

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：37303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06805

研究課題名(和文)カルボキシル基を有する天然化合物による活性型グレリン産生抑制効果の検討

研究課題名(英文) Inhibitory effect of natural compounds with carboxylic group on active ghrelin production

研究代表者

中島 健輔 (Nakajima, Kensuke)

長崎国際大学・薬学部・助手

研究者番号：90762162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、摂食亢進作用を有する活性型グレリンの産生を抑制する物質の探索を行った。その結果、カルボキシル基を有するトリテルペン類(アシアチン酸、グリチルレチン酸、オレアノール酸)およびエピガロカテキン没食子酸(EGCG)がグレリン産生細胞AGS-GHRL8の活性型グレリン産生を抑制することが明らかとなった。また、オレアノール酸およびEGCGはマウス血漿中活性型グレリン濃度を低下させることも明らかとなった。本研究で見出したトリテルペン類およびEGCGは、活性型グレリン産生抑制を機序とする肥満の予防・改善薬の開発に有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)：We screened for compounds with inhibitory effect on the production of active ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. We found that triterpenes with carboxylic group, such as asiatic acid, oleanolic acid and glycyrrhetic acid as well as epigallocatechin gallate (EGCG) suppressed active ghrelin production in the ghrelin-expressing cell line, AGS-GHRL8. Furthermore, oleanolic acid and EGCG decreased the plasma level of active ghrelin in mice. These triterpenes and EGCG are useful for the development of agents for prevention and treatment of obesity by suppressing active ghrelin production.

研究分野：医療薬学

キーワード：活性型グレリン 抗肥満 トリテルペン類 カルボキシル基 EGCG

1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病、脂質異常症および高血圧などの生活習慣病に加え、がんを含む様々な疾患の原因にもなるため、その対策が急がれている。

グレリンは 28 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、3 位セリン残基にオクタノイル基が結合したオクタノイルグレリン(活性型グレリン)は摂食亢進作用を示すことが知られている。このことから、活性型グレリン産生抑制物質の探索は、摂食行動を抑制する新規の抗肥満薬の開発につながると考えられる。

我々は、グレリン強制発現細胞(AGS-GHRL8)を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索実験系を構築している。この実験系を用いて、現在までにオレイン酸、リノレン酸、ステアリン酸などの脂肪酸およびウルソール酸、コロソリン酸などのトリテルペン類が活性型グレリンの産生を抑制することを明らかにしている。

活性型グレリンは、主に胃の X/A-like 細胞内にて、ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) による 3 位セリン残基のオクタノイル化の後、プロホルモン転換酵素(furin、PC1/3、PC2) による C 末端の切断を経て生成される。GOAT の基質となるオクタノイル CoA の生成には、オクタノ酸のカルボキシル基が必要であること、および現在までに我々が見出した上記の物質がいずれもカルボキシル基を有していたことから、カルボキシル基を有する物質は、活性型グレリンの産生を抑制する可能性が高いと考えられた。そこで、ウルソール酸のカルボキシル基が水酸基に置き換わったウバオールの AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生への影響を調べたところ、ウバオールは AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生を抑制したが、その効果はウルソール酸に比して著しく低かった。この結果から、活性型グレリン産生抑制作用へのカルボキシル基の関与が示唆された。以上の背景から、本研究では、カルボキシル基を有する天然化合物を中心に活性型グレリン産生抑制物質を探索することとした。

2. 研究の目的

本研究では、AGS-GHRL8 細胞を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索、探索により見出された物質のマウスにおける抗肥満効果の検討、活性型グレリン産生に関与するタンパクの mRNA 発現量変化の検討、を行い、肥満の予防および改善薬の開発に寄与する物質を見出すことを目的とした。探索の対象は、主にカルボキシル基を有する天然化合物とした。

3. 研究の方法

(1) AGS-GHRL8 細胞を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索

AGS-GHRL8 細胞は、オクタノ酸存在下で

活性型グレリンを産生する特徴を有している。オクタノ酸のみを添加した培地およびオクタノ酸と同時に被験物質を添加した培地で AGS-GHRL8 細胞を 24 時間培養後、それぞれの培地を回収した。その後、培地中の活性型グレリン濃度を ELISA により測定し、両者を比較することによって、被験物質の活性型グレリン産生抑制効果を評価した(図 1)。

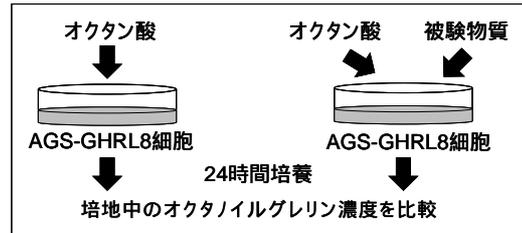


図1 AGS-GHRL8細胞を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索実験系

(2) マウス血漿中活性型グレリン濃度、体重および摂食量に及ぼす被験物質の影響

AGS-GHRL8 細胞にて活性型グレリン産生抑制効果を示した物質を一定期間マウスに経口投与し、体重および摂食量の変化を調べ、さらに最終投与後、6 時間の絶食を行い、血液および胃を採取した。採取した血液から遠心分離により血漿を得、活性型グレリン濃度を ELISA キットにより測定した。採取した胃は RNAlater Solution 内に浸漬し、mRNA 発現量の測定まで - 80 で保存した。

(3) 活性型グレリン産生に関与するタンパクの mRNA 発現量に及ぼす被験物質の影響

被験物質存在下、AGS-GHRL8 細胞を 24 時間培養し、トリゾール試薬にて、RNA を抽出した。その後、逆転写により得た cDNA を用いて、リアルタイム PCR を行い、GOAT および furin の mRNA 発現量を測定した。マウス胃も同様に RNA を抽出し逆転写を行った後、グレリン、GOAT、furin、PC1/3 および PC2 の mRNA 発現量を測定した。

本課題の動物に係る実験は、長崎国際大学薬学部研究等倫理委員会の承認を得(承認番号: 第 123-2 号)、長崎国際大学薬学部動物実験指針に基づき行った。

4. 研究成果

本研究では、AGS-GHRL8 細胞を用いて、カルボキシル基を有するトリテルペン類(アシアチン酸、オレアノール酸、グリチルレチン酸)および代表的な緑茶カテキンであるエピガロカテキン没食子酸(EGCG)の活性型グレリン産生抑制作用を明らかにした。以下にそれぞれの研究成果を示す。

(1) トリテルペン類

AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生に及ぼすトリテルペン類の影響

カルボキシル基を有するアシアチン酸、オ

レアノール酸、グリチルレチン酸およびベツリン酸について、細胞生存率に影響を及ぼさない濃度にて検討を行ったところ、アシアチン酸、オレアノール酸およびグリチルレチン酸は有意に活性型グレリン産生を抑制した。(図2)

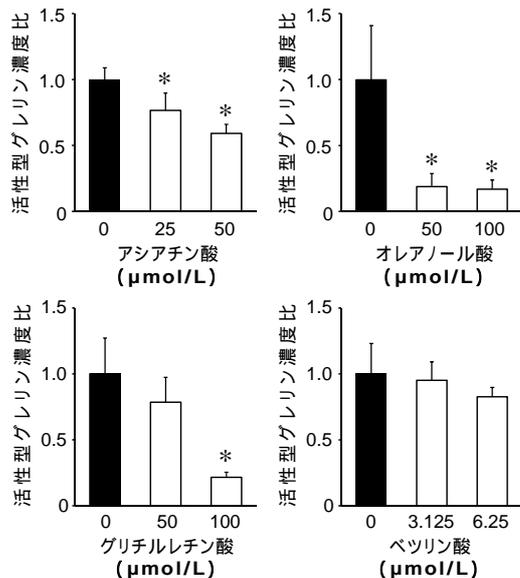


図2 AGS-GHRL8細胞の活性型グレリン濃度に及ぼすトリテルペン類の影響
*P<0.01 vs コントロール (n=6)

続いて、トリテルペン類の活性型グレリン産生抑制作用におけるカルボキシル基の関与について検討した。AGS-GHRL8細胞の活性型グレリン産生に及ぼすオレアノール酸の影響をオレアノール酸のカルボキシル基がメチル基に置き換わったβ-アミリンのそれと比較したところ、6.25μmol/L オレアノール酸は活性型グレリン産生抑制作用を示したが、同濃度のβ-アミリンでは、抑制効果はみられなかった(図3)。

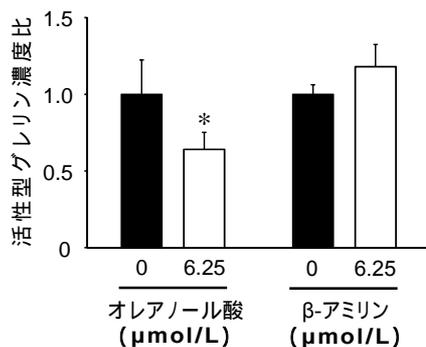


図3 AGS-GHRL8細胞の活性型グレリン濃度に及ぼすカルボキシル基の影響
*P<0.01 vs コントロール (n=6)

ウルソール酸のカルボキシル基が水酸基に置換されたウバオールを用いた以前の検討では、ウルソール酸に比し、ウバオールの活性型グレリン産生抑制作用は著しく弱かった。本研究では、他のトリテルペン類については、カルボキシル基のみが置換された化合物を得ることが困難であったため実施していないが、β-アミリンおよびウバオールの

結果から、カルボキシル基が活性型グレリン産生抑制の機序に關与している可能性が高いと考えられる。

マウス血漿中オクタノイルグレリン濃度および体重に及ぼすトリテルペン類の影響

オレアノール酸(20または40mg/kg)をマウスに1週間経口投与したところ、血漿中活性型グレリン濃度は有意に低く、体重増加量は有意に少なかった(図4)。このことから、オレアノール酸は活性型グレリン産生抑制を機序とする抗肥満薬になりうる可能性が示唆された。

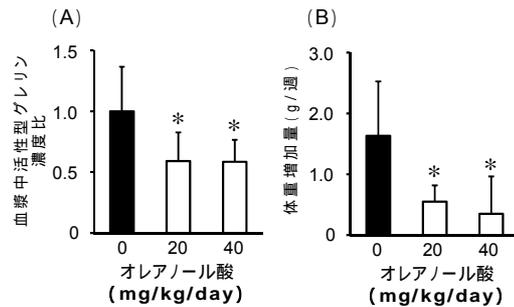


図4 血漿中活性型グレリン濃度(A)および体重(B)に及ぼすオレアノール酸の影響
*P<0.05 vs コントロール (n=6)

AGS-GHRL8細胞のGOATおよびfurinのmRNA発現に及ぼすトリテルペン類の影響

ウルソール酸およびコロソリン酸を含めたトリテルペン類のAGS-GHRL8細胞のGOATおよびfurinのmRNA発現量への影響を検討した結果、全てのトリテルペン類において、mRNA発現の有意な低下はみられず、トリテルペン類の活性型グレリン産生抑制機序にGOATおよびfurinのmRNA発現低下は關与しないことが示唆された(図5)。

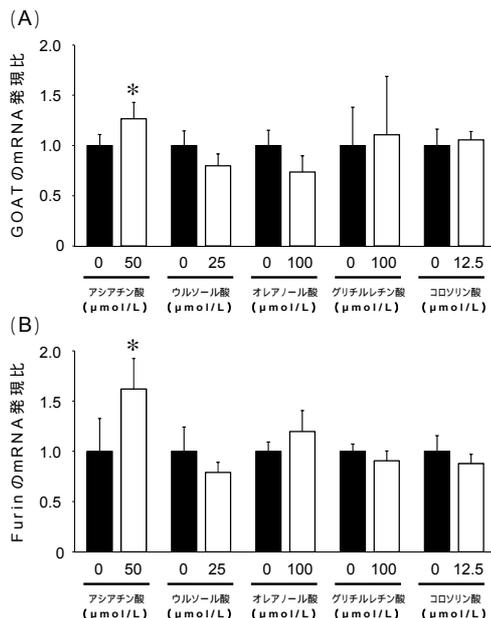


図5 AGS-GHRL8細胞のGOAT(A)およびfurin(B)のmRNA発現に及ぼすトリテルペン類の影響
*P<0.01 vs コントロール (n=4)

(2) EGCG

AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生に及ぼす EGCG の影響

細胞生存率に影響を及ぼさなかった濃度 (50 または 100 $\mu\text{mol/L}$) の EGCG を用い、検討を行ったところ、100 $\mu\text{mol/L}$ の EGCG は、AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生を抑制した (図 6)。

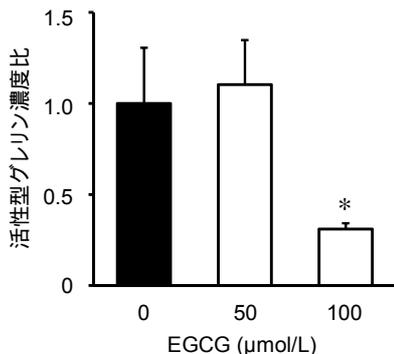


図6 AGS-GHRL8細胞の活性型グレリン産生に及ぼす EGCGの影響 * $P < 0.05$ vs コントロール (n=6)

マウス血漿中オクタノイルグレリン濃度に及ぼす EGCG の影響

EGCG を 94%以上含有する TEAVIGO[®] を 1 回 100mg/kg にて 1 日 3 回、3 日間経口投与し、血漿中活性型グレリン濃度を測定した結果、TEAVIGO[®] 投与群の血漿中活性型グレリン濃度が有意に低かった (図 7)。このことから EGCG はマウス血漿中活性型グレリン濃度を低下させる作用を有するものと考えられた。

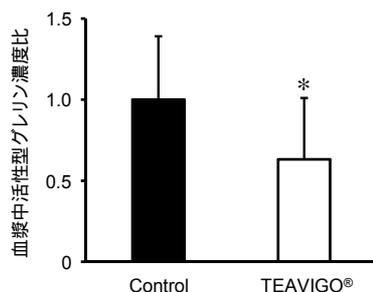


図7 マウス血漿中活性型グレリン産生に及ぼす TEAVIGO[®]の影響 * $P < 0.05$ vs コントロール (n=10)

AGS-GHRL8 細胞およびマウス胃のグレリン、GOAT、furin、PC1/3 および PC2 の mRNA 発現に及ぼす EGCG の影響

EGCG の存在下、24 時間培養した AGS-GHRL8 細胞の GOAT および furin の mRNA 発現量および TEAVIGO[®] を投与したマウス胃のグレリン、GOAT、furin、PC1/3 および PC2 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて測定した。AGS-GHRL8 細胞では、GOAT および furin とともに有意な変化は認められなかった (図 8)。一方、マウス胃では、GOAT および furin の有意な発現変化は認められなかったものの、グレリンおよび PC1/3 の mRNA 発現に有意な低下が認められた (図 9)。これらの結果よりマウス血漿中活性型グレリン濃度低下作用にグレリンおよび PC1/3 の

mRNA 発現量の低下が関与している可能性が示唆された。

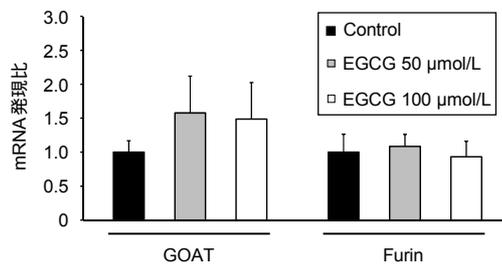


図8 AGS-GHRL8細胞のGOATおよびfurinのmRNA発現に及ぼすEGCGの影響 (n=4)

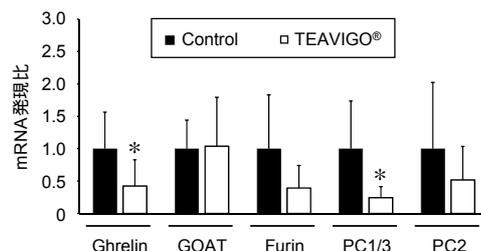


図9 マウス胃のグレリン、GOAT、furin、PC1/3およびPC2のmRNA発現に及ぼすEGCGの影響 * $P < 0.05$ vs コントロール (n=8~10)

本研究では、カルボキシル基を有するトリテルペン類であるアシアチン酸、オレアノール酸、グリチルレチン酸ならびに EGCG の *in vitro* における活性型グレリン産生抑制作用を明らかにした。また、オレアノール酸および EGCG のマウス血漿中活性型グレリン濃度低下作用も明らかにした。本研究の成果は、これらの物質を利用した活性型グレリンの産生抑制作用を機序とする新規抗肥満薬開発の足がかりになるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計4件)

Uto T, Tung HN, Nakajima K, Ohta T, Oiso S, Kariyazono H, and Shoyama Y. Bioactivities of Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl. Leaf and Its Triterpenes. Journal of Pharmacognosy & Natural Products 2017, 3:1 DOI: 10.4172/2472-0992.1000134. 査読有

Nakajima K, Oiso S, Uto T, Morinaga O, Shoyama Y and Kariyazono H. Triterpenes suppress octanoylated ghrelin production in ghrelin-expressing human gastric carcinoma cells. Biomedical Research (Tokyo, Japan) 37, 343-349, 2016. doi: 10.2220/biomedres.37.343. 査読有

仮屋 蘭 博子、大磯 茂、中島 健輔、グレリン分泌抑制成分探索のための細胞評価系の構築と成分探索、Foods and Food Ingredients Journal of Japan、221、88-93、2016 査読無

http://www.saneigenffi.co.jp/ffi/2016_221_2.html

Oiso S, Nobe M, Iwasaki S, Nii W, Goto N, Seki Y, Nakajima K, Nakamura K, Kariyazono H. Inhibitory Effect of Oleic Acid on Octanoylated Ghrelin Production. Journal of Oleo Science 64, 1185-1192, 2015. doi: 10.5650/jos.ess15137. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

中島 健輔、大磯 茂、仮屋園 博子、エピガロカテキン没食子酸のオクタノイルグレリン産生抑制効果とその抑制機序の検討、日本薬学会第137年会、2017年3月24日~27日、仙台

中島 健輔、大磯 茂、宇都 拓洋、森永 紀、正山 征洋、仮屋園 博子、マウス血漿中オクタノイルグレリン濃度に基づきエピガロカテキン没食子酸およびグリチルリチン酸の影響、第33回日本薬学会九州支部大会、2016年、12月3日~4日、鹿児島

中島 健輔、大磯 茂、宇都 拓洋、森永 紀、正山 征洋、仮屋園 博子、活性型グレリン産生抑制作用を有する天然化合物の探索、平成28年度物理化学インターカレッジセミナー兼日本油化学会界面科学部会九州地区講演会、2016年11月26日~27日、福岡

中島 健輔、大磯 茂、宇都 拓洋、森永 紀、正山 征洋、仮屋園 博子、活性型グレリン産生抑制作用を有する天然化合物の探索、第32回日本薬学会九州支部大会、2015年、11月28日~29日、延岡

〔その他〕

受賞等

平成28年度物理化学インターカレッジセミナー兼日本油化学会界面科学部会九州地区講演会 優秀口頭発表賞、活性型グレリン産生抑制作用を有する天然化合物の探索、2016年11月26日~27日

ホームページ等

長崎国際大学

<http://www.niu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 健輔 (NAKAJIMA Kensuke)

長崎国際大学・薬学部・助手

研究者番号：90762162