

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15262

研究課題名(和文) 消化管上皮細胞機能を調節する食品素材と生物活性成分の探索

研究課題名(英文) Search for the food material and the bioactive compound that modify the intestinal epithelial cell functions

研究代表者

加藤 英介 (Kato, Eisuke)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：40466446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：二型糖尿病を予防する新たな機能性食品開発の基礎を築くため、消化管細胞を標的とする食品成分の探索と機能解析を行った。その結果、プロアントシアニンやエピガロカテキンガレートとガロカテキンガレートが、消化管上皮細胞モデルであるCaco-2細胞の $\alpha$ -グルコシダーゼやその他の糖質消化吸収関連遺伝子の発現も抑制することを見出した。またその機能の一部は $\alpha$ -グルコシダーゼの発現を誘導する転写因子の発現低下が関わっていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二型糖尿病は日本を含めた世界各国で主要な健康問題として扱われており、人口の5-10%程度が患者であると推計されている。従って治療に加えて予防法が重要であり、その中でも機能性食品は重要な位置づけにある。本研究では、従来の糖尿病予防に寄与する機能性食品とは異なる作用で効果を発揮する食品成分を見出しており、その応用により新たな糖尿病予防食品の開発が期待できる。また学術的には食品成分の消化管に対する新たな働きを示したことになり、食品と消化管の関わりに関する理解の進展も期待できる。

研究成果の概要(英文)：To construct the basics for developing novel functional foods against type 2 diabetes mellitus, food derived compounds that target intestinal cells were searched and analyzed. Proanthocyanidins, epigallocatechin gallate, and gallic acid were found to decrease the expression of  $\alpha$ -glucosidase and other sugar digestion and absorption related genes of Caco-2 cells, a model of intestinal epithelial cell. In addition, at least a part of these functions were controlled by the reduction of transcription factors that induce the expression of  $\alpha$ -glucosidase.

研究分野：食品機能化学

キーワード：糖尿病 食品 ポリフェノール 消化管 グルコシダーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二型糖尿病は近年、日本を含めた世界各国の患者数が成人人口の 5-10%にも達し、世界保健機関 (WHO) でも主要な健康問題として扱われている。そのため二型糖尿病の治療や予防を目的とした研究は広く行われている。食事は二型糖尿病の発症と関わりが深く、重要な研究対象である。特に日本では、消化酵素を阻害して血糖値の上昇を抑制する食品素材中の生物活性成分が、糖尿病を防ぐ特定保健用食品 (トクホ) や機能性表示食品として活用されている。

研究遂行者はこれまでに、消化酵素の働きを阻害する食品素材と新規生物活性成分の探索、活性成分の機能解析、活性成分の構造的改良や応用利用を行ってきた。また研究成果の一部については、実用化に向けて企業との共同研究へも展開させている。しかし、このような食品素材中の消化酵素阻害成分は重要であるが、既に社会に還元されている成熟した研究でもある。従って、糖尿病対策食品の更なる発展には、これまで未注目である標的を選び、食品の新たな生物活性を発掘する必要がある。

本研究では消化管上皮細胞を標的として選定した。何故なら消化管上皮細胞は、糖尿病予防に重要な血糖値調節に係るグルコーストランスポーターや  $\alpha$ -グルコシダーゼを発現しており、かつ食品成分がそれらの発現調節に与える影響は解析されていないからである。解析されていない理由としては、消化管上皮細胞の寿命が一般に 1-2 日であり、食品成分による影響も短期間で消えてしまうからだと考えられる。しかし、消化管上皮細胞での消化酵素の発現量を低下させる生物活性成分や (*J. Nut. Biochem.* 2013, 24, 606)、消化管細胞の増殖を促進させる食品成分の報告はある (*Mol. Ther.* 2013, 21, 1345)。また、食事は毎日取るものであるため、寿命が短くとも消化管上皮細胞が食品成分の影響を受けることは十分期待できる。

### 2. 研究の目的

消化管上皮細胞は、 $\alpha$ -グルコシダーゼを生産して多糖を分解し、生成した単糖をナトリウム共役型グルコーストランスポーター 1 (SGLT1) により取り込み体内へと輸送する。この過程の結果、血糖値は上昇するため、糖尿病予防を目的とするならば  $\alpha$ -グルコシダーゼや SGLT1 の発現に影響を与える食品素材を研究すればいい。

本研究では準備段階でシソに消化管上皮細胞の  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現を抑制する生物活性を見出していたため、シソ抽出物中の  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現を抑制する生物活性物質の解明と機能解析を目的とした。また  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現を抑制するその他の素材、成分の探索、及び SGLT1 の発現を抑制する素材と生物活性物質の探索も目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を指標とした活性測定法

小腸上皮細胞モデルであり  $\alpha$ -グルコシダーゼ群を発現することが確認されているヒト由来 Caco-2 細胞株を用いて測定した。Caco-2 細胞をサンプルで刺激した後、サンプルを洗浄して除去した。この細胞の  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現量を簡便に測定する指標として、蛍光基質を用いて酵素反応を行い、酵素活性を代替指標とした。尚、サンプルの細胞毒性に由来する偽陽性結果を除くため、生細胞数測定キット (CCK-8、同仁化学研究所) により生細胞数も測定して毒性がないことも確認した。

#### 2) $\alpha$ -グルコシダーゼ発現量を指標とした活性測定法

被験物質を Caco-2 細胞培養液中に添加して一定期間培養後に mRNA を抽出し、逆転写後に  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。タンパク質についても抽出し、抗  $\alpha$ -グルコシダーゼ抗体を用いてウェスタンブロッティングにより発現量を測定した。

#### 3) 生物活性物質の単離と構造解析

生物活性物質の探索は 1) を主な指標として、2) を補助的に利用しながら行った。素材抽出物を各種カラムクロマトグラフにより活性を指標として精製した。精製した生物活性物質の構造解析は各種機器分析と誘導体化を併用して行った。

#### 4) 生物活性成分の機能解析

単離した生物活性成分の機能を解析するため、1) と 2) を用いた生物活性評価を行った。また関連遺伝子としてグルコーストランスポーター 2 (GLUT2)、グルコーストランスポーター 5 (GLUT5)、SGLT1、ラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ (LPH) や、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子 CDX-2、HNF-1 の発現への影響についてもリアルタイム PCR により評価した。

#### 3 - 5. 他の活性成分の探索

1) の手法を利用して、3) で同定した成分の関連成分より活性成分を探索し、その機能を解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) 食品素材からの $\alpha$ -グルコシダーゼ発現抑制活性物質の探索と機能解析

当初予定であったシソは、製品ロットにより活性に違いが見られたため、各種素材のスクリーニングを行いヘザーフラワー (*Calluna vulgaris* の花部) を新たに素材として選定した。ヘザーフラワー抽出物を Caco-2 細胞に添加すると、細胞膜上の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は優位に減少し (図 1)、またその際に  $\alpha$ -グルコシダーゼ mRNA、タンパク量の減少も確認された。活性を指

標としてヘザーフラワー抽出物を溶媒分配ののち、DIAION-HP20 を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、Cosmosil 75C18-OPN を用いた逆相カラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20 を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、InertSustain C18 を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製することで活性成分(CV-P)を単離することに成功した。

CV-Pの構造は、NMRとHPLC分析よりプロアントシアニジンと推定され、チオール分解分析法を用いることでその構成するフラバン-3-オール類と重合度を推定することができた(表1)。さらに、 $\alpha$ -グルコシダーゼ mRNA 発現量に対するCV-Pの影響を評価し、12.5から100  $\mu\text{g/mL}$ の範囲で濃度依存的にCaco-2細胞の $\alpha$ -グルコシダーゼ mRNA 発現量を低下させることを明らかとした(図2)。また100  $\mu\text{g/mL}$ のCV-Pを添加することで $\alpha$ -グルコシダーゼのタンパク質量についても優位に低下していることを確認した。

さらにCV-PのCaco-2細胞に対する機能を解析するため、 $\alpha$ -グルコシダーゼ以外で糖質の消化吸収に参与しているタンパク質としてGLUT2, GLUT5, SGLT1, LPHを選び、それらの遺伝子発現についても解析した。その結果、CV-PはGLUT5, SGLT1, LPHについても有意に発現を低下させることを明らかとした(図3)。また $\alpha$ -グルコシダーゼの発現を制御する転写因子の内、CDX-2とHNF-1の発現量解析も行うことで、こうしたCV-Pの作用には、HNF-1a,bの発現量低下が関与していると推定した(図4)。

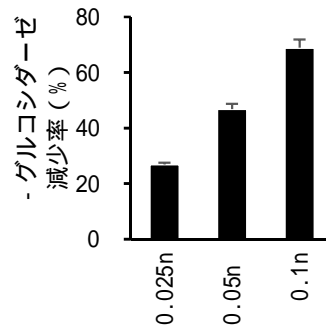


図1 ヘザーフラワー抽出物のCaco-2細胞 $\alpha$ -グルコシダーゼ量抑制活性。nは素材重量に依存した単位。

表1 CV-Pを構成するフラバン-3-オールと組成比

フラバン-3-オール	モル比(%)
カテキン(末端)	5.7
エピカテキン(末端)	3.6
カテキン(伸長部)	1.5
エピカテキン(伸長部)	69.3
エピガロカテキン(伸長部)	13.3
A型二量体(伸長部)	6.6
平均重合度	10.8

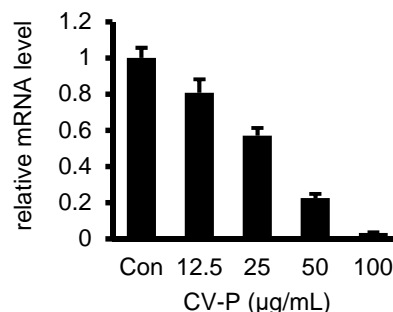


図2 CV-Pの添加によるCaco-2細胞の $\alpha$ -グルコシダーゼ発現量低下作用

## 2) その他の食品由来成分からの $\alpha$ -グルコシダーゼ発現抑制活性物質の探索

プロアントシアニジンであるCV-Pはフラバン-3-オール、つまりカテキン類の重合体であることから、カテキン類にも類似の作用が見いだせるのではないかと考えた。カテキン(C)、エピカテキン(EC)、ガロカテキン(GC)、エピガロカテキン(ECG)、エピカテキンガレート(EGC)、エピガロカテキンガレート(EGCG)の $\alpha$ -グルコシダーゼ発現抑制活性を測定したところ、ECGとEGCGを $\alpha$ -グルコシダーゼ発現抑制活性物質として見出した。ECG、EGCGの他の当消化吸収関連遺伝子に対する影響を評価したところ、CV-Pとは多少異なりGLUT2, GLUT5, SGLT1の発現を減少させ、LPHには影響しなかった(図3)。また発現を制御する転写因子に対しては、EGCGはHNF-1aに対して低下傾向を示し、HNF-1bは有意に減少させたが、ECGは影響しなかった(図4)。

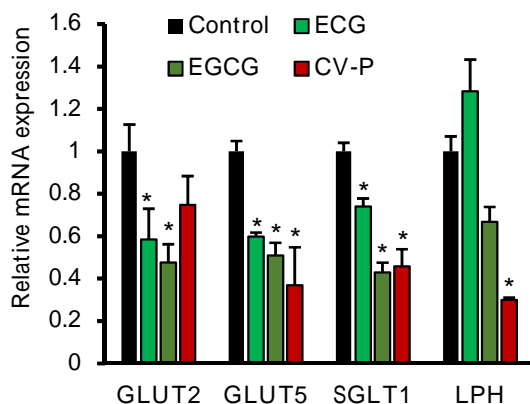


図3 消化吸収関連遺伝子の発現に対する生物活性物質の影響(\* $p < 0.05$ )

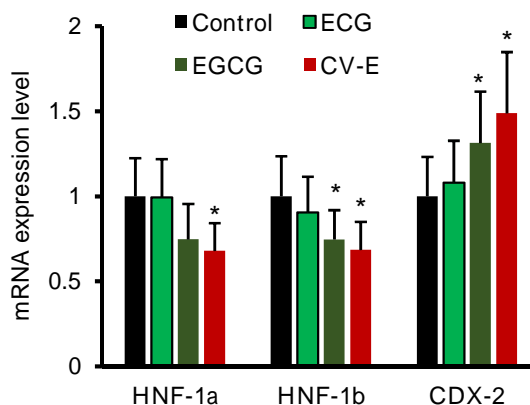


図4 転写因子の遺伝子発現に対する生物活性物質の影響(\* $p < 0.05$ )

### 3) 今後の展望

本研究では食品中の成分が消化管上皮細胞の遺伝子発現を調節し、栄養素の消化、吸収に影響するということが示された。本研究ではモデル細胞である Caco-2 のみを用いたため、今後正常細胞や実験動物レベルでの検証が必要であるが、見出した化合物は様々な植物性食品に含まれるプロアントシアニジンやカテキン類であるため、機能性食品として新しい作用を有する製品への応用が期待される。またこれら化合物がどのようにして遺伝子発現を調節しているかを今後明らかにしていくことで、食品と消化管との関わりの新たな面を明らかにできることも期待される。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計1件)

Eisuke Kato, Bioactive compounds in plant materials for the prevention of diabetes and obesity, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 2019, 83, 975-985  
DOI: 10.1080/09168451.2019.1580560

#### [学会発表](計8件)

Eisuke Kato, Investigation of bioactive principles in food/medicinal plant materials for development of FOSHU products, International Conference on Innovation, Entrepreneurship and Technology 2018, 2018.  
Kota Noda, Eisuke Kato, Jun Kawabata, Search for compounds suppressing intestinal alpha-glucosidase expression in Caco-2 cells, International Conference on Innovation, Entrepreneurship and Technology 2018, 2018.  
加藤 英介, 糖尿病、肥満予防を目的とした天然由来成分の探索と機能解析、公益社団法人日本農芸化学会 東北・北海道合同支部大会、2018  
野田 耕太, 加藤 英介, 川端 潤, *Calluna vulgaris* からの  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現量抑制物質の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018  
加藤 英介, 食用植物の抗肥満、抗糖尿病効果を分子レベルで理解するための生物活性成分の探索と機能解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018  
野田 耕太, 加藤 英介, 川端 潤, Caco-2 細胞をモデルとした消化管  $\alpha$ -グルコシダーゼ発現量抑制物質の探索、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017  
野田 耕太, 加藤 英介, 川端 潤, Caco-2 細胞をモデルとした消化管  $\alpha$ -グルコシダーゼ量の測定と発現抑制素材の探索、日本農芸化学会 2017 年度京都大会、2017

### 6. 研究組織

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。