

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780128

研究課題名(和文)腸管の味覚受容体を介した機能食品因子の認識とその情報伝達

研究課題名(英文)A study on signal transduction mechanisms of food chemicals through receptors in intestinal epithelia

研究代表者

藍原 祥子(Aihara, Yoshiko)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30620877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴン様ペプチド(GLP)1、ペプチドYY(PYY)、コレシストキニン(CCK)の摂食抑制ペプチドを分泌するCaco-2細胞を用いて食事ポリフェノールをスクリーニングした結果、エピガロカテキンガレート(EGCG)とフェルラ酸が消化管ホルモン分泌の刺激因子として同定された。マウスから摘出した腸管を用いると、EGCG刺激によりGLP-1、PYY、CCKのホルモンが分泌されることが示された。さらにCaco-2にEGCGを作用させた際の遺伝子発現の変動から、消化管ホルモンの分泌に至る細胞内メカニズムに細胞膜レセプターが関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：We constructed a novel bioassay system to evaluate ligands of gut hormone secretion using cultured cells (Caco-2). Caco-2 was found to release glucagon-like peptide 1 (GLP-1), peptide YY (PYY), and cholecystokinin (CCK) by adding sugars, free fatty acids, and amino acids, respectively. A screening among phytochemicals using Caco-2 cells showed that (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and ferulic acid can stimulate release of gut hormones. By using dissected gut rings of mice, it was demonstrated that EGCG induce gut hormone release of GLP-1, PYY and CCK from animal tissues. These results indicate that Caco-2 is useful tool to evaluate gut hormone secretion in vitro. According to a gene expression analysis of stimulated Caco-2 cells by EGCG, it is shown that a membrane receptor is involved in a signaling cascade for exocytosis of hormone.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：消化管ホルモン ファイトケミカル

1. 研究開始当初の背景

味覚受容体は口腔のみでなく腸管の上皮細胞でも発現していることが近年報告され、その機能が注目されている。甘味受容体 T1R を介してグルコース依存的に消化酵素の分泌を制御し、グルコーストランスポーター SGLT1 の発現を亢進する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 15075-15080, 2007) 例や、マウス苦味受容体 T2R138 を介したフェニルチオ尿酸 (PTC) 依存的な消化管ホルモン分泌の亢進の例などが示された (J. Clin. Invest., 118, 3693-3700, 2008)。これらは腸管内の味覚受容体が食品因子による機能調節を仲介する可能性を示唆する。

食品因子のうち、分解され ATP を産生する糖質、タンパク質、脂質を栄養素とすると、非栄養素とはエネルギー代謝に組み込まれず分解されない食品成分である。分解されないためにヒト体内で様々な生理活性を示すと期待される。現行の非栄養素の機能性の研究では血中へ吸収されることを前提にされているが、これらの成分の血中吸収量は僅かである。非栄養素のいくつかは、苦味の受容体である T2R 遺伝子群のリガンドになることが示されている (Chem. Senses 35, 157-170, 2010)。以上より、消化管において非栄養素が認識され、生理機能を誘導する可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

食品因子のうち、エネルギー代謝に含まれないが生理活性を有する因子 (非栄養素) について、腸管上皮における化学受容を介した機能の解明を試みる。非栄養素の代表例として、食品中の含有量の多い食事ポリフェノールに注目する。これらの作用に、腸管上皮細胞に発現する味覚受容体の介在を想定する。

腸管は異物に対処する重要な器官であり、特にエネルギー摂取を主体とする代謝調節においては重要な役割を担う。消化、吸収の作用は生体で同調している必要があるが、その連携は腸管からの情報なしには成り立たない。腸管は様々な内分泌細胞を有しシグナルを発信している。これら消化管ホルモンは、他の消化器官にダイレクトに働きかけるほか、中枢に作用して生体全体の活動を制御する。本研究では、非栄養素の機能の候補として消化管ホルモンにまず注目する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いて消化管ホルモン分泌を測定する *in vitro* アッセイ系を構築する。

消化管ホルモンのうち、食品因子により産生され中枢に作用するホルモンは、グルカゴン様ペプチド (GLP)-1、ペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK) である。GLP-1 と PYY は

下部腸管に存在する内分泌細胞 L 細胞で、CCK は上部小腸上皮内に分布する内分泌細胞 I 細胞で産生・分泌される。ヒト結腸腺癌由来の培養細胞 Caco-2 は、単層の下部を培地に曝すことにより吸収上皮様に分化することから小腸上皮モデルとして用いられている。栄養素の刺激によって分泌される消化管ホルモンの作用機序を捉えるにあたり、栄養素の吸収との相互作用を考慮して、この Caco-2 細胞で消化管ホルモンの分泌が見られるかを検討する。

アッセイ系の構築後、化学構造の骨格に基づいて代表的な食事ポリフェノールを選択し、消化管ホルモンを分泌する因子をスクリーニングする。具体的には、ケルセチン、ルテオリン、ヘスペリジン、エピガロカテキンガレート (EGCG)、ゲニステイン、シアニジン、フェルラ酸、エモジンを選択する。

(2) 培養細胞を用いた食品因子に応答する消化管ホルモン分泌の作用機序の探索

上記の実験で得られた因子を用いて消化管ホルモンの分泌に至る経路の同定を試みる。具体的には、ホルモンの分泌 (細胞外放出) に関与するシグナルとして細胞内カルシウムイオンと、サイクリック AMP の経路を検討する。また、食品因子の受容および下流シグナル伝達経路を予測し、機能阻害をすることで経路の探索を試みる。

(3) 食品因子に応答する消化管ホルモン分泌を介した生理機能の解析

GLP-1、PYY、CCK はいずれも視床下部で作用する食欲抑制因子であることから、これらの分泌を促進する因子では摂食量が抑制されることが期待される。マウスを用いて、食品因子の投与による摂食量の変化を解析する。

一方、GLP-1 は膵臓に作用しインスリン分泌を調節するインクレチンとしての作用を有する。摂食時の血糖値の調節を検証するため、耐糖能の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 消化管ホルモンの分泌を評価する系の構築およびポリフェノールのスクリーニング

ヒト結腸腺癌由来の培養細胞 Caco-2 は、既知の食品因子に反応してグルカゴン様ペプチド (GLP)-1、ペプチド YY (PYY)、コレシストキニン (CCK) を分泌することを確認した。これを用いて骨格の異なるポリフェノールをスクリーニングしたところ、エピガロカテキンガレート (EGCG) とフェルラ酸がそれぞれのホルモン分泌を促進することが明らかとなった。

エピガロカテキンガレートは、茶葉などに

多く含まれるポリフェノールであるが、異なる構造の分子種が8つある。他7種のカテキン類の効果を比較検討したところ、ガロカテキンゲレートでも同様の消化管ホルモン分泌作用が観察されたが、残る6種のカテキン類では見られなかった(図)。

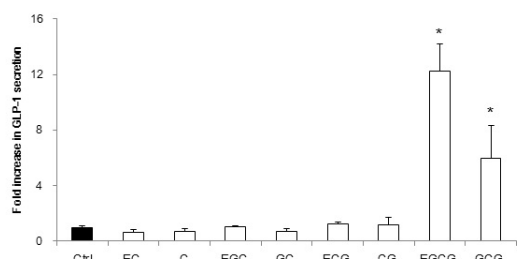


図 カテキン類による GLP-1 の分泌

一方、フェルラ酸と類似した構造を示すフェニルプロパノイド類を数種スクリーニングしたところ、クロロゲン酸による分泌量が多かった。

上記で得られた消化管ホルモン分泌を促進するポリフェノールのうち EGCG を代表として、マウスより摘出した腸管組織を用いて生物組織での生理活性を検討したところ、培養細胞系と同様に GLP-1、PYY、CCK の分泌が確認できた。従って、Caco-2 は消化管ホルモン分泌のスクリーニング系として有効であることが示された。

本実験で得られた結果は、植物由来のポリフェノールが直接消化管の上皮細胞に作用して摂食刺激に関するホルモンの分泌を変化させている可能性を示す。またこの作用がいくつかのフラボノイド類で共通に見られたことから、受容メカニズムは柔軟であることが予想された。

(2)EGCG による消化管ホルモン分泌の機能解析

NCI-H716 細胞はヒト由来の培養細胞株で、条件に応じて L 細胞様に分化し、GLP-1 と PYY を産生する。この細胞に EGCG を作用させ細胞内メカニズムを解析したところ、カルシウムイオン濃度の上昇が観測された。従って EGCG による GLP-1 の分泌は、カルシウムイオンをシグナルとするホルモン顆粒の細胞外放出である可能性が示唆された。

同時にこの細胞の刺激時において遺伝子変動を調べたところ、味覚受容体の発現量が上昇したことからこの経路には受容体に関与していることが示唆された。

(3)EGCG による消化管ホルモンを介した生理機能の解析

測定した消化管ホルモンのうち GLP-1 は視床下部に作用して摂食を抑制する働きと、インスリン分泌および受容を制御し血糖値の調節を行うインクレチンとしての働きを有

する。マウスより摘出した腸管に対し EGCG が GLP-1 の分泌を促進したことから、これを前提とした生理機能として耐糖能試験と摂食量の評価を行った。

腹腔内に糖負荷したマウスの血糖値の変化を水を経口投与した群をコントロールとして、EGCG を経口投与した群、EGCG の経口投与と同時に GLP-1 受容体阻害剤を投与した群と比較すると、血糖値の上昇に3群で差が観測された。すなわち、糖負荷による血糖値の上昇が EGCG 投与群で緩やかになり、GLP-1 のアンタゴニストでキャンセルされるという結果が得られた。

一方、EGCG を経口投与したマウスの摂食量は、投与後2時間において水を投与した群に比べて有意に少ないことが示された。(1)で得られた消化管ホルモンを分泌しないカテキンを投与した群では摂食量の変化が見られなかったことからこの効果は EGCG による食欲抑制効果を有する消化管ホルモンの分泌を介した可能性が高い。

本研究の成果は、食品因子が、腸管上皮での受容によって消化管ホルモンを分泌することにより、生体のエネルギー代謝や摂食行動を調節するといった生理機能を発現する可能性を示す。食品の摂取がエネルギーを産生する際には、その他の情報伝達も重要な因子になることを示唆することは、動物の行動を規定する新しい概念の一助となる。

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 0 件)
投稿中

〔学会発表〕(計 4 件)

Song WY, Aihara Y, Hashimoto T, Kanazawa K, Dietary polyphenols induce a secretion of gut hormones from Caco-2 cells, 20th International Congress of Nutrition, Granada, 2013, 9, 19

宋 苑吟、藍原 祥子、橋本 堂史、金沢 和樹、食事ポリフェノールによる消化管ホルモンの分泌調節、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、名古屋、2013, 5, 26

宋 苑吟、藍原 祥子、橋本 堂史、金沢 和樹、腸管上皮モデルを用いた香辛料成分による消化管ホルモンの分泌の検討、第 27 回日本香辛料研究会、藤沢、2012, 10, 27

藍原 祥子、Song Wong Yong、橋本 堂史、金沢 和樹、ポリフェノール刺激によるヒト腸管由来培養細胞における消化管ホルモンの分泌、第 66 回 日本栄養・食糧学会大会、仙台、2012, 5, 19

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藍原 祥子 (AIHARA, Yoshiko)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30620877