

ホルミシスの概念から見えてくる ポリフェノールの新しい作用機構

村上 明

(兵庫県立大学 環境人間学部教授)

はじめに

ポリフェノールには多様な生理機能性があり、作用機構に関する知見も蓄積されている一方、未だ不明な点も多い。たとえば、「血中への吸収効率が極めて低いにも関わらず、なぜ様々な臓器で機能性を示すのか」という謎がある。また、「環境ストレスに適応するために植物が生合成しているポリフェノールがヒトの健康に役立つ機能を持つのはなぜか?」という素朴な疑問もあるだろう。私たちは近年、ホルミシス (hormesis: 適度な環境ストレスにより生体防御系が強化される現象) の概念がこうした謎や疑問を解く鍵であると考え、様々な研究を進めている^{1,2)}。本稿ではホルミシスの観点から解釈可能なポリフェノールの新しい作用機構について概説した。

これまでの知見

ポリフェノールの生理機能性が注目され始めた当初、その作用機構としては、主に活性酸素の消去による抗酸化作用が重要視されていた。事実、カテコール構造やピロガロール構造を持つポリフェノールは、試験管中の活性評価系では強い抗酸化性を示すことが多くの論文で報告されている。その一方で、動物実験などにおいては「抗酸化性が認められなかった」などの知見も多い。その原因としては、ポリフェノールの吸収効率が極めて低く、また速やかに代謝され抗酸化性を失う化学変化を起こすことなどが挙げられる。さらに、酸素濃度が高い条件下では逆に酸化を促進する例も多く見られることから「ポリフェノール=抗酸化性」という単純な解釈は難しくなっているのが現状である。さらに複雑なことに、適度な酸化促進作用は、Keap1/Nrf2系の活性化を介して抗酸化酵素の誘導につながる³⁾ ことも知られており、酸化ストレスに対してポリフェノールがどのように作用するのか不確定な面が多い。

一方、抗酸化作用以外の作用機構についてもいくつかの重要な知見がある。たとえばTachibanaらは緑茶カテキン(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) の受容体を67 kDa laminin receptorと同一⁴⁾、発がん予防効果を始め様々な機能性の発現機構に関与していることを指摘している。また、Yamashitaらは、カカオに含まれるprocyanidinがマウスにおいてinsulinの分泌を促進し、これがglucagon-like peptide-1 (GLP-1) を介した作用であると提唱した⁵⁾。重要なことにprocyanidinはほとんど吸収されないことから、腸管での刺激がGLP-1の分泌促進に関与している可能性がある。こうした新しい作用機構を探索することは極めて重要である。

EGCGの新しい脂肪分解機構

緑茶に含まれるポリフェノールが中性脂肪を分解することは広く知られ、また特定保健用食品や機能性表示食品としても利用されている。しかし、その作用機構に関しては、脂肪分解に関わるlipaseの活性化や脂肪酸の合成抑制など、比較的下流の知見がほとんどである。すなわち、「ポリフェ

ノールが細胞内に入り、まず何が起こるか？」という上流の知見はほとんどない。

そこで私たちはまず、緑茶の主要なポリフェノールとしてEGCGを取り挙げ、中性脂肪を蓄積した分化Huh7細胞へ添加後、早期に起こるイベントについて探索した。その結果、EGCGは細胞内で酸化ストレスおよびタンパク質変性ストレスを誘起することを見出した⁶⁾。その一方で、EGCGで処理した細胞では、解毒酵素、抗酸化酵素、および熱ショックタンパク質（分子シャペロンの1種で変性タンパク質の修復に関わる）のmRNA発現量が上昇し、細胞はEGCGに由来するストレスに対抗していることが判明した。ポリフェノールはヒトを含む動物には異物であることからこうした細胞応答が起こることは妥当であろう。

重要なことに、適応応答機構を活性化・維持するためにはATPが必須であることから細胞はEGCG由来のストレスに対抗するためATPを消費する可能性がある。事実、EGCGをHuh7細胞へ添加すると、細胞内ATP量の減少が起こると共に、培地中glucose濃度の低下とglucose誘導体の細胞内取り込み量の増加が観察された。これらの結果は、解毒酵素などの誘導により細胞内ATPが消費され、それを補填するために細胞内へのglucoseの取り込みが促進されたことを強く示唆している。

また、細胞内ATP量が減少したことと関連し、細胞をEGCGで処理すると細胞内のエネルギーセンサーであるAMPK（AMP活性化プロテインキナーゼ）の活性化が起こることも見出した。また、中性脂肪を分解するlipaseとしては、ATGL（脂肪細胞特異的リパーゼ）の関与が示唆されている。

以上の知見をまとめたものが図1である。本仮説が正しければ、「ポリフェノールは動物には栄養素ではなく異物であるがゆえにストレス源となる。そして、このストレスに適応するためにエネルギーが消費されるが、減少分を補うために脂肪分解が起こる」という解釈が可能となる。すなわち、ポリフェノールは決して身体に良い物質だから体脂肪を分解できるのではなく、「適度に厳しい異物だからこそ機能性を示す」という捉え方ができよう。また、この現象は、エネルギー恒常性の維持という意味で、運動時の物理的なストレスによる脂肪分解機構に類似していると指摘できる。

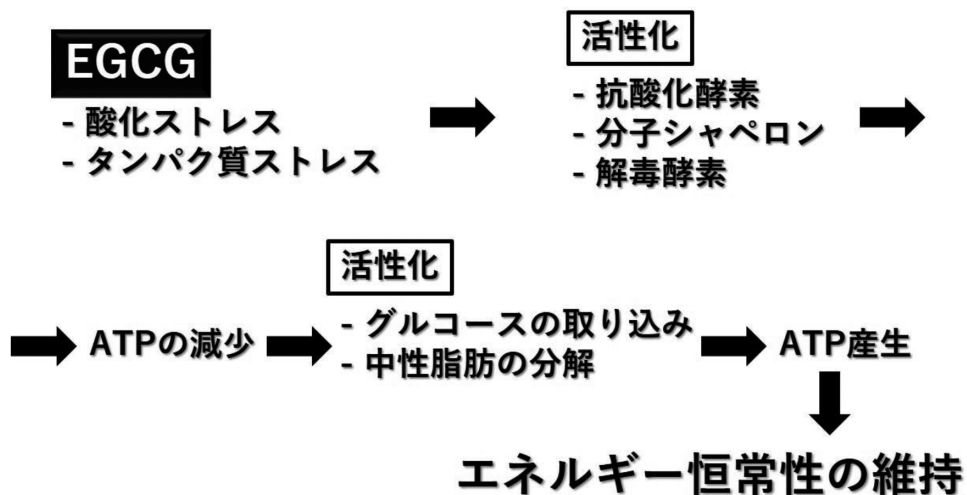


図1 EGCGの新しい脂肪分解機構（仮説）

Quercetinの新しい吸収および作用機構

タマネギを始め多くの野菜・果物類に含まれるquercetinは様々な生理機能性を示すことが知られている。経口摂取したquercetinは速やかに代謝を受け、体内寿命が短いと指摘される一方で脳内でも検出される⁷⁾など、その吸収・送達機構には不明な点が多く残されている。そこで私たちは、近年、細胞間コミュニケーション機能で注目されているextracellular vesicles (EV、細胞外小胞)に着目した。EVは脂質二重層で覆われた小胞であり、内部には機能性を有するタンパク質やRNAが内包されている。

まず、HT-29細胞（ヒト大腸がん由来）をquercetinで処理後、細胞を洗浄し24時間培養後の細胞内、培地中、EV中のquercetinとその代謝物を解析した。その結果、EV中でquercetinが検出され、その量は細胞内よりも多いものであった⁸⁾。また、代謝物としてはグルクロン酸抱合体の存在が確認できた。さらに、ラットへ経口投与（2g/kg, p.o.）したところ、48時間後の血清EV中でquercetinが検出され、その濃度はalbumin中よりも高かった。

次にquercetinを内包させたEVを調製し、化学的安定性と細胞内への取り込み効率を評価した。その結果、リン酸緩衝液中ではEV内包quercetinは遊離状態に比べ有意に安定性が高く、またRAW264.7細胞（マウスマクロファージ）への取り込み効率は遥かに高いものであった。そこで、RAW264.7細胞をリボ多糖で刺激し、炎症促進因子である一酸化窒素の産生を促進させる評価系で両者の活性を比べたところ、EV内包quercetinは顕著に高い産生抑制活性を示すことが判明した。以上の結果から、経口摂取したquercetinが消化管内でEVに内包され、その後、安定した状態で体内を循環し、機能性を発現する可能性が示唆された（図2）。

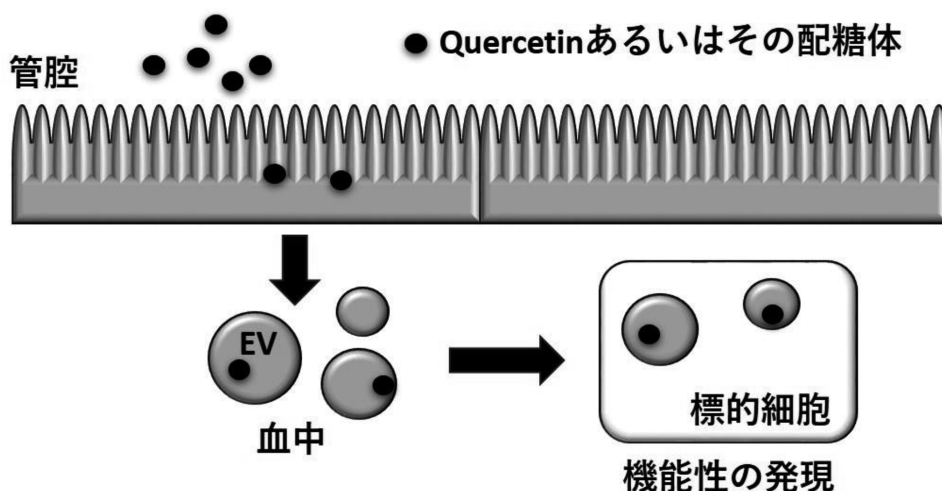


図2 Quercetinの新しい吸収および機能性発現機構（仮説）

乳汁中におけるquercetinの役割

近年、ヒト乳汁中にポリフェノールが存在することが見出され注目されている⁹⁾。しかしながら、これまでの研究では乳汁試料を脱抱合処理していたことから、アグリコンと抱合体の存在比率は不明である。また、quercetinを母親に摂餌させる実験動物モデルは報告されていなかった。そこで

私たちは出産後のICRマウスにquercetinを混餌投与（1%、2週間）し、乳汁を始めとする試料中のquercetinおよび代謝物を解析した¹⁰⁾。

その結果、母親の血漿中quercetin濃度が $1\mu\text{M}$ 以下であったのに対し、乳汁中では約 $15\mu\text{M}$ となっており、乳腺を通過した後にその大部分が脱抱合されている、あるいは濃縮されている可能性が示唆された。その後、用量を0.01%、0.1%、1%、投与期間を出産後の1週間と短縮した実験プロトコールにおいても、乳汁における濃度依存的なアグリコンの蓄積が確認できた。血漿および乳汁中におけるquercetinと代謝物の割合を図3に示した。上述のように、母親では血漿中に存在するのはほとんど代謝物（99.8%）であるが、乳汁中では18%がアグリコンに変換されている。また、これを飲んだ仔マウスの血漿中では97.5%がアグリコンであり、母マウスと同様な代謝経路を持つことが強く示唆された。

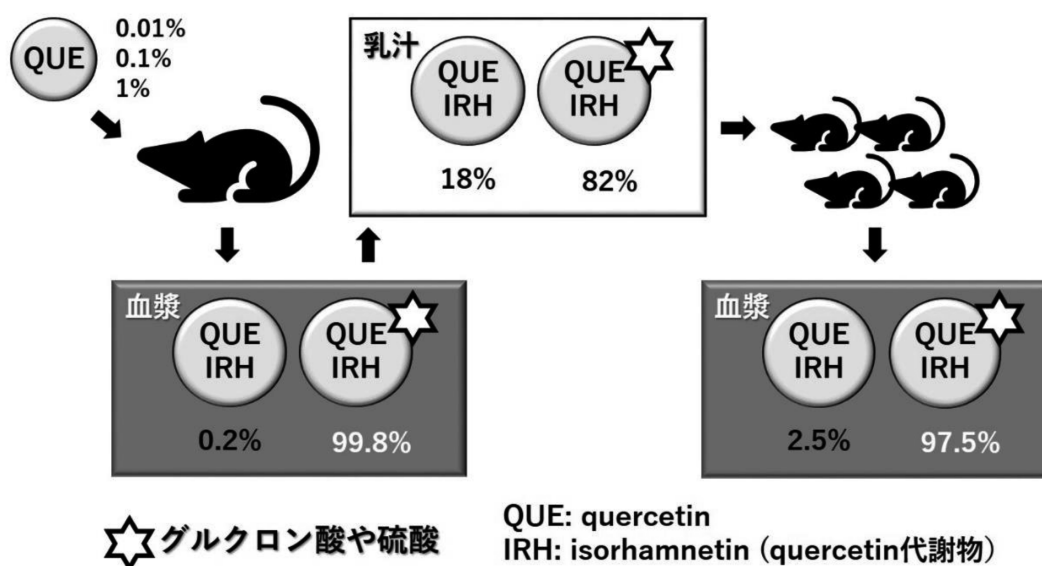


図3 血漿中と乳汁中におけるquercetinおよび代謝物の割合

今後の展望

まず、ポリフェノールの新しい脂肪分解機構についてはまず、動物実験での検証が不可欠であると考えている。また、こうした新奇な機構が今回示したEGCGの例だけに留まるのか、他のポリフェノールあるいはファイトケミカルにも共通したメカニズムなのか否かを検討することは重要である。次にEVに関する動物実験では今回の投与量が極端に多かった（今回は急性毒性を示さない用量として 1g/kg を設定）ため、投与量を減らす、さらには血漿回収時間を変化させてEV試料の解析を実施する必要がある。また、EV内包quercetinが高い細胞取り込み効率を示したことは非常に興味深い、他の機能性についても広く精査することは重要である。さらに、乳汁中ポリフェノールの研究ではヒト試料においてもアグリコンが高濃度で存在するのか、また、乳児の機能性に与える影響について検討する予定である。

謝辞

ここに記載した研究成果は石坂朱里助教（兵庫県立大学）および多くの大学院生・学生との共同研究によるものです。紙面を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Murakami A, Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis, *Curr Opin Toxicol*, 30:100337 (2022) doi.org/10.1016/j.cotox.2022.02.010
- 2) Murakami A, Impact of hormesis to deepen our understanding of the mechanisms underlying the bioactivities of polyphenols. *Curr Opin Biotechnol*, 86:103074 (2024) doi: 10.1016/j.copbio.2024.103074.
- 3) Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*, ;8(1-2):76-87 (2006). doi: 10.1089/ars.2006.8.76.
- 4) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.*, 11(4):380-1 (2004). doi: 10.1038/nsmb743.
- 5) Yamashita Y, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Cacao liquor procyanidins prevent postprandial hyperglycaemia by increasing glucagon-like peptide-1 activity and AMP-activated protein kinase in mice. *J Nutr Sci.*, 8:e2 (2019). doi: 10.1017/jns.2018.28.
- 6) Suihara S, Ishisaka A, Murakami A. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate at a high concentration may induce lipolysis via ATP consumption by activation of stress defense mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 85(2):411-420 (2021). doi: 10.1093/bbb/zbaa056.
- 7) Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med.*, 51(7):1329-36 (2011). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017.
- 8) Ishisaka A, Sugimoto R, Marumo H, Doi T, Hamada K, Fujimoto M, Fujiwara N, Yamasaki M, Murakami A. Role of Extracellular Vesicles in Absorption and Functional Mechanisms of Quercetin. *Mol Nutr Food Res.*, 67(21):e2300225 (2023). doi: 10.1002/mnfr.202300225.
- 9) Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition.*, 29(1):195-202 (2013). doi: 10.1016/j.nut.2012.07.015.
- 10) Fujiwara N, Mukai R, Nishikawa M, Ikushiro S, Murakami A, Ishisaka A. Transfer of quercetin ingested by maternal mice to neonatal mice via breast milk. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 87(4):442-447 (2023). doi: 10.1093/bbb/zbad007.