

学 位 論 文 題 名

Neutraceutical study on marine allenic carotenoids
with anti-obesity effects on mice

（海洋性アレンカロテノイドの抗肥満作用に関する栄養・機能学的研究）

学位論文内容の要旨

近年、肥満の増加は社会的にも大きな問題となっており、その予防法の開発に関しては社会的にも大きな課題として注目されている。肥満では脂肪細胞の肥大化と、脂肪細胞数の増加が起きており、さらに高脂血症、高血圧、糖尿病などを併発したメタボリックシンドロームを誘発することが問題である。このような症状が続くことで、死因の代表である心疾患や脳卒中のリスクが高まる。よって、脂肪組織の肥大化を抑制する化合物の探索とその分子機構の解明、それに立脚した予防法及び治療法の確立は極めて重要であると言える。これまでの研究において、ワカメなどの褐藻に含まれるフコキサンチンが糖尿病/肥満マウス KK-A^y に対し白色脂肪組織の重量増加を抑制することが明らかにされている。更にフコキサンチンを投与したマウスの白色脂肪組織にはフコキサンチノールやアマロウシアキサンチン A が蓄積することが見出されている。これらの知見は脂肪組織に蓄積するフコキサンチノールとアマロウシアキサンチン A が脂肪組織に直接作用することを示唆している。本研究ではフコキサンチンの抗肥満作用の発現に関わる基盤作用として、代謝物による脂肪組織構成細胞への直接作用として脂肪細胞の分化への影響を解明することを第一の目的とした。更に、脂肪細胞の分化抑制機構に関して分子レベルでの解明を試みた。

第一章では、マンジュウボヤからアレン結合をもつフコキサンチン代謝物のアマロウシアキサンチン A を単離するとともに、アセチレン構造をもつ類縁カロテノイドであるアマロウシアキサンチン B を分離、同定した。また、ワカメからフコキサンチンを分離した後、リパーゼを用いた加水分解を行いフコキサンチノールを調製した。更に、これをアルカリ処理することによりエポキシド構造を開裂させてイソフコキサンチノールを

得た。

第二章では、第一章で単離、調製したアレン構造を有するアマロウシアキサンチン A の脂肪細胞に対する分化抑制能を検討した。マウス胎児由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を前培養しコンフレントまで増殖させた後、インスリン、デキサメタゾン、IBMX といった分化誘導剤を含む DMEM 培地で分化誘導を行った。その後、DMEM 培地に交換しマンジュウボヤから抽出したアマロウシアキサンチン A とアマロウシアキサンチン B やフコキサンチノールとイソフコキサンチノールを添加し分化抑制能を調べた。その結果、アマロウシアキサンチン A とフコキサンチノールは 3T3-L1 の分化において誘導され脂肪合成に関わる glycerol-3-phosphatedehydrogerase (GPDH) 活性に対して抑制作用を示した。これら二つのカロテノイドはフコキサンチンの生体内代謝物であるが、特に GPDH 活性に対する抑制作用はフコキサンチノールよりもアマロウシアキサンチン A が強いことが示された。更に分化抑制に関わる分子メカニズムを解明するため、分化のマスターレギュレータである PPAR γ や C/EBP ファミリーの mRNA の発現量とタンパク質を測定した。その結果、アマロウシアキサンチン A 添加した 3T3-L1 細胞では、C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) α mRNA 発現が減少するとともに、PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) mRNA 発現も大きく低下した。また、PPAR γ と C/EBP α のタンパク質レベルでの減少も見られた。一方、生体内代謝物ではないイソフコキサンチノールやアレン結合をもたないアマロウシアキサンチン B では、アマロウシアキサンチン A やフコキサンチノールと比較して 3T3-L1 の分化に対する抑制効果が弱いことが分かった。このようにフコキサンチン代謝物のアマロウシアキサンチン A やフコキサンチノールが脂肪細胞の分化を抑制したことから、フコキサンチンの代謝物が脂肪細胞における脂肪合成に直接作用することが推察された。特に、脂肪組織中の主要な代謝物であるアマロウシアキサンチン A が強い活性をもつことが示された。

第三章では、第二の目的として脂肪細胞の分化が活発に起こり、それに伴いアディポサイトカインの産生異常やマクロファージの浸潤など脂肪組織の質的変化が見られる肥満の初期段階におけるフコキサンチンの影響をマウスを用いた動物実験において調べた。試験飼料は AIN-93G 組成にしたがって調製した。1 週間大豆油 7%を含む AIN-93G を飼料として 4 週齢の糖尿病/肥満 KK-A^yマウス（雌）を温度 23 $\pm$ 1°C、湿度

50%、明暗を 12 時間周期として予備飼育を行い、その後フコキサンチン 0.2%を含む飼料量を自由摂取させ、1 週間および 2 週間実験飼育を行った。このマウスから子宮周囲 WAT アディポサイトカイン mRNA 発現量の比較を行った。その結果、マクロファージの浸潤を誘導する MCP-1 や炎症性を増大させる TNF- α や PAI-1 の mRNA 発現量は 1 週間飼育と 2 週間飼育のコントロール群を比較すると、2 週間飼育のコントロール群で有意に増加しており、フコキサンチン群はそれぞれのコントロール群と比較して顕著に mRNA 発現を抑制した。脂肪組織では肥大化とともにマクロファージや CD8+T 細胞の浸潤が起こり慢性炎症が誘発される。そこでマクロファージのマーカーとして F4/80 と CD8+T 細胞のマーカーである CD8 α の mRNA 発現をそれぞれ測定した。その結果、各遺伝子発現量がコントロール群に比べてフコキサンチン群は 1 週間投与では低い傾向にあり、2 週間投与では有意に低い発現量であった。以上の結果から、肥満初期の脂肪組織に対してフコキサンチンは、マクロファージや CD8+T 細胞の浸潤を抑制するとともに炎症性のアディポサイトカインの遺伝子発現を抑制し、炎症を予防し、肥満を抑制していることが推察された。

第四章では、フコキサンチン機能の脂肪組織に対する新たな制御機能を明らかにする目的でケモカイン発現の調節について検討した。第三章で肥満の脂肪組織に CD8+T 細胞やマクロファージが浸潤することが明らかとなった。このように、脂肪組織には、脂肪滴を有する脂肪細胞のみならず、stroma-vascular fraction (SVF)と総称される前駆脂肪細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞など他種類の細胞が含まれている。本章では、コラゲナーゼを用いて脂肪組織を脂肪細胞と SVF に分離して、得られた分画を用いてケモカインの発現量やタンパク質を測定した。特に、本研究ではアテローム硬化症の進行において T 細胞との相互作用が知られる、RANTES や SDF-1 α とこれらのレセプターに注目し WAT から分離した脂肪細胞と SVF での発現量を測定した。RANTES、CCR5、CXCR4 mRNA 発現は脂肪細胞と比べ SVF で高かった。逆に、SDF-1 α mRNA 発現は成熟脂肪細胞で高かった。これらの結果から、RANTES と CCR5 は同一の細胞主に発現するが、SDF-1 α と CXCR4 は同一の細胞ではなく他の細胞にパラクリン的に作用することが推察された。さらに、フコキサンチン投与群の WAT では、RANTES、SDF-1 α のタンパク質量もコントロールと比べ減少した。一方、最近、Nara N たちはケモカインの一つである CXCL14 をノックダウンしたマウス

が高脂肪食によって誘発される肥満に対して抵抗性を示すことを報告した。そこで、CXCL14 の mRNA 発現を測定した結果、2 週間フコキサンチン投与群でコントロール群と比べて有意に抑制されていた。また、WAT が増大すると低酸素状態になることが知られているが、それにより誘導される HIF-1 α は leptin や VEGF の分泌を刺激する。1 週間投与と 2 週間投与を比較すると、2 週間投与のコントロール群で HIF-1 α の mRNA 発現量が有意に増加しており、2 週間フコキサンチン投与群はコントロール群と比較して顕著に抑制されていた。これらの結果は、フコキサンチンが肥満初期の 脂肪組織において脂肪細胞の分化やアディポサイトカインの産生に加え、ケモカインの産生調節制御機構も有しており、それらが肥満を予防する上で重要な役割をになっていることを示すものである。

ワカメなどの褐藻に含まれるフコキサンチンは抗肥満効果が期待されるカロテノイドである。本研究により、その生体内代謝物であるアマロウシアキサンチン A が脂肪細胞の分化を制御する転写因子の PPAR γ や C/EBP α の mRNA 発現を抑制し、分化を抑制することが明らかとなった。更に、肥満初期においてみられるマクロファージや CD8+T 細胞の浸潤を抑制するとともに、炎症に関わるアディポサイトカインやケモカインの産生を抑制することを新たに見い出した。このような脂肪組織を構成する細胞に対する複合的効果が、アレン結合を有するフコキサンチンの肥満初期における予防分子機構と推察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 下 和 夫

副 査 教 授 板 橋 豊

副 査 准教授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

Neutraceutical study on marine allenic carotenoids with anti-obesity effects on mice

(海洋性アレンカロテノイドの抗肥満作用に関する栄養・機能学的研究)

ワカメなどの褐藻に特徴的なカロテノイド、フコキサンチンの抗肥満作用が最近注目されている。フコキサンチンは生体内で代謝され、フコキサンチノールやアマロウシアキサンチンAとなることも明らかにされており、これらの代謝物がフコキサンチンの生体内での活性本体と推察できる。しかし、両カロテノイドの活性と構造相関については不明な点も多い。また、その作用の分子機構についてもUCP1に対する発現誘導など一部明らかにされているが、全容解明には至っていない。そこで、本研究では、フコキサンチンの抗肥満作用を明確にすることを目的とし、代謝物の活性を脂肪細胞の分化への影響を中心に検討した。また、糖尿病/肥満KK-*Ay*マウスを用いて、フコキサンチンの投与が肥満形成の初期において、どのような影響を脂肪組織に与えるかについても検討した。本研究で明らかにした点は以下の通りである。

1. アマロウシアキサンチンAとフコキサンチノール、及びそれらの構造類縁体であるアマロウシアキサンチンBとイソフコキサンチノールの、マウス胎児由来3T3-L1前駆脂肪細胞に対する分化抑制能を調べたところ、アレン構造を有するアマロウシアキサンチンAとフコキサンチノールのみが、コントロールと比較して脂肪細胞の分化を有意に抑制することを明らかにした。これら二つのカロテノイドはフコキサンチンの生体内代謝物であるが、特にGPDH活性に対する抑制作用はフコキサンチノールよりもアマロウシアキサンチンAが強いことも明らかにした。

2. アレンカロテノイド（アマロウシアキサンチンAとフコキサンチノール）の分化抑制機構を解明するため、分化のマスターレギュレータであるPPAR γ や C/EBPファミリーのmRNAとタンパク質発現量を測定した。その結果、アマロウシアキサンチンAを添加した3T3-L1細胞では、C/EBP α とPPAR γ のmRNA及びタンパク質発現が低下することを見出した。以上より、フコキサンチン代謝物である両アレンカロテノイドが脂肪細胞における脂肪合成に直接作用すること、特に、脂肪組織中の主要な代謝物であるアマロウシアキサンチンAが強い活性を持つことを明らかにした。

3. 脂肪細胞の分化が活発に起こり、それに伴いアディポサイトカインの産生異常やマクロファージの浸潤など脂肪組織の質的変化が見られる肥満の初期段階でのフコキサンチンの影響を、マウスを用いて検討した。その結果、マクロファージの浸潤を誘導するMCP-1並びに炎症性を増大させるTNF- α やPAI-1のmRNA発現量は、1週間飼育後と比較して2週間飼育後に有意に増加するが、フコキサンチン投与によりこのmRNA発現量の増大は有意に抑制されることを明らかにした。脂肪組織では肥大化とともにマクロファージやCD8+T細胞の浸潤が起こり慢性炎症が誘発される。そこでマクロファージのマーカーとしてF4/80を、また、CD8+T細胞のマーカーとしてCD8 α のmRNA発現をそれぞれ測定したところ、各遺伝子発現量がコントロール群に比べてフコキサンチン群は1週間投与では低い傾向にあり、2週間投与では有意に低くなることを明らかにした。以上より、肥満初期の脂肪組織に対してフコキサンチンは、マクロファージやCD8+T細胞の浸潤を抑制するだけでなく、炎症性のアディポサイトカインの遺伝子発現も抑制すること、こうした制御がフコキサンチンの抗炎症作用と抗肥満作用の分子機構であることを明確にした。

4. 脂肪組織には、脂肪滴を有する脂肪細胞以外に、stroma-vascular fraction (SVF)と総称される前駆脂肪細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞など他種類の細胞が含まれている。そこで、コラゲナーゼを用いて脂肪組織を脂肪細胞とSVFに分離し、得られた分画中のケモカインの発現量やタンパク質を測定した。その結果、フコキサンチン投与により、RANTES、SDF-1 α のタンパク質量の減少、CXCL14のmRNA発現量の抑制、HIF-1 α のmRNA発現量の抑制が起こることを明らかにした。以上の結果から、フコキサンチンが肥満初期の脂肪組織において脂肪細胞の分化やアディポサイトカインの産生に加え、ケモカインの産生調節制御機構も有しており、この作用が、肥満を予防する上で重要な役割を担っていることを示した。

本研究により、フコキサンチンの生体内代謝物であるアマロウシアキサンチンAが脂肪細胞の分化を抑制する活性本体であり、その制御は、PPAR γ やC/EBP α といった転写因子のmRNA発現の抑制に起因することを明らかにした。更に、フコキサンチン代謝物は、肥満初期においてみられるマクロファージやCD8+T細胞の脂肪組織への浸潤を抑制するとともに、炎症に関わるアディポサイトカインやケモカインの産生を抑制することも新たに見出した。このような脂肪組織を構成する細胞に対する複合的効果が、アレン結合を有するフコキサンチン代謝物の肥満初期における予防分子機構であることを初めて明確にした。これらの成果は、褐藻由来の機能性成分として注目されているフコキサンチンの生理活性解明に資するものであり、明確な学術的基盤に基づくメタボリックシンドローム予防成分の創出にも寄与すると考えられる。よって審査員一同は本研究の申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。