



Novel function of (-)-epigallocatechin-3-gallate on gut hormone secretion

Song, Won Young

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2015-09-04

(Date of Publication)

2020-09-04

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3289号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003289>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 宋 宛吟

論文題目

Novel function of (-)-epigallocatechin-3-gallate on gut hormone secretion
(エピガロカテキンガレート の腸管ホルモン分泌に関する新しい機能)

この研究では、茶に含まれる主要なポリフェノールであるエピガロカテキンガレート(EGCG)が、食欲抑制作用を有する腸管ホルモンの分泌を増加させることを見出した。この知見は、栄養素ではない食品成分(非栄養素)であるEGCGが内分泌誘導因子として機能すること、すなわち非栄養素がエネルギーバランスの制御に関与する可能性を示唆し、ポリフェノールの機能発現における新たな作用点を提案する。

ヒトは食物を摂取し、消化吸收の過程を経てエネルギーを産生するが、それと同時に食物が消化管内に取り込まれたことを認識し、身体の小組織では様々な制御が行われている。この制御には、消化器官同士や消化器官と脳を繋ぐ神経ネットワークと、消化管から分泌され血流によって作用部位に届けられるホルモンが関与している。腸管上皮で産生されるペプチドホルモン類は、食事刺激に応じて分泌され、消化器官の運動、血糖値、食欲などを調節する。食欲抑制を促す腸管ホルモンであるコレシストキニン(CCK)、グルカゴン様ペプチド(GLP)-1、ペプチドYY(PYY)は、食物摂取にตอบสนองして腸管から分泌されたのち、迷走神経を介するか血流に運ばれるかして脳に運ばれ、最終的に摂食行動調節に関与する。腸管ホルモンは腸管上皮の内分泌細胞で栄養素分子を受容して分泌されるので、他の食品因子でもその分泌が誘導される可能性がある。最近の研究では、ポリフェノールの生体の機能のひとつに摂食量の抑制が示されている。本研究では摂食調節に関与する消化管から脳へのシグナルとしてポリフェノールが作用する可能性を検証した。

第一章では、まずヒト腸管上皮由来の培養細胞株であるCaco-2細胞を用いて腸管ホルモンの分泌を測定するアッセイ法を構築した。Caco-2細胞は主に吸収上皮細胞のモデルとして使用されるが、内分泌に関与する因子を発現することが知られていた。遺伝子発現解析により、腸管ホルモンに関与するCCK、PYY、プログルカゴン、ならびにPC1の発現が確認された。栄養因子をCaco-2細胞に添加して刺激し、2時間培養後に放出されたホルモン量を酵素免疫測定法で測定すると、CCKはグルコース、スクロース、フェニルアラニン、オレイン酸とパルミチン酸の刺激、GLP-1はグルコース、スクロース、グルタミン、フェニルアラニン、オレイン酸とパルミチン酸の刺激、PYYはグルタミンとオレイン酸によって分泌促進されることが示された。続いて、ポリフェノール類から構造の異なる化合物を選択し、これらのホルモンを分泌するものを探索した。数種類のポリフェノール分子のうち、EGCG、クロロゲン酸、フェルラ酸がCaco-2細胞から一種またはすべての腸管ホルモンの分泌を促進し

た。茶に含まれる4種のカテキン類とそれらの構造異性体で構造相関を調べると、EGCGの立体異性体であるガロカテキンガレートにEGCGと似た分泌促進傾向が観察された。Caco-2細胞から分泌されたCCK、GLP-1、PYYは生体ではCCKは上部腸管に分布するI細胞、GLP-1とPYYは下部腸管に分布するL細胞という異なる内分泌細胞で産生・分泌される。培養細胞系で見出された腸管ホルモンの分泌が生体でも生じるかを確認するために、腸管ホルモン分泌を促進するEGCGを、摘出したマウス腸管に作用させホルモン分泌量を測定した。その結果、EGCGの刺激により十二指腸断片からCCKが、回腸と結腸の断片からGLP-1が分泌されることが示された。

第二章ではEGCGによって誘導される食欲抑制ホルモン分泌の作用機構に対する分子レベルの解析を行った。腸管ホルモン分泌としては分泌顆粒のエクソサイトーシスを惹起する細胞内カルシウム濃度の変動が予想されており、複数のGタンパク質共役受容体(GPCR)およびその下流のシグナル伝達分子が報告されている。一方、EGCGがリガンドとして活性化する受容体として、67kDaラミニンセプター(67LR)、侵害刺激受容体チャネルTRPA1、GPCR型の苦味受容体hTAS2R39とhTAS2R14が知られている。それぞれの経路を検討するため、67LR中和抗体、TRPA1のアンタゴニストであるAP18、苦味受容体下流のエフェクター分子であるホスホリパーゼの阻害剤U73122をそれぞれEGCGと同時にCaco-2細胞に添加してGLP-1分泌量を測定した。その結果、すべての阻害剤においてGLP-1分泌量に差は見出されなかった。使用した阻害剤のうちU73122は受容体そのものを阻害しないため、本実験ではTAS2Rの非関与は決定的ではない。細胞外の刺激にตอบสนองするGPCRは、ポジティブフィードバックにより転写量が増加することがある。リアルタイムPCRを行うと、Caco-2細胞をフェニルアラニンで刺激した際の候補受容体CaSR、またオレイン酸で刺激した際の候補受容体FFAR4の発現量の増加が確認された。このときEGCGで刺激後のCaco-2細胞内の受容体のうち、hTA2R39の遺伝子発現量が増加していたことから、Caco-2細胞におけるEGCGの受容分子はhTAS2R39である可能性が高い。続いて細胞内シグナリング経路としてカルシウム濃度の関与を検討しようとしたところ、Caco-2細胞ではカルシウム指示薬をロードすることが非常に困難であった。そこでヒト結腸由来のL細胞モデルであるNCI-H716細胞を使用することにし、EGCG刺激依存的なGLP-1分泌を確認した後、カルシウムイメージング法を試みた。カルシウム指示薬Fluo-8を導入したNCI-H716に対し、カルシウムのイオノフォアとして働くイオノマイシンを添加し蛍光顕微鏡下で観察すると、Ca²⁺濃度上昇を示す蛍光強度の増強が確認された。続いてEGCGを添加し同様に観察したところ、視野中の一部の細胞で蛍光強度の増加が観察された。従って、腸由来の細胞においてEGCG刺激に応じて細胞内カルシウムイオンが増加することが示唆された。

第三章では、EGCGによって誘導される腸管ホルモンの生理効果についてマウスを用いて検討した。CCK、GLP-1、PYYは食餌刺激で分泌されると脳に働いて摂食行動を抑制する。ICRマウスは一日に摂食する量の7割程度を暗期に摂取するため、暗期開始の直前にEGCGを胃内投与し、2時間毎の摂食量を24時間かけて計測した。その結果、EGCG投与後の2時間までの摂食量が、水を投与した群と比較して有意に減少した。その後の時間帯については両群に有意な差は観察されず、24時間の総摂食量にも差は観察されなかった。1章のスクリーニングにおいて摂食抑制腸管ホルモンの分泌が観察されなかったエピカテキンを用いて同様の実験を行ったところ、EGCG投与による摂食量の変化はエピカテキンでは観察されず、摂食量の変化に摂食抑制腸管ホルモンが関与していることが示唆される結果となった。以上の結果より、EGCGによる腸管ホルモン分泌が生体において生理機能を発現する可能性が示された。

以上より本学位論文では、EGCGが食欲抑制に関与する腸管ホルモンを分泌することを培養細胞系と摘出腸管を用いた系を用いて明らかにし、その分子メカニズムとして苦味受容体の関与を示唆した。さらにマウスにおいてEGCGによる食欲抑制効果を示し、腸管ホルモン分泌の関与を示唆した。緑茶や烏龍茶には抗肥満効果があるとされており、近年では過剰な食欲の抑制の効果があるとも言われている。本学位論文の結果は、EGCGが腸管ホルモンの分泌を介して食欲調節に影響を与え、エネルギー収支の調節に寄与することを示唆している。

宋 宛吟：3

EGCGを含むポリフェノールは食事に微量にしか含まれない植物由来の成分で、生体によりわずかに吸収されるものの基本的には速やかに排出される因子である。こうした体内動態を有する化合物の生体における生理機能調節の作用点として、腸管という生体外と直接作用する部位での受容を介したシグナル伝達系は、血中に取り込まれ運搬された先の体内組織で発揮される機能とは異なる、新しい生理作用を展開することが期待される。

(3071字)

氏名	宋 宛聆		
論文 題目	Novel function of (-)-epigallocatechin-3-gallate on gut hormone secretion (エピガロカテキンガレートの腸管ホルモン分泌に関する新しい機能)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	水野 雅史
	副 査	教授	白井 康仁
	副 査	准教授	橋本 堂史
	副 査	助教	藍原 祥子
	副 査		

要 旨

この研究では、茶に含まれる主要なポリフェノールであるエピガロカテキンガレート(EGCg)が、食欲抑制作用を有する腸管ホルモンの分泌を増加させることを見出した。この知見は、栄養素ではない食品成分(非栄養素)であるEGCgが内分泌誘導因子として機能すること、すなわち非栄養素がエネルギーバランスの制御に関与する可能性を示唆し、ポリフェノールの機能発現における新たな作用点を提案したという点で意義が高い。

ヒトは食物を摂取し、消化吸収の過程を経てエネルギーを産生するが、それと同時に食物が消化管内に取り込まれたことを認識し、身体各組織では様々な制御が行われている。この制御には、消化器同士の消化器と脳を繋ぐ神経ネットワークと、消化管から分泌され血流によって作用部位に届けられるホルモンが関与している。腸管上皮で産生されるペプチドホルモン類は、食事刺激に応じて分泌され、消化器の運動、血糖値、食欲などを調節する。食欲抑制を促す腸管ホルモンであるコレシストキニン(CCK)、グルカゴン様ペプチド(GLP)-1、ペプチド YY(PYY)は、食物摂取に反応して腸管から分泌されたのち、迷走神経を介するか血流に運ばれるかして脳に運ばれ、最終的に摂食行動調節に関与する。腸管ホルモンは腸管上皮の内分泌細胞で栄養素分子を受容して分泌されるので、他の食品因子でもその分泌が誘導される可能性がある。最近の研究では、ポリフェノールの生体の機能のひとつに摂食量の抑制が示されている。本研究では摂食調節に関与する消化管から脳へのシグナルとしてポリフェノールが作用する可能性を検証した。

本学位論文草稿は、3章より構成されている。

第1章では、まずヒト腸管上皮由来の培養細胞株であるCaco-2細胞を用いて腸管ホルモンの分泌を測定するアッセイ法を構築した。Caco-2細胞は主に吸収上皮細胞のモデルとして使用されるが、内分泌に関与する因子を発現することが知られていた。遺伝子発現解析により、腸管ホルモンに関与するCCK、PYY、プログルカゴン、ならびにPC1の発現が確認された。従ってCaco-2細胞がCCK、GLP-1、PYYの腸管ホルモンを分泌する可能性が高いと判断した。

続いてCaco-2細胞における腸管ホルモンの分泌能について、既知の刺激因子を用いて検討した。既知の刺激因子である栄養因子をCaco-2細胞に添加して刺激し、2時間培養後に放出されたホルモン量を酵素免疫測定法で測定すると、CCKはグルコース、スクロース、フェニルアラニン、オレイン酸とパルミチン酸の刺激、GLP-1はグルコース、スクロース、グルタミン、フェニルアラニン、オレイン酸とパルミチン酸の刺激、PYYはグルタミンとオレイン酸によって分泌促進されることが示された。これによりCaco-2細胞が、腸管ホルモン分泌を検討する細胞系として機能することが確認された。

続いて、ポリフェノールで腸管ホルモン分泌しうるものをスクリーニングするため、構造の異なるポリフェノール類の代表的な化合物を選択し、Caco-2細胞に処理した。数種類のポリフェノール分子のうち、EGCg、クロロゲン酸、フェルラ酸がCaco-2細胞から一種またはすべての腸管ホルモンの分泌を促進することを見出した。茶に含まれる4種のカテキン類とそれらの構造異性体で構造活性相関を調べると、EGCgの立体異性体であるガロカテキンガレートにEGCgと似た分泌促進傾向が観察された。