



神戸大学大学院農学研究科 山下陽子

## 難吸収性食品成分の組織間ネットワークを介した生理機能に関する研究

## はじめに

少子高齢化社会を迎えた我が国において、健康寿命の延伸が強く求められているが、日々の食事は健康の維持・増進に深く関与している。食品はさまざまな機能を有するが、近年は三次機能である生体調節機能が注目されており、生活習慣病予防・改善、抗がん、免疫促進、抗酸化、抗アレルギー、血流促進などの多くの機能が報告されている。本研究では、難吸収性のポリフェノールであるフラバン-3-オール類の機能性に着目した。プロシアニジン類は、カカオや黒大豆種子、シナモン、アップル、グレープシードなどの食品に多く含まれており、エピカテキンあるいはカテキンが重合した縮合型タンニンで、2~15量体として存在する(図1)。水酸基による抗酸化能に着目すれば、オリゴマーである

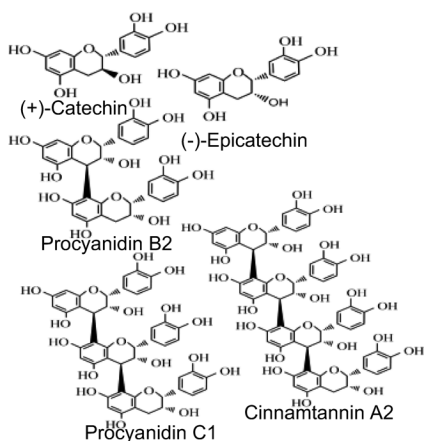


図1. プロシアニジンの構造例

プロシアニジンは抗酸化性が高いと期待できるが、重合度の高い高分子化合物は、血中への吸収率が大変低く、ほとんど体内に吸収され無いため生体利用性が低いと考えられていた。一方、「腸は第二の脳」と称され、脳からの制御とは独立して、あるいは腸からのシグナルが脳を支配することで、全身エネルギー代謝などの様々な生理機能を調節することが明らかになってきている。そこで、難吸収性のポリフェノールは、この消化管内でなんらかの作用を発揮し、腸と脳などの組織間ネットワークを介した代謝調節機構に影響をもたらすのでは無いかと考えた。また、生物は地球の自転周期に沿って、全身に組み込まれた時計遺伝子によって生み出される24時間周期の概日リズムが備わっており、生体機能を調節している。しかし、これまで報告されている食品の機能性に関して、この概日リズムを考慮した研究はほとんどなされていない。腸脳組織間ネットワークを主軸とした全身エネルギー代謝調節に概日リズムが関わる可能性について、その詳細な制御機構を分子レベルで明らかにするとともに、分子標的を見出すことは、時空間的な観点から食品の真の生体機能をとらえ、その全貌を明らかにできることが期待できると考え研究を行ってきた。

## 1. 難吸収性ポリフェノールが消化管ホルモン分泌に及ぼす効果

プロシアニジンは、上述の通り難吸収性であるにも関わらず、マウスにプロシアニジンを投与すると高血糖抑制が、単量体よりも高いことが明らかになった<sup>1)</sup>。そこで、これらの機能

の初発作用点が消化管にあるのではないかと考え、着目したのが消化管ホルモンである glucagon like peptide-1 (GLP-1) である。GLP-1 は消化管のL細胞から分泌されるインクレチンホルモンの一種であり、膵臓からのインスリン分泌を促進させるとともに、全身にさまざまな生理機能をもたらす。カカオ由来プロシアニジン高含有組成物 (CLPr) を単量体から3量体までの低重合画分と4量体以上の高重合画分に分離した組成物を用いた際、マウスに経口投与した場合、いずれの画分も GLP-1 を分泌することが判った<sup>2)</sup>。また、プロシアニジンは重合度依存的に GLP-1 分泌促進効果を発揮し、特に4量体の cinnamtannin A2 が強い効果を示した<sup>3)</sup>。

## 2. 難吸収性ポリフェノールの消化管シグナルを介した高血糖・肥満予防効果

上述のように、プロシアニジンによる GLP-1 分泌促進効果は、膵臓からのインスリン分泌を増加させ、糖負荷時の血糖上昇を抑制することを明らかにしたが、この際、血糖消費に関わる主要組織である骨格筋において、糖輸送担体4型 (GLUT4) が細胞膜上へと移行し、細胞内への糖取り込み量が増加することも確認した<sup>1)</sup>。そのシグナル伝達経路として、インスリン経路だけでなく、インスリン非依存的な経路であり、エネルギー代謝のマスターレギュレーターである AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 経路も関わっていた<sup>1)</sup>。この効果は、実験動物に経口投与した際にのみ認められるものであり、筋肉細胞に直接プロシアニジンを作用させた時には、インスリン経路は関与しなかった。一方、プロシアニジンで認められた AMPK の活性化に関しても、GLP-1 受容体阻害剤を前処理した場合に、その活性がキャンセルされたことから、AMPK を介したエネルギー代謝促進効果に関しても、GLP-1 が関与している可能性がある<sup>4)</sup>。以上のことから、プロシアニジンの高血糖や肥満の抑制効果は、消化管からの GLP-1 分泌が初発となり、膵臓、筋肉、肝臓や脂肪へと伝わる組織間シグナル伝達ネットワークによることが考えられた。この効果は、プロシアニジンだけでなく、同じく難吸収性の紅茶ポリフェノールを経口投与した際にも、インスリン経路と AMPK 経路の活性化を介して、高血糖を抑制することを解明した<sup>5)</sup>。また、GLP-1 は迷走神経求心路を介して脳にシグナルが伝えられることにより、摂食抑制因子の発現を上昇させ、過食の抑制に寄与している。本研究においても、肥満モデルマウスのうち、レプチン欠損により過食が誘導される ob/ob マウスに黒大豆種皮由来プロシアニジン高含有組成物 (BE) を摂取させると、過食の抑制を介して、体重増加と脂肪の蓄積が抑制されることが判った。この際にも、血中の GLP-1 分泌量が増加していた。このような現象は、健常マウスでは認められなかった。以上のことから、プロシアニジンは消化管からの GLP-1 分泌が初発となり、臓器間シグナルネットワークを介して、高血糖や肥満予防に寄与することが判った。

### 3. 難吸収性ポリフェノールの消化管シグナルを介した血管機能向上効果

血管機能の低下は、心血管疾患や動脈硬化発症の基盤となる。一酸化窒素(NO)は、血管拡張に寄与することで、これらの疾病発症のリスク低減に寄与する因子の一つである。GLP-1は、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化し、NO分泌を増加させることで血管機能や心機能の向上に寄与することが知られている。その作用機構は、GLP-1が血管内皮細胞上に発現しているGLP-1受容体に結合することで、細胞内のcyclic AMP(cAMP)を上昇させて、その下流でeNOSの活性化を介してNOの分泌を促進する。本研究ではBEをラットに投与すると、GLP-1分泌を介して血管内皮細胞内のcAMPの上昇とeNOSの活性化をもたらす、NO分泌が促進されることを明らかにした<sup>6)</sup>。GLP-1受容体阻害剤の前処理によって、これらの効果はキャンセルされた。また、血管内皮細胞であるHUVECにプロシアニジンを直接作用させた場合、あるいは腸管モデルのCaco-2とHUVECの共培養システムを用いてプロシアニジンを作用させた場合には、ラットの経口投与で認められたような作用機構とは異なっていた<sup>7)</sup>。以上のことから、NO産生効果に関しても動物個体ではGLP-1が上流のシグナル分子として重要な役割を果たしていることが示唆された。プロシアニジンのNO上昇を介した血管機能向上効果は、ヒト介入試験でも確認できた<sup>8,9)</sup>。

### 4. 難吸収性ポリフェノールと概日リズムリズムとの関係

次に、概日リズムを考慮し、ポリフェノールを投与するタイミングを変えた場合に、機能性発現に影響をもたらすか、また、いつ摂取することが最も効果的かについて解明を試みるとともに、それと体内時計との関わりについて検証した。明暗周期が12時間ごとの環境でマウスを飼育した。以下、明期の開始時刻をZeitgeber Time(ZT)0と表す。ZT1とZT13にそれぞれカカオ由来プロシアニジン高含有組成物(CLP<sub>r</sub>)を単回経口投与した後、糖負荷試験を実施したところ、ZT1では高血糖抑制効果が認められたが、ZT13ではその効果が認められなかった<sup>10)</sup>。GLP-1分泌促進効果も同様の傾向を示した。この時、時計遺伝子の発現を解析したところ、ZT1は、主要な時計遺伝子の1つである*Brain and Muscle Arnt-like Protein-1(Bmal1)*の発現量が高いタイミングであった。*Bmal1*は、ヒトの睡眠期開始ごろから発現量が増加し、夜間でのエネルギー代謝の低下や脂肪蓄積の増加に関わることが知られている因子である。CLP<sub>r</sub>は、睡眠期頃に誘導される代謝低下に伴う急激な血糖値の上昇に対して、強い抑制効果を発揮するが、活動期のエネルギー代謝が活発な時間帯には血糖値を下げる効果を発揮せず、低血糖を起こすリスクも低いことが判った。また、CLP<sub>r</sub>はGLP-1とインスリンの分泌促進を介して、肝臓や筋肉における時計遺伝子の発現を変化させることが判った<sup>4)</sup>。これらの時計遺伝子の発現調節作用は、GLP-1受容体阻害剤の前処理によってキャンセルされた。これらのことから、GLP-1の分泌能は時計遺伝子が支配する概日リズムの影響を受けながら、逆に、時計遺伝子の発現にも関わることから、GLP-1と時計遺伝子は相互に制御し合っていることが示唆された<sup>10)</sup>。以上のことから、プロシアニジンの生体調節機能は、概日リズムの影響を受け、効果的な摂取タイミングがあることが判った。

### おわりに

本研究は、プロシアニジンの難吸収性という特性に着目して、それが体内に吸収される前に、消化管への作用が初発とな

り、全身の組織との緻密なシグナルネットワークによって機能発現に繋がることを見出すとともに、この効果が概日リズムとも深く関わりを持つことを見出した。得られた成果は、生体における食品成分での真の機能を時空間的にとらえようとしている点で新奇性があり、食品機能性研究分野において重要な知見になるものであると考えている。今後も、生体内で起こる様々な生理現象を網羅的にとらえた研究を展開し、健康長寿の延伸に貢献しうる食品機能学的基礎研究のさらなる発展に精進していきたい。

### (引用文献)

- 1) Yamashita Y, Wang L, Nanba F, 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).
- 2) Yamashita Y, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Cacao liquor procyanidins prevent postprandial hyperglycemia by increasing glucagon-like peptide-1 activity and AMP-activated protein kinase  $\alpha$  phosphorylation in ICR mice. *J Nutr Sci*. 8, e2, 1-9 (2019).
- 3) Yamashita Y, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 activity and insulin secretion. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77, 888-891 (2013).
- 4) Hironao KY, Mitsuhashi Y, Huang S, Oike H, Ashida H, Yamashita Y. Cacao polyphenols regulate the circadian clock gene expression and through glucagon-like peptide-1 secretion. *J Clin Biochem Nutr*. 67, 53-60 (2020).
- 5) Yamashita Y, Wang L, Tainshun Z et al. Fermented tea improves glucose intolerance in mice by enhancing translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle. *J Agric Food Chem*. 60, 11366-11371 (2012).
- 6) Domae C, Nanba F, Maruo T et al. Black soybean seed coat polyphenols promote nitric oxide production in the aorta through glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal cells. *Food Funct*. 10, 7875-7882 (2019).
- 7) Domae C, Ashida H, Yamashita Y. Black soybean seed coat polyphenols promote nitric oxide production in the aorta through the Akt/eNOS pathway. *Funct Foods Health Dis*. 10, 330-343 (2020).
- 8) Yamashita Y, Wang L, Nakamura A et al. Black soybean improves the vascular function through an increase in nitric oxide and a decrease in oxidative stress in healthy women. *Arch Biochem Biophys*. 30, 688, 108408 (2020).
- 9) Yamashita Y, Nakamura A, Nanba F et al. Black Soybean Improves Vascular Function and Blood Pressure: A Randomized, Placebo Controlled, Crossover Trial in Humans. *Nutrients* 12, 2755 (2020).
- 10) Hironao KY, Ashida H, Yamashita Y. The cacao procyanidin extract-caused anti-hyperglycemic effect was changed by the administration timings. *J Clin Biochem Nutr*. 67, 61-66 (2020).

**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、日々温かくご指導を賜りました芦田均先生(神戸大学大学院教授)に心より厚く御礼申し上げます。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者の皆様へ感謝申し上げます。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。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長入江一浩先生(京都大学大学院教授)に厚くお礼申し上げます。