

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580194

研究課題名(和文) 温熱寒涼食品の温度感受性TRP受容体活性化能と体熱産生への影響

研究課題名(英文) Activities of thermosensitive TRP channels of foods having body-warming, body-chilling or cooling nature and effects on body temperature

研究代表者

渡辺 達夫 (Watanabe, Tatsuo)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10210915

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)：human TRPM8、TRPV3、TRPV4を安定的に発現する培養細胞系を樹立した。香辛植物の精油や抽出物30種にて、これらの活性化成分ならびに阻害成分のスクリーニングを行い、TRPM8のアゴニストと、TRPV3・TRPV4のアンタゴニストを含む抽出物等数種を見出したが、いずれも単離には至らなかった。新たなTRPV1・TRPA1アゴニストを複数の香辛植物から見出した。また、ボアカンジンの温度感受性TRP受容体への作用を詳細に調べた。マウスでの給餌試験で、TRPM8とTRPA1アゴニストの効果を調べた。また、無麻酔にてマウスの体表面温度を赤外線サーモグラフィにて測定する実験系を開発した。

研究成果の概要(英文)：We established human embryonic kidney cells stably having human TRPM8, TRPV3, and TRPV4 genes, respectively. Then we searched for agonists or antagonists of TRPM8, TRPV3, and TRPV4 by the use of 30 kinds of essential oils or extracts from spices and herbs and found some active fractions for TRPM8 agonists and TRPV3 and TRPV4 antagonists. Further, we found novel TRPV1 and TRPA1 agonists from some spices and herbs. In addition we clarified effects of voacangine on thremo TRPs in detail. Also, effects of TRPM8 and TRPA1 agonists on visceral fats of high-fat and high-sucrose diets were performed and found that a TRPA1 agonist can reduce visceral fat deposition. Moreover, we established experiment system monitoring skin temperature of mice under awaking conditions by using infrared thermography.

研究分野：食品化学

キーワード：TRP受容体 温度感受性 食品成分

1. 研究開始当初の背景

現在、生活習慣病が大きな問題となっているが、肥満は大きな危険因子である。脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの多くが、動脈硬化やインスリン抵抗性などを誘発するために肥満は生活習慣病の危険因子となると考えられている。

本研究では、主に TRPV1・TRPA1 以外の温度感受性 TRP 受容体を活性化する食品成分の探索を中医学での温熱性食品と寒涼性食品から実施し、それに続いて、動物での添加試験等による抗肥満に対する有用性の解明を目指すものである。

温度感受性 TRP 受容体とエネルギー消費の関係では、TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1) で研究が進んでいる。なかでも最も作用が判明しているのがトウガラシの辛味成分カプサイシンである。トウガラシを食べて体が温くなるのは、カプサイシンによってエネルギー代謝が亢進し、体熱産生が促進されるからである。1997年に、感覚神経に存在するカプサイシン受容体が発見され、カプサイシンの作用標的であることが判明した。即ち、TRPV1は辛みの受容体であった。カプサイシンと結合した TRPV1は陽イオンを非選択的に透過する。その結果、感覚神経が脱分極し、その刺激が中枢神経へと伝達され、交感神経を賦活し、副腎髄質からのアドレナリン分泌を促進する。血中に放出されたアドレナリンは、肝臓や白色脂肪組織からエネルギー基質を誘導し、エネルギー代謝が亢進され、体熱が産生されることが明らかとなっている。驚くべきことに、TRPV1は43以上の熱を感知する温度感受性イオンチャネルであった。その後、続々と温度感受性受容体が発見され、現在では、高温で作動する TRPV2、暖かい温度帯で反応する V3、V4、M2、M4、M5、冷たさを感知すると考えられる A1、M8などが知られている。これらの温度感受性受容体の活性化とエネルギー消費・体温調節の関係は徐々に明らかになりつつある。

エネルギー消費を高める食品成分としてカプサイシンでの研究が先行しているが、高エネルギー食負荷時の抗肥満効果は明らかであるものの、他の TRP アゴニストとの組合せの効果など不明な点が多く残されている。温度感受性 TRP 受容体を活性化する成分による肥満抑制を効果的に実施するためには、新たな温度感受性 TRP 受容体の活性化成分の探索と組合せの効果を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

まず、TRPM8やTRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM4、TRPM5などを活性化する食品成分を解明することを目的とした。これらを探求することで新たな活性化成分を見出す可能性があるだけでなく、西洋の伝承療法として使用させるハーブ類、または東洋の薬膳にお

ける温熱性・寒涼性食品と温度感受性受容体との関係、体温調節について明らかになる可能性があり、民間の伝承療法に対して科学的な根拠を提供できるとも期待される。温度感受性受容体の活性化を指標とした温熱性ならびに寒涼性食品の現代的解明は全く行われておらず、きわめて独創的な研究である。また、指端の血流を増大させる食品や食品成分は、いわゆる「冷え」を改善することが期待される。「冷え」を有していると、QOLは著しく低下し、睡眠の質もさがる。現代のような空調が整って運動不足気味の社会では、「冷え」の改善にたいして大きな需要がある。食することで体を冷やす食品は、柿の抽出物がヒトで皮膚温を低下させるという知見はあるが、化合物も含めて明確に証明されたものはほとんどないが、発見できれば、クーラーの使用を控えても日本の夏期の酷暑を乗り切る一助となろう。

3. 研究の方法

(1) In vitro 試験

human TRPM8、TRPV2、TRPV3、TRPV4を安定的に異所発現した HEK 細胞の樹立を試みた。それぞれの遺伝子を含む市販のプラスミド(すべて Origene SKU)から pcDNA4/TO にインサートを組み込みなおし、リポフェクションにて T-Rex HEK 細胞にトランスフェクトして、抗生物質添加培地にて選抜・単クローン化し、安定発現細胞を得た。

温度感受性 TRP チャネルが活性化すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することから、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fluo-4 AM を細胞に取り込ませ、サンプル投与による蛍光量の変化から、活性を評価した。測定前日に、60 mm シャーレにセミコンフルエントになった細胞を PBS で洗浄後、Trypsin / EDTA 処理によりシャーレ底面から細胞を剥がし、細胞数 4.0×10^4 cell / mL に希釈した。T-REx系の細胞には Tetracycline を培地に加えた。96 well full-area assay plate に $100 \mu\text{L} / \text{well}$ ずつ細胞懸濁液をまき、 CO_2 インキュベーターで 37°C にて 24 時間インキュベートした。測定当日、Fluo-4 AM を細胞に取り込ませた後、FLEXstation II にて化合物および ionomycin 投与後の蛍光量の変化を測定した。Ionomycin 投与で各 well の最大応答が得られ、化合物投与による応答は、最大応答にて規格化した。

human TRPV1 と TRPA1 に影響を及ぼす成分の探索を引き続き実施した。

(2) In vivo 試験

TRPM8 と TRPA1 アゴニストの高エネルギー食負荷マウスへの影響を検討した。肥満を誘発させるために、高脂肪-高シヨ糖食 (HFS 食、エネルギー比：脂質 48%、シヨ糖 25%) を用い、TRPM8 アゴニストとして WS-12、TRPA1 アゴニストとして ガランガルの辛味化合物 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) を HFS 食

に添加してペアフィーディングにて摂取カロリーをそろえて1ヶ月間与え、組織重量や血中パラメータへの影響を検討した。

温度感受性 TRP 受容体アゴニスト等の「冷え」への影響を調べることを最終目標とし、無麻酔でマウス体表温度に及ぼす影響を検討する実験系の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) In vitro 試験

human TRPM8, TRPV3, TRPV4 を安定的に発現する培養細胞系を樹立し、それぞれ既知のアゴニストで適切に応答し、アンタゴニストで応答が抑制されることを確認した。Human TRPV2 の安定発現細胞は樹立できなかったが、リポフェクションによる一過的導入にてアゴニストの検討が可能であった。

香辛植物の精油や抽出物 30 種にて、今回樹立した human TRPM8, TRPV3, TRPV4 の安定発現細胞を用いて、活性化成分ならびに阻害成分のスクリーニングを行った。

その結果、香辛植物 1 種類の 50% エタノール抽出物に比較的強い TRPM8 アゴニスト活性が認められた。MPLC と HPLC による活性の精製を試みたが、単一化合物にまで精製するに至らなかった。また香辛植物の精油数種に TRPM8 阻害活性が含まれる可能性を見出した。

TRPV3 と TRPV4 に関しては、アゴニスト活性は見出されなかった。しかし、精油数種に TRPV3 の、精油と抽出物それぞれ数種に TRPV4 の阻害活性が認められた。TRPV4 アンタゴニストの精製を試みたが、単離するに至らなかった。

新たな TRPV1・TRPA1 活性化成分を探索し、ドリ안의含硫化合物数種が TRPV1・TRPA1 アゴニストであることを見出した。また、ワサビに含まれるイソチオシアナート類の TRPA1 活性を明らかにした。さらに、バンウコンとウインターセイボリー中の TRPA1 活性を検討し、桂皮酸の誘導体ならびにカルバクロールとチモールが活性化成分であることを見出した。TRPV1 の阻害活性が腸管組織標本での実験から示唆されていたボアカンジンの温度感受性 TRP への影響を詳細に調べた結果、TRPV1 に対しては阻害、TRPA1 は活性化、TRPM8 には阻害を示すことを明らかにした。TRPV1 に対しては、カプサイシンと温度による活性化 (43 以上) をボアカンジンは阻害したが、酸による活性化は阻害しなかった。TRPM8 に対しては、メントールやイシリンによる活性化は阻害したが、低温による活性化 (28 以下) は阻害しないという特性を有していた。

(2) In vitro 試験

TRPM8 の選択的アゴニストである WS-12 を HFS 食に 0.025% および 0.050% の割合で添加したところ、TRPM8 アゴニストであるメントール添加試験で認められた内臓脂肪の低減作用は認められなかった。HFS 食の一ヶ月の負荷で血糖値は高値を示すが、WS-12 の添加

により低減する傾向が認められた。

TRPA1 の強力なアゴニストである ACA を HFS 食に 0.025% と 0.050% の割合で添加して一ヶ月間与えたところ、摂取カロリーは等しかったにもかかわらず、0.050% ACA 群は無添加群に比し体重は有意に低値を示した。また、腎周囲、精巣上体、腸間膜の 3 部位での内臓脂肪が用量依存的に低下した。さらに、肩胛骨間褐色脂肪組織中の産熱タンパク質である UCP1 量も用量依存的に増大し、ACA の摂取は、褐色脂肪の活性化などを介して内臓脂肪の蓄積を抑制することが示唆された。

無麻酔にてマウスの体表温度を測定する実験系を検討し、幅 3cm、長さ 30cm ほどのワイヤメッシュのステージを 30cm ほどの高さとし、中央に高さ 10cm の壁を設けることでマウスが中央にほぼ落ち着き、赤外線サーモグラフィー装置で体表面温度を測定する実験系を開発した。経口投与で有効な褐色脂肪を活性化するアドレナリン受容体 3 アゴニストと、尾部の血流を高める 2 アゴニストをマウスに経口投与してこの実験系にて体表面温度の経時変化をサーモグラフィーにて測定した結果、3 アゴニスト投与での肩胛骨間褐色脂肪組織上部の温度上昇と、2 アゴニスト投与による尾部皮膚温の著しい上昇を認め、本実験系の有用性を確認した。本実験系は無麻酔下での実験系であるため、同一のマウスを一定の期間を得た後に繰り返し使用できるという特徴を持つ。また、実際の摂取時の生体応答を、麻酔下での実験よりも正しく評価できると考える。この実験系にて、TRPM8 や TRPV3, TRPV4 アゴニストならびにアンタゴニストの単独投与ならびに複数同時投与時のマウス表皮温への影響を測定できる。また、「冷え」の評価系の確立を今後目指していく。

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)

1. Terada Y., Kitajima M., Taguchi F., Takayama H., Horie S., Watanabe T.: Identification of indole alkaloid structural units important for stimulus selective TRPM8 inhibition: SAR study of naturally occurring iboga derivatives. *J. Nat. Prod.* 査読あり, 77, 1831-1838 (2014)
2. Terada Y., Hosono T., Seki T., Ariga T., Ito S., Narukawa M., Watanabe T.: Sulphur-containing compounds of durian activate the thermogenesis-inducing receptors TRPA1 and TRPV1. *Food Chem.*, 査読あり, 157, 213-220 (2014)
3. Terada Y., Horie S., Takayama H., Uchida K., Tominaga M., Watanabe T.: Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by voacangine, an alkaloid

present in *Voacanga africana*, an African tree. *J. Nat. Prod.*, 査読あり, **77**, 285-297 (2014)

4. Masuda H., Mori N., Matsui Y., Tsukiyama K., Nishimura O., Takeuchi S., Terada Y., Watanabe T., Nadamoto T.: Effects of carvacrol and volatile fraction of winter savory (*Satureja montana* L.) on body temperature in humans who experience a feeling of cold. *Food Sci. Technol. Res.*, 査読あり, **19**, 1085-1092 (2013)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 寺田祐子, 北島満里子, 田口英悠美, 高山廣光, 堀江俊治, 渡辺達夫: Voacangine 類縁化合物を用いた構造-活性相関研究 - 化学アゴニスト選択的 TRPM8 阻害に重要な構造の同定, 第 29 回日本香辛料研究会(札幌), 要旨集 p.9-10, 2014 年 10 月 24, 25 日 5.

2. 三好一史, 亀山大輔, 杉山渉, 渡辺達夫 「無麻酔・無(軽)拘束マウスにおけるカプサイシンの表皮温度への影響」日本香辛料研究会第 28 回学術講演会(千葉), 2013 年 11 月 15-16 日

3. 池谷辰則, 亀山大輔, 三好一史, 渡辺達夫 「TRPM8 が糖質代謝に及ぼす影響」第 67 回日本栄養・食糧学会大会(名古屋) 要旨集 p.93, 2013 年 5 月

4. 寺田祐子, 増田秀樹, 後藤洋子, 廣岡沙織, 西村 修, 渡辺達夫 「本ワサビ・西洋ワサビ由来 isothiocyanate 類の TRPA1・TRPV1 活性」第 67 回日本栄養・食糧学会大会(名古屋) 要旨集 p.126, 2013 年 5 月

5. Ikeya T., Terada Y., Narukawa M., Sato T., Watanabe T.: 1'-Acetoxychavicol acetate, a TRPA agonist, suppresses obesity due to high energy diet in mice. 245th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, USA, Apr 7-11 (2013)

6. Terada Y., Horie S., Takayama H., Watanabe T.: New class TRPM8 antagonist, voacangine is the first natural competitive antagonist for menthol receptor, TRPM8. 245th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, USA, Apr 7-11 (2013)

7. 竹内俊介, 寺田祐子, 増田秀樹, 後藤洋子, 廣岡沙織, 西村 修, 渡辺達夫 「バンウコン (*Kaempferia galanga* L.) に含まれる TRPA1 活性化成分」日本農芸化学会 2013 年度(平成 25 年度)大会(仙台) 2013 年 3 月

8. 三好一史, 亀山大輔, 杉山 渉, 渡辺達夫 「無麻酔・無(軽)拘束マウスでのサーモグラフィによる表皮温度測定方法」第 64 回日本栄養・食糧学会中部支部大会(名古屋) 要旨集 p.10, 2012 年 12 月 15 日

9. 池谷辰則, 寺田祐子, 亀山大輔, 久保田紀久枝, 渡辺達夫 「TRPA1 活性化成分 1-acetoxychavicol acetate はマウスの内蔵脂肪の蓄積を抑制する」第 27 回日本香辛料

研究会(藤沢) 要旨集 p. 17, 2012 年 10 月 26-27 日

10. Terada Y., Horie S., Takayama H., Watanabe T.: Voacangine, an Iboga-type alkaloid of *Voacanga africana*, is a novel stimulus-specific antagonist for capsaicin receptor, TRPV1. Cold Spring Harbor Conferences Asia, Ion Channels: Biophysics, Diseases & Therapeutics, Suzhou, China, Abstracts p. 43, Sep 17-21 (2012)

11. Ikeya T., Sato T., Watanabe T.: Menthol, a TRPM8 agonist, suppresses obesity due to high energy diet. Cold Spring Harbor Conferences Asia, Ion Channels: Biophysics, Diseases & Therapeutics, Suzhou, China, Abstracts p. 22, Sep 17-21 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 達夫 (WATANABE, Tatsuo)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号: 10210915