



Studies on the preventive effects of chalcones on obesity and insulin resistance

Zhang, Tianshun

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6027号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006027>

※ 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 張 天 順

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 preventive effects of chalcones on obesity and insulin resistance

(カルコンの肥満およびインスリン抵抗性予防効果に関する研究)

指導教員 芦田 均

近年、肥満に伴う糖尿病や脂肪肝の患者が増加の一途をたどっており、予防医学の観点から、肥満によるインスリン抵抗性や高血糖を抑制する食品因子の探索およびその作用機構の解明が世界的に求められている。本学位論文草稿は、アシタバ、ソウズク、オオパンガジュツ、カバなどの植物に多く含まれるカルコンに注目した。これらのカルコンは、芳香族ケトンに分類される有機化合物であり、抗バクテリア性、抗菌性、抗腫瘍性、抗炎症性などの機能性が示されている。しかし、カルコン類の抗肥満および抗インスリン抵抗性効果についてまだ不明である。そこで、本研究では、カルコン類の未知なる機能解明に注目し、その肥満、脂肪肝およびインスリン抵抗性の予防・改善作用を検証するとともに作用機構の解明を実施した。

第1章は三つ Section で構成されている。Section A には 3T3-L1 脂肪細胞を用いて脂肪蓄積を抑制するポリフェノールの探索を行った。その結果はアシタバ由来カルコンである 4-hydroxyderricin (4HD) と xanthoangelol (XAG)、ソウズク由来カルコンである cardamonin (CAR) ならびにカバに含まれる flavokawain B (FKB) は細胞毒性を示さず、より高い脂肪蓄積抑制効果を有する化合物であることが判った。Section B において 4HD と XAG が脂肪蓄積を有意に抑制した。その作用機構を調べたところ、これらのカルコンは、脂肪細胞の分化マーカーである転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β 、 α と peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の発現を mRNA とタンパク質レベルで抑制し、また、糖輸送担体である GLUT4 の発現をタンパク質レベルで抑制した。さらに、これらのカルコンは、AMP-activated protein kinase (AMPK)、extracellular signal-regulated kinase (ERK) および c-Jun amino-terminal kinases (JNK) のリン酸化を促進した。4HD と XAG による C/EBP β 、 α と PPAR γ の発現抑制は、AMPK、ERK および JNK のリン酸化阻害剤によりキャンセルされた。これらのことにより、4HD と XAG は、AMPK、ERK および JNK のリン酸化亢進を介して脂肪細胞の分化に関わる PPAR γ と C/EBPs の発現を抑制した。その結果より、細胞内の脂肪蓄積が減少することが判った。Section C で CAR と FKB の脂肪細胞分化抑制機構について検討した。CAR と FKB は、ERK の活性化を介して、脂肪細胞の分化に関わる PPAR γ と C/EBP α の発現を抑制した。その結果により、細胞内の脂肪蓄積が減少することが判った。以上の結果から、4HD、XAG、CAR と FKB は肥満の予防・改善に有効な食品因子であることが示唆された。

第2章では、HepG2 細胞を用いた細胞内の中性脂肪蓄積量を指標とした評価モデルを確立した。確立したモデルを用いて 4HD、XAG、CAR と FKB が肝細胞における脂質代謝に及ぼす影響を検討した。これらのカルコンは脂肪酸による HepG2 細胞内の脂肪蓄積を抑制した。メカニズムを解明するとこれらのカルコンは sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) の発現を抑制し、脂肪酸酸化に関連マーカー PPAR α の発現を促進することが判った。また、これらのカルコンは AMPK と liver kinase B1 (LKB1) のリン酸化を促進した。以上の結果から、4HD、XAG、CAR と FKB は AMPK/LKB1 伝達経路を介して HepG2 細胞内の脂肪蓄積を抑制することが判った。

第3章では、カルコンである 4HD と XAG が多く含まれているアシタバ抽出物 (AE) を用いて 30% ラード添加高脂肪食に混餌した飼料をマウスに摂取させ、肥満やインスリン

(氏名： 張 天順 NO. 2)

抵抗性に及ぼす効果を検討し、その作用メカニズムの解明を行った。脂肪組織と肝臓両方で AE は AMPK のリン酸化を促進して脂質代謝を制御したことが明らかとなった。脂肪組織において、AE は高脂肪食による脂肪合成に関連するマーカーである PPAR γ 、C/EBP α および SREBP-1 の発現の上昇を抑制し、白色脂肪組織における脂肪蓄積を低下させた。肝臓において、AE は高脂肪食による脂肪合成に関連するマーカーである SREBP-1 と fatty acid synthase の発現を抑制し、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1A、アシル-CoA オキシダーゼおよび PPAR α の発現を促進することを明らかにした。それとともに、AE は高脂肪食による肝臓脂質量の増加を抑制した。また、AE は高脂肪食による血漿グルコースおよびインスリン量の増加を抑制し、アディポネクチンの低下を促進することを明らかにした。これらの結果から、AE は AMPK リン酸化の促進を介して、高脂肪食摂取による脂肪蓄積とインスリン抵抗性の予防につながると考察した。

本学位論文に記載の研究の実施により、4HD、XAG、CAR および FKB が AMPK、ERK および JNK の活性化を介した脂肪細胞分化を抑制したことを明らかにした。また、HepG2 細胞において、これらのカルコンは AMPK/LKB1 伝達経路を介する脂肪蓄積を抑制することか分かった。さらに、4HD および XAG が多く含まれているアシタバ抽出物は AMPK の活性化を介した肥満およびインスリン抵抗性を改善した。これらのことにより、カルコンは脂肪蓄積を抑制するとともに、肝臓の脂肪蓄積およびインスリン抵抗性を改善する効果を持つという作用機構が明らかとなった。

本学位論文の附章として、以下のことを行った。

黒大豆種皮抽出物 (BE) はポリフェノールが多く含まれており、様々な生理機能を持つことが報告されている。本研究では、BE と BE から cyanidin 3-glucoside (C3G) を除去した BE (PC-rich BE)、ならびにこれらに含まれている C3G やプロシアニジンを用いて、DNA 損傷抑制効果とそのメカニズムを解明した。BE は変異原性が認められなかったが、それに含まれる C3G とプロシアニジン (二量体、三量体、四量体) が benzo(a)pyrene [B(a)P] および 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) に対して抗変異原性を示すことを見出した。HepG2 細胞において、C3G とプロシアニジンは B(a)P により誘導された aryl hydrocarbon receptor 核内移行と cytochrome P4501A1 を抑制した。一方、C3G とプロシアニジンは nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 の核内移行と第二素酵素 glutathione S-transferase の発現を促進することが判った。これらのことを介して B(a)P による DNA 損傷を抑制したことが明らかとなった。また 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) により誘導された 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の生成に対する BE およびそれに含まれているポリフェノールによる阻害効果を検討した。本研究で細胞系における LC-MS/MS を用いた、8-OHdG の分析方法を確立し、この方法を用いて、BE に含まれるプロシアニジン、カテキンおよびエピカテキンが 8-OHdG の生成を抑制することを明らかにした。以上の結果により、BE に含まれているポリフェノールが B(a)P、4NQO および AAPH により誘導された DNA 損傷や変異原性を抑制することが明らかになった。

氏名	張 天順		
論文 題目	Studies on the preventive effects of chalcones on obesity and insulin resistance (カルコンの肥満およびインスリン抵抗性予防効果に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	芦田 均
	副 査	教授	白井 康仁
	副 査	教授	上曾山 博
	副 査	准教授	橋本 堂史
	副 査		
要 旨			
近年、肥満に伴う糖尿病や脂肪肝患者が増加の一途をたどっており、予防医学の観点から、肥満によるインスリン抵抗性や高血糖を抑制する食品因子の探索およびその作用機構の解明が求められている。本学位論文は、アシタバ、ソウズク、オオバンガジュツ、カバをはじめとする多くの植物性食品に含まれているカルコンに着目し、その肥満やインスリン抵抗性に対する予防効果と作用機構についての解明を行った成果の集積である。これまでに、カルコンは、抗バクテリア性、抗菌性、抗腫瘍性、抗炎症性などの機能性を示すことが報告されている。しかし、カルコンの肥満およびインスリン抵抗性予防効果についての研究は少なく、作用機構は不明であった。 そこで、学位申請者である張天順氏は、不明であった作用機構を解明すべく研究に着手し、成果を積み重ねた。同氏の研究結果の概要は以下のとおりである。培養細胞および実験動物を用いて、カルコンである 4-hydroxyderricin (4HD), xanthoangelol (XAG), cardamonin (CAR), ならびに flavokawain B (FKB) が AMP-activated protein kinase (AMPK) と mitogen-activated protein kinases (MAPKs) のリン酸化亢進を介して、マウス由来の脂肪細胞である 3T3-L1 細胞の分化を抑制することを見出した。また、ヒトの肝細胞である HepG2 細胞において、これらのカルコンは、脂肪酸により誘導された脂肪蓄積に対して、liver kinase B1 (LKB1)/AMPK 情報伝達経路の活性化を介して抑制作用を発揮することを明らかにした。さらに、4HD および XAG が多く含まれているアシタバ抽出物をマウスに 16 週間摂取させたところ、肝臓と白色脂肪組織において、アシタバ抽出物は AMPK のリン酸化を亢進させることで、肥満およびインスリン抵抗性を抑制することが強く示唆された。これらの成果から、カルコンは脂肪蓄積を抑制するとともに、脂肪肝およびインスリン抵抗性の発症を予防する作用機構を提唱している。 本学位論文は、緒言と結語、ならびに以下の三つの章と附章から構成されている。 緒言では、肥満、脂肪肝並びにインスリン抵抗性を含む生活習慣病について概説し、これらの生活習慣病予防に果たす食品の重要性を論じている。特に、多くの生活習慣病の基盤病態となる肥満予防に関して、ポリフェノールの機能と役割に関する従来の知見を解説している。さらに、ポリフェノールの中で、カルコンに特化して、その生理活性や疾病予防効果の詳細を研究背景として紹介している。 第1章は、4HD, XAG, CAR, ならびに FKB の脂肪細胞分化抑制機構について検討した結果を三つのセクションに分けて述べている。はじめのセクションでは、49 種のポリフェノールを用いて、3T3-L1 脂肪細胞が分化に伴って蓄積する脂肪滴の形成を抑制する化合物を探索した結果、アシタバ由来カルコンである 4HD と XAG, ソウズク由来カルコンである CAR, ならびにカバに含まれる FKB が、強い脂肪蓄積抑制効果を有する化合物であると明らかにした。次のセクションでは、4HD と XAG による脂肪蓄積抑制効果の作用機構を調べている。これらのカルコンは、脂肪細胞特異的な分化マーカーであり、転写因子でもある CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β と α, ならびに peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の発現を mRNA とタンパク質レベルで抑制し、また、糖輸送担体である glucose transporter type (GLUT) 4 の発現をタンパク質レベルで抑制することを見出した。さらに、脂肪細胞の分化マーカーの上流で、AMPK と、MAPKs に属する extracellular signal-regulated kinase (ERK) および c-Jun amino-terminal kinases (JNK) のリン酸化が促進されることも見出した。AMPK, ERK, ならびに JNK のリン酸化阻害剤を細胞にカルコンと同時に処理することにより、4HD と XAG による C/EBPβ, α と PPARγ の発現抑制がキャンセルされることも確認した。これらのことから、4HD と XAG は、AMPK, ERK および JNK のリン酸化亢進を介して脂肪細胞の分化に関わる PPARγ と C/EBPs の発現を抑制し、その結果として、細胞内の脂肪蓄積が抑制される作用機構が明らかとなった。最後のセクションでは、CAR と FKB による			

氏名	張 天順
脂肪細胞の分化抑制機構の解明を行い、CAR と FKB は、4HD と XAG と同様に、ERK の活性化を介して、脂肪細胞の分化に関わる C/EBPα と PPARγ の発現を抑制することで、細胞内の脂肪蓄積が抑制することを明らかにした。以上の結果から、カルコンは肥満の予防・改善に有効な食品因子であると考察している。本章の内容の一部は、<i>Molecular Nutrition and Food Research</i>, 57, 1729-1740, 2013 に掲載されている。 第2章では、脂肪酸により誘導された肝細胞の脂肪蓄積抑制に対するカルコンの効果を検討した結果を述べている。まず、HepG2 細胞に各種脂肪酸を添加して、最も細胞内に中性脂肪を蓄積することができる条件を定めることで評価モデルを確立した。確立したモデルを用いて、4HD, XAG, CAR, ならびに FKB が、HepG2 細胞内への脂肪蓄積を抑制することを明らかにした。また、作用機構として、これらのカルコンは sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) の発現を抑制し、脂肪酸酸化に関わる転写因子である PPARα の発現を促進すること、さらに、これらの上流でカルコンは LKB1 と AMPK のリン酸化を促進させることを見出した。以上の結果から、4HD, XAG, CAR, ならびに FKB は、LKB1/AMPK 伝達経路を活性化させ、脂肪酸による HepG2 細胞への脂肪蓄積を抑制すると考察している。本章の内容は、<i>Food and Function</i> に投稿中である。 続く第3章では、カルコンである 4HD と XAG が多く含まれているアシタバ抽出物の脂質代謝改善効果を動物実験で検証している。アシタバ抽出物を、30%ラードからなる高脂肪食と対照食に混餌した飼料をマウスに 16 週間摂取させる、食餌誘導性の肥満やインスリン抵抗性に対する抽出物の効果を確認するとともに、作用機構も検討している。その結果、アシタバ抽出物が、脂肪組織と肝臓のいずれにおいても AMPK の活性化を促進することを見出した。白色脂肪組織においては、AMPK の活性化が高脂肪食により誘導された脂肪合成に関連タンパク質である PPARγ, C/EBPα, ならびに SREBP-1 の発現抑制を介して脂肪蓄積を低下させることが判った。一方で、肝臓における AMPK の活性化は、高脂肪食により誘導される SREBP-1 と fatty acid synthase の発現を抑制し、逆に、脂肪酸分解に関わるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1A, アシル-CoA オキシダーゼ、ならびに PPARα の発現を促進させることで、高脂肪食が惹起した肝脂質量の増加を抑制することが判った。さらに、アシタバ抽出物は高脂肪食による血漿グルコース量およびインスリン量の増加を抑制し、アディポネクチン量の低下を改善することも判った。これらの結果から、アシタバ抽出物は、AMPK の活性化促進を介して、高脂肪食摂取による脂肪蓄積と分解に関わる因子の機能異常を改善させ、肥満やインスリン抵抗性発症の予防につながると考察している。本章の内容は、投稿準備中である。 結語では、カルコンの脂質代謝改善効果に関する研究成果を取り纏めるとともに、解決すべき残された課題と今後の展望について論じている。 最後に、本学位論文の附章として、黒大豆種皮抽出物とこの抽出物に含まれるポリフェノールによる DNA 損傷抑制作用機構を調べた成果を示している。まず、黒大豆種皮抽出物と cyanidin 3-glucoside (C3G) を除去した黒大豆種皮抽出物、ならびに抽出物に含まれている C3G やプロシアニジン類(二量体、三量体、四量体)は、benzo(a)pyrene [B(a)P] および 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) に対して抗変異原性を示すことを明らかにした。また、HepG2 細胞において、C3G とプロシアニジン類は、B(a)P により誘導された小核形成を抑制し、また、aryl hydrocarbon receptor の核内移行とその下流の薬物代謝第 I 相酵素 cytochrome P4501A1 の発現を抑制した。一方、これらのポリフェノールは、nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 の核内移行を促進し、下流の薬物代謝第 II 相酵素 glutathione S-transferases の発現促進を介して DNA 損傷を抑制することを見出した。さらに、2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) により誘導された 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の生成に対する黒大豆種皮抽出物とそのポリフェノールの阻害効果を検討している。細胞系における LC-MS/MS を用いた 8-OHdG の分析方法を確立し、この方法を用いて、プロシアニジン類と単量体であるカテキンおよびエピカテキンが 8-OHdG の生成を抑制することを見出した。以上のことから、黒大豆種皮抽出物とそのポリフェノールは、B(a)P, 4NQO, ならびに AAPH により誘導された DNA 損傷や変異原性を抑制することが明らかとなった。附章の内容の一部は、<i>Food Science and Technology Research</i>, 19, 685-690, 2013, および <i>Mutation Research</i>, 752, 34-41, 2013 に掲載されている。 以上のことから、本学位論文に記載の研究の実施により、学位申請者の張天順氏は、カルコンである 4HD, XAG, CAR, ならびに FKB が、脂肪細胞の分化に伴う脂肪蓄積と、脂肪酸がもたらす肝細胞への脂肪蓄積を抑制すること、さらに、4HD および XAG が多く含まれているアシタバ抽出物が、食餌誘導性の肥満およびインスリン抵抗性を予防することを検証し、得られたそれぞれの事象についての作用機構を明らかにした。これらの成果の集積により、カルコンは、脂質代謝改善機能に関する多様な作用を有することが初めて明らかとなった。また、附章ではポリフェノールが化学物質により誘導された遺伝子損傷を抑制する作用機構も明らかとなった。 本研究はカルコンについて、その生活習慣病予防効果と作用機構を研究したものであり、カルコンの脂質代謝改善効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の張天順氏は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。	