

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14424

研究課題名(和文) PPAR 活性化食品素材・因子を利用して得られる脂質筋は健全な骨格筋か？

研究課題名(英文) Are skeletal muscles rich in lipids produced by PPARgamma agonistic food materials healthy?

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：香辛料の一種である黒ショウガに含まれる5,7ジメトキシフラボン(DMF)を用いて筋脂質蓄積とインスリン抵抗性改善作用を2型糖尿病マウスを用いて検討した。耐糖能は改善されたが、筋脂質蓄積および関連する筋酵素活性が抑制され、アディポネクチン濃度に変化は認められなかった。また、生体内代謝物の網羅的解析により、DMFの投与により肝臓および骨格筋にて特にフォルモネチン含有量が増加することを新規に見出した。さらに、PPAR アゴニストの新規探索を多価不飽和脂肪酸の中で実施し、9-PAHSAに活性が認められた。DMFおよび9-PAHSAはPPAR を介した2型糖尿病症状の改善に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒ショウガの熱産生に着目した食品は多く市場されている。本研究は、黒ショウガの既存の作用の追究ではなく、黒ショウガに含まれる5,7ジメトキシフラボン(DMF)を用いて骨格筋に脂質蓄積を促してインスリン抵抗性を改善する新規作用の探索および機序の解明を目指した。DMFは骨格筋や肝臓の脂肪蓄積を抑制して、耐糖能を改善するため、機能性食品素材として利用できることを明らかにした。またDMF代謝物であるフォルモネチンが骨格筋および肝臓に蓄積されることから、フォルモネチンが作用している可能性が考えられた。フォルモネチンや新規に見出した9-PAHSAの食品市場での利用についてはその機能性を明確にする必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study has investigated the possibility of food materials to activate lipogenesis (PPAR agonists) on muscular fat accumulation and insulin resistance. Type-2 diabetic mice were fed with 5, 7-dimethoxyflavones (DMF), a methoxypolyphenol compound in black ginger. Glucose tolerance was improved, but muscular fat accumulation and its related enzymatic activity indices were unexpectedly suppressed, and adiponectin levels were not altered by dietary DMF. Metabolomics analyses have revealed that dietary DMF largely increased the levels of formonectin, a kind of flavonoids, in the liver and muscles. Moreover, screening of PPAR agonists from polyunsaturated fatty acids have showed that palmitic-acid-9-hydroxy-stearic-acid (9-PAHSA) showed a strong PPAR ligand binding activity. These findings suggest that two chemical compounds, DMF and 9-PAHSA, can be useful for improvement of type-2 diabetes.

研究分野：食品栄養学

キーワード：脂質合成 筋脂質蓄積 インスリン抵抗性 黒ショウガ 5,7ジメトキシフラボン フォルモネチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

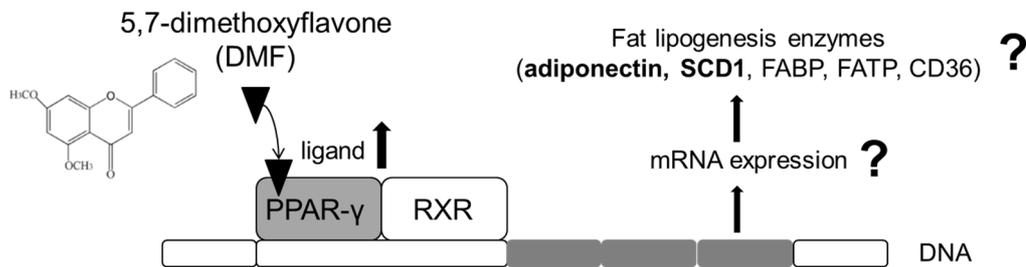
1. 研究開始当初の背景

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。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。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、抗糖尿病医薬化合物であるピオグリタゾンと同様に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 $\gamma$ ) に対する結合を高めることが先行研究で示唆された食品成分である5,7-ジメトキシフラボン(5,7-DMF)を用いて骨格筋における脂質蓄積およびインスリン抵抗性改善作用を検討することとした。なお、先行研究(科研費若手(B)16K21349)(I. Ochiai et al., 2019)においては、5,7-DMFを含む黒ショウガの抽出物を用いた検討を主として実施し、インスリン抵抗性改善作用を有し、その活性画分はエタノール溶出画分であることも明らかにした。しかし、骨格筋における脂質蓄積の蓄積が抑制される結果が導き出されたため、5,7-DMF以外の成分が筋脂質蓄積に対して負に作用し、インスリン抵抗性を改善している可能性があると考えた。また、PPAR $\gamma$ のアнтаゴニストであるBADGEを用いた検討より、BADGEの併用投与によって予想外にも黒ショウガのエタノール溶出画分の抗インスリン抵抗性改善作用は増強されたことから、黒ショウガのエタノール溶出画分による作用はPPARを活性化させる成分だけではなく、その他の作用機構にも影響を及ぼして相加相乗的に作用している可能性が示唆された。そのため、単一成分に絞って検討するため、同溶出画分に含有される代表的化合物であり、かつPPAR $\gamma$ の活性化化合物の5,7-DMFを用いて検討することにした。

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】。本研究では、特に脂肪酸不飽和化酵素および血漿中のアディポネクチン濃度に着目した。

また、新規のPPARアゴニストを探索するため、多価不飽和脂肪酸およびその類似化合物に着目した。他研究者による報告によると、糖尿病に罹患することにより、脂肪酸結合型脂肪酸の血漿中濃度が低下することが示唆されている。一方で、PPAR $\gamma$ アゴニストとして不飽和脂肪酸が知られている。そのため、【表1】に示すように多様に存在する脂肪酸結合型脂肪酸類にもPPAR $\gamma$ アゴニスト様活性がみられる可能性がある。健常人の血漿中に存在することから、生体由来の脂肪酸結合型脂肪酸類にPPAR $\gamma$ 結合活性が認められれば、安全性に優れた化合物として期待できる。本研究では、同一濃度における脂肪酸結合型脂肪酸のPPAR $\gamma$ 結合活性をin vitroにて検討し、新規PPAR $\gamma$ アゴニストを見出すことを目標にした。



(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 アゴニストは一般的に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。本研究では、*in vitro*にて PPAR アゴニスト様活性が示唆された 5,7-DMF に筋脂質合成活性やインスリン抵抗性改善作用が見られるか否かを検討した。

## 2. 研究の目的

【実験】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として知られる 5,7-DMF の給餌が 2 型糖尿病マウスの耐糖能の改善および骨格筋脂肪蓄積にいかに関与を及ぼすのかを明らかにすることを目的に検討した。

【実験】脂肪酸結合型脂肪酸 20 種類を用いて PPAR $\gamma$  結合活性能を *in vitro* にて検討した。

## 3. 研究の方法

### 【実験】PPAR アゴニストである 5,7-DMF を用いた検討

黒ショウガエタノール抽出物に含まれる 5,7-DMF は約 10% である。本動物実験では、先行研究で検討した黒ショウガのエタノール溶出画分 (0.19%) から計算した添加量である 5,7-DMF 0.02% 含有の場合を検討することとした (1. Ochiai et al., 2019)。5,7-DMF を高脂肪高ショ糖食に 0.02% 混合し、2 型糖尿病モデル Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY) マウス (5 週齢、雄) に 8 週間自由給餌した。対照には非添加高脂肪高ショ糖食を用いた。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、肝臓、脂肪組織、血漿などを採取し、2 型糖尿病の発症に関する血中指標および筋脂質蓄積を測定した。また、脂溶性代謝物を網羅的に検討するため、肝臓および腓腹筋を用いて LC-MS/MS 法を用いた検討を行った。

### 【実験】脂肪酸結合型脂肪酸による PPAR $\gamma$ 結合活性能の評価

市販される脂肪酸結合型脂肪酸 20 種類 (いずれも Cayman 製、フナコシより購入) を 1 mM または 5 mM になるように DMSO で溶解した。対照として既存の PPAR アゴニスト医薬品を用い、同様に溶解し、試験に用いた。評価キットには藤倉化成製の EnBio RCAS for PPAR を用いた。DMSO のみの添加の場合の活性を 100% とし、150% 以上の場合を活性ありと判断した。

## 4. 研究成果

### 【実験】PPAR アゴニストである 5,7-DMF を用いた検討

高脂肪高ショ糖食への 5,7-DMF 添加給餌は耐糖能試験における血糖値の推移を抑制した。また、体重増加量および肝臓重量を有意に抑制する一方で、脂肪組織重量は有意に増加させた。この結果は PPAR アゴニストのピオグリタゾン投与による先行研究結果 (2. Ochiai and Matsuo, 2013) と同様であり、PPAR の活性化に伴うものと考えられる【図 2】。解剖時の絶食時血漿中のグルコースおよびインスリン濃度は 5,7-DMF 給餌によって低下する傾向を示したが、アディポネクチン濃度を上昇させる結果は得られなかった【図 3】。骨格筋および肝臓の脂質蓄積量は

5,7-DMF 給餌によって低下し、脂質合成に関与する酵素活性群【図 1】の一つである SCD1 活性指標についても低下した【図 4】。一方で、脂肪組織における SCD1 活性指標は増加した。これらの一連の結果より、研究当初、仮説として想定した“PPAR アゴニストの 5,7-DMF は骨格筋脂質合成を促し、インスリン抵抗性を改善する”結果とは一部矛盾し、“5,7-DMF は PPAR アゴニスト様作用を示し、骨格筋脂質合成を抑制し、インスリン抵抗性を改善する”結果となった。

この要因を検討するため、“5,7-DMF の生体内代謝物がインスリン抵抗性の改善に作用している”という仮説を立て、肝臓および骨格筋における脂溶性代謝物を網羅的に解析した結果、特にフォルモネチンが肝臓および骨格筋共に顕著に高値を示した【図略】。対照群の組織にはフォルモネチンは蓄積されていなかったことから、5,7-DMF の生体内代謝によって生じたものと考えられた。その他、ステロール代謝物に特徴的な増加が認められた【図略】。

以上より、PPAR アゴニストである 5,7-DMF を用いて脂質骨格筋を作製する結果とはならなかったが、健全でありインスリン抵抗性が改善された骨格筋を作出できる結果となった。

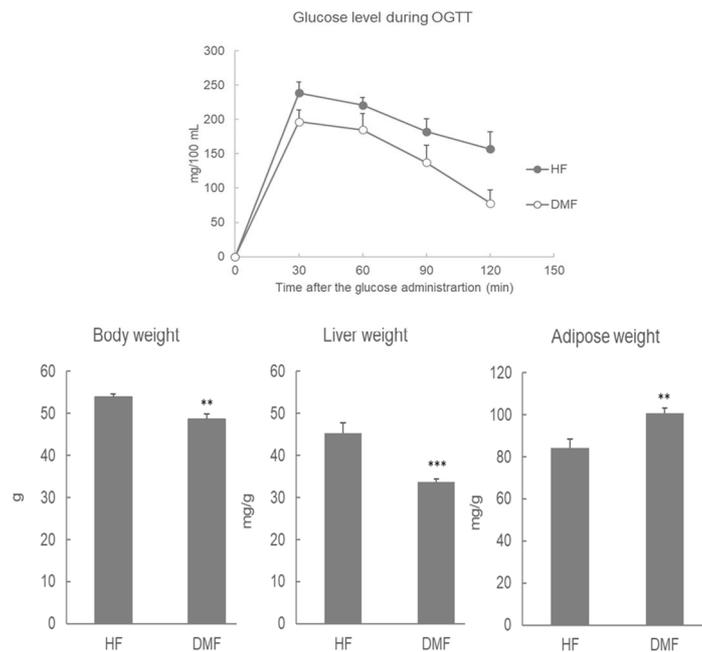


図 2 マウスの耐糖能（上）最終体重（左下）肝臓（中下）および脂肪組織重量（右下）  
有意差のある個所にマークあり

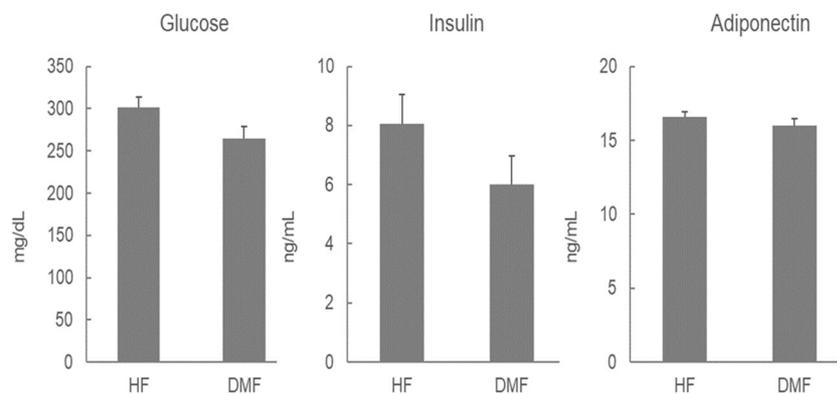


図 3 マウス血漿成分濃度（左からグルコース、インスリン、アディポネクチン）  
いずれも有意差はなし

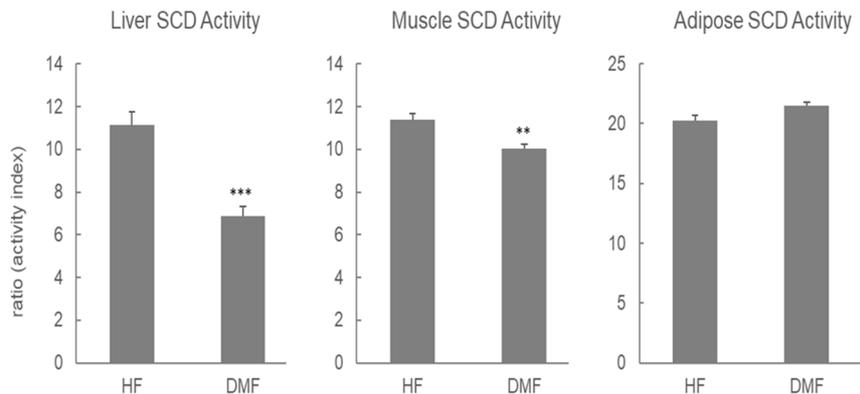
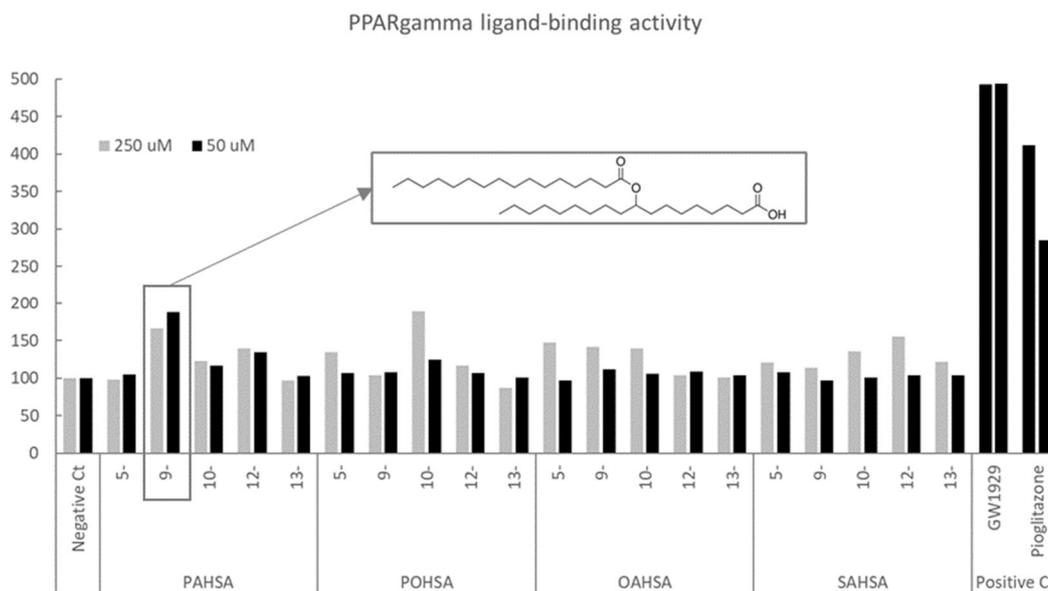


図4 マウスの肝臓、骨格筋および脂肪組織の脂肪酸不飽和化酵素（脂質合成）活性  
有意差のある個所にマークあり

【実験】 脂肪酸結合型脂肪酸による PPAR $\gamma$  結合活性の評価

脂肪酸結合型脂肪酸 20 種類による PPAR $\gamma$  結合活性の in vitro 結果を【図 5】に示した。9-PAHSA ( palmitic-acid-9-hydroxy-stearic-acid ) にのみ活性が認められた ( 50  $\mu$ M にて活性 188% )。



以上の実験 および実験 の後に、5,7-DMF、フォルモネチンおよび 9-PAHSA を用いて、NSY マウスに給餌した場合の 2 型糖尿病改善作用について検討したが、予想した仮説に至る結果は認められなかった。本研究結果より、PPAR アゴニストを用いた糖代謝異常は改善可能であるが、脂質蓄積型の骨格筋と並行しない結果となった。生体内代謝を加味した投与物質の量の調製および他の PPAR アゴニストの探索およびその作用機序の解明が必要である。

参考文献

- Ochiai M, Takeuchi T, Nozaki T, Ishihara KO, Matsuo T. Kaempferia parviflora Ethanol Extract, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Ligand-binding Agonist, Improves Glucose Tolerance and Suppresses Fat Accumulation in Diabetic NSY Mice. J Food Sci. 2019 Feb;84(2):339-348. doi: 10.1111/1750-3841.14437.
- 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(9):745-54. doi: 10.5650/jos.62.745.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ochiai Masaru, Takeuchi Toshiki, Nozaki Tsutomu, Ishihara Ken o, Matsuo Tatsuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Kaempferia parviflora Ethanol Extract, a Peroxisome Proliferator Activated Receptor Ligand binding Agonist, Improves Glucose Tolerance and Suppresses Fat Accumulation in Diabetic NSY Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 339 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1750-3841.14437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaru Ochiai, Tsutomu Nozaki, Ken-o Ishihara
2. 発表標題 Kaempferia parviflora improve glucose intolerance and fat accumulation in type-2 diabetic model mice
3. 学会等名 Asia Congress of Nutrition 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合優, 野崎勉, 石原健夫
2. 発表標題 PPAR リガンド活性化素材である黒ウコン (Kaempferia parviflora) による耐糖能改善作用
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----