

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 人間・環境学 )	氏名	津田 諭志
論文題目	Metabolic effects of coffee components on rat skeletal muscle in the resting and contracting states —Evidence for 5'AMP-activated protein kinase activation, glucose metabolism enhancement, and ergogenic effect— (コーヒー成分が安静時および収縮時のラット骨格筋に及ぼす代謝的効果 —AMPキナーゼ活性化、糖代謝促進および運動機能増進作用の検証—)		
(論文内容の要旨)			
<p>骨格筋は体内最大のエネルギー代謝器官であり、その主要制御因子として5'AMP-activated protein kinase (AMPK) が知られている。近年、コーヒーの習慣的摂取が2型糖尿病の発症リスクを低下させることが疫学的研究で多数報告され、その機序の1つとして、カフェインの骨格筋AMPK活性化作用が示唆されている。本論文はラット骨格筋を用いて、コーヒーに含まれる主要なファイトケミカル (カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸) の代謝促進効果を、骨格筋AMPKを主軸において検証したものである。</p> <p>第1章では、2型糖尿病の世界的な増加とその予防に対する習慣的な運動の重要性、運動による骨格筋AMPK活性化の生理学的意義、及び運動類似的に骨格筋AMPKを活性化するファイトケミカルについて概説した上で、本研究において、上記3種のファイトケミカルに焦点を合わせ、AMPKに着目して研究を行ったことを記述した。</p> <p>第2章では、骨格筋における糖輸送の分子機構とその制御、運動や様々なファイトケミカルによる骨格筋AMPKの活性化、コーヒー摂取による2型糖尿病の発症リスク低下、及び上記3種のファイトケミカルと骨格筋糖輸送に関する主要な先行研究を整理し総括した。</p> <p>第3章では、第1・2章を踏まえた上で、本研究で実施した3つの研究の目的を記述した。</p> <p>第4章では、カフェ酸、クロロゲン酸が骨格筋AMPKに及ぼす影響に関する研究について記述した。本研究では、実験手法として単離筋インキュベーション系を用いた。この手法は、ラットから単離した骨格筋を酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベートするものであり、血液循環やホルモン、神経系、消化器系などの影響を除外し、骨格筋に対するファイトケミカルの直接的作用を解析することを可能とした。その結果、カフェ酸は単離したラット滑車筋において、AMPK<math>\alpha</math> Thr<sup>172</sup>リン酸化を用量 (<math>\geq 0.1</math> mM)、時間 (<math>\geq 30</math>分間) 依存的に亢進した。AMPKには<math>\alpha 1</math>、<math>\alpha 2</math>の2種類の活性サブユニットが存在するが、カフェ酸はAMPK<math>\alpha 2</math>活性のみを亢進した。AMPKは細胞内エネルギー状態の低下に反応して活性化されることが知られているが、カフェ酸は細胞内エネルギー状態の指標であるクレアチンリン酸の含有量を低下させるとともに、インスリン非依存性糖輸送活性を亢進した。以上より、コーヒーの抗糖尿病作用には、カフェインのみならず、カフェ酸による骨格筋AMPK活性化を介した糖代謝促進作用が関与している可能性が示唆された。</p> <p>第5章では、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸が筋収縮時の骨格筋AMPK活性化に及ぼす影響に関する研究について記述した。In vitroの検討では、ラット滑車筋を単離し、ファイトケミカルを含む<math>\alpha</math>MEM培地でインキュベートし、通電によりテタヌス収縮を惹起した。</p>			

その結果、カフェイン存在下（3 mM、30分間または120分間）では、筋収縮によるAMPK活性化が増強されるとともに、最大発揮張力の増加、及び張力減衰の緩和が観察された。また、カフェイン存在下では、筋収縮によるアデノシン3リン酸、クレアチンリン酸の含有量低下がより高度となり、インスリン非依存性糖輸送活性化の増強も確認された。さらに、筋細胞内カフェイン濃度を測定した検討により、カフェイン濃度がインキュベーション開始後30分までに最大濃度に到達し、筋収縮がその濃度に影響を及ぼさないことも明らかとなった。一方、カフェ酸、クロロゲン酸は筋収縮によるAMPK活性化に影響を及ぼさなかった。また、ラットにカフェインを腹腔内投与し坐骨神経に通電し筋収縮を惹起させたin vivoの検討では、摘出した長趾伸筋においてAMPK活性、インスリン非依存性糖輸送活性について、in vitroと同様の変化が観察された。以上より、カフェインが収縮時の骨格筋の疲労を軽減し、細胞内のエネルギー状態をより低下させるメカニズムを介して、筋収縮によるAMPK活性化、及びインスリン非依存性糖輸送活性化に対して相加的な影響を及ぼす可能性が示唆された。

第6章では、カフェインが筋収縮時の代謝応答に及ぼす影響に関する研究について記述した。上記、in vitro実験と同様の手法を用い、ラット滑車筋をカフェイン存在下（3 mM、30分間）または非存在下でテタヌス収縮を惹起し、対照群を含めて、代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）を行った。その結果、184種類の代謝産物が同定され、50種類の代謝産物に有意な変動が認められるとともに、カフェイン存在下での筋収縮において、ペントースリン酸、核酸合成、脂肪酸酸化、TCA回路、アミノ酸代謝などの多数の代謝経路に関わる代謝産物が増加した。一方、解糖系代謝産物はカフェインの影響を受けなかった。以上より、カフェインが筋収縮時のエネルギー代謝を増強させるなど、多様な代謝促進作用を有することが示唆された。

第7章では、本研究結果を要約し、カフェイン、カフェ酸がともに運動類似的に骨格筋AMPKを活性化するとともに、カフェインが筋収縮時のAMPKの最大活性を増強すること、一方、骨格筋AMPK活性化作用を持つファイトケミカルが筋収縮によって誘導されるAMPK活性化に対して必ずしも相加的な作用を持つとは限らないこと、カフェインによる代謝変化がカフェインの筋機能増進に寄与することを提唱した。さらに今後の展望として、コーヒーに含まれるファイトケミカルの長期的な効果の検討の必要性と、運動が十分に行えない人々に有益となる運動類似の効果を持ったファイトケミカルの同定の重要性を記述した。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

骨格筋は体内最大の糖・脂質・エネルギー代謝器官として、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。本論文は、2型糖尿病の発症リスク低下が疫学的に示されている飲料であるコーヒーに着目し、コーヒーが含有する代表的なファイトケミカルであるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸について、これらが骨格筋に与える急性的な代謝変化とそのメカニズムを、ラット骨格筋を用いて詳細に検討したものである。

申請者は、基本手法として、ラットから単離した滑車上筋をインキュベートし、通電にてテタヌス収縮を生じさせる実験方法を採用した。滑車上筋は1980年代より骨格筋代謝の検討に用いられてきた筋であるが、本手法を用いることで、ファイトケミカルを直接的に骨格筋に作用させつつ、筋収縮を一定の条件にコントロールすることが容易となった。

運動時に生じる筋収縮は骨格筋糖代謝を活性化させる強力な生理的刺激であり、その作用は2型糖尿病予防・改善のための運動療法として広く利用されている。運動中の骨格筋では5'AMP-activated protein kinase (AMPK) が急性的に活性化され、インスリン非依存性糖輸送活性亢進、糖輸送担体glucose transporter 4 (GLUT4) 発現亢進、ミトコンドリア増加、インスリン感受性亢進など、2型糖尿病予防・改善に寄与する様々な生体反応が惹起される。一方、近年、ラット骨格筋を用いた研究で、カフェインが骨格筋AMPKを急性的に活性化し、インスリン非依存性糖輸送活性を亢進すること、すなわち運動類似効果を有することが示された。そこで申請者は、第1の研究として、カフェ酸、クロロゲン酸が、カフェインと同様の作用を有するかを、ラット滑車上筋を用いて検討した。その結果、カフェ酸がAMPKを活性化しインスリン非依存性糖輸送活性を亢進する一方、クロロゲン酸はこれらの作用を持たないことが示された。さらに、カフェ酸はカフェインに類似して、細胞内エネルギー状態の指標であるクレアチンリン酸を減少させるが、カフェインとは異なり、異なる活性サブユニットを持ったAMPK (AMPK $\alpha$ 1、AMPK $\alpha$ 2) のうちAMPK $\alpha$ 2だけを活性化することが示された。これらの結果は、コーヒーによる骨格筋糖代謝活性化にカフェ酸が寄与している可能性と、その作用メカニズムを提示するものである (Journal of Nutritional Biochemistry 2012年発行 第23巻 第11号 1403-1409頁に掲載)。

申請者は、第2の研究として、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸が筋収縮時の骨格筋AMPK活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、ラット滑車上筋を用いた検討で、カフェインが、筋収縮時に生じるAMPKとインスリン非依存性糖輸送の活性化を増強する作用を持つこと、さらには最大発揮張力の増加作用と張力減衰の緩和作用を持つことが示された。一方、カフェ酸、クロロゲン酸は、筋収縮時に生じるAMPK活性化に影響しなかった。また、ラット生体における検討においても、カフェインの腹腔内投与後に坐骨神経通電によって収縮させた長趾伸筋において、AMPK活性とインスリン非依存性糖輸送活性の増強作用が示された。これらの結果は、カフェインが、収縮時の骨格筋においても、AMPKを通じた糖代謝活性化作用や筋機能亢進作用を持つことを提示するものである (Physiological Reports 2015年発行 第3巻 第10号)

e12592に掲載)。

申請者は、第3の研究として、カフェインが収縮時の骨格筋に与える代謝的影響を、代謝産物の網羅的解析により検討した。ラット滑車筋をカフェイン存在下または非存在下で収縮させ、メタボローム解析を行って比較したところ、カフェイン存在下では、ペントースリン酸、核酸合成、脂肪酸酸化、TCA回路、アミノ酸代謝などの代謝産物が増加することが示された。これらの結果は、カフェインが筋収縮時において、糖代謝にとどまらない多様な代謝促進作用を有することを提示するものである (Nutrients 2019年発行 第11巻 第8号 1819に掲載)。

以上のように、本論文では、コーヒーが含有する3種のファイトケミカルが骨格筋代謝に与える急性的影響を検討し、カフェ酸によるAMPKを介した糖代謝の活性化、カフェインによる筋収縮時のAMPK活性化と糖代謝活性化の増強及び筋機能の亢進、カフェインによる筋収縮時の多様な代謝経路活性化など、示唆に富む多くの可能性を明らかにした。本論文はラット骨格筋における検証であり、ヒトの通常量のコーヒー摂取において同様の現象が生じるかは現時点では不明である。しかし、本論文の成果は、ヒトにおける今後の検証の基礎となる学術的意義の高いものであり、人間・環境学研究科 認知・行動科学講座 身体機能論分野の研究として高く評価できる。

よって、本論文は博士(人間・環境学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降