

カカオ豆抽出物による脂肪細胞の分化と脂肪蓄積の抑制効果

芦田 均

神戸大学大学院農学研究科教授

【はじめに】

チョコレートやココアの原料であるカカオが多様な機能性を持つことは、チョコレート・ココア国際栄養シンポジウムなどを通して科学者だけでなく、一般の方々にも広く知られてきている。例えば、カカオの健康促進効果として、コレステロール排泄促進作用(1)や冠動脈疾患予防効果(2)はよく知られている。動脈硬化やインスリン抵抗性などの肥満に関連する疾病の予防効果もヒト試験をはじめとして報告されているが(3-4)、その詳細な作用機構と有効成分については、まだ十分に解明されていない。そこで本研究では、カカオ豆抽出物が脂肪の蓄積と脂肪細胞への分化に及ぼす影響について、動物実験で検証し、培養細胞実験で作用機構の検討を行った。

【脂肪細胞の分化過程】

脂肪細胞は、まず、中胚葉系幹細胞が前駆脂肪細胞となることが決定づけられ、次に、前駆脂肪細胞が増殖し、未成熟な小型脂肪細胞へと分化する。この過程で脂肪細胞特異的遺伝子の発現により特有の形態と機能を獲得する。さらに、生体のエネルギー代謝状態に応じて、中性脂肪をより多く蓄積することにより成熟大型脂肪細胞へと終末分化する(図1)。機能を終えた脂肪細胞はアポトーシスにより組織から排除される。また、前駆脂肪細胞に多くのミトコンドリアが発生すると褐色脂肪細胞へと分化する(5)。

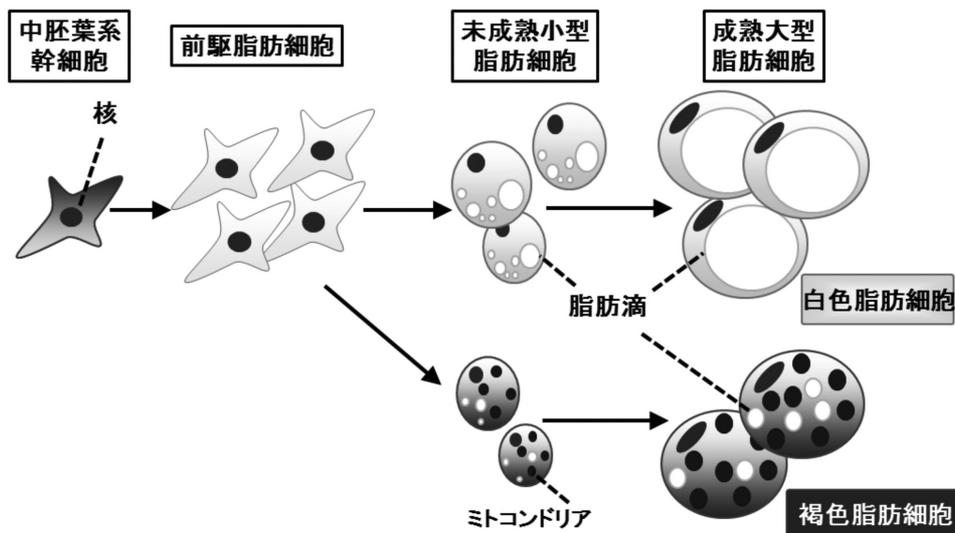


図1 脂肪細胞の分化過程

肥満は、脂肪細胞数の増加と脂肪細胞の肥大化の両者に起因すると考えられており、上述の前駆脂肪細胞の増殖や分化、肥大化、あるいは細胞死という一連の脂肪細胞のライフサイクルと密接に関連している。脂肪細胞の分化を制御する転写因子として、PPAR γ やC/EBPファミリーが知られている。特に、分化中期に発現するPPAR γ は、脂肪細胞の分化に必須の転写因子であり、同じくC/EBP α は、脂肪細胞がインスリン感受性の獲得に必須の転写因子であることから、これら二つの転写因子は脂肪細胞の分化におけるマスター・レギュレーターと位置付けられている(6)。これらの転写因子は、分化初期の一過性細胞増殖期に発現する転写因子 C/EBP β とC/EBP δ により発現誘導される。PPAR γ やC/EBP α は脂肪蓄積に関わる脂肪酸合成酵素FASやコレステロール代謝の転写因子であるSREBP-1などの発現を促し、脂肪細胞の肥大化をもたらす(図2)(7)。

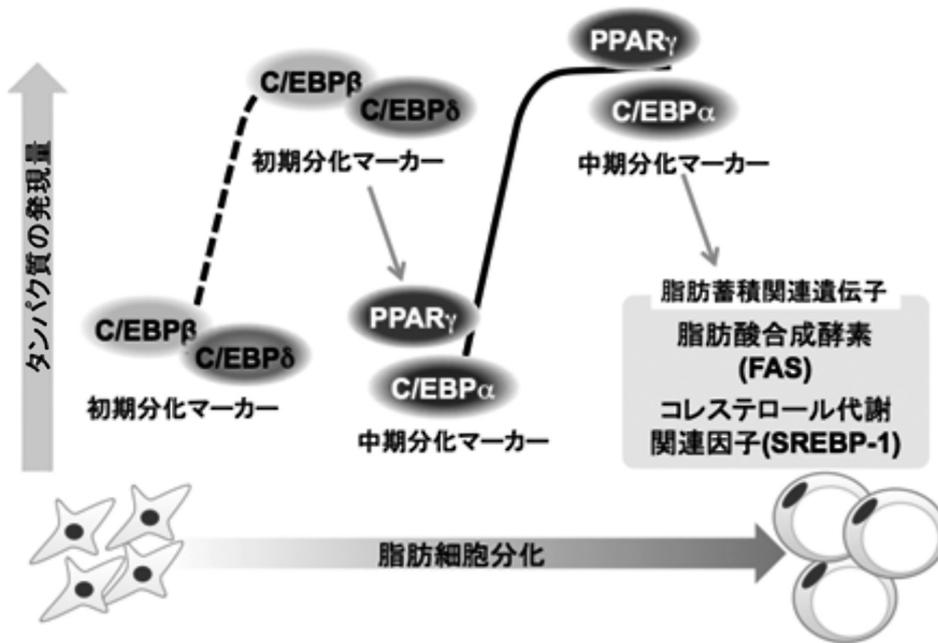


図2 脂肪細胞の分化に関わる因子

【動物実験でのカカオ豆抽出物の肥満抑制作用】

本研究では、カカオマスをもヘキサン脱脂した後に、50%エタノールで抽出したものをカカオ豆抽出物として用いた。雄性4週齢のICRマウス10匹を5匹ずつ2群に分け、一方の群にはカカオ豆抽出物を市販粉末飼料に1%となるように混餌して1週間自由摂取させた。もう一方の群は、抽出物を含まない飼料を与えて対照群とした。

カカオ豆抽出物は白色脂肪組織重量を有意に低下させることで、体重増加を抑制した。また、興味深いことに褐色脂肪組織重量は増加した。飼育終了時の血液マーカーの変化は、血漿の中性脂肪の減少とアディポネクチンの増加が認められた。一方で、コレステロールと血糖値には変化がなかった。

そこで、脂肪細胞の分化に関わる因子の発現をタンパク質レベルで調べたところ、PPAR γ とC/EBP α 、ならびにこれらの下流のFASとSREBP-1の発現が低下することが認められた。アディ

ポネクチンの増加が認められたことから、その下流でPPAR γ とC/EBP α の発現を調節するAMP活性化タンパク質キナーゼ（AMPK）のリン酸化（活性化）を調べたところ、カカオ豆抽出物投与群でAMPKとその下流にあり、脂肪酸合成の律速酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼ（ACC）のリン酸化（不活性化）が認められた。

これらのことから、カカオ豆抽出物は、アディポネクチンの増加をもたらすことでAMPKを活性化し、その結果、脂肪細胞分化のマスター・レギュレーターであるPPAR γ とC/EBP α の発現を低下させることで脂質代謝を改善し、肥満を抑制したと考えられた。

【培養細胞実験でのカカオ豆抽出物による脂肪細胞分化抑制作用】

本研究では、Greenら(8)により1974年に樹立されたマウス由来脂肪細胞である3T3-L1細胞を用いて、カカオ豆抽出物による脂肪細胞の分化抑制作用の確認と作用機構の解明を実施した。3T3-L1細胞を定法に従ってデキサメタゾン、メチルキサンチンならびにインスリンを混合した分化誘導剤を作用させることで、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化させた。この過程でカカオ豆抽出物を培養液に50~150 μ g/ml添加すると、抽出物の濃度依存的に細胞内への脂質蓄積量が減少した。なお、用いた抽出物の濃度範囲では、細胞毒性は認められなかった。

そこで、動物実験と同様に脂肪細胞の分化に関わる因子の発現をタンパク質レベルで調べたところ、PPAR γ とC/EBP α 、ならびにこれらの下流のFASの発現が抽出物の濃度依存的に低下した。次に、C/EBP β とC/EBP δ の発現についても調べたところ、同様に抽出物の濃度依存的にこれらの転写因子の発現が低下した。以上のことから、カカオ豆抽出物中の成分が、C/EBP β とC/EBP δ の発現低下をもたらし、その結果として、脂肪細胞のマスター・レギュレーターであるPPAR γ とC/EBP α の発現を抑制することが明らかとなった。

【カカオ豆抽出物中の有効成分の探索】

最後に、カカオ豆抽出物中の有効成分の探索を行った。カカオ豆抽出物をAmberlite XAD-7を充填したカラムクロマトグラフィーに供して、エタノールと水の混合溶媒で溶出することで、4つの画分に分けた。このうちエタノール：水が2：1の画分（E2W1）と1：2の画分（E1W2）が3T3-L1細胞の分化抑制効果を示し、PPAR γ とC/EBP α の発現低下をもたらした。特に、E2W1画分は、もとの抽出物より強い効果を示した。

これらの画分を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、E2W1画分には、メチルキサンチン誘導体であるテオプロミンとカフェインが主要ピークとして検出され、一方で、E1W2画分には、主にテオプロミンが含まれていることが判った。また、カカオ豆抽出物（100 μ g/ml）中には、テオプロミンが50 μ Mとカフェインが10 μ M含まれていることが判った。

そこで、これらの化合物の標品を3T3-L1細胞に作用させたところ、テオプロミンは濃度依存的に脂肪滴の蓄積を抑制し、10 μ Mで有意差が認められたのに対し、カフェインは100 μ Mまでの濃度では効果を示さなかった。また、PPAR γ とC/EBP α の発現においても同様の結果が得られた。カカオ豆中抽出物を分画した画分の結果から、これらの共存が脂肪細胞分化抑制効果を高めることが推測されたので、テオプロミンとカフェインを混合して細胞に作用させたところ、テオプロミンの効果のカフェインが増強することが認められた。

【まとめ】

以上のことから、カカオ豆抽出物をマウスに摂取させると脂肪の蓄積が抑制することが判った。この作用機構として、カカオ豆抽出物は、脂肪細胞の分化に関わる転写因子であるC/EBP β とC/EBP δ の発現を抑制し、さらに分化のマスター・レギュレーターであるPPAR γ とC/EBP α の発現も抑制すること脂質代謝を制御して、脂肪の蓄積を抑制することが判った。また、カカオ豆抽出物に含まれる主要な有効成分は、テオブロミンであり、カフェインは、テオブロミンによる抑制効果を増強する作用をもつことが明らかとなった (図3)。

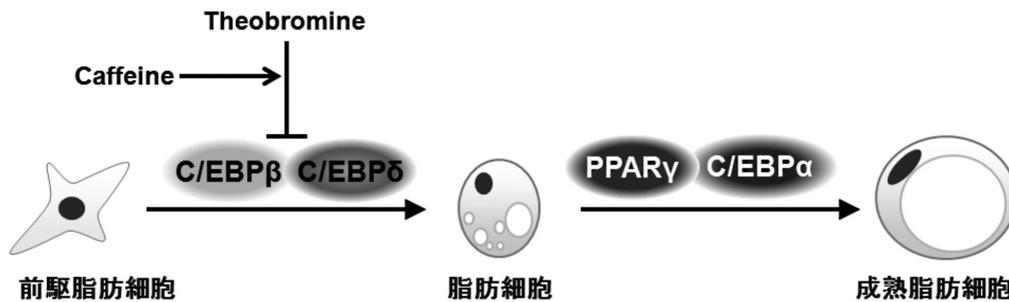


図3 カカオ豆抽出物中の有効成分であるテオブロミンとその効果を増強するカフェインによる脂肪細胞の分化抑制機構

【参考文献】

- (1) Yasuda, A. 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) Horn, P. et al, Dietary flavanol intervention lowers the levels of endothelial microparticles in coronary artery disease patients. *Br J Nutr*. 111, 1245-1252 (2014).
- (4) Grassi, D. et al, Shortterm administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr*. 81, 611-614 (2005).
- (5) Rosen, E.D. et al, Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16, 145-171 (2000).
- (6) Wu, Z.D. et al, Cross-regulation of C / EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 3, 151-158 (1999).
- (7) Spiegelman, B.M. et al. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity / diabetes. *J Biol Chem*. 268, 6823-6826 (1993).
- (8) Green, H. et al, An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 5, 19-27 (1975).