



## 「べにふうき」緑茶による脂肪蓄積抑制の作用機序

織谷幸太, 松井悠子, 栗田郁子, 木下洋輔, 川上晋平, 柳江高次, 西村栄作, 加藤正俊\*,  
齋 政彦<sup>§</sup>, 松本一朗\*\*, 阿部啓子\*\*, 山本(前田)万里\*\*\*, 亀井優徳

森永製菓株式会社ヘルスフードサイエンス研究所

\* 株式会社森永生科学研究所

\*\* 東京大学大学院農学生命科学研究科

\*\*\* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

### Mechanism of Anti-obese Effects of 'Benifuuki' Green Tea

Yukihiro Oritani, Yuko Matsui, Ikuko Kurita, Yosuke Kinoshita, Shinpei Kawakami, Koji Yanae,  
Eisaku Nishimura, Masatoshi Kato\*, Masahiko Sai<sup>§</sup>, Ichiro Matsumoto\*\*,  
Keiko Abe\*\*, Mari Maeda-Yamamoto\*\*\* and Masanori Kamei

Health Food Science Research Institute, Morinaga & Co., Ltd., 2-1-1,  
Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-8504

\* Morinaga Institute of Biological Science, INC., 2-1-16, Sachiura,  
Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0003

\*\* Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University  
of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657

\*\*\* National Institute of Vegetable and Tea Science, National Agriculture and  
Food Research Organization, 2769 Kanaya, Shimada, Shizuoka 428-8501

The molecular mechanism underlying high anti-obese effects of 'benifuuki', a tea cultivar that contains unique methylated catechins such as epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate (EGCG<sup>3</sup>Me), was explored. This cultivar was then compared with 'yabukita', a popular tea cultivar that lacks these methylated catechins. (1) The comprehensive gene expression in the perirenal adipose tissue of mice (12-week-old male C57BL/6J) was examined by DNA microarray analysis, following consumption of either high-fat diets with and without the addition of 2% benifuuki or 2% yabukita leaf powder. (2) In cultured 3T3-L1 cells, EGCG, EGCG<sup>3</sup>Me and caffeine were compared for their inhibitory effects on the intracellular fat accumulation as well as on cell differentiation from precursor to mature adipocytes. (3) Time-dependent changes in EGCG and EGCG<sup>3</sup>Me plasma concentrations were examined in catheterized rats following oral administration of benifuuki extract under an overnight fasting condition. The results of the DNA microarray indicated that the anti-obese effect of benifuuki may be ascribed to the inhibition of fat accumulation in adipocytes *via* the downregulation of enzyme expression associated with both the synthesis and  $\beta$ -oxidation of fatty acids. The stronger anti-obese effects of benifuuki compared with yabukita may be attributed to the presence of its unique methylated catechins (primarily EGCG<sup>3</sup>Me), whose stability in circulation is 3.2 times higher than EGCG; however, the inhibitory activity of EGCG<sup>3</sup>Me on fat accumulation is almost the same as that of EGCG (about 91% in terms of differentiation inhibition in 3T3-L1 cells). Thus, EGCG<sup>3</sup>Me appears to fortify the overall anti-obese effects of benifuuki. That is, the inhibitory activity on fat accumulation through the combination of both EGCG and EGCG<sup>3</sup>Me was 1.7 times higher than that through EGCG alone, even though the content of EGCG<sup>3</sup>Me in benifuuki is much less than EGCG.

(Received Nov. 18, 2008 ; Accepted Feb. 4, 2009)

**Keywords :** benifuuki, methylated catechins, epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)gallate (EGCG<sup>3</sup>Me), fat accumulation, obesity  
**キーワード :** べにふうき, メチル化カテキン, エピガロカテキン-3-*O*-(3-*O*-メチル) ガレート (EGCG<sup>3</sup>Me), 脂肪蓄積, 肥満

〒230-8504 神奈川県横浜市鶴見区下末吉 2-1-1

\* 〒236-0003 神奈川県横浜市金沢区幸浦 2-1-16

\*\* 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

\*\*\* 〒428-8501 静岡県島田市金谷 2769

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), m-sai-ia@morinaga.co.jp

緑茶 (*Camellia sinensis* L.) は日本や中国などで古来より飲用されてきたが, 近年では, 緑茶の主要成分である茶カテキンの多様な生理機能が注目され, 広く世界中で飲用されている。緑茶に含まれる茶カテキンには, エピガロカ

表 1 各群における体重, 食餌量, 臓器重量および血清生化学データ

	「べにふうき」群	「やぶきた」群	無添加群
体重増加量 (g/5 weeks)	6.00±0.67†	7.53±0.70	8.79±0.87
総摂取カロリー (kcal/5 weeks)	556.8±13.6	575.6±17.2	568.2±20.9
肝臓 (mg)	1019.5±20.3	1019.6±32.7	1100.8±29.8
皮下脂肪 (mg)	450.1±41.1†	556.3±50.8†	765.7±77.7
精巣上体脂肪 (mg)	861.1±93.1†	1035.8±114.7	1308.2±149.1
腎周囲脂肪 (mg)	273.4±35.0†	337.6±32.0	462.2±55.1
血中総コレステロール (mg/dL)	155.8±4.8	138.9±10.2	161.8±4.9
血中中性脂肪 (mg/dL)	50.0±6.31	61.2±6.13	61.5±8.15
血糖値 (mg/dL)	220.1±7.8	240.5±7.5	250.3±10.9
血中レプチン (ng/mL)	1.56±0.34†	3.11±0.99	5.32±1.40

平均値±標準誤差

†; 多重比較 (Tukey の方法) において無添加群と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた

テキンガレート (EGCG), エピガロカテキン (EGC), エピカテキンガレート (ECG), エピカテキン (EC) などの一群の類縁体があるが, これらの中で EGCG は含有率が最も高く, 一般的に生理活性も強いことが知られている. 緑茶中の茶カテキン組成は, 品種, 栽培条件, 摘葉時期, 加工条件などによって異なるが, 茶品種の一つである「べにふうき」の乾燥茶葉中には, エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル) ガレート (EGCG3<sup>Me</sup>) に代表されるメチル化カテキンが 0.8~2.5% (w/w) 程度含まれている (総カテキンに占めるメチル化カテキンの割合は 15% 程度). このメチル化カテキンは, 日本国内で一般的に流通している茶品種の「やぶきた」には含まれていない<sup>12)</sup>.

近年, 肥満が社会的問題の一つとして認知され, 2008 年 4 月より特定健康診査・特定保健指導が開始されるなど, その対策に関心が寄せられている. これまでに, 緑茶ならびに EGCG に代表される茶カテキンには脂肪蓄積抑制作用<sup>3)~5)</sup> やエネルギー代謝亢進作用<sup>6)</sup> などの抗肥満作用のあることが報告されているが, 「べにふうき」および EGCG3<sup>Me</sup> の抗肥満効果に関する報告はない. 我々は, 「べにふうき」茶葉には「やぶきた」茶葉と比べて強い抗肥満効果があることを見いだした<sup>7)</sup>. 本報告では, 「べにふうき」の抗肥満作用メカニズムの解明を目的として, 「べにふうき」茶葉および「やぶきた」茶葉を添加した高脂肪飼料ならびに無添加の高脂肪飼料を 5 週間摂取させたマウスの脂肪組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析して比較するとともに, 培養脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪蓄積に及ぼす EGCG, EGCG3<sup>Me</sup> およびカフェインの影響について調べた. また, 「べにふうき」エキスを経口投与したラット血液中における EGCG および EGCG3<sup>Me</sup> の滞留性についても比較した.

## 実験方法

すべての動物実験は, 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示

第 88 号)」を遵守して行った.

### 1. DNA マイクロアレイ解析

12 週齢のオス C57BL/6J マウスに 2% 「べにふうき」茶葉添加高脂肪飼料, 2% 「やぶきた」茶葉添加高脂肪飼料および無添加の高脂肪飼料を 5 週間自由摂食させ (各群  $n = 10$ ), 肥満関連のパラメーターを測定した結果, 「べにふうき」茶葉は一般的な緑茶である「やぶきた」茶葉に比べて強い抗肥満効果を示した (表 1). 5 週間の飼育期間を経た上記 3 群のマウス (各群  $n = 10$ ) から, DNA マイクロアレイ解析に使用する個体をそれぞれ 3 個体ずつ選抜した. 具体的には, 松井らの方法<sup>8)</sup> を参考に, 10 項目の肥満関連パラメーター (体重増加量, 総摂取カロリー, 肝臓重量, 鼠径部皮下脂肪組織重量, 腎周囲脂肪組織重量, 精巣周囲脂肪組織重量, 血中中性脂肪濃度, 血中総コレステロール濃度, 血中レプチン濃度, 血糖値) を指標として, 各群から最も平均的な 3 個体を選抜した. 各群 3 個体の腎周囲脂肪組織から Trizol (Invitrogen) および RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し, 遺伝子発現量を Affymetrix 社のマニュアルに従って Gene Chip mouse 430 2.0 array (Affymetrix) により網羅的に測定した. データ解析には GeneChip Operating Software ver.1.2 (Affymetrix) および GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technology) を用いた. 各群 3 個体中で 2 個体以上が Present または Marginal のフラッグを示したプローブを解析対象とした. 3 群間の統計解析は一元配置分散分析により行い, Benjamini と Hochberg らの方法<sup>9)</sup> で false discovery rate を算出し,  $q$  値が 0.3 以下の遺伝子についてのみ 3 群間の発現量を Tukey の方法により多重比較検定 ( $P < 0.05$ ) した.

### 2. 脂肪前駆細胞における脂肪蓄積抑制

#### (1) カテキン類

EGCG およびカフェインはシグマ社から購入し, EGCG3<sup>Me</sup> Me は佐野らの方法<sup>10)</sup> を用いて「べにふうき」茶葉より純品を精製した.

#### (2) 脂肪前駆細胞の培養および分化誘導

マウスの脂肪前駆細胞 3T3-L1 (ATCC) は、10% (v/v) FBS を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) で培養した。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導は、Furuyashiki らの方法<sup>11)</sup> を一部改変し、以下の条件で行った。24 ウェルプレートに細胞を  $1 \times 10^5$ /ウェルの密度で播種し、2 日間培養した後、10% (v/v) FBS、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma)、 $1 \mu\text{M}$  dexamethasone (Sigma) および  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  insulin (Sigma) を含む DMEM で更に 2 日間分化誘導処理した。誘導処理後、培地を 10% (v/v) FBS および  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  insulin を含む DMEM に交換し、2~3 日毎に培地を交換しつつ、6~7 日間培養を継続した。分化誘導開始時より、培地中に異なる濃度の EGCG、EGCG3''Me あるいはカフェインを添加し、脂肪蓄積量または分化率に対する影響を以下の測定方法により評価した。

### (3) Oil Red O 染色による脂肪蓄積量の比較

Wolfram らの方法<sup>5)</sup> に従って、24 ウェルプレート上の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、10% (v/v) ホルマリンで 30 分固定した後、60% (v/v) イソプロパノールに溶解した Oil Red O (Sigma) 飽和溶液に 20 分間浸漬して脂肪を染色した。染色後、細胞を PBS で 3 回洗浄して顕微鏡観察を行った後、100% イソプロパノールを添加して Oil Red O を抽出し、 $A_{516}$  を測定した。無添加における  $A_{516}$  を 100% とし、EGCG、EGCG3''Me あるいはカフェインを培地に添加した細胞の脂肪蓄積率を算出し、これらの添加物による脂肪蓄積抑制効果を比較した。有意差検定 ( $P < 0.05$ ) は Tukey の方法による多重比較を行った。

### (4) Nile Red 染色による脂肪細胞分化率の比較

Feyisola らの方法<sup>12)</sup> に従って、24 ウェルプレート上の細胞をトリプシン処理により剥離し、1% (w/v) パラホルムアルデヒドで 20 分固定した後、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  Nile Red (MP Biomedicals) で 10 分染色した。細胞中の脂肪へ取り込まれた Nile Red の蛍光を FACSCanto II (Becton Dickinson and Company) を用いて測定した。Nile Red の測定は、アルゴンレーザー (488 nm) で励起し、564~604 nm のバンドパスフィルターを通過した蛍光を検出し、Nile Red 染色された細胞を分化細胞とした。1 測定当たりの細胞数は 5000 以上とし、総細胞数に占める Nile Red 染色細胞数の割合を分化率として算出した。EGCG および EGCG3''Me の各添加濃度における分化率について、Student の *t*-test により有意差検定 ( $P < 0.05$ ) を行った。

## 3. EGCG および EGCG3''Me の血中滞留量の測定

### (1) 実験動物および採血

7 週齢のオス SD ラット (日本 SLC) に前もって頸静脈カニューレ手術を施した後、実験に使用するまでに 1 週間の回復期間を設けた。回復期間中は、温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、明期 12 時間 (7:00-19:00) の条件下にて一

般飼料 CE-2 (日本クレア) および水道水を自由に与え、床網付きのステンレスケージ中で単独飼育した。「べにふうき」エキス (アサヒ飲料) を EGCG 濃度が  $1 \text{mM}$  となるように  $1 \text{mM}$  アスコルビン酸を含む  $1 \text{mM}$  塩酸に溶解し、試験前日より 1 晩絶食させたラットに体重  $100 \text{g}$  当たり  $1 \text{mL}$  を経口投与した ( $n=7$ )。投与前および投与後 15、30、60、120、180 分の時点で、カニューレを通じて  $0.5 \text{mL}$  ずつへパリン加採血を行い、血漿を分離した後分析時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

### (2) EGCG および EGCG3''Me の定量

血漿中の EGCG および EGCG3''Me の濃度は、Lee らの方法<sup>13)</sup> を一部改変した方法により HPLC (SCL-10Avp; 島津製作所) を用いて測定した。即ち、まず、アセトニトリルで血漿中のタンパク質を除去し、酢酸エチルにより EGCG および EGCG3''Me を抽出した。抽出液を減圧乾固した後、用いた血漿と同量の HPLC 移動相溶液に溶解し、その  $20 \mu\text{L}$  を逆相カラム (CAPCELL PAK C18 MGII,  $2.0 \times 150 \text{mm}$ ; 資生堂) にインジェクションした。HPLC 移動相には  $100 \mu\text{M}$  EDTA $\cdot$ 2Na を含む 0.1% リン酸溶液: アセトニトリル = 90:10 を用い、流速  $0.4 \text{mL}/\text{min}$  でアイソクラティック溶出した。溶出ピークの検出は電気化学検出器 (NANOSPACE SI-2; 資生堂) により行い、 $600 \text{mV}$  の印加電圧で検出された電流値の溶出パターンからピーク面積を算出し、濃度既知の標準物質のピーク面積から作成した標準直線を用いて定量した。経口投与後 3 時間までの EGCG および EGCG3''Me の血中濃度を曲線下面積 (AUC) に変換し、各時間における AUC の有意差 ( $P < 0.05$ ) を Student の *t*-test により検定した。

## 実 験 結 果

### 1. 白色脂肪細胞の遺伝子発現に及ぼす「べにふうき」茶葉摂取の影響

「べにふうき」茶葉を摂取したマウス (「べにふうき」群)、「やぶきた」茶葉を摂取したマウス (「やぶきた」群) および無添加の高脂肪飼料を摂取したマウス (無添加群) の腎周囲白色脂肪における脂質代謝関連遺伝子の発現量の変動を DNA マイクロアレイにより解析して比較した (表 2)。その結果、脂肪酸合成酵素遺伝子群の発現を制御する Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 (Srebp1) 遺伝子<sup>14)</sup> の発現量が、「べにふうき」群では無添加群の 0.68 倍と減少傾向にあった ( $P < 0.10$ )。また、Srebp1 によって制御される Stearoyl-CoA desaturase 2 遺伝子<sup>14)</sup> の発現量が、「べにふうき」群で無添加群の 0.5 倍に減少していた ( $P < 0.05$ )。更に、脂肪酸の  $\beta$  酸化に関与する Acetyl-CoA acyltransferase 1A (Acaal)<sup>15)</sup> や Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl (Pcox)<sup>16)</sup> 遺伝子の発現量が、「べにふうき」群では無添加群に比較してそれぞれ 0.71 倍 ( $P < 0.05$ )、0.75 倍 ( $P < 0.05$ ) と有意に減少していた。

表 2 脂質合成, 代謝および脂肪細胞増殖因子についての遺伝子発現解析

	シンボル	遺伝子	プローブ#	q 値	「べにふうき」群	「やぶきた」群	無添加群
Lipid synthesis and metabolism	Scd2	Stearoyl-CoA desaturase 2	1415822_at	0.19	0.50±0.1 <sup>ab</sup>	0.91±0.0	1.00±0.2
	Acaa1	Acetyl-CoA acyltransferase 1A	1416947_s_at	0.25	0.71±0.1 <sup>a</sup>	0.86±0.0	1.00±0.1
	Pcox	Acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl	1420684_at	0.18	0.75±0.0 <sup>a</sup>	0.76±0.1 <sup>a</sup>	1.00±0.0
Transcriptional regulation	Srebp1	Sterol regulatory element binding factor 1	1426690_a_at	0.26	0.68±0.1	0.77±0.1	1.00±0.2
Growth factor and leptin	Igf-1	Insulin-like growth factor 1	1419519_at	0.19	0.63±0.1 <sup>ab</sup>	0.86±0.1	1.00±0.1
	Obese	Leptin	1422582_at	≥0.3	0.58±0.2	0.83±0.2	1.00±0.1

平均値±標準偏差

<sup>a</sup>; 多重比較 (Tukey の方法) において無添加群と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた

<sup>b</sup>; 多重比較 (Tukey の方法) において「やぶきた」群と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた

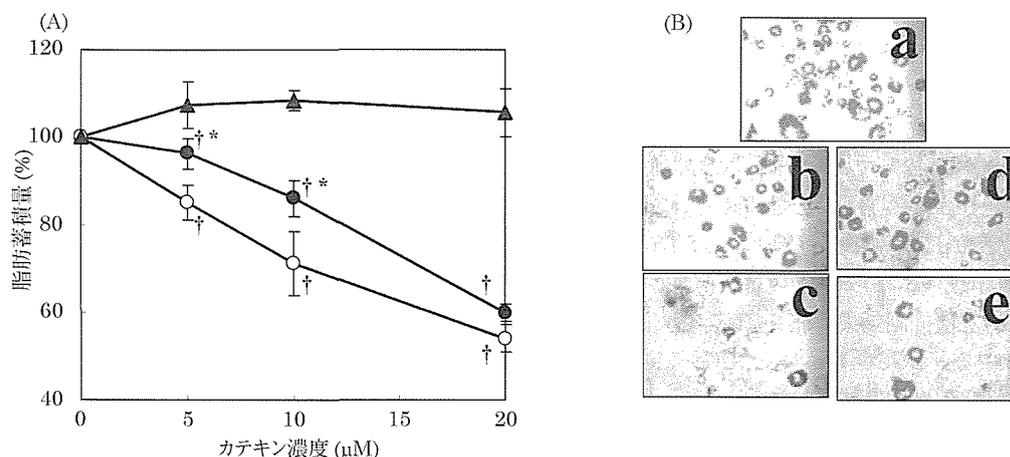


図 1 カテキンによる脂肪細胞 (3T3-L1) への分化抑制作用

(A) データは平均値±標準偏差で示した. ●; EGCG3''Me, ○; EGCG, ▲; カフェイン. †; 多重比較 (Tukey の方法) においてカフェイン処理区と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた. \*; 多重比較において EGCG 処理区と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた.

(B) 脂肪細胞 (3T3-L1) の Oil Red O 染色像.

a; カテキン未処理, b; 10μM EGCG 処理, c; 20μM EGCG 処理, d; 10μM EGCG3''Me 処理, e; 20μM EGCG3''Me 処理.

その他, 前駆脂肪細胞の分化を促進する Insulin like growth factor-1 (IGF-1) 遺伝子<sup>17)</sup> の発現量は, 「べにふうき」群が「やぶきた」群および無添加群と比較して有意に減少していた. レプチン遺伝子の発現量は, 各群間に有意差を認めるには至らなかったものの, 「べにふうき」群が無添加群の 0.58 倍と低値を示し, 体脂肪率と正の相関関係にあるとされる血中レプチン濃度<sup>18)19)</sup> の挙動 (表 1) とよく一致していた.

## 2. EGCG および EGCG3''Me の脂肪蓄積抑制効果

3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に及ぼす EGCG および EGCG3''Me の抑制作用を, カフェインを対照として比較した. 培地中へ添加した EGCG および EGCG3''Me の濃度は, 予備試験により 3T3-L1 細胞に対する細胞毒性が認められなかった 0-30μM の範囲とした (データ省略). 分化誘導開始時より 3T3-L1 を異なる濃度 (5, 10, 20μM) の EGCG, EGCG3''Me あるいはカフェインを添加した培地で 8 日間培養し, 細胞内の脂肪蓄積量を Oil Red O 染色により測定した. その結果, カフェイン添加と EGCG 添加との間, およ

び, カフェイン添加と EGCG3''Me 添加との間には, いずれも脂肪蓄積量に有意差が認められ, EGCG と EGCG3''Me のいずれについても濃度依存的な脂肪蓄積抑制作用が認められた (図 1A). Oil Red O 染色後の顕微鏡観察の結果からも, EGCG と EGCG3''Me は共に細胞内の脂肪蓄積量を濃度依存的に減少させることが確認された (図 1B). 一方, カフェインには脂肪蓄積抑制効果は認められなかった (図 1A).

しかし, 上で見られた EGCG と EGCG3''Me による脂肪蓄積抑制効果は, 3T3-L1 細胞の分化が抑制された結果の可能性も考えられる. そこで, 脂肪蓄積量の比較ではなく, 脂肪を蓄積した成熟脂肪細胞と脂肪を蓄積しなかった前駆細胞との比率を比較した. 細胞播種後 3 日目より 3T3-L1 を異なる濃度 (5, 10, 15, 20, 30μM) の EGCG または EGCG3''Me を添加した培地で 9 日間培養し, 細胞に蓄積した脂肪を蛍光色素 Nile Red で染色した後, フローサイトメーターにより細胞の蛍光強度を測定して全細胞数に対する脂肪蓄積細胞数の割合 (分化率) を求めた. その結果,

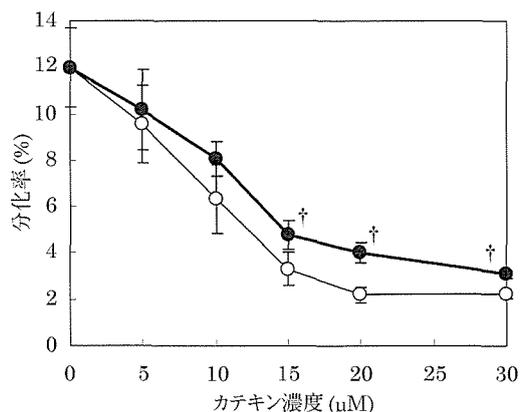


図 2 カテキンによる脂肪細胞 (3T3-L1) 分化抑制効果  
フローサイトメトリーにより測定した分化率を示した。  
データは平均値±標準偏差で示した。●; EGCG3' Me,  
○; EGCG. †;  $P < 0.05$

無添加における分化率は 12% であったのに対し, EGCG および EGCG3' Me を 10  $\mu$ M 添加したときにはそれぞれ 6.3% および 8.1%, また 30  $\mu$ M 添加ではそれぞれ 2.2% および 3.1% であった (図 2)。これらの結果は, EGCG および EGCG3' Me の脂肪蓄積抑制効果は脂肪細胞の分化抑制によることを示している。EGCG および EGCG3' Me による 3T3-L1 細胞の分化抑制は濃度依存的であり, 30  $\mu$ M 添加時の EGCG3' Me の分化抑制作用は EGCG の 81.7% に比べて 74.2% とほぼ同等であった。

### 3. 「べにふうき」エキスを投与したラット血漿中の EGCG および EGCG3' Me 濃度

頸静脈カニューレラットに「べにふうき」エキスを経口投与後, 血漿中の EGCG および EGCG3' Me 濃度を経時的に測定し, AUC に変換した。「べにふうき」エキスを投与後 3 時間までの AUC は, EGCG の 0.015  $\mu$ Mh に対して EGCG3' Me では 0.011  $\mu$ Mh であり, 両者間に有意な差は認められなかった (図 3)。投与した「べにふうき」エキス溶液中の EGCG および EGCG3' Me の濃度はそれぞれ 1.00 mM および 0.23 mM であったにもかかわらず, AUC で比較した血漿中の EGCG3' Me 滞留量は EGCG の滞留量と遜色がないレベル (約 70%) を示した (図 3)。血漿を  $\beta$ -グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.31; Sigma) およびカテコール-O-サルファターゼ (EC 3.1.6.1; Sigma) で脱抱合処理しても同様の結果が得られた (データ省略)。これらの結果は, 吸収率を含めた血液中的滞留性は, EGCG3' Me が EGCG の約 3.2 倍高いことを示している (表 3)。

## 考 察

無添加の高脂肪飼料ならびに 2% (w/w) の「べにふうき」茶葉または「やぶきた」茶葉を添加した高脂肪飼料により C57BL/6J マウスを 5 週間飼育し, 飼育期間中における体重増加量および脂肪組織の増加重量を比較した結果,

表 3 EGCG および EGCG3' Me の血中滞留効率

	「べにふうき」エキス中 濃度 (mM)	AUC (0-3 h) ( $\mu$ Mh)	EGCG に対する 血中量 (相対値)
EGCG	1.00	0.015	1.0
EGCG3' Me	0.23	0.011	3.2

「べにふうき」茶葉には「やぶきた」茶葉と比べて明らかに高い抗肥満効果が認められた (表 1)。これらのマウスの腎周囲白色脂肪における脂質代謝関連遺伝子群の発現量を DNA マイクロアレイ解析により比較した結果, 「べにふうき」茶葉の抗肥満効果は, 脂肪組織における脂質合成酵素群および脂質代謝酵素群の遺伝子発現を低下させることに基づく脂肪蓄積の抑制によることが示唆された (表 2)。すなわち, 白色脂肪組織中の脂肪酸合成酵素遺伝子群の発現を制御している Srebp1 遺伝子<sup>14)</sup> の発現量は, 「べにふうき」添加群が無添加群に比べて減少傾向にあり, Srebp1 に制御される Scd2 遺伝子<sup>14)</sup> の発現も 50% 減少していた (表 2)。また, 脂肪酸の  $\beta$  酸化に關与する Acaa1<sup>15)</sup> や Pcox 遺伝子<sup>16)</sup> の発現が有意に低下していた (表 2)。これは, 「べにふうき」の摂取が脂肪燃焼を促進することにより抗肥満効果が現れたのではなく, 脂肪蓄積の抑制によって抗肥満効果を実現したことを裏付ける結果であり, 培養脂肪細胞を用いたメチル化カテキンの脂肪蓄積抑制実験の結果と一致していた。さらに, 肝臓および白色脂肪組織に発現している細胞成長因子 insulin-like growth factor (IGF-1) は脂肪細胞の分化を促進することが知られている<sup>17)</sup> が, 「べにふうき」群では IGF-1 遺伝子の発現量が無添加群に比べて有意に低下しており (表 2), 脂肪細胞のオートクリンな IGF-1 による分化誘導を「べにふうき」が抑制する可能性が示唆された。また, レプチン遺伝子の発現量については, 「べにふうき」群は無添加群に比べて 0.58 倍の低値を示した (表 2), 体脂肪率と正の相関関係にあるとされる血中レプチン濃度<sup>18)19)</sup> の挙動 (表 1) とよく一致していた。DNA マイクロアレイ解析で「べにふうき」について観察されたこれらの効果は, 「やぶきた」ではほとんど観察されず, Pcox 遺伝子の発現が有意に低下したのみであり (表 2), 「べにふうき」の抗肥満効果が「やぶきた」より強いこと (表 1) とよく一致した。

Wolfram らは, C57BL/6J マウスに緑茶を長期間摂取させることにより白色脂肪細胞における脂質合成酵素 (Fatty acid synthase や Stearoyl CoA desaturase 1 など) の遺伝子発現が抑制され, 脂肪前駆細胞に EGCG が直接作用して脂肪蓄積を抑制したと報告している<sup>5)</sup>。「べにふうき」茶葉の脂肪蓄積抑制効果が一般的な茶品種「やぶきた」に比べて強い原因は, 「べにふうき」茶葉に特異的に含まれる EGCG3' Me などのメチル化カテキンにあるという可能性が示唆されている<sup>7)</sup>。そこで我々は, マウス白色脂肪前駆

細胞 3T3L1 を用いて EGCG3<sup>o</sup>Me の脂肪蓄積抑制効果を EGCG と比較した結果、メチル化カテキンは EGCG とほぼ同等の濃度依存的な脂肪蓄積抑制作用を有することが明らかとなった (図 1A および図 1B)。一方、カフェインには脂肪蓄積抑制効果は認められなかった (図 1A)。また、DNA マイクロアレイ解析の結果から IGF-1 を介する脂肪細胞の分化抑制の可能性が示唆されたので、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化率に及ぼす EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の影響を調べた。その結果、EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me による脂肪蓄積抑制の作用機序は、一細胞当たりの脂肪蓄積量を均等に減少させるのではなく、脂肪細胞の分化を抑制して脂肪を蓄積する細胞数を減らすことによると考えられた。EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me による 3T3L1 細胞の分化抑制は濃度依存的であり、30 μM 添加時の EGCG3<sup>o</sup>Me の分化抑制効果は EGCG の 91% であり、ほぼ同等であった (図 2)。EGCG による脂肪蓄積抑制の作用点としては、PPAR $\gamma$ <sup>(1)</sup> および C/EBP $\alpha$ <sup>(1)</sup> の遺伝子発現抑制や Insulin Receptor Substrate (IRS) のリン酸化阻害<sup>(20)</sup> が報告されている。我々の DNA マイクロアレイ解析の結果は、「べにふうき」に特異的に含まれるメチル化カテキンによる IGF-1 遺伝子の発現抑制が脂肪蓄積抑制の作用機序に含まれる可能性を示唆しているが、3T3L1 細胞で見られた脂肪蓄積抑制効果および分化抑制効果は EGCG と EGCG3<sup>o</sup>Me で類似している (図 1 および図 2)、EGCG について既に報告されている上記の脂肪蓄積抑制作用機序は EGCG3<sup>o</sup>Me についてもあてはまる可能性があり、更に詳細な検討が必要である。

高脂肪飼料へ添加した「べにふうき」茶葉と「やぶきた」茶葉の非メチル化カテキン含量は同等であるが、「べにふうき」茶葉中には非メチル化カテキンの約 15% のメチル化カテキンが加算的に含まれており、総カテキン含量は「べにふうき」茶葉添加飼料が「やぶきた」茶葉添加飼料より 15% 多かった。しかし、「べにふうき」茶葉が「やぶきた」茶葉より強い抗肥満効果を発揮する (表 1) 原因がこの 15% 相当のメチル化カテキンにあるならば、EGCG3<sup>o</sup>Me は EGCG に比べて格段に強い抗肥満効果を持たなければ説明がつかない。EGCG3<sup>o</sup>Me は、EGCG よりもヒスタミン遊離抑制作用が強く、優れた抗アレルギー作用を発揮することが知られている<sup>(21)</sup>。佐野らは、EGCG3<sup>o</sup>Me の抗アレルギー作用が EGCG より強い理由として、マウス血中における EGCG3<sup>o</sup>Me の安定性が EGCG より高いことを挙げており、EGCG3<sup>o</sup>Me の血中滞留性は EGCG の約 9 倍高く、ガロイル基のトリオール構造の有無が血中安定性に大きく関与していることを報告している<sup>(22)</sup>。我々は、ラットに「べにふうき」エキスを経口投与したあと、血中の EGCG3<sup>o</sup>Me と EGCG の濃度を経時的に測定し、佐野らの結果を支持する確認データを得た (図 3)。すなわち、投与後 3 時間までの AUC で比較したとき、EGCG3<sup>o</sup>Me の血中滞留性

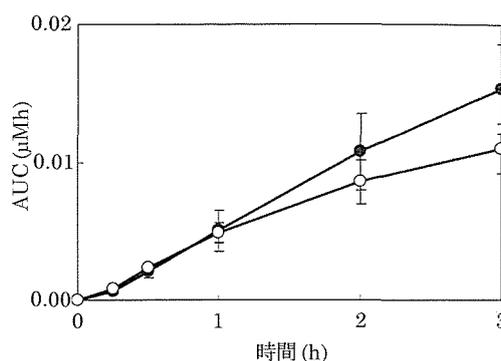


図 3 「べにふうき」エキス経口投与時のラット血漿中カテキン滞留量

データは平均値±標準誤差で示した。○; EGCG3<sup>o</sup>Me, ●; EGCG.

は EGCG の 3.2 倍であった (表 3)。EGCG3<sup>o</sup>Me の脂肪細胞分化抑制効果は、EGCG とほぼ同等であり (図 2)、EGCG3<sup>o</sup>Me の血中滞留性は EGCG に比較して 3.2 倍高いことを考慮すると、「べにふうき」エキスを摂取したときの EGCG と EGCG3<sup>o</sup>Me を合わせた血中滞留量は EGCG の 1.7 倍に (表 3) に達する。これらの結果は、「べにふうき」に特異的に含まれる EGCG3<sup>o</sup>Me などのメチル化カテキンは EGCG を含めた総カテキンの血中有効濃度を持続的に高く維持することに大きく寄与することを示しており、このことが、「べにふうき」が一般の茶品種「やぶきた」に比べて強い抗肥満効果を示す主な理由と考えられる。

## 要 約

「べにふうき」はエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート (EGCG3<sup>o</sup>Me) 等のメチル化カテキンを含有する独特な茶品種である。本報告では、「べにふうき」の強い抗肥満効果の作用機序について、メチル化カテキンを含まない茶品種「やぶきた」を比較対照として検討した。

〔方法〕 12 週齢の C57BL/6J♂マウスを高脂肪飼料のみ、2%「べにふうき」茶葉を含有する高脂肪飼料、および、2%「やぶきた」茶葉を含有する飼料により 5 週間飼育し、腎周囲脂肪組織中の遺伝子発現量を DNA マイクロアレイ法により網羅的に測定、比較した。また、3T3L1 細胞株を用いて、EGCG、EGCG3<sup>o</sup>Me およびカフェインが細胞内脂肪蓄積および前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化に及ぼす阻害効果を比較した。更に、一夜絶食させたラットに「べにふうき」の熱水抽出液を経口投与したあと、血漿中における EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の経時的な濃度変化を比較した。

〔結果および結論〕 DNA マイクロアレイの結果より、「べにふうき」の抗肥満効果は、脂肪細胞中における脂肪酸の合成および  $\beta$  酸化に関連する酵素群の遺伝子発現レベルを低下させることにより、細胞内への脂肪蓄積を阻害した

結果であると考えられた。「べにふうき」が「やぶきた」よりも強い抗肥満効果を有する主な原因は、「べにふうき」に含まれるメチル化カテキン(主としてEGCG<sup>3</sup>Me)にあると考えられた。EGCG<sup>3</sup>Meの脂肪蓄積阻害効果はEGCGとほぼ同等であり(3T3-L1細胞の分化抑制効果として約91%)、血中における滞留性はEGCGの3.2倍高いため、「べにふうき」中に含まれるEGCG<sup>3</sup>Me量はEGCG量に比べて非常に少ないにもかかわらず、EGCGとEGCG<sup>3</sup>Meを合算した脂肪蓄積抑制効果はEGCG単独の効果に比べて1.7倍高くなり、EGCG<sup>3</sup>Meが含まれることによって「べにふうき」の抗肥満作用は増強されている。

カテキン精製に御協力いただきました静岡県立大学薬学部薬学科、宮瀬 敏男教授に篤く御礼申し上げます。

### 文 献

- 山本(前田)万里, 佐藤満昭, 松田奈帆美, 宮瀬敏男, 川本恵子, 鈴木直子, 吉村昌恭, 立花宏文, 袴田勝弘, 茶の品種, 摘採期と製造法によるエピガロカテキン3-O-(3-O-メチル)ガレート含量の変動. *食科工*, **48**, 64-68 (2001).
- Suzuki, M., Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T. and Maeda-Yamamoto, M., Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 510-514 (2003).
- Meguro, S., Mizuno, T., Onizawa, K., Kawasaki, K., Nakagiri, H., Komine, Y., Suzuki, S., Matsui, Y., Hase, T., Tokimitsu, I., Shimasaki, H. and Itakura, H., Effects of tea catechins on diet-induced obesity in mice. *J. Oleo Science*, **50**, 593-598 (2001).
- Hase, T., Komine, Y., Meguro, S., Takeda, Y., Takahashi, H., Mtsui, Y., Inaoka, S., Katsuragi, Y., Tokimitsu, I., Shimasaki, H. and Itakura, H., Anti-obesity effects of tea catechins in humans. *J. Oleo Science*, **50**, 599-605 (2001).
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S.R., Elste, V. and Weber, P., TEAVIGO (epigallo catechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann. Nutr. Metab.*, **49**, 54-63 (2005).
- Dulloo, A.G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P. and Vandermander, J., Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **24**, 252-258 (2000).
- 稲垣宏之, 杉谷政則, 瀬戸口裕子, 伊藤良一, 織谷幸太, 西村栄作, 佐藤 進, 加藤正俊, 齋 政彦, 山本(前田)万里, 亀井優徳, 高脂肪飼料摂取マウスにおける「べにふうき」緑茶の脂肪蓄積抑制効果. *食科工*, **56**, 403-411 (2009).
- Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M., Kato, M., Kamei, M., Shibata, H., Matsumoto, I., Abe, K. and Hashizume, S., Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*, **5**, 594-601 (2005).
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y., Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B.*, **57**, 289-300 (1995).
- Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Kyoji, Y. and Maeda-Yamamoto, M., Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906-1910 (1999).
- Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K. and Ashida, H., Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR $\gamma$ 2 and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2353-2359 (2004).
- Awonusunu, F., Srinivasan, S., Strange, J., Al-Jumaily, W. and Bruce, MC., Developmental shift in the relative percentages of lung fibroblast subsets: role of apoptosis postseptation. *American J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **277**, L848-859 (1999).
- Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A. and Yang, C.S., Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prev.*, **4**, 393-399 (1995).
- Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M. and Edwards, P. A., Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20603-20610 (1999).
- Chevillard, G., Clémencet, M.C., Etienne, P., Martin, P., Pineau, T., Latruffe, N. and Nicolas-Frances, V., Molecular cloning, gene structure and expression profile of two mouse peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes. *BMC Biochem.*, **25**, 3 (2004).
- Van Veldhoven P.P., Vanhove, G., Vanhoutte, F., Dacremont, G., Parmentier, G., Eysen, H.J. and Mannaerts, G. P., Identification and purification of a peroxisomal branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24676-24683 (1991).
- Martina, A.P., Winterhalter, K.H., Boni-Schnetzler, M., Froesch, E.R. and Zapf, J., Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology*, **133**, 2624-2631 (1993).
- Ahren, B., Plasma leptin and insulin in C57BL/6J mice on a high-fat diet relation to subsequent changes in body weight. *Acta. Physiol. Scand.*, **165**, 233-240 (1999).
- Shimizu, H., Shimomura, Y., Hayashi, R., Ohtani, K., Sato, N., Futawatari, T. and Mori, M., Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **21**, 536-541 (1997).
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M., Wang, Y., Teixeira, S.R., Riegger, C. and Weber, P., Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J. Nutr.*, **136**, 2512-2518 (2006).
- Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikumoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H. and Kawakami, T., O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunol.*, **172**, 4486-4492 (2004).
- 佐野満昭, 宮瀬敏男, 立花宏文, 山本万里, 茶成分の抗アレルギー作用. *Fragrance J.*, **4**, 46-52 (2000).

(平成 20 年 11 月 18 日受付, 平成 21 年 2 月 4 日受理)