

培養肝細胞 HepG2 における糖・脂質代謝に対する
サプリメント素材コレウス・フォルスコリ抽出物の作用に関する研究

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

15MA003 館花 春佳

要旨

【目的】シソ科ハーブ コレウス・フォルスコリは、アーユルヴェーダ医学で循環器・消化器疾患等に用いられてきた。近年、その成分 forskolin で規格化した抽出物 (*Coleus forskohlii* extract: CFE) が、ダイエットサプリメント素材として広く利用されている。しかし、CFE の有効性や安全性には不明な点が多い。一方、一連の動物試験で、CFE は肝の薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 分子種を強く誘導し、また脂肪肝を誘発した。よって標的となる肝における CFE の作用、さらにはその関与成分・機序の解明は、CFE の安全な利用また新規機能性成分の開発に資すると推定される。そこで、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 における糖・脂質代謝に対する CFE またその画分・成分の作用を調べた。

【方法】HepG2 は、CFE またはその画分 (~100 µg/ml) 等の存在下で培養 (~24 時間) した。グルコースの細胞内取込量は、培養前の培養液中のグルコース濃度 (11 mM) から培養後の濃度を差し引いて求めた。細胞内脂肪蓄積は Oil Red O 染色法、細胞活性は MTT 法、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現はリアルタイム RT-PCR により検討した。CFE 画分の分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行った。

【結果】CYP 分子種には CFE (10 µg/ml 以上) 添加で遺伝子発現亢進を示すものがあった。CFE (6.3 µg/ml 以上) は 24 時間後に脂肪蓄積を有意に増大させた。また、CFE (25 µg/ml) 添加 24 時間後にグルコース・脂質代謝関連遺伝子に発現量の変化が認められ、GLUT1 の発現増大、PEPCK1 の発現増大が顕著であった。CFE (6.3 µg/ml 以上) 存在下 24 時間の培養により、グルコースの細胞内取込量は濃度依存的に有意に増大し、その作用はインスリンを凌いだ。以上より、CFE は HepG2 における糖・脂質代謝に作用することが明確になったので、その画分 (5 種) について検討した結果、Fraction (Fr) 2 は脂肪蓄積増大とともに、グルコース取込促進作用を示す一方、50 µg/ml の添加では細胞死を誘発する可能性が示された。HPLC 分析では Fr2 の主要成分として crocetin dialdehyde (CRDA) が検出された。CRDA (~1 µM) は脂肪蓄積を増大させたが、グルコース取込には無影響であった。CFE の指標成分 forskolin, CRDA の酸化物 crocetin の細胞内中性脂肪蓄積、グルコース取込への作用は認められなかった。

【結論】CFE は HepG2 における脂肪蓄積・細胞内グルコース取込を促進するという新知見を得た。CRDA は脂肪蓄積促進の関与成分の候補と考える。CFE の Fr2 は CRDA とは別に、細胞内グルコース取込促進や細胞死誘発成分を含む可能性が示唆される。これらの成果は、CFE の安全な利用・新規機能性成分の開発に資すると推定される。

**Effects of *Coleus forskohlii* extract on
glucose and lipid metabolism in cultured hepatocytes**

Graduate School of Human Life Sciences,
Department of Food and Nutritional Sciences, Jumonji University

Haruka Tatehana

Abstract

[Objective] The labiate herb *Coleus forskohlii* has been used for such as cardiovascular and gastrointestinal diseases in Ayurvedic medicine. In recent years, CFE standardized with its ingredient forskolin is widely used as a dietary supplement material. However, there are many unclear points on the effectiveness and safety of CFE. On the other hand, a series of animal studies showed that CFE strongly induced hepatic drug metabolizing enzyme cytochrome P450 (CYP) molecular species and induced fatty liver. Therefore, elucidation of CFE's action in the target liver as well as its active ingredient and mechanisms would contribute to safe use of CFE and development of new functional ingredients. On these back ground, this study investigated the effects of CFE, its fractions and ingredients on sugar/lipid metabolism in human liver cancer-derived cell line HepG2.

[Method] HepG2 was cultured (~24 h) in the presence of CFE or its fractions (~100 µg/ml). The intracellular uptake of glucose was calculated from the difference of glucose concentration in the media before and after culture. Cellular fat accumulation, cell activity, and expression of sugar/lipid metabolism-related genes were examined by Oil Red O staining method, MTT method, and real-time RT-PCR, respectively. Analysis of the CFE fraction was performed by high performance liquid chromatography (HPLC).

[Results] Some CYP molecular species showed increased gene expression by addition of CFE (>10 µg /ml). CFE (> 6.25 µg / ml) significantly increased fat accumulation after 24 hours. In addition, changes in the expression of glucose/lipid metabolism-related genes were observed 24 hours after addition of CFE (25 µg/ml), and the expression of GLUT1 and

PEPCK1 remarkably increased. The intracellular glucose uptake significantly increased in a concentration-dependent manner in the presence of CFE (>6.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for 24 hours, and CFE's action surpassed insulin. Since CFE clearly affected as above on sugar/lipid metabolism in HepG2, 5 fractions of CFE were then examined. Fr2 showed glucose uptake promoting action together with an increase in fat accumulation, whereas 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed the possibility of inducing cell death. Upon HPLC analysis, crocetin dialdehyde (CRDA) was detected as a major component of Fr2. CRDA (<1 μM) increased fat accumulation but had no effect on glucose uptake. Forskolin (indicator ingredient of CFE) and crocetin (oxidized form of crocetin dialdehyde) showed no effect on fat accumulation and glucose uptake.

[Conclusion] This study has showed a new finding that CFE promotes fat accumulation and intracellular glucose uptake in HepG2. CRDA may be a candidate for the active ingredient in fat accumulation promotion. These results will contribute to the safe use of CFE and the development of new functional ingredients.