

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580176

研究課題名(和文)生活習慣病予防・改善に向けた食品因子による腸管上皮単糖トランスポーターの制御解析

研究課題名(英文)Regulation of intestinal epithelial glucose transporter by food factors to prevent or improve metabolic syndrome

研究代表者

薩 秀夫 (SATSU, HIDEO)

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：80323484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖質過剰摂取に起因する疾患予防を目的とし、腸管での単糖吸収を抑制する食品成分の解析を進めた。腸管上皮細胞でのグルコースの吸収を担うグルコーストランスポーターであるSGLT1、フルクトースの吸収を担うGLUT5を阻害するフィトケミカルをそれぞれ探索した結果、柑橘類に含まれるタンジェレチン、緑茶に含まれるエピカテキンガレートなどがSGLT1活性およびGLUT5活性を阻害することを見出した。さらにマウスを用いて糖負荷試験をおこなったところ、タンジェレチンはマウス血糖値の増加を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the food substances that inhibit intestinal monosaccharide absorption to prevent the diseases caused by excessive carbohydrates. We searched for phytochemicals that inhibit glucose transporter SGLT1, responsible for glucose absorption, and also GLUT5, responsible for fructose absorption. We found that tangeretin contained in citrus fruits and epicatechin gallate contained in green tea inhibited SGLT1 and GLUT5 activity. Oral glucose tolerance test using mice showed that tangeretin significantly suppressed the increase in mouse blood glucose level.

研究分野：食品機能学

キーワード：トランスポーター 腸管上皮細胞 フィトケミカル 生活習慣病 糖質

### 1. 研究開始当初の背景

腸管の最前線に位置する腸管上皮細胞は、(1) 栄養素をはじめとする食品成分の吸収機能、(2) 生体異物の体内への侵入を阻止するバリアー機能、(3) 外来刺激を受容して生体内へ伝達するシグナル変換機能、など生体にとって極めて重要な働きをしている。一方で、腸管上皮細胞は食品成分によって最も高濃度かつ高頻度に曝される環境にあることから、上記腸管上皮細胞機能が様々な食品成分によって制御・調節を受けることは十分に考えられる。

一方近年食生活の変化により、生活習慣病およびその複合した病態であるメタボリックシンドロームの増加が大きな社会的関心事となっているのは周知の事実である。特に飽食・過食の時代と言われて久しく、過剰な栄養素・エネルギーの摂取とそれに伴う肥満、メタボリックシンドロームに対する対策、特にその予防は国民的・社会的に大きな関心事となっている。中でも糖尿病は自己免疫疾患である I 型と II 型があるが、生活習慣に起因するのは II 型糖尿病であり、II 型ではインスリンを分泌する能力が低下してしまい慢性的に高血糖が続くようになり、糖尿病を引き起こす。また糖尿病が進行すると動脈硬化を進展させ心筋梗塞や脳卒中を引き起こすことも知られている。糖尿病をはじめとする生活習慣病の増加の一因としては糖質の過剰摂取が挙げられるが、中でもグルコース(ブドウ糖)およびフルクトース(果糖)の過剰摂取が近年注目されつつある。具体的には清涼飲料水などの原料にフルクトースが高含有された高果糖コーンシロップが使われており、清涼飲料水の摂取量の急激な増加が近年の生活習慣病増加や肥満、特に子供の肥満増加の一因ともされている。これらの背景から、近年では糖質を 0 あるいは低減化した飲料・食品が開発・市販されているが、これらは呈味性などへの影響もあり、単に糖質を食品から除くだけでなく別の技術的な解決策が必要である。糖質は消化管内の糖質分解酵素によって単糖にまで分解され、グルコースは主にナトリウム共輸送型のグルコーストランスポーター (SGLT1; SLC5A1)、フルクトースは促進拡散型のグルコーストランスポーター 5 (GLUT5; SLC2A5) によってそれぞれ吸収される。従ってこれらのトランスポーター活性を抑制することで過剰な糖質(単糖)の吸収をより根本的に抑制できると考えられるが、グルコース及びフルクトースの吸収を直接的に担う SGLT1 および GLUT5 に対する食品成分の作用研究例はほとんど知られていないのが現状である。

そこで本研究では、生活習慣病の予防・改善を目的に腸管上皮に発現するグルコースおよびフルクトーストランスポーター (SGLT1/GLUT5) に着目し、これらを抑制する食品成分の探索・解析を進めることとした。

### 2. 研究の目的

上記のような背景をふまえて本研究では、以下の具体的な目的を持って進めることとした。

(1) 腸管上皮モデル培養細胞株あるいは SGLT1/GLUT5 高発現株を作成・用いて、グルコース・フルクトース取込活性評価系を構築し、様々な食品素材の中からこれら単糖トランスポーターの取込活性を抑制する食品因子をスクリーニングする。

(2) 見出されたトランスポーター抑制食品因子の阻害メカニズムを、細胞レベルで詳細に解析するとともに、その抑制作用が *in vivo* でもみられるかどうか実験モデル動物を用いて検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト SGLT1 安定高発現 CHO 細胞株の構築

ヒト SGLT1 をクローニングして哺乳細胞用発現ベクターを構築した。ヒト SGLT1 発現ベクターを CHO-K1 細胞に遺伝子導入したのち抗生物質による選択をおこない、さらに限界希釈法によってシングルクローンを獲得した。その中で最もナトリウム依存的グルコース取込活性の高いクローンを単離した。

(2) グルコース取込活性の測定

SGLT1 高発現 CHO 細胞を 24 穴プレートに培養した。翌日細胞から培地を除き PBS で洗浄した後、グルコースフリーの HBSS でインキュベートした。グルコースフリー HBSS を除き、トリチウム標識したグルコースを含んだグルコースフリー HBSS を加えて 37 °C で 30 分間インキュベートした。その後氷冷した 0.05% アジ化ナトリウム入り PBS で洗浄した後、0.1% Triton-X で細胞を可溶化し、そこに含まれるトリチウム量を液体シンチレーションカウンターで測定することで細胞内に取り込まれたグルコース量とした。

(3) マウスを用いた経口糖負荷試験

ICR マウス(雄、6 週齢)を用いることとし、1 週間予備飼育した後に 18 時間絶食させた。グルコース (1 g/kg BW) と 0.3% カルボキシメチルセルロースに溶解させたフィトケミカルを、ゾンデを用いて経口投与させた。投与後、0、30、60、120 分後に眼窩静脈叢より採血し、グルコーステストキットを用いて血中グルコース濃度を測定することで血糖値を算出した。

(4) ヒト GLUT5 安定高発現 CHO 細胞株の構築

ヒト GLUT5 をクローニングして哺乳細胞用発現ベクターを構築した。以降は(1)と同様にシングルクローンを選び、その中で最もフルクトース取込活性の高いクローンを単離した。

(5) フルクトース取込活性の測定

腸管上皮モデル Caco-2 細胞を 24 穴プレート上に 2 週間培養し、小腸上皮様に分化させ

たものを用いた。また(4)で構築したヒト GLUT5 安定高発現 CHO 細胞株の場合には 24 穴プレートに継代して 2 日後の細胞を用いた。フルクトース取込活性の測定法については、トリチウム標識したフルクトースを用いる点以外は、基本的に(2)のグルコース取込活性測定法と同様におこなった。

#### 4. 研究成果

(1)腸管上皮グルコーストランスポーター SGLT1 評価系の構築および SGLT1 を制御する食品成分の解析

ヒト SGLT1 をクローニングし発現ベクターを構築した。構築したベクターを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し抗生物質で選択をおこなった後、限界希釈法によってシングルクローンを単離した。単離したクローンについて、ナトリウム依存的グルコース取込活性の最も高いクローンを選択した。選択したクローンではヒト SGLT1 の mRNA 発現が RT-PCR 法により確認され、またそのグルコース取込活性は SGLT1 阻害剤であるフロリジンによって強く阻害されたことから、選択したクローンでは SGLT1 が発現・機能していることが確認された。

構築したヒト SGLT1 高発現株を用いて、SGLT1 を介したグルコース取込活性を阻害するフィトケミカルを探索した。約 60 種類のフィトケミカル類について検討した結果、柑橘類に含まれるタンジェレチン(図 1)、緑茶に含まれるエピカテキンガレート(EGg)(図 2)およびショウガ科植物に含まれるカルダモンが高い阻害活性を有していることを見出した(図 3)。

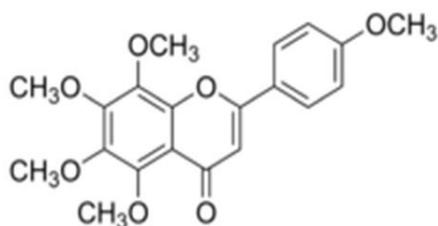


図 1 タンジェレチンの化学構造

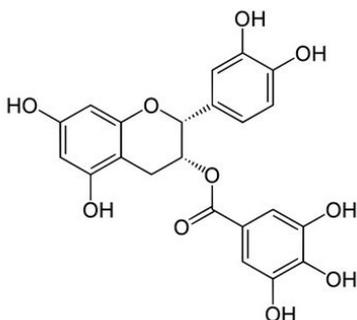


図 2 エピカテキンガレート(EGg)の化学構造

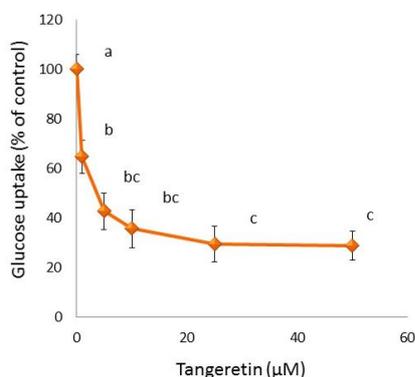


図 3 SGLT1 高発現 CHO 細胞におけるグルコース取込活性にタンジェレチンが与える影響

(Each value represents mean  $\pm$  SE (n=3); a,b,c Turkey's test (p<0.05) 異符号間に有意差有り)

また、見出された 3 種のフィトケミカルがグルコース以外の栄養素の吸収に関わるトランスポーターに与える影響を検討したところ、タンジェレチンと ECg はフルクトースの取込を阻害するものの、アミノ酸(ロイシン・グルタミン酸)およびジペプチド(グリシルサルコシン)の取込には影響を及ぼさず、単糖のトランスポーターに特異的であることが示唆された。またカルダモンは、アミノ酸・ペプチドに加えてフルクトースの取込も阻害せず、グルコースのトランスポーターに特異的であることが示唆された。

さらに、タンジェレチンやカルダモンがグルコースの腸管吸収に与える影響を *in vivo* で検討することとし、ICR マウスを用いて経口糖負荷試験をおこなった。体重 1 kg あたり 250 mg もしくは 400 mg のタンジェレチンおよびカルダモンをグルコースと同時に投与し、継時的に血漿中のグルコース濃度を測定した。その結果、タンジェレチンおよびカルダモンの投与によって血糖値上昇が有意に抑制され、血糖上昇面積(AUC)の有意な減少が認められた。

以上より、タンジェレチンおよびカルダモンは腸管における SGLT1 活性を阻害することで血糖値の上昇を抑制することが示唆された。これらの知見はグルコースの過剰摂取や食後の急激な血糖値上昇を一因とする疾患の予防につながることを期待される。

(2)腸管上皮フルクトーストランスポーター GLUT5 を制御する食品成分の解析

腸管上皮モデル Caco-2 細胞におけるフルクトース取込活性を制御するフィトケミカルを探索した。約 40 種類のフィトケミカルについて検討した結果、ノビレチン、タンジェレチン(図 1)およびエピカテキンガレート(EGg)(図 2)が高いフルクトース取込阻害活性を有していることを見出された(図 4)。また ECg の構造類似体がフルクトース取込活性に与える影響を調べた結果、カテキンガ

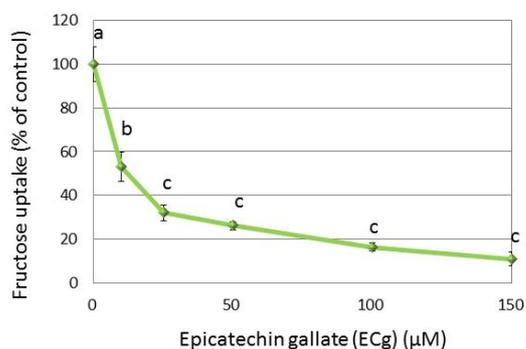


図 4 腸管上皮モデル Caco-2 細胞におけるフルクトース取込活性にエピカテキンガレート (ECg) が与える影響

( Each value represents mean  $\pm$  SE (n=3), ; a,b,c Turkey 's test (p<0.01) 異符号間に有意差有り )

レートでは ECg と同程度の阻害活性がみられたものの、様々な生理活性が報告されているエピガロカテキンガレートなどその他のカテキン類では阻害活性がみられず、ECg およびカテキンガレートの特異性が高いことが示された。次に、フルクトースがノビレチンおよび ECg の腸管上皮モデル透過に及ぼす影響を検討したところ、フルクトースはいずれのフィトケミカルの腸管上皮透過に対しても影響を与えなかった。これよりフルクトースとノビレチンおよび ECg は物理的に直接結合せず、ノビレチンおよび ECg によるフルクトース取込阻害はフルクトースとの直接結合ではなく細胞を介していることが示唆された。また Caco-2 細胞におけるフルクトース取込活性の Kinetics を解析した結果、ノビレチンおよび ECg はフルクトース取込活性の Km 値には大きな変化を与えないものの Vm 値を大きく減少させることが示されたことから、親和性には影響せず、みかけのトランスポーター数に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに Caco-2 細胞を透過性膜上に培養し、フルクトース透過量に対するノビレチンおよび ECg の影響を検討した結果、ノビレチンおよび ECg はいずれも濃度依存的にフルクトースの基底膜側への透過を阻害することが見出され、ノビレチンおよび ECg は腸管上皮モデル Caco-2 細胞層におけるフルクトース吸収・透過を抑制することが示された。

並行して、ヒト GLUT5 発現ベクターを構築し SGLT1 と同様に安定な GLUT5 高発現 CHO 細胞株を構築した。GLUT5 高発現株においてもノビレチンおよび ECg は濃度依存的に GLUT5 を介したフルクトース取込活性を阻害することが確認された。さらに新たにおよそ 20 種類のフィトケミカルについてフルクトース取込活性に与える影響を GLUT5 高発現株を用いて検討したところ、ホップに含まれるキサントフモールなど新たに 3 種のフィトケミカルが GLUT5 活性を阻害することを見出した。特にキサントフモールは

SGLT1 活性を阻害しなかったことから、GLUT5 選択的に阻害することが示唆された。

以上本研究より、ノビレチンなどいくつかのフィトケミカルは GLUT5 を介した腸管上皮フルクトース吸収を抑制することが示唆された。これらの結果は、フルクトースの過剰摂取に起因する疾患の予防・改善につながることを期待される。

## 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 7 件 )

薩 秀夫、腸管上皮トランスポーターと機能性食品成分の相互作用、日本ビタミン学会誌「ビタミン」( Vitamins(Japan) ), 89(5/6), 275-279, 査読有 ( 依頼総説 ) .

清水 誠、戸塚 護、薩 秀夫、腸管の機能とポリフェノール、日本ポリフェノール学会誌、印刷中、査読無 ( 依頼総説 ) .

Satsu, H., Yoshida, K., Mikubo, A., Ogiwara, H., Inakuma, T., Shimizu, M., Establishment of a stable aryl hydrocarbon receptor-responsive HepG2 cell line. *Cytotechnology*, in press, 査読有, (DOI 10.1007/s10616-014-9711-6).

Hiura, Y., Satsu, H., Hamada, M., Shimizu, M., Analysis of flavonoids regulating the expression of UGT1A1 via xenobiotic receptors in intestinal epithelial cells. *Biofactors*, 40(3), 336-345 (2014), 査読有, (DOI: 10.1002/biof.1153).

Satsu, H., Schaeffer, M.T., Guerrero, M., Saldana, A., Eberhart, C., Hodder, P., Cayanan, C., Schürer, S., Bhatara, B., Roberts, E., Rosen, H., Brown, S.J., A sphingosine 1-phosphate receptor 2 selective allosteric agonist. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(17), 5373-5382 (2013), 査読有, (DOI: 10.1016/j.bmc.2013.06.012).

Takaishi, N., Satsu, H., Takayanagi, K., Mukai, K. and Shimizu, M. *In vivo* and *in vitro* studies on the absorption characteristics of  $\beta$ -cryptoxanthin in the intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(11), 2124-2128 (2012), 査読有, (DOI:10.1021/jf204625y).

Satsu, H., Chidachi, E., Hiura, Y., Ogiwara, H., Gondo, Y., and Shimizu, M. Induction of NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 expression by cysteine via Nrf2 activation in human intestinal epithelial LS180 cells. *Amino Acids*, 43(4), 1547-1555(2012), 査読有, (DOI: 10.1007/s00726-012-1230-1).

[ 学会発表 ] ( 計 1 6 件 )

Oji, I., Development and analysis of

evaluation system to search for food factors that modulate fructose transporter in intestinal epithelia, 12th Asian Congress of Nutrition 2015 (ACN2015), 2015.5.16, Yokohama (Japan).

薩 秀夫、腸管上皮細胞における機能性ペプチドの吸収およびその生理機能、第二回食品由来ペプチドの機能および応用学術交流会、2015年3月15日、エクシブ鳥羽アネックス(鳥羽)。

薩 秀夫、機能性食品成分のトランスポーター、第66回日本ビタミン学会大会、2014年6月14日、姫路商工会議所(姫路)。大路樹、腸管上皮フルクトーストランスポーターGLUT5を制御する食品成分の解析、第68回日本栄養・食糧学会大会2014年6月1日、酪農学園大学(江別)。嶋中花、ホエイタンパク質酵素分解物による腸管におけるフルクトース吸収抑制の可能性、第68回日本栄養・食糧学会大会2014年5月31日、酪農学園大学(江別)。

柴田諒祐、腸管上皮グルコーストランスポーターSGLT1を制御する食品因子の探索及び解析、日本農芸化学会2014年度大会2014年3月29日、明治大学生田キャンパス(神奈川)。

柴田諒祐、腸管上皮グルコーストランスポーターを制御する食品因子探索評価系の構築及び解析、第18回日本フードファクター学会学術集会(JSoFF2013)、2013年11月9日、東京農業大学(東京)。

薩 秀夫、Interaction between Nutrients/Food Components and Intestinal Epithelial Transporters、第28回日本薬物動態学会大会(JSSX2013)、2013年10月10日、タワーホール船堀(東京)。

柴田諒祐、Na<sup>+</sup>/グルコース共輸送担体1(SGLT1)活性を制御する食品因子探索評価系の構築及び解析、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月26日、名古屋大学(名古屋)。

瀧 壮平、カテキン類が腸管上皮細胞におけるフルクトース吸収活性に及ぼす影響、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、東北大学(仙台)。

薩 秀夫、糖質の腸管吸収調節—食品成分による制御—、第91回日本栄養・食糧学会関東支部大会シンポジウム、2013年2月16日、東京大学中島記念ホール(東京)。

薩 秀夫、腸管における食品因子の吸収及び機能性・安全性に関する細胞生物学的研究(農芸化学奨励賞受賞講演)、日本農芸化学会関東支部2012年度第2回例会、2013年2月9日、茨城大学(茨城)。

Shimizu, M., Regulation of intestinal nutrient transport by food factors, International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2012) 2012.12.2,

Hawaii (USA).

瀧 壮平、腸管上皮フルクトース吸収活性を制御するフィトケミカルの探索および解析、第17回日本フードファクター学会学術集会・第9回日本カテキン学会総会合同大会2012、2012年11月10日、静岡県男女共同参画センター(静岡)。

薩 秀夫、食品因子の腸管吸収とその機能性・安全性に関する分子栄養学的研究(第1回三島海雲学術賞受賞講演)、2012年7月5日、東京會館(東京)。

宮崎 悠、アミノ酸がCaco-2細胞のグルコーストランスポーターに与える影響、第66回日本栄養・食糧学会大会、2012年5月19日、東北大学(仙台)。

#### 〔図書〕(計3件)

薩 秀夫、建帛社、「機能性食品成分の腸管上皮吸収機構およびトランスポーター制御」 in 「食品因子による栄養機能制御」(芦田均、立花宏文、原博責任編集、日本栄養・食糧学会監修)、2015年、144-160(分担執筆)。

薩 秀夫、シーエムシー出版、「タウリン」 in 「アミノ酸科学の最前線 基礎研究を生かした応用戦略」(鳥居邦夫、門脇基二監修)、2014年、220-228(分担執筆)。

薩 秀夫、丸善出版、「機能性食品の作用と安全性百科」(上野川修一、清水俊雄、清水 誠、鈴木英毅、武田英二編)、2012年、pp.183、pp.187、pp.205、pp.213、pp.219、pp.224、pp.227(分担執筆)。

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：フルクトース吸収阻害剤  
発明者：薩秀夫、大路樹、柴田諒輔  
権利者：東大 TLO  
種類：特許  
番号：特許願 2014-086005 号  
出願年月日：平成 26 年 4 月 18 日  
国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

薩 秀夫 (SATSU HIDEO)  
前橋工科大学・工学部・准教授  
研究者番号：80323484

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し