



# Studies on the anti-obesity effect of black soybean (*Glycine max* L.) seed coat polyphenols focusing on the role of the central nervous system controlling feeding behavior

廣直, 賢勇

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2027-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8954号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490179>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 博士論文内容の要旨

氏名                     廣直 賢勇                    

専攻・講座           生命機能科学専攻・応用生命化学講座          

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on the anti-obesity effect of black soybean (*Glycine max* L.) seed coat polyphenols  
focusing on the role of the central nervous system in controlling feeding behavior  
(摂食行動を制御する中枢神経系の役割に着目したクロダイズ種皮ポリフェノールの  
抗肥満作用に関する研究)

指導教員                     山下 陽子

食事が健康に及ぼす効果は「何を」「どれくらいの量」摂取するだけでなく、「いつ」摂取するかという側面にも影響される。同じ食事内容でも、摂取するタイミングと量が異なれば、体重や脂肪の付きかたも異なる。これは、生物の様々な生理機能 (睡眠/覚醒、食欲、代謝機能、体温調節など) が約 24 時間周期で変動する概日リズムを有し、地球の自転周期によって生じる昼夜の明暗サイクルに同調していることに起因する。概日リズムを無視したタイミングの食事は、摂取した栄養素が適切に代謝されないことや、概日リズムの同調を狂わせることに繋がり、様々な代謝性疾患の罹患リスクを高める要因となる。

動物性脂質を豊富に含む高脂肪食 (HFD) をマウスに摂取させると肥満になるが、その要因は「摂取エネルギー過多」よりも「摂食行動リズムの破綻」であるという説が、昨今有力である。夜行性であるマウスは通常、1日に摂取するエネルギー量のうち7~8割を活動時間帯である夜間に摂取し、休息時間帯である日中はあまり摂餌しない。しかしHFDを与えると、日中の摂取エネルギー量が増加 (対して夜間は減少) し、肥満となる。この肥満は、高脂肪食の給餌を夜間のみ制限することで改善する。一方で、通常食であっても給餌時間を日中に制限すると肥満を発症する。以上の証拠のように、明らかな摂取エネルギー過多でない限り、食餌誘導性肥満の主たる要因は「不適切なタイミングの食事」であり、食事の内容に依存しない。

ではHFDはどのようにして摂食リズムを破綻させるのか。これには摂食行動を支配する中枢神経系 (CNS: central nervous system) が深く関係している。摂食行動の動機付けは、主に「エネルギー恒常性」と「嗜好性」の2つの側面に支配されている。「エネルギー恒常性」を司る一次中枢は、間脳の視床下部弓状核 (ARC: arcuate nucleus) であり、全身のエネルギー状態や消化管内の食物情報を、血中の栄養素やホルモン濃度を介して直接的に、または求心性迷走神経を介して間接的に認識し、摂食行動や末梢組織 (肝臓や骨格筋、脂肪組織など) のエネルギー代謝機能を調節する。HFDを過剰に摂取すると、ARCに存在する脳内免疫細胞ミクログリアが活性化し、細胞体の肥大と増殖を伴いながら、様々な炎症性の液性因子を放出する。これらが神経機能を妨害することで、摂食行動や代謝機能の調節機構が破綻することが判っている。このミクログリアの炎症応答を抑制すると、HFD誘導性の肥満が改善することが様々な研究で判明している。一方で「嗜好性」を動機とする摂食行動には、中脳の腹側被蓋野 (VTA: ventral tegmental area) から大脳半球の側坐核 (NAcc: nucleus accumbens) へのドーパミン神経投射が関与している。高カロリーで美味しい食事を摂取した際や、食事報酬の獲得が期待される時に、ドーパミン投射量が増加し、摂食行動が動機付けられる。VTAのドーパミン投射量やNAccのドーパミン感受性は日内変動し、特に休息時間帯に嗜好性が高まることが知られており、これがマウスの日中におけるHFDの摂餌量を増加させる要因であると考えられている。

ここまでの背景から、HFDの摂取が引き起こす肥満の改善を目指すには、末梢組織の代謝機能だけでなく、CNSへ及ぼす影響や摂食行動を考慮し、治療標的を探索する必要がある

ある。これまでに、様々な抗肥満効果を有する機能性食品成分が見出されてきたが、それらのほとんどは、脂質の吸収抑制、肝臓における脂質合成、脂肪組織における脂質蓄積の抑制、脂肪分解など、末梢組織における代謝機能への効果に焦点を置いており、摂食行動や中枢神経系への効果に着目し、抗肥満効果を検証した研究例はない。本研究で用いるクロダイズ種皮ポリフェノール [BE: a polyphenol-rich extract from the seed coat of black soybean (*Glycine max L*)] は、flavan 3-ol である (-)-epicatechin、およびそれらの重合体である procyanidin、主に cyanidin 3-O-glucoside を主

とするアントシアニンを豊富に含む食品素材である [Fig 1]。これまでの研究により BE は、食後血糖上昇抑制効果や、HFD が誘導する肥満を抑制するなど、末梢組織の代謝機能を向上させ、食事に起因する諸疾患を予防・改善することが判っている。しかし、これらの機能性が発揮されるメカニズムは、末梢組織における代謝機能の解析にとどまっており、摂食行動を司る CNS の役割に着目した検証は行っていない。そこで本研究では、BE の抗肥満効果の新たなメカニズムを探索することを目的として、BE の摂取が摂食行動およびそれを司る CNS 領域へ与える効果を検証した。本研究論文は、General Introduction、研究内容 Chapter 1~3、General Discussion & Conclusion Remarks、Appendix という構成である。研究概要については以下に記述する。

まず Chapter 1 では、HFD とともに BE をマウスに摂取させて摂食行動を観察し、BE の抗肥満効果が CNS を媒介するか否かを明らかにすることを目的とした。特に HFD 摂取により炎症が顕著に現れる ARC とその周辺部位に着目し、BE が HFD 摂取マウスの ARC における炎症の改善と神経応答性の回復が認められるかを解析した。その結果、BE は HFD 摂取マウスの日中における摂餌量の増加を抑制し、ARC のミクログリアの活性化と集積を抑制することがわかった。さらに飽食ホルモンであるレプチンの神経感受性の回復が認められ、神経機能を維持することが判った。続いて、上記の効果に最も関与する BE 中の成分を特定するために、BE のポリフェノール成分を、その構造的特徴から単量体 flavan 3-ol の (+)-catechin と (-)-epicatechin を含む画分、二量体以上の flavan 3-ol である procyanidin を含む画分、アントシアニンである cyanidin 3-O-glucoside の 3 種類の画分に精製し、それぞれを HFD に混餌してマウスに与えた。その結果、cyanidin 3-O-glucoside (C3G) が、視床下部のミクログリア活性化を抑制する化合物であることが判った。

C3G はそのままの形では生体利用性が極めて低く、消化管から吸収される過程で速やかに様々な単純フェノール化合物へと代謝される。そこで Chapter 2 では、マウス由来ミクロ

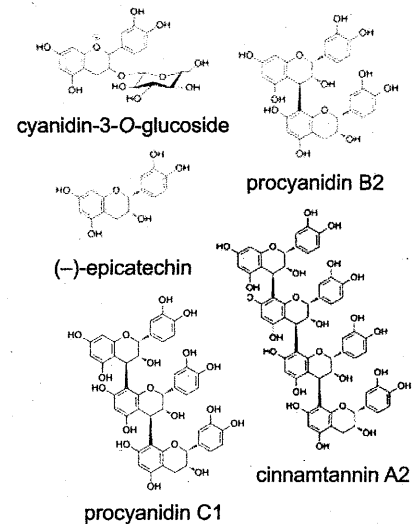


Fig 1. BE を構成するポリフェノール

グリア細胞を用いた *in vitro* の実験系を通して、C3G の主要な生体代謝物の中から、脂肪酸が誘導するミクログリアの炎症応答を抑制する化合物を探索した。HFD を組成する脂肪酸のうち、長鎖飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸が、ミクログリア細胞の炎症性サイトカインの放出量と遺伝子発現量を増加させた。この炎症応答を最も抑制したのはプロトカテク酸であった。この抗炎症効果のメカニズムとして、転写因子 NF- $\kappa$ B を細胞質に留める役割を果たす I $\kappa$ B $\alpha$  のユビキチン化-プロテアソーム分解を抑制することで、NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制していることが示唆された。続いてプロトカテク酸が、*in vivo* (マウスを用いた実験) においても、HFD 誘導性の摂食リズムの変化と視床下部炎症を改善するかを検証した。その結果、プロトカテク酸は HFD を摂取したマウスの体重増加、日中の摂餌量の増加、および ARC におけるミクログリアの活性化と蓄積を抑制した。さらに本章では、Chapter 1 よりもマウスの 1 日の摂餌量データを細かく採取することで、HFD 摂取がもたらす摂食リズムの変化と、プロトカテク酸による改善効果が最も大きいタイミングを明らかにすることを試みた。その結果、HFD の摂取は特に明期開始時刻から 4 時間の摂餌量を増加させ、プロトカテク酸はそれを抑制することがわかった。

BE を組成するポリフェノールは強い苦味や渋味を呈することから、BE の混餌は餌への嗜好性を低下させることが考えられた。そこで Chapter 3 では、BE による摂食リズムの改善効果が、マウスの嗜好性に影響を与えた結果であるか否かについて明らかにするために、飼料選択試験を実施した。プレーンな飼料と、BE を混餌した飼料を自由に選択できる条件下でマウスを飼育した際、マウスは低脂肪食と高脂肪食に関わらず、BE を混餌した飼料よりも、プレーンな飼料を好んだ。しかし、一種類の飼料を摂取させた場合、BE の有無に関わらず、日中における摂取エネルギー量は変化しなかった。この結果から、BE を HFD に混餌したことによる日中の摂餌量の低下が、嗜好性への影響によるものではなく、エネルギー恒常性を支配する視床下部の炎症抑制効果を媒介していると考えられた。

Appendix では、BE の単回経口摂取が摂食行動に与える効果を確認した。これまでの研究で、BE に含まれるポリフェノールは、食欲抑制効果を発揮する消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の分泌を促進することが明らかとなっている。GLP-1 は求心性迷走神経を媒介して脳へと食物情報を伝達し、摂食行動を停止させることから、BE が上記の効果を発揮するか否かについて検証した。マウスを 16 時間絶食させた後、BE を単回経口投与した結果、BE 投与後の 1.5 時間の摂食行動が抑制された。さらに BE の投与後から 30 分の時点において、頸静脈孔下部に存在する迷走神経神経節の神経細胞の活性化が認められた。さらに、BE の投与による摂食行動抑制効果は、求心性迷走神経の薬理的な遮断、および GLP-1 受容体の競合阻害剤の投与により消失した。また摂食抑制効果と GLP-1 分泌促進効果は、BE の含まれる成分の中で、C3G ではなく、flavan 3-ol を豊富に含む画分で認められた。

(氏名：廣直 賢勇 NO. 4 )

著者は以上の研究を通して、BEによる肥満抑制効果のメカニズムとして、摂食行動を司る CNS への効果を含んでいることを示唆する結果を得た。BE に含まれる cyanidin 3-O-glucoside は、視床下部における抗炎症効果を発揮することで、神経機能を保護して摂食リズムの維持と抗肥満効果を発揮した。一方で、flavan 3-ol は求心性迷走神経を介した腸脳相関作用により、亜急性的な摂食抑制効果を発揮することが明らかとなった。本研究結果は、ポリフェノールが CNS を媒介して多様な生理機能を発揮する潜在的なメカニズムを解明するための、新たな証拠と知見を提供するものである。

氏名	廣直 賢勇		
論文 題目	Studies on the anti-obesity effect of black soybean ( <i>Glycine max</i> L.) seed coat polyphenols focusing on the role of the central nervous system in controlling feeding behavior (摂食行動を制御する中枢神経系の役割に着目したクロダイズ種皮ポリフェノールの抗肥満作用に関する研究)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	准教授	山下 陽子
	副査	教授	芦田 均
	副査	教授	坂本 克彦
	副査	教授	矢尾 育子
	副査		
要 旨			
<p>高脂肪食の摂取による肥満は、摂食リズムの乱れに起因することが近年明らかとなっている。通常の摂食行動のリズムは、動物の睡眠/覚醒に合わせて制御されているが、高脂肪食を摂取すると、摂食リズムが乱れ、肥満になる。ただし、高脂肪食であっても、摂食タイミングを覚醒時間帯に制限することで肥満の発症が抑制され、低脂肪食であっても、摂食タイミングを睡眠時間帯に制限することで肥満が誘導される。明らかな摂取エネルギー過多でない限り、肥満の最たる原因は「不適切な摂食タイミング」にあり、食事の種類や内容に依存しない。現代社会では、時間に依らず、いつでも高カロリーな食事を摂取できるため、肥満を予防するためには、適切な摂食リズムを保つことは極めて重要であり、食欲を適切にコントロールするための手段が求められる。</p> <p>本学位論文は、上記の課題に着目し、クロダイズ種皮由来ポリフェノール (BE) の抗肥満効果のメカニズムの一端に、摂食行動の制御が関わっていることを証明したものである。学位申請者である廣直賢勇氏は、摂食行動を制御する中枢神経系の役割に着目し、動物実験ならびに培養細胞実験を通して、BE の肥満改善効果のメカニズムの一端を明らかにした。高脂肪食の摂取が摂食リズムを乱す主なメカニズムには、以下の2つが存在する。1. 全身のエネルギー状態を監視し食欲を制御する「視床下部弓状核 (ARC)」において、脳内免疫細胞ミクログリアの活性化を誘導し、炎症反応による神経機能の低下が食欲の制御機能を低下させること、2. 快楽や嗜好性を司る腹側被蓋野 (VTA)–側坐核 (NAcc) 間のドーパミン投射経路が睡眠時間帯において活性化しやすく、高脂肪食への嗜好性が睡眠時間帯に上昇すること、である。廣直氏は、BE が ARC における炎症を抑制することで摂食リズムの乱れを是正して、肥満を改善することを見出し、その有効成分として cyanidin 3-<i>O</i>-glucoside を、有効性のある生体代謝物として protocatechuic acid を見出した。廣直氏はさらに食欲の制御に関わる中枢神経系の役割にも着目し、BE の強制単回経口投与が、消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の分泌を介して求心性迷走神経を活性化させ、摂食行動を抑制することを見出し、本効果に関与する化合物群として flavan 3-ols を見出した。本学位論文は、緒言、3章構成の実験結果、結語、ならびに附章から構成されている。</p> <p>第1章では、BE の摂取が、エネルギー恒常性の制御中枢である ARC に対する効果を検証している。高脂肪食を与えたマウスの ARC では、ミクログリア細胞の顕著な活性化が認められ、さまざまな炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現量の上昇が観察された。加えて、明暗周期に従った明確な摂食リズムが消失し、1日中ダラダラと食事をするようになった。一方で、高脂肪食と共に BE を与えたマウスにおいては、ARC における炎症応答が改善され、摂食リズムについても、普通食を摂取したマウスと同等にまで回復した。さらに、BE 摂取マウスの、飽食ホルモンであるレプチンの神経感受性の回復を示し、神経機能を維持することが証明された。続いて廣直氏は、上記の効果に最も関与する BE 中の成分を特定するために、BE のポリフェノール成分を、その構造的特徴から単量体 flavan 3-ol の(+)-catechin と(-)-epicatechin を含む画分、二量体以上の flavan 3-ol である procyanidin を含む画分、アントシアニンである cyanidin 3-<i>O</i>-glucoside の3種類の画分に精製し、それぞれを HFD に混餌してマウスに与えている。その結果、cyanidin 3-<i>O</i>-glucoside (C3G) が、視床下部のミクログリア活性化を抑制する化合物であることが判明した。食品由来の化合物が、高脂肪食誘導性の摂食リズムの乱れを是正することを発見した報告は、本研究が初めてである。</p>			

氏名

廣直 賢勇

第2章においては、C3Gの生体利用性と、消化管から吸収される過程で速やかに様々な単純フェノール化合物へと代謝されることに着目し、マウス由来ミクログリア MG6 細胞を用いた *in vitro* の実験系を通して、C3Gの主要な生体代謝物の中から、脂肪酸が誘導するミクログリアの炎症応答を抑制する化合物を同定することを目指している。高脂肪食を組成する脂肪酸のうち、長鎖飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸が、ミクログリア細胞の炎症性サイトカインの放出量と遺伝子発現量を増加させた。この炎症応答を最も抑制した C3G 主要代謝物は **protocatechuic acid** であった。この抗炎症効果のメカニズムとして、転写因子 NF- $\kappa$ B を細胞質に留める役割を果たす I $\kappa$ B $\alpha$  のユビキチン化-プロテアソーム分解を抑制することで、NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制していることが明らかにされた。廣直氏は、最終的に **protocatechuic acid** が、*in vivo* (マウスを用いた実験) においても、高脂肪食誘導性の摂食リズムの変化と視床下部炎症を改善すること、肥満を抑制することを見出し、第1章の BE 中の活性本体を明らかにした。

BEを組成するポリフェノールは強い苦味や渋味を呈することから、BEの混餌は餌への嗜好性を低下させることが考えられた。そこで第3章では、BEによる摂食リズムの改善効果が、マウスの嗜好性に影響を与えた結果であるか否かについて明らかにするために、飼料選択試験を実施している。プレーンな飼料と、BEを混餌した飼料を自由に選択できる条件下でマウスを飼育した際、マウスは低脂肪食と高脂肪食に関わらず、BEを混餌した飼料よりも、プレーンな飼料を好んだ。しかし、一種類の飼料を摂取させた場合、BEの有無に関わらず、日中における摂取エネルギー量は変化しなかった。この結果から、BEをHFDに混餌したことによる日中の摂餌量の低下が、嗜好性への影響によるものではなく、エネルギー恒常性を支配する視床下部の炎症抑制効果を媒介していると考えられ、第1章と第2章の結論を補足する結果が得られた。

最後に附章では、BEの単回経口摂取が摂食行動に与える効果を確認している。これまでの研究で、BEに含まれるポリフェノールは、食欲抑制効果を発揮する消化管ホルモンである GLP-1 の分泌を促進することが明らかとなっている。GLP-1 は求心性迷走神経を媒介して脳へと食物情報を伝達し、摂食行動を停止させることから、BEの単回経口投与が、食欲抑制効果を発揮するのではないかと、という仮説の下で検証を行なっている。マウスを16時間絶食させた後、BEを単回経口投与した結果、仮説通りにBE投与後の1.5時間の摂食行動が抑制された。さらにBEの投与後から30分の時点において、頸静脈孔下部に存在する迷走神経神経節の神経細胞の活性化が認められた。さらに、BEの投与による摂食行動抑制効果は、求心性迷走神経の薬理的な遮断、およびGLP-1受容体の競合阻害剤の投与により消失した。また摂食抑制効果とGLP-1分泌促進効果は、BEに含まれる成分の中で、C3Gではなく、**flavan 3-ols**を豊富に含む画分で認められた。

本学位論文に記載の研究の実施により、学位申請者は、BEによる肥満抑制効果のメカニズムとして、摂食行動を司る中枢神経系への効果を含んでいることを示唆する結果を得た。BEに含まれる **cyanidin 3-O-glucoside** は、視床下部における抗炎症効果を発揮することで、神経機能を保護して摂食リズムの維持と抗肥満効果を発揮し、**flavan 3-ols** は求心性迷走神経を介した腸脳相関作用により、亜急性的な摂食抑制効果を発揮することが明らかとなった。本研究結果は、ポリフェノールが中枢神経系を媒介して多様な生理機能を発揮する潜在的なメカニズムを解明するための、新たな証拠と知見を提供するものであるとともに、他の機能性食品研究に対しても、重要な知見を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって学位申請者の廣直賢勇氏は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。