プロシアニジンの高血糖・肥満予防効果に関する研究

神戸大学大学院農学研究科　山　下　陽　子

はじめに

近年，生活習慣病患者が急増しており，その基盤病態である肥満の予防・改善に有効な食品因子の探索およびその作用メカニズムの解明が世界的に求められている．カカオ豆，黒大豆種皮，りんご，ぶどう種子などの食品には，(+)-カテキンや(−)-エピカテキンが重合したポリフェノールであるプロシアニジンが多く含まれている（図1）．プロシアニジンは，水酸基の多さから，抗酸化性が高いと期待できるが，消化管からほとんど吸収されず，生体利用性やその作用メカニズムについて十分に解明されていない．そこで，本研究ではプロシアニジンの(1) 高血糖予防効果とその作用メカニズム，(2) 肥満予防効果とその作用メカニズムについて検討を行い，新奇分子ターゲットが関わっていることを明らかにした．

1.　プロシアニジンの高血糖予防効果とその作用メカニズム

1-1.　プロシアニジンのGLUT4細胞膜移行促進に及ぼす影響

プロシアニジン高含有食品素材であるカカオリカー抽出物は，マウスに経口投与した後に糖（グルコース）負荷試験（OGTT）を行うと，糖負荷による一過的な血糖値の上昇を有意に抑制することを見出した (1)．その作用メカニズムとして，運動や筋委縮で活性化される AMP-activated protein kinase（AMPK）のリン酸化が筋肉組織で起こり，結果として糖輸送担体（GLUT）4の細胞膜移行が促進され，血中グルコースを筋肉細胞に取り込むことで高血糖を抑制したことが強く示唆された (1)．また，プロシアニジン高含有カカオ抽出物は，30%ラード添加高脂肪食を14週間摂取させた食事誘導性肥満モデルマウスの高血糖に対しても，筋肉組織における AMPK 経路を介した GLUT4 の細胞膜移行促進により，慢性的な空腹時高血糖やインスリン抵抗性を予防することを明らかにした (2)．ところで，黒大豆種皮から抽出したプロシアニジン高含有組成物（BE）は，プロシアニジンとアントシアンを主成分とするが，BE からアントシアンを除去し，プロシアニジンをより高濃度に濃縮した組成物（PCBE）を用いたところ，PCBE は BE より低濃度で高脂肪食によるインスリン抵抗性の惹起を抑制し，その作用機構には，筋肉における AMPK 経路の亢進を介した GLUT4 の細胞膜移行が関わることが明らかとなった．

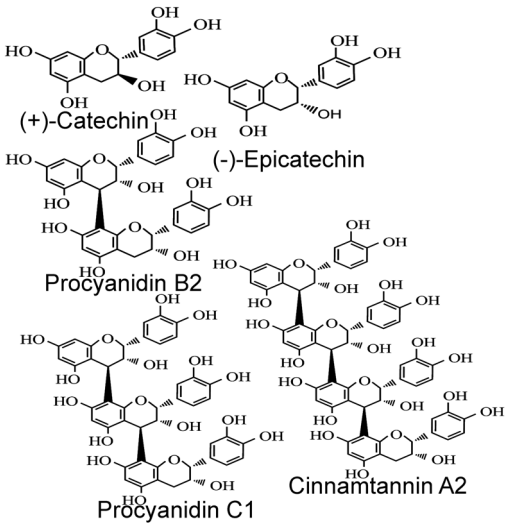

図1.　プロシアニジンの構造例

次に，単量体であるエピカテキンとプロシアニジン（2〜4量体）の精製物を用いてマウスへの投与実験を行ったところ，いずれの化合物も OGTT での高血糖を抑制し，その効果は4量体までは重合度依存的であった．また，筋肉組織における AMPK のリン酸化と GLUT4 の細胞膜移行も重合度依存的であった (3)．さらに，L6筋管細胞で同様の結果が得られた (4)．以上のことから，プロシアニジンの高血糖抑制効果には，AMPK が鍵分子として作用していることが明らかとなった．しかし，重合度の高いプロシアニジンは，ほとんど体内に取り込まれない．実際に血中のプロシアニジン量を HPLC を用いて測定したところ，重合度依存的に体内での存在量が少ないことが分かった (3)．体内に吸収されないにも関わらず，高重合なプロシアニジンで強い高血糖抑制効果が認められた理由について，以下に示す．

1-2.　プロシアニジンによるインクレチン効果の発見

上述のように，重合度の高いプロシアニジンは吸収されにくいにもかかわらず高血糖予防効果を発揮したのは，化合物が体内へ吸収された後に組織で作用したとは考えにくい．そこで，血中に吸収される前段階である消化管で作用を発揮している可能性が高いのではないかと推測し，着目したのがインクレチン効果である．インクレチンは，腸管L細胞から分泌される消化管ホルモンであり，インスリン分泌を促す働きを持つ．プロシアニジンが消化管から分泌されるインクレチンホルモンの glucagon like peptide-1（GLP-1）の分泌促進を介してインスリン分泌増強作用を示すか否かを検討した．プロシアニジン化合物を単回強制経口投与したところ，プロシアニジン4量体で有意な GLP-1 分泌量増加効果が認められた (5)．これに伴って，インスリン分泌も同様に有意な増加を示した．その下流のインスリンシグナル伝達経路が筋肉組織において促進していることも確認した (3，5)．これらの作用は，L6筋肉細胞にプロシアニジンを直接作用させた際には認められず (4)，動物実験においてのみ認められたことから，プロシアニジンは消化管でのインクレチン効果を介して高血糖の抑制に関与していることが強く示唆された．すなわち，プロシアニジンは AMPK のリン酸化を介した筋肉に作用して GLUT4 を細胞膜移行させるだけでなく，体内に吸収されなくても，腸管においてインクレチンホルモンである GLP-1 を分泌させて，それが膵β細胞に作用してインスリンを分泌させることで高血糖抑制に寄与することが明ら

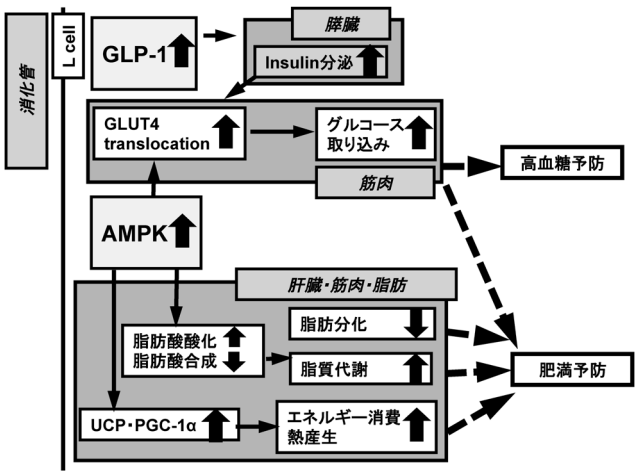

図2. プシアニジンの高血糖・肥満予防効果とそのメカニズム

かとなった（図2）.

2. プロシアニジンの肥満予防効果とその作用メカニズム

プロシアニジンを高含有するカカオ豆や黒大豆種皮抽出物は，高血糖予防効果でも鍵分子となるAMPKの活性化を介して，その下流における体熱産生やエネルギー産生に関連する因子のuncoupling proteins（UCPs）や，ミトコンドリア発生に関連するperoxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha（PGC-1α）の発現を脂肪組織や筋肉，肝臓において増加させることを明らかにした．ポリフェノール高含有食品素材がUCPsの発現を増加させることを見出したのは，本研究が初めてである（2，6）．本来は褐色脂肪組織に発現しているUCP1が白色脂肪細胞でも増加していることも明らかにし，このことは白色脂肪の分化過程の途中で，褐色脂肪のフェノタイプを有した細胞であるベージュ脂肪細胞が発現していることが強く示唆された（2）．さらに，AMPKの活性化はアディポネクチンの分泌促進が正の制御を担っていることも明らかにした（2）．また，黒大豆種皮から抽出したBEをマウスに摂取させると，白色ならびに褐色脂肪組織でのUCPsの発現を増加させるとともに，肥満によって増加する炎症性サイトカインの発現を遺伝子レベルで抑制し，脂肪酸酸化に関連する遺伝子発現を増加させた（6）．これらの効果が複合的に作用することで，プロシアニジン高含有組成物は高脂肪食摂取による肥満惹起の抑制に寄与することが判った（図2）.

3. プロシアニジンによる高血糖ならびに肥満抑制効果と時計遺伝子との関係

全ての生物は，24時間の地球の自転周期に対応した概日リズムで生体を調節し，恒常性を維持している．この概日リズムを制御するのが，生体内に発現する時計遺伝子である．時計遺伝子は，概日リズムを刻むだけでなく，エネルギー代謝を始め，様々な生理機能と深く関係している．近年では，摂取に適した時間に栄養素を摂る，時間栄養学という考え方が注目されている．上記1，2で述べたプロシアニジンの高血糖・肥満抑制効果に関しても，投与するタイミングによって効果に差があるのかどうかを検証したところ，興味深いことに，明期に投与した場合と，暗期に投与した場合で，高血糖抑制効果に差があり明期開始時にプロシアニジンを投与した時に，高血糖抑制効果が最も強いことが明らかとなった．脂肪蓄積抑制効果に関しても，同様の結果が得られた．これらの効果の差に，時計遺伝子が関わっているか否かについて検証したところ，主な時計遺伝子である，*Bmal1*と*Per*がプロシアニジンの投与するタイミングによって変化することが明らかとなり，鍵分子として関わっている可能性を示唆するデータを得た．つまり，プロシアニジンは時計遺伝子の発現に影響を及ぼすとともに，その制御下で高血糖・肥満抑制効果が発揮されるため，摂取に適した時間が存在する可能性があり，現在詳細に解明することに着手している．

おわりに

本研究では，プロシアニジンの高血糖と肥満抑制効果を発揮する作用機構の解明を行った．その結果，AMPKの活性化と消化管からのGLP-1分泌促進が鍵となっていることを明らかにした．今後は，これらの初発を担う分子ターゲットを究明したいと考えている．食品中に含まれる非栄養成分が腸に作用し，全身での代謝を制御することを見出したのは，生理機能を理解する上で重要な知見となる．この研究成果をさらに発展させ，さまざまな機能性食品成分探索とその作用機構解明を行い，ヒトの健康維持増進に貢献したいと考えている．

（引用文献）

1) Yamashita, Y. et al. Cacao liquor procyanidin extract improves glucose tolerance by enhancing GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscle. J Nutr Sci. 1, e2 (9 page) (2012).
2) Yamashita, Y. et al. Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. Arch Biochem Biophys. 527, 95–104 (2012).
3) Yamashita, Y et al. Procyanidin promotes translocation of glucose transporter 4 in muscle of mice through activation of insulin and AMPK signaling pathways. PLoS ONE. 11, e0161704 (2016).
4) Kurimoto, Y. et al. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. J Agric Food Chem. 61, 5558–5564 (2013).
5) Yamashita, Y. et al. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 activity and insulin secretion. Biosci Biotechnol Biochem. 77, 888–891 (2013).
6) Kanamoto, Y. et al. A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating uncoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. J Agric Food Chem. 59, 8985–8993 (2011).

謝　辞　本研究は，神戸大学大学院農学研究科応用生命科学専攻，応用生命化学講座，生物機能開発化学研究分野にて行われたものです．本研究の機会を与えていただくとともに，日々温かくご指導ご鞭撻を賜り，本賞にご推薦くださいました芦田均先生（神戸大学大学院教授）に心より厚く御礼申し上げます．また，本研究の発展に多大なるご支援とご指導を賜りました共同研究企業の株式会社明治，フジッコ株式会社の皆々様に感謝申し上げます．最後に，本研究を遂行するにあたり日頃よりサポートいただいた神戸大学大学院農学研究科の先生方，生物機能開発化学研究室のスタッフならびに学生の皆様に深く感謝いたします．