

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500996

研究課題名(和文) コーヒーによるステロイド代謝調節と生活習慣病予防との相関

研究課題名(英文) Effects of coffee consumption on steroid metabolisms linked to life-style related disorders.

研究代表者

田村 悦臣 (Tamura, Hiroomi)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：50201629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1日3-4杯のコーヒー摂取は生活習慣病を予防する効果があることが報告されている。一方、ストレスホルモンや性ホルモンなどのステロイドホルモンの代謝異常は生活習慣病のリスク要因である。そこで、ヒト由来培養細胞を用いてコーヒーの影響を解析した。その結果、コーヒーは大腸がん細胞においてはエストロゲンの活性化、乳がん細胞においては不活性化に寄与する効果を示した。これらは、共にそれぞれのがん細胞の発症を抑制する効果を期待させる。一方、前立腺がん細胞では、男性ホルモンの活性化の傾向が見られ、予防効果との相関はなかった。また、神経系細胞では認知症予防効果が期待される神経ステロイドの産生を増加する効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Coffee is one of the world's most commonly consumed beverages. Recent epidemiological studies show that coffee consumption has been associated with a lower risk of several life-style related disorders such as diabetes, obesity, cancers and dementia. On the other hand, dysfunction of metabolism of steroids such as stress hormone, estrogens and androgens is closely linked to the risk of incidence of these disorders. We investigated effects of coffee on the metabolism of these steroid hormones in human cancer cells such as colon, breast, prostate cancers and glioma. We obtained results suggesting protective effects of coffee on colon and breast cancers but not to prostate cancer. In addition, our result suggest that coffee may increase production of neurosteroids that act to lower the risk of dementia.

研究分野：生化学

キーワード：コーヒー 生活習慣病 ステロイドホルモン 大腸がん 乳がん 前立腺がん 神経ステロイド

1. 研究開始当初の背景

肥満、動脈硬化や糖尿病、高血圧などの生活習慣病の予防は、国民の健康にとって大きな課題である。近年、コーヒー摂取が、糖尿病や脳卒中、肝臓がんや大腸がんなどのいわゆる成人病を予防する効果があるとの疫学的調査・研究が多く報告されている。グルココルチコイドやエストロゲンなどのステロイドホルモンは、多様な生理活性を有し、その活性の変調が様々な生活習慣病の発症リスクと相関することが明らかとなってきている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、がん、認知症、肥満などの生活習慣病発症と関係するステロイドホルモンの代謝に対するコーヒー成分の効果を調べ、その予防効果の分子基盤を明らかにし、さらに、有効成分を基にした新たな予防薬の開発へつなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コーヒーの調製

コロンビア産アラビカ種のコーヒー豆を用いた。8gのコーヒー粉を96°C、140mLの熱水で抽出したものを100%(v/v)コーヒーとした。焙煎は220°Cで行った。

(2) 遺伝子およびタンパク質発現の解析

各種タンパク質の遺伝子発現はqPCR法で、タンパク質発現はImmunoblot法で行った。

4. 研究成果

(1) ヒト消化管モデル Caco-2 細胞におけるエストロゲン代謝に対する効果

コーヒーが Caco-2 細胞のエストロゲン硫酸抱合反応を強く阻害することを見出し、コーヒーの大腸がん予防効果との関連について解析を進めた。阻害活性は、焙煎により生成する成分であった。また、コーヒーは、エストロゲン硫酸抱合に関与する酵素 SULT1E1 および steroid sulfatase (STS) の遺伝子発現を抑制し、さらに、抱合体を排出する輸送蛋白 BCRP の発現および活性を促進した(図1)。これらの効果はコーヒーの焙煎成分によるものであることが明らかとなった。

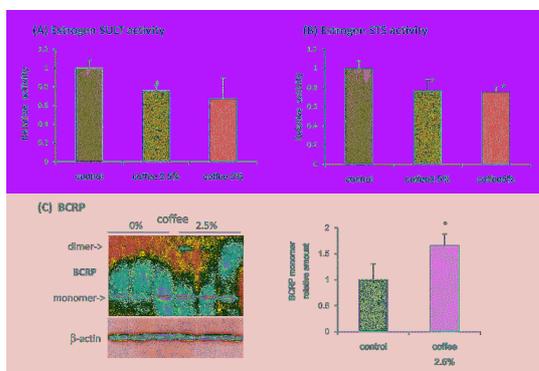


図1 コーヒーによる Caco-2 細胞エストロゲン代謝タンパク質への効果

また、遺伝子発現調節には、BCRP は NF-κB, SULT1E1 には Sp-1 が関与する可能性が示唆された(文献)。さらに、SULT1E1 活性を阻害するコーヒー成分の分離を試みた。デカフェ

インスタントコーヒー1kgより、阻害成分の分離・同定を行ったところ、分子量205の新規含窒素芳香族化合物であった(図2)。

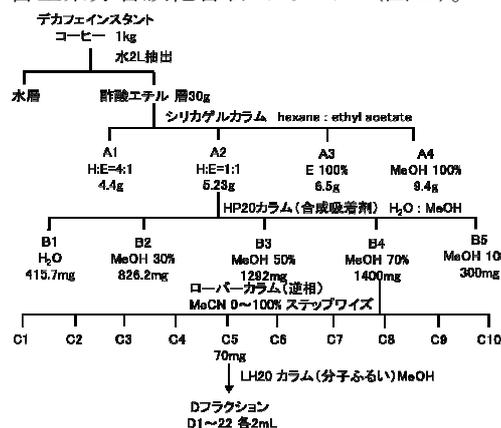


図2 デカフェコーヒーからの SULT1E1 活性阻害成分の単離法(部分)

(2) ヒト乳がん細胞 MCF-7 におけるエストロゲン代謝に対する効果

MCF-7 細胞はエストロゲン依存的に増殖するヒト乳がん細胞であり、STS の発現が正常細胞に比べ高い。したがって、血液エストロゲン硫酸からエストロゲンが生成され増殖活性が高いと考えられており、STS 阻害剤が乳がん治療に使われている。最近、コーヒー摂取が乳がん治療効果を増大することを示す疫学研究が報告された。そこで、乳がん細胞 MCF-7 のエストロゲン代謝に対するコーヒーの効果調べた。MCF-7 細胞の SULT1E1 発現は低く、STS 遺伝子の発現は高かった。コーヒーは MCF-7 細胞の増殖を抑制した。STS およびエストロゲン受容体(ERα)の発現を抑制した(図3)。また、阻害活性は焙煎により生成した。以上の結果は、コーヒー中の阻害成分が、細胞内エストロゲン活性を減弱することを示唆し、乳がん治療薬の候補になりうることが期待される。

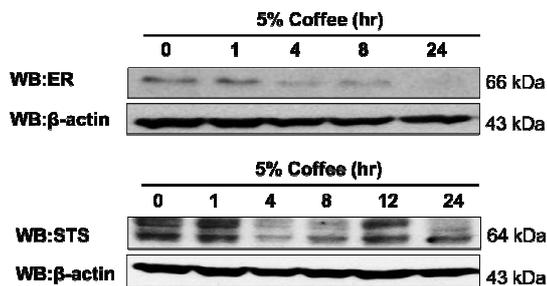


図3 ヒト乳がん細胞 MCF-7 のエストロゲン代謝関連タンパク質の発現に対するコーヒーの効果

(3) ヒト前立腺がん LNCaP における男性ホルモン代謝酵素 AKR1C3 に対する効果

前立腺がんの進行には男性ホルモン(アンドロゲン)が関与し、アンドロゲン受容体(AR)を介する作用が重要な働きをしている。そのため、前立腺がんの治療薬として抗アンドロゲン薬が適用される。最近の疫学調査から、コーヒーの習慣的な喫飲が前立腺がんを

予防する可能性が示唆されている。そこで、アンドロゲン代謝に対するコーヒーの効果を検査した。

男性ホルモン代謝酵素の中心的な酵素 Aldo-keto reductase family 1 member C type3 (AKR1C3)は、アンドロゲン非依存性前立腺がん細胞で高発現している。そこで、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP を用いて、AKR1C3 発現に対するコーヒーの効果を見たところ、コーヒー濃度依存的に遺伝子発現が増加し、2.5%コーヒー添加後8時間で最大8倍になった。タンパク質も同様の変化を示した(図4)。さらに、AKR1C3 遺伝子発現の誘導について検討した結果、抗酸化を司る転写因子 Nrf2 の活性化によることが明らかとなった。コーヒー中の AKR1C3 誘導活性は、カフェインやクロロゲン酸などの主成分ではなく、コーヒー豆の焙煎により生成し、ブタノールで抽出される成分であった(図4)。今後、この活性化のメカニズムの解析を進める。今回の結果は、コーヒーの喫飲の前立腺がんの予防効果との相関は示さなかったが、AKR1C3 が前立腺がんのバイオマーカーとなっていることから、診断の際、対象者のコーヒー摂取の情報を得ることが重要であることを示唆する。

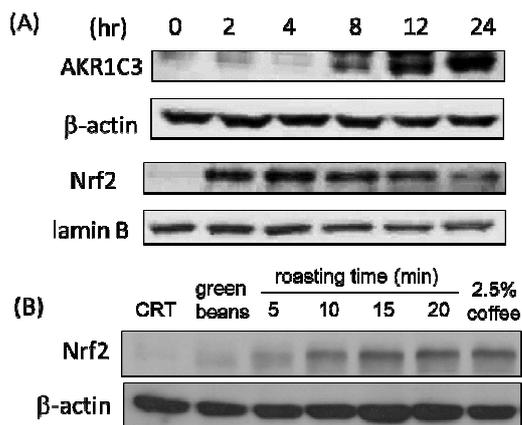


図4 (A) 2.5%コーヒーによる Nrf2 活性化とそれによる AKR1C3 発現誘導。(B) Nrf2 活性化成分はコーヒー豆の焙煎により生成する。

(4) ヒト神経細胞における神経ステロイド合成に対する効果

神経ステロイドは脳内で合成されるステロイドの総称で、記憶学習・情動といった中枢作用に影響を与えることが知られているが、コーヒー摂取が認知症の予防に有効であるという疫学研究がある。そこで、コーヒーの神経ステロイド合成に与える影響について調べた。その結果、コーヒー成分がステロイド合成・代謝系のうち、活性の高い神経ステロイド *allo*-pregnenolone 産生を促進する AKR1C1, AKR1C3 等の遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなった(図5)。また、この効果が DNA のメチル化に対し影響を与えるエピゲネティックな制御である可能性が示唆された。

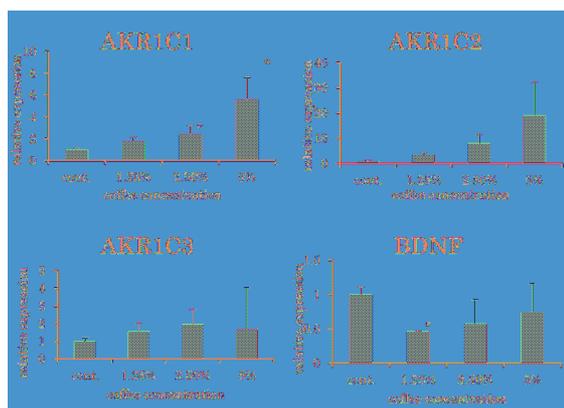


図5 ヒトグリア細胞 GI-1 における神経ステロイド合成系遺伝子発現に対するコーヒーの効果

## 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6件)

①Roasted coffee induces aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) expression in human prostate cancer LNCaP cells associated with Nrf2 activation. Kuniji Takahashi, Megumi Funakoshi-Tago, Marie Takaoka, Shota Kakio, Kenji Kobata, and Hiroomi Tamura

*Open Prostate Cancer Journal*, in press (2015) 査読有

②Coffee inhibits adipocyte differentiation via inactivation of PPAR $\gamma$ .

Ryohei Aoyagi, Megumi Funakoshi-Tago, Yosuke Fujiwara and Hiroomi Tamura. (2014) 査読有

*Biol. Pharm. Bull.*, 37(11), 1820-1825 (2014)

③ Dexamethasone suppresses neurosteroid biosynthesis via downregulation of steroidogenic enzyme gene expression in human glioma GI-1 cells.

Fuyuko Koibuchi, Natsumi Ritoh, Ryohei Aoyagi, Megumi Funakoshi-Tago and Hiroomi Tamura. *Biol. Pharm. Bull.*, 37(7), 1241-1247 (2014) 査読有

④ Yuji Narukawa, Akiko Niimura, Hitomi Noguchi, Hiroomi Tamura and Fumiyuki Kiuchi. New diterpenoids with estrogen sulfotransferase inhibitory activity from *Leonurus sibiricus* L. *J. Nat. Med.* 68, 125-131 (2013) 査読有

⑤ Marina Isshiki, Haruka Ohta and Hiroomi Tamura. Coffee reduces SULT1E1 expression in human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(2), 299-304 (2013) 査読有

⑥ Toshiaki Yagishita, Akira Kushida and Hiroomi Tamura. Vitamin D<sub>3</sub> enhances *all-trans* retinoic acid (ATRA)-mediated neurosteroid biosynthesis in human glioma GI-1 cells. *J. Biochem.*, 152(3), 285-292 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

- ①武田峰佳、露崎 英子、上田 史仁、多胡めぐみ、田村悦臣。ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞におけるエストロゲン代謝に対するコーヒー豆抽出液の影響、日本薬学会第 135 年会、2015. 3. 28 神戸
- ②中山拓哉、辻山真、多胡めぐみ、田村悦臣。ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞の K-ras 発現に対するコーヒーの影響、日本薬学会第 135 年会、2015. 3. 28、神戸
- ③野中勇佑、石原由麻、多胡めぐみ、田村悦臣。コーヒー豆抽出液による LPS シグナル伝達経路抑制機構の解析。日本薬学会第 135 年会 2015. 3. 26 神戸
- ④ Shota Kakio, Katsunori Takahashi, Megumi Funakoshi-Tago, Hiroomi Tamura. Effects of coffee on BDNF activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The 12th International Congress on Alzheimer's and Parkinson's diseases. 2015. 3. 19 Nice, France
- ⑤垣尾翔大、高橋克徳、多胡めぐみ、田村悦臣。SH-SY5Y 細胞において、コーヒーが脳由来神経栄養因子 BDNF の働きに及ぼす影響。第 87 回日本生化学会大会、2014. 10. 18 京都
- ⑥牧千洋、青柳良平、多胡めぐみ、田村悦臣。マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 の分化初期段階における一過性細胞増殖へのコーヒーの影響。第 87 回日本生化学会大会、2014. 10. 18 京都
- ⑦清水美貴子、吉田美咲、橋口正行、望月眞弓、田村悦臣。メタ解析を用いた日本の大腸がん発症に対するコーヒー摂取の有用性評価。日本薬学会第 134 年会。2014. 3. 29
- ⑧垣尾翔大、高橋克徳、多胡めぐみ、田村悦臣。SH-SY5Y 細胞における脳由来神経栄養因子 BDNF の働きに対するコーヒーの効果。日本薬学会第 134 年会。2014. 3. 28 熊本
- ⑨牧千洋、青柳良平、多胡めぐみ、田村悦臣。マウス脂肪前駆細胞 3T3L1 における insulin シグナルへのコーヒーの影響。日本薬学会第 134 年会。2014. 3. 28 熊本
- ⑩青柳良平、牧千洋、多胡めぐみ、田村悦臣。コーヒーによる脂肪細胞への分化抑制メカニズムの解析。日本薬学会第 134 年会。2014. 3. 28 熊本
- ⑪高橋國次、田村悦臣。ヒト由来前立腺がん LNCap 細胞に対するアンドロゲン作用へのコーヒーの影響。フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013. 9. 13 福岡
- ⑫青柳良平、牧千洋、田村悦臣。コーヒーによる脂肪細胞分化抑制効果とそのメカニズム解析。フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013. 9. 13 福岡
- ⑬青柳良平、牧千洋、田村悦臣。脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いたコーヒーの脂肪細胞分化への影響。第 86 回日本生化学会大会。第 86 回日本生化学会大会 2013. 9. 12 横浜
- ⑭太田 遥香、一色 真里奈、田村悦臣。コ

ーヒーによるエストロゲン硫酸転移酵素 SULT1E1 の発現抑制の解析。第 85 回 日本生化学会大会。2012. 12. 16 福岡

⑮鯉渕英由子、利藤奈都美、田村悦臣。ヒト神経膠種 GI-1 細胞における神経ステロイド合成に対するグルココルチコイドの影響。第 85 回 日本生化学会大会。2012. 12. 16 福岡

〔図書〕(計 1 件)

Effects of Coffee on Estrogen Sulfation in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells. Hiroomi Tamura. Coffee in Health and Disease Prevention (ed. V. Preedy), Chapter 61, 545-552 (2014) Academic Press

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

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

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.k-ris.keio.ac.jp>  
<http://www.pha.keio.ac.jp/research/hc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 悦臣 (TAMURA, Hiroomi)  
慶應義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号：50201629