

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19580131	
研究課題名（和文）	食品のインスリン抵抗性改善作用による抗糖尿病効果とその作用メカニズムの解析
研究課題名（英文）	Anti-diabetic effect of factors derived from foods, wild grapes and Wasabia japonica.
研究代表者	
伊藤 芳明 (ITO YOSHIAKI)	
岩手大学・農学部・准教授	
研究者番号：50312517	

研究成果の概要：本研究は地域食材の糖代謝調節機能に及ぼす健康機能性を明らかにすることを目的として行なった。その結果、本わさび根茎に含まれる isothiocyanate 類の一つに糖尿病モデル動物で血糖上昇緩和効果があることを新規に見いだした。またヤマブドウは岩手県など冷涼な地域で栽培されるが、ジュースなどの加工時に生じる未利用資源である搾り粕や果皮などに存在するオレアノール酸に 3T3-L1 脂肪細胞の分化抑制や蓄積脂質の分解効果のあることを明らかにし、糖尿病の背景要因となる肥満の抑制効果が期待できる可能性を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：糖尿病、インスリン、わさび、イソチオシアネート、ヤマブドウ、肥満、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の一つである糖尿病は世界的な増加を示しており、日本も例外でない。日本人の糖尿病患者数は最近40年で20倍の増加を示し、今後も増えることが予想される。その主な原因はインスリン分泌低下の素因に加えて、生活習慣の変化による肥満・インスリン抵抗性を引き起こす要因の増加によると考えられている。肥満やインスリン抵抗性は、糖尿病に直接つながる糖代謝調節不良のみならず、高脂血症、高血圧とも密接に絡み合い、いわゆるメタボリックシンドロームの惹起、心筋梗塞や脳梗塞などの心血管疾患といった主要な死亡要因を招く。肥満やイン

スリン抵抗性の増加要因となる生活習慣の変化のうち、食習慣の影響は大きい。穀類や野菜を中心とした日本型食生活から、より高カロリーな肉類や脂肪の多い欧米型食事内容への嗜好性の変化は、容易にエネルギー摂取の過剰を起しやすく、結果、肥満の増加を招く。脂肪細胞から分泌される生理活性分子である種々のアディポサイトカインが、組織のインスリン感受性に関与することが明らかにされ、加えて脂肪細胞の肥大化に伴い、adiponectin のように骨格筋や肝臓でのインスリン感受性をあげる因子の発現は低下し、逆に TNF- α , resistin, 遊離脂肪酸などインスリン作用を障害する、または PAI-1 のよう

に血栓症に関わる因子の増加がおこることが示され、脂肪組織でのこれらアディポサイトカインの発現・分泌パターンの悪化がインスリン抵抗性の誘発に深く関与すると捉えられるようになってきた。インスリン抵抗性の原因の解明とその治療に向けた医学的なアプローチは盛んとなっているが、増加する糖尿病やその予備群に対応するには、日常生活の中で予防もしくは改善し、発症の抑制と悪化の防止が重要であり、その観点から食事や食品成分の利用は非常に有効な手段の一つである。

2. 研究の目的

様々な食品やその成分の生体調節効果が見いだされているが、sulforaphaneに代表されるブロッコリーなどアブラナ科の植物・野菜類に含まれる isothiocyanate 類は、これまでに抗酸化や抗癌作用を有することで食品機能性研究が数多く行われてきた。私は地域食品素材の健康機能性を検索する中で、ワサビ（アブラナ科ワサビ属，*Wasabia japonica* Matsum.）の isothiocyanate である 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6MSITC)にこれまで報告のない糖新生抑制効果のあることを明らかにしている。すなわち、ラット肝臓細胞 H4IIE を用いた解析から、6MSITC は糖新生の律速酵素である PEPCK や G6Pase 遺伝子発現の抑制並びに培地への糖放出の抑制効果を示した。この効果はインスリンと類似した作用でありながら、インスリンレセプターや IRS-1 などのいわゆるインスリンシグナルの上流に位置するシグナル分子の活性化を促すことなく、作用していることが明らかになっている。このことは、2型糖尿病で見られる JNK 活性の上昇による IRS-1 などのインスリンシグナル分子の作用障害が要因となって起こるインスリン抵抗性などに対して有効であることが予想される。

また別な検討から、やはり地域食品素材の一つであるヤマブドウのエタノール抽出成分に脂肪細胞の分化・成熟の抑制効果や酸化ストレス負荷時に上昇した PAI-1 発現の抑制効果、逆に低下した adiponectin 発現の回復作用があることを見いだしている。ブドウにはカテキン類やプロシアニジン類、アントシアニンなどが含まれており、これらの成分の脂肪細胞に対する類似の効果はいくつかの報告がある。ヤマブドウは全国生産の6割を岩手県が占めるが、生食には向かずワイン等の加工用に利用される。今回見られている効果は、そうした加工の搾り粕からの抽出物でも認められることから資源の有効利用の点で意義がある。しかしながら成分的な特定は出来ていない。

したがって本研究では、ワサビイソチオシ

アネートである 6MSITC の細胞系で見いだされたインスリン様作用（糖新生抑制効果）を進展させ、*in vivo*での抗糖尿病効果について糖尿病モデル動物を用いた検証を行ない、その作用機序の解明することで、有効性と安全性を明らかにすることと、同じく地域食材の一つであるヤマブドウの脂肪細胞に対する効果とその候補成分の検討を行うことで関与成分を明らかにし、肥満に伴う糖代謝異常の改善に対するヤマブドウやその成分の有用性を明らかにすることを目的としている。以上の研究を通じて、ワサビイソチオシアネートやヤマブドウなどの食品成分、食品素材がもつアディポサイトカイン発現パターンやインスリン抵抗性の改善作用などを介した抗糖尿病効果とその作用メカニズムを明らかにしていこうとするものである。

3. 研究の方法

(1) ヤマブドウ搾り粕抽出物成分による脂肪細胞機能改善効果の検討

①ヤマブドウ搾り粕およびオレアノール酸による脂肪分解試験

マウス 3T3-L1 脂肪細胞を 6well プレートに 0.8×10^5 cells / 2 ml DMEM+10%CS / well となるように播種し培養した。コンフルエントを確認後、定法通り、分化誘導培地 I (DMEM+10%FBS+0.5mM IBMX+0.25 μ M dexamethasone+10 μ g/ml インスリン)に換え 3 日間培養した。その後分化誘導培地 II (DMEM+10%FBS+10 μ g/ml インスリン)で 5 日間程度培養し、脂肪滴の蓄積を促した。

蓄積脂肪の分解促進効果を試験するために、分化後の細胞を DMEM+0.1%BSA 1ml/well で培養し、同時に試験試料（ヤマブドウ搾り粕抽出物メタノール溶液：ヤエガキ醗酵技研、オレアノール酸エタノール溶液）をヤマブドウ抽出物溶液については 0.125、0.25、0.5、1 mg/ml、オレアノール酸溶液については 100、200 μ M となるように加え、24 時間培養した。培養上清中のグリセロール量を測定し、脂肪分解活性とした。

②ヤマブドウ搾り粕抽出物およびオレアノール酸が遺伝子発現に与える影響

従来のヤマブドウ搾り粕は小規模に研究室レベルで試作されたものであったので、今回工業的に調製された抽出物とは異なる。そこで再度、脂肪細胞に対する遺伝子発現への効果を検討し、あわせてオレアノール酸の効果も検討した。

上述の方法に準じて、3T3-L1 脂肪細胞を 6well プレートで分化させた後、DMEM+0.1% BSA 2ml に換えると同時に、酸化ストレスとして H_2O_2 (200 μ M) 単独、もしくはヤマブドウ搾り粕抽出物の共存下で処理した。またオレ

アノール酸については、細胞を分化誘導培地 II 処理時にオレアノール酸共存下で処理し、遺伝子発現への影響を Northern blotting 法にて検討した。

(2) ワサビイソチオシアネート化合物による抗糖尿病効果の検討

① 肝臓由来細胞 H4IIE におけるインスリン様活性の機序の解析

6MSITC は H4IIE 細胞における糖新生系酵素 PEPCK や G6Pase の遺伝子発現を抑制する作用を有することは、既に明らかにしているが、その作用機序は不明なところがある。そこでストレス応答性シグナル因子の一つである p38MAPK が糖新生系酵素の発現上昇に関与し、6MSITC がその活性化を抑制する効果を有することなどが報告されていることから、6MSITC の効果における p38MAPK を含む MAPK family の関与を検討した。

細胞を 6cm プレートに播き、コンフルエントとした後、DMEM+0.1%BSA 培地に換え培養した。24 時間後新しい DMEM+0.1%BSA 培地に交換すると同時に dexamethasone (Dex)、 Bt_2 cAMP でそれぞれ終濃度 500nM、0.1mM で処理した。そこに 10^{-6} M Insulin 溶液を終濃度 10nM、6MSITC を 15μ M、p38MAPK、JNK、Erk の阻害剤をそれぞれ 10μ M、 25μ M、 20μ M の濃度で添加し、PEPCK、G6Pase 遺伝子の発現への影響をみた。

② 種々のメチレン基鎖長のイソチオシアネート化合物でのインスリン様活性の比較

上述と同様に細胞を培養し、Dex と Bt_2 cAMP で処理すると同時に 4MSITC、6MT (sulfenyl 体)、6MSITC、6M sulfenyl ITC、7 MSITC、8 MSITC、9 MSITC を終濃度 15μ M になるように添加し、24 時間培養した。その後、グルコースとフェノールレッド不含培地に交換し 4 時間培養後、培地へのグルコース放出量を測定した。

③ 2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay における 6MSITC の抗糖尿病効果

動物は 4 週齢の肥満型 2 型糖尿病モデル KKA^y 系雄マウス (日本クレア、東京) 12 頭を用い個別にステンレスケージに入れて飼育した。当初の 5 日間は予備飼育とし、AIN93 組成カゼイン飼料と水を自由摂取させた。6 日目にコントロールとして生理食塩水を投与する C 群 5 頭、6MSITC ($25\text{mg}/\text{kg BW}$) を投与する 6MITC 群 7 頭に群分けし、表 1 の高脂肪食で 37 日間飼育し、飼料摂取量と体重変化を測定した。飼育期間中、生理食塩水および 6MSITC を 10 時から 11 時の間に毎日腹腔内に投与した。飼育期間中は一週間ごとに 5

時間絶食後の血糖値を、尾静脈血より測定し最後の 2 週は血糖値と合わせて HbA1c の測定も行った。飼育 33 日目に経口グルコース負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test : OGTT) を行い、耐糖能を評価した。38 日目に 5 時間絶食後、ジエチルエーテル麻酔下で解剖した。ヘパリンで処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血し、肝臓、腎臓、精巣周囲脂肪組織、腎臓周囲脂肪組織、腸管膜周囲脂肪組織を採取し、重量を測定した後ただちに液体窒素で凍結した。

表 1. 飼料組成 [g/100g diet]

	高脂肪食
カゼイン ¹⁾	20.0
AIN93G 塩類混合物	4.3
AIN93 ビタミン混合物	1.2
大豆油 ²⁾	7.0
コリン重酒石酸塩 ²⁾	0.3
セルロース粉末 ¹⁾	6.2
α -コーンスターチ ¹⁾	30.7
シスチン ³⁾	0.3
ショ糖 ⁴⁾	10.0
ラード ²⁾	20.0

1) オリエンタル酵母工業 (千葉)、2) Wako、3) 田辺製薬 (大阪)、4) 東洋精糖 (東京)

(3) データ処理と統計処理

データは平均値 (AVG) と標準偏差 (SD) で表し、平均値間の有意差検定は Instat3.0 (Graphpad) を使用し、各処理は Tukey により行った。各検定の有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) ヤマブドウ搾り粕抽出物成分による脂肪細胞機能改善効果

① ヤマブドウ搾り粕およびオレアノール酸による脂肪分解試験

無処理 (相対比 $100 \pm 8.4\%$, $n=3$) に対して、ヤマブドウ搾り粕抽出物 0.125, 0.25, 0.5, 1.0mg/ml と添加するにつれ、 199.0 ± 14.5 , 262.4 ± 13.9 , 359.9 ± 20.7 , 287.9 ± 45.2 と脂肪分解活性が添加量に応じて増加した。またオレアノール酸処理でも濃度依存的な増加を認めた (100μ M: 188 ± 23.2 , 200μ M: 218.5 ± 16.3 , vs control: 100 ± 8.4 , $n=3$)。以上の結果は、ヤマブドウ搾り粕抽出物における新たな効果として蓄積脂肪の分解促進効果を明らかにするとともに、果皮成分の一つである β アミリン系トリテルペンであるオレアノール酸の有効性を明らかに

するものである。

②ヤマブドウ搾り粕抽出物およびオレオノール酸が遺伝子発現に与える影響

肥満した状態の脂肪組織では酸化ストレスの亢進(Fat ROS)が進み、PPAR γ やSREBP1cといった脂肪細胞分化に重要な転写因子が遺伝子レベルで発現低下させること、さらにadiponectinの低下やPAI-1、IL-6の上昇といったアディポサイトカイン遺伝子発現異常を引き起こすことが明らかになっている。

今回用いている従来に比べ、純度の高いヤマブドウ搾り粕抽出物の酸化ストレスによる遺伝子発現変化に対する軽減効果を見たところ、adiponectinの発現では無処理(100% \pm 9.2, n=4)に比較して、H₂O₂処理群(78.9% \pm 16.2)では低下し、抗酸化物質であるNAC(N-acetyl-cysteine, 5mM)を添加することで回復した(202.6 \pm 61.2)。しかしながらヤマブドウ搾り粕抽出物の添加では回復効果は認められなかった(ヤマブドウ搾り粕抽出物 0.0625mg/ml:45.7% \pm 13.3, 0.125mg/ml:49.3 \pm 7.3, 0.25mg/ml:30.5 \pm 5.3)。一方、PAI-1についてはヤマブドウ搾り粕抽出物の添加により無処理よりも上昇する傾向を示し、期待とは逆の結果となった。このことは、抽出方法の違いや元のヤマブドウの品質の違いにより効果が異なる可能性、もしくは純度が高いサンプルにより含まれているpolyphenol成分によるプロオキシダント的な効果が引き起こされた可能性を示唆するものであると考えられた。

脂肪細胞の成熟過程である分化誘導培地IIでの培養時点でのオレオノール酸添加によるadiponectin遺伝子への影響は、添加濃度依存的な変化が見られた(無処理:100% \pm 26.7, 100 μ M:128 \pm 23.8, 200 μ M:162.3 \pm 43.6, n=6)。しかしながら誤差も大きく、有意な変化とは言えなかった。むしろ同じ濃度を分化誘導Iの時点で処理した場合に、その後の脂肪蓄積に抑制効果が認められたことから、オレオノール酸の効果は前駆脂肪細胞から脂肪細胞へ分化する過程を抑制する効果がある可能性が示唆された(無処理:100% \pm 6.6, 25 μ M:83.9 \pm 3.5, 50 μ M:79.1 \pm 7.1, 100 μ M:68.0 \pm 5.3, 200 μ M:62.8 \pm 4.0, n=7)。

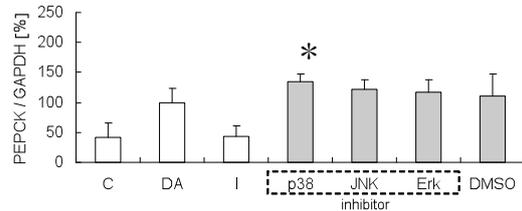
(2)ワサビイソチオシアネート化合物による抗糖尿病効果

①肝臓由来細胞H4IIEにおけるインスリン様活性の機序

6MSITCによるH4IIE細胞における糖新生抑制活性におけるp38MAPKおよびJNKやErkといったMAPK familyに対する阻害効果との関係を明らかにする目的で、H4IIE細胞でのDexおよびBt₂cAMP処理がp38MAPK活性を介した

ものであるかをp38MAPK、JNK、Erkの阻害剤を用いて検討したところ、図1aおよびbに示すようにPEPCKおよびG6Pase遺伝子発現はそれらの阻害剤の影響を受けていないことが分かった。一方同じ条件で6MSITC15 μ Mで処理した場合にはPEPCKやG6Paseの発現は図2に示すように顕著に抑制された。このことから、6MSITCの糖新生抑制効果はp38MAPKの阻害を介した作用ではないことが推察される。

a. PEPCK



b. G6Pase

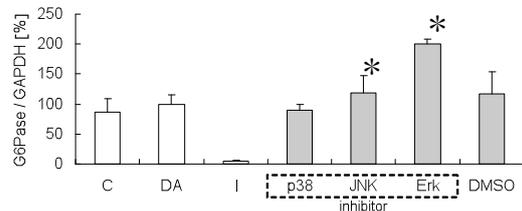
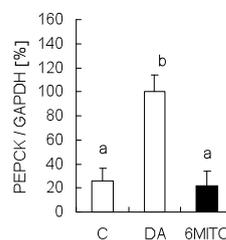


図1. H4IIE細胞における糖新生系遺伝子発現に対するMAPK family阻害剤の影響

グラフはDAを100%とした時の相対値を示す。値はAvg \pm SD (n=8)、*: DA群との有意差を表す。

a. PEPCK



b. G6Pase

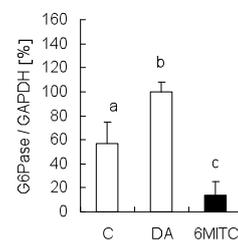


図2. 6MITCがDex/Bt₂cAMPによるPEPCKおよびG6Pase遺伝子発現誘導に及ぼす効果。値はAvg \pm SD (n=6)、異なる記号間で有意差を表す。

②種々のメチレン基鎖長のイソチオシアネート化合物でのインスリン様活性の比較

6MSITC、またその構造類似体である4MSITC、6MT、6 M sulfonyl ITC、7MSITC、8MSITC、9MSITCをいずれも15 μ Mとなるように添加し、24時間培養した時の培地へのグルコース放

出量を図 3 に示す。

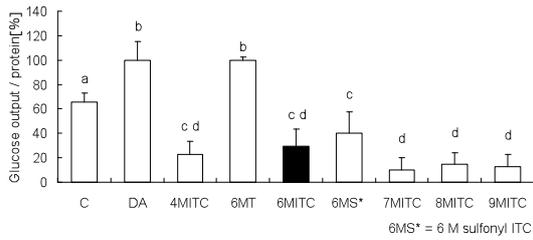


図 3. 種々のメチレン基鎖長イソチオシアネート化合物のグルコース放出量抑制効果
グラフはDAを100%とした時の相対値を示す。培地へのグルコース放出量は細胞タンパク質量で補正した。値は Avg±SD (n=8)、異なる記号間で有意差を表す。

鎖長に注目すると、6MSITC より炭素鎖が短いものにも長いものにも、Dex/Bt₂cAMP により惹起されたグルコース産生を抑制する効果があることが明らかとなった。さらに、その抑制効果は鎖長が長くなるにつれて強くなる傾向が見いだされた。酸素の結合に注目すると、6MSITC から酸素が1つ失われた6MTには抑制効果は見られなかった。一方6MSITC にさらにもう1つ酸素が結合した sulfonyl 体では、6MSITC と同程度の抑制効果が認められ、methylsulfinyl あるいは methylsulfonyl 構造が活性に関与している可能性が明らかとなった。

③2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay における6MSITCの抗糖尿病効果

37 日間の飼育中の体重変化を図 4、1 日あたりの摂食量を図 5 に示す。また解剖時の体重と総飼料摂取量、組織重量を表 2 に示す。37 日間の 6MSITC 腹腔内投与の結果、体重増加量は 2 群間で有意な差は認められなかった。肝臓重量、腎臓重量、体重 100g 当たりの肝臓重量および腎臓重量で、C 群に比べ 6MSITC 群で有意に減少した。しかしながら脂肪重量に関しては有意な変化は認められず、6MSITC には、KKAy マウスにおける脂肪蓄積を抑制する効果は認められなかった。

次に飼育 33 日目に行った OGTT の結果と血糖上昇曲線下面積(AUC)を図 6 に示す。OGTT では、グルコース負荷前でも C 群と比べ 6MSITC 群で有意に血糖値が低下しており、グルコース負荷後も、60 分後を除く全ての時点で有意に低い値を示した。AUC については、有意差は出なかったものの低下傾向にあった(p value=0.0907)。

また飼育期間中の血糖値の経時変化と、飼

育 31 日目の HbA1c、また飼育終了日の血漿中グルコース濃度および HbA1c を図 7 に示す。飼育 2 週目から C 群と比べ 6MSITC 群で血糖値が有意に低下し、飼育終了日の血漿中グルコース濃度も有意に低値を示した。過去の平均血糖値を反映する HbA1c の値も、飼育 31 日目および飼育最終日で有意に低値を示した。

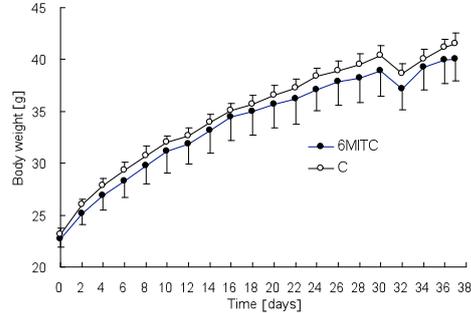


図 4. 体重変化
値は Avg±SD で各群の頭数は C 群(n=5)、6MSITC 群(n=7)。

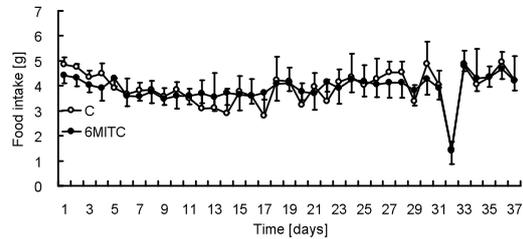


図 5. 1 日あたりの摂食量
値は Avg±SD で各群の頭数は C 群(n=5)、6MSITC 群(n=7)。

表 2. 6MSITC 投与による体重、飼料摂取量、組織重量

	C群	6MITC群
初日体重 [g]	23.2 ± 0.60	22.7 ± 0.72
最終日体重 [g]	41.5 ± 1.0	40.1 ± 2.1
体重増加量 [g/5wk]	18.4 ± 1.4	17.4 ± 2.1
飼料摂取量 [g/5wk]	144.9 ± 7.74	144.7 ± 9.61
肝臓重量 [g]	2.01 ± 0.20	1.58 ± 0.18 †
腎臓重量 [g]	0.566 ± 0.026	0.482 ± 0.032 †
精巣周囲脂肪重量 [g]	1.77 ± 0.30	1.53 ± 0.20
腎臓周囲脂肪重量 [g]	0.709 ± 0.12	0.808 ± 0.16
腸間膜周囲脂肪重量 [g]	1.02 ± 0.055	0.961 ± 0.089
体重100g当たりの組織重量		
肝臓重量 [g]	4.83 ± 0.52	3.94 ± 0.34 †
腎臓重量 [g]	1.36 ± 0.058	1.21 ± 0.11 †
精巣周囲脂肪重量 [g]	4.26 ± 0.64	3.82 ± 0.51
腎臓周囲脂肪重量 [g]	1.70 ± 0.26	2.01 ± 0.36
腸間膜周囲脂肪重量 [g]	2.45 ± 0.15	2.40 ± 0.19

値は Avg±SD で各群の頭数は C 群(n=5)、6MSITC 群(n=7). † : C 群の値との有意差を示す (P<0.05)

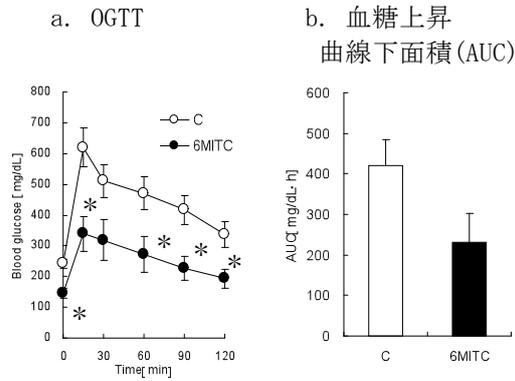


図 6. OGTT、血糖上昇曲線下面積 (AUC) 値は Avg±SE で各群の頭数は C 群 (n=5), 6MSITC 群 (n=7). *: 各時間における C 群との有意差を示す (P<0.05).

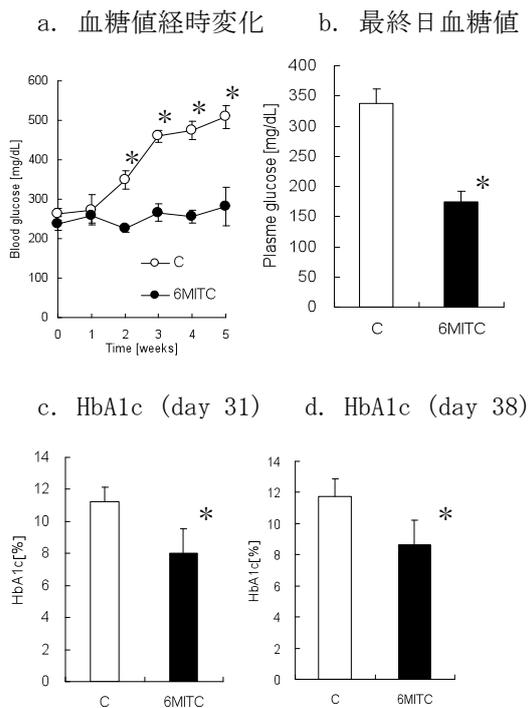


図 7. マウスの血糖値経時変化、最終日血糖値、31日目および最終日 HbA1c 値は Avg±SD で各群の頭数は C 群 (n=5), 6MSITC 群 (n=7). *: C 群との有意差を示す (P<0.05).

以上から、6MSITC は *in vivo* の検討でも抗糖尿病効果を示すことが明らかとなった。また細胞でのイソチオシアネート化合物類の効果と併せて考えると、食材に含まれるイソチオシアネート類には抗糖尿病効果が期待できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Park, K.-O., Ito, Y., Nagasawa, T., Choi, M.-R., and Nishizawa, N., Effects of dietary Korean proso-millet protein on plasma adiponectin, HDL cholesterol, insulin levels, and gene expression in obese type 2 diabetic mice., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 巻、2918-2925、2008、査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 坂本良介、笹森裕未、伊藤芳明、木村賢一、長澤孝志、食品由来のイソチオシアネートの構造とインスリン様活性の相関、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡・マリンメッセ福岡
- ② 清野紘子、伊藤芳明、木村賢一、長澤孝志、西澤直行、糖尿病モデル動物におけるワサビ成分の病態緩和効果、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名古屋・名城大学
- ③ 清野紘子、伊藤芳明、木村賢一、長澤孝志、西澤直行、ワサビ成分による抗糖尿病効果、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 19 日、京都・京都国際会議場

[その他]

セミナーなど

- ① 伊藤芳明、本わさび含有化合物がもつ抗生活習慣病特性、岩手大学新技術説明会、2009 年 1 月 13 日、東京・科学技術振興機構東京本部
- ② 伊藤芳明、わさび成分の抗糖尿病効果、平成 19 年度いわて産学連携フォーラム～「リエゾン I」マッチングフェア～、2007 年 11 月 2 日、盛岡・いわて県民情報交流センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 芳明 (ITO YOSHIAKI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：50312517

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし