

ココアに含まれるテオブロミンの機能

中尾 洋一

(早稲田大学 理工学術院教授)

共著者：大塚悟史、竹口陸斗

はじめに

ココアは世界中で飲料として親しまれており、最近では食物繊維を配合した腸活ココアが話題になるなど、その機能性に注目が集まっている。ココアには動脈硬化や高血圧の予防になると考えられるカカオポリフェノールが豊富に含まれ、それ以外にも、カフェインやテオブロミン、テオフィリンなどのキサンチン誘導体が含まれている。このうち特にテオブロミンは、カフェインの10倍以上も含まれる主要成分でありながら、その生理作用については研究が進んでいない。このため、テオブロミンの生理作用を明らかにできれば、ココアの新たな機能性を見出すことができると考え、研究を行っている。

われわれはこれまで、「エピジェネティックな遺伝子発現スイッチ」に着目し、遺伝子発現スイッチが活発に切り替わっていると考えられる神経幹細胞の分化過程における影響を指標とし、テオブロミンの機能性について研究を行ってきた。この結果、テオブロミンとカフェインを混合投与すると、それぞれを単独投与した時と異なる神経分化への影響が生じることを見出した¹⁾。すなわち、類似の構造を有するキサンチン誘導体であるテオブロミンとカフェインであっても、それぞれの単独成分と混合物とでは機能性が異なるため、その機能性の評価には混合状態における作用メカニズムの理解が必要であることを示唆している。このことは、これまでテオブロミンの機能性解明を難しくしていた理由を合理的に説明するものであり、カフェインを含むがテオブロミンは含まないコーヒーと、カフェインとその10倍量のテオブロミンを含むココアの、飲料としての機能性・嗜好性の違いを生むメカニズムを示唆するものである。また、一般的にコーヒーは大人の飲み物であり、ココアは子供の飲み物のような印象が受け入れられているが、この印象に対してはあまり明確な科学的根拠は示されていない。われわれの知見は、このような印象を説明するための何らかの科学的ヒントになる可能性があると考えている。

このような観点から、われわれはテオブロミンとカフェインの単独投与時と混合投与時の神経分化過程における網羅的遺伝子発現解析を行った。ここで得られた大量のRNA-seqデータをもとに、独自に作成したプログラムによってパスウェイ解析を行い、単独および混合投与時に、それぞれが神経細胞分化過程に与える影響の違いを明らかにした。また、この影響の違いがテオブロミン、カフェイン、および両者の混合物による健康への影響を反映するかどうかを検証するため、ヒトiPS細胞の遺伝子発現プロファイルに基づく機能性（毒性）予測システムStemPanTox²⁾を用いて、それぞれの機能性（毒性）の予測結果を比較した。

RNA-seq解析によるカカオ含有化合物の生物活性評価

我々はこれまでの研究から、テオブロミンとカフェインの混合投与によって神経幹細胞から

ニューロンへの分化が抑制されること、さらにこの作用はテオブロミンとカフェインの単独投与では見られず、テオブロミンとカフェインを混合投与することで初めて見られる作用であることを見出した。そこで、テオブロミン、カフェイン混合物によって引き起こされる神経分化抑制作用のメカニズム解析を行うため、それぞれを単独もしくは混合物として神経幹細胞に投与した際の網羅的遺伝子発現変化をRNA-seqを用いて解析した。RNA-seqは、細胞のRNAを抽出後、各遺伝子の発現量を網羅的に解析する手法であり、個別に遺伝子発現を解析する研究手法では見逃されるような遺伝子発現プロファイルの変化を探索するのに有効な手法である。混合投与時の遺伝子発現プロファイルをテオブロミン、カフェイン単独投与時の発現プロファイルと比較することで、混合物によって引き起こされる複雑な作用メカニズム解析も可能となる。一方でRNA-seqで生じる膨大なデータを人間の頭で比較・解析するのは不可能であるため、既存のRNA-seq解析プログラムをもとに改良したプログラムを用いた解析を行った。ここでは、細胞培養3日目 (Day 3) の神経幹細胞にサンプルを投与して、1日後のDay 4および2日後のDay 5におけるRNAを抽出し、RNA-seq解析に付した。Day 3、4、および5における遺伝子発現プロファイルをもとに主成分分析および階層的クラスタリング解析を行った結果、サンプル投与による遺伝子発現変動よりも培養日数間の変動の方が大きいことが分かった (図1)。つまり、培養日数に依存して変化する細胞の遺伝子発現変化が大きいいため、より正確な解析のためには、同じ培養日数におけるサンプル投与群間のデータ比較の必要性が示唆された。

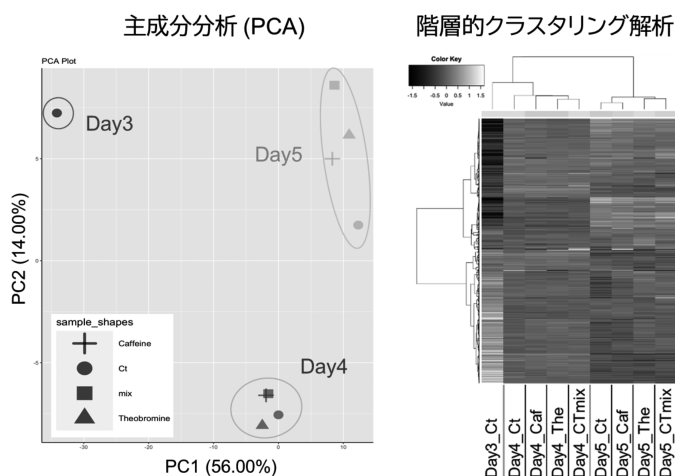


図1 主成分分析および階層的クラスタリング解析結果。
Ct: コントロール, Caf; caffeine, The; theobromine, CTmix; 混合物。

各培養日数において発現量の変動が大きい遺伝子群についてgene ontology (GO) 解析を行った結果、我々が着目している神経分化や細胞分化に関与する遺伝子群の多くはday 4では発現量が低く、day 5で発現量が増加していることが分かった。そこで、day 5における遺伝子発現データセットを用いてRNA-seqデータの比較を行うこととした。各サンプル投与時に遺伝子発現量がコントロール比1.5倍以上増減した遺伝子群のデータセットを用いてGO解析を行った結果、混合物は細胞分裂に関連する遺伝子群の発現量を増加させ、神経分化・細胞分化に関連する遺伝子群の発現量を減少させていることが分かり、混合物の神経分化抑制作用を支持する結果が得られた。カフェインおよびテ

オプロミン単独投与による遺伝子発現変化に着目すると、カフェイン単独では、細胞分裂に関連する遺伝子群の発現量が増加しており、テオプロミン単独では、神経分化や細胞分化に関連する遺伝子群の発現量が減少していることが分かった。このことから、混合投与による遺伝子発現の変化はそれぞれの単独投与による遺伝子発現変化を反映していることが示唆された。今後は、各サンプル投与によって変動した遺伝子群から活性の差に寄与する遺伝子を特定し、その遺伝子の機能解析を行うことで、カフェイン、テオプロミン、および混合物の機能性についてさらなる知見を得たいと考えている。

StemPanToxを用いたカフェイン、テオプロミン、および混合物の機能性（毒性）予測

カフェインには覚醒作用や、利尿作用、強心作用等多くの生理作用が報告されており、気管支拡張作用を持つテオフィリンは医薬品として用いられている³⁾。一方で、テオプロミンはカフェインに比べて10倍以上ココア中に含まれているにもかかわらず、カフェインと同様の利尿作用以外の生理作用に関してはほとんど報告がない。さらに、我々が見出したカフェイン・テオプロミン混合物の神経分化抑制活性のように、ココア全体ではカフェインとテオプロミン単独投与だけでは分からないような作用がある可能性が示唆されてきた。そこで、混合物による未知の機能性を探索するために、カフェイン、テオプロミン、および混合物投与群について、AIによる機能性（毒性）予測プログラムであるStemPanTox²⁾ による機能性（毒性）予測を行った。

StemPanToxは、ヒトES・iPS細胞といった多能性幹細胞を用いた化学物質の毒性・機能性評価システムである。化学物質24種類をヒトES・iPS細胞に曝露した際の経時的遺伝子発現データの主成分分析を行い、ここから選んだ特徴的な20遺伝子について、サンプル投与下での発現プロファイルの変化をqPCR法にて調べることで、6種類の毒性（神経、心筋、肝臓、糸球体、管状臓器、非遺伝子性発がん性）を90%程度の高精度で検出・予測することが可能である（図2）。

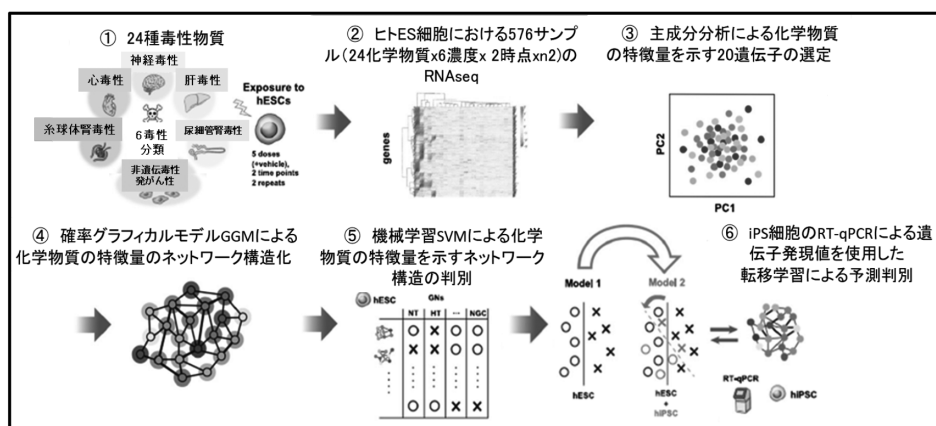


図2 StemPanTox概要図.

このStemPanToxシステムを用いて、カフェイン、テオプロミン、および混合物による6種類の機能性（毒性）に対する評価を行った。すなわち、2日間未分化維持培養を行ったヒトiPS細胞にサンプルを添加し、24時間および48時間後のRNAを抽出し、特徴的な遺伝子20種類の発現量をqPCRによって解析した。遺伝子発現量のコントロール比をもとに、確率グラフィカルモデルGGMを用

いて各サンプル投与時における特徴量のネットワーク構造化を行った。その結果、各条件において異なるネットワーク構造を構築することが分かった（図3）。

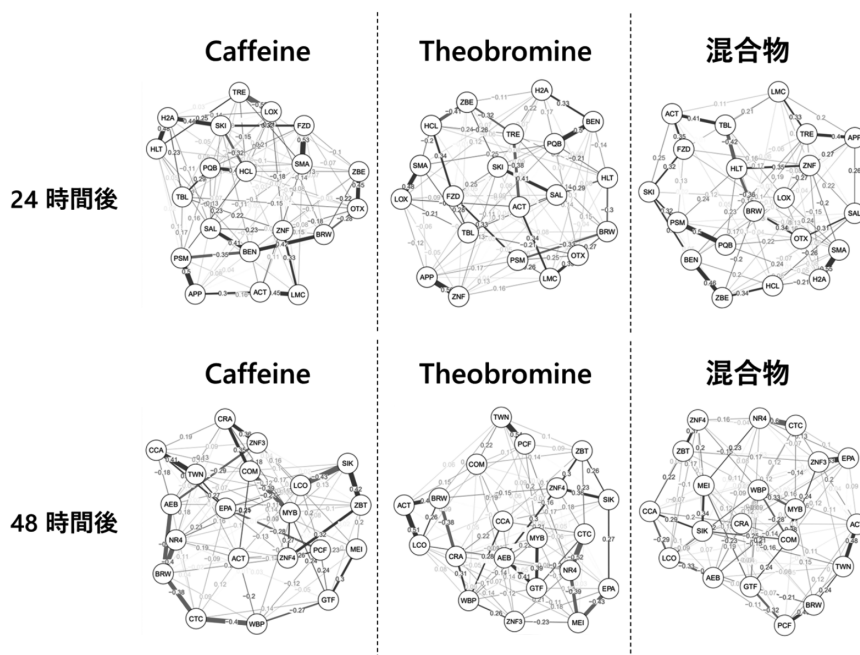


図3 GGMモデルを用いた特徴遺伝子変動ネットワーク. 緑: 正の相関、赤: 負の相関.

次に、得られたネットワーク構造から機械学習を用いた毒性判別によって、6種類の毒性の有無についてそれぞれ予測を行った（表1）。その結果、糸球体腎毒性のようにサンプル投与24時間および48時間後の結果において共通して陰性と判定されたものがある一方、心毒性のようにカフェイン

表1 遺伝子変動ネットワークに基づく毒性（機能性）予測. ○: 陽性, ×: 陰性

毒性	サンプル	毒性予測結果（24時間後）	毒性予測結果（48時間後）
心毒性	Caffeine	○	○
	Theobromine	○	×
	混合物	×	×
肝毒性	Caffeine	○	○
	Theobromine	○	×
	混合物	○	○
非遺伝性発がん性	Caffeine	○	×
	Theobromine	×	○
	混合物	○	×
神経毒性	Caffeine	×	○
	Theobromine	○	×
	混合物	×	×
尿細管腎毒性	Caffeine	○	×
	Theobromine	○	×
	混合物	○	○
糸球体腎毒性	Caffeine	×	×
	Theobromine	×	×
	混合物	×	×

とテオブロミンの単独投与では陽性を示したが混合物では陰性を示すものもあった。さらに、培養時間によって異なる予測が判定されるものもあった。

これらの結果は、カフェインとテオブロミンの構造の違いや、代謝による各化学物質とその代謝物存在比の変化を反映しているものと考えられる。今後はそれらの要因を詳細に解析することで、カフェインおよびテオブロミン両者を含むココアに特徴的な機能性の理解につなげたい。

まとめ

テオブロミンとカフェインの混合物による神経分化抑制作用の詳細な作用メカニズムを調べるため、RNA-seqを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、混合物はカフェインとテオブロミン単独投与による遺伝子発現変化をそれぞれ反映し、細胞分裂に関連する遺伝子の発現を促進し、かつ、神経分化や細胞分化に関連する遺伝子の発現を抑制していることが分かった。そのことから、テオブロミンとカフェインの単独投与では生じない、混合物に特有の作用が存在していることが示唆された。

さらに、StemPanToxを用いてテオブロミン、カフェイン、およびその混合物の機能性（毒性）予測を行った。その結果、各サンプルおよび培養時間に応じて共通する予測結果として、単独投与では毒性があると予測された心毒性については混合物の投与では毒性がないと予測されるなど、単独投与と混合物投与の違いを反映する結果も得られた。また、サンプルおよび培養時間だけでは説明がつかない予測結果も得られていることから、より詳細な解析が必要である。以上の研究結果は、テオブロミンとカフェインの相互作用がもたらす独特な生理活性や機能性を理解する上で重要な情報を提供しており、ココアの新たな機能性の発見につながるとともに、健康および医療への応用が期待される。

引用文献

- 1) 第24回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム講演要旨集
- 2) Junko Yamane, Takumi Wada, Hironori Otsuki, Koji Inomata, Mutsumi Suzuki, Tomoka Hisaki, Shuichi Sekine, Hirokazu Kouzuki, Kenta Kobayashi, Hideko Sone, Jun K Yamashita, Mitsujiro Osawa, Megumu K Saito, Wataru Fujibuchi, StemPanTox: A fast and wide-target drug assessment system for tailor-made safety evaluations using personalized iPS cells. *iScience*, 2022, 25, 104538.
- 3) 栗原久、『カフェインの科学 – コーヒー・茶・チョコレートの薬理作用 –』、学会出版センター、東京.