

カカオ由来プロシアニジン画分による 生活習慣病予防・改善効果とそのメカニズム

芦田 均

神戸大学大学院農学研究科教授

【はじめに】

カカオは、チョコレートやココアの原料として、世界中で永く親しまれている食品である。近年、カカオの健康促進効果が着目されており、コレステロール排泄促進(1)や冠動脈疾患抑制効果(2)などが報告されている。カカオには、エピカテキンやプロシアニジンを主成分とするポリフェノールが豊富に含まれており、これらが健康促進効果に寄与している可能性が考えられているが、その作用機構については十分に明らかとなっていない。特に、エピカテキンの重合体であるプロシアニジンは、腸管内での糖類吸収阻害作用の報告(3)はあるが、その生体利用性が低いため、ヒトや実験動物を用いた健康促進効果の作用機構解明に関する研究例が少ない。本研究では、カカオ由来プロシアニジン画分を用い、マウスにおけるプロシアニジンの高血糖、インスリン抵抗性、肥満に対する予防効果の検証とその作用機構の解明を試みた。特に、血糖調節を担う糖輸送担体 (GLUT4) の膜移行を分子標的とした研究を実施した。

【糖輸送担体 (GLUT4)】

糖輸送担体のGLUT4は、骨格筋、心筋、脂肪組織に特異的に発現し、インスリンに応答して細胞内から細胞膜上に移行することで、グルコースを細胞内に取り込む役割を持つ。従って、生体において食後高血糖の消費に大きく関わっている。また、インスリン非存在下でも、GLUT4は運動や筋収縮などの刺激によって細胞膜へ移行することが知られている。このように、膜移行を支配するシグナル伝達経路には、インスリン依存性と非依存性 (AMPK) 経路がある(4)。これらの経路の概要は図1に示す通りである。ポリフェノール類は、血糖上昇抑制効果や糖尿病予防、改善効果などを持つことが知られており、数多くの化合物やそれらを多く含有する組成物についての研究報告がなされている。血糖調節効果を示すポリフェノールの中には、GLUT4の細胞膜移行を亢進、またはその上流のシグナル伝達経路を調整することで、有効性を発揮することがすでに見出されている。本研究室においても、代表的な茶カテキンであるエピガロカテキンガレート (EGCg) が、正常なL6筋管細胞のみならず、インスリン抵抗性を惹起したL6筋管細胞においてもGLUT4の膜移行を亢進し、細胞内へのグルコース取り込みを増加させることを報告した(5)。また、その他のカテキン類、ケンフェロール、ミリセチンなども、インスリン依存的な経路を活性化させてGLUT4の細胞膜移行を亢進し、グルコースの取り込みを増加させることが報告されている(6)。さらに、AMPK経路を介して作用を発揮する化合物についても、ケルセチンとその配糖体であるイソケルシトリン、ナリンゲニン、アントシアニジン(6)がある。さらにレスベラトロールについては、いずれの経路の活性化も報告されている(6)。しかし、プロシアニジンがGLUT4の膜移行ならびにそれに関連するシグナル伝達経路に及ぼす効果についての報告は無い。

本研究において、カカオ由来プロシアニジン画分を用いたマウスにおけるプロシアニジンの血糖調節作用とその作用機構について明らかにしたことを以下に述べる。

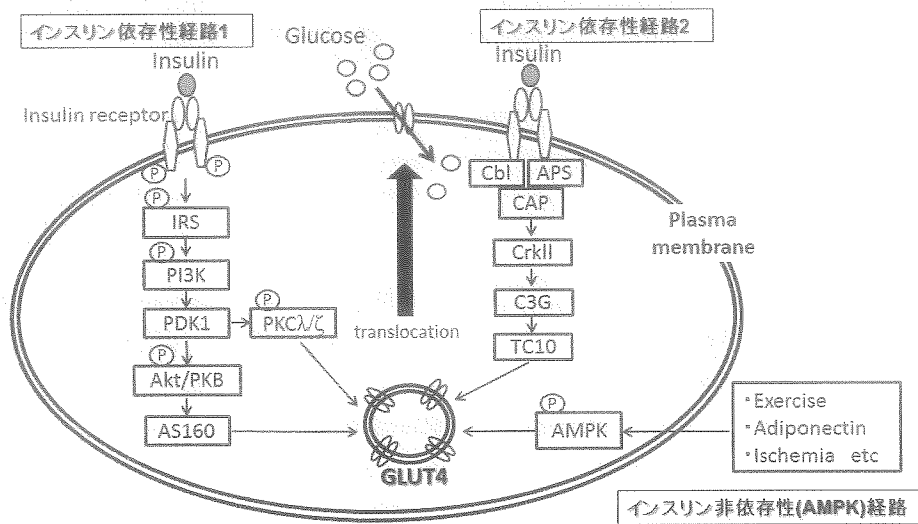


図1 GLUT4細胞膜移行に関わるシグナル伝達機構

【プロシアニジンの血糖調節促進および肥満抑制効果】

1. カカオ由来プロシアニジン画分の筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進効果

カカオ由来プロシアニジン高含有画分 (CLPr) をL6筋肉細胞に作用させた際、細胞内へのグルコース取り込みを濃度依存的に促進し、5あるいは10 $\mu\text{g/ml}$ で作用させた場合、コントロールと比較して有意であった。また、効果の認められた濃度において、CLPrはGLUT4の細胞膜移行を亢進していることを見出した。すなわち、CLPrは筋肉細胞において、GLUT4の膜移行を介したグルコース取り込み促進効果を持つことが明らかとなった(7)。

2. カカオ由来プロシアニジン低重合画分あるいは高重合画分の筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進効果

CLPrからプロシアニジン低重合画分 (1~3量体) と、高重合画分 (4量体以上) を調製し、1と同様の実験を実施したところ、低重合画分でより強いグルコース取り込み促進効果が認められた。その作用機構は、AMPK経路を介したGLUT4の細胞膜移行亢進であり、インスリン依存的な経路は介していなかった。一方、高重合画分は *in vitro* で二糖類加水分解酵素であるマルターゼ活性を優先的に抑制した。以上のことから、プロシアニジンは、重合度の程度により異なる作用を示すことが明らかとなった(8)。

表1 カカオ由来プロシアニジン高含有画分 (CLPr) および、低重合、高重合プロシアニジン画分の組成

(%)	CLPr	低重合	高重合
Total polyphenol	69.8	75.4	66.1
Catechin	4.28	10.03	0.25
Epicatechin	6.12	14.56	0.39
Procyanidin B2	3.60	8.43	0.24
Procyanidin B5	0.75	1.79	ND
Procyanidin C1	2.28	5.25	0.31
Cinnamtannin A2	1.01	0.23	2.91

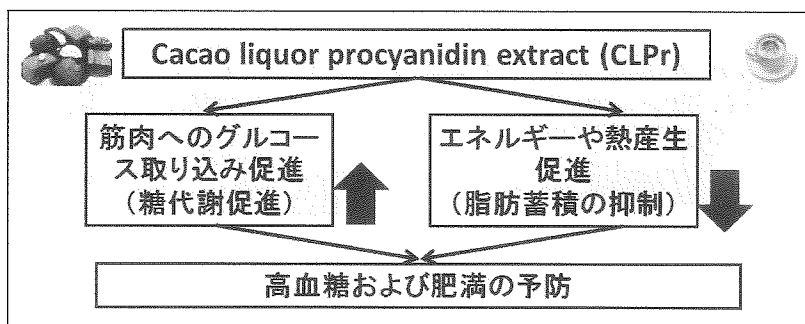
3. カカオ由来プロシアニジン画分の実験動物における血糖調節亢進および肥満予防効果

CLPr 50あるいは250mg/kg body weightをマウスに強制経口投与した60分後に、グルコース、マルトース、スクロース、デンプン1g/kg body weightを負荷したところ、CLPrはいずれの糖類を負荷した場合にも、血糖値上昇を有意に抑制した。また、CLPrは筋肉組織でのGLUT4の細胞膜移行を亢進させた。一方で、小腸での二糖類加水分解酵素活性の阻害作用は認められなかった。このことから、CLPrによる血糖調節亢進効果は、GLUT4の細胞膜移行亢進を介する作用であることが強く示唆された(7)。

次に、CLPr 0.5あるいは2%を含む高脂肪食（30%ラード）をマウスに13週間摂取させたところ、CLPrは高脂肪食が誘導する高血糖、インスリン抵抗性、ならびに肥満の惹起を抑制した。また、CLPr 2%摂取群では、飼育11週目に実施した耐糖能試験において、コントロール食群、高脂肪食群の両群で有意な血糖上昇抑制効果を示した。CLPrに認められた高血糖予防効果は、筋肉におけるAMPK経路の亢進を介したGLUT4の細胞膜移行促進効果であることを確認した。一方で、インスリン経路のPI3Kには影響を及ぼさなかった。さらに、CLPrによる筋肉、脂肪、肝臓におけるAMPK経路の亢進は、その下流でミトコンドリアの発生に関わるPGC-1 α と体熱産生に関連するUCPsの発現を増加させた。その結果、飼育終了時の高脂肪食群では、CLPr 2%摂取群で総脂肪重量が低値を示し、特に、皮下脂肪、腎周囲脂肪、ならびに精巣上体脂肪では有意な脂肪蓄積抑制効果が認められた。一方、除脂肪体重は各群間で有意な差を認めず、CLPrは脂肪組織を特異的に減少させることが示唆された。すなわち、CLPrがPGC-1 α とUCPsの発現増加を介してエネルギー・体熱産生を亢進させることにより、肥満の予防に寄与したと考えられた(9)。

【まとめ】

以上のことから、CLPrは、糖代謝と体熱産生を亢進させ、高血糖、インスリン抵抗性、ならびに肥満を予防する作用を持つことが明らかとなった。その作用機構として、AMPKの活性化を介した①筋肉でのGLUT4の細胞膜移行亢進とグルコース取り込みの促進ならびに、②PGC-1 α とUCPsの発現増加によるエネルギー・体熱産生の上昇とが関与することが明らかとなった。



【参考文献】

1. Yasuda et al, Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors*. 33, 211-223 (2008).
2. Mellor, D.D. et al, High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2

diabetes patients. *Diabet Med.* ; 27 : 1318-21 (2010).

3. Schäfer, A. et al: Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract.* 77, 41-46 (2007).
4. Hardie, D.G. et al: AMP-activated protein kinase : a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 36, 28-34 (2004).
5. Ueda, M. et al, Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 377, 286-290 (2008).
6. Kati, H. et al, Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1365-1402 (2010).
7. Yamashita, Y. et al, Cacao liquor procyanidin extract suppresses hyperglycemia by enhancing glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in skeletal muscle. *Journal of Nutritional Science.* 1 : e2 (9 pages) (2012).
8. Yamashita, Y. et al, Comparison of anti-hyperglycemic activities between low- and high-degree of polymerization procyanidin fractions from cacao liquor extract. *Journal of Food and Drug Analysis.* 20, 283-287 (2012).
9. Yamashita, Y. et al, Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Archives Biophysics and Biochemistry.* 527, 95-104 (2012).