

平成 31 年 2 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21349

研究課題名(和文) インスリン抵抗性改善食品因子を利用した健全な脂質筋の作製と栄養生理学的利点の解明

研究課題名(英文) Production and nutritional aspects of fat containing skeletal muscles using food materials to improve insulin resistance

研究代表者

落合 優 (Ochiai, Masaru)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80750546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋脂質の過剰蓄積は2型糖尿病の発症要因であるが、インスリン感受性が高い持久系アスリートの筋脂質蓄積量は比較的多い。この相反する事象は糖尿病学分野において注目すべき研究対象である。アディポネクチンの産生および分泌を司るペロオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR $\alpha$ )を活性化させる食品因子として黒ショウガのエタノール抽出画分を見出し、実験動物を用いて検討を行ったところ、黒ショウガエタノール抽出画分はPPAR $\alpha$ に対する強いアゴニスト様作用を有するが、抗2型糖尿病作用はPPAR $\alpha$ による作用だけではないこと、脂質筋を作成する食品因子として、5,7-ジメトキシフラボン是有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Muscular fat accumulation can lead to the onset of type-2 diabetes mellitus, but fat content is highly accumulated in muscles of endurance athlete. This is well called "athlete paradox". As a PPAR $\alpha$  agonist to stimulate adiponectin production and its secretion, ethanol extract of Kaempferia parviflora was selected. From the animal studies using a PPAR $\alpha$  agonist and its antagonist, ethanol extract of Kaempferia parviflora showed PPAR $\alpha$  agonistic activities and improved glucose tolerance without excess fat accumulation in skeletal muscles. These results can indicate that the anti-type-2 diabetes mellitus effects were caused by not only the activation of PPAR $\alpha$  but also other mechanisms. And, as food factors to produce fat containing muscles, 5, 7-dimethoxyflavones were also one of effective.

研究分野：食品科学

キーワード：インスリン抵抗性 PPAR $\alpha$  黒ショウガ 骨格筋 脂質 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

骨格筋内脂質の過剰蓄積はインスリン抵抗性および2型糖尿病の発症要因の一つであり、日本人に多く見られる非肥満型2型糖尿病の特徴でもある(1)。一方で、骨格筋内脂質は持久運動時の主要エネルギー源の一つであり、インスリン感受性が高い持久系アスリートの骨格筋内脂質蓄積量は比較的多いことが報告されている(2)。この相反する事象は“アスリートパラドックス”と称され、インスリン抵抗性・2型糖尿病に対する骨格筋内脂質過剰蓄積の善悪の検証が行われている。このことは脂肪組織や肝臓における脂質の過剰蓄積がインスリン抵抗性を増悪させることは対照的であり、インスリン抵抗性状態の骨格筋における脂質代謝を明らかにすることは、インスリン抵抗性および2型糖尿病の改善・発症予防方策として新規で有益なものになると期待される。本研究では、脂肪細胞から分泌されインスリン抵抗性を改善する作用を有するアディポネクチンに着目し、アディポネクチンの産生および分泌を司るペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) に対する結合を食品因子で高める手法を検討することとした。

PPAR $\gamma$  は主に脂肪組織に高発現し、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴って発現量が増加する因子である。脂肪組織における PPAR $\gamma$  の標的遺伝子としてはアディポネクチン、脂肪酸不飽和化酵素、脂肪酸結合タンパク質、CD36、脂肪酸輸送タンパク質などがあり、これらのタンパク質の遺伝子発現は PPAR $\gamma$  をノックアウトまたは抑制すれば弱くなり、活性化すれば強くなる(図1)。

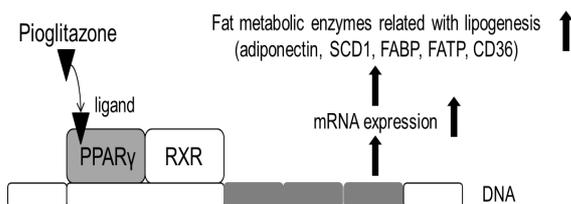


図1 PPAR の転写促進作用と関連遺伝子

PPAR の標的遺伝子としてはアディポネクチン、ステアロイル CoA デサチュラーゼ、脂肪酸結合タンパク質、CD36、脂肪酸輸送タンパク質などがある。PPAR アゴニスト(ピオグリタゾン)は脂肪組織における脂質合成および蓄積を高めるが、同時にアディポネクチンの産生および分泌を亢進させるため、インスリン抵抗性惹起因子を抑制する働きが期待されている。

PPAR $\gamma$  の活性化因子は脂肪組織における脂質合成および蓄積を高めるが、同時にアディポネクチンの産生および分泌を亢進させるためインスリン抵抗性惹起因子を抑制する働きが期待されている。一方で、PPAR $\gamma$  は骨格筋においても発現しているが、PPAR $\gamma$  アゴニストが骨格筋脂質蓄積を活性化するか否か、また、そのことが脂質代謝系を活性化

するか否かについての報告は少ない。先行研究(3)において、PPAR $\gamma$  アゴニストである医薬化合物のピオグリタゾンを高脂肪食給餌ラットに8週間投与したところ、耐糖能の改善とともに骨格筋脂質蓄積の増加と脂質合成系酵素活性指標(脂肪酸不飽和化酵素)の亢進および相関性を確認した。

ピオグリタゾンと同様の作用を有する PPAR $\gamma$  活性化食品素材および食品由来化合物を探索する段階で PPAR のリガンド活性化能を有するメトキシフラボノイド化合物(4)に焦点を当て、黒ショウガ(*Kaempferia parviflora*)に着目し、その活性本体の同定や生理機能についての研究を食品科学的また生化学的手法を用いて実施してきた。

2. 研究の目的

本研究では、PPAR のリガンド結合能を有する黒ショウガ中の機能性成分を同定すること、実験動物の骨格筋における脂肪蓄積能と耐糖能の改善作用を中心に検討した。

3. 研究の方法

(1) PPAR のリガンド結合能を有する黒ショウガ中の成分分析

黒ショウガ粉末を水、熱水、メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチルおよびヘキサンで一晩抽出し、抽出液を凍結乾燥または揮発させ、乾固物を得た。乾固物を DMSO で希釈し、PPAR のリガンド活性化能を評価する試料を得た。また、各乾固物に含まれるポリメトキシフラボノイド類を HPLC 分析により定量した。

(2) PPAR のリガンド結合能を活性化する黒ショウガエタノール抽出物を用いた耐糖能改善試評価

黒ショウガ(1%)および黒ショウガエタノール抽出物(0.19%、回収率から決定)を高脂肪高シヨ糖食に混合し、2型糖尿病モデル Nagoya-Shibata-Yasuda マウス(5週齢、雄)に8週間自由給餌した。陽性対照としてピオグリタゾン化合物(3 mg/kg/day o.p.)を設定した。飼育6週間終了後に経口グルコース負荷試験(OGTT)、飼育7週間終了後に腹腔インスリン負荷試験(ITT)を実施し、それぞれ血糖値の推移について検討した。飼育8週間終了後に解剖を行い、骨格筋、血液などの生体試料を採取し、2型糖尿病の発症に関する血中指標、骨格筋脂質蓄積を評価した。

(3) PPAR アンタゴニストを用いた評価

黒ショウガエタノール抽出物による効果が PPAR による作用であるかどうかについて検討をするため、PPAR アンタゴニストを用いた評価を実施した。PPAR アンタゴニス

トにはBADGE(和光純薬工業製)を用いた。黒ショウガエタノール抽出物(0.19%)を高脂肪高シヨ糖食に混合し、2型糖尿病モデルNSYマウスに8週間自由給餌した。BADGEは30mg/kg/dayを毎日腹腔内投与した。陽性対照としてピオグリタゾン化合物(3mg/kg/day o.p.)を投与した。飼育6週間終了後にOGTT、飼育7週間終了後にITTを実施し、それぞれ血糖値の推移について検討した。飼育8週間終了後に解剖を行い、骨格筋、血液などの生体試料を採取し、(2)と同様に評価した。

(4)黒ショウガエタノール抽出画分に含まれるPPARアゴニストである5,7-ジメトキシフラボンを用いた評価

黒ショウガエタノール抽出物による耐糖能改善作用がPPARアゴニストである5,7-ジメトキシフラボンによるものであるかどうかについて検討した。5,7-ジメトキシフラボンは純品試薬を用いた。高脂肪高シヨ糖食に0.02%の5,7-ジメトキシフラボンを混合し、NSYマウスを用いておよびと同様に評価した。

#### 4. 研究成果

(1)PPARのリガンド結合能を有する黒ショウガ抽出物の成分分析

図2に各抽出物のPPARリガンド結合能の結果を示した。中でも有機溶媒(エタノール、アセトン、酢酸エチル、メタノール)で抽出した画分により用量依存的にリガンド結合能が強くなること示唆された。5,7-ジメトキシフラボノイドもピオグリタゾンと同様にPPAR $\gamma$ に対する結合能を強く有する化合物であった。黒ショウガエタノール抽出画分のHPLCクロマトグラムより、規格成分である5,7-ジメトキシフラボノイドを含め、その他のメトキシフラボノイドが多く含まれていることが示された。

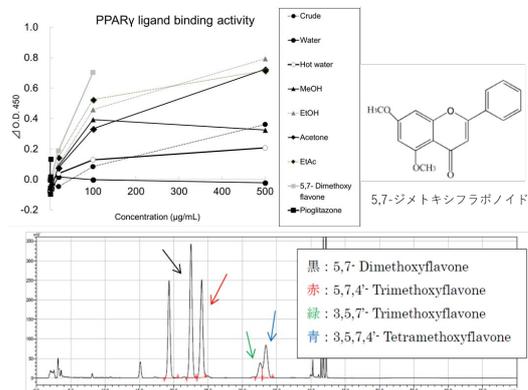


図2 黒ショウガによるPPARリガンド結合能と活性化化合物

PPARリガンド結合能を評価した結果、黒ショウガのエタノール、メタノール、アセトン抽出画分に強い結合活性を有することが確認された(図左上)。エタノール抽出物のHPLCクロマトグラム(図下)には数種類のメトキシフラボノイド類が含まれることが示されている。5,7-ジメトキシフラボノイド(図右上)はその一つであり、ピオグリタゾンと同様にPPARリガンドに対する結合能を有する食品由来化合物である。

(2)PPARのリガンド結合能を活性化する黒ショウガエタノール抽出物を用いた耐糖能改善試評価

PPAR $\gamma$ 結合能が高い黒ショウガのエタノール抽出画分を2型糖尿病モデルNSYマウスに8週間給餌する試験を実施し、耐糖能を評価したところ、グルコース負荷後の血糖値上昇を顕著に抑制し、また、インスリン負荷後の血糖値を顕著に抑制した(図3)。

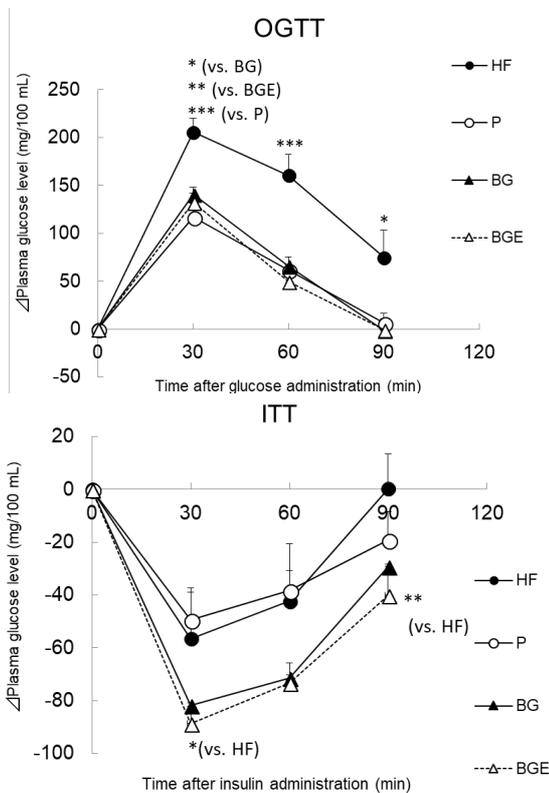


図3 黒ショウガのエタノール抽出物による耐糖能改善作用

グルコース負荷後の血糖値上昇およびインスリン負荷後の血糖値を抑制した。

一方で、PPAR $\gamma$ アゴニストの副作用として脂肪蓄積があるが、黒ショウガのエタノール抽出画分は脂肪組織(図は省略)、肝臓および骨格筋の脂質蓄積を低下させ、さらに血中アディポネクチン濃度は高値とはならなかった(図4)。

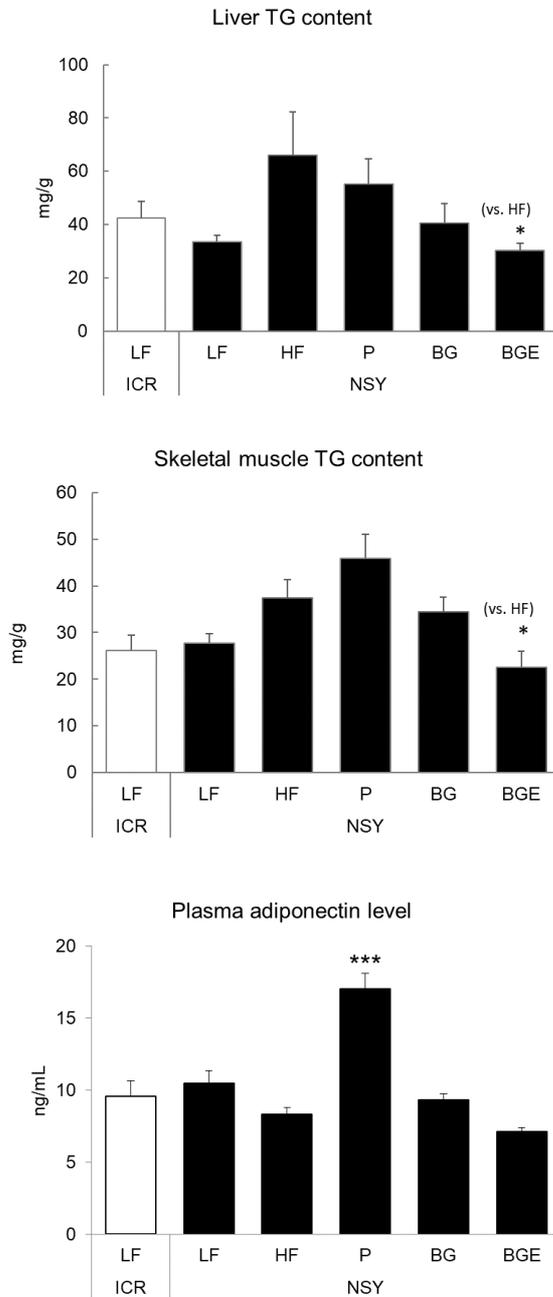


図 3 黒ショウガエタノール抽出物が血中アディポネクチン濃度および脂質蓄積抑制に及ぼす作用

血中アディポネクチン濃度は高値とはならず、骨格筋の脂質蓄積を低下させた。

この結果は PPAR $\gamma$  アゴニスト様以外の作用機序も兼ねてインスリン抵抗性を改善する可能性を示唆するものであることが示唆された。

(3) PPAR アンタゴニストを用いた評価

(2)の一端を証明するため、PPAR $\gamma$ のアンタゴニスト(BADGE)を用いた試験を行ったところ、BADGEは黒ショウガエタノール抽出画分の作用を打ち消すことなく、耐糖能

および組織脂肪蓄積を相加的に改善・低減化する結果となった(図3および一部図省略)。

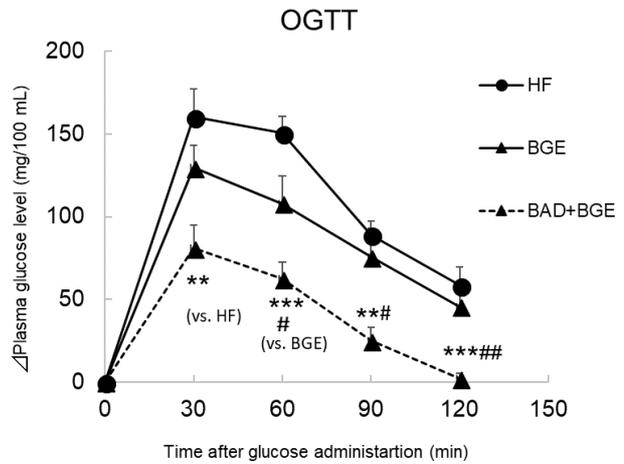


図 4 黒ショウガエタノール抽出物による耐糖能改善作用と脂質蓄積抑制作用

PPAR アンタゴニストの BADGE は黒ショウガエタノール抽出画分の作用を打ち消すことなく、耐糖能を相加的に低減させた。

(4) 黒ショウガエタノール抽出画分に含まれる PPAR アゴニストである 5,7-ジメトキシフラボンを用いた評価

黒ショウガのエタノール抽出画分の成分の一つである、5,7-ジメトキシフラボンを投与したところ、耐糖能は改善するが、脂肪組織および筋における脂質蓄積が確認された(図省略)。そのため、脂質筋を作製する食品因子として、5,7-ジメトキシフラボンは有効であることを示唆した。

以上より、インスリン抵抗性改善剤として、PPAR 活性化素材である黒ショウガ抽出物は骨格筋における脂質蓄積を増加させることはないが、その中の成分(例えば 5,7-ジメトキシフラボン)は耐糖能を改善しつつ脂質蓄積を促進させる可能性が示唆された。

本研究の要約

本研究では、PPAR $\gamma$  活性化食品因子を用いて脂質合成系酵素活性と骨格筋脂質蓄積を増加させることにより、抗 2 型糖尿病作用の可能性を見出すという従来とは逆の作用機序を着眼点とした研究であり、骨格筋内脂質量が多いにもかかわらずインスリン感受性が高い持久系アスリートに共通する。ピオグリタゾンには PPAR $\gamma$  活性化に伴う骨格筋脂質蓄積および脂質合成系酵素活性の増加が確認され、食品科学的手法でスクリーニングした黒ショウガのエタノール抽出画分には高い PPAR $\gamma$  リガンド結合能を有し、耐糖能を

顕著に改善することを見出した。PPAR $\gamma$ を含めた複数の作用機序で抗2型糖尿病効果を呈することが示唆された。

(4)研究協力者  
野崎 勉 (NOZAKI Tsutomu)

#### 謝辞

本研究で用いた黒ショウガの提供を受けましたビーエイチエヌ株式会社に対し感謝いたします。

#### 引用文献

- (1) Kato K., Takamura T., Takeshita Y., et al.: Ectopic Fat Accumulation and Distant Organ-Specific Insulin Resistance in Japanese People with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. PLoS ONE 2014; 9:e92170.
- (2) Amati F., Dubé J.J., Alvarez-Carnero E., et al.: Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? Diabetes 2011; 60:2588-97.
- (3) Ochiai M, Matsuo T.: Pioglitazone-induced increase in the stearoyl-CoA desaturation index and fat accumulation in rat muscles are not related to lipoprotein lipase activity. J Oleo Sci. 2013; 62:745-54.
- (4) Matsuda H, Nakamura S, Yoshikawa M. Search for new type of PPAR $\gamma$  agonist-like anti-diabetic compounds from medicinal plants. Biol Pharm Bull. 2014; 37:884-91.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

落合優、2型糖尿病改善作用を有する PPAR $\gamma$  活性化食品因子の探索、メディカルサイエンスダイジェスト、44 巻、2018 年 6 月号、295-298、2018 年、査読なし

〔学会発表〕(計 2 件)

Masaru Ochiai, Yoshiyuki Azuma, and Tatsuhiro Matsuo, Dietary Effect of *Kaempferia parviflora*, a PPAR $\gamma$  Agonist, on Glucose Tolerance in Non-obese Typed Diabetic Mice, Experimental Biology 2017, 2017.

Masaru Ochiai and Noszaki Tsutomu, PPAR $\gamma$  agonists from *Kaempferia parviflora* improve glucose and fat metabolism in Mice, Experimental Biology 2017, 2017.

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

落合 優 (OCHIAI Masaru)  
北里大学・獣医学部・講師  
研究者番号：80750546