

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350169

研究課題名(和文)新規に樹立した活性型グレリン産生・分泌細胞株の抗肥満機能性食品開発への応用

研究課題名(英文)Development of functional food ingredients with anti-obesity effect using a novel active-ghrelin-secreting cell line

研究代表者

仮屋 博子 (KARIYAZONO, HIROKO)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20437958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換えによって作製したグレリン分泌細胞AGS-GHRL8を用い、摂食亢進作用を有する活性型グレリンの産生・分泌抑制物質を探索した結果、食品含有脂肪酸のステアリン酸、オレイン酸、リノール酸および-リノレン酸、植物含有成分のウルソール酸、コロソリン酸、グリチルレチン酸およびエピガロカテキン没食子酸がその候補に挙げられた。オレイン酸を2週間経口投与した通常食摂取マウスの血中活性型グレリン濃度は、非投与群に比し著しく低く、細胞実験で得た結果と一致した。オレイン酸の抗肥満機能性の可能性ならびに抗肥満機能性食品開発におけるAGS-GHRL8細胞の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：An active ghrelin secreting cell line, AGS-GHRL8, was established by transfecting ghrelin cDNA into AGS cells originating from human gastric carcinoma. Culture of AGS-GHRL8 cells in the presence of octanoic acid caused the secretion of octanoylated (active) ghrelin. To explore the molecules suppressing active ghrelin secretion, we examined the potential of several food ingredients using AGS-GHRL8 cells. Subsequently, we observed that in addition to common dietary fatty acids such as stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and γ -linolenic acid, a range of plant-derived molecules such as ursolic acid, corosolic acid, glycyrrhetic acid and epigallocatechin gallate suppressed active ghrelin secretion. Treatment of mice with oleic acid for two weeks lowered the circulating levels of active ghrelin. These results indicate the promising use of oleic acid as an anti-obesity agent and demonstrate the utility of AGS-GHRL8 cells in screening candidate inhibitors of active ghrelin production.

研究分野：医療系薬学

キーワード：グレリン 脂肪酸 オレイン酸 AGS-GHRL8細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満症ならびに肥満を発症基盤とする糖尿病、脂質異常症、高血圧症などの生活習慣病やメタボリックシンドロームの患者が増加している。肥満は、食事療法や運動療法を基本に、摂取エネルギーが消費エネルギーを上回らないようにすること、過食を防ぐことにより、理論的には改善・予防できる。しかしながら、このような方法で減量に成功する肥満症の例は少なく、有効な治療法の開発が望まれてきた。一方、市中には、健康増進および美容保持のための肥満の改善を謳った種々のダイエット用食品・サプリメントが氾濫している。

グレリンは、摂食亢進作用を有する 28 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンである。その活性発現には N 末端から 3 番目のアミノ酸であるセリン残基の側鎖が脂肪酸のオクタン酸でアシル化修飾を受けていることが必須であること、そのアシル化を触媒する酵素は、グレリンのオクタン酸転移酵素 (ghrelin O-acyl transferase: GOAT) であること、循環血液中には活性型のオクタン酸アシル化グレリンとともにその数十倍の濃度にのぼるデスアシル型グレリンが存在していることが知られている。

我々は、活性型グレリンの産生・分泌を抑制することにより摂食亢進を抑え、肥満の予防・改善に貢献できると考え、活性型グレリン産生・分泌の *in vitro* 評価系の構築を試みた。グレリンは主として胃で産生されることから、GOAT の発現が確認されたヒト胃がん細胞 AGS から遺伝子組換えによってグレリンの強制発現細胞 AGS-GHRL8 を単離した。AGS-GHRL8 細胞は、AGS 細胞では確認できなかったデスアシルグレリンの分泌が確認されるとともに、培地へのオクタン酸の添加によりオクタン酸濃度依存的な活性型グレリンの増加ならびに活性型グレリンの数十倍高濃度のデスアシルグレリンの分泌が確認された。このことから、AGS-GHRL8 細胞はオクタン酸アシル化の機構を有しており、活性型グレリンの産生・分泌の *in vitro* 評価系として有用であることが示された。

マウスを用いた先行研究において、グレリンの脂肪酸修飾は食餌として摂取した脂肪酸が直接アシル転移されて起こることが示されていたことから、同研究で用いられたヘプタン酸をオクタン酸とともに AGS-GHRL8 細胞の培地に添加し、培養後の培地中活性型グレリン濃度を測定した結果、オクタン酸添加による活性型グレリンの増加がヘプタン酸濃度依存的に抑制された。

以上のことから、AGS-GHRL8 細胞評価系を用いて活性型グレリンの産生・分泌を抑制する物質の探索を行い、肥満に関連した各種疾患の予防を目指した抗肥満性機能性食品の開発を最終目標とする研究に着手した。

2. 研究の目的

ヒト胃がん細胞 AGS から遺伝子組換えによって作製したグレリンの安定発現株 AGS-GHRL8 細胞は、摂食亢進活性を示す活性型グレリンに必須のオクタン酸の取り込み及びオクタン酸アシル化の機構が機能しており、*in vitro* における活性型グレリン産生の評価系としての有用性が高いと考えられる。本研究では、活性型グレリンの産生を阻害する食品成分の探索に本細胞を活用し、候補成分を動物に投与してその効果を検証し、抗肥満機能性食品の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AGS-GHRL8 細胞評価系を用いた活性型グレリン産生・分泌抑制物質の探索

AGS-GHRL8 細胞は、10%FBS 添加 D-MEM 培地中、37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。

各試験物質の活性型グレリン産生・分泌抑制効果を検討する濃度を設定するために、細胞生存率に及ぼす影響を調べた。

上記で設定した濃度の試験物質をオクタン酸とともに AGS-GHRL8 細胞の培地に添加し、24 時間培養後の培地中活性型グレリン濃度を ELISA で測定することにより、試験物質の活性型グレリン産生・分泌抑制作用を評価した。ELISA 用サンプル培地には、1/10 容量の 1mol/L 塩酸を添加した。

試験物質は、食品含有の各種脂肪酸および植物含有成分とした。脂肪酸は、酢酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸および-リノレン酸を用いた。植物含有成分は、ピワ葉・バナバ葉に含まれるウルソール酸およびコロソリン酸、甘草に含まれるグリチルレチン酸、緑茶に含まれるエピガロカテキン没食子酸を用いた。

(2) マウスを用いた抗肥満効果の検証

マウス血漿中活性型グレリンの測定

6 週齢の C57BL/6J 雄性マウスは、室温、12 時間の明暗サイクル条件下、通常食餌で飼育した。AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリンの産生・分泌を抑制した物質を 2 週間経口投与後、血漿中活性型グレリン濃度を ELISA で測定し、対照群のそれと比較した。対照群のマウスには試験物質の溶媒を投与した。両群ともに、投与終了後心採血によって得た血液から血漿を分離し、1/10 容量の 1mol/L 塩酸を添加したものを ELISA 用サンプルとした。

マウス胃のグレリン mRNA 発現量の測定

試験物質あるいはその溶媒を投与したマウスから胃組織を採取し、RNA を抽出後、逆転写反応を行い、リアルタイム PCR によりグレリン mRNA 発現量を測定した。

これらの実験は、長崎国際大学薬学部研究等倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生・分泌に及ぼす各種脂肪酸の影響

AGS-GHRL8 細胞の生存率に及ぼす食品含有各種脂肪酸の影響を調べた。酢酸、オレイン酸、リノール酸および α -リノレン酸は、100 μ M において細胞生存率に影響を及ぼさなかったことから、試験濃度を 50 μ M および 100 μ M に設定した。ステアリン酸は、50 μ M では細胞生存率に影響しなかったが、100 μ M では約 50% と有意に低下したことから、試験濃度を 50 μ M とした。AGS-GHRL8 細胞をオクタン酸およびこれら食品含有各種脂肪酸とともに培養し、培地中の活性型グレリン濃度を測定した結果、100 μ M の酢酸は、オクタン酸による活性型グレリン濃度の上昇に変化を及ぼさなかったが、50 μ M のステアリン酸、50 μ M と 100 μ M のオレイン酸、リノール酸および α -リノレン酸は、有意に抑制した。100 μ M のオレイン酸による抑制率はほぼ 100% であった (図 1)。

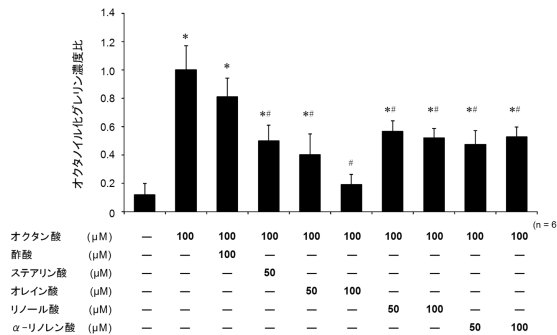


図 1 AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン分泌に及ぼす食品含有脂肪酸の影響
平均 \pm 標準偏差、* p <0.01 vs. 未処置
p <0.01 vs. オクタン酸 100 μ M

(2) AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生・分泌に及ぼす植物含有成分の影響

植物含有成分の試験濃度も各種脂肪酸と同様に AGS-GHRL8 細胞の生存率を測定することにより、次のようにそれぞれ設定した。ウルソール酸は 6.25 および 12.5 μ M、コロソリン酸は 12.5 および 25 μ M、グリチルレチン酸ならびにエピガロカテキン没食子酸は 50 および 100 μ M とした。ウルソール酸、コロソリン酸、グリチルレチン酸およびエピガロカテキン没食子酸とともに、濃度依存的に AGS-GHRL8 細胞のオクタン酸による活性型グレリン濃度の上昇を抑制した。

(3) マウス血漿中活性型グレリン濃度に及ぼすオレイン酸の影響

AGS-GHRL8 細胞を用いたスクリーニングにより、活性型グレリン産生・分泌抑制候補物質となったオレイン酸のエステル体 (オレイ

ン酸エチル) をマウスに 300mg/kg/日、2 週間経口投与し、摂食量、体重増加の程度、活性型グレリンの血中濃度および胃のグレリン mRNA の発現強度を調べた。対照群のマウスにはオレイン酸の溶媒に用いた 5% アラビアゴム溶液を投与した。オレイン酸投与マウスの血漿中活性型グレリン濃度は、対照群マウスのそれより有意に低かった (図 2)。摂食量、体重増加の程度および胃のグレリン mRNA の発現強度には両群間で差がなかった。

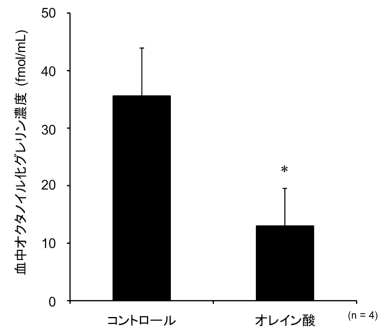


図 2 マウスの活性型グレリン血漿中濃度に及ぼすオレイン酸投与の影響
平均 \pm 標準偏差
* p <0.05 vs. コントロール

(4) まとめ

オレイン酸投与マウスの血中活性型グレリン濃度は対照群マウスのそれより低く、AGS-GHRL8 細胞で得られた結果と一致したことから、活性型グレリン産生・分泌阻害物質の探索における AGS-GHRL8 細胞を用いた評価系の有用性が確認されるとともに、オレイン酸含有食品の活性型グレリン産生・分泌抑制を介した抗肥満機能が期待された。オレイン酸投与マウスの胃のグレリン mRNA の発現は対照群マウスと差がなかったことから、血中活性型グレリン濃度の低下はグレリンの翻訳後修飾の過程の変化によるものと考えられた。

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)

飯屋園博子、大磯茂、中島健輔、グレリン分泌抑制成分探索のための細胞評価系の構築と成分探索. Foods & Food Ingredients Journal of Japan. 査読無、2016; 21(2): 88-93.

Oiso S, Nobe M, Iwasaki S, Nii W, Goto N, Seki Y, Nakajima K, Nakamura K, Kariyazono H. Inhibitory effect of oleic acid on octanoylated ghrelin production. Journal of Oleo Sciences.

査読有, 2015; 64(11): 1185-1192. doi: 10.5650/jos.ess15137.

Oiso S, Morinaga O, Goroku T, Uto T, Shoyama Y, Kariyazono H. Generation of an anti-dabigatran monoclonal antibody and its use in a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for serum dabigatran. Therapeutic Drug Monitoring. 査読有, 2015; 37(5): 594-599. doi: 10.1097/FTD.000000000000184.

Iwase H, Kariyazono H, Arima J, Yamamoto H, Nakamura K. Nutritional effect of oral supplement enriched in -3 fatty acids, arginine, RNA on immune response and leukocyte-platelet aggregate formation in patients undergoing cardiac surgery. Nutrition and Metabolic Insights. 査読有, 2014; 7: 39-46. doi: 10.4137/NMI.S13810.

Iwase H, Oiso S, Kariyazono H, Nakamura K. Biological effects of the plasticizer tris (2-ethylhexyl) trimellitate. Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics. 査読有, 2014; S2: 004. doi:10.4172/2167-065X.S2-004.

Oiso S, Takayama Y, Nakazaki R, Matsunaga N, Motooka C, Yamamura A, Ikeda R, Nakamura K, Takeda Y, Kariyazono H. Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells. Oncology Reports. 査読有 2014; 31(2): 719-726. doi: 10.3892/or.2013.2896.

[学会発表](計 18 件)

大磯茂、野邊みゆき、岩崎集平、後藤夏美、関夕佳里、中島健輔、中村和男、仮屋園博子、オクタノイル化グレリン産生に及ぼす脂肪酸の影響、日本薬学会第 136 年会、平成 28 年 3 月 26 日-29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

中島健輔、大磯茂、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、中村和男、仮屋園博子、活性型グレリン産生抑制作用を有する天然化合物の探索、第 32 回日本薬学会九州支部大会、平成 27 年 11 月 28 日-29 日、九州保健福祉大学 (宮崎県・延岡市)

Oiso S, Nobe M, Iwasaki S, Nii W, Goto N, Seki Y, Nakajima K, Nakamura K, Kariyazono H. Effect of acetic acid, oleic acid, linoleic acid, and -linolenic acid on octanoylated ghrelin production. The 6th Asian Conference on Colloid and Interface Science (ACCIS 2015 Japan), November

24-27, 2015, Arkas Sasebo (Sasebo Nagasaki, Japan).

中島健輔、大磯茂、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、中村和男、仮屋園博子、AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生に及ぼすウルソール酸 およびコロソリン酸の影響、日本薬学会第 135 年会、平成 27 年 3 月 25 日-28 日、デザイン・クリエティブ センター神戸 (兵庫県・神戸市)

中島健輔、大磯茂、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、中村和男、仮屋園博子、ウルソール酸およびコロソリン酸の活性型グレリン産生抑制効果、第 31 回日本薬学会九州支部大会、平成 26 年 12 月 6 日-7 日、第一薬科大学 (福岡県・福岡市)

仁位和加奈、山口祐平、大磯茂、中村和男、仮屋園博子、ヘプタン酸は活性型グレリンの産生を抑制する、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 27 日-30 日、熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市)

仁位和加奈、山口祐平、大磯茂、中村和男、仮屋園博子、活性型グレリン産生に及ぼす GOAT 阻害ペプチド GSSFL およびヘプタン酸の影響、日本薬学会九州支部大会、平成 25 年 12 月 7 日-8 日、長崎国際大学 (長崎県・佐世保市)

その他、国内学会発表 11 件

[その他]
ホームページ等
長崎国際大学
<http://www.niu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仮屋園 博子 (KARIYAZONO Hiroko)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号: 20437958

(2) 研究分担者

大磯 茂 (OISO Shigeru)
長崎国際大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40543106