カカオポリフェノールのメタボリックシンドローム予防効果

Prevention Effects of Cacao Polyphenols on Metabolic Syndrome

山下 陽子

神戸大学大学院農学研究科
〒657-8501
神戸市灘区六甲台町 1-1

Yoko YAMASHITA
Department of Agribioscience,
Graduate School of Agricultural
Science
Kobe University, Rokkodai-cho,
Kobe, 657-8501, Japan

芦田 均

神戸大学大学院農学研究科
〒657-8501
神戸市灘区六甲台町 1-1

Hitoshi ASHIDA
Department of Agribioscience,
Graduate School of Agricultural
Science
Kobe University, Rokkodai-cho,
Kobe, 657-8501, Japan

論文要旨：カカオはカテキンやそれが重合したプロシアニジン類などのポリフェノールを多く含み、生活習慣病などのさまざまな疾病の予防効果が期待されている。本稿では、カカオポリフェノールによる AMP 活性化キナーゼ (AMPK) のリン酸化とインクレチンホルモンの分泌によるグルコース輸送担体 4 型の細胞膜移行を介した高血糖予防効果と AMPK のリン酸化によるエネルギー産生を向上させ脂肪蓄積予防効果について、わたしたちの知見を中心に紹介する。

Abstract: Cacao beans contain abundant polyphenols such as catechins and their polymers procyanidins. Intake of cacao product in particular dark chocolate has various health promotion effects including prevention of lifestyle diseases. We here show that prevention effects of cacao polyphenols on hyperglycemia and adiposity: Cacao polyphenols promote translocation of glucose transporter 4 to the plasma membrane of muscle cells accompanied by phosphorylation of AMP-activated kinase (AMPK) and GLP-1 secretion; and they increase energy expenditure-related factors such as uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 through phosphorylation of AMPK.

Key words: procyanidin, hyperglycemia, obesity, incretin

1 はじめに

ヒトは体内で栄養素を自らが産生する能力を持たず、食品を通して他の生命から栄養素を得て生命を維持している。これまでの人類の歴史の中で、ほとんどは食糧難な時代であったため、食糧を安定して確保するための工夫を凝らすとともに、飢餓に対応するための体質を獲得してきた。しかし、近年の急速な食の多様化に伴って、これまでは無かったエネルギー摂取過剰による疾病、いわゆるメタボリックシンドロームの患者やその予備軍が急増している。メタボリックシンドロームという定義は、1988 年に、Reaven¹⁾ がインスリン抵抗性と高インスリン血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症、高血圧が集積して糖尿病と心血管疾患に至るとする syndrome X という概念を提唱し、翌年、Kapran²⁾ が腹部肥満、糖尿病、高血圧、高中性脂肪血症の集積を「死の四重奏」

として提唱したことに始まる。また、1998 年には WHO がメタボリック症候群という名称で診断基準を発表し、全世界で認知される言葉となり、予防改善に取り組んでいるが、依然その患者数は増え続け、世界的に深刻な問題になっている。メタボリックシンドロームの予防・改善には日々の食事が重要な役割を占めており、中でも近年、ヒトの健康維持・増進に寄与する食品中の機能性成分が注目されている。機能性成分の一つであるポリフェノールは、非栄養素であるが抗酸化能をはじめ、生活習慣病予防効果、抗がん作用、免疫賦活作用、抗アレルギー作用、血流促進作用、認知症予防効果など多くの生理機能を発揮することが報告されている³⁻⁶⁾。本稿では、カカオポリフェノールについて、メタボリックシンドローム予防効果を中心に紹介する。

2 カカオポリフェノールについて

チョコレートやココアの原料であるカカオ (*Theobroma cacao*) は、神の食べ物と呼ばれ世界中で永く食さ

連絡者：山下 陽子
E-mail : yoko.y@crystal.kobe-u.ac.jp

れてきた食品である。15世紀アステカ族は神秘的な力を持つとして、食べる以外にも、薬・儀式の捧げ物、貢物、貨幣として重宝した。その後ヨーロッパ、世界各国へと広がった⁷⁾。古来より、カカオに薬効があることは人々の経験から認知されていたようであるが、近年になって、さまざまな生体機能とその作用機序が科学的に解明されつつある。カカオが生体に機能を発揮する成分の一つに、ポリフェノールが挙げられる。カカオポリフェノールは、カカオ豆を発酵・焙煎し、胚乳部分をすり潰したカカオマスと呼ばれる部分に豊富に含まれている。カカオに含まれるポリフェノールは、主にカテキンやそれが重合したプロシアニジン類である⁸⁾。プロシアニジンは、フラボノイド類のフラバン-3-オールに属し、エピカテキンあるいはカテキンが縮合したオリゴマーあるいはポリマー（2～15量体）として存在する⁹⁾。構造の一例をFig. 1に示す。自然界に存在するプロシアニジンは、(-)-エピカテキンからなるもののほうが、(+)-カテキンから構成されるものより多く見いだされている¹⁰⁾。カカオポリフェノールに関しては、カカオ豆の発酵過程で主にモノマーからオリゴマーに生合成されると報告さ

れているが、詳細な経路に関しては、まだ十分に解明されていない。プロシアニジンは、結合様式の差で立体構造も異なり、脂質やタンパク質、糖や核酸などの他の化合物との親和性の変化をもたらす。さらに、分子構造の違いにより体内動態や生体機能が異なる。カカオポリフェノールに含まれるプロシアニジン類は、特徴として基本骨格となる(-)-エピカテキンのB環が垂直に曲がっているため、二量体のプロシアニジンB2の[(-)-エピカテキン(C4-C8), (-)-エピカテキン]はU字カーブを描き、二つのB環同士が重なり合う構造をとっている。このような現象は、付加的な結合だけでなく、立体結合でも認められヒドロキシグループの3位が分子の立体構造を位置づける重要な役割を果たしている。さらに高重合なプロシアニジンでは、ねじれ構造をとる。例えば(-)-エピカテキン(C4-C8)が結合した4量体では、左側にねじれた立体配置をとる¹¹⁾。水酸基による抗酸化能に着目すれば、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。一方で、重合度の高い高分子化合物は、モノマーと比べると腸管からほとんど吸収されないと考えられるが、様々な生理機能を発揮することも報告されている^{12, 13)}。

3 カカオポリフェノールの高血糖予防効果とその作用機構

3・1 糖輸送担体の膜移行促進を介した筋肉組織への糖取り込み促進効果

プロシアニジンやそれを多く含む食品が、糖代謝を促進し、高血糖の予防改善を含めた健康の維持増進に及ぼす効果が報告されている。例えば、ダークチョコレート摂取すると、健康人ではインスリン感受性が高まること¹⁴⁾、カカオポリフェノールを摂取させた肥満Ⅱ型糖尿病モデルのdb/dbマウスでは、高血糖の進行を抑制することが報告されている¹⁵⁾。食品成分の血糖調節に重要となる作用点とその標的は、大きく分けると消化管からの糖の吸収抑制、膵臓からのインスリン分泌の促進、肝臓での糖新生の抑制、末梢組織への糖取り込みの促進が挙げられる。近年では、腎臓からの再吸収抑制も注目が高まりつつある。これまでの研究で、ポリフェノールをはじめとする食品由来の機能性成分による血糖上昇抑制効果は、小腸での酵素活性を阻害し、消化管から糖の吸収を抑制する作用が多く報告されてきた。一方で、私たちが肥満・高血糖抑制効果の標的分子として注目しているのは、筋肉や脂肪組織への糖取り込みを担うインスリン応答性糖輸送担体4型(GLUT4)の細胞膜移行促進作用を介した血糖調節機構である。糖輸送担体(GLUT)は、細胞膜を12回貫通するトランスポーター

Fig. 1 プロシアニジンの構造

で、N末端とC末端のいずれもが細胞内にある。これまでに14種のアイソフォームが発見されており、アミノ酸配列の類似性から3つのサブクラスに分類されている¹⁶⁾。このうち、クラスIに属するGLUT1から4までのアイソフォームは、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。特にGLUT4は、骨格筋、心筋と脂肪組織において特異的に発現しており、インスリンに応答して細胞内のプールから細胞膜上に移行してグルコースの取り込みを担うことから、食後高血糖の消費に大きく関わっている。また、インスリンシグナル伝達経路を介さなくても、運動や筋収縮によりAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)のリン酸化を介して、GLUT4は細胞膜移行を促進する経路が存在することが明らかとなっている。GLUT4が発現する組織のうち、特に筋肉は、食後一過的に上昇したグルコースの取り込みの約80%を担い、グルコースを消費する主要な組織である。そこで、カカオポリフェノール類が、筋肉におけるGLUT4の細胞膜移行に及ぼす影響を検証した結果を以下に示す。

3・2 カカオポリフェノールによるAMPKを介した血糖調節作用

AMPKは、骨格筋において運動や筋収縮によりATPが分解されて生じるAMPによって活性化されるタンパク質リン酸化酵素である。AMPKは、セリン/スレオニンキナーゼであり、構造的には、触媒サブユニットの α サブユニットと、調節サブユニットの β と γ サブユニットからなり、AMPが γ サブユニットに結合すると、上流に位置するLKB1, TAK1, ならびに Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼ(CaMKK)1などに、親和性が高くなることが知られている¹⁷⁾。また、活性型である高分子量のアディポネクチンがAMPKをリン酸化することも知られている¹⁸⁾。近年の研究では、AMPKがさまざまな細胞においてエネルギーの恒常性を維持するためのレギュレーターとしての役割を担っており、ホルモン刺激や摂取した栄養素によって応答し、末梢組織だけでなく中枢神経系を介して全身のエネルギーバランスの調節に関わることが報告されている¹⁸⁾。糖代謝においては、インスリン非依存的にGLUT4を細胞膜上に移行させ、筋肉細胞や脂肪細胞内に糖を取り込むことは上述の通りである。糖尿病患者に対する運動療法の科学的根拠は、運動や筋収縮によるAMPKの活性化を介したグルコースの筋肉細胞内への取り込み促進により、血糖値の低下を促すことにある。また、肥満が主要な要因の一つとして挙げられているインスリン抵抗性では、インスリン受容体やGLUT4の発現低下が認められ

ており、AMPKはGLUT4遺伝子の発現を亢進する¹⁹⁾。

筋肉において、カカオポリフェノールによるAMPKの活性化を介したGLUT4の細胞膜移行の促進作用について紹介する。カカオリカー由来のプロシアニジン含有組成物(CLP_r)と、CLP_rから単量体であるエピカテキンとその3量体までのプロシアニジンを含む低重合画分(Low-DP)あるいは4量体以上を含む高重合画分(High-DP)を分離・精製した組成物を用いて実験を行った。また、単量体であるエピカテキンとその2から4量体のプロシアニジンについては、各化合物レベルでも評価を実施した^{12, 20, 21)}。まず、培養細胞を用いた実験では、ラット骨格筋由来L6筋肉細胞にポリフェノール類を作用させた。その結果、CLP_rならびにLow-DP, High-DPがAMPKのリン酸化を介してGLUT4の細胞膜移行を促進させることが明らかとなった。この際に、細胞内で代謝を受けない2-deoxy-D-glucose(2-DG)を負荷し、細胞内への糖取り込み量を測定したところ、いずれもが2-DGの細胞内取り込みを増加させた。また、化合物レベルでその効果を検証したところ、4量体までは重合度依存的にAMPKのリン酸化を介したGLUT4細胞膜移行促進による糖取り込み促進効果が強くなることが判った²¹⁾。しかし、Low-DPとHigh-DPの効果を比較すると、Low-DPの方が高い効果を有したことから、重合度が4付近の化合物で最もこれらの効果が高く、より高重合物では効果が弱くなることが推測された。

続いて、実験動物を用いた実験におけるプロシアニジンの効果について紹介する。マウスにCLP_r, Low-DPならびにHigh-DPを強制経口投与した60分後に採取した筋肉では、GLUT4の細胞膜移行促進効果を発揮することが確認された¹²⁾。このとき、筋肉においてAMPKのリン酸化が亢進していることを確認した。また、このタイミングで糖負荷試験を実施すると、プロシアニジン組成物は糖負荷後の血糖上昇を有意に抑制した。興味深いことに、上述の培養細胞系で得られた結果とは異なる点として、High-DPでもLow-DPと同程度の効果を有し、高重合物でも高い効果を発揮することが明らかとなった。すなわち、プロシアニジンに細胞に直接作用させた際と、実験動物に作用させた際とでは、血糖上昇抑制効果の作用機序が異なると推測された。さらに、単量体であるエピカテキンと2から4量体までのプロシアニジンを化合物レベルで単回投与したところ、培養細胞実験と同様に4量体までは重合度依存的にAMPKのリン酸化を介してGLUT4細胞膜移行促進を介した糖取り込み促進効果が認められた²¹⁾。耐糖能試験でこれらの化合物が血糖上昇を抑制することも確認した。特に、4量体のプロシアニジンは、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BWという低濃度で血糖

上昇抑制効果を発揮した²²⁾。このように、カカオポリフェノール高含有組成物である CLPr やその化合物を単回投与させた際、AMPK の活性化を介した GLUT4 の細胞膜移行により血糖調節に関与していることが明らかになった。

次に、カカオポリフェノールを高含有する食品組成物を用いて、長期間摂取させた際の食事誘導性肥満モデルマウスに及ぼす影響を調べた。CLPr を普通食あるいは30% ラード添加高脂肪食に混餌した飼料を作成し、これらの飼料を C57BL/6N マウスに自由摂取させて、14 週間飼育した際の血糖調節に及ぼす効果について検証した。空腹時血糖は、高脂肪食摂取により普通食群と比較して上昇したが、CLPr はこれを有意に抑制し、インスリン抵抗性の指数である HOMA-IR の上昇も抑制した。このとき、筋肉における GLUT4 細胞膜移行を検証したところ、CLPr による促進効果が認められた。GLUT4 の細胞膜移行に関わる上流シグナル伝達経路には、AMPK のリン酸化が関与していた。また、インスリン抵抗性が惹起されると、GLUT4 の発現量そのものが減少することが報告されているが、CLPr は、高脂肪食摂取によるインスリン抵抗性発症に伴う、GLUT4 の発現量減少も抑制していた²³⁾。

これらのことから、カカオポリフェノールが初発段階として何らかの標的分子に作用して AMPK の活性化をもたらし、それが強く示唆されるが、標的分子とその下流の活性化機構は不明であり、今後より詳細な分子メカニズムを解明していく必要がある。

3・3 カカオポリフェノールによるインクレチン様作用を介した高血糖抑制効果

インクレチンは、消化管から分泌されるホルモンの一種であり、血糖の上昇に依存して分泌が促進される。インクレチンによるインスリン促進作用をインクレチン作用というが、これは、糖負荷後の総インスリン分泌の約50%以上を担うといわれており、食後の血糖維持に大きく貢献している²⁴⁾。主なインクレチンとして、GIP (gastric inhibitory polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) がある。GIP は、小腸上部を中心に存在する K 細胞から、GLP-1 は小腸下部を中心に存在する L 細胞から分泌される。これらのインクレチンホルモンは、最終的に膵臓β細胞からインスリン分泌を促進することで血糖調節に寄与している。腸管よりインクレチン放出を促進する食品成分としては、糖類、アミノ酸やペプチド、脂質や脂肪酸などの栄養素が知られている²⁵⁻²⁸⁾。インクレチンは、インスリン分泌促進による血糖調節作用に加え、さまざまな生体調節に関与することが近年明らかとなっている。例えば、膵α細胞からのグルカゴンの分泌を抑制

したり、膵臓細胞を保護したりする作用を持つ²⁵⁾。また、GLP-1 は膵臓以外に胃や中枢神経系にも作用する。胃では蠕動運動を抑制し、腸への食物輸送を緩やかにし、食後の急激な血糖上昇を抑制する。中枢神経系では、食欲を抑制することによって食べ過ぎを予防する²⁵⁾。しかし、GLP-1 および GIP ともペプチドホルモンであり血中の酵素である dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) により速やかに分解され、その半減期は約2~5分である^{24,29)}。また、Ⅱ型糖尿病を発症すると、インクレチン作用が健常者に比較して低下することも知られている²⁴⁾。このように、近年の肥満・高血糖予防の要求が高まる中、インクレチンは血糖調節に有利なことから、GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害剤が糖尿病の新たな薬剤として開発が進められている。上述したように、栄養素、特にグルコース依存的にインクレチン作用を示すことが報告されているが、非栄養素によるインクレチン作用に関する報告はほとんどない。本項では、プロシアニジンのインクレチン様作用について紹介する。

前項で述べたとおり、プロシアニジン化合物を単回投与したマウス筋肉において AMPK のリン酸化が亢進していることを述べたが、同じ動物でインスリン経路も活性化していた²²⁾。これらのことから、プロシアニジンを培養細胞と動物実験に作用させた際に、いずれも GLUT4 の細胞膜移行が促進されるが、その上流でのシグナル伝達経路は異なることが判った。すなわち、培養筋肉細胞にプロシアニジンを用いた際には、インスリン経路には影響を及ぼさず、AMPK 経路のみが活性化したが、実験動物に単回投与した際には、筋肉でインスリン経路と AMPK 経路の双方が活性化して、GLUT4 細胞膜移行を促進させるという差異である。そこで、わたしたちは実験動物にプロシアニジンを投与した際には、消化管内における作用を有しているのではないかと考え、インクレチン様作用に着目して検証を行った。その結果、マウスに CLPr や High-DP, Low-DP を投与した60分後に、GLP-1 活性化体が血中にて増加することを発見した。CLPr を投与した際には、GIP も増加傾向が認められた。このインクレチン様作用により、インスリン分泌が促され、筋肉組織においてもインスリン経路を介した GLUT4 の細胞膜移行が促進された。結果として、糖負荷後の高血糖を抑制していることも確認された。プロシアニジン2から4量体と単量体のエピカテキンを投与させた実験から、4量体が顕著に GLP-1 分泌を高めることが認められた。以上の結果より、カカオポリフェノールのプロシアニジンは、腸管でのインクレチン作用を発揮することで血糖調節に寄与することが明らかとなった。

高重合なプロシアニジンは分子量が大きく、腸管から吸収されにくいいため、腸管下部に到達してL細胞を刺激することで、GLP-1分泌を促進したのではないかと考えている。従って、比較的低重合なプロシアニジンと高重合なプロシアニジンとでは、高血糖予防効果に関して異なった作用機序を持つ可能性が高いが、その詳細は今後の検討課題である。このように、非栄養素でGLP-1分泌亢進効果を明らかにしたのは本研究が初めてである³⁰⁾。一方で、DPP-4の活性化阻害に機能性食品成分が関与するということが近年報告されている³¹⁾。プロシアニジンの作用が、GLP-1分泌促進効果に加えて、DPP-4活性阻害効果を持つのかについても今後の課題であり、現在解析を進めている。今後、インクレチン効果を有する機能性食品成分に関する研究が、さらに発展すると考えている。以上の結果をまとめると、プロシアニジンやプロシアニジンを高含有する食品組成物は、筋肉においてGLUT4の細胞膜移行を促進させることで、血糖調節に寄与していることが*in vivo*, *in vitro*の双方の実験から明らかとなった。プロシアニジンを用いた際に活性化するシグナル伝達経路には、インクレチン作用を介したインスリン経路に加え、動物実験と細胞実験の双方で認められたAMPK経路とがあり、これらが相加・相乗的に血糖調節に寄与していると考えている。

4 カカオポリフェノールの脂肪蓄積予防効果とその作用機構

筋肉におけるAMPKの活性化は、糖代謝だけでなく、Fig. 2に示す様にacetyl-CoA carboxylase (ACC)により生成するmalonyl CoA量を減らすことにより、 β 酸化の律速酵素であるcarnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)の阻害を解除して脂肪酸酸化を亢進させる。また、glycerol-3-phosphate acyl transferase1 (GPAT-1)の発現量を抑制することで脂肪酸のエステル化を低下さ

せることも知られている¹⁷⁾。肝臓における脂肪酸合成は、AMPKによる抗肥満作用としてよく知られている¹⁷⁾。すなわち、筋肉の場合と同様に、AMPKは肝臓のACC活性とfatty acid synthase発現を低下させ、一方で、malonyl-CoA decarboxylase活性を上昇させることで脂肪酸合成を抑制する。AMPKの活性化を制御する上流因子の一つであるアディポネクチンも、エネルギー産生に関わるタンパク質の発現を増強させる。その一例として、AMPKの活性化と密接に関わり、エネルギー消費の自律的調節に関与する分子に、ミトコンドリア脱共役蛋白質(uncoupling protein; UCP)がアディポネクチンにより発現増加する³²⁾。UCPが活性化されると、化学エネルギーがATPを経ずに直接熱へと変換され、散逸消費されるため、体熱産生の上昇に関わる。UCPには、熱産生部位である褐色脂肪細胞に特異的に発現しているUCP-1のほかに、白色脂肪組織や骨格筋、脾臓、小腸など全身に幅広く存在するUCP-2、主に骨格筋に発現するUCP-3などのアイソフォームが知られている。これらの中でもUCP-1については、肥満動物においてその機能低下が報告されている。UCP-1は、褐色脂肪細胞の β アドレナリン受容体の刺激によって活性化されることが報告されている³³⁾。 β 受容体刺激に伴うプロテインキナーゼAの活性化は、cAMP応答配列結合蛋白質(CREB)などの転写調節因子を介して、UCP-1の遺伝子発現を増加させる³⁴⁾。また、UCPの発現には、ミトコンドリアの増生に関与するperoxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1)の存在が必要であることも報告されている³⁴⁾。また、これまで褐色脂肪特異的と捉えられてきたUCP-1であるが、褐色脂肪細胞がほとんどなくとも、ある種の刺激を与えることで、UCP-1の発現が上昇して、白色脂肪が褐色化し、エネルギー消費の亢進が可能となることも報告されている³⁵⁾。この白色脂肪の褐色化は、肥満予防に寄与する標的として近年注目を集めている。このように、AMPKとこの分子が関連するシグナル伝達経路の分子機構は、エネルギー産生を亢進し、抗肥満作用に関わる。したがって、AMPKを活性化する食品因子やそれを多く含む機能性食品組成物は、抗肥満効果が期待できる。

上述のとおり、わたしたちはカカオポリフェノールが筋肉においてAMPKを活性化していることを見いだした。また、カカオポリフェノールをマウスに高脂肪食と共に長期間摂取させると、筋肉だけでなく肝臓、白色脂肪や褐色脂肪組織において、AMPKを活性化させることを確認した²³⁾。このとき、血中における活性型アディポネクチン量の増加を伴って、体熱産生に関わる因子であるUCPの遺伝子、ならびにタンパク質発現が、筋肉・

Fig. 2 AMPKを介した高血糖と肥満予防に関わる作用機構

Fig. 3 カカオポリフェノールの高血糖・肥満予防機構

肝臓・脂肪で増加することも判った。さらに、皮下白色脂肪組織において UCP-1 の発現増加を誘導するとともに、ミトコンドリアの発現に関わる PGC-1 α の遺伝子発現を増加させた。これらの作用機構が関与して、高脂肪食摂取による肥満・脂肪蓄積が抑制されたと考えられた。以上のことから、カカオポリフェノールは AMPK の活性化をキーファクターとして、エネルギー産生を向上させ、肥満抑制効果を発揮することが判った (Fig. 3)。

Osakabe らは³⁶⁾、プロシアニジン単回投与すると、エネルギー代謝を上昇させ、褐色脂肪組織中の UCP-1 発現を増加させること、さらにその作用機構には神経伝達物質が関与していることを報告している。また、プロシアニジン反復投与した際にも、骨格筋における PGC-1 α と UCP の発現上昇に伴って、ミトコンドリア新生が促されることも報告している。エネルギー代謝に対して大きく影響を与える交感神経系を、プロシアニジンは消化管内ですでに刺激し³⁶⁾、その結果として分泌されるカテコールアミンが全身性の代謝促進作用を発揮している可能性が考えられている³⁷⁾。以上のことから、プロシアニジンはまず初発段階として、消化管内における何らかの受容体に作用し、分子機構を変化させることで抹消組織における代謝調節を制御する可能性が高いと考えられ、その詳細な作用機構の早期究明が求められる。

5 おわりに

これまでにわたしたちはプロシアニジンの血糖ならびに脂質代謝調節作用機構を明らかにしたが、プロシアニジンの体内動態の詳細は不明であるとともに、活性発現に関わる分子標的もしくは受容体が未解明である。しかし、インクレチン様作用からも推察できるように、高重

合なプロシアニジンは、摂取した後に消化吸収という過程を経る前に、すでに消化管内のシグナルを介して、全身性の代謝調節機構の制御に関わっていることが考えられる。今後、エネルギー代謝に深くかかわる自律神経系を司るカテコールアミン等の関与について研究していく予定である。また、エネルギー代謝は、日内変動を繰り返しながら恒常性を維持しているため、時計遺伝子やサーカディアンリズムを考慮する必要がある。私たちも、カカオポリフェノールによる血糖上昇抑制効果やエネルギー代謝促進効果は、投与するタイミングによって効果の強弱に差があることを見出し、その際に時計遺伝子が関与する可能性を得ている。AMPK が時計遺伝子の発現を制御していることや、GLP-1 やインスリンも時計遺伝子と深く関わっていることから、カカオポリフェノールの時計遺伝子との関わりについても詳細の解明を進めるとともに、より効果的な摂取タイミングを提案するためのエビデンスを構築していきたいと考えている。さらに、わたしたちの研究事例も含めて、ポリフェノールを実験動物に用いたこれまでの報告では、高容量で対象化合物を投与したものが多く、認められた作用が生理的条件下で実施されたものでないことも否めない。基本的にポリフェノールは生体異物として認識されるため、このことを考慮して、吸収や代謝変換、排泄などの生体利用性を考える必要がある。したがって、実際に生体内で効果を示す有効形態とその濃度を念頭に研究を進展させていかなければならない。さらに、食事として摂取する場合を考慮し、他の化合物や栄養素が存在する中での構造変化や機能性に及ぼす効果についても検討する必要がある。化合物間の相互作用や複数の化合物による相加・相乗効果等も検討し、少量で高い効果を発揮する組み合わせも解明していきたいと考えている。このように、今後解決しなければならない課題は多く残されているが、世界的に食経験の長いカカオに多く含まれ、ヒトが摂取する機会の多いポリフェノールのプロシアニジンは、ヒトの健康維持増進に有用性の高い成分として魅力的な化合物である。

文 献

- 1) Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607 (1988).
- 2) Kaplan, N. M. The deadly quartet: upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch. Intern. Med.*, **149**, 1514-1520 (1989).
- 3) Langhans, W. Food components in health promotion and disease prevention. *J. Agric. Food Chem.*, doi: 10.1021/acs.jafc.7b02121 (2017).
- 4) Mattered, R.; Benvenuto, M.; Giganti, M. G.; Tresoldi, L;

- Pluchinotta, F. R.; Bergante, S.; Tettamanti, G.; Masuelli, L.; Manzari, V.; Modesti, A.; Bei, R. Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients*, **9**, pii: E523 (2017).
- 5) Takano, F.; Takata, T.; Yoshihara, A.; Nakamura, Y.; Arima, Y.; Ohta, T. Aqueous extract of peanut skin and its main constituent procyanidin A1 suppress serum IgE and IgG1 levels in mice-immunized with ovalbumin. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 922-927 (2007).
- 6) Noratqah, S. B.; Naina-Mohamed, I.; Zulfarina, M. S.; Qodriyah, H. M. Natural polyphenols in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets*, doi: 10.2174/1389450118666170328122527 (2017).
- 7) 佐藤清隆, 古谷野哲男. カカオとチョコレートサイエンス・ロマン-神の食べ物の不思議-幸福房 (2011).
- 8) Stanley, T. H.; Smithson, A. T.; Neilson, A. P.; Anantheswaran, R. C.; Lambert, J. D. Analysis of cocoa proanthocyanidins using reversed phase high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: Application to studies on the effect of alkaline processing. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 5970-5975 (2015).
- 9) Pereira-Caro, G.; Borges, G.; Nagai, C.; Jackson, M. C.; Yokota, T.; Crozier, A.; Ashihara, H. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 427-434 (2013).
- 10) Moghadasian, M. H.; Michel Eskin, N. A. *Functional Foods and Cardiovascular Disease*. CRC Press, pp. 233-245 (2012).
- 11) Esatbeyoglu, T.; Wray, V.; Winterhalter, P. Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using countercurrent chromatography. *Food Chem.*, **179**, 278-289 (2015).
- 12) Yamashita, Y.; Okabe, M.; Natsume, M.; Ashida, H. Comparison of anti-hyperglycemic activities between low- and high-degree of polymerization procyanidin fractions from cacao liquor extract. *J. Food Drug Anal.*, **20**, 283-287 (2012).
- 13) Dorenkott, M. R.; Griffin, L. E.; Goodrich, K.M.; Thompson-Witrick, K. A.; Fundaro, G.; Ye, L.; Stevens, J. R.; Ali, M.; O'Keefe, S. F.; Hulver, M. W.; Neilson, A. P. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 2216-2227 (2014).
- 14) Kerimi, A.; Williamson, G. The cardiovascular benefits of dark chocolate. *Vascul. Pharmacol.*, **71**, 11-15 (2015).
- 15) Tomaru, M.; Takano, H.; Osakabe, N.; Yasuda, A.; Inoue, K.; Yanagisawa, R.; Ohwatari, T.; Uematsu, H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition*, **23**, 351-353 (2007).
- 16) 山下陽子, 山本憲朗, 芦田均. ポリフェノールによるグルコーストランスポーターの機能調節. ビタミン学会, **86**, 163-173 (2012).
- 17) Lage, R.; Diéguez, C.; Vidal-Puig, A.; López, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol. Med.*, **14**, 539-549 (2008).
- 18) Hattori, Y.; Nakano, Y.; Hattori, S.; Tomizawa, A.; Inukai, K.; Kasai, K. High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF- κ B activation in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.*, **582**, 1719-1724 (2008).
- 19) Holmes, B. F.; Sparling, D. P.; Olson, A. L.; Winder, W. W.; Dohm, G. L. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **289**, E1071-1076 (2005).
- 20) Yamashita, Y.; Okabe, M.; Natsume, M.; Ashida, H. Cacao liquor procyanidin extract improves glucose tolerance by enhancing GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscle. *J. Nutr. Sci.*, **1**, e2 (2012).
- 21) Kurimoto, Y.; Shibayama, Y.; Inoue, S.; Soga, M.; Takikawa, M.; Ito, C.; Nanba, F.; Yoshida, T.; Yamashita, Y.; Ashida, H.; Tsuda, T. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 5558-5564 (2013).
- 22) Yamashita, Y.; Wang, L.; Namba, F.; Ito, C.; Toda, T.; Ashida, H. Procyanidin promotes translocation of glucose transporter 4 in muscle of mice through activation of insulin and AMPK signaling pathways. *PLoS ONE*, **11**, e0161704 (2016).
- 23) Yamashita, Y.; Okabe, M.; Natsume, M.; Ashida, H. Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Arch. Biophys. Biochem.*, **527**, 95-104 (2012).
- 24) Mentlein, R. Mechanisms underlying the rapid degradation and elimination of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**, 443-452 (2009).
- 25) Tian, L.; Jin, T. The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J. Diabetes*, **6**, 753-765 (2016).
- 26) Domínguez Avila, J. A.; Rodrigo García, J.; González Aguilar, G. A.; de la Rosa, L. A. The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling. *Molecules*, **22**, pii: E903 (2017).
- 27) Ezcurra, M.; Reimann, F.; Gribble, F. M.; Emery, E. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **13**, 922-927 (2013).
- 28) Holst, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.*, **87**, 1409-1439 (2007).
- 29) Drucker, D. J. Glucagon-like peptides. *Diabetes*, **47**, 159-169 (1998).
- 30) Yamashita, Y.; Okabe, M.; Natsume, M.; Ahida, H. Cin-

- namtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 and insulin secretion in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 888-891 (2013).
- 31) Peng, C. H.; Yang, Y. S.; Chan, K. C.; Wang, C. J.; Chen, M. L.; Huang, C. N. Hibiscus sabdariffa polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 9736-9743 (2014).
 - 32) Putman, C. T.; Kiricsi, M.; Pearcey, J.; MacLean, I. M.; Bamford, J. A.; Murdoch, G. K.; Dixon, W. T.; Pette, D. AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J. Physiol.*, **551**, 169-178 (2003).
 - 33) Bargut, T. C.; Aguila, M. B.; Mandarim-de-Lacerda, C. A. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell*, **48**, 452-460 (2016).
 - 34) Lin, J.; Handschin, C.; Spiegelman, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.*, **1**, 361-370 (2005).
 - 35) Wu, J.; Boström, P.; Sparks, L. M.; Ye, L.; Choi, J. H.; Giang, A. H.; Khandekar, M.; Virtanen, K. A.; Nuutila, P.; Schaart, G.; Huang, K.; Tu, H.; van Marken Lichtenbelt, W. D.; Hoeks, J.; Enerbäck, S.; Schrauwen, P.; Spiegelman, B. M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, **150**, 366-376 (2012).
 - 36) Kamio, N.; Suzuki, T.; Watanabe, Y.; Suhara, Y.; Osakabe, N. A single oral dose of flavan-3-ols enhances energy expenditure by sympathetic nerve stimulation in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **91**, 256-263 (2016).
 - 37) Matsumura, Y.; Nakagawa, Y.; Mikome, K.; Yamamoto, H.; Osakabe, N. Enhancement of energy expenditure following a single oral dose of flavan-3-ols associated with an increase in catecholamine secretion. *PLoS One*, **9**, e112180 (2014).