

学 位 論 文 題 名

フコキサンチンによる骨格筋での代謝制御を介した
血糖改善効果に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、糖尿病患者の世界的な増加が問題となっている。糖尿病は高血糖を特徴とする疾患であり、慢性患者のように高血糖が持続すると網膜症や壊疽など深刻な合併症が生じる。また、糖尿病に伴うこれらの症状は自覚症状が少ないまま進行し、さらに治療による予後が悪いことから、その予防が極めて重要である。

骨格筋は、生体において体重の約 40%を占め、インスリン刺激下での血糖の取り込みは生体全体の 80%を占めるため、血糖制御に最も重要な器官であるといえる。しかし、糖尿病ではインスリン抵抗性が誘導され骨格筋でのグルコーストランスポーター 4(GLUT4)を介したインスリン依存的な血糖取り込みが減弱する。そのため、高血糖の改善において骨格筋での糖や脂肪酸代謝、インスリン抵抗性の改善が重要である。

近年、ワカメなどの褐藻類に含まれるフコキサンチン(Fx)による高血糖改善効果などの抗糖尿病効果が報告されている。そのため、Fx による高血糖改善効果の機序として、骨格筋での糖や脂肪酸代謝の亢進やインスリン抵抗性の改善機能が考えられる。しかし、Fx の骨格筋への影響を詳細に検討した報告例はない。そこで本研究では、Fx による高血糖改善効果の分子機構として骨格筋に注目し、マウス骨格筋モデルである C2C12 筋管細胞や糖尿病/肥満 KK-A^yマウスを用いて抗糖尿病効果とその分子機構の解明を行った。

第一章では、Fx の生体内代謝物であり骨格筋で最も多く蓄積が見られるフコキサンチノール(FxOH)を用いて、骨格筋モデル細胞における糖・脂質代謝への影響並びに、骨格筋から分泌されるマイオカインの 1 種であり生体全体のエネルギー代謝の亢進に関わるインターロイキン-15(IL-15)の産生能を調べた。更に、インスリン抵抗性の細胞モデル実験系として、肥満により脂肪組織からの分泌が増加するパルミチン酸やレプチン、レジスチンなどのアディポカイン存在下における FxOH の糖・脂質代謝への影響について検討した。FxOH は、パルミチン酸によりインスリン抵抗性を誘導した細胞条件下にあっても GLUT4 やカルニチンアシルトランスフェラーゼ I b(CPT1b)などの糖代謝や脂肪酸代謝に関連する因子の mRNA の発現を亢進し、更に、レプチン及びレジスチン存在下においてフコキサンチノールにより誘導される GLUT4 の mRNA 発現が増強された。加えて、FxOH により IL-15 の mRNA 発現の増加が見られた。近年、IL-15 はマイオカインとして脂肪組織に作用し、白色脂肪組織の縮小や分化抑制作用を示すことが明らかにされた。よって Fx は、骨格筋において糖取り込みや脂肪酸代謝を介した高血糖の改善だけではなく、生体全体でのエネルギー代謝の改善にも影響を及ぼし、効果的な糖尿病の予防が期待できると考えられる。

第二章では、FxOH の C2C12 筋管細胞における GLUT4 の発現及び活性化機構について検討した。GLUT4 による糖取り込みは、発現や細胞膜移行により制御される。FxOH は C2C12 筋管細胞において、GLUT4 の発現や細胞膜移行を活性化した。骨格筋での糖取り込みはインスリン依存的な GLUT4 の他に恒常的な糖取り込みを担う GLUT1 が挙げられる。FxOH はラット骨格筋モデル L6Y 細胞において、GLUT1 による糖取り込みを阻害するフロレチン存在の有無に関わらず 2DG

取り込みを亢進した。この結果は、F_xOH は GLUT4 を介して糖取り込みを活性化することを示す。GLUT4 の細胞膜移行を制御する経路としてインスリン経路が挙げられるが、F_xOH はインスリン経路の下流因子である Akt を活性化した。一方、GLUT4 の発現を制御する経路として AMP-activated protein kinase(AMPK)や Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase(CaMK)、カルシニューリンや p38 mitogen-activated protein kinase(p38 MAPK)を介した経路が挙げられる。F_xOH とこれらの経路に関わる阻害剤を併用して C2C12 筋管細胞に添加したところ、AMPK の阻害剤存在下において F_xOH により誘導される GLUT4 の mRNA が消失した。更に、F_xOH が C2C12 筋管細胞において AMPK を活性化することが確認された。以上から、F_x による高血糖改善の機序として、F_x が骨格筋に直接作用し、Akt や AMPK の活性化を介して GLUT4 の発現や細胞膜移行を活性化し、血糖取り込みを亢進することが推察される。

第三章では、このような F_x による血糖値改善機構を *in vivo* で証明するために、F_x を糖尿病/肥満 KK-A^y マウスに経口投与し、骨格筋における糖及び脂肪酸代謝への影響を検討した。F_x を KK-A^y マウスに 4 週間投与すると、骨格筋における GLUT4 の発現量は増加傾向を示し、細胞膜移行は有意に亢進した。骨格筋は主に、ヒラメ筋など持久的な運動を担う遅筋と、長趾伸筋など瞬発的な運動を担う速筋に分けられる。遅筋は、脂肪酸代謝など酸化能力が高く GLUT4 の発現が高い Type I 繊維が特徴的に見られる。一方、速筋に見られる Type II 繊維は、酸化能力は低いが解糖系による糖代謝が活発である。また運動は、遅筋において GLUT4 の細胞膜移行を活性化し、速筋では GLUT4 の発現を誘導する。しかし、肥満や糖尿病では、このような Type I 繊維の減少や各繊維での GLUT4 の発現の減少が見られる。よって、F_x による高血糖改善効果を更に詳細に検討するために、骨格筋の部位での GLUT4 の活性化機序を検討した。本研究では、特に遅筋としてヒラメ筋、速筋として長趾伸筋を用い、F_x がこれらの骨格筋における GLUT4 発現や細胞膜移行に及ぼす影響を検討した。F_x を KK-A^y マウスに 2 週間投与すると、血糖値の改善に加え、血清インスリン値の改善や両骨格筋において Akt の活性化などインスリン抵抗性の改善が見られた。なお、F_x による血糖改善は投与 1 週間で見られないことから、F_x による血糖改善効果は投与 2 週間で現れることが明らかとなった。また、F_x 投与により骨格筋において CPT1B や fatty acid transporter CD36(FAT/CD36)、transcription factor A mitochondria(TFAM)の mRNA の発現が増加したことから、糖代謝のみならず脂肪酸代謝を活性化することが推察される。F_x は、ヒラメ筋において GLUT4 の細胞膜移行を亢進し、長趾伸筋では GLUT4 の発現量を増加させた。更に F_x 投与は、両骨格筋において運動により誘導される IL-15 などのマイオカインや PGC-1 α 発現を誘導した。このようなことから、F_x は運動と同様の機序で骨格筋でのエネルギー代謝を活性化し、高血糖を改善すると推察される。また、F_x 投与により骨格筋において Akt や AMPK の活性も確認されたことから、F_x はこれらの機序を介して GLUT4 の発現や細胞膜移行を制御していることが推察された。

以上から、F_x による高血糖改善効果は、骨格筋におけるインスリン抵抗性の改善や糖代謝及び脂肪酸代謝の活性化であり、高血糖の根本的な原因を改善する分子機構であると言える。更に F_x の骨格筋におけるこれらの作用の一部は、インスリン非依存的な AMPK の活性化にもよると考えられるため、インスリン抵抗性による高血糖の改善において非常に効果的であると言える。さらに F_x の骨格筋への作用は、運動時に見られるエネルギー消費と類似の機構であり、その中で重要な役割を示す PGC-1 α の発現や生体全体でのエネルギー代謝の亢進にもつながるマイオカインの誘導も見られたことから、運動との併用などその利用法に関する研究展開が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 酒 井 隆 一
副 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 准教授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

フコキサンチンによる骨格筋での代謝制御を介した 血糖改善効果に関する研究

糖尿病は高血糖を特徴とする疾患であり、網膜症や壊疽など深刻な合併症を誘発する。また、高血糖状態は心疾患や脳血管疾患などの主要なリスクファクターであり、ヒトの死因に深く関わっている重大病態といえる。そこで、糖尿病の予防や治療を目的とした様々な取り組みが試みられている。特に、運動療法と食事療法はその主要なものであり、食品成分による高血糖状態の改善に大きな関心が集まっている。食品成分が血糖値を制御するメカニズムには幾つかあるが、その主要なターゲット部位は骨格筋である。骨格筋は体重の約40%を占め、インスリン刺激下で生体に取り込まれる糖（グルコース）の80%は骨格筋で消費される。しかし、インスリン抵抗性が誘導されると、骨格筋でのグルコーストランスポーター 4(GLUT4)を介した血糖取り込みが減弱する。そのため、食品成分による高血糖の改善では、インスリン抵抗性の改善とGLUT4の発現増大並びに活性化が重要と考えられている。

糖尿病を改善する食品成分はこれまでも幾つか報告されているが、ワカメなどの褐藻類に含まれるフコキサンチン(Fx)は、血糖値の改善作用の他に、糖尿病に関連する内臓脂肪増大の減少効果と強い抗炎症作用を有することから、その活用が期待されている。Fxの抗糖尿病作用のメカニズムとしてはこれまでにインスリン抵抗性の改善が報告されているが、骨格筋への作用については不明であった。そこで本研究では、骨格筋に注目し、マウス骨格筋モデルであるC2C12筋管細胞や糖尿病/肥満KK-A^yマウスを用いて、Fxの抗糖尿病効果とその分子機構の解明を行った。本研究で得られた成果は以下のように要約される。

1. Fxの生体内代謝物であり骨格筋で最も多く蓄積が見られるフコキサンチノール(FxOH)を用いて、骨格筋モデル細胞における糖・脂質代謝と、骨格筋から分泌されるマイオカインの1種であり生体全体のエネルギー代謝の亢進に関わるインターロイキン-15(IL-15)の産生能への影響を調べた。その結果、FxOHは、パルミチン酸などによりインスリン抵抗性を誘導した細胞条件下にあってもGLUT4やCPT1bなどの糖代謝や脂肪酸代謝の亢進因子の遺伝子発現を増大させることを明らかにした。また、白色脂肪組織の縮小や分化抑制作用を示すIL-15の遺伝子発現が、FxOH添加により亢進することも見出した。

2. 骨格筋での糖取り込みはインスリン依存的なGLUT4の他に恒常的な糖取り込みを担うGLUT1が挙げられるが、FxOHはラット骨格筋モデル細胞において、GLUT1による糖取り込みを阻害するフロレチン存在の有無に関わらず糖取り込みを亢進させることを見出し、FxOHの糖取り込み促進作用が、GLUT4を介した糖取り込みの活性化に起因することを示した。

3. GLUT4の細胞膜移行を制御する経路としてインスリン経路が挙げられるが、FxOHはインスリン経路の下流因子であるAktを活性化することを明らかにした。一方、GLUT4の発現を制御する経路としては、AMPK、CaMK、カルシニューリン及びp38MAPKを介した経路が挙げられる。そこで、これらの経路の阻害剤を用いてFxOHによるGLUT4発現亢進作用について検討したところ、AMPK経路の活性化がFxOHによるGLUT4発現増大の主要メカニズムであることを見出した。

4. Fxを糖尿病/肥満KK-*Ay*マウスに経口投与したところ、2週間の投与で血糖値や血清インスリン値の改善効果並びにマウス骨格筋におけるGLUT4の発現量の増加と有意な細胞膜移行の亢進を見出した。また、Fx投与により骨格筋においてCPT1b、FAT/CD36、TFAMの遺伝子発現が増加することを明らかにし、Fxが糖尿病/肥満マウスの糖代謝のみならず脂肪酸代謝も活性化させることを示した。

5. 骨格筋は主に、ヒラメ筋など持久的な運動を担う遅筋と、長趾伸筋など瞬発的な運動を担う速筋に分けられる。遅筋は、脂肪酸代謝など酸化能力が高くGLUT4の発現が高いType I 繊維が特徴的に見られる。一方、速筋に見られるType II 繊維は、酸化能力は低いが解糖系による糖代謝が活発である。また運動は、遅筋においてGLUT4の細胞膜移行を活性化し、速筋ではGLUT4の発現を誘導する。しかし、肥満や糖尿病では、このようなType I 繊維の減少や各繊維でのGLUT4の発現の減少が見られる。そこで、本研究では、糖尿病/肥満KK-*Ay*マウスから遅筋としてヒラメ筋を、速筋として長趾伸筋を分離し、Fxの両骨格筋に対するGLUT4発現や細胞膜移行に及ぼす影響をそれぞれの骨格筋で検討した。その結果、ヒラメ筋においてはGLUT4の細胞膜移行の有意な亢進が、長趾伸筋ではGLUT4の発現量の有意な増大の起ることを明らかにした。

6. 糖尿病/肥満KK-*Ay*マウスにFxを投与後、遅筋（ヒラメ筋）と速筋（長趾伸筋）を分取し、両骨格筋からのマイオカインやその他の代謝関連生体分子の分泌・発現について検討したところ、運動により誘導されるIL-15などのマイオカインやエネルギー代謝改善の鍵分子となるPGC-1 α 発現が、Fx投与により有意に亢進することを見出した。また、Fx投与により両骨格筋においてAktやAMPKの活性亢進も確認し、FxがAktやAMPKの活性化を介してGLUT4の発現や細胞膜移行を制御していることを示した。

以上のように、本研究では、Fxが効果的な高血糖改善効果を示す理由について、骨格筋におけるインスリン抵抗性の改善と糖代謝の活性化作用を中心に、分子レベルで明確にした。Fxの骨格筋への作用は、運動時に見られるエネルギー消費と類似の機構であり、Fxがエネルギー代謝全体を亢進させることで血糖値の改善を示す特異な食品成分であることを初めて明らかにした。得られた成果は、褐藻に特有な色素成分、フコキサンチンの機能性についての今後の研究展開に大きく資するものであり、褐藻を用いた新たな産業の創出にも寄与すると考えられる。よって審査員一同は本研究の申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定