* (mg/mg 蛋白質)	GPDH 活性* (ユニット/ mg 蛋白質)
0	0.414 ± 0.001	6227 ± 451
0.5	0.264 ± 0.007	2446 ± 90
1.0	0.137 ± 0.017	675 ± 91
2.0	0.065 ± 0.003	96 ± 31

*測定値は3連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。トリグリセリド、GPDHとも、ベルベリンを添加しないものに比べ添加群において危険率0.05で有意であった。

ベルベリン濃度は、数 $\mu\text{g/mL}$ 相当であると推定される。

Yamazaki らは、正常および高脂血症マウスにオウバクのメタノール抽出物を経口投与すると、血漿トリグリセリド濃度が低下することを報告している¹¹⁾。この脂質低下作用はオウバク中のベルベリンによると推定している。本研究においてベルベリンが脂肪細胞のトリグリセリド合成を強く抑制したことは、高脂血症マウスにおいてもトリグリセリドの生合成をベルベリンが抑制している可能性を示唆する。キハダが実験動物の脂質代謝にどのように影響するかを今後詳しく検討する必要があると考えられる。

3. 要 約

キハダ内皮の抽出物、およびキハダに含まれる有効成分のひとつであるベルベリンに分化誘導したマウス 3T3-L1 細胞へのトリグリセリド蓄積を抑制する作用を見いだした。キハダ抽出物およびベルベリンは、細胞へのトリグリセリドの蓄積を抑制するとともに、トリグリセリド合成に関連した細胞内酵素 GPDH の活性を強く抑制した。

文 献

- 1) 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 新本洋士, 農産物のラジカル消去能の検索, 日食工誌, **49**, 257-266 (2002).
- 2) Kimura, T., Suzuk, M., Takenaka, M., Yamagishi, K. and Shinmoto, H. L-O-Caffeoylhomoserine from *Matteuccia struthiopteris*, *Phytochemistry*, **65**, 423-426 (2004).
- 3) 新本洋士, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 東北地域で生産される野菜および山菜類の抗変異原性試験, 日食工誌, **49**, 736-739 (2002).
- 4) 新本洋士, 木村俊之, 鈴木雅博, 山岸賢治, 東北地域農産物のマウス白血球細胞増殖に対する作用, 日食工誌, **48**, 787-790 (2001).
- 5) Iwashita, K., Yamaki, K. and Tsushida, T., Effect of flavonoids on the differentiation of 3T3-L1 adipocytes, *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 154-160 (2001).
- 6) Iwashita, K., Yamaki, K. and Tsushida, T., Mioga (*Zingiber mioga* Rosc.) extract prevents 3T3-L1 differentiation into adipocytes and obesity in mice, *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 164-170 (2001).
- 7) Shoji, T., Kobori, M., Shinmoto, H., Yanagida, A., Kanda, T. and Tsushida, T. Inhibitory effects of apple polyphenols on differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes, *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 119-121 (2000).
- 8) 林 良興, 樹木の成分と効用—キハダ, 森林総合研究所報, **63**, 6 (1993).
- 9) Mizuno, M., Tanaka, T., Namba, T. and Takahashi, S. A botanical origin and berberine content of indo-obaku (*Berberis asiatica*). 生薬学雑誌, **39**, 71-75 (1985).
- 10) 梶 勝次, 佐藤孝夫, 山岸 喬, 中野道晴, キハダ内皮のベルベリン含量の個体および産地間差異, 北海道林業試験場研究報告, **27**, 84-91 (1989).
- 11) Yamazaki, T., Miura, T., Kako, M., Ishihara, E., Usami, M. and Tanigawa, K., Effect of methanol extract of *Phellodendri cortex* on lipid metabolism in normal and hyperlipidemic mice, *Natural Medicines*, **50**, 417-419 (1996).

(平成 17 年 5 月 6 日受付, 平成 17 年 7 月 22 日受理)