



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Novel functions of flazin against lipid metabolic disorder and mitochondrial dysfunction [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	呉, 訓智
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第15821号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91871
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Xunzhi_Wu_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：呉 訓智

審査委員	主査 教授	池田 敦子
	副査 教授	恵 淑萍
	副査 教授	千葉 仁志（札幌保健医療大学）

学位論文題名

Novel functions of flazin against lipid metabolic disorder and mitochondrial dysfunction
(脂質代謝異常およびミトコンドリア機能不全に対するフラジンの新たな機能に関する研究)

当審査は 2024 年 1 月 24 日実施の公開発表にて行われた。（出席者 33 名）

フラジンは食事由来の β -カルボリンアルカロイドで、主に醤油、米酢、日本酒など日本で使われる発酵食品に含まれている。 β -カルボリンに属し、 β -カルボリンには抗脂肪生成作用や抗酸化作用など様々な生理活性がある。ところで、糖尿病性腎症（DN）は、糖尿病の重篤な合併症であり、末期腎臓病の主な原因である。そこで、フラジンの活性が DN の進行緩和に寄与できるのではないかと考えた。しかし、フラジンのこれら DN への効果は未開拓の分野で、今後の発展が待たれている状況にある。本論文は、このような現況にあるフラジンについて、ヒト由来の腎細胞および DN モデルマウスを用いて、新規機能と糖尿病性腎症に対する効果を検討したものである。

まず研究に用いるフラジンと重水素化フラジンの化学合成を行い、カラムクロマトグラフィーで生成した。検証のため、エレクトロスプレーイオン化学質量分析および核磁気共鳴にてその構造と純度を確認した。

次いで、*in vitro* 研究としてヒト腎細胞（HK-2）を用いて、腎細胞における脂質過負荷およびミトコンドリア機能障害に対するフラジンの効果を検討した。脂質過負荷を誘導するために、細胞にパルミチン酸（PA）とオレイン酸（OA）を添加し、さらにフラジンを添加することで脂質過負荷に対する効果を調べた。実験に適したフラジン、PA、OA の投与量を決定するため、細胞を PA、OA、フラジンで 24 時間処理した後、細胞計数キット-8 の吸光度を用いて細胞生存率を確認した。細胞脂質プロファイルについては、メタノール/メチル *tert*-ブチルエーテル法で細胞脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー/質量分析計で分析した。脂質滴の分析には、オイルレッド O 染色を用いた。脂質小滴の含有量とサイズの定量分析には ImageJ を用いた。また、脂質滴中の脂質を直接分析するために NanoESI/MS を行った。遺伝子発現試験は、細胞からグアニジニウムチオシアネート法により total RNA を単離した後、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行って cDNA を調製した。標的遺伝子の mRNA 発現を評価するために、リアルタイム-PCR を用いて定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行った。この結果、脂質過負荷では、フラジンが脂質過負荷から細胞を保護し、細胞の生存率を向上させることを証明した。さらに、フラジンが細胞のトリグリセリド含量を減少させ、脂質滴の表面特性の改善により脂質滴蓄積を低下させた。このメカニズムとして、フラジンによる脂肪分解遺伝子の発現亢進と、脂肪生成遺伝子の発現抑制を確認した。

さらに、フラジンによる酸化ストレス保護作用を検討した。酸化ストレスを誘導するために、L-ブチオニン-(S, R)-スルホキシミンを細胞に添加した。活性酸素種レベルを検出するために、2', 7'-ジクロロフルオレジンジアセテートを細胞に添加し、活性酸素種の存在を可

視化した。ミトコンドリアの形態を調べるために、MitoTracker Green および Hoechst 33342 を細胞に添加し、ミトコンドリアと核を染色した。ミトコンドリア機能の評価においては、アデノシン三リン酸含量とミトコンドリア DNA コピー数をカウントした。この結果、フラジンが細胞を酸化ストレスから保護し、細胞生存率を増加させることが明らかになった。これは、フラジンがミトコンドリアの凝集抑制によるミトコンドリア機能の改善、カルジオリピン (CL) 含量を向上させ、かつ CL/CL ヒドロキシペロキダーゼ比の減少による CL プロファイル改善によるものであることを示した。また、フラジンによる CL 生合成に関与する遺伝子 *CDS1*、*CDS2*、*PGS1* の発現亢進を確認できた。

DN マウスモデルを作成するため、ストレプトゾトシンを添加した高脂質食をマウスに与えた後、フラジンを投与した。腎機能の確認のために、血漿クレアチニン値を測定した。腎形態変化はヘマトキシリンとエオシン、および過ヨウ素酸シッフ染色を行った。腎脂質は液体クロマトグラフィー質量分析により分析した。また、酸化損傷はマロン時アルデヒド含有量によって検討した。この結果、フラジンは腎機能を改善し、DN マウスの腎臓の組織学的変化、リン脂質プロファイル、酸化ストレスを緩和した。フラジンによる効果を評価した。

最後に、醤油中に含まれるフラジンの定量法を確立した。市販の醤油を用いて抽出溶媒、抽出サイクル、液体クロマトグラフィー/質量分析法を含めて抽出法を最適化した。抽出されたフラジンの分析において、感度、直線性、精度、回収率を検証できた。この定量法により、今後食品に含まれるフラジンの探索と開発に貢献が期待できる。

これを要するに、著者は、フラジンについて細胞および DN マウスモデルを用いて、過酸化付加及び酸化ストレスに対する効果に関する新知見を得たものであり、フラジンが栄養補助食品として DN 予防に貢献する可能性大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格あるものと認める。