

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500792

研究課題名（和文） コーヒーのエストロゲン硫酸抱合の阻害と生活習慣病予防効果との相関

研究課題名（英文） Study for the correlation between lifestyle-related diseases and the inhibition of estrogen sulfo-conjugation by coffee.

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

研究成果の概要（和文）：コーヒーの焙煎成分が、ヒト消化管モデル Caco-2 細胞におけるエストロゲンの硫酸抱合反応を強く阻害することを見出し、この阻害活性がコーヒー摂取の習慣による生活習慣病予防効果と相関があるのではないかという仮説を立てた。デカフェインスタントコーヒー 1kg より、その阻害成分の分離・同定を行ったところ、分子量 205(C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) の新規含窒素芳香族化合物であった。また、コーヒー成分が、Caco-2 細胞におけるエストロゲン代謝に関わる酵素群(SULT1E1, sulfatase, BCRP)の遺伝子発現に影響を与えることを見出し、そのメカニズムを解析した。

研究成果の概要（英文）：We found that components in roasting coffee strongly inhibit the sulfate conjugation of estrogen in the cell model of human gastrointestinal tract, Caco-2. We hypothesized that this inhibitory effect of coffee on the estrogen sulfation is correlated to the preventive effect of daily coffee consumption on lifestyle-related diseases. To demonstrate this hypothesis, we tried to purify and identify the inhibitory components of coffee. From 1kg decaffeinated instant coffee, we succeeded in purification and identification of the component. The component has a novel nitrogen-containing aromatic structure (MW. 205, C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>). We also found that components in coffee affect gene expression of proteins involved in estrogen metabolism (SULT1E1, sulfatase, and BCRP), and analyzed the mechanism underlying the phenomenon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：生活習慣病、コーヒー、硫酸抱合、エストロゲン、消化管

## 1. 研究開始当初の背景

近年、コーヒーの習慣的な摂取が、肥満、2型糖尿病、高脂血症、大腸がん、肝がんなどの生活習慣病を予防する効果があること

が疫学調査から明らかとなっている。このコーヒーの生活習慣病予防効果のメカニズムは不明な点が多い。我々は、ヒト消化管モデル細胞において、コーヒーがエストロゲンの

硫酸抱合反応を阻害することを見出し、この阻害活性が、生活習慣病予防効果と相関があるという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

コーヒーによるエストロゲン不活性化反応の阻害とそのメカニズムおよび生活習慣病予防との関係を明らかにするために、まず、コーヒーよりその阻害成分を単離・精製し、同定する。それを用いて、エストロゲン代謝への影響、さらに生活習慣病予防効果があるかどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) コーヒーの抽出は、コーヒー豆 (Arabica 種) 10g を熱湯 (95 ) 140mL で紙フィルター抽出したものを 100% コーヒーとした。

(2) ヒト消化管モデル Caco-2 細胞は, DMEM +10%FBS 培地で 3 週間培養した。コーヒーによる処理は、培地に 0-5% (v/v) コーヒーを添加し 24 時間で行った。

(3) エストロゲン (17β -estradiol: E<sub>2</sub>) の硫酸抱合反応は、20nM [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> を培地に添加し、2 時間後の培地中の E<sub>2</sub> 硫酸抱合体を定量して求めた。

(4) 阻害成分の分離・精製は、デカフェインスタントコーヒー 1kg より, E<sub>2</sub> 硫酸抱合反応の阻害活性を指標とし、種々のクロマトグラフィーを用いて行った (図 1)。

(5) microRNA 発現の解析は、コーヒー添加 0% と 2.5% で 24 時間処理した細胞より低分子 RNA を調整し、Hy5 標識を行い、human miRNA チップを用いて hybridization を行い、発現強度を比較した。

## 4. 研究成果

(1) コーヒーによる E<sub>2</sub> 硫酸抱合反応の阻害は、デカフェインスタントコーヒー中にも同じ程度検出されたので、デカフェインスタントコーヒー 2L (1 kg) より酢酸エチル抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、ダイアイオンカラム、逆送ローバーカラム、LH20 カラム等を用いて分離・精製を行った (図 1,2)

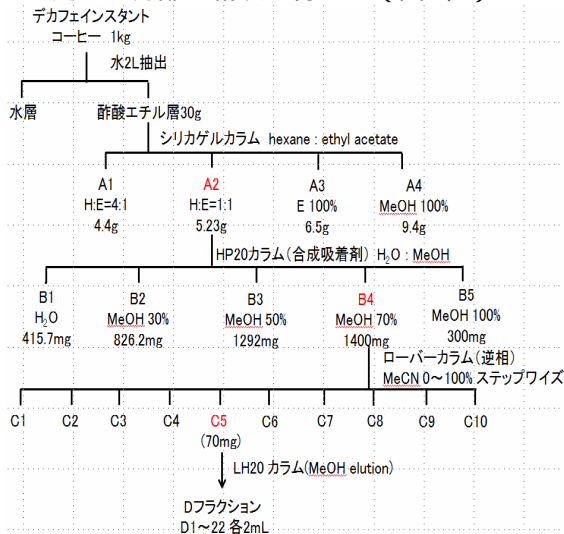


図1 エストロゲン硫酸抱合阻害活性成分の分画

その結果、分子量 204 の新規窒素含有芳香族化合物 (化学式 ; ) を得た。この新規化合物が、エストロゲン硫酸抱合阻害を担うものかどうかを確認するため、この化合物の合成

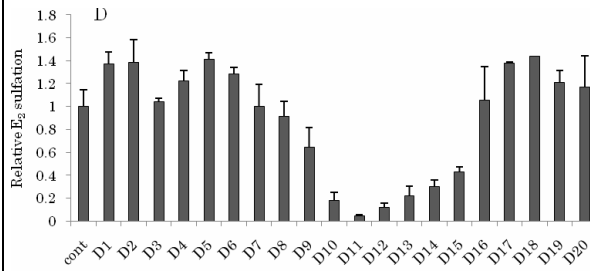


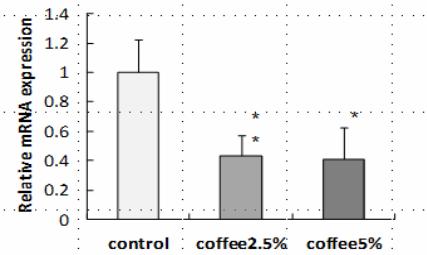
図2 Dフラクションの分画

を試みた。現在、最終ステップに至っている。今後、合成した化合物に活性があることを確認し、モデル疾患動物を用いて、生活習慣病予防効果を検討する予定である。

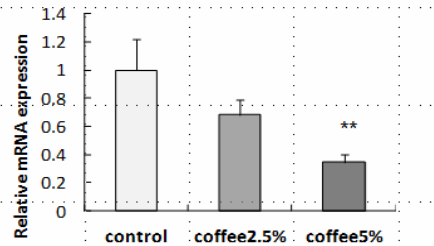
(2) 我々は、コーヒーの焙煎で生成する成分が、Caco-2 細胞におけるエストロゲン代謝に関わる酵素群 (SULT1E1, sulfatase, BCRP) の遺伝子発現に対して影響を与えることを見出した (図 3)。

図3 コーヒーによるエストロゲン代謝関連酵素遺伝

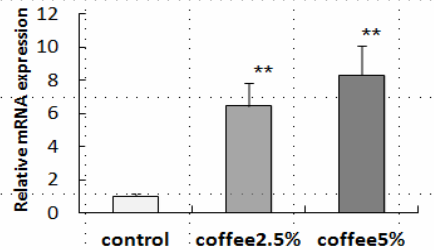
### (A) SULT1E1



### (B) STS



### (C) BCRP



子の発現制御

この遺伝子発現の変化に呼応して、各酵素タンパク質の活性が変化していることも確認できた。

また、コーヒー中の遺伝子発現調節因子は、コーヒーの焙煎により生じることを明らかにした(図4)。

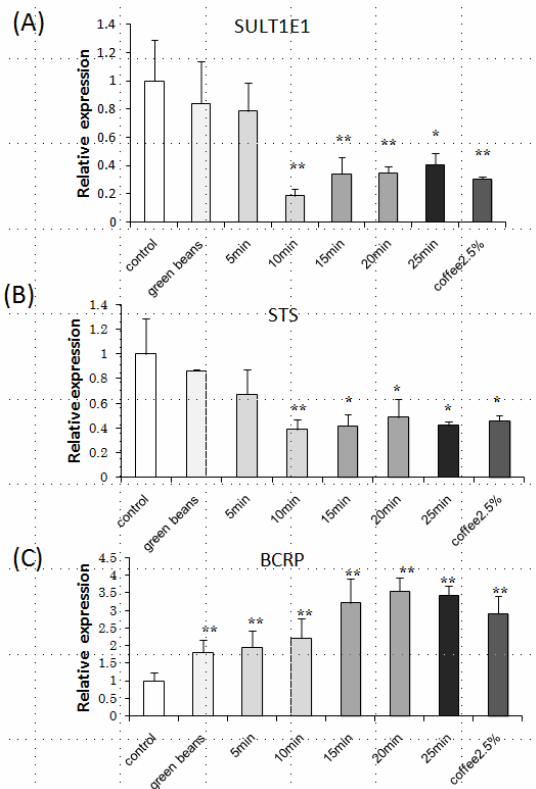


図4 焙煎による転写制御活性の生成

(3) コーヒーによる遺伝子発現の制御機構の解析の結果、BCRPの遺伝子発現は、転写因子 NF-kB を介することを、阻害剤 DHMEQ の効果、ChIP アッセイおよび核移行により調べ明らかにした。(図5)。

図5 コーヒーによる NF-kB の核移行

また、コーヒーによる SULT1E1 の発現抑制が mithramycin 処理により阻害されることから、転写因子 Sp1 の関与、もしくは、DNA のメチル化阻害の可能性が示唆された(図6)。

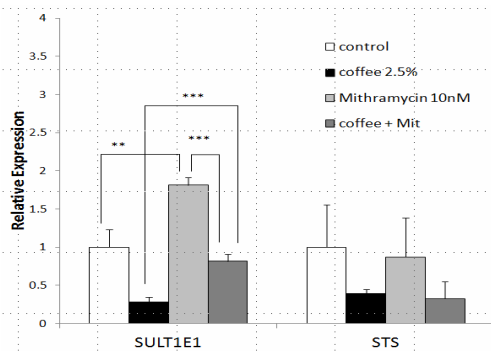


図6 mithramycin による SULT1E1 発現阻害への効果

(4) Caco-2 細胞における遺伝子発現に対するコーヒーの効果の分子基盤をさらに検討するため、コーヒー添加による microRNA の発現変動を調べた。その結果、数種の miRNA の発現が大きく変動した。変動した miRNA の標的遺伝子には、NF-kB へのシグナル伝達因子 TRAF6 や発がん遺伝子 K-ras が含まれ、この miRNA の発現に対する効果が、コーヒーの生活習慣病予防効果と関連する可能性が示唆された(図7)。

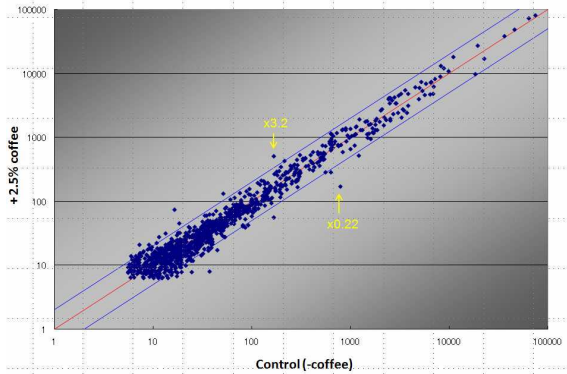
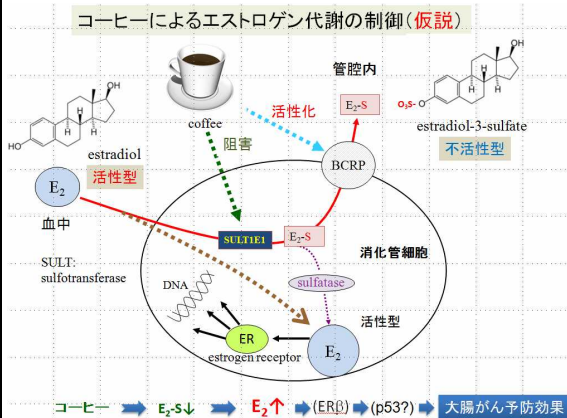


図7 コーヒーによる microRNA の発現変動

(5) 以上の結果から、Caco-2 細胞におけるエストロゲン代謝に対するコーヒーの効果は、下図のような仮説としてまとめることができる。



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5件)

田村悦臣. ヒト消化管を用いた in vitro 試験の有用性と課題について考える. HAB NEWS LETTER、査読無、16 巻 No.1, 2009, 7-8. <http://www.hab.or.jp/>  
 Kushida A. Hattori K. Yamaguchi N. Kobayashi T. Tamura H. Sulfation of

estradiol in human epidermal keratinocyte. Biol. Pharm. Bull. 査読有, 34(7), 2011, 1147-1151.

<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.1147>

Isshiki M, Umezawa K, Tamura H. Coffee induces breast cancer resistance protein expression in Caco-2 cells. Biol. Pharm. Bull. 査読有, 34(10), 2011, 1624-1627.

<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.1624>

Arao T, Tamura H. Coffee induces 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human placental choriocarcinoma cells, JEG-3. J. Health Sci., 査読有, 57(5), 2011, 436-441.

<http://dx.doi.org/10.1248/jhs.57.436>

Hattori K, Yamaguchi N, Umezawa K, Tamura H. Interferon gamma induces steroid sulfatase expression in human keratinocytes. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 35(9), *in press*, 2012.

〔学会発表〕(計 7 件)

Hiroomi Tamura, Coffee induces 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in cultured human placental trophoblast JEG-3. 7th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition. 2011.6.5. Bangkok, Thailand.

一色真里奈, 田村悦臣. 消化管モデル Caco-2 細胞のエストロゲン硫酸抱合に対するコーヒーの影響. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 2010.10.5. 東京.

一色真里奈, 田村悦臣. ヒト消化管モデル Caco-2 細胞のエストロゲン代謝に対するコーヒーの影響. 日本薬学会第 130 年会. 2010.3.30. 岡山.

一色真里奈, 田村悦臣. コーヒーによるヒト消化管モデル Caco-2 細胞における BCRP 発現誘導. 日本薬学会第 131 年会. 2011.3.30.

田村悦臣. コーヒーによるステロイド代謝調節を介した予防薬学の可能性. 第 4 回食品薬学シンポジウム. 2011.10.29. 東京.

青柳良平, 服部研之, 伊達朗, 田村悦臣. ヒト表皮三次元培養モデルにおけるコーヒーの表皮分化マーカー発現誘導効果. 日本薬学会 第 132 年会. 2012.3.29. 札幌.

太田 遥香, 一色 真里奈, 木島 文, 梅沢 一夫, 田村悦臣. Caco-2 細胞における BCRP 発現に対するコーヒーの効果. 日本薬学会第 132 年会. 2012.3.30. 札幌.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://foodscience.keio.ac.jp/profile-tamura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村悦臣 (TAMURA HIROOMI)

慶応義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 50201629