



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	櫻井, 知子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/94910
Type	doctoral thesis
File Information	Akiko_Sakurai_summary.pdf



学位論文内容の要約

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。NAFLD 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、細胞外フラックス解析により、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、 β 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 α (PPARGC1A) は、脂肪酸の β 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 Monolysocardiolipin (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 の量が小さく、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レベルは減少した。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、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 β 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。