

## 【奨励賞トピックス】

# ミトコンドリア調節能からみた りんごプロシアニジンの生理作用

増田 功<sup>1) 2) 3)</sup>、小池 正人<sup>1) 4)</sup>、中島 翔平<sup>2) 3)</sup>、水谷 由布<sup>2)</sup>、小澤 裕介<sup>1)</sup>

渡辺 憲史<sup>1)</sup>、野尻 英俊<sup>4)</sup>、指原 浩一<sup>2)</sup>、横手 幸太郎<sup>1)</sup>、清水 孝彦<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 千葉大学大学院・医学研究院

<sup>2)</sup> アサヒグループホールディングス株式会社

<sup>3)</sup> アサヒカルピスウェルネス株式会社

<sup>4)</sup> 順天堂東京江東高齢者医療センター

## 序

古来より「1日1個のりんごで医者いらず」ということわざがあるが、りんごの健康機能の全貌については未知な部分が多い。一方「フレンチ・パラドックス」解明で話題になった赤ワイン中のポリフェノール成分であるレスベラトロールの生理作用については、長寿遺伝子の活性化をはじめ、その後の研究が目覚ましい。本稿では、りんごに含まれる主要ポリフェノールであるプロシアニジンについて、またその生理作用や作用機序に焦点を当てる。

キーワード：apple procyanidins, functional mechanism, mitochondria

## 1. りんごポリフェノールについて

「りんご」と聞けば、漠然と身体に良い食材であると感じる人は少なくない。また幼い頃、体調をくずした時に、ほとんどの人が親からりんごを勧められたであろう。はたして本当に、りんごは身体に良い影響を与えるのか。そして、りんごの中のどのような成分が健康の維持・増進に寄与するのだろうか。我が国におけるりんごの疫学研究のひとつに動脈硬化リスクとの関連性調査がある。本調査では、推定エネルギー必要量より摂取エネルギーが少ないまたは脂質比が30%より低い食生活の者において、りんご摂取は動脈硬化に予防的に作用する可能性が示唆されている<sup>[1]</sup>。さらにアメリカ人を対象にした調査では、りんごを多く摂取している者ほど、受診率や薬の処方率が低い傾向にあるとの報告がある<sup>[2]</sup>。このような知見を踏まえれば、やはりりんごはことわざ通りの機能的な食材なのかもしれない。一般的にりんごはビタミンや有機酸、カリウムを比較的多く含むが、先の疫学調査結果やこれから述べる研究論文の内容は、むしろ

ポリフェノールの重要性を物語っている。ポリフェノールとは、光合成により植物体内で生成される色素や苦味成分を指すが、作物や品種により、含まれるポリフェノールの種類とその構成は様々である。一方、りんごに含まれるポリフェノールの大半は、カテキン体が連なった構造を有するプロシアニジンという成分である(図1)。プロシアニジン(Procyanidin)はフラボノイド類に属し、りんご以外にもブドウやカカオに含まれているが、その含有量や分子量構成は大きく異なる。

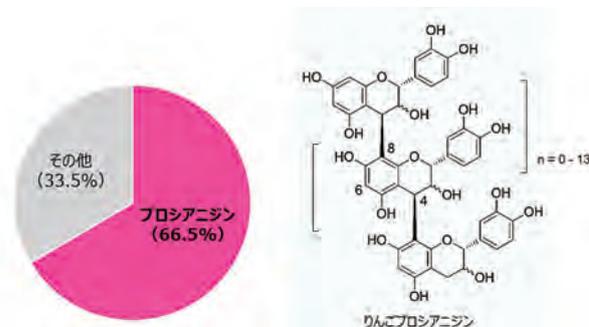


図1. りんごに含まれるポリフェノールについて  
(a) りんごポリフェノールの組成、(b) りんごプロシアニジンの構造

連絡先：増田功 〒260-8670

千葉市中央区亥鼻 1-8-1

TEL：042-769-7824

E-mail：isao.masuda@asahicalpis-w.co.jp

## 2. りんごプロシアニジンの健康機能研究の歴史と明らかになりつつある作用機序

これまでに報告されているプロシアニジンの生理機能は、他のポリフェノールと同様に抗酸化作用<sup>[3]</sup>や抗炎症作用<sup>[4]</sup>があるが、とりわけりんごプロシアニジンに着目してみると抗アレルギー作用、脂質代謝調節作用、寿命延長作用、発毛促進作用、美容作用など多岐にわたっている(表1)<sup>[5-18]</sup>。ここに掲げられている生理作用を見れば、あの「1日1個のりんごで医者いらず」ということわざが、いかに真実に近いと感じられる。

一方りんごプロシアニジンに関する総掲載論文数は、茶カテキンやレスベラトロールと比較すると決して多くなく、またその多くが国内の研究機関によるものであることから、世界的に見ればりんごプロシアニジン研究の歴史は浅いと言わざるを得ない。それは、りんごからポリフェノール成分を得ること、あるいはそこからプロシアニジン成分のみを抽出することに大きな技術的障壁があるためである。そのような状況の中、我々は独自の技術により、りんごからプロシアニジン成分のみを抽出し、分子量あるいは異性体毎に分取・精製することで、表1に示すようなりんごプロシアニジンが持つ非常に特異な生理活性を見出してきた<sup>[20,21]</sup>。ここで多彩な生理機能が報告されているりんごプロシアニジンだが、その作用機序は未知な点が多い。一方升本らは、肥満モデルマウスを用いた試験において、腸管吸収率が極めて低い高分子量プロシアニジンが腸内環境へ及ぼす影響について報告している<sup>[15,21]</sup>。高脂肪高ショ糖食摂取マウスに4量

体以下の低分子量プロシアニジンと5量体以上の高分子量プロシアニジン摂取させた結果、高分子量プロシアニジン摂取群特異的に体重増加抑制作用ならびに腸内代謝産物の変動、さらには腸内 *Akkermansia* 属の増加を認めた。*Akkermansia* 属は腸内に存在するムチン分解菌として有名であるが、近年の研究により肥満や糖尿病との相関性が注目を集めている<sup>[22,23]</sup>。

## 3. りんごプロシアニジンのミトコンドリア新生作用

前項で紹介した高分子量プロシアニジンの腸内環境改善作用に関する報告に対し我々は、血中へ移行する低分子量プロシアニジンにも高分子量のそれとは異なる作用点があるだろうと考え、このたび軟骨細胞を用いた研究によりミトコンドリア新生作用を見出した<sup>[24]</sup>。関節の軟骨変性を伴う運動器疾患として変形性関節症は有名であるが、未だ詳しい発症メカニズムが解明されておらず、内科的治療の開発も遅れている。一方近年の研究により、変形性関節症の発症・増悪は軟骨細胞のミトコンドリア機能の低下と相関することが明らかとなり<sup>[25-28]</sup>、現在、それらをターゲットとした介入研究が期待されている。運動器に対するりんごプロシアニジンの保護効果は現状報告例がほとんどないが、表1に記す研究成果のいくつかは、りんごプロシアニジンが細胞に直接働きかけることを示唆しており、ミトコンドリアに作用していても不思議ではないと考えるに至った。そこで我々はマウス初代軟骨細胞に対し、りんご由来プロシアニジン画分を添加しミトコンドリアマーカーを調べたところ、ミ

表1. りんごプロシアニジンの生理作用に関する研究論文

キーワード	細胞/動物/ヒト	試験デザイン/結果	引用
アレルギー	ヒト	りんごプロシアニジン摂取により、炎症スコア、舌癬化スコア、かゆみスコアが対照群(通常治療)と比較し有意に改善	Kojima et al. (2000) <sup>[5]</sup>
	動物	りんごプロシアニジンはI型アレルギーモデルマウスに対し、濃度依存的に耳の厚化反応を抑制した	Akiyama et al. (2000) <sup>[6]</sup>
	細胞	りんごプロシアニジンはIgEとそのレセプターをリンクすることでマスト細胞の脱顆粒を抑制した	Tokura et al. (2005) <sup>[7]</sup>
	細胞	りんごプロシアニジンC1(3量体)は細胞間シグナリング経路を介してマスト細胞を活性化した	Nakano et al. (2008) <sup>[8]</sup>
寿命	細胞(線虫)	りんごプロシアニジンはsir2を介して線虫の寿命を延長した	Sunagawa et al. (2011) <sup>[9]</sup>
血管	細胞	りんごプロシアニジンは、血管内皮細胞においてNO-cGMP経路を介して血管弛緩作用を示した	Matsui et al. (2009) <sup>[10]</sup>
	細胞	りんごプロシアニジンは、血管内皮細胞においてKLF2発現を上昇させ、エンドセリン合成を抑制することで血管を弛緩させた	Caton et al. (2010) <sup>[11]</sup>
	動物	りんごプロシアニジンオリゴマーは、LOX-1を阻害し、ラット血管への脂質沈着を抑制した	Nishizuka et al. (2011) <sup>[12]</sup>
脂質	細胞	りんごプロシアニジンは、脂肪細胞への分化を阻害した	Shoji et al. (2000) <sup>[13]</sup>
	動物	りんごプロシアニジンオリゴマーは、腓リパーゼを阻害し、トリグリセリドの吸収を抑制した	Sugiyama et al. (2007) <sup>[14]</sup>
	動物	りんごプロシアニジンは、腸内フローラに影響を及ぼし、抗肥満作用を示した	Masumoto et al. (2016) <sup>[15]</sup>
アルツハイマー	細胞	りんごプロシアニジンは、アミロイドβの凝集を抑制した	Toda et al. (2011) <sup>[16]</sup>
発毛	動物	りんごプロシアニジンB体(2量体)はマウスにおいて、ミノキシジルと同程度の発毛促進作用を示した	Takahashi et al. (1998) <sup>[17]</sup>
美容	細胞	プロシアニジンの3量-5量体はメラニン生成を抑制した	Shoji et al. (2005) <sup>[18]</sup>

トコンドリア転写調節因子として知られる PGC-1 $\alpha$  の遺伝子発現量ならびにミトコンドリア DNA コピー数の著しい増加 (図 2 (a))、さらにはミトコンドリア脱水素酵素活性の増加を認めた。また主要軟骨基質であるプロテオグリカンの産生能評価においては、単量体であるエピカテキンとの活性比較により、プロシアニジン構造特異的な促進作用が明らかとなった。さらに、軟骨細胞のミトコンドリア機能低下により再現される変形性膝関節症モデルマウス (Sod2 欠損型) において、りんごプロシアニジン経口摂取群では膝関節軟骨変性病態が抑制された (図 2 (b))。これにより、りんごプロシアニジンのミトコンドリアを介した作用機序、また「関節」という新たな健康領域での生理作用が明らかとなった。

### 終わりに

長きにわたりその健康機能が注目されてきたりんごの作用機序は、「腸内細菌」や「ミトコンドリア」という切り口から、今日、分子レベルで解明されつつある。とりわけミトコンドリア調節作用の観点から見れば、非侵襲療法の開発が遅れている変形性膝関節症のような疾患に留まらず、ミトコンドリアが重要な働きを担う多くの疾病に対しても、一般食材であるりんごに秘められた可能性を提示できるものと確信している<sup>[29,30]</sup>。

### 参考文献

1. Tokuda, I., Takahashi I., Totsuka M. *et al.* Influence of dietary habits on the association between apple consumption and atherosclerosis risk in general population. *JPFNI*, **25**, 1 (2015).
2. Davis, M. A., Bynum, J. P. & Sirovich, B. E. Association between apple consumption and physician visits: appealing the conventional wisdom that an apple a day keeps the doctor away. *JAMA Intern. Med.* **175**, 777-783 (2015).
3. Packer, L., Rimbach, G. & Virgili, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 704-724 (1999).
4. Mackenzie, G. G., Delfino, J. M., Keen, C. L. *et al.* Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-kappaB-DNA binding. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 1252-1262 (2009).
5. Kojima, T., Akiyama, H., Sasai, M. *et al.* Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. *Allergology International* **49**, 69-73 (2000).
6. Akiyama, H., Sakushima, J., Taniuchi, S. *et al.* Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1370-1373 (2000).
7. Tokura, T., Nakano, N., Ito, T. *et al.* Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcepsilonRI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1974-1977 (2005).
8. Nakano, N., Nishiyama, C., Tokura, T. *et al.* Procyanidin C1 from apple extracts inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **147**, 213-221 (2008).
9. Sunagawa, T., Shimizu, T., Kanda, T. *et al.* Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.)

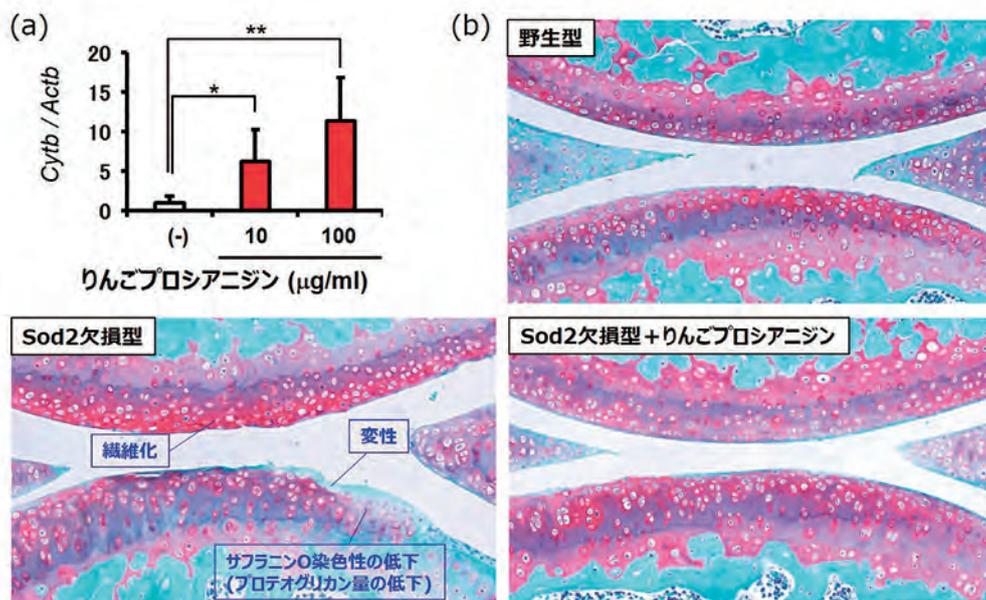


図 2. ミトコンドリアに対するりんごプロシアニジンの作用  
(a) マウス初代培養軟骨細胞におけるミトコンドリア DNA コピー数、(b) 機械的負荷条件下での 16 週齢マウス膝関節軟骨切片のサフラニン O 染色像

- extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* **77**, 122-127 (2011) .
10. Matsui, T., Korematsu, S., Byun, E. B. *et al.* Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K<sup>+</sup> channel activations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2246-2251 (2009) .
  11. Caton, P. W., Pothecary, M. R., Lees, D. M. *et al.* Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4008-4013 (2010) .
  12. Nishizuka, T., Fujita, Y., Sato, Y. *et al.* Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **87**, 104-113 (2011) .
  13. Shoji, T., Kobori, M., Shinmoto, H. *et al.* Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes. *Food Sci. Technol Res.*, **6**, 119-121 (2000) .
  14. Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T. *et al.* Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4604-4609 (2007) .
  15. Masumoto, S., Terao, A., Yamamoto, Y. *et al.* Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Sci. Rep.* **6**, 31208 (2016) .
  16. Toda, T., Sunagawa, T., Kanda, T. *et al.* Apple Procyanidins Suppress Amyloid beta-Protein Aggregation. *Biochem. Res. Int.* **2011**, 784698 (2011) .
  17. Takahashi, T., Kamiya, T., Hasegawa, A. *et al.* Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells in vitro and activate hair follicle growth in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 310-316 (1999) .
  18. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N. *et al.* Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6105-6111 (2005) .
  19. Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T. *et al.* Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3806-3813 (2003) .
  20. Nakashima, S., Oda, C., Masuda, S. *et al.* Isolation and structure elucidation of tetrameric procyanidins from unripe apples (*Malus pumila* cv. Fuji) by NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **83**, 144-152 (2012) .
  21. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N. *et al.* Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 884-892 (2006) .
  22. Cani, P. D., Everard, A., [Akkermansia muciniphila: a novel target controlling obesity, type 2 diabetes and inflammation?]. *Med. Sci. (Paris)* , **30**, 125-127 (2014) .
  23. Yassour, M., Lim M. Y., Yun, H. S. *et al.* Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med.* **8**, 17-016-0271-6 (2016) .
  24. Masuda, I., Koike M., Nakashima, S. *et al.* Apple procyanidins promote mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. *Sci. Rep.* **8**, 7229-018-25348-1 (2018) .
  25. Aigner, T., Fundel, K., Saas, J. *et al.* Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 3533-3544 (2006) .
  26. Ruiz-Romero, C., Calamia, V., Mateos, J. *et al.* Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 172-189 (2009) .
  27. Scott, J. L., Gabrielides, C., Davidson, R. K. *et al.* Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1502-1510 (2010) .
  28. Koike, M., Nojiri, H., Ozawa, Y. *et al.* Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci. Rep.* **5**, 11722 (2015) .
  29. Wang, Y., Zhao, X., Lotz, M. *et al.* Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2141-2153 (2015) .
  30. Reddy, P. H. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis.* **40**, 245-256 (2014) .