

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850082

研究課題名(和文)重合ポリフェノールの消化管ホルモンを介した代謝調節機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the functions for metabolic regulation of polymeric polyphenol through intestinal hormone

研究代表者

山下 陽子 (Yamashita, Yoko)

神戸大学・農学研究科・特命助教

研究者番号：10543796

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)：重合ポリフェノールのインクレチン効果解明を行った。重合ポリフェノールとしてプロシアニジン高含有組成物を明期にマウスに投与すると、投与一時間後に血中GLP-1とアディポネクチンの分泌が促進することを明らかにした。この効果は、投与するタイミングによって異なり、暗期では弱くなった。このことから、GLP-1によるインスリン分泌促進が時計遺伝子の位相を前進させていること可能性が示唆された。また、テアフラビンを投与するとカテコールアミンの分泌も促進していた。つまり、重合ポリフェノールは消化管を初発段階として、腸管ホルモンやカテコールアミンの分泌を促進して、糖代謝の改善に寄与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：An aim of this study is clarification of incretin effect of polymeric polyphenols. It was found that procyanidin as a polymeric polyphenol promote secretion of incretin hormone GLP-1 and adiponectin in plasma 1hour after oral administration to the mice at light period. It was noteworthy that this promotion effect was differ from the administration timing: the effect is weakened when procyanidin was administered at dark period. This difference suggest that insulin secretion by GLP-1 advances phase of clock gene expression. Oral administration of theaflavin, another polymeric polyphenol, promoted secretion of catecholamine. Thus, polymeric polyphenols primarily act to the digestive tract and may contribute to improvement of carbohydrate metabolism through promoting secretion of intestinal hormones and adipocytokines.

研究分野：食品機能

キーワード：重合ポリフェノール 消化管ホルモン GLP-1 インクレチン 血糖調節効果

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の患者が急増しており、肥満によるインスリン抵抗性や高血糖を予防・改善する食品因子の探索およびその作用機序の解明が求められている。これまでに、カテキン類が重合したプロアントシアニジンやテアフラビン類を高濃度に含有する食品や食品由来組成物が、高血糖や肥満に対して予防効果を有する可能性が報告されているが、作用機序についての詳細は十分に明らかとなっておらず、そのほとんどが筋肉や脂肪細胞など末梢組織における作用あるいはグルコシダーゼ活性阻害に留まっている。重合ポリフェノール類は、高分子であるため、経口摂取しても消化管からの吸収効率は極めて低いことから、生体利用性も低いと考えられており、機能性や体内動態に関する研究が少ない。食品成分の作用点は末梢組織だけでなく、生体内での代謝に関連するホルモン調節機構とも深く関連している。特に、重合体である高分子ポリフェノール化合物の末梢組織での作用は、消化管内におけるホルモン分泌調節機構を変化させることから始まると考えられる。これが、重合ポリフェノールの末梢組織での作用を制御する中心的な役割、もしくは、作用の初発段階であるとも想定される。ポリフェノール等の非栄養素が消化管からのホルモン分泌刺激作用に及ぼす影響について報告はほとんどなく、さらにその分泌機序や作用機序の詳細も十分に解明されていない。また、重合ポリフェノールとしては、種々の重合度と構造が存在する。しかし、単一化合物の単離が困難であることから、其々の作用機序や力価が不明であり、単一化合物レベルでの研究が少ない。

2. 研究の目的

本研究では、消化管ホルモンの調節作用に着目し、重合ポリフェノールの高血糖と肥満に対する予防・改善効果とその作用機序の解明を行う。さらに、消化管内での初発標的分子ならびに活性本体を同定することで、重合ポリフェノールの代謝変動機序の全貌解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 重合ポリフェノールの消化管ホルモン分泌促進効果について、培養細胞ならびに実験動物を用いて検証する。

(2) 重合ポリフェノールによるホルモン分泌が相互作用することによって血糖調節能を発揮しているのか否かについて、動物実験を用いて検証する。

(3) 初発標的分子と活性本体を解明するために、培養細胞と実験動物を用いたレッドクスサイクル染色や二次元電気泳動、MASCOT解析を行う。

4. 研究成果

(1) 重合ポリフェノールの消化管ホルモン

分泌促進効果について、ICR 雄性マウスに、プロシアニジン高含有食品素材であるカオポリフェノール抽出物(CLP_r)を 150 mg/ kg 体重、あるいはエピカテキンとプロシアニジン 2 から 4 量体の化合物を 10 μg/ kg 体重で強制経口投与し、その 60 分後における消化管ホルモンの GLP-1 分泌量、ならびにアディポサイトカインのアディポネクチン、インスリンを測定した。その結果、プロシアニジン 4 量体のシンナムタンニン A2 は、コントロールと比較して、有意に GLP-1 分泌を増加させ、それに伴ってインスリンも分泌促進させることが明らかとなった。CLP_r ならびに 4 量体未満のプロシアニジンも、GLP-1 分泌促進傾向が認められた。プロシアニジン投与した 60 分後にグルコースを 1 g/kg 体重で投与することで耐糖能試験を行ったところ、プロシアニジンは血糖上昇を抑制することが明らかとなった。その際、筋肉における糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜移行が促進しており、シグナル伝達経路にはインスリン経路の活性化が関与していることが明らかとなった。また、インスリン非依存的な経路である AMP 活性化キナーゼ (AMPK) も促進していることも確認した。以上のことから、プロシアニジンは消化管の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経路を活性化が高血糖抑制に寄与することが明らかとなった。なお、プロシアニジン 4 量体を 10 μg/kg 体重で投与した 60 分後における血中量を測定したが、プロシアニジン 4 量体は検出されなかった。

テアフラビンでも同様の実験を実施した。紅茶より抽出したテアフラビン高含有組成物(BTP)を 150 mg/ kg 体重で強制傾向投与した 60 分後に糖負荷試験を行ったところ、糖負荷後の血糖上昇を濃度依存的に抑制していることが明らかとなった。この時、筋肉における GLUT4 の細胞膜移行が促進し、シグナル伝達経路としてインスリン経路と AMPK 経路の両方が活性化していることが明らかとなった。従って、プロシアニジンやテアフラビン等の難吸収性の重合体ポリフェノール類は、消化管内でインクレチン効果を発揮することが判った。

また、重合体ポリフェノールは、インクレチン効果とは別に、インスリン非依存的な経路である AMPK も活性化することがわかった。AMPK の上流では、交感神経系のカテコールアミンやアディポサイトカインのアディポネクチンが活性化に関与していることが報告されている。そこで、上記の実験条件下でアディポネクチンの分泌量を測定したところ、プロシアニジンに関しては CLP_r がアディポネクチン分泌量を増加させることを明らかになった。テアフラビンについては、化合物レベルでの研究はできなかったが、テアフラビン高含有の BTP がカテコールアミンの分泌量を促進させることを明らかにした。

(2) 重合ポリフェノールによるホルモン分泌が相互作用することによって血糖調節能を発揮しているのか否かについて検証を行った。(1)で述べたとおり、インクレチンホルモンの分泌が初発段階となり、他のホルモン分泌を促進しているのではないかと推察した。そこで、CLPr を投与する 15 分前に GLP-1 受容体阻害剤の Exendin(9-39)を腹腔内投与し、CLPr 投与 1 時間後のインスリン、GLP-1 とアディポネクチン分泌量を測定した。GLP-1 受容体阻害剤投与群において、CLPr に認められたインスリンならびにアディポネクチン分泌促進効果が抑制される傾向が示された。GLP-1 はインスリン分泌を制御することは報告されているが、アディポネクチンに及ぼす影響は明らかとなっていない。以上の結果から、GLP-1 がアディポネクチンを分泌に関与する可能性が示された。一方、CLPr の投与による AMPK の活性化促進作用は、阻害剤の前処理によってもキャンセルされなかったことから、アディポネクチンを介した AMPK の活性化以外の経路も関与していることが示唆された。いずれにせよ、重合ポリフェノールは消化管ホルモン分泌が他のアディポサイトカインやインスリンホルモンの分泌を促進させることから、プロシアニジンによる作用は GLP-1 分泌が初発段階を担っている可能性が明らかとなった。

(1) や (2) で述べた効果は、CLPr を投与するタイミングによって異なり、時計遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが判った。消化管ホルモンやカテコールアミンの分泌について、時計遺伝子が関与していることが報告されている。プロシアニジンがどのようなメカニズムで時計遺伝子の発現に関与しているかは不明であるが、今後詳細を検討する。

(3) 重合ポリフェノールの分子標的の探索を行う実験系確立を試みた。分析系を構築するためのモデルとして、カテキンとアルブミンの結合を調べた。その結果、カテキンの 3 位がアルブミンの分子表面と薬物結合サイトにあるトリプトファン残基との結合に重要であり、エピガロカテキンガレートでは、ガレートエステルとこれらのトリプトファン残基とが結合していることを明らかにした。

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 4 件)

- (1) Yamashita, Y., Wang, L., Namba, F., Ito, C., Toda, T., and Ashida, H.: Procyanidin promotes translocation of glucose transporter 4 in muscle of mice through activation of insulin and AMPK signaling pathways. PLoS ONE, 査読有,

11, 2016 年, e0161704

- (2) 芦田 均, 山下 陽子: 食品成分による耐糖能異常の改善について, 食品加工技術, 査読無, 35 巻, 2015 年, 31-35
- (3) Nagano, T., Hayashibara, K., Ueda-Wakagi, M., Yamashita, Y., and Ashida, H.: Black tea polyphenols promotes GLUT4 translocation through both PI3K- and AMPK- dependent pathways in skeletal muscle cells. Food Science and Technology Research, 査読有, 21, 2015 年, 489-494
- (4) 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

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) 山下 陽子: 脂質・エネルギー代謝と体内時計との関係 ~いつ・何をたべる?~ 第 24 回日本植物油協会植物油栄養懇話会(招待講演), 2016 年 11 月 11 日, 如水会館(東京)

- (2) Ashida, H. and Yamashita, Y.: Prevention of hyperglycemia and obesity by cacao polyphenols. The 3rd International Conference on Pharma and Food (ICPF2016) (Invited Speaker), Nov16-18, Nihondaira Hotel (Shizuoka)

- (3) 光橋 雄史, 山下 陽子, 芦田 均: カカオポリフェノールの代謝促進効果: 投与タイミングと時計遺伝子(YIA 受賞). 第 21 回フードファクター学会学術集会, 2016 年 11 月 19 日~20 日, 富山国際会議場大手町フォーラム(富山県)

- (4) 山下 陽子, 難波 文男, 戸田 登志也, 芦田 均: 黒大豆種皮由来のプロシアニジンとアントシアニンの肥満・高血糖予防効果とその作用機構, 第 55 回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 2016 年 10 月 22 日, 帝塚山学院大学(大阪府)

- (5) 光橋 雄史, 山下 陽子, 芦田 均: カカオポリフェノール抽出物の投与タイミングと時計遺伝子の関係, 第 55 回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 2016 年 10 月 22 日, 帝塚山学院大学(大阪府)

- (6) 池田 真規, 若木 学, 林原 香織, 山下 陽子, 芦田 均: カテキン誘導体とアルブミンの結合親和性について, 日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会(第 496 回講演会), 2016 年 9 月 16 日~17 日, ピアザ淡海・滋賀県立大学(滋賀県)

(7) **山下 陽子**：～食品の生体機能性に関する研究に魅了されて～難消化性ポリフェノールによる糖代謝・脂質代謝促進効果、第22回フードサイエンスフォーラム学術集会(招待講演)、2016年9月8日～9日、ゆのごう美春閣(岡山県)

(8) **山下 陽子**, 李 岫, 吉岡 泰淳, 芦田 均：黒大豆種皮ポリフェノールの抗酸化能を介した疾病予防効果、第10回日本ポリフェノール学会、2016年8月4日～5日、芝浦工業大学(東京都)

(9) 池田 真規, 若木(上田) 学, 林原 香織, **山下 陽子**, 芦田 均：カテキンの相互作用による血清アルブミンの結合親和性に対する影響、第10回日本ポリフェノール学会、2016年8月4日～5日、芝浦工業大学(東京都)

(10) **山下 陽子**, 光橋 雄史, 芦田 均：難消化性ポリフェノールの高血糖・肥満抑制効果に関わる新奇分子ターゲット、日本農芸化学会関西支部例会(招待講演)、2016年7月9日大阪府立大学(大阪府)

(11) **山下 陽子**, 光橋 雄史, 夏目 みどり, 芦田 均：カカオポリフェノールの時間遺伝子に制御されたエネルギー代謝について、第70回日本栄養・食糧学会(招待講演)、2016年5月13日～15日、ポートピアホテル・武庫川女子大学(兵庫県)

(12) 光橋 雄史, **山下 陽子**, 芦田 均：カカオポリフェノール抽出物の投与タイミングと時計遺伝子の発現量および血糖調節作用の関係、第70回日本栄養・食糧学会、2016年5月13日～15日、ポートピアホテル・武庫川女子大学(兵庫県)

(13) **Yamashita, Y.**, Ashida, H: Preventive effects of cacao polyphenols on hyperglycemia and obesity. The 6th International Conference on Food Factors (ICOFF2015) (Invited Speaker), Nov. 22-25, Seoul (Korea)

(14) 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)

(15) 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)

(16) 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)

(17) **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)

〔図書〕(計 2件)

(1) 芦田 均, **山下 陽子**：第 編食品素材としてのポリフェノールの研究開発；4. カカオポリフェノールの抗肥満効果『ポリフェノール：『機能性成分研究開発の最新動向』波多野力, 下田博司編, シーエムシー出版、2016, 頁135-140, 総ページ数288.

(2) **山下 陽子**, 芦田 均：食品因子による栄養機能制御、建帛社、2015年、頁177-195, 総ページ296.

〔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：**山下 陽子**、芦田 均、夏目 みどり
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：
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

山下 陽子(YAMASHITA Yoko)
神戸大学・大学院農学研究科・特命助教
研究者番号：10543796

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()