

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：22303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14737

研究課題名(和文)腎臓における糖再吸収トランスポーターSGLT2制御に関する食品機能学的研究

研究課題名(英文) Food functional study on the regulation of glucose reabsorption transporter SGLT2 in the kidney

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年増加する糖尿病の予防を目的として、糖尿病新薬のターゲットである腎臓におけるグルコース再吸収トランスポーターSGLT2に注目し、SGLT2を阻害する食品成分を探索することとした。SGLT2遺伝子を動物培養細胞に安定に導入しSGLT2活性を評価できる実験系の構築に成功した。構築した評価系を用いてSGLT2活性を阻害する食品成分を探索した結果、緑茶に含まれるカテキン類の一種であるカテキンガレート、また柑橘類に多く含まれるノビレチンがSGLT2活性を阻害することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We focused on sodium-dependent glucose transporter 2(SGLT2) that is responsible for glucose reabsorption in the kidney, a new drug target of diabetes, and tried to search for food factors which inhibit SGLT2 activity. We constructed a stable cell line expressing human SGLT2 and developed assay system to assess SGLT2 activity. By using this system, we performed screening of food substances which inhibit SGLT2 activity. As a result, we found that catechin gallate which is one of catechins in tea, and nobiletin which is mainly contained in citrus fruits inhibited SGLT2 activity. These flavonoids may be useful to prevent diabetes.

研究分野：食品機能学

キーワード：トランスポーター 糖尿病 グルコース フラボノイド 腎臓

1. 研究開始当初の背景

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・過食の時代とも言われて久しく、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、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とともに、神経障害、網膜症、腎症の三大合併症につながる事が知られている。世界での糖尿病患者数は増加の一途を続けており、2015年で約4億1500万人、2040年には約6億4200万人になると予想されている (IDF Diabetes Atlas, Seventh edition, 2015)。また日本においても、平成24年国民健康・栄養調査結果では、「糖尿病が強く疑われる人」が約950万人、「糖尿病の可能性が否定できない人」と合わせると約2,050万人と推定されており、糖尿病の予防・治療は極めて重要な国民的課題である。このような背景のもと、糖尿病に対する治療薬の開発が医学薬学分野で盛んにおこなわれ、中でも腎臓におけるグルコースの再吸収を担うナトリウム共輸送型グルコーストランスポーター2 (SGLT2; SLC5A2) の阻害剤が開発され、新たな糖尿病治療薬として日本では2014年に承認・発売が開始されている。これは腎臓におけるグルコースの再吸収を阻害し、グルコースをそのまま尿中に排出しようというアプローチである。これら SGLT2 阻害薬の有効成分はいずれも低分子有機化合物であるが、SGLT2 に対する食品因子の作用は全く検討されていないのが現状である。

そこで本研究では、糖尿病の予防を目的に腎臓における糖再吸収を担うグルコーストランスポーター-SGLT2 に注目し、SGLT2 を阻害する食品成分の探索評価系の構築および探索・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、食品機能分野の観点から糖尿病の予防・改善を目的に腎臓に発現する糖再吸収グルコーストランスポーター (SGLT2) に注目し、以下の具体的な目標をもって進めることとする。

- (1) ヒト SGLT2 をクローニングして発現ベクターを作成し動物培養細胞株に遺伝子導入してヒト SGLT2 高発現細胞株を構築し、安定なヒト SGLT2 活性評価系を確立する。
- (2) 構築した SGLT2 活性評価系を用いて、各種食品素材の中から SGLT2 を介したグルコース取込活性を抑制する食品因子を探索・解析する。

3. 研究の方法

(1) 酵素法を用いた SGLT2 活性の測定

SGLT2 活性測定には、グルコースアナログである 2-デオキシグルコース (2-DG) を用いた。2-DG は細胞内に取り込まれると、速やかにデオキシグルコース-6-リン酸 (DG6P) に代謝されることが知られている。96 ウェルプレートに反応酵素としてグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) や蛍光物質である resazurin を混合した反応溶液とともに 2-DG を取り込ませた後の細胞可溶化液を加えて 37 °C で一定時間インキュベートした。その後、励起 530nm 蛍光 600nm で蛍光強度を測定し、DG6P 量を定量することで細胞内に取り込まれた 2-DG 量を算出した。

(2) ヒト SGLT2 安定高発現 CHO 細胞株の構築

ヒト SGLT2 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なグルコース (2-DG) 取込活性の高いクローンを単離した。単離したクローンより RNA を抽出し、SGLT2 の mRNA 発現を RT-PCR 法により確認した。

(3) ヒト SGLT2 高発現 CHO 細胞株を用いた SGLT2 活性を阻害するフィトケミカルの探索

ヒト SGLT2 高発現細胞を 24 ウェルプレートに播種し、6 時間後に無血清培地に置換して培養を続けた。さらに 18 時間後に 2-DG 取込実験をおこなった。2-DG と同時にフィトケミカルを添加し、37 °C で一定時間インキュベートした後細胞を可溶化し、前述の酵素法を用いて SGLT2 活性を測定した。

(4) マウスを用いた SGLT2 活性評価試験

ICR マウス (雄、7 週齢) を用いることとし、1 週間予備飼育した後に SGLT2 阻害成分を経口投与するとともに、絶食を開始した。絶食開始後、0、1、2、4、6、12、24 時間後に採血し、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. 研究成果

(1) 酵素法を用いた SGLT2 活性測定系の構築

SGLT2 活性を測定するため、酵素法を用いて 2-DG を基質として用いる測定系の構築を進めた。2-DG は細胞内に取り込まれると速やかに DG6P に代謝されることから、まず DG6P の定量系を検討した。96 ウェルプレートに反応酵素として G6PDH や蛍光物質である resazurin を混ぜ合わせた反応溶液とともに DG6P を加えて 37 °C で一定時間インキュベートした。その後、励起 530nm 蛍光 600nm で蛍光強度を測定した。その際、使用する G6PDH の濃度や resazurin 濃度などの最適な条件を検討し、最適な測定条件を確立した。次に、2-DG を取り込ませた細胞の可溶化液

を用いて同様に測定し、DG6P 量を定量することで細胞内に取り込まれた 2-DG 量を算出し SGLT2 活性とした。

(2) ヒト SGLT2 安定高発現 CHO 細胞株の構築及び SGLT2 活性測定条件の最適化

ヒト SGLT2 遺伝子と抗生物質耐性遺伝子を含む哺乳細胞発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO-K1 にリポフェクション法にてトランスフェクションした。その後、動物培養細胞に毒性を示す抗生物質 G418 を添加し、薬剤選抜をおこなった。G418 存在下で生存した細胞をさらに限界希釈法を用いて 96 ウェルプレートの各ウェルにシングルクローンを形成できるように播種した。得られたシングルクローン約 100 個について、2-DG 取込活性を測定し、取込活性の比較的高い 8 個のクローンをピックアップし、さらにそれらのクローンについて SGLT2 を介したナトリウム依存的な 2-DG 取込活性を評価するためにナトリウムイオン存在下とナトリウムイオン非存在下での 2-DG 取込活性を比較した。その結果、最も高いナトリウム依存的 2-DG 取込活性 (SGLT2 活性) を示したシングルクローン (4B7) を得た。4B7 株における 2-DG 取込活性は SGLT 阻害剤であるフロリジンによって顕著に抑制され、SGLT2 を介した取込が示された。さらに 4B7 株より RNA を抽出して cDNA を合成し、RT-PCR をおこなったところ、4B7 株ではヒト SGLT2 のバンドが検出され、4B7 株における SGLT2 の mRNA 発現が確認された。

次に、4B7 株を用いて SGLT2 活性測定の最適条件を検討し、その結果細胞数 4.0×10^5 (cells/well) で播種、2-DG 濃度 2 mM、インキュベーション時間 10 分、という条件に決定した。

(3) ヒト SGLT2 高発現 CHO 細胞株を用いた SGLT2 活性を阻害するフィトケミカルの探索・解析

約 30 種類のフィトケミカルを用いて SGLT2 活性を阻害する食品成分を探索した。その結果、カテキン類の一種であるエピカテキンガレート (ECg) が SGLT2 活性を阻害することが見出された。そこで ECg に加えて他のカテキン類が SGLT2 活性に及ぼす影響を検討することとし、エピ型ではエピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、また非エピ型では、カテキン (C)、ガロカテキン (GC)、カテキンガレート (Cg)、ガロカテキンガレート (GCg) の計 8 種類について検討することとした。8 種類のカテキン類を 25 μ M で検討したところ、25 μ M ではガレート基をもつ ECg、EGCg、Cg、GCg の 4 種が 2-DG 取込阻害活性を有した。さらにこの 4 種について 10 μ M で検討したところ、ECg、EGCg は 2-DG 取込阻害活性がみられなかったのに対し、GCg では

弱い阻害活性がみられ、Cg に最も強い 2-DG 取込阻害活性がみられた。これより、最も SGLT2 阻害活性が高いカテキン類は Cg であることが明らかとなり、またカテキン類が SGLT2 活性を阻害するには、ガレート基を有することが必須であり、より強い阻害活性を示すには、非エピ型であること、B 環 5 位にヒドロキシ基がないことが示唆された。

さらに柑橘類に含まれるメトキシフラボノイドの一種でシークワーサーに多く含まれるノビレチンが、SGLT2 活性を阻害することが見出された。そこでノビレチンの構造類似体で温州みかんに多く含まれるタンジェレチンについて検討したところ、タンジェレチンではノビレチンほどの阻害活性はみられなかった。これより、SGLT2 活性の強い阻害にはノビレチンの B 環 3 位のメトキシ基が重要であることが示唆された。

以上の結果より、ガレート型カテキンおよびノビレチンは SGLT2 活性を阻害することが見出された。現在さらにマウスを用いて in vivo SGLT2 活性評価試験系を構築しつつある。In vivo の SGLT2 活性評価系を構築後、Cg あるいはノビレチンが実際に SGLT2 活性を抑制するか検討を進める予定である。

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 2 件)

Satsu, H., Molecular and cellular studies on the absorption, function, and safety of food components in intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81(3), 419-425 (2017), 査読有, (DOI: 10.1080/09168451.2016.1259552).
薩 秀夫, 食品成分による腸管上皮トランスポーターの制御, *BIO Clinica*, 31(12), 70-74 (2016), 査読無 (依頼総説).

[学会発表] (計 8 件)

鈴木大斗, Na⁺共輸送型グルコーストランスポーター-SGLT1 及び SGLT2 を制御するポリフェノールの探索・解析, 第 12 回トランスポーター研究会年会, 2017 年 7 月 8 日, 東北大学片平キャンパス (仙台).
薩 秀夫, フィトケミカルによるグルコーストランスポーターの制御・調節, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学 (京都).
Satsu, H., The absorption and physiological function of food-derived peptides in intestinal epithelial cells, The 4th International Academic Conference on Food-derived Peptides, 2016.5.22, Dongguan (China).
鈴木大斗, 腸管上皮グルコーストランスポーター-SGLT1 の阻害作用を有する野菜成分の探索, 第 70 回日本栄養・食糧学

会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学（西宮）。

武田博士、腎臓における糖再吸収トランスポーターSGLT2 活性の安定評価系の構築、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター（札幌）。

薩 秀夫、動物培養細胞を用いた食素材の機能性評価、次世代産業研究シーズカンファレンス 2016、2016年1月19日、イベント高崎（高崎）。

Satsu, H., Regulation of intestinal glucose transporter by phytochemicals. The 6th International Conference on Food Factors, 2015.11.23, COEX (Seoul).

薩 秀夫、腸管上皮グルコーストランスポーターSGLT1 を制御する食品成分探索評価系の構築及び解析、第10回トランスポーター研究会年会、2015年6月20日、（慶應義塾大学薬学部芝キャンパス（東京））。

〔図書〕(計3件)

薩 秀夫、シーエムシー出版、「 α -グルコシダーゼ活性阻害試験（第3章血糖値低下作用）in「機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集」（山本（前田）万里監修）2017年、76-78（分担執筆）。

鈴木大斗、シーエムシー出版、「SGLT1高発現 CHO 細胞をグルコース吸収抑制試験 2.1 2-DG を用いた酵素法」（第3章血糖値低下作用）in「機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集」（山本（前田）万里監修）2017年、79-84（分担執筆）。

薩 秀夫、シーエムシー出版、「SGLT1高発現 CHO 細胞をグルコース吸収抑制試験 2.2 放射性同位体を用いた活性測定法」（第3章血糖値低下作用）in「機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集」（山本（前田）万里監修）2017年、85-87（分担執筆）。

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