

山口県立大学 学位論文 博士（健康福祉学）

博士論文審査要旨

授与番号

健康福祉第一号

取得者

井上 佳美

論文題目

食品に含まれる抗酸化物質としてのフラボノイドによる糖毒性の抑制に関する研究

授与年月日

2009（平成21）年3月18日

審査委員

主査	長坂 祐二	（山口県立大学看護栄養学部 教授）
副査	足立 蓉子	（山口県立大学大学院健康福祉学研究科 教授）
副査	林 隆	（山口県立大学看護栄養学部 教授）

論文要旨

食品に含まれる抗酸化物質としてのフラボノイドによる糖毒性の抑制に関する研究

糖尿病はインスリンの作用不足により、慢性の高血糖をきたす疾患の総称である。糖尿病患者において高血糖が持続することが糖尿病特有の合併症を発症させ、日常生活に支障をきたすようになる。また、合併症による身体的健康の低下に加えて、インスリン治療や医療費の増加、仕事、就学上の問題から、社会的および心理的健康も低下する。

血糖値の上昇が、さらにインスリン分泌障害とインスリン抵抗性を悪化させて悪循環を起こしたり、慢性合併症の原因となることを糖毒性という。高血糖に起因する慢性合併症の発症機序として、酸化ストレスの亢進、ポリオール経路の代謝亢進、Protein kinase C 活性の亢進、Advanced glycation endoproteins (AGE) を含むグリケーションの促進などの仮説が提唱されているが、いずれの仮説においても活性酸素の発生が重要な役割を果たしている。

糖尿病の慢性合併症の予防には、血糖値の厳格なコントロールがもっとも重要な治療法であることに疑いはないが、すべての糖尿病患者で理想的な血糖コントロールを達成することは困難である。そこで、フラボノイドなど抗酸化作用を有する食品成分により、糖毒性による悪影響を軽減させることができれば、糖尿病の慢性合併症予防のための有効な補助的治療法になることが期待される。

本研究では、高濃度グルコース下で低下するグルタチオンを指標として、フラボノイドの一種であるケルセチンが酸化ストレスによる細胞障害を予防することができるかどうか、培養細胞を用いた実験を行った。その結果、ケルセチンはそれ自身の抗酸化作用に加えて細胞内 GSH 濃度を増加させることにより酸化ストレスによる細胞障害を軽減する可能性があることが示された。続いて、高濃度グルコースおよびケルセチンにより変化するタンパク質のプロテオーム解析を行った結果、グルタチオン代謝に関わる酵素、細胞骨格の調節に関わるタンパク質、糖代謝に関わる酵素、分子シャペロン、タンパク質合成に関わるタンパク質など 13 種類を同定することができた。

本研究を通して、食品に含まれるフラボノイドの1種であるケルセチンが、培養細胞を使った実験ではあるが、糖尿病患者でみられる糖毒性を軽減する可能性があることが示された。また、プロテオーム解析により、高濃度グルコースおよびケルセチンによりグルタチオン代謝に関わる酵素が変動することを初めて同定した。このことは、糖毒性のメカニズムとケルセチンの作用メカニズムの解明に役立つものと考えられる。

Effects of flavonoids, dietary antioxidant, on glucose toxicity

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage, dysfunction, and failure of various organs, especially the eyes, kidney, nerves, heart, and blood vessels. Having diabetes mellitus impaired not only physical health, but also social and psychological health by the problems of insulin treatment, increasing medical cost, employment opportunity, entering school and so on.

Chronic exposure to hyperglycemia can lead to cellular dysfunction that may result in impaired insulin secretion, insulin resistance and chronic complications, a process that is termed glucose

toxicity. Intracellular hyperglycemia induces overproduction of superoxide at the mitochondrial level. Overproduction of superoxide is the first and key event in the activation of all other pathways involved in the pathogenesis of diabetic complications, such as polyol pathway flux, increased advanced glycosylation end product (AGE) formation, and activation of protein kinase C (PKC).

There is no doubt that a strict control of blood glucose is the most important strategy to prevent chronic complications of diabetes. However, it is difficult for many people with diabetes to achieve the ideal blood glucose control even though the advance of drug therapy. If antioxidants in food such as flavonoids could reduce the glucose toxicity, consumption of such foods might become effective supportive therapy to prevent chronic complications of diabetes.

In this study, I examined whether quercetin, one of the flavonoids, can reduce the oxidative stress induced by high concentrations of glucose in cultured cells. The intracellular concentration of glutathione which was known to be decreased in diabetic patients was used as index of glucose toxicity. The results showed that quercetin increased the intracellular concentration of glutathione in both normal and high concentration of glucose, and protected cell damage induced by hydrogen peroxide. Furthermore, I did proteome analysis of cells cultured in high concentration of glucose or quercetin, and identified 13 proteins which is decreased or increased by the treatment. These proteins included enzymes related to glutathione metabolism, proteins related to the regulation of cytoskeleton, enzymes related to glucose metabolism, molecular chaperones, and proteins related to protein synthesis in ribosome.

In the present study using cultured cells, I showed that quercetin could reduce the glucose toxicity by increasing the intracellular concentration of glutathione. This supports the recommendation of vegetable consumption in diabetic patients. I also found that the amounts of enzymes related to glutathione metabolism were changed by high concentration of glucose for the first time. These results will be helpful to understand the mechanisms of the glucose toxicity and the action mechanisms of quercetin.

審査結果

本論文は、フラボノイドの一種であるケルセチンが、それ自身が持つ抗酸化作用に加えて、細胞内グルタチオン (GSH) 濃度を増加させることにより糖毒性を軽減することを、培養細胞を使った基礎実験によって示したもので、四章で構成されている。

第一章では、糖尿病の病態について概観し、高血糖の持続が糖代謝の悪循環をもたらし、さらに慢性合併症を引き起こす糖毒性について記載した上で、糖毒性の実態が、高血糖によってもたらされる酸化ストレスの亢進であることを論じている。さらに、糖尿病患者における酸化ストレスの亢進は、過剰なグルコースの代謝による活性酸素産生の増加による攻撃因子の増加に加えて、GSH濃度の低下により防御因子の減少が関わっていることを示し、食品成分による酸化ストレスを軽減することが糖尿病の慢性合併症を予防する可能性について考察している。

第二章では、食品に含まれる抗酸化物質であるフラボノイドを糖尿病患者の治療に使用した臨床試験の文献レビューを行っている。その結果、ほとんどの臨床試験で血糖値の改善、インスリン抵抗性の改善、過酸化脂質の減少など何らかの効果が認められたが、いずれの臨床試験も規模が小さく、効果を証明するには至っていないこと、また、フラボノイドの作用機序については、いまだ十分には解明されていないことを記載し、基礎研究の必要性を論じている。

第三章では、ケルセチンの糖毒性軽減効果に関する培養細胞を用いた実験結果について記載している。細胞内GSH濃度は高グルコース濃度で低下し、ケルセチンを添加することにより細胞内GSH濃度は濃度依存性に増加した。過酸化水素による細胞障害に対するケルセチンの効果を検討すると、正常なグルコース濃度で培養した場合でも、高グルコース濃度で培養した場合でも、同じように細胞の生存率は低下するが、ケルセチンを添加することにより細胞の生存率は回復した。過酸化水素は、細胞内GSH濃度は低下させたが、ケルセチン添加することによりGSH濃度は回復した。これらの実験により、ケルセチンは正常のグルコース濃度でも高グルコース濃度でも、細胞内のGSH濃度を上昇させることにより、酸化ストレスによる細胞障害を軽減させる作用があること示すことができた点は評価できる。次に、細胞内タンパク質を二次元電気泳動法により展開し、高濃度グルコースあるいはケルセチンにより変化するタンパク質の同定を行った。その結果、GSH代謝に関わる酵素、細胞骨格の調節に関わるタンパク質、糖代謝に関わる酵素、分子シャペロン、タンパク質合成に関わるタンパク質など13種類のタンパク質を同定することができた。

第四章では、糖毒性を軽減する食生活として野菜を摂取することの意義と期待される効果の作用機序について、本研究の成果に基づいて解説している。

最終試験では、本研究の概要をわかりやすく説明し、質疑応答において、研究対象や実験系を選択した理由、実験条件、プロテオーム解析の結果の解釈、健康福祉学としての意義などの質問に対し、概ね適切な回答が得られた。

以上の所見を総合して、博士論文審査及び最終試験に合格したものと認める。

以上