

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11720

研究課題名(和文) 食品因子の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の解明と抗肥満効果の検証

研究課題名(英文) Research on leptin secretion-stimulating action from gastric mucosal cells and its anti-obesity effects by food factor

研究代表者

赤川 貢 (Mitsugu, Akagawa)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70405356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レプチンは食欲抑制とエネルギー消費増大をもたらす抗肥満ホルモンであり、主に脂肪細胞から分泌されるが、近年になって胃粘膜細胞からも分泌されることが明らかにされた。しかし、胃粘膜細胞のレプチン分泌を刺激する食品因子は未解明のままであった。そこで、研究代表者はラット由来正常胃粘膜細胞RGM1を用いてレプチン分泌を刺激する抗肥満食品因子を探索した。その結果、主要な緑茶カテキンである epigallocatechin-3-o-gallate (EGCG) が顕著にレプチン分泌を刺激することを見出した。また、マウスへのEGCGの経口投与によって胃液中のレプチン濃度が上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって食品因子による胃粘膜細胞のレプチン分泌刺激作用とその機構が初めて解明された。また、食によるレプチンの分泌制御という新規の食品機能性を確立することができた。本研究の達成により、肥満を発症基盤とする多くの生活習慣病の予防・改善にも貢献しうることから、国民生活への反映、および波及効果は、極めて大きいものである。

研究成果の概要(英文)：Leptin is a weight-reducing hormone produced by adipose tissue and gastric mucosa, which decreases food intake via its hypothalamic receptor. Onset of food intake triggers a rapid release of leptin into the gastric lumen from gastric mucosa, and increases plasma leptin level. Gastric leptin participates in the short term regulation of food intake. However, little is known about food factors that stimulate leptin secretion from gastric mucosa. In this study, we searched for anti-obesity food ingredients that stimulate leptin secretion from cultured gastric mucosal cells. We exposed about 50 food ingredients to rat gastric mucosal cells (RGM1) and evaluated leptin secretion. Consequently, we found that epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), a major green tea catechin, greatly stimulates leptin secretion from RGM1 cells. Moreover, we demonstrated that oral administration of EGCG increased the level of leptin in gastric juice.

研究分野：食品機能化学

キーワード：leptin obesity catechin polyphenol green tea

### 1. 研究開始当初の背景

世界的に蔓延する肥満は、糖尿病、脂質異常症、高血圧等の生活習慣病の発症基盤であり、深刻な健康問題となっている。本課題で着目した「レプチン」は、視床下部に作用して食欲を抑制するとともに代謝を亢進して体重を減少させる抗肥満ホルモンとして知られる。当初、レプチンを分泌するのは脂肪細胞だけとされていたが、胃粘膜細胞もレプチンを分泌することが発見され、摂食に応答して迅速に血中レプチン濃度を上昇させ、食欲抑制と代謝亢進を誘導することが示唆されている。しかしながら、胃粘膜細胞に対してレプチン分泌を刺激する食品因子は未同定であり、その分泌機構も未解明のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、胃粘膜細胞のレプチン分泌を刺激する食品因子を探索・同定し、その分泌刺激機構を分子レベルで解明することを目的とした。また、その抗肥満効果を *in vivo* 試験で実証することで新規の食品機能性を確立し、肥満の予防・改善に資する高機能性食品の創製を目指した。

### 3. 研究の方法

ラット由来正常胃粘膜細胞 RGM1 を用いてレプチン分泌を刺激する抗肥満食品因子を探索した約 50 種の食品因子を RGM1 細胞に曝露し、レプチン分泌量をサンドイッチ ELISA によって測定した。細胞内カルシウムイオンの濃度変化は、蛍光性カルシウムイオンプローブである Fluo 8 AM を用いて蛍光プレートリーダーを使用して分析した。遺伝子のノックダウンは siRNA 法を用いて実施した。また、レプチン分泌刺激作用が認められた食品因子をマウスに経口投与し、胃液中のレプチンレベルをウェスタンブロット法によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 食品因子のスクリーニングとレプチン分泌刺激機構の解析

食品因子のスクリーニングの結果、主要な緑茶カテキンである (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) が顕著にレプチン分泌を刺激することを見出した。RGM1 細胞に EGCG (0~50  $\mu$ M) を曝露し、レプチン分泌量と細胞内レプチン量を評価した結果、5 分間の曝露でレプチン分泌が刺激されて、EGCG 濃度依存的な分泌の促進が観察された (図 1)。同様に細胞内レプチン量をウェスタンブロット法によって評価した。その結果、5 分間の曝露でレプチンの分泌が刺激され、細胞内レプチン量の減少も認められた。

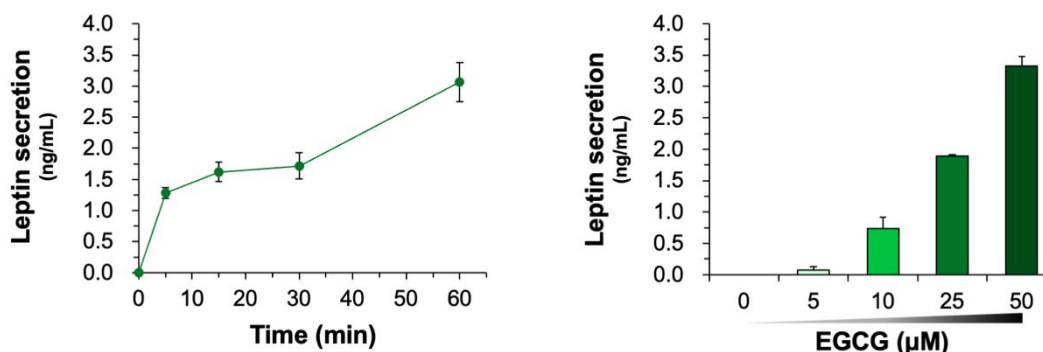


図 1. EGCG による RGM1 細胞のレプチン分泌刺激

また、細胞内のカルシウムイオン濃度変化を測定したところ、EGCG 曝露直後にカルシウムイオン濃度の急激な上昇が観察された。さらに、カテキン受容体として知られる 67-kDa laminin receptor (67LR) のレプチン分泌刺激への関与を検証した。その結果、67LR のノックダウンが EGCG のレプチン分泌刺激および細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を顕著に減弱した。したがって、EGCG が胃粘膜細胞の 67LR を介して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を誘導し、レプチン分泌を刺激する分子機構が推定された。EGCG が 67LR に結合すると、adenylate cyclase (AC) および exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の活性化を介して phospholipase c (PLC) が活性化する経路が存在するため、AC の阻害剤 2',5'-dideoxyadenosine を処理したところ、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とレプチンの分泌が顕著に抑制された。また、Epac の阻害剤 ESI09 を処理した際も、同様の結果が得られた。67LR は Akt/ endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/soluble guanylate cyclase (sGC) 経路を活性化することが報告されている。この経路を介して PLC が活性化する経路も存在するため、RGM1 細胞に EGCG を曝露し、細胞内の Akt の活性化を評価した。その結果、EGCG 処理によって Akt のリン酸化が顕著に促進されることが明らかとなった。次に、sGC の阻害剤 NS2028 を RGM1 細胞に前処理したところ、EGCG による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とレプチン分泌刺激が顕著に

抑制された。さらに、AC および sGC の下流の protein kinase A (PKA) の阻害剤 H89 を処理した際も、同様の結果が得られた。本研究より、主要な緑茶カテキンである EGCG は 67LR を介して、AC/cAMP/Epac 経路および Akt/eNOS/NO/sGC/PKA 経路の活性化を経て PLC を活性化し、小胞体カルシウムイオンの放出を誘導してレプチンの分泌を刺激する機構が推定された。

#### (2) in vivo 試験によるレプチン分泌刺激の評価

マウスに EGCG を経口投与し、5 分後に胃液を回収してレプチンレベルをウェスタンブロット法により解析した。その結果、EGCG の経口投与によって有意に胃液レプチン量が増加することを確認した (図 2)。

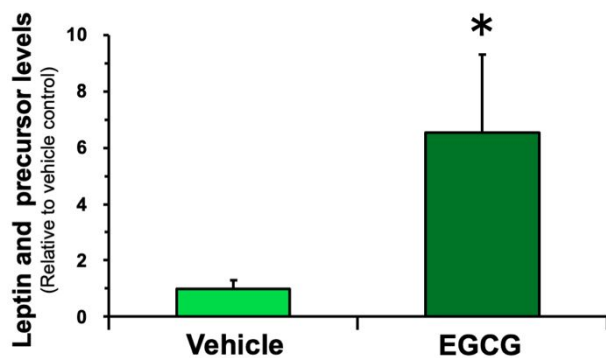


図 2. EGCG の経口投与による胃液レプチン濃度の上昇

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐々木 知里、太田 裕基、石井 剛志、向井 克之、赤川 貢
2. 発表標題 (-)-Epigallocatechin-3-O-gallateの胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の解明
3. 学会等名 第59回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永良 祐樹、赤川 貢、内藤 健太郎
2. 発表標題 アカメガシワ由来ポリフェノール、ベルゲニンのSIRT1/PGC-1 経路を介したミトコンドリア新生促進作用の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早川 諒、中川 侑紀、飯泉 陽介、石井 剛志、芦田 均、赤川 貢
2. 発表標題 フェニルホウ酸誘導体との親和性を利用したフラボノール標的タンパク質の網羅的分析法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chisato Sasaki, Hiroki Ota, Takeshi Ishii, Katsuyuki Mukai, Akinobu Matsuyama, Mitsugu Akagawa.
2. 発表標題 (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate stimulates leptin secretion from gastric mucosal cells via 67-kDa laminin receptor/Ca <sup>2+</sup> signaling.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Nakagawa, Yosuke Iizumi, Takeshi Ishii, Hitoshi Ashida, and Mitsugu Akagawa.
2. 発表標題 A systematic and comprehensive analytical strategy to identify quercetin-modified proteins.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 赤川 貢、内田 浩二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 茶ポリフェノールの生理機能と応用展開 “化学修飾タンパク質の生成と機能”	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------