

# インスリン抵抗性改善食品素材を利用した骨格筋脂質蓄積作用の善悪の検証

落合 優

北里大学獣医学部 助授

## 緒言

異所性脂肪蓄積組織の一つである骨格筋における脂質（Intra-muscular lipids, IML）の過剰蓄積はインスリン抵抗性（IR）の発症要因である<sup>1)</sup>。しかし、IMLは持久運動時の主要エネルギー源の一つでもあるため、インスリン感受性が高い持久系アスリートの骨格筋にもIMLは比較的多く蓄積される<sup>2)</sup>。この相反する事象が示すように、IRに対するIML過剰蓄積の善悪については明確な結論は出ていない。したがって、IRを惹起した骨格筋を用いてIML代謝調節機序を明確にすることは、アスリート様IML代謝調節によるIRの改善な方策になりうる。

IR改善作用を有するアディポネクチンの産生・分泌に関与するPeroxisome proliferator-activated receptor-gamma（PPAR $\gamma$ ）に対する活性化食品因子としてメトキシフラボノイド類等があるが、骨格筋における脂質代謝調節機序は不明であり、その点を明らかにすることは

2型糖尿病の改善方策の提案に重要である。

先行研究において、脂肪酸を不飽和化する酵素であるStearoyl-CoA desaturase（SCD）の活性に及ぼすPPAR $\gamma$ 活性化化合物（ピオグリタゾン：PIO）が糖代謝を改善する過程でIML蓄積量とSCD活性を増加させる現象を見出した<sup>3)</sup>。SCDの活性化は細胞内毒性を有する飽和脂肪酸の含有率を低下させる可能性を有する。

本研究では、PIOと同様にPPAR $\gamma$ を活性化させ、SCDを抑制する成分を食品資源から探索し、IRとIML蓄積に対する食品資源の作用について検討した。

## 実験方法

### 実験1 PPAR $\gamma$ のリガンド結合活性を高める食品資源の探索

先行研究にて評価対象とした食品資源はメトキシ基を有するフラボノイド類を含有する食品資源であり、評価した代表的な食品資源を表1に示した。中でも図1（上）

表1 PPAR $\gamma$ 結合活性に用いた食品資源およびその抽出物など

サンプル名（略称）	学名	処置（抽出溶媒など）
黒ショウガ粉末（BG）	<i>Kaempferia parviflora</i>	全体（3種類）（A, B, C） 水抽出物 熱水抽出物 メタノール抽出物 エタノール抽出物 アセトン抽出物 酢酸エチル抽出物
赤ショウガ粉末（RG）	<i>Zingiber officinale var. rubrum</i>	全体
チェストツリー粉末（CHE）	<i>Vitex agnus-castus</i>	全体
シークアサー粉末（SHI）	<i>Citrus depressa</i>	全体
ピオグリタゾン（PIO）		試薬（陽性対照として）
GW1929		試薬（陽性対照として）
ジメトキシフラボノイド（DMF）		試薬（陽性対照として）

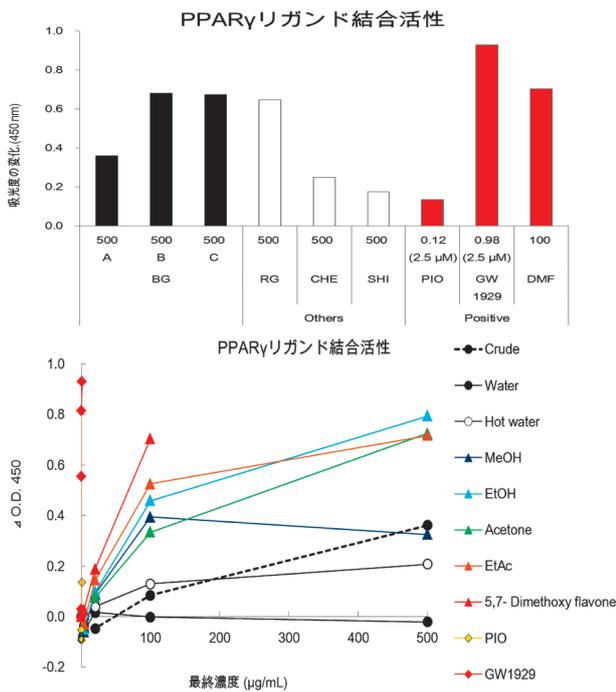


図1 PPAR $\gamma$ のリガンドに対する結合能評価 (実験1)

上: PPAR $\gamma$ アゴニスト様作用が期待される食品資源の評価 (最終濃度500  $\mu$ g/mL)、下: BGおよびその各抽出物によるPPAR $\gamma$ のリガンド結合能の評価 (濃度依存性評価)。BG: 黒ショウガ粉末、RG: 赤ショウガ粉末、CHE: チェストツリー粉末、SHI: シークワーサー粉末、PIO: ピオグリタゾン、DMF: ジメトキシフラボノイド、Crude: 粉末全体、Water: 水抽出物、Hot Water: 熱水抽出物、MeOH: メタノール抽出物、EtOH: エタノール抽出物、Acetone: アセトン抽出物、EtAc: 酢酸エチル抽出物。

に示す通り、黒ショウガ粉末 (*Kaempferia parviflora*) (Black Ginger、以下BG) に高いPPAR $\gamma$ のリガンド結合能を得ていたため、本研究では特にBGに着目した。PPAR $\gamma$ のリガンド結合評価はEnBio RCAS Kit for PPAR $\gamma$ -NcoR (藤倉化成) を用いて実施した。BGはビーエイチエヌ社製の原料、PIOおよびBGの規格成分であるDMFは試薬を用いた。

### 実験2 BGの短期給餌が血中アディポネクチン濃度に及ぼす影響

Wistar系雄ラット15匹 (日本エスエルシー、以降省略) を本試験に用いた。実験動物は12時間の明暗サイクル、室温23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cを維持し、水道水および食餌を自由摂取させる条件を維持した環境下で飼育した。9~10週間高脂肪高ショ糖食 (HFSD) を摂取させたラットを対照群、PIO (3 mg/kg/day) 群またはBG (1%) 群に分けた。BG給餌開始前および給餌8日後の非絶食時の血

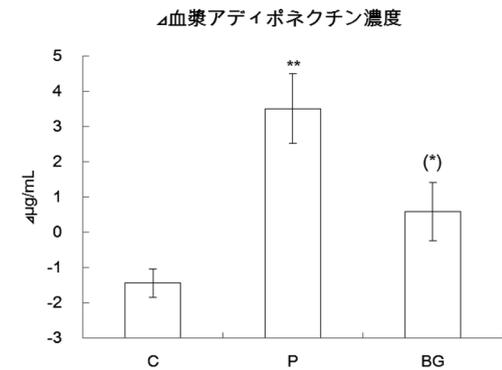
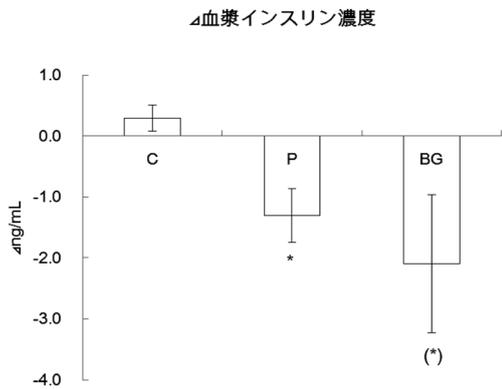
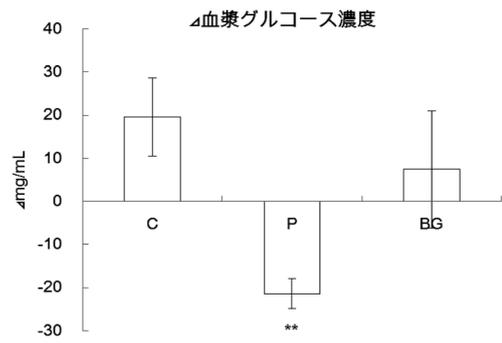


図2 BGの短期給餌による血清成分の変化 (実験2)

平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n=5$ )。C群と各群との間の有意差検討には対応のない $t$ 検定を用いた。検定の有意差水準は5%未満とした ((\* $p<0.1$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ )。C: 対照群、P: ピオグリタゾン投与群、BG: 黒ショウガ粉末給餌群。

液を採取し、血漿中のグルコース、インスリンおよびアディポネクチン濃度を測定し、その数値の変化を算出した。

### 実験3 BGがIML代謝に及ぼす影響

ICR系雄マウス51匹を試験 (13週間) に用いた。HFSDを11週間摂取させたマウスを対照群、PIO (3 mg/kg/day) 群、BG (1%) 群、BGのエタノール (EtOH)

抽出物（1%）群またはBGの酢酸エチル（AcEt）抽出物（1%）群に分け、14日間投与した。その後、絶食時血清の生化学指標の分析や骨格筋中脂質の量的（中性脂肪量）および質的分析（脂肪酸の不飽和化指数）を実施した。脂肪酸組成の分析は既報<sup>3)</sup>に従い実施した。脂肪酸の不飽和化指数はC18:1とC18:0の組成比（C18:1/C18:0）で示した。

#### 実験4 BG-EtOH抽出物が耐糖能に及ぼす影響

自然発症2型糖尿病モデルであるNSY系雄マウス35匹およびその対照ICRマウス7匹を試験（8週間）に用いた。NSYマウスは普通食群またはHFSD群に分け、HFSD群をさらに対照群、PIO（3 mg/kg/day）群、BG（1%）群またはBG-EtOH抽出物（0.19%）群に分けた。試験7および8週目に糖負荷試験（OGTT）およびインスリン負荷試験（ITT）を行い血糖値の推移を測定した。

### 結果・考察

#### 実験1 PPAR $\gamma$ のリガンド結合活性を高めるBG中の成分の探索

PPAR $\gamma$ のリガンド結合活性はBGおよびそのメタノール、EtOH、AcEt、アセトン抽出物で特に強く、濃度依存性が確認された（図1下）。BGに含まれるメトキシフラボノイド類（5,7-ジメトキシフラボノイド：5,7-DMF）についても強い活性と濃度依存性が確認されたので、上

記の抽出画分に5,7-DMFが含まれている可能性が示唆された。

#### 実験2 BGの短期投与が血中アディポネクチン濃度に及ぼす影響

BGは血漿中のインスリン濃度を低下、アディポネクチン濃度を増加させる傾向を示した。しかし、血漿グルコース濃度においては有意な変化は認められなかった（図2）。

#### 実験3 PPAR $\gamma$ 活性化食品素材およびその抽出物が骨格筋脂質代謝に及ぼす影響

BG、BG-EtOH抽出物およびBG-AcEt抽出物は血清のグルコース濃度およびレプチン濃度を低下させる傾向を示し、血清アディポネクチン濃度を上昇させる傾向を示した。血清インスリン濃度に関してはBG-EtOH抽出物で低下する結果となった。腓腹筋の中性脂肪含有量はPIO投与において高値を示したが、BG、BG-EtOHおよびBG-AcEt抽出物の給餌群においては有意な差は認められなかった。しかしながら、脂肪酸不飽和化指標はPIO投与群と同様にBGおよびBG-AcEt抽出物の給餌群で高値（約1.3倍）を示した。一般的に、SCD活性が上昇することは脂質蓄積が促されることを示すが、本研究では脂質蓄積は増加させなかった。その要因として、抽出物中にPPAR $\gamma$ に結合して作用を減弱させるなどアン

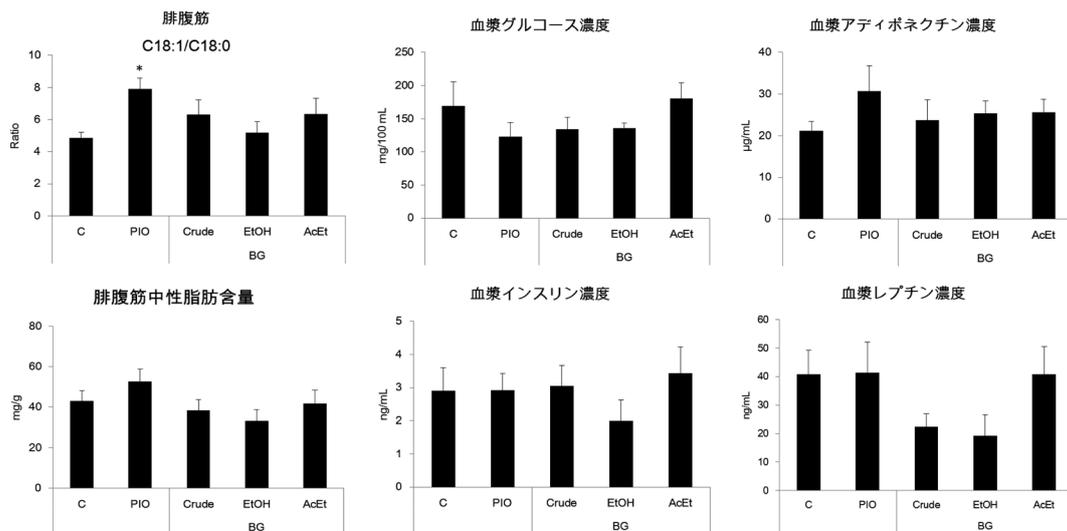


図3 BG およびその抽出物の給餌による血清成分と腓腹筋脂質への作用（実験3）

平均値±標準誤差（ $n=7-8$ ）。一元分散分析後、C群と各群との間の有意差検討にはDunnnett検定を用いた。検定の有意差水準は5%未満とした（\* $p<0.05$ ）。C: 対照、PIO: ピオグリタゾン、BG: 黒シヨウガ粉末、Crude: 粉末全体、EtOH: エタノール抽出物、AcEt: 酢酸エチル抽出物。

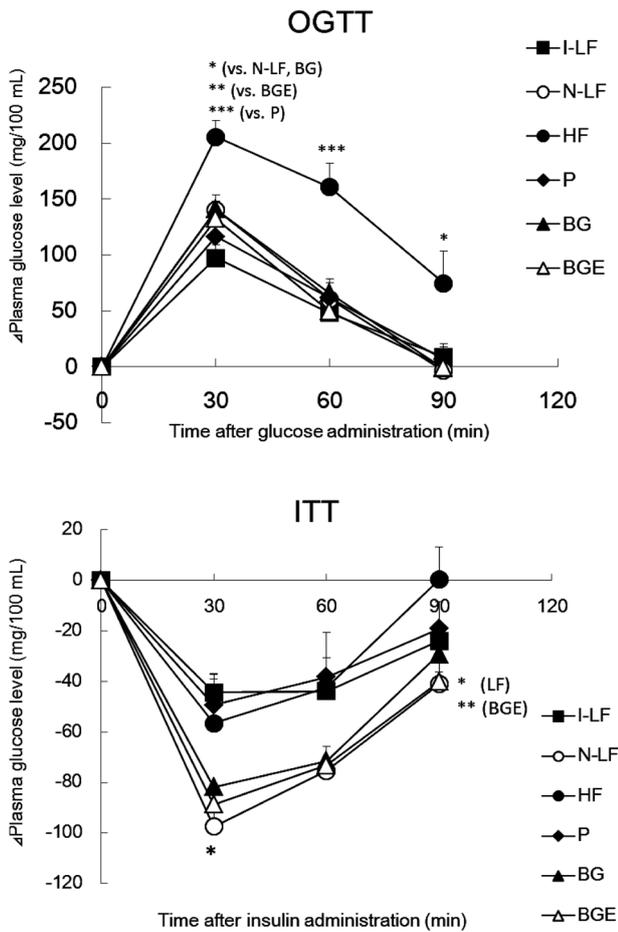


図4 OGTTおよびITTにおける血糖値の推移 (実験4)

平均値±標準誤差 (n=7)。一元分散分析後、N-LF群と各群との間の有意差検討にはDunnett検定を用いた。検定の有意差水準は5%未満とした (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。I-LF: ICR-普通食、N-LF: NSY-普通食、HF: NSY-高脂肪高ショ糖(HFSD)食、P: NSY-HFSD食-ピオグリタゾン投与、BG: NSY-HFSD食-黒ショウガ粉末給餌、BGE: NSY-HFSD食-黒ショウガ粉末のエタノール抽出物給餌。

タゴニスト様作用を有する化合物が含まれている可能性が示唆される<sup>4,5)</sup>。近年の研究において、BGには抗肥満作用が報告されている<sup>4,6)</sup>ため、PPAR $\gamma$ に対して強く結合する物質の中でもその作用を促進させる物質と抑制させる成分に分けて検討することが必要であると考えられる。本結果より、食品由来PPAR $\gamma$ アゴニストはIML量を変化させず、飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸に変換する酵素を活性化させるなどIMLを構成する脂肪酸種を変化させる可能性が示唆された。また、IRを惹起する因子として報告されている骨格筋中のジアシルグリセロールの定量を薄層クロマトグラフィー法にて試みたが、PIO投与群においてわずかな増加が認められたのみであり、BGおよびその抽出物による変化は確認されなかった。

実験4 PPAR $\gamma$ 活性化食品成分が耐糖能に及ぼす影響

BGおよびBG-EtOH抽出物群で糖負荷後の血糖値上昇が著しく抑制される結果となった。また、BGおよびBG-EtOH抽出物群でインスリン負荷後の血糖値の低下が著しい結果となった。以上より、BGの摂取による耐糖能およびIRの改善はEtOH抽出物に含まれる成分が本体の一つである可能性が示唆された。

結 論

PPAR $\gamma$ のリガンド結合能を有するBGを用いて、耐糖能を維持しつつ脂質が蓄積される健全な骨格筋の作出を検討した結果、BGの特にEtOH抽出物にIRを改善する作用および飽和脂肪酸の蓄積を低下させる作用を有する可能性が示唆された。IRを惹起させる骨格筋中の因子を探索するなど、さらなる検討が必要である。

要 約

IRに対するIMLの過剰蓄積の善悪についての明確な結論はない。本研究において、核内受容体のPPAR $\gamma$ を活性化させ、脂質合成能を調節するIR改善剤のPIOに筋脂質蓄積を亢進する作用が確認されたことから、本研究ではPPAR $\gamma$ に対するリガンド結合能を高く有する食品資源のBGに着目して、骨格筋における脂質蓄積および脂肪酸組成の変化を検討した。実験1においてBGのアルコール抽出物にPPAR $\gamma$ のリガンド結合能を有すること、実験2および4にてBG-EtOH抽出物に糖代謝を改善させる作用を有することが示唆された。また実験3において、腓腹筋の中性脂肪蓄積量自体に変化はないものの、脂肪酸不飽和化酵素活性を示す指標を増加させ、IR惹起因子の一つである飽和脂肪酸の含有率を低下させた。これらの結果はPPAR $\gamma$ アゴニストであるPIOと同様の結果であった。以上より、BGおよびBG-EtOH抽出物にはPPAR $\gamma$ のリガンド結合能を有し、IMLを構成する飽和脂肪酸を低減させ、IRを改善させる作用を有する可能性が示唆された。BG-EtOH抽出物にはPPAR $\gamma$ のリガンドに結合するメトキシフラボノイドを含む成分が多様に含まれると考えられるため、比活性に優れた真の活性成分の探索、精製およびその成分を用いた検討が今後の課題である。

謝 辞

本研究にご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の方々に深く感謝申し上げます。ま

た、本研究で用いた黒ショウガ粉末をご提供いただきましたビーエイチエヌ株式会社の関係者の方々に対しましても感謝いたします。

#### 文 献

- 1) K. Kato, et al.: *PLoS ONE*, **9**, e92170, 2014.
- 2) Y. Tamura, et al.: *Metabolism*, **57**, 373–379, 2008.
- 3) M. Ochiai, T. Matsuo: *J. Oleo Sci.*, **62**, 745–754, 2013.
- 4) Y. Okabe, et al.: *Phytomedicine*, **21**, 800–806, 2014.
- 5) K. Ninomiya, et al.: *J Nat Med.*, **70**, 179–189, 2016.
- 6) T. Akase, et al.: *J. Nat Med.*, **65**, 73–80, 2011.