



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ケンフェロールのミトコンドリア機能向上作用の解明 [論文内容及び審査の要旨]                                                                  |
| Author(s)           | 櫻井, 知子                                                                                                  |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(保健科学)                                                                                                |
| Dissertation Number | 甲第16329号                                                                                                |
| Issue Date          | 2025-03-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/94909">https://hdl.handle.net/2115/94909</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | Akiko_Sakurai_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                     |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：櫻 井 知 子

## 学位論文題名

## ケンフェロールのミトコンドリア機能向上作用の解明

非アルコール性脂肪性肝疾患（Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD）は 2023 年に代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease: MASLD）と新たに定義され、現在世界中で有病率が急速に増えている。脂肪肝に酸化ストレスやミトコンドリア機能異常などのファクターが加わると予後が不良の非アルコール性脂肪性肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis: NASH）に進行するが、現在 NAFLD/MASLD に承認された治療薬は無い。そのため、NAFLD/MASLD の予防/治療法の開発が期待されている。本研究では、NAFLD 患者においてミトコンドリア機能異常が生じることを糸口に、ミトコンドリアの機能向上あるいは回復を標的として MASLD の予防/治療法を探ることとした。本研究では抗炎症、抗酸化の効果を有するポリフェノールの中でもフラボノイドの Kaempferol (KMP) に注目した。KMP は *in vitro*, *in vivo* 実験の両方で脂肪肝あるいは NAFLD モデルにおいて脂肪肝の改善効果が報告されている。しかし、ミトコンドリア機能改善のメカニズムに着目した NAFLD/MASLD における KMP の効果の報告は無い。そこで第 I 章では、KMP の基礎的な機能を把握するため、また、KMP の MASLD への予防効果を評価するために、肝培養 C3A 細胞を用いた非脂肪肝モデルにおける KMP のミトコンドリア機能への効果を調査した。

その結果、細胞外フラックスアナライザーにより、KMP は C3A 細胞において ATP 産生を含むミトコンドリア呼吸機能を増強することが明らかになった。知る限り、これは KMP によるミトコンドリア呼吸機能の改善を実証した初の報告である。本研究結果は、KMP が脂肪酸のミトコンドリアへの取り込みを促進する経路、またはミトコンドリア生合成を促進する経路を介して、ミトコンドリアエネルギー代謝を増強する可能性を示唆している。carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) はミトコンドリア外膜に局在し、linoleic acid (LA) などの長鎖脂肪酸をミトコンドリアに輸送する役割を果たし、 $\beta$  酸化の活性化に関連して ATP 産生に寄与する。また peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  (PPARGC1A) は、脂肪酸の  $\beta$  酸化などミトコンドリアのマスター制御因子である。本研究では、過去の報告と一致して KMP が *CPT1A* および *PPARGC1A* の遺伝子発現を増加させた。したがって、KMP が脂肪酸の  $\beta$  酸化の増加に寄与した可能性がある。また、非脂肪肝モデルでは、いくつかの分子種において KMP 添加による cardiolipin (CL) の増加が観察されたが、KMP 添加による CL 総量での CL の増加や monolyso-cardiolipin (MLCL) 分子種及び MLCL 総量での減少は観察されなかった。さらに、培養された C3A 細胞では、CL72:8 の濃度は総濃度の約 0.30% に過ぎなかった。CL はミトコンドリアのエネルギー代謝に必要な脂質である。また、4 つの LA のアシル鎖である 18:2 アシル鎖 (18:2) を含む CL72:8 は成熟した機能的な形態であり、生体内の肝細胞の主成分である。C3A 細胞では成熟した CL、すなわち CL 72:8 の量が少なく、成熟した CL の増減の評価が難しいと考えられた。

そこで、第 II 章では CL 代謝において基質となる 18:2 を供給するために LA 誘導の脂肪肝モデル細胞を作製した。脂肪肝モデルを開発の理由は、過剰な LA を添加し、18:2 を供給することで CL72:8 (18:2 x 4) の合成を促進させ、高い濃度域での CL の変化を観察できることを期待したためである。また、CL の成熟時において、tafazzin (TAZ) は優先的に 18:2 を選択して MLCL に結合させる酵素である。TAZ の活性については、CL72:8 / MLCL 54:6

の比によって 18:2 の取り込みを表現することで推定した。第 II 章では、作製した脂肪肝モデル細胞において、CL や MLCL の解析を分子種レベルで詳細に行い、KMP によるミトコンドリアの質の変化および抗 MASLD 効果について調査した。

予備的な検討から、LA の添加濃度に 1 mM を採用して脂肪肝モデル細胞を作製した。質量分析により、LA の添加によって CL72:8 の基礎量を増加させることに成功した。本研究では、脂肪肝モデル細胞に LA を供給することで、CL72:8 が形成されたが、CL 総量は低下した。その条件下で KMP を添加すると、CL72:8 だけでなく CL の総量も増加することが初めて示された。この KMP による CL72:8 の増加の機序には 2 つの経路の活性化が考えられる。第 I 章で KMP が *CPT1A* を増加させるという作用が見いだされた。したがって、KMP は *CPT1A* を介するミトコンドリアへの LA の取り込みを促進させ、その結果、CL72:8 の生合成を促進させた可能性が考えられた。他の経路として、KMP による CL 合成経路の活性化が考えられた。今回、TAZ 活性の指標の CL72:8 / MLCL54:6 の比が KMP 添加で増加したことから、KMP は TAZ 活性に関与して CL72:8 の合成を促進させたと考えられる。MLCL の量については、LA 群における MLCL 総量の減少傾向が観察された。この結果は、LA が MLCL 合成の減少に伴って、全体的な CL 合成の減少に関連することを示唆した。KMP 添加後ではこの減少が対照群と同程度であったため、KMP が MLCL の合成を促進させたことを意味し、KMP が CL 合成を促進したという結果と一致している。MLCL のリモデリングに関して、LA を添加したすべての群で、アシル鎖の二重結合数が多い MLCL 分子種の量が増加したのに対し、アシル鎖の二重結合数が少ない分子種の量は減少した。したがって、CL が CL リモデリングにより成熟するにつれて、MLCL のアシル鎖長が長くなり、MLCL も成熟したと考えられた。一方、KMP の添加により、LA のみを添加した場合と比較して、アシル鎖の二重結合数が多い MLCL 分子種の量が増加したが、これは成熟 CL 量の増加と連動して起こった可能性があるとして解釈した。これらの結果より、複数の二重結合を持ち、かつ CL72:8 の基質となる MLCL 分子種の全体的な合成を KMP が促進させることで、CL72:8 の増加に向かっている状態にしていると考えられた。

第 III 章では、(1) KMP とリポタンパク質との結合について調査すること、および、(2) KMP の high-density lipoprotein (HDL) および low-density lipoprotein (LDL) に対する抗酸化能について中心的に調査することとした。これまでに、KMP が oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) の酸化を抑制するとの報告があるが、LDL の構成要素のうち何の分子の酸化を抑制したのかなどの詳細な機序はわかっていない。HDL に対する KMP の酸化抑制効果については今のところ報告がない。KMP がリポタンパク質と結合して血中で存在し得るのかについては不明な点が多い。そこで本研究では、HDL と LDL の表面を構成する脂質である phosphatidylcholine (PC) とその過酸化物である phosphatidylcholine hydroperoxides (PC-OOH) を分析し、KMP のリポタンパク質に対する抗酸化能を評価した。

今回 KMP が HDL を始め各リポタンパク質と結合することを確認できた。本研究では、KMP による LDL の脂質のうち、具体的に、酸化によるリン脂質過酸化物の形成抑制が証明された。また、今回初めて HDL に対する KMP の抗酸化効果を明らかにした。過酸化脂質の抑制効果のある KMP は、酸化ストレス性疾患である NASH の発症リスクを軽減する作用が期待された。

以上を考え合わせると、血中において KMP は、LDL や HDL の血中リポタンパク質に結合して、強い抗酸化作用を発揮することが示された。今回、*in vitro* における LDL および HDL に対する抗酸化作用を立証した本研究成果は、今後の MASLD/MASH の有用な予防/治療法の開発に繋がると考えられた。

以上をまとめると、本研究では、肝培養細胞を用いて、KMP がミトコンドリアにおける  $\beta$  酸化の活性化や呼吸機能の改善に寄与することが示された。また、KMP が LDL や HDL に結合し、抗酸化作用を発揮することが初めて明らかとなった。これは KMP が血中リポタンパク質の抗酸化に有用である仮説をサポートする。本研究より脂肪肝モデル細胞を使用して得られた知見、およびリポタンパク質への結合とその酸化抑制試験の知見は、将来の動物およびヒト試験に繋がっていくと考えられた。