

# 抗肥満作用を示すコーヒー薬効成分の同定とその作用機序の解明

多 胡 めぐみ

慶應義塾大学薬学部衛生化学講座 准教授

## 緒 言

肥満が、生活習慣病のリスクファクターとなることが明らかとなり、肥満の予防や改善が現代医療における重要な課題として注目されている。肥満は、脂肪細胞の分化の亢進に起因するため、肥満の予防・改善には、脂肪細胞の分化過程を抑制することが重要である。

コーヒーは世界中で愛飲されている飲料であり、多くの疫学調査により、習慣的なコーヒーの飲用者では、肥満の割合が低く、生活習慣病の発症リスクが減少することが示されている<sup>1)</sup>。したがって、コーヒーには抗肥満作用があることが示唆されているが、その薬効にはまだ多くの不明な点が残されている。

これまでに私達は、コーヒー豆抽出液には、肥満の要因である脂肪細胞の分化を抑制する活性があることを見出している<sup>2)</sup>。コーヒー豆抽出液を添加したマウス脂肪前駆細胞3T3-L1では、分化誘導剤(dexamethasone, IBMX, insulin)による脂肪滴の蓄積が顕著に阻害されることを観察している。しかしながら、現在まで、コーヒーが抗肥満作用を示す分子機構は不明であり、脂肪細胞の分化抑制活性を有するコーヒー含有成分は同定されていない。

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化過程には、Insulinシグナル経路を介した転写因子カスケード(C/EBP $\delta$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ )の発現誘導が重要である<sup>3)</sup>。よって、本研究では、転写因子の発現誘導およびInsulinのシグナル伝達経路に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討することにより、コーヒー豆抽出液による脂肪細胞分化抑制の作用機序を明らかにすることをめざした。また、有機溶媒により分離したコーヒー豆抽出液画分を用いて、脂肪細胞分化を抑制するコーヒー含有成分の探索を行った。

## 実験方法

### 1. コーヒー豆抽出液の調製

コーヒー生豆および焙煎コーヒー豆(コロンビア産、

アラビカ種)を用いて、通常の飲用時の濃度であるコーヒー豆粉8gを熱湯140mLでフィルタードリップしたコーヒー豆抽出液を100%(v/v)として実験に用いた。フィルター滅菌を行った後、分注し、使用前まで-20°Cに保存した。

### 2. 脂肪細胞の分化に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響の検討

3T3-L1細胞に、コーヒー豆抽出液(5%(v/v))およびMDI(IBMx, dexamethasone, insulin)を添加し6日間培養後、Oil red O染色を行い、脂肪滴を染色した。エタノールで色素を抽出後、吸光度(OD<sub>490</sub>)を測定し、脂肪滴の蓄積量を定量化した。

### 3. 転写因子C/EBPs、PPAR $\gamma$ の発現誘導に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響の検討

3T3-L1細胞に、コーヒー豆抽出液(5%(v/v))およびMDIを添加し2日間培養後、RNAを抽出した。RT-qPCRにより、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  mRNAの発現量を測定した。また、コーヒー豆抽出液およびMDIを添加した3T3-L1細胞から溶解液を調製し、イムノブロット法により、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ の発現を検討した。

### 4. インスリンシグナル経路に対する影響の検討

3T3-L1細胞に、コーヒー豆抽出液(5%(v/v))およびMDIを添加し、細胞溶解液を調製した。イムノブロット法により、IR $\beta$ 、IRS1、IRS2の発現量およびMEK、ERK1/2、Aktの活性化を検討した。MEK、ERK1/2、Aktの発現量に対するリン酸化量をImage Jにより定量化し、グラフ化した。また、IR $\beta$ 、IRS1、IRS2 mRNAの発現量をRT-qPCRにより検討した。

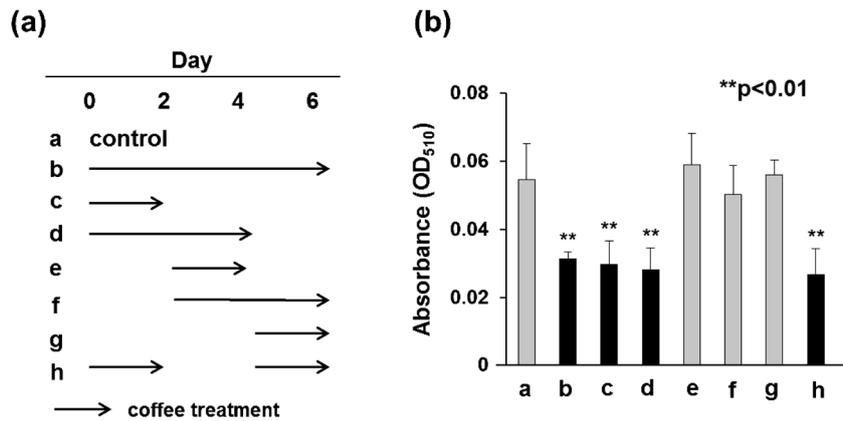


図1 コーヒー豆抽出液による脂肪細胞分化抑制  
(a) コーヒー豆抽出液の添加期間。(b) 脂肪滴の蓄積量。

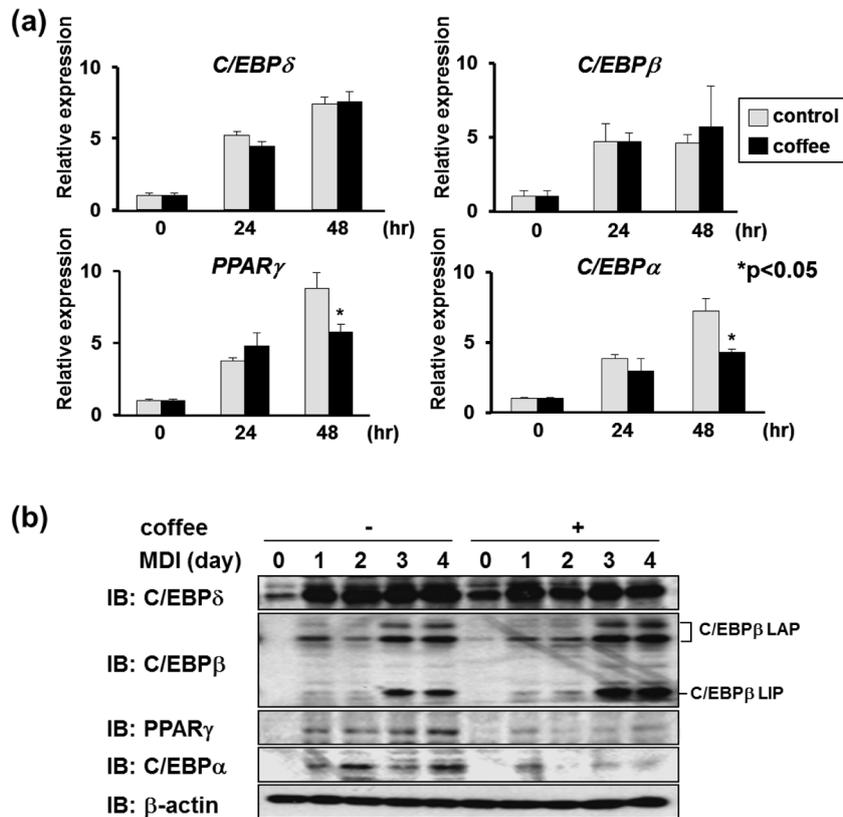


図2 コーヒー豆抽出液による PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の発現抑制  
(a) C/EBPs, PPAR $\gamma$  mRNA の発現 (b) C/EBPs, PPAR $\gamma$  タンパク質の発現。

## 結 果

### 1. コーヒー豆抽出液による脂肪細胞分化の抑制

コーヒー豆抽出液による脂肪細胞分化の抑制機構を解析するために、図1(a)で示すように、3T3-L1細胞にコーヒー豆抽出液 (5% (v/v)) を添加する時期を変えて、分化誘導剤MDI存在下、6日間培養した。その後、

oil red O染色により、脂肪滴の蓄積量を測定した。その結果、分化誘導後の2日間に、コーヒー豆抽出液を添加した条件であるc、d、hにおいて、脂肪細胞の分化が顕著に抑制された (図1)。したがって、MDIによる分化過程の初期において、コーヒー豆抽出液は脂肪細胞の分化を抑制することが明らかになった。

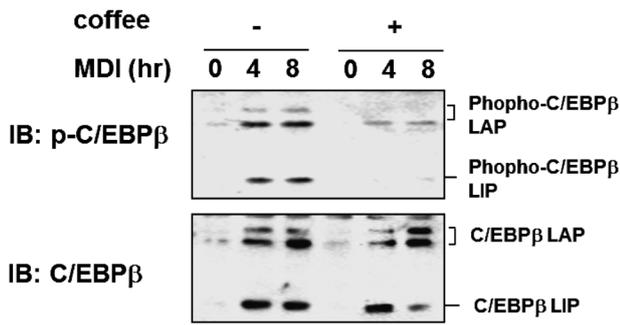


図3 コーヒー豆抽出液によるC/EBPβリン酸化の抑制

## 2. コーヒー豆抽出液によるC/EBPαおよびPPARγの発現抑制

次に、脂肪細胞の分化に重要な転写因子C/EBPδ、C/EBPβ、PPARγ、C/EBPαの発現誘導に及ぼすコーヒー豆抽出液 (5% (v/v)) の影響を検討した。コーヒー豆抽出液は、MDIによるC/EBPδ mRNAやC/EBPβ mRNAの発現誘導には影響を及ぼさなかったが、PPARγ mRNA、C/EBPα mRNAの発現誘導を有意に抑制した (図2(a))。また、イムノプロット法により、これらの転写因子のタンパク質発現を検討した結果、コーヒー豆抽出液は、MDIによるC/EBPδやC/EBPβの発現誘導には影響を及ぼさなかったが、PPARγやC/EBPα発現誘導を抑制した (図2(b))。

## 3. コーヒー豆抽出液によるC/EBPβの活性抑制

PPARγやC/EBPαは、C/EBPβの代表的な標的遺伝子である<sup>3,4)</sup>。コーヒー豆抽出液が、MDIによるPPARγ mRNA、C/EBPα mRNAの発現誘導を抑制したことから、コーヒー豆抽出液がC/EBPβの活性化を抑制する可能性が示唆された。C/EBPβの活性は、Insulin刺激によるタンパク質キナーゼERKによるリン酸化による制御されることが知られている<sup>4)</sup>。そこで、抗リン酸化C/EBPβ抗体を用いたイムノプロット法により、C/EBPβのリン酸化に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討した。コーヒー豆抽出液を添加した3T3-L1細胞では、MDIによるC/EBPβの発現誘導は観察されたが、C/EBPβのリン酸化が抑制されていた (図3)。よって、コーヒー豆抽出液は、C/EBPβの活性化を抑制することが明らかになった。

## 4. コーヒー豆抽出液によるinsulinシグナル伝達経路の抑制

次に、コーヒー豆抽出液がinsulinのシグナル伝達経路

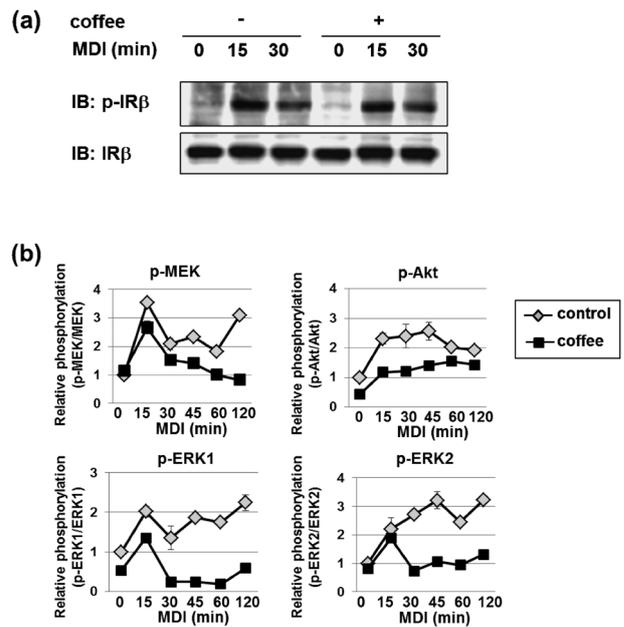


図4 コーヒー豆抽出液によるMEK、ERK1/2、Akt活性化の抑制

(a) IRβのリン酸化。(b) MEK、Akt、ERK1、ERK2のリン酸化。

に及ぼす影響を検討した。Insulinはチロシンキナーゼ共役型受容体であるinsulin受容体 (IRβ) と結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化する。まず、IRβのリン酸化に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討した。MDIによりIRβのリン酸化が誘導されたが、コーヒー豆抽出液はIRβのリン酸化に影響を及ぼさなかった (図4(a))。一方、コーヒー豆抽出液は、MDIによるMEK-ERK1/2およびAktのリン酸化を抑制した (図4(b))。したがって、コーヒー豆抽出液は、IRβの下流で、Insulinのシグナル伝達経路を抑制することが示唆された。

## 5. コーヒー豆抽出液によるIRS1タンパク質の発現抑制

コーヒー豆抽出液がinsulinシグナル伝達経路を抑制する機構を明らかにするために、IRβの基質であるIRS1およびIRS2の発現に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討した。コーヒー豆抽出液は、IRβの発現量には影響を及ぼさなかったが、IRS1の発現量を低下することを見出した。一方、コーヒー豆抽出液は、IRS2の発現量を増加した (図5(a))。続いて、IRβ mRNA、IRS1 mRNA、IRS2 mRNAの発現に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討した。コーヒー豆抽出液はIRβ mRNAやIRS1 mRNAの発現には影響を及ぼさなかったが、IRS2 mRNAの発現を有意に増加させた (図5(b))。以上の結果より、コー

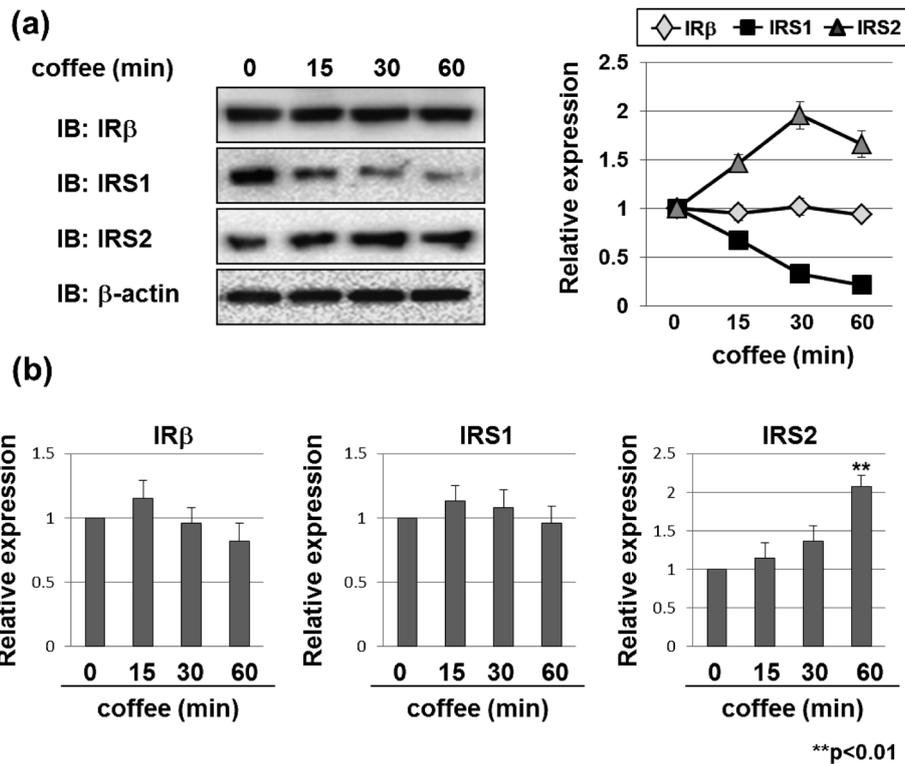


図5 コーヒー豆抽出液によるIRS1タンパク質の発現抑制

(a) IRβ、IRS1、IRS2の発現。(b) IRβ、IRS1、IRS2 mRNAの発現。

ビー豆抽出液は、IRS1の発現をタンパク質レベルで抑制することが明らかになった。さらに、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を用いて、IRS1の分解に及ぼすコーヒー豆抽出液の影響を検討した結果、コーヒー豆抽出液はIRS1の分解を促進することを観察している。

#### 6. IRS1の発現低下および脂肪細胞分化の抑制を示す コーヒー豆含有成分の同定

コーヒー豆抽出液がIRS1の分解を誘導することにより、脂肪細胞の分化を抑制することが明らかになった。これまでに、コーヒー生豆抽出液は、IRS1の発現やMDIによる脂肪細胞の分化に影響を及ぼさないことを観察しており、IRS1の分解誘導や脂肪細胞の分化抑制を示すコーヒー含有成分は焙煎によって生じる成分であると考えられた。そこで、有機溶媒 (ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール) を用いて、焙煎コーヒー豆抽出液を分離後、各画分の脂肪細胞分化やIRS1の発現に対する抑制効果を検討した。その結果、酢酸エチル画分が、IRS1の分解を促し、脂肪細胞分化を抑制することを見出した。

#### 考 察

コーヒーの飲用効果は、世界中で精力的に研究されているが、疫学調査が中心であり、コーヒー成分の薬効に着目した研究は十分に行われていない。本研究で、私達は、初めてコーヒー豆抽出液がIRS1の分解を誘導することにより、脂肪細胞の分化を抑制する分子機構を明らかにした (図6)。分化誘導剤MDIのうち、dexamethasoneはC/EBPδ mRNAの発現を誘導し、IBMXはC/EBPβ mRNAの発現を誘導することが知られている<sup>3,4)</sup>。図2に示すように、コーヒー豆抽出液は、MDIによるC/EBPδ mRNAやC/EBPβ mRNAの発現誘導を抑制しなかったことから、dexamethasoneやIBMXの作用には影響を及ぼさないことが示唆された。これまでに得られた結果により、コーヒー豆抽出液を添加した3T3-L1細胞では、アダプター分子であるIRS1タンパク質の分解が促進されることにより、insulinのシグナル伝達経路が特異的に阻害され、脂肪細胞の分化を抑制すると考えられた。コーヒー豆抽出液によるIRS1の分解は、proteasome阻害剤MG1323により解除されたことから、コーヒー豆抽出液は、プロテアソームを介したIRS1の分解を抑制し

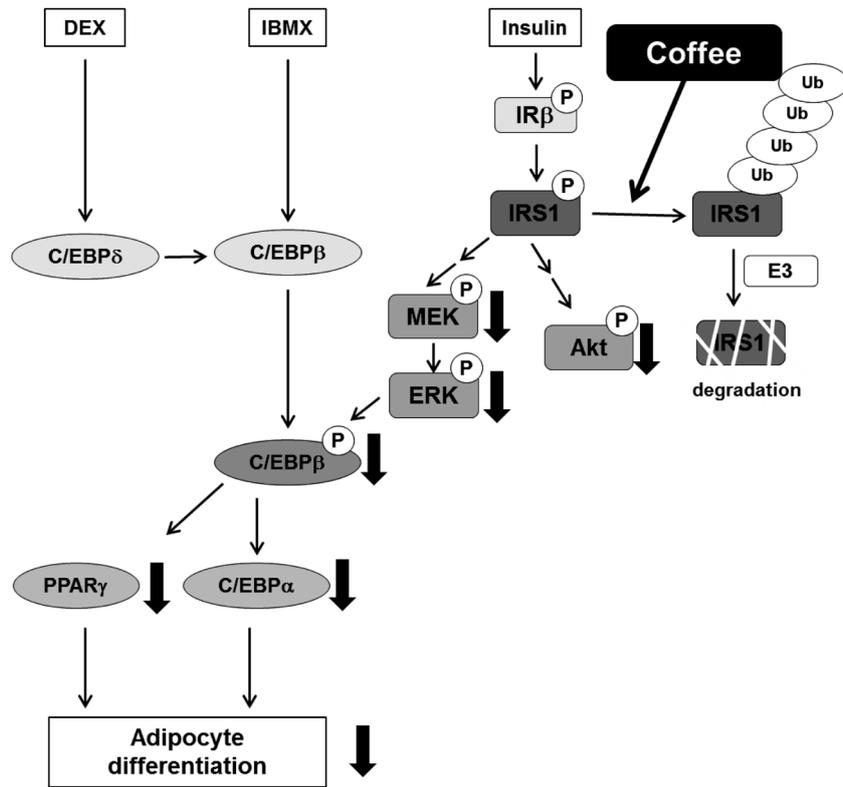


図6 コーヒー豆抽出液によるIRS1タンパク質の発現低下を介した脂肪細胞分化抑制機構

ている可能性が示唆された。

IRS1、IRS2のユビキチン依存的分解経路が報告されており、IRS1、IRS2に共通したE3ユビキチンリガーゼとして、SOCS1/3が同定されている<sup>6)</sup>。また、Cullin-RING E3がIRS1に特異的なユビキチンリガーゼであることが報告されている<sup>7)</sup>。コーヒー豆抽出液を添加した3T3-L1細胞ではIRS1の分解のみが亢進されたことから、コーヒー豆抽出液は、SOCS1/3ではなく、Cullin-RING E3の活性を制御する可能性が高く、今後、検討する必要がある。

今回の研究で、コーヒー豆抽出液のIRS1の分解誘導や脂肪細胞分化抑制を示す活性は、焙煎により生成されていることが明らかになった。また、既知のコーヒー豆含有成分であるカフェインやクロロゲン酸には、脂肪細胞分化を抑制する活性は検出されておらず、抗肥満効果を示すコーヒー成分は、焙煎によって生成する未知の成分である可能性が高い。現在までに、コーヒー豆抽出液の酢酸エチル画分が、IRS1の分解を促し、脂肪細胞分化を抑制することを見出しており、今後は抗肥満効果を示す成分の完全精製をめざす。抗肥満作用を示すコーヒー豆抽出液の活性成分を同定することは、肥満に対する有効

な治療薬やサプリメントの開発の一助となることが期待され、今後の創薬研究において貢献できると期待される。

## 要 約

疫学調査により抗肥満作用があると報告されているコーヒーの飲用効果を分子レベルで理解することをめざし、コーヒー豆抽出液による脂肪細胞分化の抑制機構を解析した。本研究により、コーヒー豆抽出液は、insulinのシグナル分子IRS1の分解を促進することにより、脂肪細胞の分化を抑制することを明らかにした。コーヒー豆抽出液は、IRS1の分解を誘導し、insulin刺激依存性のERK活性化およびERKによるC/EBPβの活性化を抑制することが明らかになった。また、IRS1の分解誘導や脂肪細胞の分化抑制を示すコーヒー含有成分は、焙煎により生じることが明らかになった。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) R. M. van Dam, et al.: *Lancet.*, **360**, 1477–1478, 2002.
- 2) R. Aoyagi, et al.: *Biol Pharm Bull.*, **37**, 1820–1825, 2014.
- 3) Z. Cao, et al.: *Genes Dev.*, **5**, 1538–1552, 1991.
- 4) R. J. Christy, et al.: *Genes Dev.*, **3**, 1323–1335, 1989.
- 5) T. Berg, et al.: *Biochem Biophys Res Commun.*, **334**, 638–645, 2005.
- 6) L. Rui, et al.: *J Biol Chem.*, **277**, 42394–42398, 2002.
- 7) X. Xu, et al.: *Mol Cell.*, **30**, 403–414, 2008.