



ポリフェノールの体内動態と機能性研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 小林 彰子

はじめに

経口摂取後の食品成分の体内動態を明らかにすることは、機能性及び安全性の観点から不可欠である。腸管吸収性は経口摂取成分の体内動態において重要な役割をもつ。ポリフェノールには多くの機能性が報告されているものの腸管吸収をはじめとする体内動態はほとんど明らかにされていない。また栄養素と比較し腸管吸収性が低く、バイオアベイラビリティは低いため、食品として経口摂取した際の機能性発現について正しく評価されているとはいえない。一方腸管は食品成分が比較的高濃度で到達するため、経口摂取した食品ポリフェノールの影響が生じやすい場といえる。本稿ではこれまで取り組んできた、1. ポリフェノールの腸管における吸収機作、2. ポリフェノールによる認知症予防に関する研究、および3. 腸管トランスポーターに与える影響について紹介する。

1. ポリフェノールの腸管上皮等生体膜における吸収機作

腸管吸収モデル細胞として、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いて、食品由来ポリフェノールの吸収機作を速度論的に解析した。Caco-2細胞をインサート膜に播種し単層膜を完成させた後、透過速度を算出した。食品からの摂取量が多く様々な生理機能が報告されている caffeic acid (CA) およびその二量体である rosmarinic acid (RA) に着目した。CA および RA 自体の透過性は低かったが、これらの主要な腸内細菌代謝物である ferulic acid, *m*-coumaric acid, *m*-hydroxyphenylpropionic acid (*m*-HPP) 等は高い吸収性を示し、pH 依存性の能動輸送機作を示した^{1,2,3}。さらに阻害剤を用いた検討から、これらの化合物はモノカルボン酸トランスポーター (MCT) により吸収される可能性が示された。また食品中の CA の多くは quinic acid と結合した chlorogenic acid として存在するが、CA は quinic acid との結合により腸管吸収性が著しく減弱した。以上のことから CA および RA は腸内細菌により代謝を受け、MCT の基質へ変化した後に腸管から吸収されることが、生体での機能発現に重要である可能性が示された。

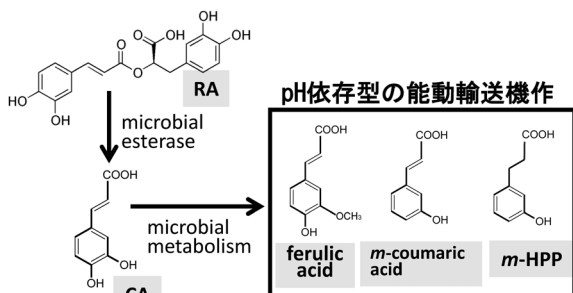


図1. Rosmarinic acid および caffeic acid の腸内細菌による代謝と腸管吸収

次に生理機能に関する報告の多いフラボノイド類の腸管吸収性を検討した。Caco-2単層膜および人工脂質膜を用いて吸収機作を解析した結果、hesperetin等のフラバノン類および equol等のイソフラボン類がpH依存型の能動輸送機作を示した^{4,5,6}。また糖が結合した hesperidin はアグリコンである hesperetin と比較し腸管吸収性が著しく低かった。以上のことからこれらフラボノイド類のアグリコンは他のフラボノイドと比較し腸管吸収性が高く、経口摂取後生体での機能発現が有利な可能性がある。

2. ポリフェノールによる認知症予防

食によるアルツハイマー型認知症 (AD) 予防を目指し、ポリフェノールの1種RAのAD予防機作を検討してきた^{7,8}。ADモデルマウス (3×Tg-AD) に10か月間RAを摂食させると、認知機能低下が改善され、脳内ではADの主病態であるタウタンパク質のリン酸化およびアミロイドβ凝集が抑制された。RAを摂食させたマウスの脳内でRAは検出限界以下であったことから、RA摂食による脳内の変化を捉えるため、海馬トランスクリプトミクスを行った。その結果、タウタンパク質のリン酸化およびアミロイドβ凝集の両方の病態の進行に関わる JNK シグナル経路が全体的に抑制されていることが明らかとなった。また JNK シグナルの上流にある炎症関連因子が脳内および末梢でも抑制されていたことから、RAにより末梢での炎症が抑制された結果、脳内での炎症も抑制され、そのことが JNK シグナルの抑制に繋がった可能性が考えられた。

3. ポリフェノールが腸管に発現するトランスポーターに与える影響

食品ポリフェノールは腸管吸収性が低いものの、経口摂取後腸管上皮には比較的高濃度で到達するため、腸管上皮はポリフェノールのターゲットとなり得る。そこで我々は、食品による脂質異常症予防の観点から腸管においてコレステロールのクリアランスに関わる2種類のトランスポーターを阻害する食品ポリフェノールを探索し、その阻害機作を明らかにした。

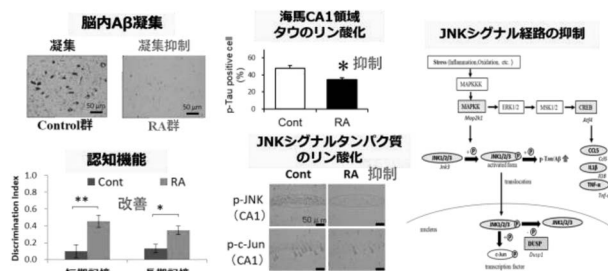


図2. Rosmarinic acid 摂食による AD 予防効果

3-1 ポリフェノールが腸管に発現するコレステロールトランスポーターに与える影響

腸管に発現するコレステロールトランスポーター Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1 L1) は、コレステロールの腸肝循環を担うため、NPC1 L1阻害は血中コレステロール濃度を低下させる。我々は食品ポリフェノールの中から NPC1 L1 阻害成分を探索するため、Caco-2細胞を用いてコレステロール輸送の速度論的パラメータを算出し、NPC1 L1 介在輸送を明らかにした⁹。また Caco-2 を用いたスクリーニングにより、コレステロール吸収を阻害するポリフェノールを 11 種同定した。多くの食品に含まれ汎用性の高い quercetin および luteolin の阻害機構を解析した。Caco-2細胞において quercetin および luteolin は濃度依存的にコレステロール取り込みを阻害し、NPC1 L1 発現細胞においても同様の効果を示した。またコレステロール負荷食を摂食させたラットにおいても血中コレステロール値を低下させた。

Quercetin および luteolin は NPC1 L1 に対し競合阻害機作を示した。さらに luteolin は競合阻害のみならずヒト NPC1 L1 の発現を抑制させる機構によってもコレステロール吸収を阻害した¹⁰。ルシフェラーゼアッセイにより、luteolin は転写因子である SREBP2 の NPC1 L1 のプロモーター領域へのアクセスを阻害し、また SREBP2 および HNF4 α の発現を抑制することで、NPC1 L1 の発現を抑制することが明らかとなった。

3-2 ポリフェノールが腸管に発現する胆汁酸トランスポーターに与える影響

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され腸管に分泌された後、小腸下部に発現する Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) により約 95% が再吸収され肝臓で再利用される。腸管における胆汁酸の再吸収阻害は、肝臓でのコレステロールから胆汁酸への異化を促進し、血中コレステロール濃度を低下させる。そこで、ASBT 阻害成分を食品ポリフェノールから探索した¹¹。Caco-2細胞において胆汁酸は Na⁺ 依存型の ASBT による能動輸送機作を示し、紅茶に含まれる重合ポリフェノールの 1 種テアフラビン (TF) の theaflavin 3-gallate および theaflavin 3'-gallate が高い阻害活性を有した。これらは ASBT 発現細胞でも阻害活性を示し、Hanes-Woolf plot により競合阻害が示された。またこれらの TF 類は中性 buffer 中で酸化型構造へと変換した後、速やかに ASBT の Cys 残基と結合し、胆汁酸取り込みを阻害すると考えられた。

おわりに

腸管をはじめとする生体膜におけるポリフェノールの透過性を明らかにすることは、生体における活性発現の理解に繋がるだけでなく、健康機能を有する食品の設計や開発の際に活かされることが期待される。脳に到達しにくい RA の脳機能改善効果については、上記のメカニズムに加え、生体内で生成する代謝物および microRNA による作用も見出している。また TF 類に代表される重合ポリフェノールは体内へは腸管から吸収されないものの、生理機能が多数報告されている。我々が見出したポリフェノールによる腸管トランスポーター阻害は、吸収されにくいとしても生理活性を有するポリフェノールのもつ重要な作用機作の 1 つであると考えられる。今後もこれらの研究を通して、ポリフェノールをはじめとする食品機能性成分の安全で効果的な摂取法の確立に繋げたい。

(引用文献)

- 1) Konishi, Y., and Kobayashi, S. Transepithelial Transport of Rosmarinic Acid in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 583-591 (2005).
- 2) Konishi, Y., and Kobayashi, S. Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6418-6424 (2004).
- 3) Konishi, Y., and Kobayashi, S. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2518-2526 (2004).
- 4) Kobayashi, S., Nagai, T., Konishi, Y., Tanabe, S., Morimoto, K., and Ogihara, T. Transport mechanisms of flavanone aglycones across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 52-60 (2012).
- 5) Kobayashi, S., and Konishi, Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 23-29 (2008).
- 6) Kobayashi, S., Tanabe, S., Sugiyama, M., and Konishi, Y. (2008) Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 33-41
- 7) Yamamoto, S., Kayama, T., Noguchi-Shinohara, M., Hamaguchi, T., Yamada, M., Abe, K., and Kobayashi, S. Rosmarinic acid suppresses tau phosphorylation and cognitive decline by downregulating the JNK signaling pathway. *NPJ Sci Food.* **5**, 1 (2021).
- 8) Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yamada, M., and Kobayashi, S. Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci. Rep.* **9**, 8711 (2019).
- 9) Nekohashi, M., Ogawa, M., Ogihara, T., Nakazawa, K., Kato, H., Misaka, T., Abe, K., and Kobayashi, S. Luteolin and Quercetin Affect the Cholesterol Absorption Mediated by Epithelial Cholesterol Transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 Cells and Rats. *PLoS One.* **9**, e97901 (2014).
- 10) Ogawa, M., Yamanashi, Y., Takada, T., Abe, K., and Kobayashi, S. Effect of luteolin on the expression of intestinal cholesterol transporters. *J. Funct. Foods.* **36**, 274-279 (2017).
- 11) Takashima, Y., Ishikawa, K., Miyawaki, R., Ogawa, M., Ishii, T., Misaka, T., and Kobayashi, S. Modulatory Effect of Theaflavins on Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter (ASBT) Activity. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 9585-9596 (2021).

謝辞 ここに紹介させていただいた一連の研究は、主に高崎健康福祉大学勤務時の共同研究と東京大学大学院農学生命科学研究科「食の安全・安心・健康領域研究室」およびニッポン寄付講座「食の健康科学研究室」にて行われたものです。これまで一緒に研究に携わり苦楽を共にしてくれた共同研究者の方々並びに卒業生および在籍生の皆様に深く感謝いたします。設立当初より寄付講座のアドバイザーとして常に親身にご指導いただいております東京大学阿部啓子名誉教授、ならびに内田浩二教授に心より感謝申し上げます。トランスポーター研究のきっかけを作り導いてくださったキリンホールディングス(株式会社)小西豊博士、高崎健康福祉大学荻原琢男教授、また食の認知症予防研究では金沢大学小野賢二郎教授、篠原もえ子准教授、福島大学平修教授、京都大学杉浦悠毅特任准教授に厚くお礼申し上げます。最後に、寄付講座を支援いただいているニッポン株式会社様、ならびに今回の受賞に際しご推薦くださいました同社間和彦イノベーションセンター長に心より感謝申し上げます。