

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03042

研究課題名(和文)食品因子による消化管センシングを介したホメオダイナミクス発現機構の解明

研究課題名(英文)Evaluation of homeodynamics induced by food factors through GI tract sensing

研究代表者

越阪部 奈緒美 (Naomi, Osakabe)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30554852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCinnamtannin A2(A2)がCapsaicin(CA)と同様に消化管感覚神経によって認識され生体にストレス応答反応を引き起こした結果、交感神経活動が亢進し、末梢の循環動態に変化をもたらすことを以下の結果により明らかにした。1.YC3.60tgマウスの脊髄後根神経節細胞にCA・A2を添加したところ、顕著なCa<sup>2+</sup>の取り込みが確認された。2.A2を経口投与後、視床下部室傍核におけるcfosおよびCRH mRNA発現が顕著に増加した。3.A2・CAをラットに強制経口投与したところ、一過的な血圧・心拍数の上昇作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではポリフェノールの一種であり強い渋味を呈するCinnamtannin A2(A2)が辛味成分であるCapsaicin(CA)と同様に消化管感覚神経によって認識され生体にストレス応答反応を引き起こした結果、交感神経活動が亢進し、末梢の循環動態に変化をもたらすことを初めて明らかにした。ポリフェノール類はトクホや機能性表示食品の関与成分として一般に広く用いられているが、生体利用性が低いことからこれまでメカニズムが不明であった。本研究の結果その作用メカニズムが明らかになったことは、国民の機能性食品の利用に大きく役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Cinnamtannin A2 (A2) was recognized by the sensory nerves distributed in GI tract and caused stress response as well as Capsaicin (CA). Resulting in enhanced sympathetic activity induced the change in peripheral hemodynamics according to the results shown in below. 1. By addition of A2 or CA to dorsal root ganglion cells derived from YC 3.60 tg mice, significant Ca<sup>2+</sup> uptake was observed. 2. After oral administration of A2, cfos and CRH mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus increased remarkably. 3. After oral administration of A2 and CA to rats, a transient increase in blood pressure and heart rate was observed.

研究分野：機能性食品

キーワード：消化管センシング 脳腸相関 渋味 辛味 ホメオダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、変化する外部・内部環境にตอบสนองするために、循環系・代謝系・内分泌系・自律神経系などによって構成される高次ネットワークが動的に反応することで恒常性が維持されることがわかってきた(ホメオダイナミクス)。一方、ここ 20 数年で機能性を有する食品因子についての研究が進み、トクホに代表されるホメオダイナミクスに寄与する製品の開発が行われてきた。これらの食品因子の中には、機能性成分の生体利用性が低いことから、作用メカニズムが不明なものも多く存在する。食品摂取後に自律神経などによる消化管運動や消化液分泌調節機構があることは一般的に知られているが、消化管の一次知覚神経末端に発現する受容体である TRP が capsaicin などの特定の食品因子を認識(消化管センシング)し、その刺激がエネルギー代謝に影響することが最近報告されている。一方我々は、チョコレートや黒豆に含まれる flavan 3-ols (エピカテキンおよびその重合物の混合物)が交感神経を刺激し、エネルギー代謝亢進や血圧低下を示すことを世界に先駆けて見出した。他方既に flavan 3-ols 含有食品の摂取はメタボリックシンドロームのリスクファクターの改善、すなわちホメオダイナミクス発現に寄与することがメタアナリシスで証明されている。Flavan 3-ols に比較して capsaicin のヒトでの報告例は非常に少なく、また必ずしも有効であるとは限らないことから、これらの化合物の知覚神経上での反応に何らかの差異があることが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、capsaicin と flavan 3-ols 構成成分の一つである cinnamtannin A2 (エピカテキン 4 量体)の知覚神経上における認識機構を検証することで消化管センシングの詳細を明らかにするとともに、その結果として発現する全身性作用がホメオダイナミクスに寄与することを証明する。

## 3. 研究の方法

### Cinnamtannin A2 応答神経細胞の可視化

Ca<sup>2+</sup> バイオセンサーである YC3.60tg マウスの脊髄後根神経節を単離し、初代培養系を確立した。1-2 週間の培養によって軸索の伸張が確認された後に、capsaicin または cinnamtannin A2 を添加し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 流入によって観察される蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

### Cinnamtannin A2 の視床下部ストレス応答遺伝子発現の検証

1 週間以上馴化した ICR 雄性マウス(8 週齢)に Cinnamtannin A を 10 または 50 μg/kg 強制経口投与した。投与前 (before) 経口投与後経時的に全脳を摘出し、8 μm の凍結コリナル切片を作成した。これらのサンプルを用いて、神経活動マーカーである cfos、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin-releasing hormone;CRH) mRNA 発現を ADC 社製 in situ hybridization 二重染色法 (ZZ probe 法) を用いて染色し、鏡検した。

### Cinnamtannin A2 と capsaicin との作用強度の比較

ウレタン麻酔下で Wistar 系雄性ラットの胃部にカニューレを留置し、拳拵筋細動脈をプレパレーションし、capsaicin または cinnamtannin A2 10 μg/kg を強制経口投与後、tail cuff 法を用いて 60 分間の血圧・心拍数の変動を観察した。

## 4. 研究成果

### Cinnamtannin A2 応答神経細胞の可視化

カプサイシンまたは cinnamtannin A2 の添加によって、顕著な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入が観察されたことから、開発した評価系の妥当性が確認された。またこの実験系に cinnamtannin A を添加した場合にも、強い  $\text{Ca}^{2+}$  が観察されたことから、cinnamtannin A は DRG に細胞体がある感覚神経細胞によって認識されることが明らかとなった (Cinnamtannin A2 添加のみ、写真 1)。

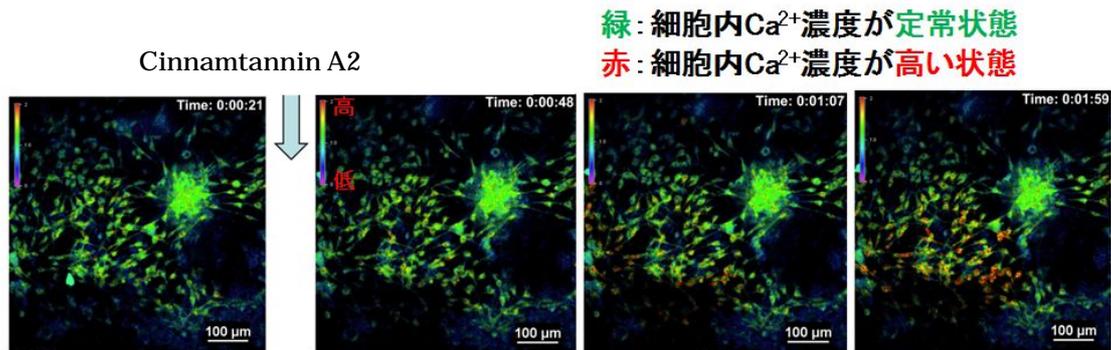


写真 1 Cinnamtannin A2 添加後の YC3.60Tg マウス由来 DRG における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化

Cinnamtannin A2 の視床下部ストレス応答遺伝子発現の検証

Cinnamtannin A を 10 または 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  強制経口投与し、経時的に全脳を摘出して作成した切片の *fos* および CRHmRNA 発現 *in situ* hybridization で観察した結果を写真 2 に示す。

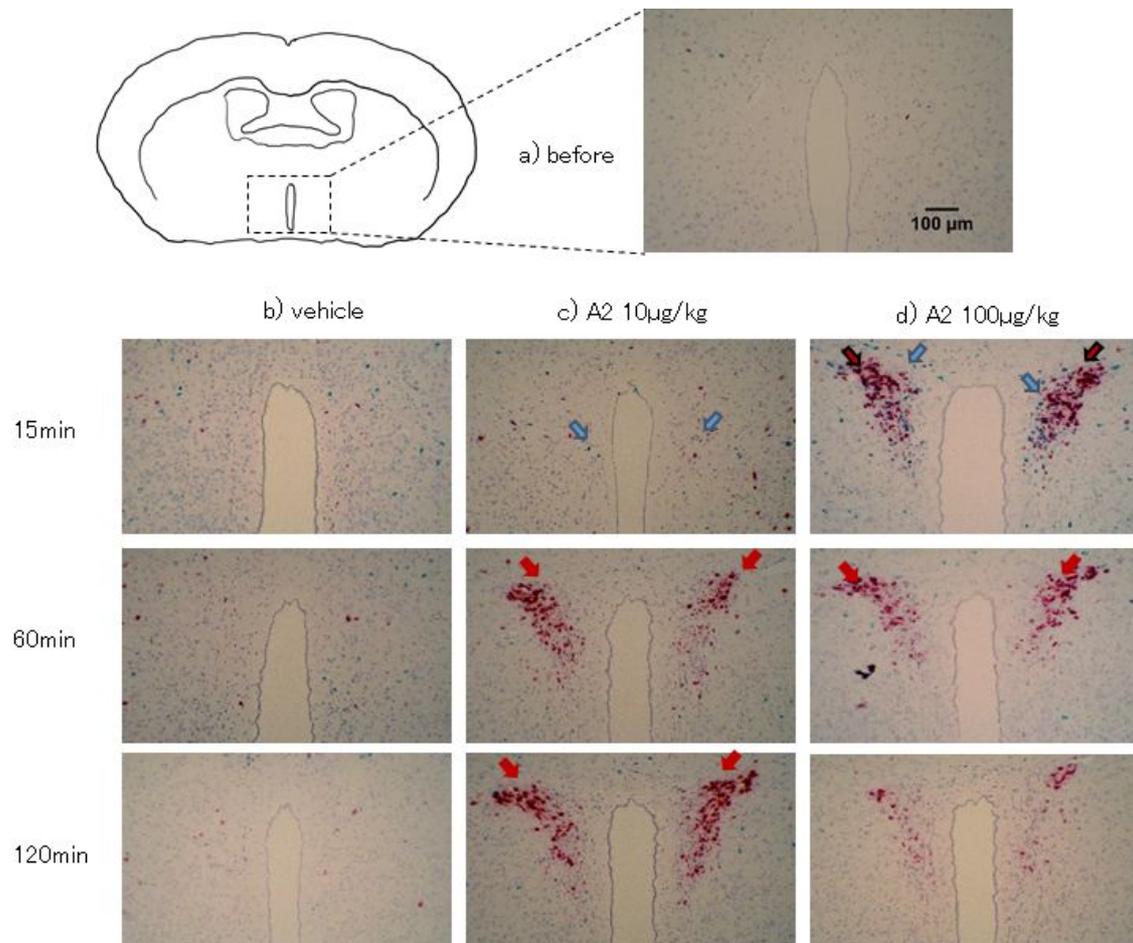


写真 2 Cinnamtannin A2 強制経口投与後の視床下部室傍核における *fos* および CRHmRNA 発現

またこれらの発現について定量化したグラフを図2に示す。

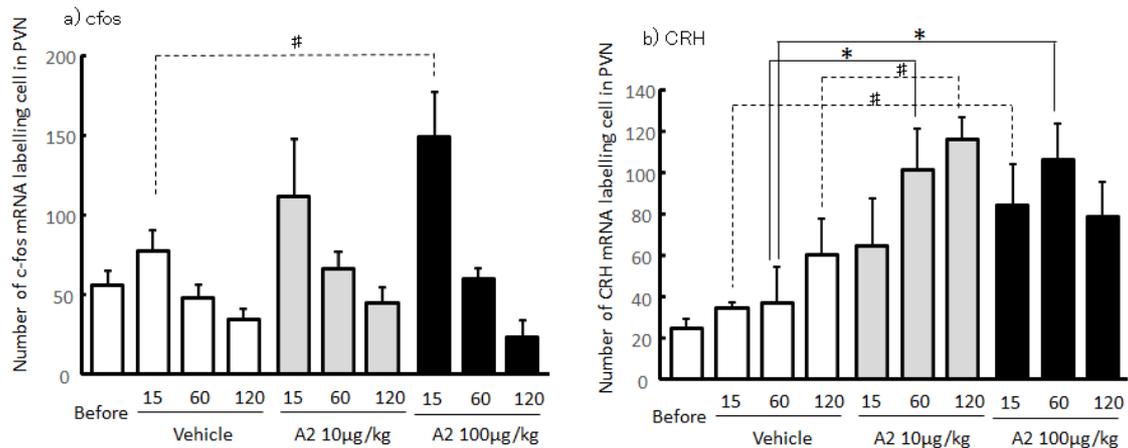


図2. Cinnamtannin A2 強制経口投与後の視床下部室傍核 c-fos(a)および CRH(b)の変動

N=4-6, each value represents mean and SD. #p<0.1, \*p<0.05

### Cinnamtannin A2 と capsaicin との作用強度の比較

Cinnamtannin A2 および capsaicin 10 µg/kg を強制経口投与後の血圧・心拍数の変動を図1に示す。Cinnamtannin A2 および capsaicin と同様に10分後から有意な血圧・心拍数の上昇が観察され、60分後には元のレベルへ戻る傾向が認められた。

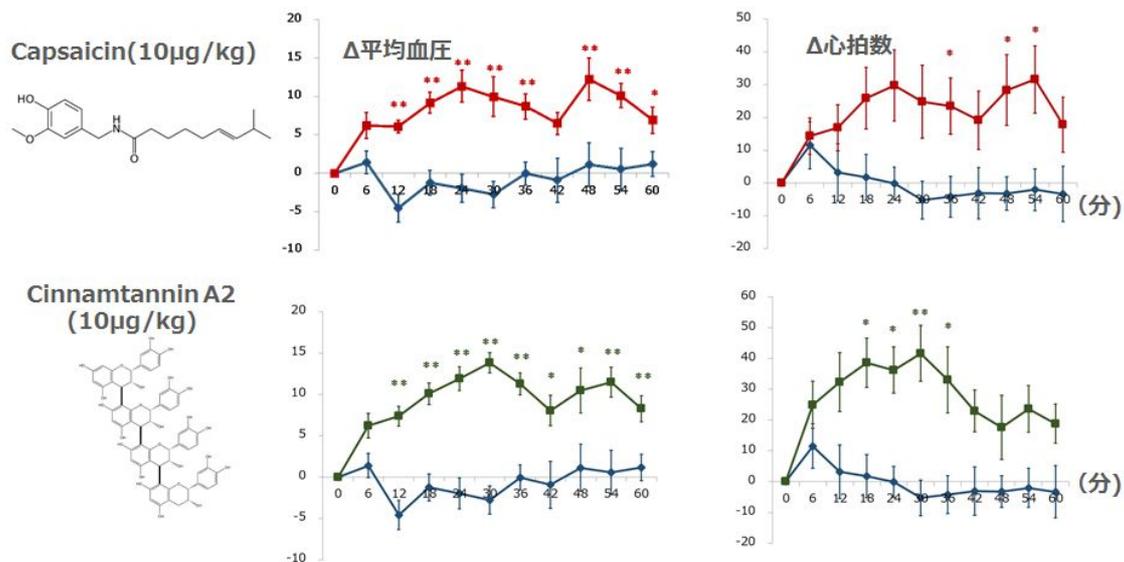


図1. Capsaicin または Cinnamtannin A2 強制経口投与後の循環動態の変動

N=8, each value represents mean and SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01

Cinnamtannin A2 の投与によってストレスホルモンである CRH の顕著な発現が認められた。

以上のことより、capsaicin と cinnamtannin A2 は消化管に存在する感覚神経によって知覚されること、またその刺激が生体にストレッサーとして認識され、交感神経活動を介して末梢循環動態に変化をもたらすことがわかった。

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Adachi T, Kakuta S, Aihara Y, Kamiya T, Watanabe Y, Osakabe N, Hazato N, Miyawaki A, Yoshikawa S, Usami T, Karasuyama H, Kimoto-Nira H, Hirayama K, Tsuji NM. Visualization of Probiotic-Mediated Ca<sup>2+</sup> Signaling in Intestinal Epithelial Cells In Vivo. *Front Immunol.* 7 (601) 2016
2. Saito A, Inagawa K, Ebe R, Fukase S, Horikoshi Y, Shibata M, Osakabe N. Onset of a hypotensive effect following ingestion of flavan 3-ols involved in the activation of adrenergic receptors. *Free Radic Biol Med* 99 584-592 2016
3. Saito A, Nakazato R, Suhara Y, Shibata M, Fukui T, Ishii T, Asanuma T, Mochizuki K, Nakayama T, Osakabe N. The impact of theaflavins on systemic- and microcirculation alterations: The murine and randomized feasibility trials. *J Nutr Biochem.* 32 107-114 2016
4. Ito M, Kudo N, Miyake Y, Imai T, Unno T, Yamashita Y, Hirota Y, Ashida H, Osakabe N. Flavan 3-ol delays the progression of disuse atrophy induced by hindlimb suspension in mice.
5. Unno T, Osakabe N. Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. *Food Sci. Nutr.* DOI10.1002/fsn3.607 2018
6. Nakagawa Y, Ishimura K, Oya S, Kamino M, Fujii Y, Nanba F, Toda T, Ishii T, Adachi T, Suhara Y, Osakabe N. Comparison of the sympathetic stimulatory abilities of B-type procyanidins based on induction of uncoupling protein-1 in brown adipose tissue (BAT) and increased plasma catecholamine (CA) in mice. *PLoS One* 13(7):e0201203
7. Fujii Y, Suzuki K, Hasegawa Y, Nanba F, Toda T, Adachi T, Taira S, Osakabe N. Single oral administration of flavan 3-ols induces stress responses monitored with stress hormone elevations in the plasma and paraventricular nucleus. *Neurosci Lett.* 682 106-111 2018

〔学会発表〕(計31件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.web.se.shibaura-it.ac.jp/seimei/osakabe-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：成川 真隆

ローマ字氏名：Narukawa Masataka

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：特任助教

研究者番号(8桁): 50432349

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安岡 顕人

ローマ字氏名：Yasuoka Akihito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。