

博士論文

ノビレチンおよび緑茶カテキンが 膵β細胞機能に及ぼす効果に関する研究

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である。

2015年9月

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府

博士後期課程薬科学専攻 薬理学教室

灌井 美樹

**Effects of nobiletin and green tea catechins
on pancreatic β -cell functions**

September 2015

Miki Takii

目次

	頁
緒論	1
第一章 膵β細胞のインスリン分泌および細胞生存に対する ノビレチンの作用解析	6
第1節 序論	6
第2節 実験方法および使用薬物	8
1-2-1. 使用薬物	8
1-2-2. ラット由来膵β細胞 INS-1D 細胞の培養	9
1-2-3. INS-1D 細胞からのインスリン分泌量測定	9
1-2-4. Flow Cytometry を用いた Annexin-V-FITC/PI 染色による アポトーシス細胞の検出	10
1-2-5. 細胞内の cAMP 濃度の測定	10
1-2-6. ウェスタンブロッティング	11
1-2-7. 統計処理	12
第3節 実験結果	13
1-3-1. グルコース誘発インスリン分泌に対するノビレチンの作用	13
1-3-2. タプシガルギン誘発アポトーシスに対するノビレチンの作用	14
1-3-3. ノビレチンによる細胞内 cAMP 濃度変化	17
1-3-4. ノビレチンによるタプシガルギン誘発アポトーシス抑制反応 メカニズムの解析	18
1-3-5. ノビレチンのアポトーシス関連タンパク質発現への作用	20
1-3-6. ノビレチンによる小胞体ストレス抑制反応への インスリンの関与	21
1-3-7. ノビレチンによる小胞体ストレス抑制反応のメカニズム	24
第4節 考察	26
第5節 小括	31
第二章 膵β細胞のインスリン分泌および細胞生存に対する カテキン類の影響	32

第1節	序論	32
第2節	実験方法および使用薬物	34
2-2-1.	使用薬物	34
2-2-2.	ラット由来膵β細胞 INS-1D 細胞の培養	35
2-2-3.	INS-1D 細胞からのインスリン分泌量測定	35
2-2-4.	INS-1D 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の測定	35
2-2-5.	Flow Cytometry を用いた Annexin-V-FITC/PI 染色による アポトーシス細胞の検出	36
2-2-6.	統計処理	36
第3節	実験結果	37
2-3-1.	グルコース誘発インスリン分泌に対するカテキン類の作用	37
2-3-2.	トルブタミド誘発インスリン分泌に対する EGCG の作用	39
2-3-3.	高濃度 KCl 誘発インスリン分泌に対する EGCG の作用	40
2-3-4.	$[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対するカテキン類の効果	41
2-3-5.	小胞体ストレス誘発アポトーシスに対する EGCG の効果	44
第4節	考察	46
第5節	小括	50
総括		51
謝辞		53
参考文献		54

略語表

ADP	Adenosine diphosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ASK1	Apoptosis-signaling-kinase 1
ATF6	Activating transcription factor- 6
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
[Ca ²⁺] _i	Cytosolic calcium concentration
CA	Catechin
cAMP	Cyclic AMP
CG	Catechin gallate
cGMP	Cyclic GMP
CHOP	C/EBP-homologous protein
CREB	cAMP response element binding protein
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin gallate
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin gallate
Epac	Exchange proteins directly activated by cAMP
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein
GC	Galocatechin
GCG	Galocatechin gallate
GLP-1	Glucagon like peptide-1
GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion
HK solution	HEPES-buffered Krebs solution
HOMA	The Homeostasis Model Assessment
IRE-1	Inositol-requiring protein-1
JNK	c-Jun N-terminal protein kinase
K _{ATP} チャンネル	ATP-sensitive potassium channel
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NOB	Nobiletin
PDE	Phosphodiesterase
PERK	Protein kinase RNA like ER kinase
PI	Propidium iodide
PKA	Protein kinase A
PKG	Protein kinase G
TG	Thapsigargin
TRAF2	TNF-receptor-associated factor 2

緒論

膵β細胞では、細胞膜上に存在するグルコーストランスポーターを介し細胞内へのグルコースの取り込みが増加すると、続いて解糖系、クエン酸回路での代謝を経てミトコンドリアでのATP合成が促進され、ATP/ADP比が上昇することで K_{ATP} チャネルが閉口する。これに伴い細胞膜が脱分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化を介した細胞内への Ca^{2+} の流入により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、インスリン分泌が惹起される(Fig. 1)。2型糖尿病は、β細胞からのインスリン分泌の低下や各組織におけるインスリン抵抗性による相対的なインスリン作用不足により、血糖値の高い状態が持続することにより発症する。慢性的な高血糖状態を伴う2型糖尿病では、β細胞が持続的に高血糖に曝されることで、酸化ストレスなどの細胞障害性因子により、β細胞機能障害が引き起こされる。その結果、β細胞数の減少やそれに伴うインスリン分泌能の低下が引き起こされ、2型糖尿病が進行すると考えられている^{1,2,3)}。そのため、2型糖尿病の進行を遅らせるためには、インスリン分泌能の維持とβ細胞数の維持が重要なポイントとなる。β細胞数減少の一因に、小胞体ストレスにより誘発されるβ細胞アポトーシスがある。β細胞から分泌されるインスリンをはじめとして、タンパク質は小胞体で合成され、適切な立体構造にフォールディングされている。しかし、異常タンパク質が蓄積すると小胞体の恒常性が破壊され、小胞体ストレスが惹起される。小胞体の恒常性を維持するため、小胞体ストレスに対する応答反応は、inositol-requiring protein-1 (IRE-1)、protein kinase RNA (PKR) like ER kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6)という3つのセンサー分子を介して起こることが知られている^{4, 5, 6, 7, 8, 9)}。IRE-1を介する経路では、TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)、apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)、c-Jun N-terminal protein kinase (JNK)といったシグナル分子の活性化を介してアポトーシスが誘導される^{4, 5, 6, 7, 8, 9)}。PERKを介した経路では、eIF2 α を介したタンパク質の翻訳抑制や、eIF2 α による転写因子activating transcription factor 4 (ATF4)の発現上昇を介して、アポトーシス関連転写因子C/EBP-homologous protein (CHOP)の発現が上

昇し、アポトーシスが誘導される^{4,5,6,7,8,9)}。ATF 6 を介した経路では、ゴルジ体におけるタンパク質分解により活性化された ATF6 が核内に移行してアポトーシス関連転写因子 CHOP の発現が上昇し、アポトーシスが誘導される^{4,5,6,7,8,9)} (Fig. 2)。2 型糖尿病治療薬として古くから使用されてきたスルホニルウレア薬は、ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP}チャネル) を閉口し、インスリン分泌を促進するが、長期投与により β 細胞を疲弊させ、スルホニルウレア薬の効果が減弱する二次無効を引き起こすなど問題が多い。そのため、近年の糖尿病治療戦略としては、インスリン分泌促進作用に加え、β 細胞を保護し β 細胞数の量的な減少を抑制し、糖尿病の進行を防ぐ治療法に注目が集まっている。

食糧事情の変化により世界的にも糖尿病患者数は増加しており、世界の糖尿病人口は 3 億人を超え、2030 年には 5 億人を超えると予測されている¹⁰⁾。また我が国においても、2012 年の時点で「糖尿病が強く疑われる人」は 950 万人、病気の可能性を否定できない「糖尿病予備軍」は 1,100 万人となっており¹¹⁾、今後の我が国の人口構成の超高齢化に伴い、糖尿病有病者数はさらに増加することが予測される。

厚生労働省は、平成 22 年に初めて日本の「健康寿命」を算出した。その結果、静岡県の女性は全国 1 位、男性は全国 2 位と男女ともに上位であった。現在、寿命と健康寿命の差を縮めるために健康寿命の延伸、つまり健康長寿が求められている。糖尿病は、血管障害による心血管疾患のリスクを高め、また神経障害、網膜症や腎症などの合併症を併発するなど、生活の質を著しく低下させる疾患であることから、健康長寿実現のために、食生活の改善等により糖尿病の発症を予防する動きが活発化している。食生活の改善のひとつとして、抗糖尿病効果を有する天然物由来成分をサプリメント等により食生活に取り入れることが考えられる。

本研究では、抗糖尿病効果を有すると言われている天然物由来成分として、静岡県の特産品である緑茶中に含まれるカテキン類と、みかんなど柑橘果皮に含まれるノビレチンに着目した。カテキン類については、脂肪燃焼効果により 2 型糖尿病の改善効果があるとの報告¹²⁾があり、特定保健用食品として高濃度茶カテキン飲料な

どは一般的に広く摂取されている。また、カテキン類がインスリン分泌を促進したという結果から、カテキン類が β 細胞に作用し抗糖尿病効果を示すという報告がなされている^{13,14)}。一方、カテキン類が活性酸素を産生してアポトーシスを誘導するとの報告¹⁵⁾やストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいてカテキン類の処置によりインスリン分泌が抑制されるとの報告¹⁶⁾もあり、糖尿病に対して負の効果を示すことも報告されている。このように、カテキン類の膵 β 細胞に対する作用については未だ統一した見解は得られていない。ノビレチンについては、前駆脂肪細胞3T3-L1細胞における検討で脂肪細胞の分化や脂肪分解をノビレチンが促進し抗肥満効果を示すとの報告や¹⁷⁾、*ob/ob*マウスや高脂肪食誘発糖尿病モデルマウスにおいて、ノビレチンがインスリン抵抗性改善作用を示すとの報告^{18),19)}など、2型糖尿病改善効果を示すことが報告されているが、 β 細胞に対する直接的な作用に関する報告はない。糖尿病患者や糖尿病予備軍の人々を対象に、これら天然物由来成分を日常生活に取り入れた食生活の改善を考えた場合、これらの β 細胞に対する直接的な作用について明らかにしておく必要がある。

本研究では、膵 β 細胞のインスリン分泌や細胞生存に対するカテキン類やノビレチンの作用を解明することを目的として、第一章ではノビレチンの作用について、第二章ではカテキン類の作用について検討した。以上の研究から、ノビレチンおよびカテキン類が β 細胞に対し、それぞれ異なる作用機序により、抗糖尿病効果を示すという新たな知見が得られた。ただし、抗糖尿病効果を示すにはカテキン類およびノビレチンそれぞれに至適濃度範囲が存在し、その範囲を逸脱することにより効果が得られない、あるいは有害な作用を発現する可能性があることも示された。

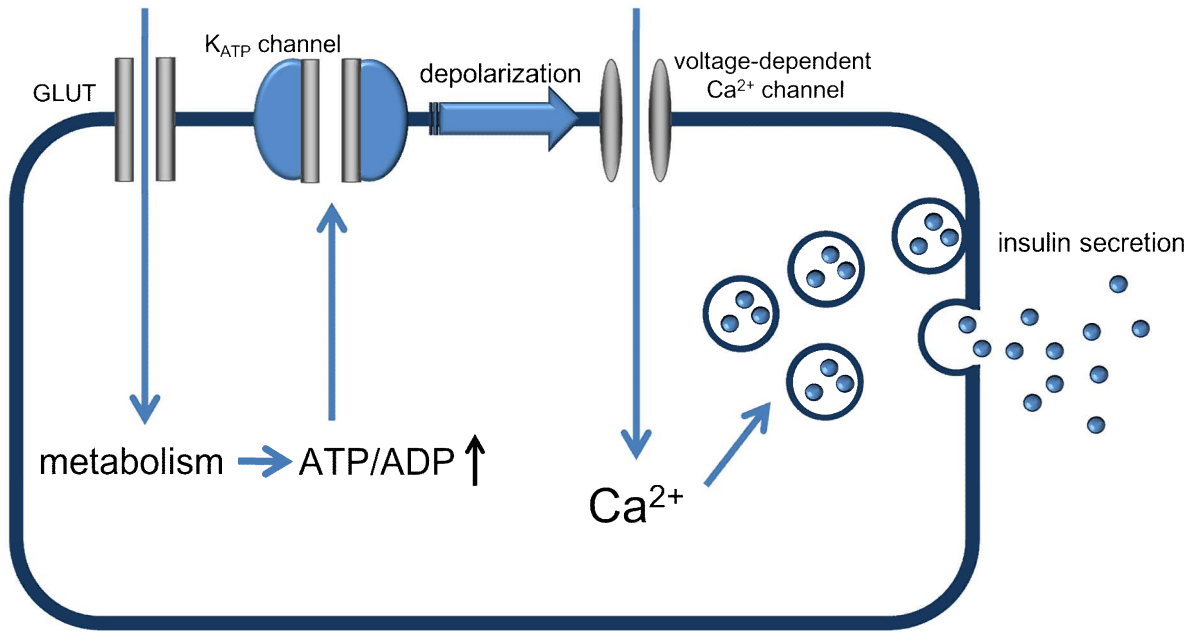


Fig. 1. Mechanism of insulin secretion in a pancreatic β -cells.

Glucose uptake into β -cells is mediated by glucose transporter (GLUT). Glucose is metabolized to produce ATP. Increased ATP levels result in closure of ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels, resulting in membrane depolarization that activates voltage-dependent Ca^{2+} channels to subsequently trigger insulin secretion.

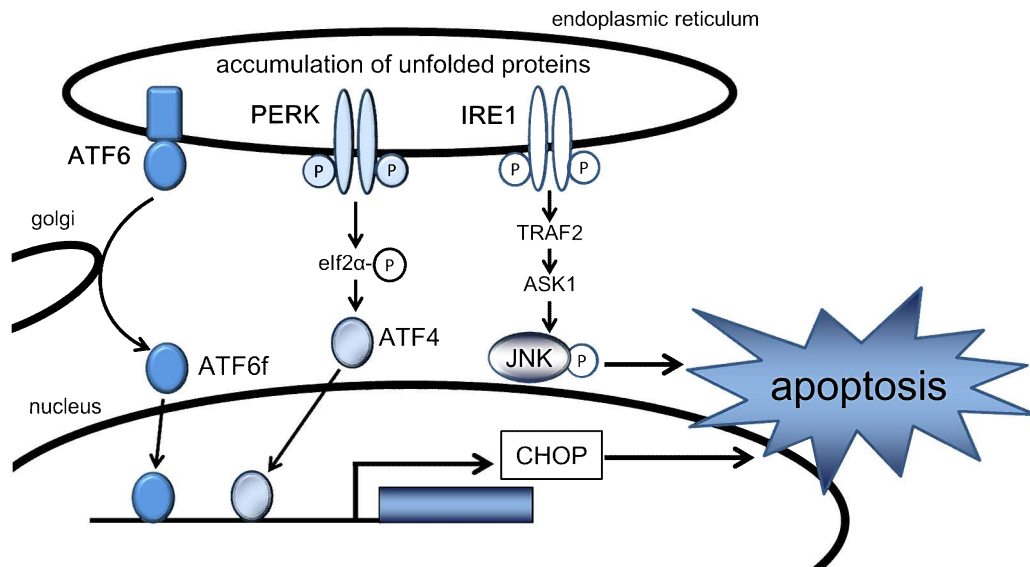


Fig. 2. Mechanism of unfolded protein response in endoplasmic reticulum.

The endoplasmic reticulum (ER) responds to the accumulation of unfolded proteins (ER stress). The response to ER stress is mediated by three different sensors, IRE-1, PERK, and ATF6. IRE-1 activates the TRAF2/ASK1/JNK pathway and induces apoptosis. PERK phosphorylates eIF2 α , which increases ATF4 expression. ATF4 mediates expression of CHOP and induces apoptosis. ER stress induces translocation of ATF6 from the ER to the Golgi and cleavage of ATF6. The cytosolic transcriptional activator domain ATF6f migrates to the nucleus to activate transcription of CHOP.

第一章 膵β細胞のインスリン分泌及び細胞生存に対する ノビレチンの作用解析

第1節 序論

カテキン類を含むフラボノイドのうち、抗糖尿病効果を示すことが報告されている化合物はいくつか知られている²⁰⁾。タマネギなどの含有成分である quercetin²¹⁾ やイソフラボン的一种である genistein²²⁾ はインスリン分泌促進効果を有することが報告されている。一方、カテキン類はインスリン分泌抑制作用を有している²³⁾。このように、β細胞に直接働きかけ、インスリン分泌を調節するフラボノイドが複数存在している。柑橘果皮成分であるノビレチンは、抗がん作用²⁴⁾、抗炎症作用²⁵⁾ や神経保護作用²⁶⁾ など、種々の生理活性を有することで近年注目を集めている。ノビレチンは他にも、前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞における検討で脂肪細胞の分化や脂肪分解を促進し抗肥満効果を示すこと¹⁷⁾ や、*ob/ob* マウスにおける検討で 1 日 200mg/kg のノビレチンを 5 週間投与することにより、インスリン抵抗性の指標である The Homeostasis Model Assessment (HOMA) の改善や血糖降下作用により抗糖尿病効果を示すこと¹⁸⁾ が報告されている。しかしながら、インスリンを分泌する膵β細胞に対する直接的な作用を詳細に検証した報告はない。

2 型糖尿病では、β細胞からのインスリン分泌機能障害に加え、β細胞数の減少が認められる。β細胞数の減少の一因として、小胞体ストレスにより誘発されるβ細胞アポトーシスが知られている。これまでに、トカゲ毒であり、グルカゴン様ペプチド(glucagon-like peptide-1: GLP-1)受容体の活性化物である exendin-4 が細胞内 cAMP 上昇を介し、小胞体ストレスを緩和することで、β細胞アポトーシスを抑制する効果を有することが証明されている。また、フラボノイド的一种である tangeretin は、CHOP の発現抑制を介し、β細胞小胞体ストレス軽減作用を有することが示唆されている²⁷⁾。このように、天然物由来の成分による小胞体ストレス軽減

を介した β 細胞数の減少抑制作用が示唆されていることから、ノビレチンによる抗糖尿病効果にも β 細胞における小胞体ストレスへの効果が寄与する可能性が考えられる。

そこで本章では、ラット由来膵 β 細胞株 INS-1D 細胞を用いて、11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌反応に与えるノビレチンの作用、及びタプシガルギン処置により誘導される小胞体ストレス誘発アポトーシスに対するノビレチンの作用とそのメカニズムの解明をめざして、以下の検討を行った。

第 2 節 実験方法及び使用薬物

1-2-1. 使用薬物

ノビレチンについては、浅川らの方法により合成されたものを、静岡県立大学菅敏幸教授に寄贈していただき実験に用いた²⁸⁾。

その他、実験に用いた薬物を以下に記載する。

RPMI-1640	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Penicillin G potassium	(Meiji Seika, Tokyo, Japan)
Streptomycin sulfate	(Meiji Seika, Tokyo, Japan)
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Sodium pyruvate	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Trypsin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Accutase	(Innovative Cell Technologies, Inc, San Diego, CA, USA)
BSA	(Roche, Basel, Switzerland)
D(+)-Glucose	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Propidium Iodide	(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)
Annexin-V-FLUOS	(Roche, Basel, Switzerland)
Thapsigargin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
KT5720	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
ESI-09	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Forskolin	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
IBMX	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
S661	(Medical&Biological Laboratories, Nagoya, Japan)

その他の試薬は、すべて市販の特級規格品を使用した。

1-2-2. ラット由来膵β細胞株 INS-1D 細胞の培養

ラット由来膵β細胞株である INS-1D 細胞は、C. Wollheim (University of Geneva, Geneva, Switzerland) より寄贈して頂いたものを用いた。INS-1D 細胞は、Asfari らの方法を参考に INS-1D complete medium (10 mM HEPES、10% FBS、100 U/mL penicillin G potassium、100 µg/mL streptomycin sulfate、1 mM sodium pyruvate、50 µM 2-mercaptoethanol を添加した RPMI 1640 with L-Glutamine and Phenol Red, Wako RPMI 1640 medium) を用いて、37 °C、95% air-5% CO₂ の培養装置中で培養した。培地交換は 2-3 日毎に行った。5-7 日毎に 0.025% trypsin/0.0045% EDTA-2Na 溶液を用いて継代を行い、 2×10^7 cells/dish の細胞密度で 90 mm cell culture dish に播種した。

1-2-3. INS-1D 細胞からのインスリン分泌量測定

INS-1D 細胞を 24 well plate に 2.5×10^5 cells/well ずつ播種し、48 時間培養した。その後、2.8 mM glucose 含有 0.1% BSA/HEPES-buffered Krebs (HK) solution (129 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.18 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES、pH は NaOH によって 7.4 に調整) にてウェルを洗浄してから同溶液中で 1 時間プレインキュベーションを行った。さらに、2.8 mM glucose、11.1 mM glucose、またはカテキン類を含有した 11.1 mM glucose に交換して 1 時間テストインキュベーションを行った。その後ウェル内の上清全量 1 mL をサンプルとして採取し、4 °C、1690×g で 10 分間遠心した後、上清を 900 µl 採取し、-20 °C で保存した。サンプル中のインスリン量は、インスリンアッセイキット (Insulin 'Eiken' Radioimmunoassay Kit, Tokyo, Japan; RAT INSULIN RIA KIT 250 TUBES, Millipore, Massachusetts, USA) を用いてラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。

1-2-4. Flow Cytometry を用いた Annexin-V-FITC/PI 染色によるアポトーシス細胞の検出

INS-1D 細胞を 12 well plate に 2.4×10^5 cells/well ずつ播種し、96 時間培養した後、各種条件の培地に交換して 18 時間培養した。その後、プロテアーゼ・コラーゲン分解酵素である Accutase を用いて細胞を回収し、PBS で洗浄した後、室温、 $163 \times g$ で 5 分間遠心した。続いて binding buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH は NaOH によって 7.4 に調整) で細胞を洗浄し、室温、 $163 \times g$ で 5 分間遠心した。その後、binding buffer を加えて細胞を攪拌し、Propidium Iodide 及び Annexin-V-FLUOS を加えて室温で 15 分間インキュベーションし、ナイロンメッシュでろ過後サンプルとした。検出は FACS Canto II Flow Cytometer (BD, New Jersey, USA) を用いて行った。Propidium Iodide、Annexin-V-FLUOS で単染色をしたサンプルを用いて、蛍光補正を行った後、Propidium Iodide 及び Annexin-V-FLUOS で 2 重染色したサンプルを測定し、各蛍光を発する細胞の割合を算出した。Annexin V-FLUOS 陽性かつ PI 陰性の細胞をアポトーシス細胞として解析した。

1-2-5. 細胞内の cAMP 濃度の測定

INS-1D 細胞を 6 well plate に 1.2×10^6 cells/well ずつ播種し、48 時間培養した。2.8 mM glucose 含有 0.1% BSA/HEPES-buffered Krebs (HK) solution (129 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.18 mM KH_2PO_4 , 5 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, pH は NaOH によって 7.4 に調整) にてウェルを洗浄してから 1 時間プレインキュベーションを行った後、各種条件の溶液に交換して 15 分間テストインキュベーションを行った。溶液除去後、各 well を PBS 3mL で 2 回洗浄し、0.1N HCl を 263 μl ずつ加え 20 分間室温でインキュベーションした。その後セルスクレーパーで細胞をかき集め 1.5 mL マイクロチューブへ回収した。4 $^\circ\text{C}$ 、 $1000 \times g$ で 10 分間

遠心した後、上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブへ移し、-80 °C で保存した。サンプル中の cAMP 量は、cAMP アッセイキット (Cyclic AMP EIA kit, Cayman, USA) を用いて 405 nm における吸光度をプレートリーダー (ARVO, Perkin-Elmer, MA, USA) により測定した。

1-2-6. ウェスタンブロッティング

INS-1D 細胞を冷却した homogenization buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 50 µg/mL leupeptin, 250 mM sucrose) 中で超音波粉碎した。タンパク質のサンプルを 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0005% bromophenol blue を含む buffer 中で沸騰させた。その後、サンプルを 10% または 12% のポリアクリルアミドゲルで分離し、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した。PVDF 膜は 5% スキムミルクまたは 3% BSA を含む buffer (10 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (TBS-T)) 中で室温 1 時間インキュベーションすることで、ブロッキング処理を行った。その後、一晩、4°C で一次抗体と反応させた。TBS-T で洗浄後、PVDF 膜をさらに二次抗体と室温で 1 時間インキュベートし、抗原抗体反応を示したバンドを市販のキット (ECL plus Western blotting reagent pack; GE Healthcare あるいは Immunostar LD; WAKO Pure Chemical Industries) を用いて可視化した。

使用した抗体は以下の通り。

一次抗体

Mouse anti-β-actin monoclonal antibody, Sigma (AC-15); 1:10,000

Rabbit anti-CHOP (D46F1) monoclonal antibody, Cell Signaling (5554); 1:1,000

Rabbit cleaved caspase-3 (Asp175) antibody, Cell Signaling (9661); 1:1,000

Rabbit anti-JNK1+JNK2+JNK3 (phosphoY185+Y185+Y223) monoclonal antibody,

Abcam (ab76572); 1: 20,000

Rabbit anti-JNK1+JNK2+JNK3 monoclonal antibody, Abcam (ab179461); 1:2,500

二次抗体

Goat anti-rabbit IgG, Sigma; 1:2,500

Goat anti-mouse IgG, Sigma; 1:2,500

1-2-7. 統計処理

本文及び図中の結果は、平均値 \pm 標準誤差 (n = 例数) で示した。多群平均値の有意差検定には Tukey-Kramer または Dunnett の検定を行い、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

1-3-1. グルコース誘発インスリン分泌反応に対するノビレチンの作用

ノビレチンは、*ob/ob* マウスや高脂肪食誘発糖尿病モデルマウスの脂肪組織において、インスリン抵抗性の改善による血糖降下作用が報告されている^{18, 19)}。一方、膵β細胞に対する直接的な効果に関する報告はない。そこで、膵β細胞に対するノビレチンの作用を検討するため、ラット由来膵β細胞株であるINS-1D細胞を用いてグルコース刺激により誘発されるインスリン分泌に対するノビレチンの効果を検討した (Fig. 4)。INS-1D細胞は、食後血糖レベルに相当する11.1 mM グルコースへの曝露でインスリン分泌が誘発される、グルコース応答性を有することが示されているβ細胞株であり、β細胞の研究に汎用されている。そこでINS-1D細胞を用い、11.1 mM グルコース及びノビレチン0.1、1、10、100 μMを1時間曝露することでバッファー中に遊離されるインスリン分泌量を測定した。その結果、11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌は、10 μM 及び100 μM ノビレチンにおいて濃度依存的に有意に増加した (Fig. 4)。特に、100 μM ノビレチン処置下においては著しい分泌亢進が認められた。なお、2.8 mM グルコースでは10 μM ノビレチンによるインスリン分泌亢進作用は認められなかった (data not shown)。

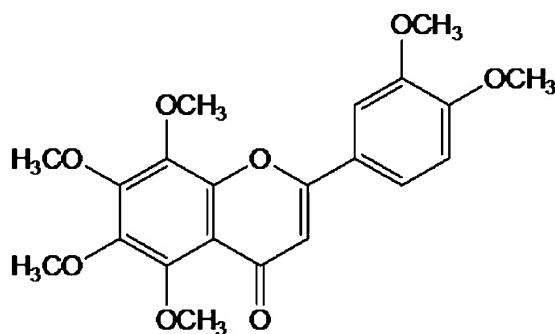


Fig. 3. Chemical structure of nobiletin.

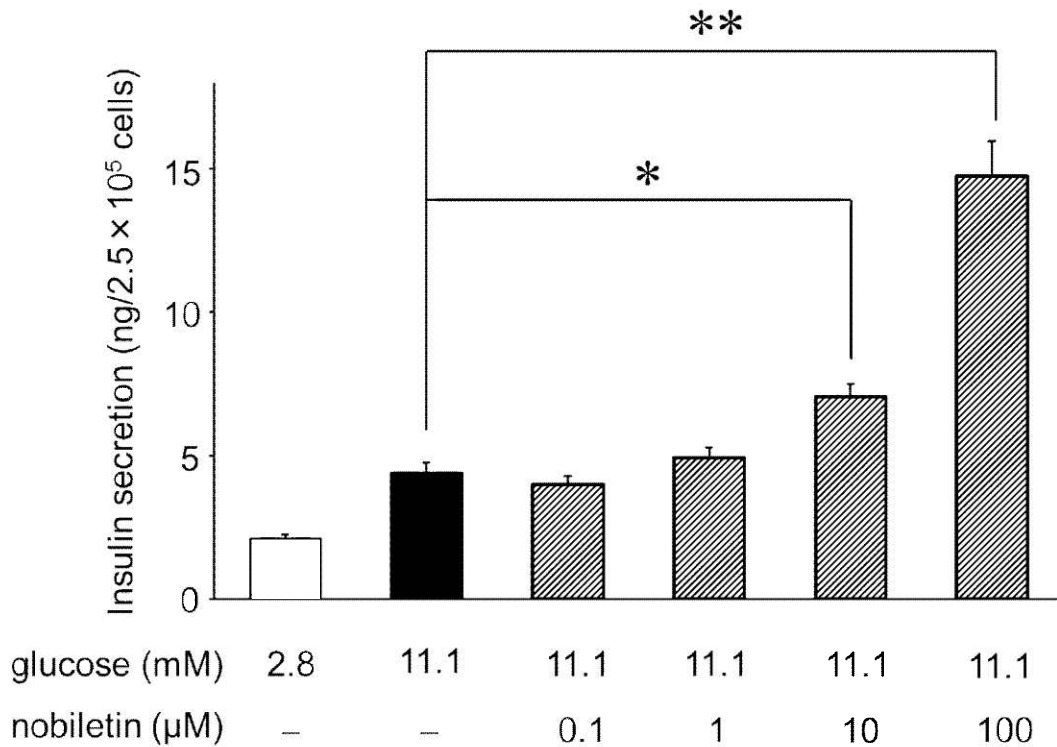


Fig. 4. Effects of nobiletin on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in INS-1D cells.

INS-1D cells were incubated for 1 hr in HEPES-buffered Krebs solution (HK solution) containing 2.8 or 11.1 mM glucose in the absence or presence of various concentrations of nobiletin. Each represents the mean \pm SEM for 4 independent experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

1-3-2. タプシガルギン誘発アポトーシスに対するノビレチンの作用

これまでに、ウシ血管平滑筋細胞では 50 μM 以上のノビレチンが、PC12 細胞では 3.125 μM 以上のノビレチンがアポトーシスを抑制するとの報告がなされている^{29, 30)}。一方、10 μM 以上のノビレチンは、ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞やヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 細胞ではアポトーシスを促進するとの相反する報告があるが^{24, 31)}、 β 細胞でのノビレチンのアポトーシスに対する作用についての報告はまだ

ない。そこで、ノビレチンの β 細胞アポトーシスに対する作用を明らかにするために、小胞体ストレスによるアポトーシスに対するノビレチンの作用について検討した。本研究では、小胞体ストレスを誘導する刺激としてタプシガルギンを用いた。タプシガルギンは、選択的小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬で、小胞体 Ca^{2+} ストアを枯渇させることによりアポトーシスを引き起こす。INS-1D 細胞においてもタプシガルギンの処置によりアポトーシスが引き起こされることが知られている³²⁾。そこで、INS-1D 細胞におけるタプシガルギン誘発アポトーシスに対するノビレチンの作用について、フローサイトメトリーにより検討した。その結果、300 nM タプシガルギン 18 時間処置により誘導されたアポトーシスは、10 μM ノビレチン処置により有意に抑制された(Figs. 5 A, B)。一方 0.1, 1, 100 μM ノビレチンはタプシガルギン誘発アポトーシスに対し有意な作用は示さなかった (Figs. 5 A, B)。

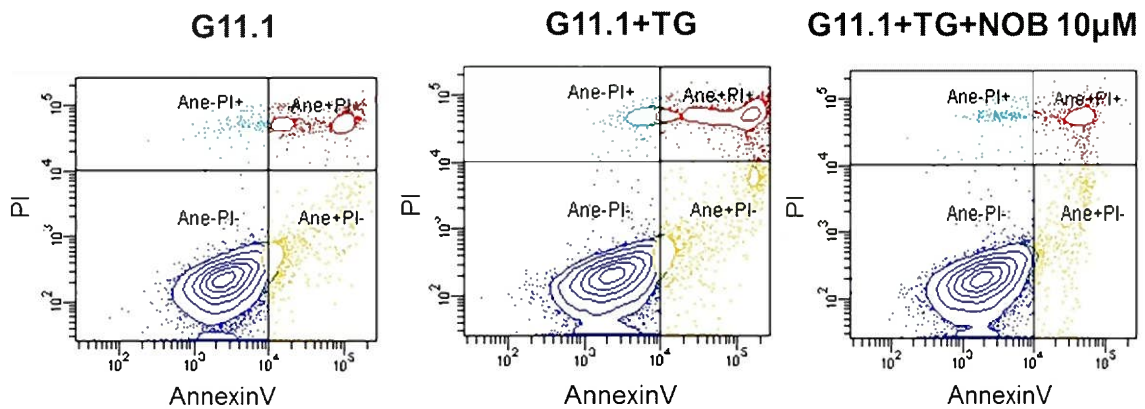
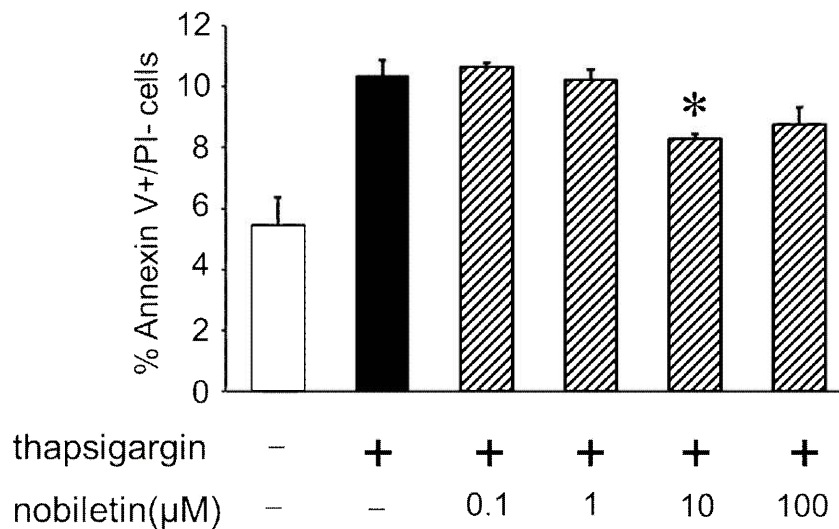
A**B**

Fig. 5. Effect of nobiletin on thapsigargin-induced apoptosis in INS-1D cells.

INS-1D cells were exposed to 300 nM thapsigargin (Tg) with or without indicated concentrations of nobiletin (NOB) for 18 hr. Apoptotic cells were measured by FACS analysis after Annexin-V/PI staining. The area of Annexin-V and PI negative indicated viable cells (Blue dots), the area of Annexin-V positive and PI negative indicated early apoptotic cells (Yellow dots) and the area of Annexin-V and PI positive indicated lateapoptotic and necrotic cells (Red dots) (A). The percentage of early apoptotic cells was calculated (B). Each represents the mean \pm SEM for 3–6 independent experiments. (* p <0.05 versus cells treated with thapsigargin.)

1-3-3. ノビレチンによる細胞内 cAMP 濃度変化

10 μ M ノビレチンによるインスリン分泌促進効果および小胞体ストレス誘発アポトーシスに対する抑制効果のメカニズムについて検討した。PC12D 細胞において、ノビレチンがホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) を阻害し細胞内 cAMP 濃度を増加させること、さらに、増加した cAMP がプロテインキナーゼ A (protein kinase A: PKA) を活性化し神経突起の伸長を促すことで抗認知症作用を示すことが報告されている²⁶⁾。そこで INS-1D 細胞においても、10 μ M ノビレチンが細胞内 cAMP 濃度変化に与える影響について検討した。ポジティブコントロールとして、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンと非選択的 PDE 阻害薬である 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) の同時処置による cAMP 濃度の増大を観察した。フォルスコリンと 10 μ M ノビレチンを同時処置した結果、細胞内 cAMP 濃度はフォルスコリン単独処置群と比較して有意に増加した (Fig. 6)。以上の結果から、INS-1D 細胞において 10 μ M ノビレチンは、おそらく PDE を阻害することにより、細胞内 cAMP 濃度を増加させる作用を有することが示唆された。

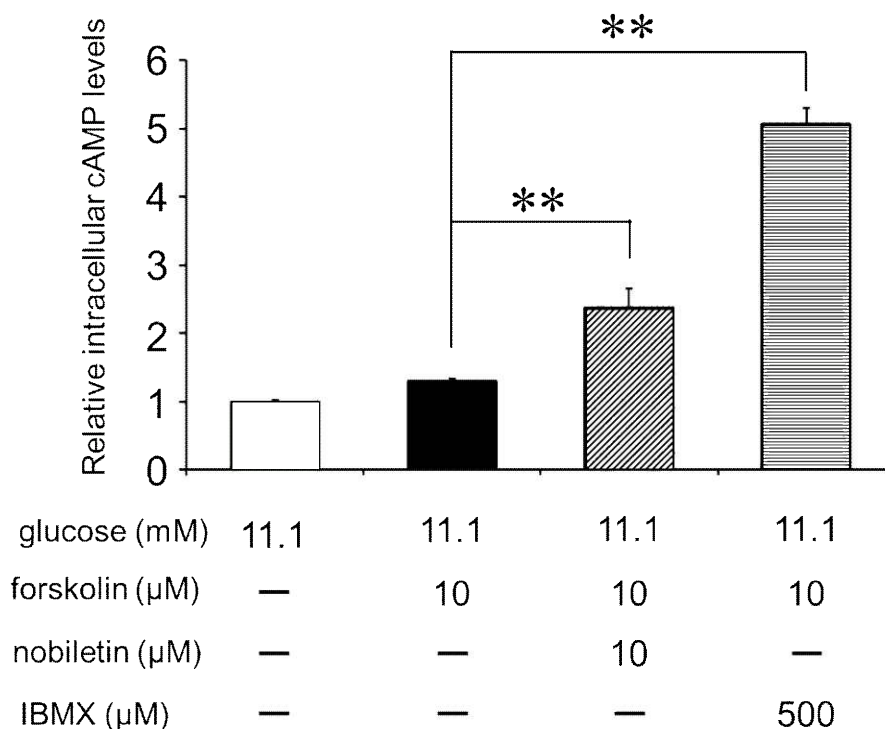


Fig. 6. Effects of nobiletin and IBMX, a nonspecific PDE inhibitor, on forskolin-induced elevation of intracellular cAMP level in INS-1D cells.

INS-1D cells were incubated for 15 minutes with HK solution containing 11.1 mM glucose in the absence or presence of forskolin (10 μM) without or with nobiletin (10 μM) or IBMX (500 μM). The amount of intracellular cAMP was measured by enzyme immunoassay. Each represents the mean ± SEM for 4 independent experiments. (** $p < 0.01$)

1-3-4. ノビレチンによるタプシガルギン誘発アポトーシス抑制反応メカニズムの解析

細胞内 cAMP 濃度が増加すると、その下流のプロテインキナーゼ A (PKA) や exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) が活性化されることが予想される³³⁾。10 μM ノビレチンが細胞内 cAMP 濃度を増加させたことから、その下流の PKA や Epac の 10 μM ノビレチンによるアポトーシス抑制作用への関与について、

特異的阻害薬を用いた薬理的検討を行った。その結果、PKA 特異的阻害薬である KT-5720 (10 μ M)により、ノビレチンによるタプシガルギン誘発アポトーシスの抑制作用は有意に阻害された (Fig. 7)。一方で、Epac 特異的阻害薬である ESI-09 (10 μ M) 存在下、10 μ M ノビレチンによるアポトーシス抑制作用に有意な変化は認められなかった。以上の結果から、ノビレチンによるアポトーシス抑制作用には PKA が関与していることが示唆された。すなわち、10 μ M ノビレチンは PDE 阻害作用による細胞内 cAMP 濃度の増大、それに続く PKA の活性化を介し、タプシガルギン誘発アポトーシスを抑制することが示唆された。

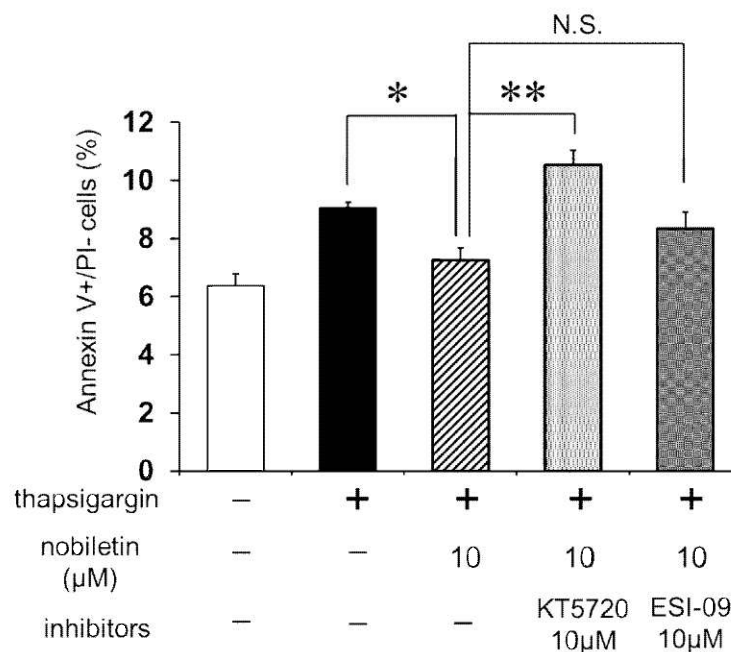


Fig. 7. Effects of KT5720, a specific PKA inhibitor, and ESI-09, a specific Epac inhibitor, on the inhibitory effect of nobiletin on thapsigargin-induced apoptosis in INS-1D cells.

INS-1D cells were treated with thapsigargin (300 nM) for 18 hr with or without nobiletin (10 μ M), KT5720 (10 μ M), and/or ESI-09 (10 μ M), as indicated. Each represents the mean \pm SEM for 3 independent experiments. (* p <0.05, ** p <0.01, N.S.: not significant)

1-3-5. ノビレチンのアポトーシス関連タンパク質発現への作用

GLP-1 は、細胞内 cAMP を増加し、PKA 活性化を介したアポトーシス関連分子の発現調節によりアポトーシスを抑制することが知られている^{34,35,36}。そこで、小胞体ストレス応答反応経路である PERK、ATF6 の経路で発現が誘導される CHOP のタンパク質発現およびアポトーシス実行因子である caspase 3 の活性化の指標となる cleaved caspase 3 を検出することで、小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシス関連タンパクの発現に対するノビレチンの作用について検討した。タプシガルギン (300 nM) を 14 時間処置すると、cleaved caspase 3 及び CHOP の発現はともに増加した。10 μ M ノビレチンをタプシガルギンと同時に処置すると、cleaved caspase 3 は有意に減少した。すなわち、ノビレチンはタプシガルギンによる caspase 3 の活性化を抑制することが示された。一方、タプシガルギンにより発現が増加した CHOP については、10 μ M ノビレチンにより発現にほとんど影響がない、あるいはむしろ発現が増加する傾向を示した (Fig. 8)。以上の結果から、10 μ M ノビレチンによるタプシガルギン誘発アポトーシスの抑制作用には、PERK、ATF6 以外の経路が関与していることが示唆された。

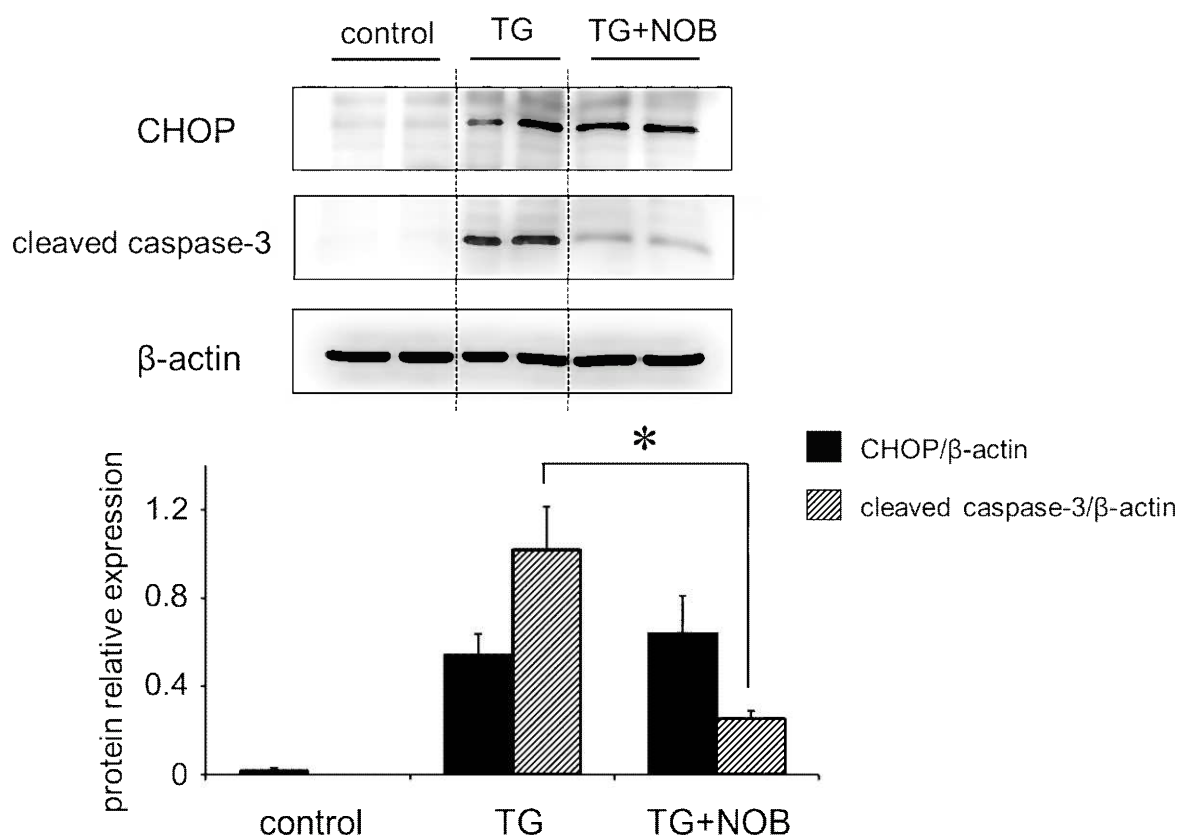


Fig. 8. Effect of nobiletin on thapsigargin-induced increases in protein expression of CHOP and cleaved caspase-3.

INS-1D cells were treated with 300 nM thapsigargin (TG) for 14 hr without or with 10 μ M nobiletin (NOB). The protein expression of CHOP and cleaved caspase-3 was analyzed by Western blot, and normalized for the expression level of β -actin. Each represents the mean \pm SEM for 4 independent experiments. (* $p < 0.05$)

1-3-6. ノビレチンによる小胞体ストレス抑制反応へのインスリンの関与

Fig. 4 で示したとおり、10 μ M ノビレチンによりグルコース誘発インスリン分泌反応は有意に増加した。インスリンは β 細胞のインスリン受容体に結合し、 β 細胞保護作用を有することが報告されている³⁷⁾。したがって、ノビレチンにより放出が促進されたインスリンが β 細胞にオートクライン、パラクライン様式で作用し、アポトーシスを抑制している可能性が考えられる。そこで、インスリン受容体アンタ

ゴニストである S661 (400 nM) を処置することによりインスリンの作用を阻害した条件下で、10 μ M ノビレチンによるアポトーシス抑制作用について検討した。タブシガルギン (300 nM) の 14 時間処置により認められた cleaved caspase 3 のタンパク質発現量の増加は、S661 (400 nM) を同時に処置することによりさらに増加した (Fig. 9)。S661 により増加した cleaved caspase 3 のタンパク質発現量は、10 μ M ノビレチンにより有意に抑制された (Fig. 9)。つまり、S661 によりインスリンの作用を阻害した条件下においても、10 μ M ノビレチンによるアポトーシス抑制作用が認められたことから、10 μ M ノビレチンによるアポトーシス抑制作用は、ノビレチンにより放出が促進されたインスリンによる細胞保護作用では説明できないことが示された。一方、タブシガルギンにより増加した CHOP の発現量は、S661 (400 nM) およびノビレチン処置条件下においても変化は認められなかった (Fig. 9)。

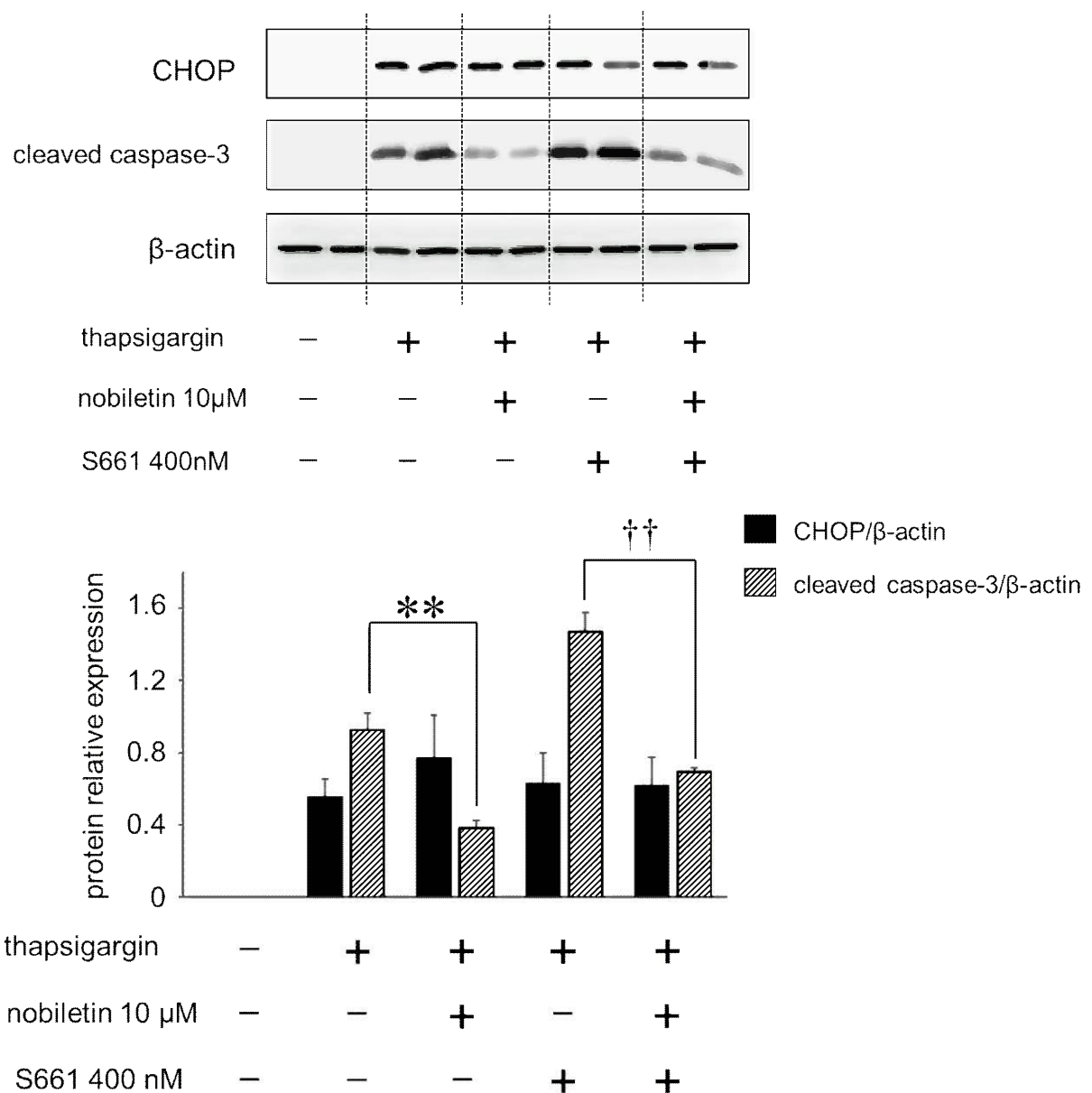


Fig. 9. Effects of nobiletin and S661, an insulin receptor antagonist, on thapsigargin-induced increases in protein expression of CHOP and cleaved caspase-3. INS-1D cells were treated with thapsigargin (300 nM) for 14 hr without or with nobiletin (10 μM) and/or S661 (400 nM). The expression of CHOP and cleaved caspase-3 protein was analyzed by Western blot, and normalized for the expression level of β-actin. Each represents the mean ± SEM for 4 independent experiments. (** $p < 0.01$, †† $p < 0.01$)

1-3-7. ノビレチンによる小胞体ストレス抑制反応のメカニズム

1-3-6 項において、ノビレチンによるインスリンを介さないアポトーシス抑制作用メカニズムの存在が示唆されたため、そのメカニズムの検討を行った。c-Jun N-terminal kinase (JNK) は、小胞体ストレス応答反応のうち IRE-1 を介する経路において、TRAF2, ASK1 の活性化を介しリン酸化され、アポトーシスを誘導する。ノビレチンと同様に細胞内 cAMP の増大を介して β 細胞保護作用を示す GLP-1 は、抗アポトーシスタンパク分子である JunB の発現増加により細胞死保護作用を示すことが報告されている³⁸⁾。JNK は JunB の発現制御を行っていることから³⁹⁾、ノビレチンも JNK 活性に影響を与える可能性が考えられる。そこで、JNK 活性に対するノビレチンの作用について検討を行った。JNK はリン酸化により活性化されることから、JNK とリン酸化 JNK (p-JNK) 抗体を用い、p-JNK/JNK 発現の相対変化を JNK の活性化の指標として用いた。その結果、タプシガルギン (300 nM) 14 時間処置により JNK の活性化は増大し、この増大は 10 μ M ノビレチンにより抑制された (Fig. 10)。以上の結果から、10 μ M ノビレチンは JNK のリン酸化を抑制することで IRE-1 を介した小胞体ストレス経路を阻害し、タプシガルギン誘発アポトーシスを抑制することが示唆された。

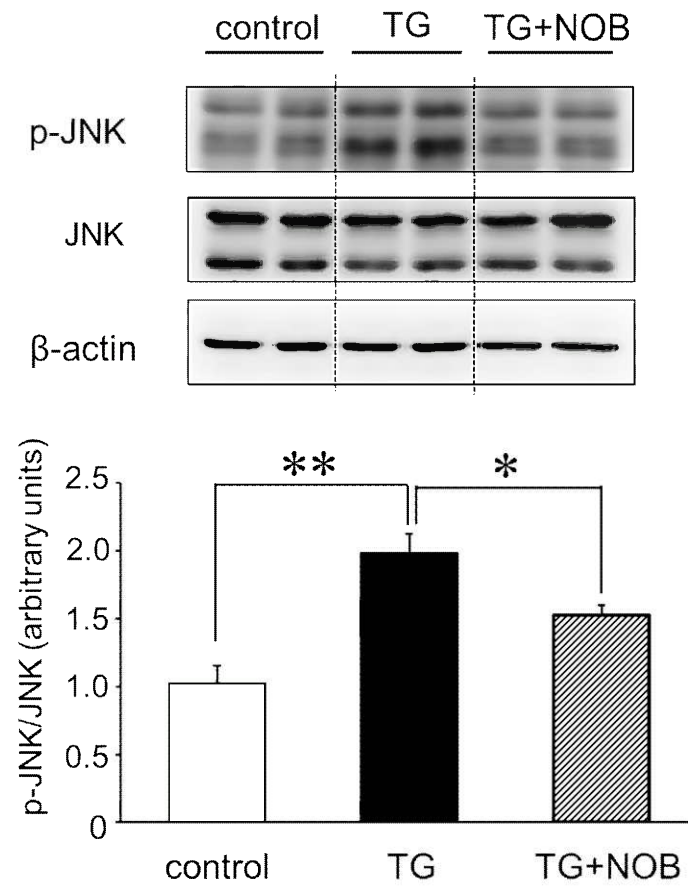


Fig. 10. Effect of nobiletin on thapsigargin-induced JNK phosphorylation in INS-1D cells.

INS-1D cells were treated with thapsigargin (TG; 300 nM) without or with nobiletin (NOB; 10 μ M). The protein expression of phospho-JNK was analyzed by Western blot. JNK phosphorylation was normalized for total JNK. Each represents the mean \pm SEM for 4 independent experiments. (* p <0.05, ** p <0.01)

第4節 考察

本章では、ノビレチンの膵β細胞におけるインスリン分泌や細胞生存に対する直接的な作用の検討を行った。その結果、まず、10 μM以上のノビレチンにより11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌反応が濃度依存的に有意に促進されることを示した。この濃度依存的なインスリン分泌促進反応は、ノビレチンによるPDE阻害による細胞内cAMP量の増加を介していることが示唆された。β細胞におけるcAMP上昇を介した分泌促進作用の特徴として、cAMPによる作用が細胞外グルコース濃度に依存する点が挙げられる。すなわち、インスリン分泌非刺激濃度のグルコース存在下では、cAMP上昇によるインスリン分泌は惹起されず、インスリン分泌刺激濃度のグルコース存在下で起こるインスリン分泌をcAMPシグナリングは増強する³³⁾。このようなcAMPによるインスリン分泌増強作用にはインスリン分泌顆粒の細胞膜への移行の促進、インスリン分泌顆粒のreadily releasable poolの拡大や補充速度の向上などが関与する³³⁾。しかし、最終的なインスリン分泌顆粒の開口放出を引き起こすには細胞内カルシウム濃度の上昇が必要となり³³⁾、低グルコース状態ではcAMP上昇のみでは開口放出が惹起されないことが、cAMPのグルコース濃度依存性の理由の説明として考えられる。ノビレチンによるインスリン分泌促進反応も、2.8 mMグルコース存在下では観察されず、グルコース濃度依存性を示した。これは、ノビレチンによるインスリン分泌促進反応が細胞内cAMP量の増加によるものであるという見解を支持するものである。

β細胞において増加した細胞内cAMPは、PKAやEpacの活性化を介し、インスリン分泌を促進することが知られている³³⁾。そこで、ノビレチンによるインスリン分泌促進反応は、細胞内cAMPの上昇を介したPKAやEpacの活性化が関与している可能性が考えられた。本章では、Epac阻害薬やPKA阻害薬を用いた検討を行っていないため、いずれの経路を介した反応であるのか、証明することはできていない。しかし、これまでの報告から、PKA、Epacともにインスリン分泌増強に関わっ

ていると考えられる。ただし、cAMP に対する PKA と Epac の親和性は異なり⁴⁰⁾、PKA の cAMP に対する親和定数が nM オーダーであるのに対し、Epac は μM オーダーと、PKA に比べ cAMP に対する親和性が低い。このことから、細胞内 cAMP 量の上昇した程度により、低濃度のノビレチンによるインスリン分泌促進反応は主に PKA が関与し、ノビレチンの濃度が増加することで細胞内 cAMP が大きく上昇した場合には、PKA に加え Epac もインスリン分泌促進反応に関与するなど、ノビレチンの濃度に応じてインスリン分泌促進経路が変化する可能性が考えられる。

PC12D 細胞において、ノビレチンは 11 種類に大別される PDE ファミリーの中でカルシウム-カルモジュリン依存性の PDE1 を阻害することが示唆されている²⁶⁾。PDE1 は細胞内において cAMP および cGMP の分解に関与している。また、PDE1 は β 細胞に発現していることが報告されている⁴¹⁾、ノビレチン処置により、cAMP 量の増加だけでなく、細胞内 cGMP 量も増加していることが予想される。細胞内 cGMP 量の増加は、続くプロテインキナーゼ G (PKG) の活性化を介し、インスリン分泌を促進するとの報告⁴²⁾から、ノビレチンによるインスリン分泌促進作用に細胞内 cGMP 量の増加も関与している可能性が考えられる。ノビレチンによる cGMP の増大を介した β 細胞機能への影響についても今後考慮する必要があるだろう。

本章では、ノビレチンの細胞生存に対する影響の検討において、 β 細胞アポトーシス誘導刺激として 300 nM タプシガルギン処置による小胞体ストレス刺激を用いた。糖尿病発症過程において、小胞体ストレスによる β 細胞アポトーシスが β 細胞量を減少させ、インスリン分泌障害を誘発する一因として知られている^{1,2,3)}。そこで、本研究では 18 時間の 300 nM タプシガルギン処置により誘導される β 細胞アポトーシスに対するノビレチンの影響について検討した。その結果、ノビレチンは 10 μM でのみタプシガルギン誘発アポトーシスを抑制した。0.1 または 1 μM ノビレチンはタプシガルギン誘発アポトーシスに対し影響を示さなかったと同時に、グルコース誘発インスリン分泌反応にも影響を与えなかったことから、1 μM 以下の低濃

度ではノビレチンの効果が現れないと考えられる。一方、100 μM ではノビレチンによるアポトーシス抑制効果が減弱した理由としては、2面的な反応を示すノビレチンの特性が挙げられる。すなわち、低濃度領域でのノビレチンはアポトーシス抑制効果を示す一方で、高濃度領域ではアポトーシス誘導効果を示すことが種々の細胞で報告されている^{24,26,31)}。ノビレチンによるアポトーシス誘導メカニズムとして、小胞体ストレスの誘導⁴³⁾の他、p53の発現増加を介した細胞周期の停止、続くアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2の発現抑制やアポトーシス促進遺伝子 Baxの活性化⁴⁴⁾が報告されている。また、ノビレチンは β 細胞においてアポトーシスの亢進に働く p38MAPK 経路や AMPK 経路を活性化することも報告されている^{24,45)}。このため、 β 細胞においても、高濃度のノビレチンでは前述のアポトーシス促進メカニズムが働き、ノビレチンによるアポトーシス抑制効果が消失した可能性が考えられた。

本章において、10 μM ノビレチンによる β 細胞アポトーシス抑制効果のメカニズムについて検討した。その結果、10 μM ノビレチンによる β 細胞アポトーシス抑制には cAMP の上昇による PKA の活性化が関与することが示唆された。PKA は、CREB のリン酸化を介したアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現亢進⁴⁶⁾や、小胞体ストレス応答反応における ATF-4 の発現によるアポトーシス抑制作用⁴⁷⁾などが報告されている。そこで、さらに、PKA の下流シグナルについて検討を進めた。その結果、10 μM ノビレチンによるアポトーシス抑制メカニズムとして IRE1 の下流の JNK 活性化が関与することが示唆された。一方で、小胞体ストレスセンサーのうち PERK および ATF6 の下流の CHOP の発現には影響を与えなかった。CHOP は小胞体ストレスの指標としてその発現変化が広く用いられ、小胞体ストレスを軽減する薬物の処置により、CHOP の発現も減少するというのが一般的である。ところが、exendin-4 やフォルスコリンなど、cAMP の上昇により β 細胞の小胞体ストレスを抑制する薬物に関しては CHOP の発現低下が認められないという報告がある^{38, 39)}。Yusta らは、その現象について、CHOP の下流の GADD34 の発現増加により、PERK 経路に対してネガティブフィードバックが働くことでアポトーシス抑制作用を示

すと説明している。一方、その説を否定している報告もある³⁸⁾。それによると、CHOP-GADD34 に依存した経路は cAMP 上昇によるアポトーシス抑制には関与せず、IRE-1 の下流に存在する JNK により発現調節を受ける抗アポトーシス分子 JunB の発現増大や、ATF6 依存性の ER シャペロンである Bip の発現増大がアポトーシス抑制作用に関与することを示唆している³⁸⁾。本章の結果では、ノビレチンは JNK のリン酸化を有意に抑制したことから、cAMP-PKA 経路の活性化に続く IRE-1 経路の抑制がノビレチンによる β 細胞アポトーシス抑制効果の主体であると考えられる。

インスリンには、 β 細胞におけるインスリン受容体を介した細胞保護作用があることが知られている³⁷⁾。本章の結果から、ノビレチンはインスリン分泌促進作用を有していることが明らかとなったため、インスリンの細胞保護作用がノビレチンによるアポトーシス抑制作用に関与している可能性が考えられた。そこで、インスリン受容体阻害薬である S661 を用いて検討を行った結果、10 μ M ノビレチンによる β 細胞アポトーシス抑制効果は S661 存在下においても認められたことから、インスリンによる細胞保護作用の関与は少ないことが示唆された。10 μ M ノビレチンによるインスリン分泌促進作用は 1.5 倍程度であり、分泌量は多いとはいえない。より高濃度でノビレチンを処置することで、インスリン自体の細胞保護効果も現れてくる可能性も考えられる。10–100 μ M の濃度範囲でより細かく濃度を設定して検討することで、ノビレチンによるアポトーシス抑制効果が最大限に発揮される濃度を今後明らかにする必要があるだろう。

本章の検討は、ラット由来膵 β 細胞株の INS-1D 細胞を用いて行った。実際、生体内でノビレチンが本実験結果と同様の作用を発現しているのかについて、単離した膵 β 細胞、あるいは *in vivo* における検討により確認する必要があるだろう。また、本章の結果から、ノビレチンがインスリン分泌促進効果および β 細胞アポトーシス抑制効果を示す濃度が 10 μ M であることが示された。ノビレチンは、水への溶解性が低く、経口吸収性も低い、ナノテクノロジーを適用し物性を改善したノビ

レチンをラットに 20 mg/kg を経口投与した場合、最高血中濃度は約 1 μ M 程度になるとの報告⁴⁸⁾がある。ラットに 50 mg/kg を経口投与した場合、最高血中濃度は 4 μ M 程度になるとの報告⁴⁹⁾もある。このような知見から、10 μ M ノビレチンにより *in vitro* で認められた効果は、*in vivo* においても到達し得る濃度と考えられる。

本章において、ノビレチンが濃度依存的にインスリン分泌促進効果および β 細胞アポトーシス抑制効果を示すことが明らかとなった。しかし、高濃度では、 β 細胞アポトーシス抑制効果は減弱することがわかった。ノビレチンをサプリメントなどで日常的に摂取することで、血糖値が高い場合のみに示される血糖上昇緩和作用や β 細胞保護作用による β 細胞量の減少抑制効果など、糖尿病予防効果が期待できる。

第5節 小括

本章の実験結果より、以下の知見が得られた。

INS-1D 細胞において、ノビレチンのグルコース誘発インスリン分泌に対する作用を検討した結果、ノビレチンが 10 μM 以上で濃度依存的に有意にグルコース誘発インスリン分泌を促進することが示された。また、ノビレチンによるグルコース誘発インスリン分泌促進反応は、2.8 mM グルコースのもとでは認められずグルコース濃度依存性であった。その作用経路としては、ノビレチンによる PDE 阻害を介した細胞内 cAMP 濃度の上昇が示唆された。

タブシガルギン処置による小胞体ストレス誘発アポトーシスに対し、ノビレチンは 10 μM のみでアポトーシス抑制効果を示した。ノビレチンのアポトーシス抑制作用には PKA の活性化が関与していることが示唆された。10 μM ノビレチンによるアポトーシス抑制効果は、インスリンによる細胞保護作用に依存せず、小胞体ストレスセンサー IRE-1 の下流の JNK 活性化の抑制が関与していることが示唆された。

以上の結果から、ノビレチンがインスリン分泌促進作用および β 細胞アポトーシス抑制作用により抗糖尿病効果を示す可能性が示された。

第二章 膵β細胞のインスリン分泌および細胞生存に対する カテキン類の影響

第1節 序論

緑茶に含まれるカテキン類は、抗酸化作用、抗がん作用や脂肪燃焼効果など様々な健康効果があることが報告されており^{12,50)}、注目を集めている天然由来成分である。緑茶には、epigallocatechin gallate (EGCG)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin gallate (ECG)、epicatechin (EC) の4種類があり、これらは加熱処理により立体構造が変化し、gallocatechin gallate (GCG)、gallocatechin (GC)、catechin gallate (CG)、catechin (CA)へと変化する⁵¹⁾。カテキン類の糖尿病に対する効果のうち、インスリン分泌機能に対する作用としては、糖尿病マウスにおいて1日あたり60–90 mg/kgのEGCG摂取によりインスリン分泌が増加するとの報告⁵²⁾やマウス由来膵β細胞株であるMIN6細胞において20–200 μMのCAがグルコース誘発インスリン分泌反応を促進するという報告¹³⁾がある。一方、ラット膵島において20 μMのEGCGおよびECGによりインスリン分泌が抑制されるとの報告があり⁵³⁾、カテキン類のβ細胞からのインスリン分泌に対する作用およびそのメカニズムについては明らかになっていない。また、2型糖尿病では、β細胞からのインスリン分泌機能障害に加え、β細胞数の減少が引き起こされる。β細胞数の減少の原因にはβ細胞アポトーシスが挙げられ、なかでも異常タンパク質の蓄積による小胞体ストレスや酸化ストレス、炎症性サイトカインなど、各種ストレスがβ細胞アポトーシスの引き金として知られている^{1,2,3)}。カテキン類のアポトーシスに対する作用は、ヒトのβ細胞においてはEGCG 1 μMおよび10 μMにより、ラット由来膵β細胞株のRINm5F細胞においてはEGCG 20 μMおよび40 μMにより、サイトカイン誘発アポトーシスが抑制されるとの報告^{14,52)}、ラット由来膵β細胞株のINS-1細胞ではEGCG 10 μM

が H_2O_2 80 μM 誘発アポトーシスを抑制するとの報告⁵⁴⁾や 1 型ゴースェ病患者の繊維芽細胞において 10 μM カテキン類により小胞体ストレスが軽減されるとの報告⁵⁵⁾がある。一方、ハムスター由来の膵 β 細胞株である HIT-T15 細胞において 50 μM の EGCG が活性酸素を産生してアポトーシスを誘導するとの報告¹⁵⁾があり、カテキン類の膵 β 細胞のアポトーシスに対する作用およびそのメカニズムの詳細は明らかになっていない。

そこで本章では、グルコース応答性を有し、 β 細胞の研究に汎用されているラット由来膵 β 細胞株 INS-1D 細胞を用いて、11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌反応に与えるカテキン類の作用およびそのメカニズム、また 300 nM タプシガルギン処置により誘導される小胞体ストレス誘発アポトーシスに対する EGCG の作用の解明をめざして、以下の検討を行った。

第 2 節 実験方法及び使用薬物

2-2-1. 使用薬物

RPMI-1640	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
FBS	Gibco, Carlsbad, CA, USA)
HEPES	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Penicillin G potassium	(Meiji Seika, Tokyo, Japan)
Streptomycin sulfate	(Meiji Seika, Tokyo, Japan)
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Sodium pyruvate	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Trypsin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Accutase	(Innovative Cell Technologies, Inc, San Diego, CA, USA)
BSA	(Roche, Basel, Switzerland)
Fura-PE3/AM	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Poly-L-Lysine Solution	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
D(+)-Glucose	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Tolbutamide	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
Propidium Iodide	(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)
Annexin-V-FLUOS	(Roche, Basel, Switzerland)
Albumin bovine serum, Fatty acid free, Low endotoxin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
Thapsigargin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)
(-)-Epigallocatechin Gallate	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Gallic acid	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Epicatechin	(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A)

(-)-Catechin	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Epigallocatechin	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Galocatechin	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Epicatechin Gallate	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)
(-)-Catechin Gallate	(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)

その他の試薬は、すべて市販の特級規格品を使用した。

2-2-2. ラット由来膵 β 細胞株 INS-1D 細胞の培養

第一章 (1-2-2) に従った。

2-2-3. INS-1D 細胞からのインスリン分泌量測定

第一章 (1-2-3) に従った。

2-2-4. INS-1D 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

0.01% Poly-L-lysine 溶液でコーティングしたカバーガラスを 35 mm cell dish に敷き、そこに INS-1D 細胞を 1×10^6 cells/dish ずつ播種し、48 時間培養した。INS-1D 細胞への Ca^{2+} 蛍光指示薬である fura-PE3 のローディングは、fura-PE3/AM (4 μM)、及び界面活性剤である 0.01% cremophore EL (4 μM)を加えた 2.8 mM glucose、0.1% BSA 含有 HK solution 1 mL を超音波処理し、その溶液中に細胞を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2–2.5 時間浸漬することによって行った。その後、細胞を接着させたカバーガラスごと温度制御機能付き恒温チャンバー (PDMI2&TC202, Medical Systems corp., New York, USA) に装着し、倒立顕微鏡 (IX71, OLYMPUS, Tokyo, Japan) のステージ上に固定

した。チャンバー内は 37 °C に保ち、HK solution を流速 1 mL/min で灌流しつつ測定を行った。二波長励起一波長蛍光測定には、AQUACOSMOS System (HAMAMATSU Photonics, Shizuoka, Japan) を用いた。100 W のキセノンランプを光源として、fura-PE3 をローディングした細胞に 340 nm 及び 380 nm の励起光を 8 秒間隔で 10 倍の蛍光用対物レンズ (UPlanSApo, OLYMPUS, Tokyo, Japan) を通して交互に照射し、得られる 510 nm の蛍光画像を記録した。この蛍光強度比 (F340/F380 ratio) の変化を $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標として用いた。

2-2-5. Flow Cytometry を用いた Annexin-V-FITC/PI 染色によるアポトーシス細胞の検出

第一章 (1-2-4) に従った。

2-2-6. 統計処理

本文及び図中の結果は、平均値 \pm 標準誤差 (n = 例数) で示した。多群平均値の有意差検定には Tukey-Kramer または Dunnett の検定を行い、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

2-3-1. グルコース誘発インスリン分泌に対するカテキン類の作用

膵β細胞に対するカテキン類の作用を検討するため、グルコース濃度やカテキン濃度を統一した条件下で、ラット由来膵β細胞株であるINS-1D細胞を用いてグルコース刺激により誘発されるインスリン分泌に対する8種類のカテキン類 (Fig. 11) の影響について検討した。INS-1D細胞に11.1 mMグルコース含有HKバッファーを1時間処置すると、上清中に放出されるインスリンは有意に増加した。EGCG、GCG、EGC、GC、ECGはそれぞれ11.1mMグルコース誘発インスリン分泌を有意に抑制し、一方、EC、CA、CGは、少なくとも100 μMまでは、11.1 mMグルコース誘発インスリン分泌反応に対する影響はなかった(Fig. 12)。これらインスリン分泌に対するカテキン類の効果は、カテキン類の構造によって違いが認められた。

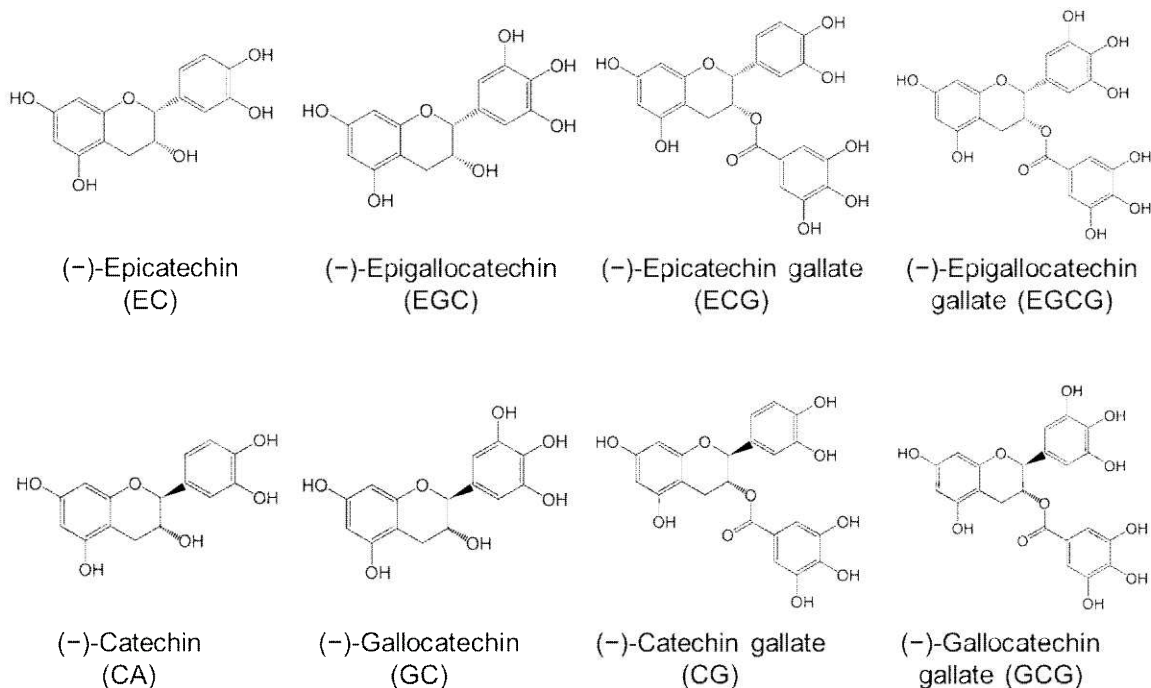


Fig.11. Chemical structures of catechins.

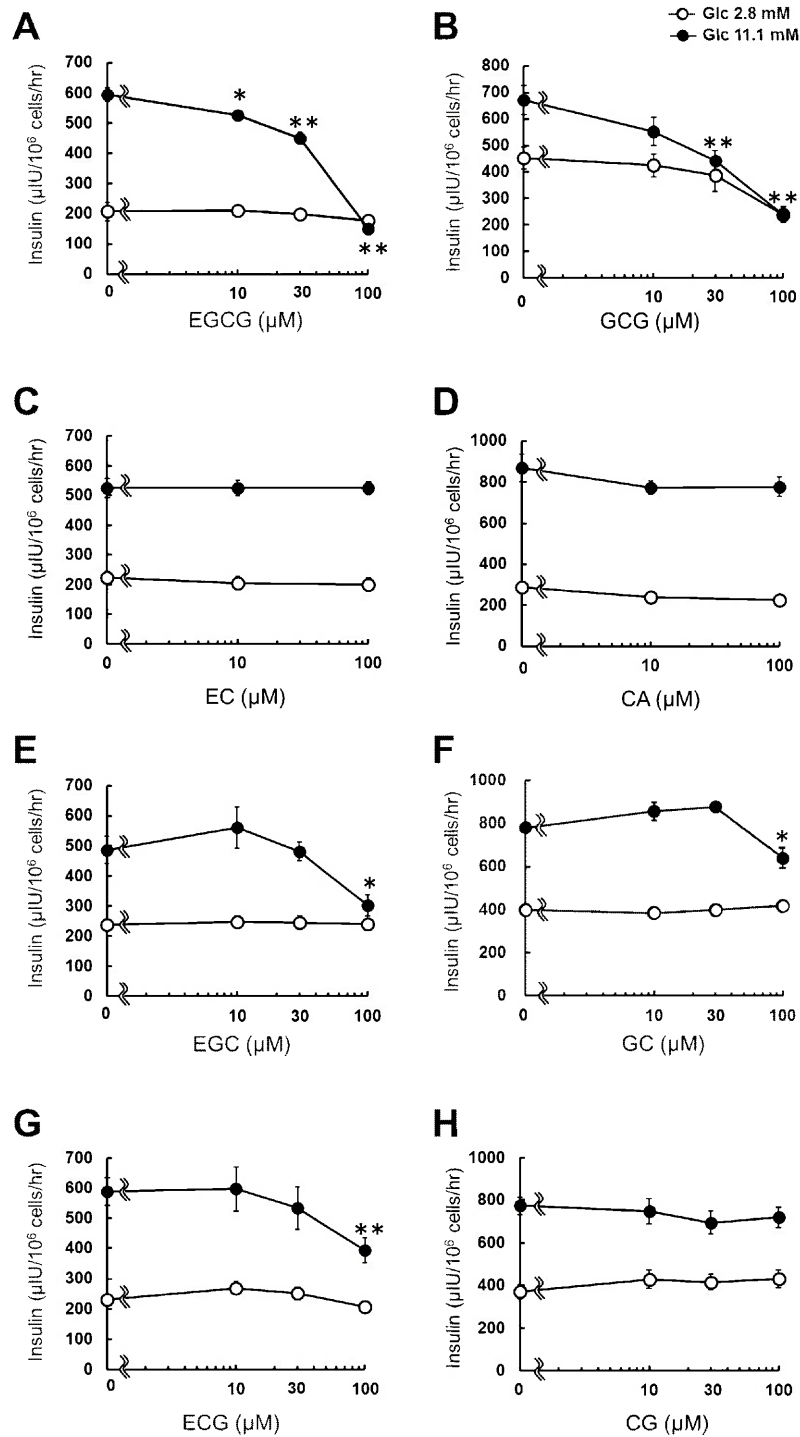


Fig. 12. Effects of catechins on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in INS-1D cells.

INS-1D cells were incubated for 1 hr in the HEPES-Krebs buffer (HK) solution containing 2.8 (open circles) or 11.1 mM glucose (filled circles) in the absence or presence of various concentrations of EGCG (A), GCG (B), EC (C), CA (D), EGC (E), GC (F), ECG (G) or CG (H). Each represents the mean \pm SEM for 4–22 independent experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus absence of each catechin)

2-3-2. Tolbutamide 誘発インスリン分泌に対する EGCG の作用

インスリン分泌反応は、主に ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) の閉口を介した細胞膜電位の脱分極により、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化されて細胞内へ Ca^{2+} が流入することにより引き起こされる。カテキン類による 11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌に対する抑制作用のメカニズムをより詳細に検討するため、スルホニルウレア受容体に結合して K_{ATP} チャンネルを閉口する tolbutamide を用い、tolbutamide (100 μ M) により誘発されるインスリン分泌反応に対する EGCG の作用について検討した。その結果、グルコース誘発インスリン分泌反応に対する作用と同様 (Fig. 12)、100 μ M EGCG により tolbutamide 誘発インスリン分泌反応は有意に抑制された (Fig. 13)。100 μ M EGCG によるインスリン分泌抑制作用が K_{ATP} チャンネルを閉口した条件下においても観察されたことから、EGCG が K_{ATP} チャンネルの閉口による脱分極を阻害し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞内への Ca^{2+} の流入を抑制し、インスリン分泌を抑制している可能性が示された。

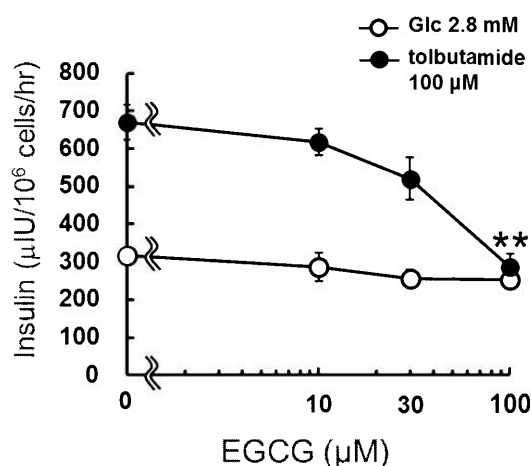


Fig. 13. Effect of EGCG on the insulin secretion induced by tolbutamide (100 μM) in INS-1D cells.

The cells were incubated for 1 hr in the HK solution containing 2.8mM glucose with or without 100 μM tolbutamide in the absence or presence of 100 μM EGCG. Each represents the mean ± SEM of 4 independent experiments. (** $p < 0.01$ compared with the control without EGCG.)

2-3-3. 高濃度 KCl 誘発インスリン分泌に対する EGCG の作用

カテキン類によるインスリン分泌抑制作用のメカニズムに K^+ チャネルに対する直接的な作用が関与しているのかを明らかにするため、細胞外液の K^+ イオン濃度を増大させることで、 K^+ チャネルの開閉に依存せず、細胞膜の脱分極状態を持続させた条件下においてカテキン類のインスリン分泌への影響について検討をおこなった。その結果、30 mM KCl 刺激誘発インスリン分泌反応は 100 μM EGCG により完全には抑制されず、部分的に抑制されるにとどまった (Fig. 14)。以上の結果より、EGCG によるインスリン分泌抑制メカニズムの一部には K^+ チャネルの開口を介した細胞膜の過分極が関与し、同時に、 K^+ チャネルに依存しない分泌抑制経路も

関与していることが示唆された。

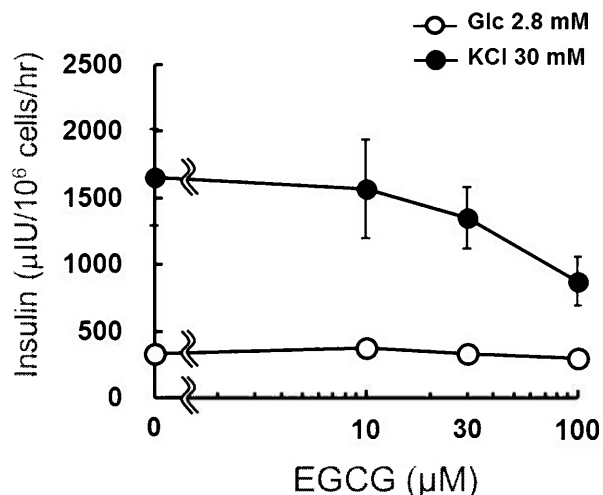


Fig. 14. Effect of EGCG on the insulin secretion induced by 30 mM KCl in INS-1D cells.

The cells were incubated for 1 hr in the HK solution containing 2.8mM glucose with or without 30 mM KCl in the absence or presence of 100 μM EGCG. Each represents the mean ± SEM of 4 independent experiments.

2-3-4. $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対するカテキン類の効果

膵 β 細胞においては、グルコース刺激により細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) のオシレーションが観察される。そして、この $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの振幅や頻度の増減が、インスリン分泌の増減と相関していることが報告されている⁵⁶⁾。そこで、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する 100 μM EGCG 処置の影響について検討した。灌流液中のグルコース濃度を 2.8 mM から 11.1 mM に上昇させると、ほとんどの INS-1D 細胞において $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが認められた。このグルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションは、100 μM EGCG により完全に抑制された。一方、100 μM EC 処置によっては影響を受けなかった (Figs. 15 A, B)。つづいて、インスリン分泌での検討と同様に、tolbutamide (100 μM) および 30 mM KCl 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対する 100 μM EGCG の作用

について検討をおこなった (Fig. 16)。その結果、tolbutamide (100 μM) により誘発された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に対し、100 μM EGCG は強い抑制反応を示した(Fig. 16 A)。一方、30 mM KCl により誘発された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に対しては、100 μM EGCG は抑制作用を示さなかった (Fig. 16 B)。以上の結果から、100 μM EGCG は K^+ チャンネルを開口することで、細胞膜を過分極させ、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制していることが示唆された。

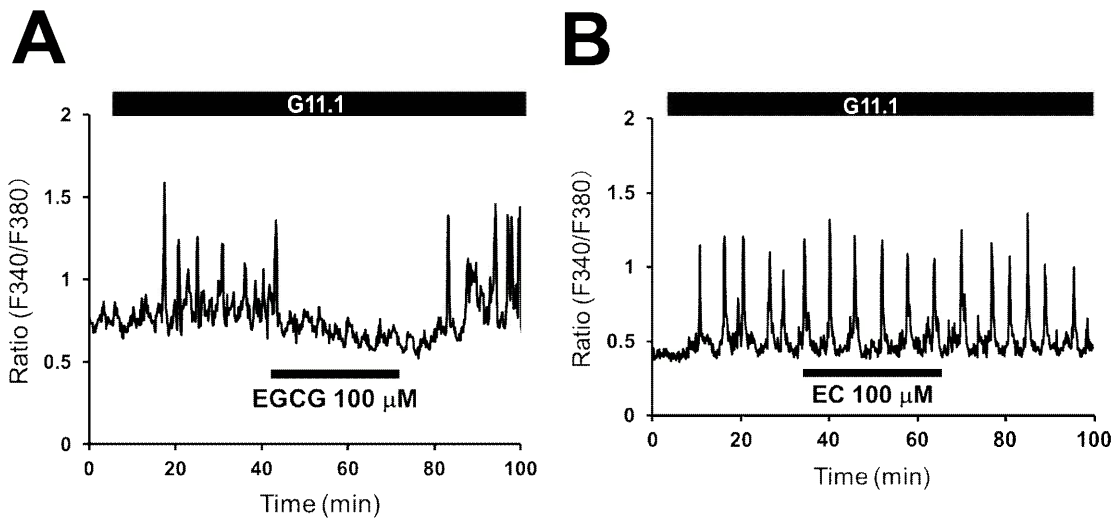


Fig. 15. Effects of EGCG (100 μM , A) and EC (100 μM , B) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations induced by 11.1 mM glucose (G11.1) in INS-1D cells.

Tracings in A and B are representative of 278 and 316 cells from 3 and 4 experiments, respectively.

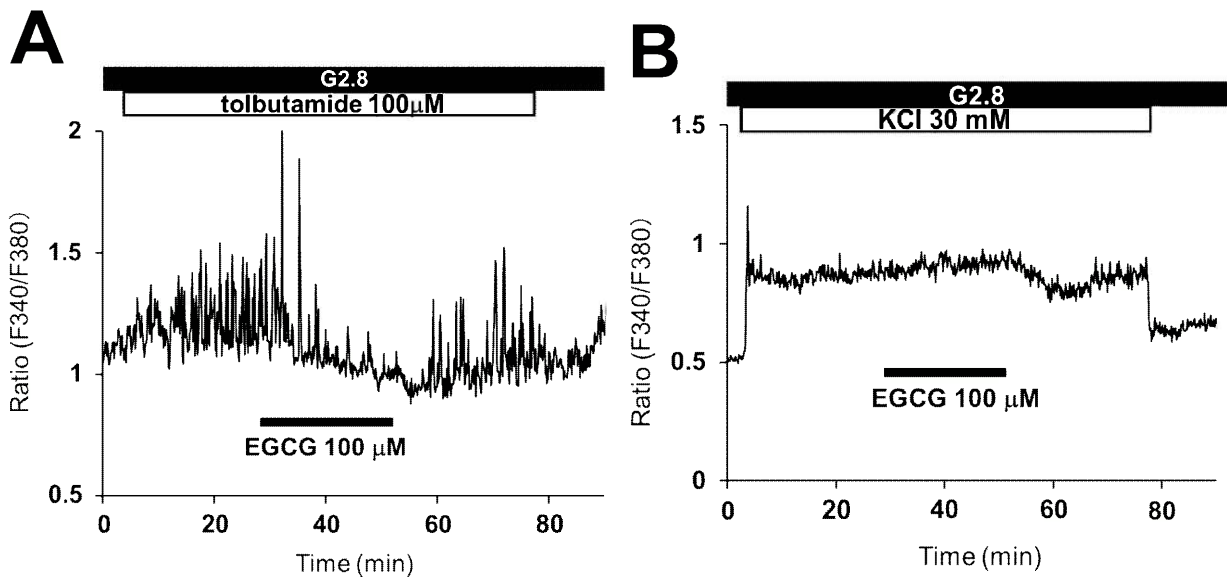


Fig. 16. Effect of EGCG on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by tolbutamide (100 μM ; A) and 30 mM KCl (B) in INS-1D cells.

Tracings in A and B are representative of 38 and 44 cells from 2 experiments, respectively.

2-3-5. 小胞体ストレス誘発アポトーシスに対する EGCG の効果

次に、膵 β 細胞死を引き起こすメカニズムのひとつである小胞体ストレスにより誘発されるアポトーシスに対する EGCG の作用について検討した。INS-1D 細胞を被験物質含有培地中で 18 時間培養した後、フローサイトメトリーによりアポトーシス解析を行った。小胞体ストレスを誘導する刺激としては、タプシガルギンを用いた。INS-1D 細胞において、300 nM タプシガルギン 18 時間処置により誘発されたアポトーシスは、EGCG 0.1 μ M では影響を受けず、EGCG 1 μ M および 10 μ M 処置により有意に抑制された(Fig. 17 A)。一方、EGCG の濃度を 30 μ M および 100 μ M に上昇させると、その抑制作用は消失した (Fig. 17 B)。以上の結果から、タプシガルギン誘発アポトーシスに対し、EGCG は低濃度(1–10 μ M)で抑制作用を示し、高濃度(30–100 μ M)ではその抑制効果が消失するという、濃度によって異なる作用を示すことが明らかとなった。

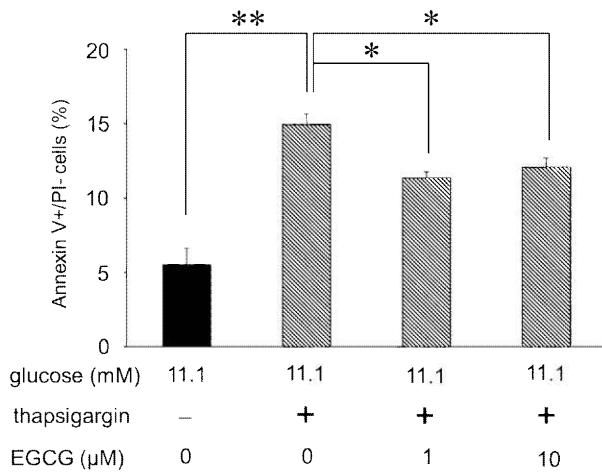
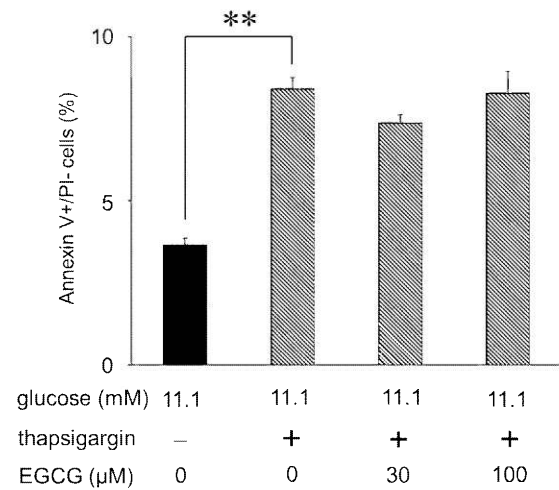
A**B**

Fig. 17. Effect of EGCG on thapsigargin-induced apoptosis in INS-1D cells.

INS-1D cells were exposed to 300 nM thapsigargin with or without indicated concentrations of EGCG for 18 hr. Apoptotic cells were measured by FACS analysis after Annexin-V/PI staining. Each represents the mean \pm SEM for 36 independent experiments. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

第4節 考察

本章では、カテキン類の膵β細胞におけるインスリン分泌や細胞生存への影響について検討を行った。カテキン類の糖尿病に対する作用として、*in vivo*における検討結果から、糖質の吸収を遅らせて血糖を降下させる作用や脂肪燃焼作用がこれまでに報告されている^{12,57)}。しかし、血糖値の変動に密接に関係する膵β細胞に対する影響については殆ど作用解析が行われていない。そこで、本研究ではカテキン類の膵β細胞を標的とした直接的な作用の解明をめざした。

茶葉中に含まれているカテキン類には主に、EGCG、EGC、ECG、ECの4種類がある。これらは加熱処理することで立体構造がcis体からtrans体へ変化し、それぞれGCG、GC、CG、CAとなる。これらカテキン類の構造上の大きな違いとして、B環の5位のOH基の有無とC環3位のOH基へのガロイル基の結合の有無が挙げられる (Fig. 11)。

インスリン分泌を担っている膵β細胞の機能維持と細胞保護は糖尿病予防や治療に重要である。カテキン類のインスリン分泌に対する作用としては、マウス由来膵β細胞株のMIN6細胞において20 μMから200 μMのCAが25 mMグルコースにより誘発されるインスリン分泌を増加させるとの報告¹³⁾や、ラットから単離した膵島において、グルタミン酸の代謝を促進してATP産生を増加することにより引き起こされるインスリン分泌をEGCGおよびECGは抑制し、ECおよびEGCは抑制しないとの報告⁵³⁾があるものの、統一した条件下で8種類のカテキン類の効果を比較した報告はなかった。そこで、本研究ではラット由来膵β細胞株のINS-1D細胞におけるグルコース誘発インスリン分泌反応に対する8種類のカテキン類の影響について検討した。その結果、カテキン類のうちEGCG、GCG、EGC、GC、ECGはグルコース誘発インスリン分泌抑制作用を示す一方、EC、CA、CGのインスリン分泌に対する影響は認められなかった。すなわち、カテキン類の構造の差異によって、グルコース誘発インスリン分泌反応への作用が異なることが本研究で明らかと

なった。

カテキン類の化学構造を比較すると、EGC と GC は B 環に 3 つの OH 基、ECG、CG は C 環 3 位のガロイル基、EGCG、GCG は B 環に 3 つの OH 基と C 環 3 位のガロイル基の両方を持っている。カテキン類がその生理活性を示すためには、細胞膜と相互作用し細胞膜に取り込まれることが必要と考えられている⁵⁸⁾。カテキン類が細胞膜に取り込まれるためには、まず親水性の細胞膜頭部への吸着、つづいて脂質二重層内部への吸収の過程を経なければならない。その両方の機構において、水素結合の形成が重要な促進因子となることが報告されている⁵⁹⁾。ガロイル基や B 環の水酸基の存在はそれぞれ水素結合の形成に寄与しているため、その両方の構造を有する EGCG は最も細胞膜に取り込まれやすいと言われており^{59, 60)}、本研究の結果においてもグルコース誘発インスリン分泌抑制作用は、EGCG が最も低い濃度から認められた。カテキン類は C 環の 2 位と 3 位の OH 基の立体化学構造から *cis*-type の EC、EGC、ECG、EGCG と *trans*-type の CA、GC、CG、GCG に分類できる。*cis*-type のカテキン類の方が *trans*-type のカテキン類より細胞膜に対する親和性が高いことが報告されている⁶¹⁾。CG を例にすると、*trans*-type の CG は疎水性の領域が中央に位置し、また親水性の A 環、B 環やガロイル基の存在により脂質二重層の脂溶性領域と CG の疎水性領域の相互作用が妨げられてしまう。このように、*cis*-type のカテキン類は同様の構造を有する *trans*-type のカテキンより細胞に対する作用が強いと推測できるが、本研究における結果でも、*cis*-type のカテキン類の多くがインスリン分泌抑制作用を示しており、上述の知見とも一致していた。

カテキン類は、抗酸化作用を持つことが知られているが、その強度については ECG>EGCG>EGC>EC であることが報告されている^{62, 63)}。本研究で得られたカテキンによるグルコース誘発インスリン分泌抑制作用に関して、ECG と EGC を 100 μ M で比較すると、ECG による抑制は部分的であるのに対し、EGC はインスリン分泌を完全に抑制した。すなわち、インスリン分泌に対する抑制作用は ECG よりも EGC の方が強く、抗酸化作用の順とは相関しないことが示され、インスリン分泌抑制作

用は抗酸化活性とは別の要因による影響を受けていると考えられた。以上より、カテキン類によるインスリン分泌抑制作用の強度には、カテキン類と細胞膜との相互作用の程度の違いが関係している可能性が高い。

カテキン類のうち、最も多くの検討に用いられている EGCG によるインスリン分泌抑制メカニズムの詳細な検討を行った結果、EGCG がグルコース誘発 $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションを抑制すること、tolbutamide により引き起こされるインスリン分泌および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を抑制すること、high K^+ 刺激によるインスリン分泌は部分的に抑制するが $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制しないことが示された。すなわち、EGCG 100 μM により、 K^+ チャネルが開口して細胞膜が過分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口が減少して細胞外からの Ca^{2+} 流入が抑制されることが示唆された。これまでに、EGCG が K_{ATP} チャネルの ATP 感受性を減弱させ、グルコース誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇およびインスリン分泌を阻害することや、EGCG の K_{ATP} チャネルに対する作用には B 環 5 位の OH 基が重要であることが報告されている⁶⁴⁾。このことから、高濃度のカテキン類によるグルコース誘発インスリン分泌抑制作用に、カテキン類による K_{ATP} チャネルの ATP 感受性の減弱が関与している可能性が考えられた。一方、high K^+ 刺激誘発インスリン分泌反応も EGCG は一部抑制したことから、 K^+ チャネルに依存しないインスリン分泌抑制作用も有していると考えられる。

膵 β 細胞が持続的に高血糖に曝されると、インスリンの生合成の増加や過剰分泌により過剰なストレスがかかり、膵 β 細胞が疲弊し、細胞数の減少やそれに伴うインスリン分泌機能の低下が引き起こされることが知られている。そこで、膵 β 細胞の細胞生存に対するカテキン類の効果について検討した。アポトーシス誘導刺激として、小胞体ストレスを惹起させるタプシガルギンを用いた。小胞体ストレスは、糖尿病状態における β 細胞のアポトーシス誘導に関与していることが知られている。検討の結果、タプシガルギン誘発アポトーシスは EGCG 1 μM および 10 μM により有意に抑制されるが、EGCG 30 μM および 100 μM により影響を受けなかった。つまり、低濃度の EGCG は細胞保護作用を示すが、高濃度になると細胞保護作用が

消失することが明らかとなった。カテキン類の細胞保護作用については、EGCG が RINm5F 細胞においてサイトカインにより誘導される活性酸素の産生を阻害する¹⁴⁾ことや、EGCG が INS-1 細胞において PI3 キナーゼ-Akt 経路を活性化する⁵⁴⁾などの報告があるものの、詳細についてはわかっていない。また、高濃度のカテキン類については、高濃度 EGCG が HIT-T15 細胞において H₂O₂ を産生するとの報告¹⁵⁾や、EGCG がヒト白血病細胞株 U937 細胞や OCI-AML1a 細胞において JNK を活性化するとの報告⁶⁵⁾などがある。高濃度のカテキン類では活性酸素が産生され、産生された活性酸素が細胞毒性を引き起こしアポトーシスが誘導されている可能性が考えられる。また、高濃度カテキン類がグルコース誘発インスリン分泌抑制作用を示すことや、インスリンに細胞保護作用があるという報告³⁷⁾から、高濃度のカテキン類によるインスリン分泌抑制作用も細胞保護作用の消失に関与している可能性が考えられた。今後、細胞生存に対するカテキン類の作用メカニズムについて、小胞体ストレス関連分子の発現変化、あるいはβ細胞におけるアポトーシス誘導経路の阻害薬を用いた解析など、より詳細な解析が必要である。

本章における検討では、一貫してラット由来膵β細胞株の INS-1D 細胞を用いた。実験動物より単離した膵島を用いた検討は、単離する技術、α細胞やδ細胞の混入、単離したβ細胞の増殖能がほとんどないなど、確保できる材料の質、量の点から実施可能な実験は限られる。しかし、培養細胞株は生体内の細胞と必ずしも性質が同じではない。実際、生体内でカテキンが本章における結果と同様の作用を発現しているのかについて、単離した膵β細胞を用いて検討する必要があるだろう。

カテキン類の中でも最も強い生理活性を示す EGCG の血中濃度については、ヒトにおいて 800 mg の EGCG の経口摂取により血中 EGCG 濃度は 1 μM 程度になるとの報告⁶⁶⁾がある一方、緑茶 0.5 から 1 L に匹敵する 525 mg の EGCG の経口摂取により血中 EGCG 濃度が 4.4 μM までになるとの報告もある⁶⁷⁾。いずれにしても、緑茶を経口摂取した後の血中カテキン濃度の検討結果から、通常の緑茶の摂取では、血中のカテキン濃度が本研究でグルコース誘発インスリン分泌抑制作用が観察さ

れたような高濃度のカテキン濃度になることは考えにくく、むしろβ細胞保護作用による抗糖尿病効果など良い面の作用が現れることが期待される。しかし、昨今、カテキン類のサプリメント等が存在するため、カテキン類による抗糖尿病効果を得るためには高濃度になるとかえって効果が得られない、あるいは有害作用が発現する可能性があることに注意し、その至適な摂取量を見極める必要があるだろう。

第5節 小括

本章における実験結果より、以下の知見が得られた。

INS-1D細胞において、カテキン類8種類のグルコース誘発インスリン分泌に対する作用を検討した結果、カテキン類の構造の差異によって、インスリン分泌抑制作用が異なることが示された。この抑制作用の違いには、カテキン類の化学構造による細胞膜との相互作用の程度の差が関与していると考えられた。

また、100 μM EGCGによるインスリン分泌抑制メカニズムとして、K⁺チャネルを開口させることにより細胞膜を過分極させ、電位依存性Ca²⁺チャネルを介した細胞内へのCa²⁺の流入を抑制している可能性が示された。

さらに、300 nM タブシガルギン処置による小胞体ストレス誘発アポトーシスに対し、1 μM および10 μM EGCGはアポトーシスを有意に抑制した。一方、30 μM および100 μMのEGCGではアポトーシスは抑制されなかった。以上の結果から、EGCGはインスリン分泌抑制作用を示さない低濃度領域でβ細胞保護作用を有し、インスリン分泌抑制作用を示す高濃度領域では細胞保護作用が消失することが明らかとなった。

以上の結果より、カテキン類は、低濃度領域においてβ細胞保護作用による抗糖尿病効果を示すことが示唆された。しかし、その効果には至適な濃度範囲が存在し、その範囲よりも高濃度になるとインスリン分泌抑制作用など注意すべき作用も現れることが示された。

総括

本研究は、膵β細胞におけるインスリン分泌能や細胞生存に対する天然物由来成分であるノビレチンとカテキン類の作用を解明することを目的として、以下の研究を行った。

まず、第一章では、ラット由来膵β細胞株である INS-1D 細胞を用いて、インスリン分泌や細胞生存に対するノビレチンの作用を検討した。そして、ノビレチンが濃度依存的に 11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌を促進することを明らかにした。さらに、そのメカニズムとして、細胞内 cAMP 濃度の増加が関与していることが示唆された。また、タブシガルギン誘発アポトーシスに対し、ノビレチンは 10 μM でのみアポトーシス抑制効果を示すことを明らかにした。10 μM ノビレチンによるタブシガルギン誘発アポトーシス抑制作用には、細胞内 cAMP 濃度の増大により活性化される PKA が関与していることを明らかにした。さらに、小胞体ストレスにより誘導されたアポトーシス関連タンパクの発現に対するノビレチンの作用について検討した結果、ノビレチンが小胞体ストレス応答反応経路の PERK や ATF6 ではなく、IRE-1 を介する経路において活性化される JNK のリン酸化を抑制することによりアポトーシス抑制作用を示すことが示唆された。

第二章では、INS-1D 細胞を用いて、インスリン分泌や細胞生存に対するカテキン類の作用を検討した。その結果、11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌反応に対し、EGCG、GCG、EGC、GC、ECG はそれぞれ 11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌を有意に抑制した。一方、EC、CA、CG は 11.1 mM グルコース誘発インスリン分泌反応に影響を与えなかった。これらインスリン分泌に対するカテキン類の効果の差異には、その化学構造の差異が関与していると考えられた。次にカテキン類による 11.1mM グルコース誘発インスリン分泌抑制メカニズムの検討を行った。そして、EGCG によるインスリン分泌抑制作用には主に K⁺チャネルの開口を介した細胞膜の過分極が関与していることが示唆され、また、K⁺チャネルに依存しない

分泌抑制機構が存在する可能性も示された。さらに、小胞体ストレスによるアポトーシスに対する EGCG の作用を検討した結果、タプシガルギン誘発アポトーシスに対し、EGCG は低濃度(1–10 μM)で抑制作用を示し、高濃度(30–100 μM)ではその抑制効果が消失するという、濃度によって異なる作用を示すことを明らかにした。

以上、本研究において、ノビレチンは、高濃度では β 細胞保護作用が得られなくなる懸念はあるものの、低濃度領域の 10 μM においてインスリン分泌促進作用および β 細胞保護作用により抗糖尿病効果を示すことが示唆された。また、カテキン類についても、高濃度ではインスリン分泌抑制作用など有害な作用を発現する懸念はあるものの、低濃度では β 細胞保護作用による抗糖尿病効果を示すことが示唆された。

謝辞

本研究の遂行および論文作成において、終始御懇切なる御指導および御鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部薬理学教室、石川智久教授に厚く感謝の意を表します。本研究の細部にわたり、数々の御指導、御鞭撻を頂きました静岡県立大学薬学部薬理学教室、金子雪子助教に深く感謝いたします。また、本研究にあたり有益な御指導、御助言を頂きました、斉藤真也准教授並びに小原一男講師に感謝いたします。

また、本論文の作成に際し御校閲、御助言賜りました静岡県立大学薬学部分子病態学教室 森本達也教授、衛生分子毒性学教室 吉成浩一教授、薬物動態学教室 尾上誠良教授に感謝いたします。

ノビレチンを分与して頂きました静岡県立大学薬学部医薬品製造化学講座 管敏幸教授、浅川倫宏助教、ウシオケミックスの岡本一男様に感謝いたします。

大学院への入学にあたり深い御理解と御支援を賜りました元静岡県環境衛生科学研究所長 松本昭司様に謹んで御礼を申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、御理解と御支援を賜りました静岡県環境衛生科学研究所医薬食品部の皆様および静岡県中部健康福祉センター化学検査課の皆様に深く感謝いたします。

実験および論文作成に御協力頂きました薬理学教室の秋山季理子氏をはじめとする皆様に感謝いたします。

最後に、学生生活中公私にわたり、さまざまな場面でお世話になった方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) Saisho, Y. (2015). β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 6(1), 109–124.
- 2) Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2. *Diabetes*, 52(1), 102–110.
- 3) Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities. *Diabetes*, 54(suppl 2), S97–S107.
- 4) Todd, D. J., Lee, A.H., & Glimcher, L. H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology*, 8(9), 663–674.
- 5) Fonseca, S. G., Burcin, M., Gromada, J., & Urano, F. (2009). Endoplasmic Reticulum Stress in Beta Cells and Development of Diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 763–770.
- 6) Osowski, C. M., & Urano, F. (2010). The binary switch between life and death of ER stressed beta cells. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 17(2), 107–112.
- 7) Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded

- protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529.
- 8) Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099–1108.
- 9) Wakabayashi, S., & Yoshida, H. (2013). The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 6, e201303010.
- 10) IDF Diabetes Atlas 5th edition. (2013) International Diabetes Federation
- 11)平成 24 年国民健康・栄養調査報告（2014）厚生労働省.
- 12) Nagao, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2007). A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity*, 15(6), 1473–1483.
- 13) Chemler, J. A., Lock, L. T., Koffas, M. A. G., & Tzanakakis, E. S. (2007). Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 797–807.
- 14) Zhang, Z., Ding, Y., Dai, X., Wang, J., & Li, Y. (2011). Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. *European Journal of Pharmacology*, 670(1), 311–316.
- 15) Suh, K. S., Chon, S., Oh, S., Kim, S. W., Kim, J.W., Kim, Y. S., & Woo, J.-T. (2010).

- Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biology and Toxicology*, 26(3), 189–199.
- 16) Yun, S.Y., Kim, S.P., & Song, D.K. (2006). Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 541(1-2), 115–121.
- 17) Saito, T., Abe, D., & Sekiya, K. (2007). Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(2), 371–376.
- 18) Lee, Y.S., Cha, B.Y., Saito, K., Yamakawa, H., Choi, S.S., Yamaguchi, K., & Woo, J.T. (2010). Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic *ob/ob* mice. *Biochemical Pharmacology*, 79(11), 1674–1683.
- 19) Lee, Y.S., Cha, B.Y., Choi, S.S., Choi, B.K., Yonezawa, T., Teruya, T., & Woo, J.T. (2013). Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 156–162.
- 20) Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11), 1777–1789.
- 21) Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., & Oiry, C. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology*, 161(4),

799–814.

- 22) Jonas, J. C., Plant, T. D., Gilon, P., Detimary, P., Nenquin, M., & Henquin, J. C. (1995). Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. *British Journal of Pharmacology*, 114(4), 872–880.
- 23) Kaneko, Y. K., Takii, M., Kojima, Y., Yokosawa, H., & Ishikawa, T. (2015). Structure-Dependent Inhibitory Effects of Green Tea Catechins on Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(3), 476–481.
- 24) Hsiao, P.C., Lee, W.J., Yang, S.F., Tan, P., Chen, H.Y., Lee, L.M., & Chien, M.H. (2014). Nobiletin suppresses the proliferation and induces apoptosis involving MAPKs and caspase-8/-9/-3 signals in human acute myeloid leukemia cells. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(12), 11903–11911.
- 25) Yoshigai, E., Machida, T., Okuyama, T., Mori, M., Murase, H., Yamanishi, R., & Nishizawa, M. (2013). Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 β -treated hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 54–59.
- 26) Nagase, H., Yamakuni, T., Matsuzaki, K., Maruyama, Y., Kasahara, J., Hinohara, Y., & Ohizumi, Y. (2005). Mechanism of Neurotrophic Action of Nobiletin in PC12D Cells. *Biochemistry*, 44(42), 13683–13691.
- 27) Takano, K., Tabata, Y., Kitao, Y., Murakami, R., Suzuki, H., Yamada, M., & Hori, O.

- (2007). Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C353–361.
- 28) Asakawa, T., Hiza, A., Nakayama, M., Inai, M., Oyama, D., Koide, H., & Kan, T. (2011). PET imaging of nobiletin based on a practical total synthesis. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(10), 2868–2870.
- 29) Zhou, C.H., Wu, X.H., & Wu, Y.Q. (2009). Nobiletin, a dietary phytochemical, inhibits vascular smooth muscle cells proliferation via calcium-mediated c-Jun N-terminal kinases pathway. *European Journal of Pharmacology*, 615(1-3), 55–60.
- 30) Lu, Y.-H., Su, M.-Y., Huang, H.-Y., Lin-Li., & Yuan, C.G. (2010). Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Neuroscience Letters*, 484(1), 6–11.
- 31) Chen, C., Ono, M., Takeshima, M., & Nakano, S. (2014). Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 34(4), 1785–1792.
- 32) Noguchi, A., Takada, M., Nakayama, K., & Ishikawa, T. (2008). cGMP-independent anti-apoptotic effect of nitric oxide on thapsigargin-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Life Sciences*, 83(25-26), 865–870.
- 33) Seino, S., & Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiological Reviews*, 85(4), 1303–1342.

- 34) Ma, X., Guan, Y., & Hua, X. (2014). Glucagon-like peptide 1-potentiated insulin secretion and proliferation of pancreatic β -cells. *Journal of Diabetes*, 6(5), 394–402.
- 35) Younce, C. W., Burmeister, M. A., & Ayala, J. E. (2013). Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304(6), C508–518.
- 36) Kim, J.Y., Lim, D.M., Park, H.S., Moon, C.I., Choi, K.J., Lee, S.K., Kim, B.J. (2012). Exendin-4 protects against sulfonylurea-induced β -cell apoptosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 118(1), 65–74.
- 37) Johnson, J. D., Bernal-Mizrachi, E., Alejandro, E. U., Han, Z., Kalynyak, T. B., Li, H., & Polonsky, K. S. (2006). Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19575–19580.
- 38) Cunha, D. A., Ladrière, L., Ortis, F., Igoillo-Esteve, M., Gurzov, E. N., Lupi, R., & Cnop, M. (2009). Glucagon-Like Peptide-1 Agonists Protect Pancreatic β -Cells From Lipotoxic Endoplasmic Reticulum Stress Through Upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*, 58(12), 2851–2862.
- 39) Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y.C., & Karin, M. (2004). Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), 271–275.

- 40) Holz, G. G. (2004). Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, 53(1), 5–13.
- 41) Landa, L. R., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., & Roe, M. W. (2005). Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31294–31302.
- 42) Kaneko, Y., Ishikawa, T., Amano, S., & Nakayama, K. (2003). Dual effect of nitric oxide on cytosolic Ca²⁺ concentration and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(5), C1215–1222.
- 43) Nemoto, K., Ikeda, A., Yoshida, C., Kimura, J., Mori, J., Fujiwara, H., Degawa, M. (2013). Characteristics of nobiletin-mediated alteration of gene expression in cultured cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 530–534.
- 44) Luo, G., Guan, X., & Zhou, L. (2008). Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*, 7(6), 966–973.
- 45) Choi, Y., Kim, Y., Ham, H., Park, Y., Jeong, H.-S., & Lee, J. (2011). Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12843–12849.
- 46) Wilson, B. E., Mochon, E., & Boxer, L. M. (1996). Induction of bcl-2 expression by

- phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5546–5556.
- 47) Yusta, B., Baggio, L. L., Estall, J. L., Koehler, J. A., Holland, D. P., Li, H., & Drucker, D. J. (2006). GLP-1 receptor activation improves β cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*, 4(5), 391–406.
- 48) Onoue, S., Uchida, A., Takahashi, H., Seto, Y., Kawabata, Y., Ogawa, K., & Yamada, S. (2011). Development of high-energy amorphous solid dispersion of nanosized nobiletin, a citrus polymethoxylated flavone, with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(9), 3793–3801.
- 49) Singh, S. P., Wahajuddin, Tewari, D., Patel, K., & Jain, G. K. (2011). Permeability determination and pharmacokinetic study of nobiletin in rat plasma and brain by validated high-performance liquid chromatography method. *Fitoterapia*, 82(8), 1206–1214.
- 50) Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., & Corti, A. (2006). Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Research*, 66(2), 1234–1240.
- 51) Sano, M., Tabata, M., Suzuki, M., Degawa, M., Miyase, T., & Maeda-Yamamoto, M. (2001). Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *The Analyst*, 126(6), 816–820.
- 52) Fu, Z., Zhen, W., Yuskavage, J., & Liu, D. (2011). Epigallocatechin gallate delays the

- onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *The British Journal of Nutrition*, 105(8), 1218–1225.
- 53) Li, C., Allen, A., Kwagh, J., Doliba, N. M., Qin, W., Najafi, H., Smith, T. J. (2006). Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10214–10221.
- 54) Kim, M. K., Jung, H. S., Yoon, C. S., Ko, J. H., Chun, H. J., Kim, T. K., & Park, J. H. (2010). EGCG and quercetin protected INS-1 cells in oxidative stress via different mechanisms. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2, 810–817.
- 55) Lee, Y.J., Kim, S.J., & Heo, T.H. (2011). Protective effect of catechin in type I Gaucher disease cells by reducing endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2), 254–258
- 56) Wollheim, C. B., & Sharp, G. W. (1981). Regulation of insulin release by calcium. *Physiological Reviews*, 61(4), 914–973.
- 57) Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Tamaya K, Miyata Y, Tanaka K, Matsumoto K: alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem*. 55:99-105, 2007.
- 58) Kamihira, M., Nakazawa, H., Kira, A., Mizutani, Y., Nakamura, M., & Nakayama, T. (2008). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1372–1375.

- 59) Sirk, T. W., Brown, E. F., Friedman, M., & Sum, A. K. (2009). Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6720–6728.
- 60) Sirk, T. W., Brown, E. F., Sum, A. K., & Friedman, M. (2008). Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7750–7758.
- 61) Kajiya, K., Kumazawa, S., & Nakayama, T. (2001). Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(12), 2638–2643.
- 62) Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339–346.
- 63) Lotito, S. B., & Fraga, C. G. (2000). Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 225(1), 32–38.
- 64) Jin, J.Y., Park, S.H., Bae, J.H., Cho, H.-C., Lim, J.-G., Park, W. S., & Song, D.-K. (2007). Uncoupling by (-)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 56(3), 237–247.

- 65) Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Yuo, A. (2002). Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *The Biochemical Journal*, 368(Pt 3), 705–720.
- 66) Chow, H. H., Cai, Y., Alberts, D. S., Hakim, I., Dorr, R., Shahi, F., & Hara, Y. (2001). Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 10(1), 53–58.
- 67) Nakagawa, K., Okuda, S., & Miyazawa, T. (1997). Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(12), 1981–1985.