

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

ナタナン・ヌキトランサン

題 目

沖縄産薬草ボタンボウフウの抗肥満作用に関する研究  
(Studies on the anti-obesity activity of Okinawan medicinal plant  
“*Peucedanum Japonicum Thanb*”)

近年日本では、高齢化の進展とともに、食生活の乱れ、運動不足、ストレスなどを原因とした生活習慣病（高脂血症、高血圧、糖尿病、動脈硬化症など）の罹患率の上昇が懸念されている。これら生活習慣病に対して肥満、特に腹腔内脂肪の蓄積は重要な危険因子であることから、安全な肥満改善食材の開発が強く求められている。

ボタンボウフウ (*Peucedanum Japonicum Thanb*) は沖縄県で伝統的に野菜/薬草として食されており、防腐、抗血小板、抗アレルギー、鎮痛作用といった生理作用が報告されている。また、伝承的に抗肥満効果があるとされているが、実験的にこれを検証した報告はない。本研究は抗肥満効果を有する機能性食品の開発を目的として、ボタンボウフウの抗肥満作用についてマウスを用いて検討した。

まず、抗肥満効果及び肝臓と脂肪組織における遺伝子発現に及ぼすボタンボウフウの影響を評価した。10%のボタンボウフウ粉末を含有する高脂肪食を4週間投与した肥満モデルマウスにおいて、以下の影響が観察された。①血清中の中性脂肪、レプチン濃度、内臓脂肪蓄積及び脂肪細胞サイズが有意に減少した。②糞中への中性脂肪及びコレステロールの排泄は増加するが、胆汁酸の排泄は減少した。③肝臓において、*PPP1R10*、*RORC*、*PBEFT*遺伝子の発現が増加し、*DUSP1*、*INSIG2*、*SERPINA12*の発現は低下した。④脂肪組織において、*PPAR $\gamma$* 、*FXR $\alpha$* 、*DGAT1*、*ATGL*遺伝子の発現が上昇した。これらの結果は、ボタンボウフウが脂肪吸収の抑制と脂肪酸代謝の活性化により、脂肪蓄積を抑制する一方、脂肪細胞分化を促進し、インシュリン抵抗性を改善する作用があることを示唆すると考えられた。

次いで、ボタンボウフウを水、50%エタノール及びエタノールで抽出し、これら抽出物の影響を比較検討した。抽出物の中、エタノール抽出物にボタンボウフウ粉末と同様の抗肥満作用及び肝臓及び脂肪組織における遺伝子発現への影響が認められた。さらに、エタノール抽出物は筋肉における*UCP3*の発現を上昇させたことから、筋肉におけるエネルギー産生を活性化することも示唆された。これらの結果より、ボタンボウフウにはエタノールに可溶の抗肥満作用を有する低分子有機天然物が存在することが明らかとなった。

最後に、レプチン遺伝子が欠損している肥満・タイプ2糖尿病モデルマウスであるC57BL/6J Ham Slc-*ob/ob*を用いて、ボタンボウフウの抗肥満作用を検証した。エタノール抽出物は糖尿病モデルマウスにおいても高脂肪食肥満モデルマウスの場合と同様に抗肥満作用を発揮した。さらに、血清中のグルコースとインシュリン濃度を有意に低下させ、インシュリン抵抗性を改善することが確認された。

これらの高脂肪食肥満モデルマウス及び糖尿病モデルマウスにおける成果は、ボタンボウフウが安全な肥満及び糖尿病の改善食材となることを初めて実験的に明らかにしたものと判断された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Natthanan Nukitrangsan
題 目	<p style="text-align: center;">Studies on the anti-obesity activity of Okinawan medicinal plant  <i>“Peucedanum Japonicum Thunb”</i>          (沖縄産薬草ボタンボウフウの抗肥満作用に関する研究)</p>
<p>In recent years, obesity has become one of the most prevalent health issues among developed countries, including Japan. Therefore, it is very important to establish strategies for prevention of obesity. <i>Peucedanum japonicum</i> Thunb (PJT), a medicinal plant belonging to the family of Umbelliferae, grows on the cliffs of Okinawa Island have been used as a folk medicine for cold and neuralgic diseases in Taiwan. Our previous study also found that PJT inhibited high-fat-induced obesity in mice with decrease in body weight. However, the anti-obesity mechanism action of PJT is poorly understood. The aim of this study was to explore the anti-obesity mechanism of PJT, and to identify the anti-obesity component in PJT.</p> <p>The first experiment examined the effect of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunb (PJT) intake on the obesity and gene expression of mice that were fed a high-fat diet. This study focused on the liver and the adipose tissues as well as the genes related to metabolic syndrome. The intake of 10% PJT for 4 weeks significantly reduced serum triglyceride (TG), leptin, abdominal fat, and adipocyte size. PJT also significantly increased the fecal excretion of TG and total cholesterol, and decreased that of bile acid. The microarray analysis on 324 metabolic syndrome-related genes found a significant upregulation of <i>PPP1R10</i>, <i>RORC</i>, and <i>PBEF1</i> genes and downregulation of <i>DUSP1</i>, <i>INSIG2</i>, and <i>SERPINA12</i> genes in the liver. These changes were indicative of increased fatty acid oxidation and insulin sensitivity in the livers of PJT-fed mice. PJT increased the expression of <i>PPAR<math>\gamma</math></i>, <i>FXR<math>\alpha</math></i>, <i>DGAT1</i>, and <i>ATGL1</i> genes in the adipose tissue, which suggested an enhancement of adipocyte differentiation.</p> <p>Second experiment studied the anti-obesity activity of PJT extract to confirm the occurrence of anti-obesity phytochemicals in PJT. Animals were thus fed modified-AIN76 diet supplemented with PJT-powder, -water extract, -50% ethanol extract or -ethanol extract. Of the extract, ethanol-extract of PJT decreased the fat accumulation and adipocyte size, serum and liver triglyceride concentration, and inhibited the obesity. This finding clearly demonstrated the occurrence of anti-obesity phytochemicals in PJT. Ethanol-extract inhibited the lipase activity <i>in vitro</i>. Modulation of gene expression by ethanol-extract was largely similar to that by PJT powder in liver and adipose tissues: upregulation of <i>RORC</i>, <i>PBEF1</i>, and downregulation <i>DUSP1</i>, <i>INSIG2</i> and <i>SERPINA12</i> in the liver, while upregulation of <i>FXR<math>\alpha</math></i> and <i>PPAR<math>\gamma</math></i> and downregulation of <i>PEG1/MEST</i> that is the size-marker of adipocyte in the adipose tissue. Furthermore, the ethanol-extract increased the expression of <i>UCP3</i> gene in muscle. These results suggested that the anti-obesity phytochemicals in PJT exerted the lipid lowering activity by inhibition of fat absorption and by modulation of the obesity-related gene expression in liver, adipose tissue and muscle.</p> <p>Finally, the anti-obesity activity of PJT extract was evaluated with obese diabetic animal model C57BL/6J Ham <i>Slc-ob/ob</i> mice. The ethanol-extract of PJT also manifested its anti-obesity activity in the obese diabetic mice as was the case for normal obese animal model. Furthermore, PJT extract improved the insulin sensitivity in this diabetic animal model. These findings in both normal and mutant mice suggested that the PJT may become of safe anti-obesity agent.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Natthanan Nukitrangsan
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学教授 高野 亮
	副査 佐賀大学教授 柳田晃良
	副査 琉球大学教授 和田浩二
	副査 鹿児島大学教授 侯 徳興
審査協力者	
題 目	<b>Studies on the anti-obesity activity of Okinawan medicinal plant</b> <b>“<i>Peucedanum Japonicum</i> Thunb”</b> (沖縄産薬草ボタンボウフウの抗肥満作用に関する研究)
<p>近年日本では、高齢化の進行とともに、食生活の乱れ、運動不足、ストレスなどを原因とした生活習慣病（高脂血症、高血圧、糖尿病、動脈硬化症など）の罹患率の上昇が懸念されている。これら生活習慣病に対して肥満、特に腹腔内脂肪の蓄積は重要な危険因子であることから、安全な肥満改善食材の開発が強く求められている。</p> <p>ボタンボウフウ（<i>Peucedanum Japonicum</i> Thunb）は沖縄県で伝統的に野菜／薬草として食されており、抗菌、抗血小板、抗アレルギー、鎮痛作用といった生理作用が報告されている。また、伝承的に抗肥満効果があるとされているが、実験的にこれを検証した報告はない。本研究は抗肥満効果を有する機能性食品の開発を目途として、ボタンボウフウの抗肥満作用についてマウスを用いて検討した。</p> <p>まず、抗肥満効果及び肝臓と脂肪組織における遺伝子発現に及ぼすボタンボウフウの影響を評価した。10%のボタンボウフウ粉末を含有する高脂肪食を4週間投与した肥満モデルマウスにおいて、以下の影響が観察された。①血清中の中性脂肪、レプチン濃度、内臓脂肪蓄積及び脂肪細胞サイズが有意に減少した。②糞中への中性脂肪及びコレステ</p>	

ロールの排泄は増加するが、胆汁酸の排泄は減少した。③肝臓において、PPP1R10、RORC、PBEF1遺伝子の発現が増加し、DUSP1、INSIG2、SERPINA12の発現は低下した。④脂肪組織において、PPAR $\gamma$ 、FXR $\alpha$ 、DGAT1、ATGL遺伝子の発現が上昇した。これらの結果は、ボタンボウフウが脂肪吸収の抑制と脂肪酸代謝の活性化により、脂肪蓄積を抑制する一方、脂肪細胞分化を促進し、インシュリン抵抗性を改善する作用があることを示唆すると考えられた。

次いで、ボタンボウフウを水、50%エタノール及びエタノールで抽出し、これら抽出物の影響を比較検討した。抽出物の中、エタノール抽出物にボタンボウフウ粉末と同様の抗肥満作用及び肝臓及び脂肪組織における遺伝子発現への影響が認められた。さらに、エタノール抽出物は筋肉におけるUCP3の発現を上昇させたことから、筋肉におけるエネルギー産生を活性化することも示唆された。これらの結果より、ボタンボウフウにはエタノールに可溶の抗肥満作用を有する低分子有機天然物が存在することが明らかとなった。

最後に、レプチン遺伝子が欠損している肥満・タイプ2型糖尿病モデルマウスであるC57BL/6J Ham Slc-*ob/ob*を用いて、ボタンボウフウの抗肥満作用を検証した。エタノール抽出物は糖尿病モデルマウスにおいても高脂肪食肥満モデルマウスの場合と同様に抗肥満作用を発揮した。さらに、血清中のグルコースとインシュリン濃度を有意に低下させ、インシュリン抵抗性を改善することが確認された。

これらの高脂肪食肥満モデルマウス及び糖尿病モデルマウスにおける成果は、ボタンボウフウが安全な肥満及び糖尿病の改善食材となることを初めて実験的に明らかにしたものと判断された。

以上の結果は、沖縄産薬草のひとつであるボタンボウフウの抗肥満効果を実験的に証明しており、沖縄発の機能性食品の開発に大きく貢献することが期待できる。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Natthanan Nukitrangsan
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学教授 高野 亮
	副査 佐賀大学教授 柳田晃良
	副査 琉球大学教授 和田浩二
	副査 鹿児島大学教授 侯 徳興
審査協力者	
実施年月日	平成24年 1月 27日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成24年1月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Natthanan Nukitragan
<p>[質問1] 抗肥満作用の原因として脂質吸収の抑制を挙げているが、脂質排泄量の差異は量的な面で抗肥満効果を十分説明できるか？</p> <p>[回答1] 排泄量の差異は一日当たり数mgであり、摂取脂質量の1%にも満たないことから、抗肥満効果を説明するには量的に不十分と考えられる。従って、吸収抑制以外の代謝面での影響が大きい可能性が高いと思われる。</p> <p>[質問2] ボタンボウフウ摂取群でエネルギー消費が高まっていることが示唆されているが、実際にエネルギー消費を測定する必要があるのではないか？</p> <p>[回答2] 代謝チャンバーを用いた実験で実測する必要があると考えている。将来的に検討したい。</p> <p>[質問3] エタノール抽出画分のポリフェノール類が有効成分であると判断しているようだが、どの成分が効いていると考えているか？</p> <p>[回答3] HPLC上で15のピークが確認されており、抗肥満効果との相関が最も高いピーク10が最も可能性が高いと考えている。</p> <p>[質問4] 遺伝子発現をリアルタイムPCRで計測しているが、マイクロアレイの結果と常に相関するか？</p> <p>[回答4] 必ずしも一致した結果は得られていない。本研究では両方の方法で再現される結果のみを採用した。</p> <p>[質問5] 遺伝子発現だけでなく、タンパク質レベルでの検討は行っているのか？</p> <p>[回答5] 本研究では遺伝子発現のみの解析に止まっている。今後ポイントを絞ってタンパク質レベルの解析も進めたい。</p> <p>[質問6] DUSP1 遺伝子が抑制されているが、MAPK経路に関与している遺伝子ではないか？その意味で興味ある結果と考えられるか？</p> <p>[回答6] ご指摘のとおりシグナル伝達系への影響は今後検討する必要があると考えている。</p> <p>[質問7] 高脂肪食条件下で実験が行われているが、普通の低脂肪食でのデータはあるのか？</p> <p>[回答7] 既に当研究室の別の学生が生化学パラメーターに関しては実験を終えている。遺伝子発現についてはデータとして発表はしていないが、糖尿病モデルマウスの実験において比較のため低脂肪食を摂取した正常マウスについての測定を行った。</p> <p>[質問8] ボタンボウフウは薬草として食されているのか？或いは野菜としての消費が多いのか？</p> <p>[回答8] 原則ハーブとして、つまり薬草としての利用が一般的だと思われる。</p> <p>[質問9] ポリフェノールのうち、メトキシ基をもつ化合物の関与があるのか？</p> <p>[回答9] 有効成分の構造に関してはまだ解析していないので現時点ではメトキシ基の寄与は明らかではない。</p> <p>[質問10] ボタンボウフウの有効成分が体内に吸収されて、いろんな代謝を動かしていると理解しているのか？</p> <p>[回答10] そうだと考えている。</p>	