

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25560049
研究課題名(和文) プロシアニジンはいンクレチン効果を示すか？

研究課題名(英文) Does procyanidin show an incretin effect?

研究代表者

芦田 均 (Ashdia, Hitoshi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90201889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロシアニジン、特に4量体であるシナムタンニンA2をマウスに経口投与した時にインクレチンホルモンであるGLP-1の分泌が促進され、インスリン分泌の上昇をもたらした。その結果、GLUT4の細胞膜移行が起こり、糖負荷時の一過的高血糖を低下させることも判った。シナムタンニンA2の作用機構として、骨格筋細胞において、インスリン経路とAMPK経路の両経路の活性化が認められた。他のプロシアニジンもインスリン経路の一部とAMPK経路の両経路を活性化させた。これらのことから、プロシアニジンは高血糖予防に有効な食品成分であることが判った。

研究成果の概要(英文)：Procyanidins, in particular cinnamtannin A2 possessed secretion of incretin hormone, GLP-1, and subsequently increased secretion of insulin from beta-cells. This effect led to improve postprandial hyperglycemia by promoting GLUT4 translocation to the plasma membrane. As the molecular mechanism, cinnamtannin A2 activated both insulin- and AMPK-signaling pathways. Other Procyanidins also increased part of insulin-signaling pathway in addition to the AMPK-signaling pathway. From these results, procyanidins are effective food factors for prevention of hyperglycemia.

研究分野：食品機能学

キーワード：プロシアニジン インクレチン 保健機能食品

1. 研究開始当初の背景

食後の高血糖を低下させるインスリンは膵臓から分泌されるが、糖を経口投与すると経静脈投与よりも大きなインスリン作用が現れるという「インクレチン効果」が明らかになった。「インクレチン」とは、消化管ホルモングルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)とグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP)の総称である。GLP-1 は、グルカゴンと同じ遺伝子 proglucagon の配列から作られるペプチドであり、小腸下部の L 細胞から分泌され、一方で、GIP は脂肪が刺激になって十二指腸の K 細胞から分泌される。GLP-1 と GIP とはいずれも、血糖値依存的に膵臓の細胞からのインスリン分泌を促進する。このような背景から、これらホルモンの作用が注目され、特に GLP-1 を分子標的とした糖尿病治療のための医薬品開発が進んでいる。一方で、食品による高血糖予防・改善効果も注目されているが、これまでに明確な「インクレチン効果」を示すポリフェノールは見出されていない。

そこで、われわれはプロシアニジンに着目した。その理由として、われわれはすでにプロシアニジン高含有組成物が高血糖抑制効果を示すことを報告していたが、作用機構が明確でなかったため、それを明確にしたいと考えたためである。プロシアニジンは、カカオや黒大豆、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縮合したオリゴマーで、2~15 量体として存在する。オリゴマーであるプロシアニジンは抗酸化性が高いと期待できるが、重合度の高い化合物は、モノマーと比べると腸管からほとんど吸収されない難吸収性ポリフェノールである。また、これまでの研究で、ポリフェノールはわずかな構造の違いによって、機能やその作用機構が異なるということが報告されており、プロシアニジン類も重合度や結合形態によって生体での働きが異なると考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、エピカテキンのオリゴマーであるプロシアニジンに注目し、マウスに経口投与することで、「インクレチン」である GLP-1 や GIP の分泌が亢進されるか否かを検証し、その有効性を実証するとともに、作用機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)プロシアニジン高含有食品素材をマウスに投与した時のインクレチン効果を検証する。検証には、GLP-1 の血漿への分泌、血漿インスリンレベルの変動、筋肉におけるインスリン依存的グルコース輸送担体 4 型 (GLUT4) の細胞膜移行とその関連シグナ

ルの解明を指標とする。

(2)プロシアニジンの二、三、四量体をプロシアニジン高含有食品素材から単離・精製する。

(3)単離・精製した各プロシアニジン化合物を用いて(1)と同様の実験を行うことで最も有効性の高い化合物を明らかにする。

(4)最も有効性を示した化合物について、その作用機構を解明する。

4. 研究成果

(1)プロシアニジン高含有食品素材であるカカオポリフェノール抽出物 (CLPr)、あるいはそれから分画した高重合(≥ 4 量体)プロシアニジン画分と低重合(≤ 3 量体)プロシアニジン画分を、研究協力者である株式会社明治の夏目みどり氏と岡部正明氏に調製して頂いた。これらを 1 または 10 mg/kg・BW の濃度で ICR 雄性マウスに強制経口投与し、60 分後にグルコースを 1 g/kg・BW 経口投与することで糖負荷試験を実施した。その結果、これらのプロシアニジン画分は濃度依存的にマウスの血糖値上昇を抑制した。この時、プロシアニジン画分は、筋肉組織においてインスリン系経路と AMPK 経路の活性化を介した GLUT4 の細胞膜移行を促進することが明らかとなった。また、グルコース糖負荷をかけない条件下で、プロシアニジン画分を投与して 60 分後に血中 GLP-1 レベルとインスリンレベルがいずれも上昇した。すなわち、プロシアニジン画分は、インクレチン効果によってインスリンレベルを上昇させ、筋肉でのインスリン系経路を活性化させたと考えた。

インクレチン効果が関与しない培養細胞実験でプロシアニジン画分を調べたところ、CLPr、高重合画分、ならびに低重合画分は、いずれも濃度依存的に L6 筋管細胞内へのグルコース取り込みを促進させるとともに、GLUT4 の細胞膜移行が亢進させることを確認した。GLUT4 の細胞膜移行に関わるシグナル伝達機構として、AMPK のリン酸化が関与していることも確認した。これらの効果は低重合画分の方が、高重合画分よりも強いことが判った。一方で、いずれの画分もインスリンシグナル伝達系には変化を及ぼさなかった。以上のことから、プロシアニジンは、AMPK のリン酸化を介して GLUT4 細胞膜移行を促進するが、動物個体レベルではこの経路に加えてインクレチン効果が働き、インスリン経路の活性化も起こることが明らかとなった。

(2)プロシアニジンは三量体までは市販されているが、きわめて高価であり、動物実験を行うことが難しい。また、四量体は市販されていない。そこで、プロシアニジンの化合

物レベルでの研究を行うために二、三、四量体を黒大豆種皮抽出物から単離・精製を行なった。なお、この研究はフジッコ株式会社の伊藤千秋氏によりなされ、提供を受けた。提供して頂いた各化合物は、高速液体クロマトグラフィーにより 95%以上の純度であることを確認した。

(3) プロシアニジン高含有組成物は、上記(1)で示したように、GLP-1 分泌促進を介するインスリン分泌増強作用(インクレチン効果)と AMPK のリン酸化亢進を介して、筋肉での GLUT4 の細胞膜移行を促進させることにより血糖上昇を抑制することが判った。そこで、上記(2)で単離・精製した各プロシアニジン化合物を用いて(1)と同様に動物実験でのインクレチン効果の検証を行うことで、各化合物による効果の違いがあるのかどうかを検証した。

単離・精製したプロシアニジン各化合物あるいは単量体であるエピカテキンを 1 ng/kg・BW から 1 mg/kg・BW までの濃度で ICR 雄性マウスに強制経口投与し、60 分後にグルコースを 1 g/kg・BW を経口投与することで耐糖能試験を実施した。その結果、各化合物は濃度依存的にグルコース負荷による一過的な高血糖を抑制した。曲線下面積で評価したところ、エピカテキンとプロシアニジン二量体は 10 µg/kg・BW で有意差が認められたのに対し、プロシアニジン三量体と四量体では 0.1 µg/kg・BW で有意差が認められた。投与量が 10 µg/kg・BW での抑制率は、エピカテキンが約 20%、二量体が約 25%、三量体が約 55%、四量体が約 45%であり、抑制効果はプロシアニジンの重合度に依存的であった。また、インクレチンホルモンである GLP-1 とインスリンの分泌量を検討したところ、プロシアニジン四量体だけが有意に血漿中への GLP-1 の分泌を促進させ、それに付随して血漿インスリンレベルも上昇させた。三量体までの化合物も、重合度依存的にこれらの分泌量を増加させる傾向が認められたが、有意差はなかった。なお、GLP-1 を分解する DPP-4 に対するプロシアニジンの直接的な阻害効果はないと考えている。

これらのことから、試験に供した化合物の中では、四量体であるシンナムタンニン A2 が高血糖抑制最も最も強い効果を示し、有意なインクレチン効果を示すことが明らかとなった。ポリフェノールが DPP-4 ではなく、GLP-1 を分泌することでインクレチン効果を発揮することを明らかにしたのは、本研究が初めてである。

(4)最後に、プロシアニジン各化合物を投与したマウス筋肉を用いて化合物レベルでの作用機構を検証した。まず、食後高血糖の消費に重要な働きを示すグルコース輸送担体 4 型 (GLUT4) の細胞膜移行を調べたところ、いずれの化合物を投与したマウスの後肢骨

格筋においても、有意な GLUT4 の細胞膜移行が認められた。この作用機構を解明するため、インスリン受容体 サブユニット (IR) とその下流のインスリン受容体基質 1 (IRS-1) のリン酸化状態を調べたところ、いずれのタンパク質もプロシアニジン四量体でのみ有意なリン酸化の促進が認められた。これらの結果は、プロシアニジン四量体のみが有意なインクレチン効果を示し、インスリン分泌をもたらしたことと一致する。

さらに、IRS-1 の下流について調べたところ、PI3K のリン酸化はいずれの化合物でも促進されており、その下流の Akt の Ser473 のリン酸化も同様であった。これらのタンパク質のリン酸化は、プロシアニジンの重合度に依存して強くなった。しかし Akt の Thr308 については、IR や IRS-1 と同様に四量体においてのみ有意にリン酸化が促進された。これらの結果は、プロシアニジンは有意なインクレチン効果を示さなくとも、動物個体ではインスリン情報伝達経路の一部を活性化し、四量体ではインスリンの影響が強く、インスリン情報伝達経路を完全に活性化させることが判った。細胞レベルでは、インスリン情報伝達経路の活性化が認められないことから、動物個体ではインクレチン効果に加えて、間接的に PI3K を活性化させる因子が働いているのではないかと考えられる。この点は、今後さらなる検討を要する。

細胞系で GLUT4 を細胞膜移行させる作用機構として働いている AMPK 経路の関与についても調べた。その結果、AMPK のリン酸化も用いた全てのプロシアニジンで認められ、やはり重合度に依存してリン酸化の程度が強くなった。一方で、われわれは、プロシアニジン高含有組成物である黒大豆種子抽出物をマウスに経口投与した時、プロシアニジンの重合度が高くなるほど血液中での存在量が少ないことを見出している。これらのことから、AMPK 経路の活性化についても、直接作用ではなく、何らかの要因により間接的に活性化されるのではないかと推察している。

まとめ

以上のことから、プロシアニジンはインクレチン効果を発揮し、インスリン情報伝達経路を活性化させるとともに、運動や筋収縮で活性化される AMPK 経路も活性化させることで、食後高血糖を速やかに低下させることができる。すなわち、これらの両経路の活性化をもたらすことで、プロシアニジン高含有食品の継続的な摂取は、糖尿病の予防・改善にも繋がることが期待される。ポリフェノールによる GLP-1 分泌を介したインクレチン効果の発見は、世界で初めてのことであり、研究で得られた成果の意義は高いと考えている。

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3件)

(1) 芦田 均, 山下 陽子: 食品成分による耐糖の異常の改善について, 食品加工技術, 査読無, 35巻, 2015年, 31-35

(2) 山下 陽子, 芦田 均: プロシアニジンの新たな生体調節機能, 化学と生物, 査読有, 58巻, 2014年, 493-494

(3) Yoko Yamashita, Masaaki Okabe, Midori Natsume, Hitoshi Ashida: Cinnamantannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 activity and insulin secretion, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 査読有, 77巻, 2013年, 888-891, DOI: 10.1271/bbb.130095

〔学会発表〕(計14件)

(1) 芦田 均, 山下 陽子: プロシアニジンの高血糖・抗肥満予防作用について, 第12回日本機能性食品医学学会総会(招待講演), 2014年12月14日, 京都国際会館(京都府)

(2) 光橋 雄史, 山下 陽子, 夏目 みどり, 芦田 均: カカオリカープロシアニジンの投与時間の違いがエネルギー代謝と時計遺伝子発現におよぼす効果, 第19回日本フードファクター学会学術集会, 2014年11月8日, 鹿児島大学(鹿児島県)

(3) 王 柳青, 山下 陽子, 芦田 均: 蛍光検出器付き HPLC によるプロシアニジン分析法の構築とその適用, 第19回日本フードファクター学会学術集会, 2014年11月8日, 鹿児島大学(鹿児島県)

(4) 王 柳青, 山下 陽子, 芦田 均: 高感度 HPLC を用いたプロシアニジン分析系の構築とその適用, 2014年度日本農芸化学会関西支部大会(第486回講演会), 2014年9月20日, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県)

(5) 芦田 均: 食品成分による耐糖能異常の改善について, 食品機械研究会: 第12回高付加価値食品開発フォーラム(招待講演), 2014年9月6日, 富士教育研修所(静岡県)

(6) 山下 陽子, 芦田 均: プロシアニジンのインクレチンならびにエネルギー産生上昇効果, 第68回日本栄養・食糧学会(招待講演), 2014年5月31日, 酪農学園大学(北海道)

(7) 芦田 均: カテキンとその重合体による肥満・高血糖予防効果について, 九州大学食品

機能デザイン研究センター公開講演会(招待講演), 2014年1月11日, 九州大学(福岡県)

(8) 山下 陽子, 岡部 正明, 夏目 みどり, 芦田 均: カカオ由来プロシアニジンによるインクレチン効果を介した血糖調整作用, 第18回日本フードファクター学会学術集会, 2013年11月9日, 東京農業大学(東京都)

(9) 芦田 均: 食品に含まれるポリフェノールの機能性研究, 第5回食品薬学シンポジウム(招待講演), 2013年11月2日, 京都大学(京都府)

(10) 山下 陽子, 芦田 均: カカオポリフェノールの高血糖・抗肥満抑制効果とその作用機構, 第5回食品薬学シンポジウム, 2013年11月1日, 京都大学(京都府)

(11) 山下 陽子, 岡部 正明, 夏目 みどり, 芦田 均: プロシアニジンによる血糖値上昇抑制効果とその作用機構解明, 日本栄養・食糧学会第52回近畿支部大会, 2013年10月25日, 滋賀県立大学(滋賀県)

(12) Hitoshi Ashida, Yoko Yamashita, Masaaki Okabe, Midori Natsume: Prevention mechanism of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract, The IUNS 20th International Conference of Nutrition (ICN2013), 2013年9月15日, グラナダ(スペイン)

(13) 山下 陽子, 岡部 正明, 夏目 みどり, 芦田 均: 重合度の異なるカカオ由来プロシアニジンが筋肉細胞での GLUT4 膜移行を介したグルコース取り込みにおよぼす効果, 第60回日本食品科学工学会, 2013年8月30日, 実践女子大学(東京都)

(14) 山下 陽子, 岡部 正明, 夏目 みどり, 芦田 均: プロシアニジンのインクレチン効果を介した食後高血糖調節作用, 第68回日本栄養・食糧学会, 2013年5月25日, 名古屋大学(愛知県)

〔図書〕(計2件)

(1) Liuqing Wang, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida: ICP2014 Organizing Committee, Polyphenols Communications, 2014, 658 (589-590)

(2) 山下 陽子, 芦田 均, 建帛社, 食品因子による栄養機能制御, 2015, 296(177-195)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: エネルギー代謝活性化剤

発明者：夏目 みどり、芦田 均、山下 陽子

権利者：株式会社明治

種類：特許

番号：特願 2014-213249

出願年月日：2014 年 10 月 26 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

芦田 均 (ASHIDA Hitoshi)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90201889

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：