

学 位 論 文 題 名

Health Benefit of Seaweed Antioxidants: Protection against Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome

(海藻抗酸化成分の健康への影響：肥満で誘発される酸化ストレスの防御とそのメタボリックシンドロームへの影響)

学位論文内容の要旨

Obesity is a condition associated with oxidative stress and reduced antioxidant status. The oxidative damage plays a key role in the development of obesity-related diseases such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and other metabolic disorders. Epidemiological studies have indicated that fruit and vegetables, and dietary antioxidants may prevent chronic diseases, potentially by affecting mechanism involved in pathogenic conditions such as oxidative stress and inflammation. It was, therefore, hypothesised that a supplementation of dietary seaweed antioxidants might act beneficially on the antioxidant status, metabolic control, oxidative stress and inflammation of obese conditions. Thus, in this study, antioxidants were extracted from brown seaweeds and examined the activity of each compound *in vitro* system. *In vivo* activity was also investigated using two types of obese-model mouse, namely, a high-fat/high-sucrose diet-induced obese C57BL/6J mouse and a spontaneous obese/diabetic KK-*A*^y mouse.

The results of the studies show that high antioxidant activity of seaweed extract was driven *in vitro* system not only from the high content of polyphenols, but also from the occurrence of fucoxanthin. The synergy in the antioxidant activity of the combination of seaweed polyphenols and fucoxanthin was also demonstrated. On the other hand, *in vivo* system, fucoxanthin exhibited antioxidant activity, while the less contribution of seaweed polyphenols was observed. It is clear that seaweed polyphenols have antioxidant activity; however, the evaluation of the effects exerted *in vitro* gives several problems mainly due to the complexity of animal body and to the lower bioavailability. These findings show that fucoxanthin is the main component of brown seaweed antioxidants *in vivo*.

NADPH oxidases (Nox) are known as a major source of extra-mitochondrial ROS and may contribute to the oxidative stress observed in glucolipotoxicity mice. The supplementation of fucoxanthin-rich fraction (FF) as well as purified fucoxanthin significantly suppressed the up-regulation of Nox subunits, the cytosolic p47^{phox} and p67^{phox} and membrane-associated gp91^{phox} in WAT. The antioxidant defense includes dietary and endogenous antioxidants and involves complex interactions between them. FF attenuated the down-regulation of antioxidant enzyme such as SOD and catalase in WAT and in liver in high-fat/high-sucrose diet-induced obese C57BL/6J mice; however, no modulation was found when purified fucoxanthin fed to spontaneous obese/diabetic KK-*A*^y mice. SOD converts superoxide anions to hydrogen peroxide (H₂O₂) and H₂O₂ can be rapidly removed by catalase, the major H₂O₂ detoxifying enzyme. Release of H₂O₂ from WAT of mice fed FF was lower than that of control mice. FF and purified fucoxanthin reduced the lipid hydroperoxide levels in both liver and WAT lipids of mice. Increase ROS in WAT is known to induce dysregulation of adipocytokine production. FF and purified fucoxanthin suppressed the up-regulation of TNF- α and MCP-1. Increase in ROS production in WAT leads to elevation of systemic oxidative stress, represented by increase in H₂O₂ level in obese mice compare to lean mice. However, the increase in H₂O₂ was suppressed by FF and purified fucoxanthin.

This study provides evidence that seaweed antioxidants supplementation, particularly fucoxanthin, provides remarkable beneficial effect by increase antioxidant status *in vivo* and improves the metabolic disorders induced by the increase in the oxidative stress in obese condition. Fucoxanthin exerts its effects through antioxidant defense mechanisms via inhibition of ROS generation based on the modulation of Nox gene expression.

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋	是太郎
副査	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

Health Benefit of Seaweed Antioxidants: Protection against Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome

(海藻抗酸化成分の健康への影響：肥満で誘発される酸化ストレスの防御とそのメタボリックシンドロームへの影響)

肥満により、糖尿病、高血圧、高脂血症などのメタボリックシンドロームが誘発され、これにより、心臓病の発症リスクの高まることは良く知られている。また、こうした疾病の発症には、肥満に伴う体内の酸化ストレスの亢進が深く関わっている。このため、我々の体には種々の抗酸化システムが備わっているが、食品由来の抗酸化成分も生体内酸化ストレスの軽減に重要な役割を果たしている。実際、多くの疫学研究により、抗酸化成分の摂取により、心臓病のリスクの低くなることが明らかになっている。こうした背景の基、野菜や果物などに含まれる抗酸化成分に関する研究が盛んに行われている。一方、水産物由来の抗酸化成分に関する知見は陸上植物由来のものに比べて少ない。そこで、本研究では、海藻の抗酸化成分に着目した。海藻に特徴的な抗酸化成分としては、フロロタンニンなどのポリフェノール類とフコキサンチンなどのカロテノイド類がこれまでに報告されている。しかし、それらの報告は、主としてインビトロでの活性の検討であり、生体への作用について言及したものはほとんどない。そこで、本研究では、肥満により酸化ストレスを誘発させた動物モデルに対する褐藻抗酸化成分の効果を検討した。本研究で明らかにした点は以下の通りである。

1. 従来、褐藻の抗酸化活性は主としてそのポリフェノール含量に依存すると報告されていた。しかし、本研究により、抗酸化成分含量の異なる褐藻類6種のメタノール抽出物の抗酸化活性を比較したところ、含まれるフコキサンチン含量もインビトロでの抗酸化活性に大きく影響することを見出した。

2. 生体内での褐藻由来抗酸化成分の活性を明らかにするため、ウガノモク、アカモク、ワカメから脂質を抽出し、これを肥満・糖尿病病態マウス(KK-A^y)に投与した。その結果、マウス肝臓中の過酸化脂質含量は、いずれの脂質投与によっても投与濃度依存的に有意に減少した。しかし、その減少度合いは、各脂質に含まれるポリフェノールの量ではなく、フコキサンチンの濃度と相関した。このことより、褐藻抗酸化成分の生体内での活性本体はフコキサンチンであることが示された。

3. フコキサンチンとポリフェノールの生体内抗酸化活性への寄与について明確にするため、アカモクから得たアセトン抽出物を液-液分配などによりフコキサンチン画分とポリフェノール画分に分画し、その抗酸化活性について正常マウス (C57BL/6J) を用いて比較した。マウスには通常食と高脂肪食を投与したが、高脂肪食投与により、正常食投与と比較して体重と内臓脂肪組織 (WAT) 重量の有意な増大が見られた他、肝臓の過酸化脂質レベルとWATでの過酸化水素生産量も有意に増加した。これに対して、フコキサンチン画分投与により、高脂肪食による肥満状態と生体内過酸化レベルの増大は有意に改善されたが、ポリフェノール画分投与ではこうした効果は見られなかった。さらに、褐藻より得た精製フコキサンチンと、著名なポリフェノールであり茶類に多く含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) を、肥満・糖尿病病態マウス (KK-A^y) に投与したところ、フコキサンチンのみで有意なWATの減少と過酸化脂質増大抑制が見られた。これらの結果より、褐藻抗酸化成分の生体内での活性本体はフコキサンチンであることが確かめられた。

4. フコキサンチンによる生体内抗酸化活性の分子機構を明らかにするために、生体内の各種抗酸化関連酵素について検討したところ、フコキサンチン投与により、酸化酵素 (NADPHオキシダーゼ) のサブユニット (p47phox、p67phox、gp91phox) の有意な発現減少と、抗酸化酵素 (スーパーオキシダーゼディスムターゼやカタラーゼ) の有意な発現増大を見出した。以上より、フコキサンチンは、肥満状態で誘発される生体内の酸化・抗酸化酵素のアンバランスな発現状態を正常に戻すことにより、その抗酸化効果を発揮することを明らかにした。また、生体内のフコキサンチン代謝物 (フコキサンチノールとアマロウシアキサンチンA) 含量と、生体内での酸化ストレスレベルとの関係についても検討し、これらの代謝物が抗酸化の活性本体であることも示した。

褐藻には種々の抗酸化成分が含まれており、これまでの研究によりその主たる活性成分としてフロロタンニンなどのポリフェノール類が報告されてきた。しかし、本研究により、生体内での褐藻抗酸化成分の活性本体は、褐藻カロテノイド、フコキサンチンであり、ポリフェノールは吸収性の低さなどが原因となって生体内ではほとんど抗酸化活性を示さないことが明らかにされた。また、フコキサンチンは生体内でフコキサンチノールやアマロウシアキサンチンAに代謝され、これらの代謝物によって生体内の酸化酵素の発現抑制と抗酸化酵素の発現増大が誘発されることを初めて見出した。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だけでなく、褐藻の有効活用と、明確な学術的基盤に基づく抗酸化素材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。