



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	慢性炎症疾患の予防基盤となるカロテノイドおよびアポカロテノイドの細胞機能調節作用に関する研究
Author(s)	高谷, 直己
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14329号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14329
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96755
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Takatani.pdf



慢性炎症疾患の予防基盤となる

カロテノイドおよびアポカロテノイドの細胞機能調節作用に関する研究

(Study on regulatory effects of carotenoids and apocarotenoids on cell
functions for prevention of chronic inflammation-related diseases)

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Life Science

高谷 直己

Naoki Takatani

2021 年

目次

緒言	・・・	1
第1章 フコキサンチンによる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)抑制機構の解明	・・・	9
第1節 食餌誘導性 NASH モデルマウスに対するフコキサンチンの抑制作用の検証	・・・	11
第2節 培養肝細胞およびマクロファージにおける脂質蓄積および炎症誘導に対する フコキサンチン代謝物の抑制作用の評価	・・・	30
第2章 フコキサンチン由来アポカロテノイドによる Nrf2 活性化を介した 抗酸化酵素の発現促進と抗炎症機構解析	・・・	42
第3章 β -カロテン由来アポカロテノイドの調製と抗炎症機構解析	・・・	62
第4章 アスタキサンチン由来アポカロテノイドによる炎症抑制機能と 脂肪細胞分化抑制能の解析	・・・	79
第1節 アスタキサンチン由来アポカロテノイドの調製と抗炎症機能解析	・・・	81
第2節 アスタキサンチン由来アポカロテノイドによる脂肪細胞分化抑制機能	・・・	96
総合考察	・・・	107
Supporting Information	・・・	115
参考文献	・・・	129
謝辞	・・・	138

緒言

がんや糖尿病、循環器疾患に代表される慢性疾患は総称して非感染性疾患(non-communicable diseases, NCD)と定義され、世界の死因の 70%以上を占める¹⁾。今後 10 年間で NCD による死亡者数はさらに増加するとの見方もあり、世界レベルで解決すべき喫緊の問題となっている²⁾。一方、我が国では超高齢化社会を迎え、NCD の予防や診断、治療に対する取り組みの重要性が殊更に大きい現状にある。しかしながら、NCD の病態については依然不明な点が多いことに加え、自覚症状のないまま病態が進行し、症状が顕性化する際には重症化していることも稀ではないため、第一義的に予防が重要である。運動の習慣化や健康的な食事は NCD の予防に効果的とされる³⁾。運動や食事バランスを基本として、日々の食事から摂取される食品因子により NCD の予防に繋げることができれば、その意義は大きい。

近年、肥満や糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)をはじめとした生活習慣病、動脈硬化性疾患、自己免疫疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患、さらにはがんにいたる NCD の共通基盤として「慢性炎症」が注目されている^{4,5)}。感染や創傷部位において比較的短期間に炎症の活性化と収束を生じる急性炎症に対して、慢性炎症では組織において低レベルの炎症反応が長期間持続・遷延化している。慢性炎症状態にある組織では、集積したマクロファージなどの免疫細胞と実質細胞が相互作用して、細胞・組織の損傷や障害が亢進している。その一方で、このような障害に対して、血管新生や細胞の増殖、線維化などのプロセスによる臓器修復応答が起こる。組織障害と修復の機転が同時に続くことにより、線維化などによる組織構築の改変(組織リモデリング)が行われ、最終的には不可逆的な臓器機能障害がもたらされる⁶⁾。このような組織学的変化は動脈硬化疾患や肥満をはじめとした慢性炎症疾患に共通して認められる現象であり、組織実質細胞と免疫細胞などの間質細胞間の相互作用による炎症反応が病態形成に重要である。例えば、肥満状態下にある脂肪組織では、肥大化した脂肪細胞の周囲に血管新生に伴ってマクロファージ

などの免疫細胞の浸潤の亢進が認められるが、炎症性因子である tumor necrosis factor α (TNF α)や飽和脂肪酸、toll-like receptor 4 (TLR4)を介して両者は相互作用する⁷⁾。これにより増悪する炎症反応はやがて脂肪組織の機能不全をもたらし、インスリン抵抗性を惹起する。また、組織へのマクロファージ浸潤にはケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)とその受容体である chemokine C-C motif receptor 2 (CCR2)が中心的な役割を果たすことが知られる。MCP-1 や CCR2 を欠損するマウスでは高脂肪食により誘導される肥満において、組織に浸潤するマクロファージが減少することで炎症が減弱し、脂肪組織の機能不全が改善される⁸⁾。一方、TLR4 が変異したマウスから採取されたマクロファージでは脂肪細胞との共培養により惹起される炎症反応が減弱することが報告されている⁹⁾。さらに、マクロファージはその役割によって炎症性の M1 型と抗炎症性の M2 型に大別できることも明らかとなっている¹⁰⁾。前者は肥満の脂肪組織で増加しており、TLR4 や炎症性サイトカイン TNF α 、interleukin-6 (IL-6)を高発現するのに対して、後者は非肥満の脂肪組織にも存在しており、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生する。肥満症例では M1/M2 比が増加¹¹⁾していることや、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体による抗糖尿病作用の一部に、脂肪組織における M2 型マクロファージ増加による M1/M2 バランス不均衡の是正が関与する可能性が示されている¹²⁾。以上の結果は、実質細胞のみならず間質細胞であるマクロファージにおける炎症を制御することにより、慢性炎症に伴う臓器機能不全を抑制できる可能性を示唆している。

カロテノイドは赤から黄色を呈し、植物や微生物、動物において広く認められる天然の脂溶性色素で、現在 1000 種類以上が知られる¹³⁾。基本構造として 8つのイソプレヌユニットが直鎖上に結合した共役ポリエン鎖と両端のエンドグループから成り、エンドグループに環化、水酸基の導入、不飽和化、配糖体や脂肪酸エステル形成などの修飾が施されることで、多種多様なカロテノイドが生じる。植物や微生物は自らカロテノイドを生合成し、光合成色素や酸化ストレスからの保護物質として利用する。一方、ヒトを含む動物は自身でカロ

テノイドを生合成できないが、食事により摂取されるため生体内にて見出される。カロテノイドはプロビタミン A 活性や抗酸化作用がよく知られる^{14,15)}。さらに近年、免疫制御機能¹⁶⁾や生活習慣病予防効果¹⁷⁾などの生理作用が明らかとなり、慢性炎症に対する抑制作用が期待される。一方、食事由来カロテノイドは吸収されたのち、一部は代謝を受け、血中を介して多くの組織中でカロテノイド代謝物が検出される¹⁸⁾。カロテノイドの生理作用に関する報告は増えているものの、その作用メカニズムとして生体内での代謝と代謝物の活性の観点から捉えた研究は少ない。

アポカロテノイドは酵素的あるいは非酵素的反応により炭素鎖が短縮したカロテノイドと定義される¹⁹⁾。哺乳類におけるカロテノイドからアポカロテノイドへの開裂反応を触媒する主要な酵素として、細胞質に局在する β -carotene 15,15'-oxygenase (BCO1) と、ミトコンドリア内膜に局在する β -carotene 9',10'-oxygenase (BCO2) が知られる^{20,21)}。BCO1 は、 β -カロテン中央部の二重結合(C-15,15'位)での酸化的開裂によるレチノイド(ビタミン A)への変換反応を触媒する。BCO1 は β -カロテン以外に、 β -クリプトキサンチンや α -カロテンなどのプロビタミン A カロテノイドのみならず、 β -apo-10'-carotenal などの β -カロテン由来アポカロテノイドを基質として retinal に変換する。しかしながら、分子中に酸素原子を含むルテインやゼアキサンチンなどのキサントフィル類には作用しない。一方、BCO2 は、C-9',10'位における開裂反応を触媒して非対称アポカロテノイドを生成する酵素であり、その広い基質認識性でキサントフィル類に対しても作用する。ノックアウトマウスを用いた解析から、それぞれの酵素の主要な生理的機能として、BCO1 はレチノイドの生成に極めて重要な役割を持つ²²⁾一方、BCO2 はレチノイド生合成のための代替経路としての働き²³⁾や、カロテノイドの過剰蓄積を防ぎ、酸化ストレス傷害から防御するために働く²⁴⁾ことが推定されている。しかしながら、レチノイドを除くアポカロテノイドの動物体内における生物活性に関する知見が少ないこともあり、BCO2 の生理的役割については未だ明確な結論が出ていない。一方、アポカロテノイドは非酵素的にも容易に生じる。 β -カロテンの自動酸化²⁵⁾や熱分解²⁶⁾

により、様々な鎖長の β -アポカロテノイドが生成する。リコペンの自動酸化では、9種類ものリコペン由来アポカロテノイドが生じることが報告されている²⁷⁾。キサントフィル類のアスタキサンチンにおいても、自動酸化で種々のアポカロテノイドが生成する²⁸⁾。また、 β -カロテン²⁹⁾、リコペン³⁰⁾、アスタキサンチン³¹⁾、ルテイン³²⁾を酸化剤処理することで種々のアポカロテノイドが生じること分かっている。さらに、アポカロテノイドは植物³³⁾や微細藻類³⁴⁾、カロテノイド含有食品中³⁵⁾からも広く検出され、機能性が明らかにされているものもある。以上のように、カロテノイドからアポカロテノイドへの代謝開裂反応が生体恒常性維持において不可欠である可能性や、自然界において多様なアポカロテノイドが広く存在することは、アポカロテノイドが生体に対して何らかの役割を担っている可能性を予想させる。しかしながら、 β -カロテンやリコペンに由来するアポカロテノイドの一部については核内受容体へのリガンド活性³⁶⁾やがん細胞増殖抑制作用³⁷⁾が知られているものの、キサントフィル類由来のアポカロテノイドの生物活性に関する報告はほとんど見られない。

フコキサンチンは、ワカメやコンブなどの大型褐藻や珪藻類に含まれる橙色を呈する海洋性カロテノイドで、その分子内にアレン結合、エポキシド、共役カルボニル基を有しており、陸上植物には見られないユニークな構造をもつ(**Figure 1**)。フコキサンチンの生理作用として、がん細胞へのアポトーシス誘導作用³⁸⁾をはじめ、酸化ストレス軽減作用³⁹⁾や血糖値改善作用⁴⁰⁾が報告されている。当研究室ではこれまでに、糖尿病/肥満モデル $KK-A^y$ マウスにフコキサンチンを 4 週間与えたところ、体重増加や内臓脂肪蓄積の抑制を認めるとともに、この作用機序の一つとして、脂肪組織において、脱共役タンパク質を含むミトコンドリア因子の発現誘導を伴う脂肪酸消費の亢進が関わることを明らかにした⁴¹⁾。また、先述のように、肥満状態では脂肪組織における炎症の亢進および免疫細胞の浸潤増加の所見が認められるが、フコキサンチンを摂取した $KK-A^y$ マウスの白色脂肪組織(white adipose tissue, WAT)では、炎症関連因子の発現上昇および細胞浸潤が抑制された⁴²⁾。さらに最近、潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して、フコキサンチンは炎症性メディエーターであるプロスタグ

ランジン合成酵素 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Ptgs2) の発現抑制を介して保護作用を示すことが報告された⁴³⁾。これらの知見は、フコキサンチンが慢性疾患の基盤にある「炎症」に対して制御機能を有することを示唆している。

摂取されたフコキサンチンは腸管にてフコキサンチノールへの加水分解を経て吸収された後、肝臓において一部がアマロウシアキサンチン A に変換されることが知られる⁴⁴⁾。ごく最近の研究において、筆者らはフコキサンチン摂取した KK-*AY* マウスや C57BL/6J マウスの生体組織中からアポカロテノイドであるパラセントロンをはじめて見出す(**Figure 1**)とともに、マクロファージに対して過剰な炎症を制御することを明らかにした⁴⁵⁾。一方、フコキサンチンを含む褐藻抽出物のヒトへの単回投与試験では、血中にフコキサンチノールが検出されるとともに、その濃度は投与 4 時間で最大値を示して 24 時間以内に速やかに減少した^{46,47)}。ヒトにおけるフコキサンチン由来アポカロテノイドについての報告は未だないものの、このようなフコキサンチノール濃度の時間経過に伴う減衰は、開裂反応を含むさらなる代謝が起こっている可能性を予想させる。さらに最近、ゼアキサンチンやルテイン、カプソルビンなどのキサントフィル類由来のアポカロテノイドがヒト血中⁴⁸⁾のみならずヒト母乳中⁴⁹⁾にも含まれることが判明した。以上より、フコキサンチンを含む食事由来カロテノイドが、ヒトなど動物体内でアポカロテノイドへと代謝されて多様な組織分布を示すことが推測されるとともに、カロテノイドの生理作用の本体として、アポカロテノイドが少なからず関与する可能性を示唆している。したがって、アポカロテノイドの代謝や生物活性に関する知見の集積は、フコキサンチンをはじめとしたカロテノイドによる生理作用における真のメカニズムの理解に繋がるものとして期待される。

そこで本研究では、慢性炎症疾患モデルマウスに対するカロテノイドの発症予防効果を調べるとともに、種々のアポカロテノイドによるマクロファージや実質細胞に対する炎症制御機能をはじめとする生物活性の探索と機序解明を試みた。まず第 1 章において、肝臓における慢性炎症疾患である NASH に着目した⁵⁰⁾。NASH は世界的に増加の一途をたどる慢

性肝疾患であり、不可逆的な病態進行により肝硬変や肝がんに至るため、前段階である脂肪肝をはじめ NASH の抑制が臨床的に重要である。本章では、食餌誘導性 NASH モデルマウスを用いてフコキサンチンによる肝臓における脂肪化や炎症への影響を *in vivo* で検証した。さらに、その作用機序の一端解明のため、組織におけるフコキサンチン代謝物に着目した。フコキサンチン摂取したマウスの肝臓を含む生体組織中のフコキサンチン代謝物の分布を調べるとともに、NASH の発症・進展に重要な肝臓細胞やマクロファージにおける炎症に対するフコキサンチン代謝物の抑制作用を評価した。次いで、第 2 章では、フコキサンチン由来アポカロテノイドにおいて、炎症制御機能に加えて、新たな生物活性として、環境ストレスなどから生体防御を担う抗酸化酵素とその発現制御因子に着目した。アポフコキサンチノイドによる抗酸化酵素発現誘導作用を調べるとともに、その上流に位置する制御因子に対する活性化機能を *in vitro* で評価した。さらに、マクロファージにおける炎症抑制作用と抗酸化酵素発現制御機能との関連を調べた。第 3 章では、自然界で最も豊富なカロテノイドの一つである β -カロテンに着目した。アポカロテノイドのうち比較的多く調べられているのが β -カロテン由来アポカロテノイドであり、自然界においても広くその存在が見られる。本実験では、酸化剤による β -カロテン酸化生成物中に特徴的な構造をもつアポカロテノイドの新規同定を行うとともに、他の β -カロテン由来アポカロテノイドとともにマクロファージに対する炎症抑制活性の比較試験を行い、抗炎症作用に効果的な分子構造を推察した⁵¹⁾。最後に、第 4 章では、食品や化粧品で用途が拡大しているアスタキサンチンに着目した。アスタキサンチンの健康機能性に関する研究は比較的進んでいるものの、アスタキサンチン由来アポカロテノイドの分布やその生物活性についてほとんど調べられていない。そこで、代謝研究にも有用と思われるアポカロテノイドの調製と同定を行った。得られた種々のアスタキサンチン由来アポカロテノイドを用いて、マクロファージおよび脂肪細胞に対する炎症制御機能を調べるとともに、肥満に関わる脂肪細胞分化に対する抑制作用について検証を行った。

以上、本論文では水産物に特徴的なフコキサンチンやアスタキサンチンに加え、代表的なカロテノイドである β -カロテン由来のアポカロテノイドが示す炎症制御機能をはじめとする生物活性を明らかにすることにより、カロテノイドの健康機能性について、新たな視点からの研究の展開を図ることを目的とする。

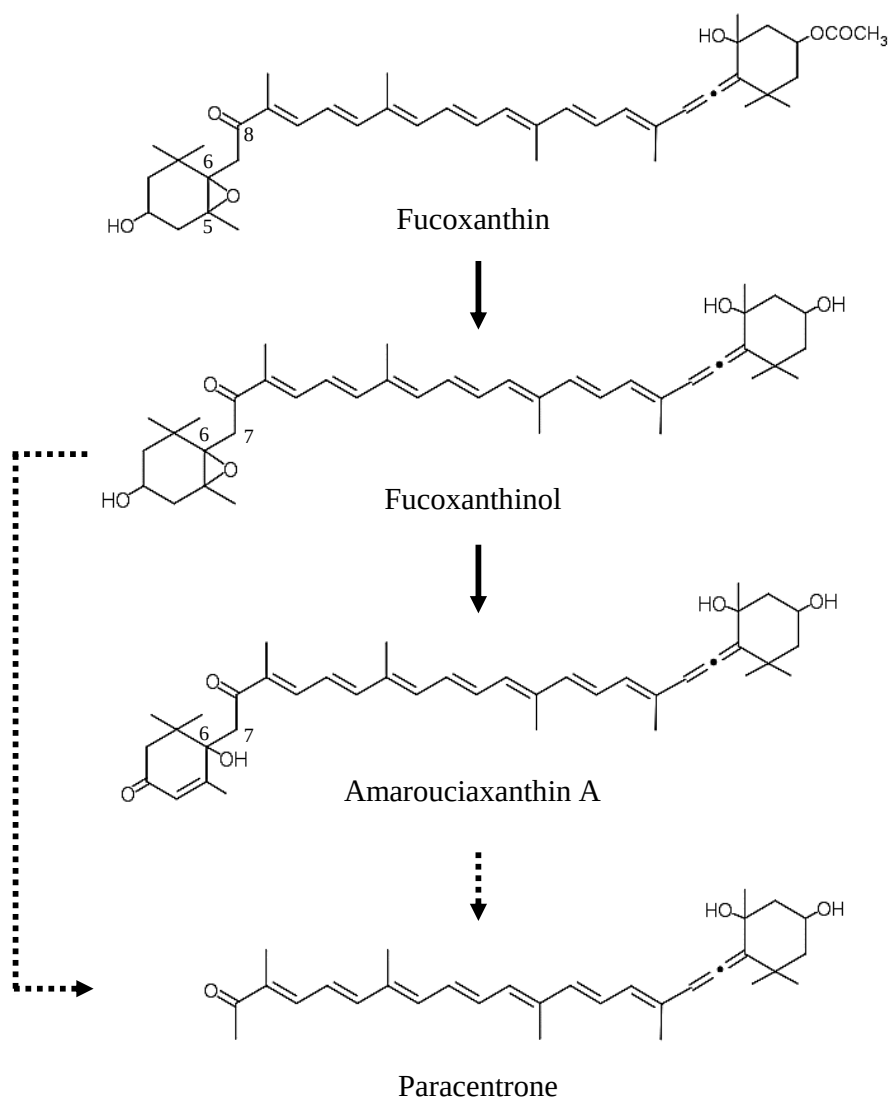


Figure 1 Fucoxanthin is converted to some metabolites in mouse body.

Dietary fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol in gastrointestinal tract. Subsequently, fucoxanthinol is oxidized to amarouciaxanthin A by unidentified dehydrogenase in liver. Paracentrone is presumably generated by retro-aldol cleavage at C-6, 7 position of fucoxanthinol or amarouciaxanthin A (dotted line).

第 1 章

フコキサンチンによる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)抑制機構の解明

序論

非アルコール性脂肪肝疾患(non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD)とは、飲酒量がエタノール換算で一日 20 g 以下で脂肪肝を呈する疾患概念である⁵²⁾。NAFLD の多くは、肥満や糖尿病、高血圧などを基盤に発症することから、メタボリックシンドロームの肝病変として捉えられている。近年、NAFLD は世界的に増加の一途にあり、その有病率はヨーロッパ 23.71%、北米 24.13%、南米 30.45%、中東 31.79%、アジア 27.37%、アフリカ 13.48%との報告がある⁵³⁾。NAFLD は非アルコール性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)と、炎症や線維化を生じる NASH に分類される。NAFL と NASH ではその予後は大きく異なり、進行性の NASH はより重篤な肝疾患である肝硬変や肝がんの発症母地となる。そのため、NASH の発症や進展阻止が重要であるが、その成因は未だ明確でなく薬物療法が確立されていない。一方で、NASH に対して運動習慣や食生活改善の有効性が指摘されており⁵⁴⁾、日々の食事から摂取される食品因子によって NASH の予防や抑制ができれば、その意義は大きい。

Day and James⁵⁵⁾が提唱する two-hit theory によると、過栄養や肥満、糖尿病といった背景因子が first hit として肝細胞への脂肪沈着(脂肪肝)を引き起こし、NAFL を惹起する。次いで、過剰な酸化ストレスや炎症性サイトカイン等の second hit が引き金となって NASH が発症するとされる(**Figure 1.1**)。先述のように、フコキサンチンは WAT や腸での炎症性因子の過剰発現を阻害することにより、組織における慢性炎症を緩和する。また、肝臓における脂質代謝改善作用⁵⁶⁾や酸化ストレス軽減作用³⁹⁾も報告されていることから、フコキサンチンは NASH に対して抑制的に作用することが期待される。しかしながら、これまでフコキサンチンの NASH に対する効果は明らかでなかった。そこで、第 1 節では、食餌誘導性 NASH モデルマウスにフコキサンチンを投与し、肝臓における脂質蓄積や酸化ストレス、炎症と

もに線維化の進行に対する抑制作用を評価した⁵⁰⁾。一方、筆者らは、摂取されたフコキサンチンは生体内において、アセチル基が加水分解されたフコキサンチノールや C-3 位のヒドロキシ基が酸化されたアマロウシアキサンチン A に加えて、開裂物であるパラセントロンへと代謝されることを見出している(**Figure 1**)^{44,45)}。そこで、第 2 節では、NASH 誘導マウスにおける生体組織中のフコキサンチン代謝物の分布を調べるとともに、第 1 節で見られた NASH 抑制作用メカニズムの一端解明のために、脂質蓄積や炎症誘導した培養肝細胞およびマクロファージに対するフコキサンチン代謝物の抑制作用を検証した。

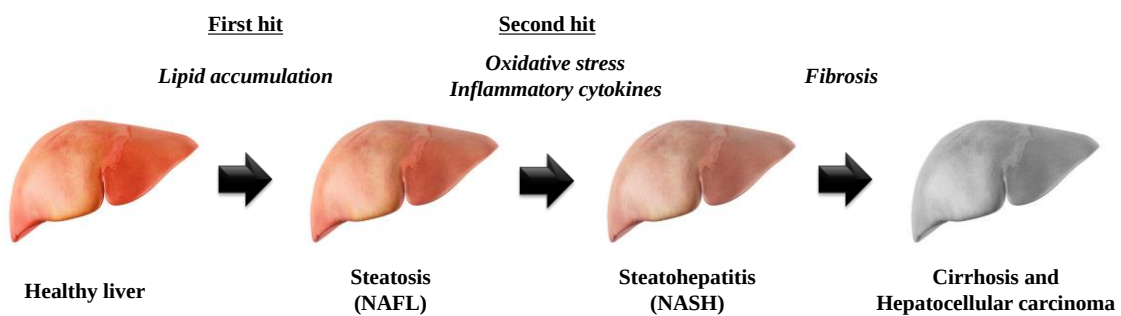


Figure 1.1 Two-hit theory in progression to non-alcoholic steatohepatitis

第 1 節

食餌誘導性 NASH モデルマウスに対するフコキサンチンの抑制作用の検証

実験方法

1.1.1 試料と試薬

フコキサンチンの精製に用いたワカメ油は株式会社サウスプロダクトから購入した。動物実験飼料として用いた、コリン充足メチオニン充足普通食(A06071314)およびコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食(A06071302)は Research Diet, Inc.より購入した。実験動物として使用した C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入した。RNAlater、bovine serum albumin (BSA)、protease inhibitor cocktail、sample buffer Laemmli 2× concentrate は Sigma-Aldrich Japan より、diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP)は同仁化学研究所より購入した。アクリルアミド(モノマー、純度 99.9%)、Bis (*N, N*-methylene-bis acrylamide)、過硫酸アンモニウム(ammonium persulfate, APS)、TEMED (*N, N, N', N'*-tetramethyl ethylenediamine)は Bio-Rad Laboratories, Inc. より入手した。Anti-smooth muscle actin (α SMA) 抗体 (14395-1-AP) は Proteintech Group Inc.より、anti-GAPDH 抗体(ab8245)と二次抗体として用いた goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (ab97051)および goat anti-mouse IgG H&L (HRP) (ab97023)は abcam plc より購入した。ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 AE-6530M 型、水平積層セミドライ式ブロッキング装置ホライズブロット AE-6677P 型、ブロッキング用 PVDF 膜(クリアブロット P 膜)、ブロッキングペーパー(アブローベントペーパー、0.9 mm 厚)はアトー株式会社より購入したものを用いた。その他実験に用いた有機溶媒をはじめとする種々の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

1.1.2 フコキサンチンの調製

ワカメ油を、ヘキサン/アセトン(60:40, v/v)を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマト

グラフィーに供し、橙赤色を示すフコキサンチン画分を分取した。溶出溶媒を留去後、クロロホルム/メタノール/水(10:5:3, v/v/v)にて液相分離を行い、クロロホルム層(下層)を回収した。フコキサンチン純度が *all-trans* 体と *cis* 体合わせて 97%以上(*all-trans*: 85.1%, *cis*: 12.3%)になるまで、カラムクロマトグラフィーによる精製操作を繰り返した。純度の確認は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により以下に示す条件で行った。

ポンプ：LC-20AD (株式会社島津製作所)

検出器：SPD-M20A (株式会社島津製作所)

カラム：Develosil ODS-UG-5 (250 × 4.6 mm、野村化学株式会社)

温度：30°C

移動相：メタノール/アセトニトリル(70:30, v/v)

流量：1.0 mL/min

1.1.3 動物飼育

5 週齢雄性 C57BL/6J マウスを 23°C±1°C、湿度 50%、12 時間の明暗周期の環境下で、予備飼育 1 週間、実験飼育 4 週間の計 5 週間飼育を行った。予備飼育期間は普通食(A06071314)と水道水を自由に摂取できるようにし、予備飼育終了後に全群の平均体重が同等となるよう、3 群(n=7/群)に群分けを行った。実験飼育期間中は、①Control 群(A06071314 を給餌)、②NASH 群(A06071302 を給餌)、③Fx+NASH 群(0.2%フコキサンチン含有 A06071302 を給餌)の各群について、それぞれ自由摂餌および自由飲水できるようにし、2 日毎に新しい餌および水道水に交換した。各群の飼料組成は **Table 1.1.1** に示した。実験飼育終了後、イソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。安楽死後、直ちに臓器を摘出し、重量測定後に-80°Cで保存した。肝臓組織観察に用いた肝臓の一部は、10%中性緩衝ホルマリソ液(pH7.4)に浸漬し室温で保存した。mRNA 発現解析に用いた臓器の一部は、RNAlater に

浸漬して-30°Cで保存した。

1.1.4 血清中肝臓障害マーカー分析および肝臓組織学検査

血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ(alanine aminotransferase, ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspartate aminotransferase, AST)値の分析は公益社団法人函館市医師会 函館市医師会健診検査センターに依頼した。また、肝臓切片の作製とヘマトキシリン/エオシン(Hematoxylin/Eosin, H/E)染色は、株式会社バイオ病理研究所に依頼した。

1.1.5 肝臓脂質の分析

総脂質の抽出

Folch 法⁵⁷⁾を基本とした方法で抽出した。すなわち、肝臓約 150 mg を精秤し、10 mL のクロロホルム/メタノール混合液(2:1, v/v)中で 1 分間ホモジェナイズを行った後、吸引濾過した。ろ液をロータリーエバポレーターで乾固後、再度クロロホルム/メタノール混合液(2:1, v/v) 2 mL に溶解して試験管に移し、蒸留水 400 μ L を加えて、3,000 rpm, 15 分間遠心分離を行った。分離した下層(クロロホルム層)を、予め恒量した試験管に移し、窒素気流下で乾固後に重量を測定し、肝臓総脂質とした。

トリグリセライドおよびコレステロール量の測定

トリグリセライドおよびコレステロールの定量には、それぞれトリグリセライド E-テストワコーおよびコレステロール E-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。肝臓総脂質約 3 mg を試験管に精秤し、Triton X-100/メタノール混合液(1:1, v/v) 60 μ L を加えてよく懸濁し、窒素気流下でメタノールを留去した。乾固物に蒸留水 1.2 mL を加え、よく懸濁した後、50 μ L を新しい試験管に移し、次いで蒸留水 50 μ L、キット付属の発色試薬 750 μ L をこの順に加えて、37°C水浴上で 5 分間インキュベートした。反応後溶液 200 μ L を 96-

well マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp.)にて主波長 600 nm および副波長 700 nm における吸光度を測定した。各種濃度に調整した標準試料を用いて作成した検量線から、肝臓中のトリグリセライドおよびコレステロール量を算出した。

脂質ヒドロペルオキシドの測定

Iwasaki ら³⁹⁾の既報に従い行った。すなわち、肝臓総脂質約 1 mg をねじ付き試験管に秤量し、ブチル化ヒドロキシトルエン(butylated hydroxytoluene, BHT)を 10 mg/mL の濃度で含むクロロホルム 100 μ L を加えて溶解した。次いで、DPPP を 0.1 mg/mL の濃度で含むクロロホルム 50 μ L を加えて、ブロックヒーターにて遮光下 60°C で 60 分間反応させた。反応後、直ちに氷上に移して、2-プロパノール 6 mL を加えてよく攪拌した。この反応液を以下の HPLC 条件で分析した。

ポンプ：L-2130 (株式会社日立製作所)

検出器：FL Detector L-2485 (株式会社日立製作所)

カラム：Develosil ODS-UG-5 (250 $\times$ 4.6 mm、野村化学株式会社)

温 度：40°C

移動相：1-ブタノール/メタノール(10:90, v/v)

波 長：励起 352 nm、蛍光 380 nm

流 量：1.0 mL/min

チオバルビツール酸反応性物質(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)の測定

Kikugawa ら⁵⁸⁾の既報に従い行った。すなわち、肝臓約 50 mg を秤取し、30%(w/v)となるよう 1.15%(w/v) 塩化カリウム水溶液を加えてホモジェナイズした。ねじ付き試験管に、ホ

モジエネート 0.1 mL、8.1%(w/v) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液 0.2 mL、酢酸緩衝液 (pH3.5) 1.5 mL、0.8%(w/v) BHT 含有酢酸溶液 50 μ L、0.8%(w/v) TBA 水溶液 1.5 mL、5 mM 塩化鉄(III)水溶液 0.7 mL をこの順に加えて、密栓し 4°C で 60 分間静置後、沸騰水浴上で 60 分間加熱した。冷却後、塩化鉄(III)水溶液 1 mL、ブタノール/ピリジン混合液(30:2, v/v) 5 mL を加えて振とうした。3,000 rpm 10 分間遠心分離を行い、遠心上清をキュベットに移して、532 nm における吸光値を測定した。TBARS 値は下記の式より算出した。

試料重量 1 g から生成する赤色色素(TBARS)量 [μ mol]

$$=(A-A_0)/156000 \times (5.8/10^3) \times (10^2/3) \times 10^6$$

A₀: ブランクの吸光度、A: 検液の吸光度、*: 赤色色素の分子吸光係数

1.1.6 定量 polymerase chain reaction (PCR)法による肝臓組織 mRNA 発現量の測定

肝臓組織からの total RNA 抽出

肝臓約 20 mg をチューブに移し、ジルコニアビーズ 2 粒と QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) 500 μ L を加えて、Micro Smash(株式会社トミー精工)にて 3,000 rpm, 10 秒間破碎を行った。クロロホルムを 100 μ L 加え、遠心分離(12,000 $\times$ g, 10 分, 4°C)を行った。水層(上層) 200 μ L を新しいエッペンチューブに移し、2-プロパノール 200 μ L を加えて 10 分静置後に遠心分離 (12,000 $\times$ g, 10 分, 4°C)を行った。沈殿した粗 RNA 画分に 75%(v/v) エタノールを 1 mL 加えて再度遠心分離(7,500 g, 5 分, 4°C)後、得られた沈殿を RNase free water(ニッポンジーン株式会社) 1 mL に溶解し total RNA を得た。

逆転写反応による cDNA の合成

Total RNA から cDNA の合成は High-Capacity cDNA Archive kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて、使用説明書に従い反応液を調製し、25°C, 10 分間に次いで 37°C, 120 分間の逆転写反応を行った。以下に、反応液組成を示した。

Components	Volume (μL) / Reaction
10 × Reverse Transcription Buffer	2.5
25 × dNTPs	1.0
10 × random primers	2.5
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL	1.25
Nuclease-free H ₂ O	5.25
Total RNA solution	12.5
Total per Reaction	25

mRNA 発現量の測定

リアルタイム定量 PCR 装置 StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Inc.)にて、GeneAce Probe qPCR Mix II (ニッポンジーン株式会社)を用いて添付の使用説明書に従い行った。PCR 反応は、酵素活性化のため 95°C, 10 分間反応の後、変性ステップとして 95°C, 30 秒間、次いで伸長ステップとして 60°C, 1 分間の反応を 40 サイクル行った。mRNA 発現は、検量線法による相対定量を行った。データ解析には、内在性コントロールとして *Rps18* を用い発現量を補正した。使用した Taqman Gene expression assay (Thermo Fisher Scientific, Inc.)は以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Tumor necrosis factor	<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
Chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
Adhesion G protein-coupled receptor E1 [F4/80]	<i>Adgre1</i>	Mm00802529_m1
Integrin alpha X [Cd11c]	<i>Itgax</i>	Mm00498698_m1
Chemokine (C-C motif) receptor 2	<i>Ccr2</i>	Mm00438270_m1
Lymphocyte antigen 6 complex, locus C2 [Ly-6C]	<i>Ly6c2</i>	Mm03009946_m1
Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1</i>	Mm01178820_m1
Collagen, type I, alpha 1	<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	<i>Timpl</i>	Mm01341361_m1
Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [αSMA]	<i>Acta2</i>	Mm01546133_m1
Ribosomal protein S18	<i>Rps18</i>	Mm02601777_g1

1.1.7 ウェスタンブロッティングによる肝臓組織タンパク質発現解析

肝臓組織からのタンパク質抽出

肝臓約 3 mg をエッペンチューブに秤取し、溶解バッファー(50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1%(v/v) Triton X-100、0.5%(w/v) デオキシコール酸ナトリウム、0.1%(w/v) SDS、1 mM EDTA、10 mM フッ化ナトリウム、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)、1%(v/v) protease inhibitor cocktail、pH8.0) 300 μ L 中で肝臓をホモジェナイズ後、氷上で 20 分間静置した。遠心分離(12,000 $\times$ g, 20 分, 4 $^{\circ}$ C)後、上清を新しいエッペンチューブに移し、抽出タンパク質を得た。

タンパク質の濃度測定

プロテインアッセイ BCA キット(富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて、添付の使用説明書に従って行った。すなわち、96-well マイクロプレートに試験液 20 μ L を移した後、試薬 A (BCA 溶液)/試薬 B (硫酸銅(II)溶液)混合液(50:1, v/v) 200 μ L を加え、37 $^{\circ}$ Cにて 30 分間インキュベートした。次いで、マイクロプレートリーダーにて 562 nm における吸光度を測定した。種々の濃度に調整した BSA を用いて作成した検量線から、タンパク質濃度を算出した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli の方法⁵⁹⁾を一部改変して行った。前項で得たタンパク質抽出液 30 μ L に、sample buffer, Laemmli 2 $\times$ concentrate 30 μ L を加えて攪拌し、95 $^{\circ}$ Cで 5 分間加熱することにより変性処理を行った。次いで、10%ポリアクリルアミドゲル(10%(w/v) アクリルアミド/Bis、375 mM Tris-HCl、0.1%(w/v) SDS、0.15%(w/v) APS、0.1%(v/v) TEMED、pH8.8)にタンパク質量が 50 μ g になるよう負荷し、Laemmli 泳動バッファー(25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1%(w/v)

SDS)中で 20 mA/ゲルの定電流で 100 分間電気泳動を行った。分子量マーカーとして、Precision Plus Protein Standards Dual Color(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を 5 μ L 負荷した。

ブロッティング

セミドライ式ウェスタンブロッティングは Kyhese-Andersen の方法⁶⁰⁾を一部改変して行った。PVDF メンブレンは予め親水化処理(メタノール中に 1 分間浸漬)し、blotting buffer B (25 mM Tris、20%(v/v) メタノール)に浸漬したものをを用いた。陽極電極板上に、blotting buffer A (0.3 M Tris、20%(v/v) メタノール)に浸しておいたブロッティングペーパー2 枚、blotting buffer B に浸しておいたブロッティングペーパー1 枚、親水化処理済 PVDF メンブレン 1 枚、電気泳動後ゲル 1 枚、blotting buffer C (25 mM Tris、40 mM 6-アミノカプロン酸、20%(v/v) メタノール)に浸しておいたブロッティングペーパー3 枚をこの順に重ね陰極電極板を密着させた。ゲルサイズに対して 0.56 mA/cm² の定電流で 40 分間ブロッティングを行った。

タンパク質の検出

Tween 含有 TBS バッファー(TBST; 0.1%(v/v) polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween-20 相当品)、20 mM Tris-HCl、137 mM NaCl、pH7.6)に 2%(w/v)になるよう BSA を溶解したブロッキングバッファーにてメンブレンを 1 時間振とう後、TBST にて 30 分間振とうして洗浄を行った。次いで、一次抗体を溶解したブロッキングバッファーにてメンブレンを 2 時間室温で振とうした(希釈率; α SMA, 1:10,000、GAPDH, 1:20,000)。TBST を用いて 10 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体を溶解したブロッキングバッファーにてメンブレンを 1 時間室温にて振とうした(希釈率; 1:20,000)。TBST で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.)の使用説明書に従い、タンパク質を化学発光検出した。すなわち、メンブレン上に luminol/enhancer solution/ peroxide solution 混合液(1:1, v/v) 2 mL を滴下し、遮光下で 5 分間インキュベート後、ATTO Cooled CCD Camera System

(アトー株式会社)を用いて撮影を行い、ATTO Densitograph Software Library CS Analyzer 3.0 (アトー株式会社)にて発光強度を数値化した。

1.1.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による血清中 MCP-1 濃度の測定

血清中の MCP-1 濃度は、Mouse CCL2/MCP-1 Uncoated ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて、添付の使用説明書に従い測定した。すなわち、付属の coating buffer に溶解した capture antibody を一晚接着させた 96-well マイクロプレートに、血清 50 μ L を加え、室温で 2 時間インキュベートした。次いで、wash buffer (0.05%(v/v) Tween-20 含有 PBS) 250 μ L にて 5 回洗浄を行い、ビオチン標識された detection antibody 100 μ L を加えて 1 時間室温でインキュベートした。再度、wash buffer 250 μ L にて 5 回洗浄を行い、HRP 標識アビジン溶液 100 μ L を加えた。室温で 30 分間インキュベート後、wash buffer 250 μ L にて 7 回洗浄を行った。次いで、基質溶液(Tetramethylbenzidine, TMB) 100 μ L を加えて 15 分インキュベート後、2N 硫酸 50 μ L にて反応を終了させた。マイクロプレートリーダーにて主波長 450 nm および副波長 570 nm における吸光度を測定した。キット付属の標準試料を段階希釈して作成した検量線から、タンパク質濃度を算出した。

1.1.9 統計

データは平均 $\pm$ 標準誤差(standard error of the mean, SEM)で示した。統計計算は一元配置分散分析を行った後、*Dunnett* の多重比較法を用いた。有意水準は 5%および 1%とした。

1.1.10 動物倫理

本動物実験は、北海道大学実験動物委員会の承認を受け行った(承認番号 19-0082)。

結果および考察

食餌誘導性 NASH モデルマウスにおける肝臓重量増加、肝臓脂質蓄積および肝臓障害に対するフコキサンチンの抑制作用

NASH の特徴の一つである肝臓への過剰な脂肪蓄積に起因する脂肪毒性は、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の産生を促進し、酸化ストレスや小胞体ストレスを増大させて肝臓細胞死を伴う肝障害を誘起する⁶¹⁾。4 週間の実験飼育終了後、Control 群と比較して、NASH 群において顕著な肝臓重量の増加と肝臓への脂質蓄積が認められた (Table 1.1.2、Figure 1.1.1)。さらに NASH 群において、血中の肝臓障害マーカーである AST および ALT 値が著増していた (Table 1.1.2) ことから、肝脂肪化ならびに肝臓障害が誘導されていることが確認された。NASH 群とフコキサンチン摂取群 (Fx+NASH) では摂餌量や最終体重に差が見られなかった一方で、フコキサンチン摂取群では、肝臓重量の増加抑制のみならず肝臓中の脂質 (総脂質、トリグリセライド、総コレステロール) レベルの上昇がいずれも有意に抑制された (Table 1.1.2、Figure 1.1.1 (A))。これは、肝臓組織切片の H/E 染色において、NASH 群で顕著な脂肪滴の蓄積 (円形の空洞部) が認められるのに対して、フコキサンチン摂取群で脂肪滴の蓄積が明らかに低下したことから確認できる (Figure 1.1.1 (B))。さらに、血中 AST および ALT 値の上昇も大きく抑制された (Table 1.1.2) ことから、フコキサンチンが肝臓への脂質蓄積の抑制ならびに肝臓障害を軽減したことが推察された。フコキサンチンの肝臓脂質代謝に与える影響として、糖尿病/肥満モデルマウス KK-*A^y* における肝臓脂質レベルの低下³⁹⁾や、食餌誘導性肥満マウスにおいて β 酸化の亢進を介した脂質蓄積の抑制が報告されている⁶²⁾。さらに、フコキサンチンは脂質異化に関わる peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の mRNA 発現レベルを上昇させ、高脂肪食による肝臓中トリグリセライドおよびコレステロールの増加を抑制した⁶³⁾。以上のことから、フコキサンチンは、脂質代謝を制御することで肝脂肪化に対して抑制的に働き、肝臓障害を防ぐ可能性が考えられる。

食餌誘導性 NASH モデルマウスにおける肝臓酸化ストレスに対するフコキサンチンの軽減作用

酸化ストレスは ROS の産生と除去のバランスの破綻によりもたらされ、過剰な酸化ストレスは脂肪肝から NASH への進展に関与する。NAFLD/NASH 肝における酸化ストレスを評価する際に汎用される脂質過酸化マーカーである TBARS 値と脂質ヒドロペルオキシド値を測定したところ、NASH 群においてこれらの値が増加したが、フコキサンチン摂取群では有意に低値を示した(**Figure 1.1.2**)。Iwasaki ら³⁹⁾は、フコキサンチン摂取により、KK-*A^y* マウスの肝臓および WAT における脂質ヒドロペルオキシドレベルが低下することを報告した。さらに、フコキサンチンはアルコール性肝障害マウスや高脂肪食給餌マウスに対し、抗酸化関連因子 nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 (Nrf2)の活性化を介して抗酸化酵素発現を促進することで肝臓保護効果を示した⁶⁴⁾。以上より、フコキサンチンは肝臓中の酸化ストレスを軽減することで NASH への進展を防ぐことが示唆される。

食餌誘導性 NASH モデルマウスにおける肝臓組織炎症および肝臓組織への免疫細胞浸潤に対するフコキサンチンの抑制作用

NASH への進行過程において、肝臓細胞から過剰産生された TNF α や IL-6、IL-1 β 、MCP-1 等の炎症性サイトカインは肝常在マクロファージを刺激し、さらなるサイトカイン産生が促進される。その結果、免疫細胞の肝臓組織への遊走および浸潤が増加し、組織における炎症反応が増悪する⁶⁵⁾。Chiba ら⁶⁶⁾は、本実験と同様の食餌誘導性 NASH モデルマウスにおいて、肝臓中の TNF α 、IL-1 β 、MCP-1 等の炎症性因子や CD11c、F4/80 等の浸潤マーカーの mRNA 発現レベルが上昇すること、肝臓における F4/80 陽性細胞数が増加することを報告した。そこで、肝臓中のこれら因子の発現について比較を行ったところ、NASH 群において

認められた炎症性因子の mRNA 発現上昇は、フコキサンチン摂取によりいずれも抑制された(**Figure 1.1.3 (A)**)。一方、浸潤マーカーについて、マクロファージのマーカー遺伝子である *Adgre1* の mRNA 発現は NASH 群とフコキサンチン摂取群の間で差は見られなかったものの、樹状細胞(*Itgax*)や単球(*Ly6c2*)のマーカー遺伝子ならびに遊走・浸潤に密接に関わる MCP-1 受容体遺伝子(*Ccr2*)の mRNA 発現上昇はフコキサンチン摂取により有意に抑制された(**Figure 1.1.3 (B)**)。このことは、フコキサンチンが樹状細胞や単球の浸潤を抑制する可能性を示している。また、血中の MCP-1 濃度は、フコキサンチン摂取群において有意な低値を示した(**Figure 1.1.3 (C)**)。以上より、フコキサンチンは肝臓組織中の炎症性因子の発現を抑制するとともに、MCP-1 産生を減弱させて肝臓組織への免疫細胞の浸潤を抑制することで炎症の増悪を防ぐことが示唆された。

食餌誘導性 NASH モデルマウスにおける肝臓中線維化関連因子の遺伝子発現および肝星細胞活性化に対するフコキサンチンの抑制作用

NASH 肝では、慢性的な炎症と酸化ストレス負荷により線維化が惹起される。肝星細胞(Hepatic stellate cells, HSCs)は線維化の進行に重要な役割を果たすことが知られており、肝実質細胞から産生される線維化関連因子 transforming growth factor β (TGF β)は HSCs を強く活性化する⁶⁷⁾。活性化 HSCs は筋原線維細胞へと形質転換し、コラーゲン等の細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)の産生を促進する⁶⁸⁾。加えて、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)等のマトリックス分解阻害因子の産生増加も伴い、ECM 産生促進と分解抑制が生じる結果、肝臓組織の線維化が進行する⁶⁹⁾。Control 群と比較して、NASH 群において、線維化関連因子であるサイトカイン *Tgfb1*、ECM タンパク質の 1 種である *Colla1*、ECM 分解を阻害する *Timp1* の mRNA 発現が大きく増加(**Figure 1.1.4 (A)**)するとともに、活性化 HSCs マーカーである α SMA の発現が著増した(**Figure 1.1.4(B)**)ことから、NASH 群で線維化が生じていることが強く示唆された。対照的に、フコキサンチン摂取群では、これら線維化関連因

子の発現が大きく下方制御(**Figure 1.1.4**)されており、フコキサンチンが線維化の進展を抑制したことが推察される。最近、Kim ら⁷⁰⁾は、フコキサンチンがヒトおよびマウス由来の HSCs に対して TGF β による活性化を阻害することを示した。したがって、フコキサンチンは TGF β 等の HSCs の活性化誘導因子の発現を抑制するのみならず、HSCs にも直接的に作用して活性化を防ぐことで線維化を抑制する可能性が考えられる。

以上より、フコキサンチンは食餌誘導性 NASH モデルマウスに対して、肝脂肪化、酸化ストレスおよび炎症の緩和のみならず、線維化を初期段階で抑制することが明らかとなった。先述のように、摂取されたフコキサンチンは生体内では代謝物として検出される^{44,45)}。そこで、次節では、フコキサンチンによる NASH 抑制作用メカニズムの一端を明らかにするため、フコキサンチン代謝物を用いて、NASH と密接に関連する肝臓実質細胞およびマクロファージを用いた検討を行うこととした。

Table 1.1.1 Food composition used in this study

Diet ingredients		Control (A06071314)	NASH (A06071302)	Fx+NASH (A06071302+0.2% Fx)
L-Cystine	[g]	4.2	4.2	4.2
L-Isoleucine	[g]	7.6	7.6	7.6
L-Leucine	[g]	15.8	15.8	15.8
L-Lysine	[g]	13.2	13.2	13.2
L-Methionine	[g]	5.1	0.8	0.8
L-Phenylalanine	[g]	8.4	8.4	8.4
L-Threonine	[g]	7.2	7.2	7.2
L-Tryptophan	[g]	2.1	2.1	2.1
L-Valine	[g]	9.3	9.3	9.3
L-Histidine	[g]	4.6	4.6	4.6
L-Alanine	[g]	5.1	5.1	5.1
L-Arginine	[g]	6.0	6.0	6.0
L-Aspartic Acid	[g]	12.1	12.1	12.1
L-Glutamic Acid	[g]	38.2	38.2	38.2
Glycine	[g]	3.0	3.0	3.0
L-Proline	[g]	17.8	17.8	17.8
L-Serine	[g]	10.0	10.0	10.0
L-Tyrosine	[g]	9.2	9.2	9.2
Corn Starch	[g]	502.0	0.0	0.0
Maltodextrin 10	[g]	130.1	130.1	130.1
Sucrose	[g]	68.8	68.8	68.8
Cellulose, BW200	[g]	50.0	50.0	50.0
Soybean Oil	[g]	25.0	25.0	23.5
Fucoxanthin	[g]	0.0	0.0	1.5
Lard	[g]	20.0	245.0	245.0
Mineral Mix S10026	[g]	10.0	10.0	10.0
DiCalcium Phosphate	[g]	13.0	13.0	13.0
Calcium Carbonate	[g]	5.5	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1H ₂ O	[g]	16.5	16.5	16.5
Sodium BiCarbonate	[g]	7.5	7.5	7.5
Vitamin Mix V10001	[g]	10.0	10.0	10.0
Choline Bitartrate	[g]	2.0	0.0	0.0
Total	[g]	1039.3	756.0	756.0

Table 1.1.2 Food intake, body and liver weight, and the levels of AST and ALT in the serum

		Control	NASH	Fx+NASH
Food intake	[g/2days]	8.0 ± 0.1**	5.7 ± 0.3	5.9 ± 0.3
Final body weight	[g]	27.3 ± 0.8**	21.1 ± 0.4	19.6 ± 0.3
Liver weight	[g]	1.2 ± 0.1**	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1**
Serum AST	[U/L]	64.1 ± 12.5**	413.9 ± 22.4	179.6 ± 13.3**
Serum ALT	[U/L]	38.9 ± 12.6**	526.0 ± 37.5	260.6 ± 28.8**

Fx, fucoxanthin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

Data are shown as mean SEM (n=7). ** $p < 0.01$ vs NASH.

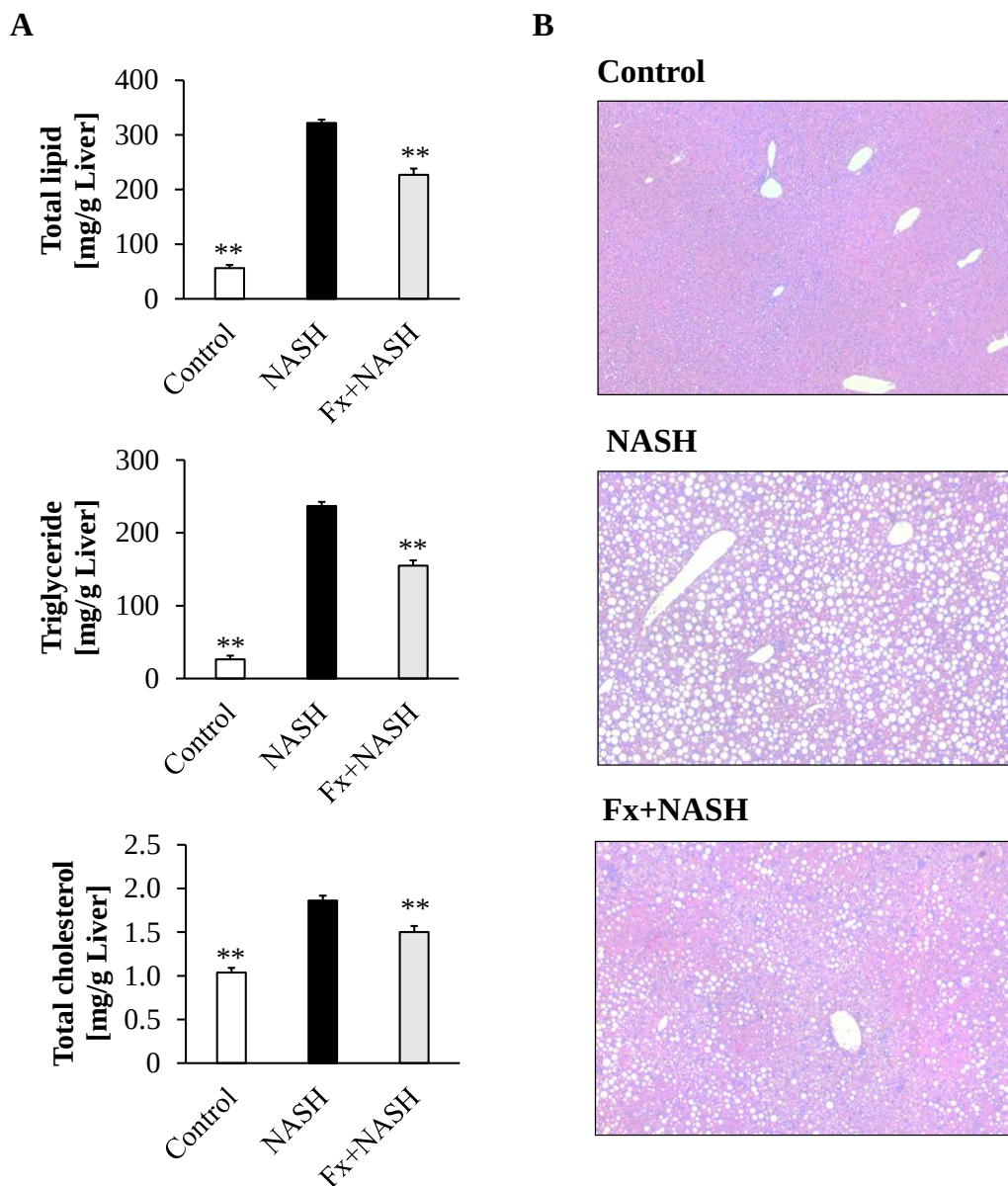


Figure 1.1.1 Liver lipid analysis in diet-induced NASH model mouse fed fucoxanthin (Fx).

(A) Total lipid was extracted using Folch method and the levels of triglyceride and total cholesterol were quantified using commercially available kits. (B) Hematoxylin/eosin staining of the mice liver sections. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=7) ** $p < 0.01$ vs. NASH.

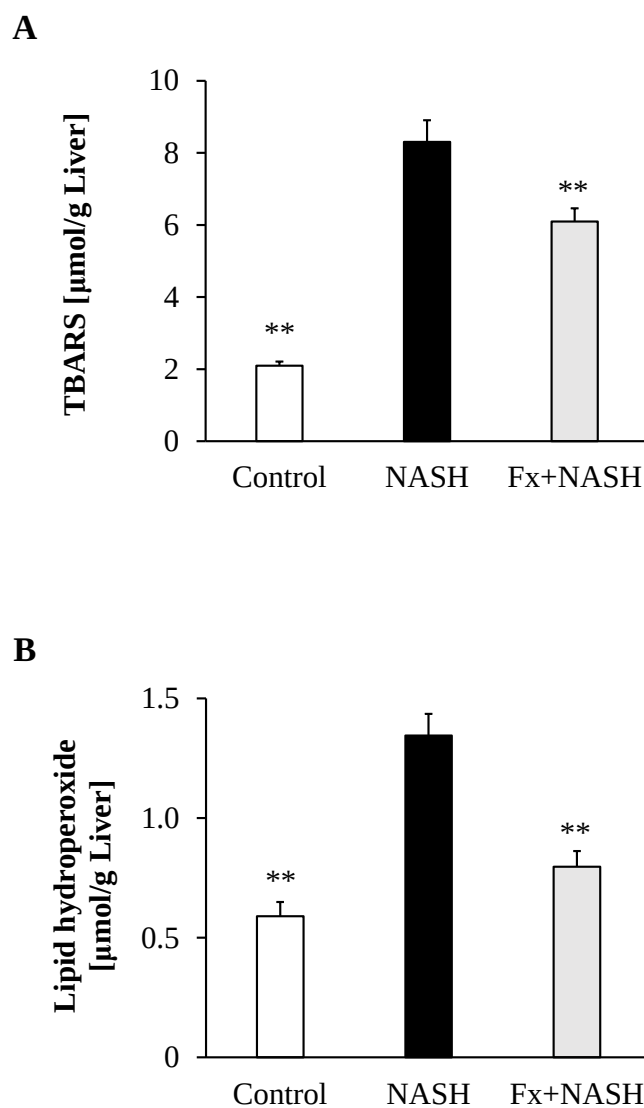


Figure 1.1.2 Evaluation of hepatic oxidative stress in diet-induced NASH model mouse fed fucoxanthin (Fx).

(A) Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and (B) lipid hydroperoxide levels in the liver of each mice (n=6-7) were determined according to the described methods. Data are shown as mean $\pm$ SEM ** $p < 0.01$ vs. NASH.

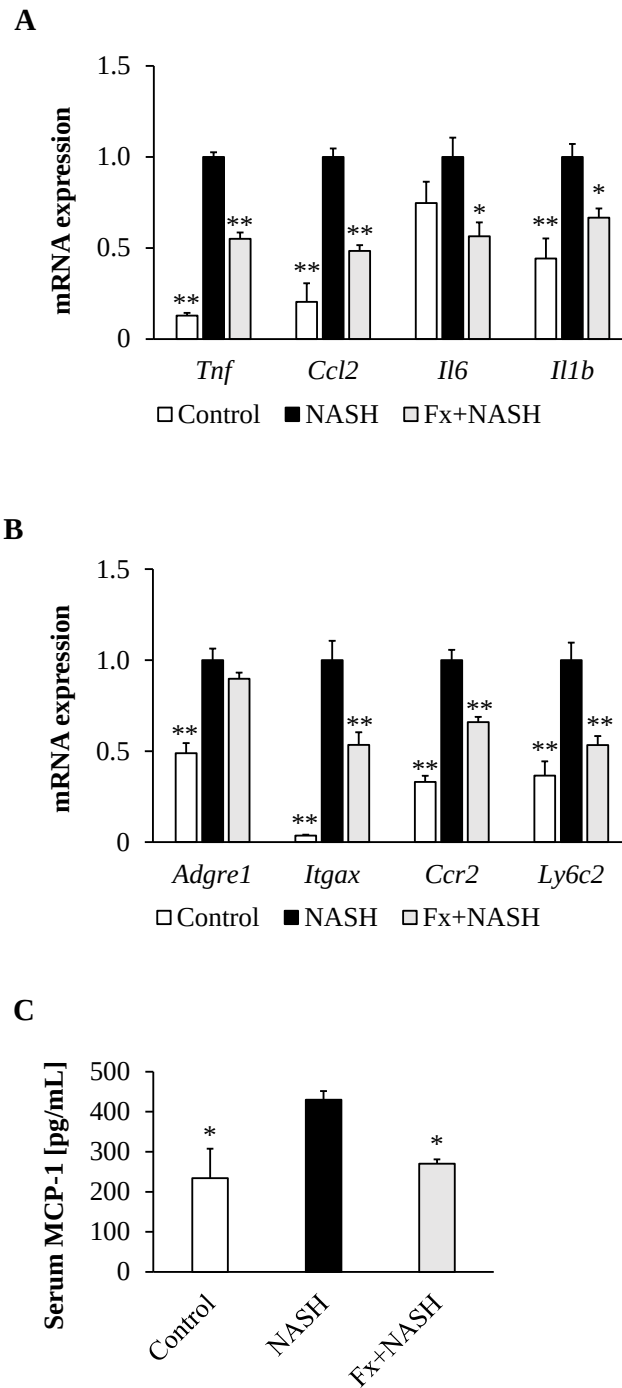


Figure 1.1.3 Gene expression of inflammatory factors (A) and infiltration markers (B) in the liver and MCP-1 level in the serum (C) of fucoxanthin (Fx)-fed mice.

Relative mRNA expression was quantified by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). *Rps18* was used as endogenous control. MCP-1 level was determined commercialized ELISA kit. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=7) ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. NASH.

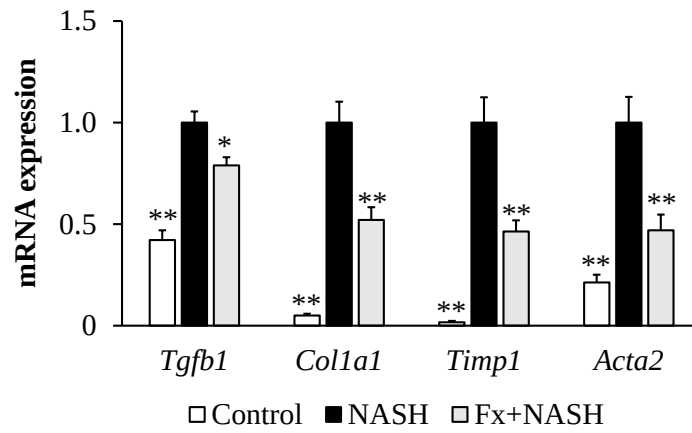
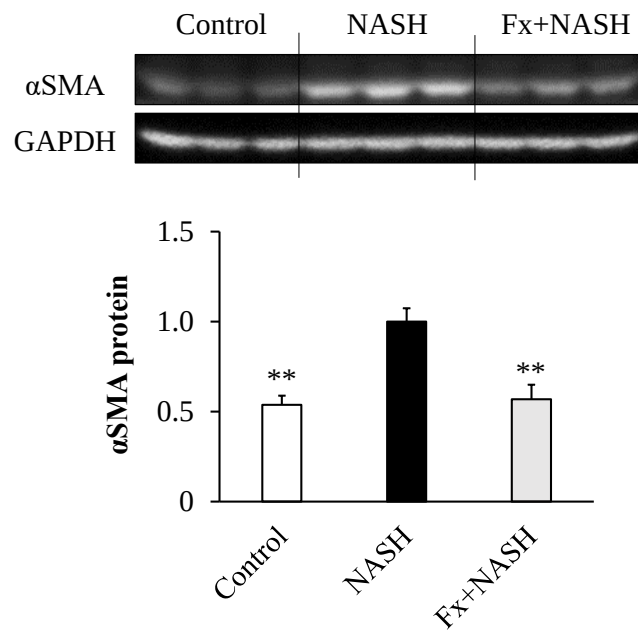
A**B**

Figure 1.1.4 Relative mRNA expression of fibrogenic factors (A) and protein expression of the activated-hepatic stellate cell marker α SMA in fucoxanthin (Fx)-fed mice.

(A) Relative mRNA expression was analyzed using RT-qPCR. *Rps18* was used as the endogenous control. (B) Western blotting of liver homogenates. GAPDH was used as loading control. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=7) **p < 0.01 and *p < 0.05 vs. NASH.

第 2 節

培養肝細胞およびマクロファージにおける脂質蓄積および炎症誘導に対する

フコキサンチン代謝物の抑制作用の評価

実験方法

1.2.1 試料と試薬

マウス肝臓 Hepa1-6 細胞およびマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)より入手した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)は日水製薬株式会社より購入した。TNF α 、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液($\times 100$)、RPMI1640、dimethyl sulfoxide (DMSO)は富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。Fetal bovine serum (FBS, Gibco)は Thermo Fisher Scientific, Inc.より購入した。ブタ臍臓由来リパーゼ、lipopolysaccharides from *E. coli* (LPS)、パルミチン酸、オイルレッド O は Sigma-Aldrich Japan から購入した。パラセントロン合成品およびアマロウシアキサンチン A 合成品は神戸薬科大学 山野由美子准教授より供与頂いた(純度>99%)。その他有機溶媒をはじめとする種々の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

1.2.2 フコキサンチノールの調製

フコキサンチンを 1.1.2 に示した方法で得た後、Tsukui らの方法⁷¹⁾に従い、酵素を用いたフコキサンチンの加水分解反応によりフコキサンチノールを調製した。すなわち、0.1M リン酸緩衝液中 50 mL にフコキサンチン 50 mg、タウロコール酸ナトリウム 250 mg、ブタ臍臓由来リパーゼ 4 g を加え、37°Cで 2 時間反応を行った。反応物をエーテル/水/メタノール (3:3:1, v/v/v)で液相分離後、エーテル層(上層)を回収した。溶媒を留去後、クロロホルム/メタノール/水(10:5:3, v/v/v)にて再度液相分離を行い、クロロホルム層(下層)を回収し、粗フコキサンチノール画分とした。次いで、この画分を以下の HPLC 条件にて、フコキサンチノール

ル純度が 99%以上になるまで精製を行った。

ポンプ：L-2130 (株式会社日立製作所)

検出器：L-2400 (株式会社日立製作所)

カラム：Develosil ODS-UG-5 (250 × 4.6 mm、野村化学株式会社)×2 本連結

温 度：室温

移動相：メタノール/アセトニトリル(70:30, v/v)

波 長：440 nm

流 量：0.7 mL/min

1.2.3 生体組織に蓄積したカロテノイドの分析

各組織 50-200 mg を秤取し、1.1.5 に示す方法で総脂質を抽出した。一方、血清の場合は 20 μ L に蒸留水 380 μ L を加え、クロロホルム/メタノール混合液(2:1, v/v) 2 mL を加えて液相分離を行った後、クロロホルム層(下層)を回収することで総脂質を得た。尚、生体組織からカロテノイドを含む総脂質を抽出する際、酸化防止のため、 α -トコフェロールを 50 μ g/mL 含むクロロホルム/メタノール混合液(2:1, v/v)を使用した。これら各生体組織中の総脂質をヘキサン/アセトン混合液(70:30, v/v) 1 mL ないし 0.5 mL に溶解した後、フィルターろ過 (TORAST Disc Syringe Filter, PTFE, 株式会社島津ジーエルシー)して得られたろ液を、以下に示す条件で HPLC 分析に供した。各種濃度に調整した標準試料から作成した検量線を用いて、各カロテノイドの定量を行った。

ポンプ：LC-20AD (株式会社島津製作所)

検出器：SPD-M20A (株式会社島津製作所)

カラム：Mightysil Si 60 (250 × 4.6 mm、関東化学株式会社)

温 度：30°C

移動相：ヘキサン/アセトン(70:30, v/v)

波 長：450 nm

流 量：1.0 mL/min

1.2.4 細胞培養

マウス肝臓細胞 Hepa1-6 は、37°C、5% CO₂ 存在下で、10%(v/v) FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM にて培養を行った。播種(5×10^4 cells/mL)して 48 時間前培養を行った後、DMSO に溶解したカロテノイド(終濃度 2.5 µM)を 24 時間処置した。次いで、同濃度のカロテノイド存在下で TNFα(終濃度 10 ng/mL)またはパルミチン酸(終濃度 100 µM)を処置して一定時間培養を行い、細胞および培養上清を回収した。

RAW264.7 細胞は 37°C、5% CO₂ 存在下で、10%(v/v) FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 にて培養を行った。播種(5×10^4 cells/mL)して 24 時間前培養を行った後、DMSO に溶解したカロテノイド(終濃度 2.5 µM)を 24 時間処置した。次いで、同濃度のカロテノイド存在下で LPS(終濃度 100 ng/mL)を処置して 24 時間培養を行い、培養上清を回収した。

尚、DMSO 添加に当たり、細胞毒性を示さない 0.1%の終濃度になるよう調整した。

1.2.5 Hepa1-6 細胞における炎症関連因子の mRNA 発現解析

TNFα で 3 時間処置した Hepa1-6 細胞の培養上清を除去し、300 µL の PBS で 2 回洗浄を行った後、QIAzol Lysis Reagent 300 µL を加えて細胞を溶解した。次いで、クロロホルム 60 µL を加えて遠心分離(12,000×g, 10 分, 4°C)を行った。水層(上層) 120 µL を新しいエッペンチューブに移し、2-プロパノール 120 µL を加えて 10 分静置後に遠心分離(12,000×g, 10 分, 4°C)を行った。沈殿した粗 RNA 画分に 75%(v/v) エタノールを 1 mL 加えて再度遠心分離(7,500

g, 5 分, 4°C)後、得られた沈殿を RNase free water (ニッポンジーン株式会社) 60 μ L に溶解し total RNA を得た。この total RNA を 1.1.6 に示した方法と同様にして逆転写反応および定量 PCR を行い、ターゲット遺伝子の mRNA 発現を測定した。用いた Taqman Gene expression assay (Thermo Fisher Scientific, Inc.)は以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Chemokine (C-C motif) ligand 2 [MCP-1]	<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
Chemokine (C-C motif) ligand 5 [RANTES]	<i>Ccl5</i>	Mm01302427_m1
Ribosomal protein S18	<i>Rps18</i>	Mm02601777_g1

1.2.6 Hepa1-6 細胞のオイルレッド O 染色

パルミチン酸で 24 時間処置した Hepa1-6 細胞の培養上清を除去し、300 μ L の PBS で 2 回洗浄を行った後、10%中性緩衝ホルマリン液(pH7.4) 300 μ L を加えて細胞を 1 時間室温で固定した。ホルマリン液を除去後、オイルレッド O 含有 60%(v/v) 2-プロパノール溶液 300 μ L 加え、15 分間染色した。蒸留水で洗浄液が透明になるまで繰り返し洗浄を行い、顕微観察を行った。

1.2.7 Hepa1-6 細胞内トリグリセライド量の測定

パルミチン酸で 24 時間処置した Hepa1-6 細胞の培養上清を除去し、300 μ L の PBS で 2 回洗浄を行った後、PBS 600 μ L で細胞を懸濁し、そのうち 10 μ L(タンパク質濃度測定用)をエッペンチューブに、500 μ L(細胞内トリグリセライド測定用)を遠沈管に移した。以下の方法で測定を行い、Hepa1-6 細胞内トリグリセライド量(μ g/mg protein)を求めた。

タンパク質濃度の測定

10 μ L の細胞懸濁液が入ったエッペンチューブを遠心分離(3,000 rpm, 15 分, 4°C)し、上清を除去後、細胞ペレットに溶解バッファー(20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1%(v/v) NP-40、

0.1%(w/v) デオキシコール酸ナトリウム、0.1%(w/v) SDS、1 mM EDTA、pH7.4) 10 μ L を加えてよく攪拌し、氷上で 10 分間インキュベートした。次いで、遠心分離(12,000 $\times$ g, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) して得られた上清中のタンパク質濃度を、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて測定した。すなわち、96-well マイクロプレートに上清 5 μ L を移した後、Reagent A (アルカリ性酒石酸銅溶液)/Reagent S 混合液(50:1, v/v) 25 μ L、Reagent B (Folin 試薬) 200 μ L をこの順に加えて、室温で 20 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて 750 nm における吸光度を測定した。各種濃度に調整した BSA を用いて作成した検量線からタンパク質濃度を算出した。

細胞内トリグリセライドの測定

500 μ L の細胞懸濁液が入った遠沈管に、メタノール 1 mL およびクロロホルム 2 mL を加えてよく攪拌し、遠心分離(3,000 rpm, 15 分)後にクロロホルム層(下層)を新しい試験管に移した。窒素気流下で溶媒を留去した後、Triton X-100/メタノール混合液(1:1, v/v) 20 μ L を加えてよく懸濁し、窒素気流下でメタノールを留去した。乾固物に蒸留水 90 μ L を加えてよく懸濁し、試験液とした。トリグリセライドの定量は、トリグリセライド E-テストワコーを用いた。すなわち、96-well マイクロプレートに 50 μ L の試験液を移した後、キット付属の発色試薬 150 μ L を加えて、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて主波長 600 nm および副波長 700 nm における吸光度を測定した。各種濃度に調整した標準試料を用いて作成した検量線からトリグリセライド量を算出し、その値をタンパク質濃度にて除することにより、細胞中トリグリセライド含量を決定した。

1.2.8 ELISA による培養上清中の MCP-1 および IL-6 濃度

TNF α で 24 時間刺激処置した Hepa1-6 細胞および LPS で 24 時間処置した RAW264.7 細胞の培養上清を回収し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。上清中の MCP-1 および IL-6 濃度は、

それぞれ Mouse CCL2/MCP-1 Uncoated ELISA kit、Mouse IL-6 Uncoated ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて、添付の使用説明書に従い測定した。操作は、1.1.8 と同様に行った。

1.2.9 統計

データは平均 $\pm$ SEM で示した。統計計算は一元配置分散分析を行った後、*Dunnett* の多重比較法を用いた。有意水準は 5%および 1%とした。

結果および考察

フコキサンチン摂取した NASH 誘導モデルマウスの各生体組織におけるフコキサンチン代謝物の蓄積

フコキサンチン摂取した糖尿病/肥満 KK-*A*^y マウスや C57BL/6J マウスにおいて、組織に蓄積する代謝物としてフコキサンチノールやアマロウシアキサンチン A、そしてパラセントロンが同定されている(**Figure 1**)⁴⁵⁾。フコキサンチン摂取した NASH 誘導マウスにおいてもこれら代謝物が検出されるかどうかを調べたところ、標品との保持時間および吸収スペクトルの比較によりフコキサンチノールとアマロウシアキサンチン A を同定するとともに、パラセントロン合成品と同じ保持時間を示す Peak 1 が検出された(**Figure 1.2.1 (A)**)。Peak 1 とパラセントロン合成品との比較において、前報⁴⁵⁾通り吸収スペクトルおよびマススペクトルの一致が見られたので、Peak 1 をパラセントロンと同定した(**Figure 1.2.1 (B)**)。以上より、フコキサンチン摂取した NASH 誘導モデルマウスにおいても、生体内にて少なくともフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A、そしてパラセントロンへと代謝されることが分かった(**Table 1.2.1**)。前節ではフコキサンチン摂取により、肝臓組織での脂肪蓄積や炎症が強く抑えられたため、肝臓細胞および組織炎症に密接に関わるマクロファージにおける代謝物の影響を調べることにした。生体組織からの代謝物の取得は微量のため困難であることから、フコキサンチンから調製したフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A 合成品、パラセントロン合成品を用いて *in vitro* 実験を行った。

Hepal-6 細胞へのパルミチン酸添加により誘導される脂肪蓄積に対するフコキサンチノールの抑制作用

NASH の前段階である脂肪肝は肝臓における脂肪滴の蓄積によって特徴づけられる。肝臓細胞に脂肪酸を添加することによって *in vitro* で脂肪蓄積モデルとして評価できることが

知られ汎用されている⁷²⁾。そこで、Hepa1-6 細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸を添加することにより、細胞内の脂肪蓄積を誘導した。その結果、対照区と比較して、パルミチン酸 100 μ M(終濃度)の添加によって Hepa1-6 細胞内に赤色で染色される脂肪滴の増加が認められた(**Figure 1.2.2 (A)**)一方で、フコキサンチノール処置した細胞では脂肪滴の減少が認められた。次いで、脂肪滴の主要な構成成分であるトリグリセライド量を測定したところ、フコキサンチノールは、パルミチン酸によるトリグリセライド蓄積の増加を有意に抑制した(**Figure 1.2.2 (B)**)。以上より、生体内で変換されたフコキサンチノールは肝臓の脂肪蓄積を抑制することで NASH を防いだ可能性が考えられる。

Hepa1-6 細胞への TNF α 添加により誘導されるケモカイン過剰発現に対するフコキサンチン代謝物の阻害作用

肝臓組織からのケモカイン過剰産生は NASH 進行に大きく関与する⁷³⁾。前節では、NASH 誘導マウスにおいて肝臓組織での MCP-1 mRNA (*Ccl2*)発現や血中 MCP-1 濃度が著増する一方、フコキサンチン摂取によって MCP-1 発現が大きく抑制されていた。そこで、肝臓細胞 Hepa1-6 を TNF α で炎症誘導した際のケモカイン過剰発現に与えるフコキサンチン代謝物の影響を評価した。対照区と比較して、TNF α 刺激により Hepa1-6 細胞培養上清中の MCP-1 濃度は上昇した(**Figure 1.2.3 (A)**)。しかしながら、フコキサンチノールおよびアマロウシアキサンチン A 処置群では培地中 MCP-1 濃度が有意に低値を示した(**Figure 1.2.3 (A)**)。一方、パラセントロンでは影響は見られなかった。さらに、TNF α 刺激した Hepa1-6 細胞におけるケモカインの mRNA 発現解析を行ったところ、フコキサンチノールおよびアマロウシアキサンチン A は TNF α によって誘導される *Ccl2* および *Ccl5* の mRNA 発現上昇を有意に抑制した(**Figure 1.2.3 (B)**)。 *Ccl5* は免疫細胞の遊走のみならず、線維化の初期段階にも重要であることが知られており⁷⁴⁾、フコキサンチノールやアマロウシアキサンチン A による NASH 抑制のための広範な制御機能が推察される。

RAW264.7 細胞への LPS 刺激により誘導される IL-6 過剰産生に対するフコキサンチン代謝物の抑制作用

NAFLD/NASH では、腸内細菌由来のエンドトキシン(LPS)の門脈血中への流入に伴うマクロファージの活性化が認められ、肝障害の進展に寄与することが考えられている⁷⁵⁾。実際に、NAFLD 患者の血中にはエンドトキシン濃度が上昇している⁷⁶⁾こと、腸管透過性が亢進していることが明らかとなっている⁷⁷⁾。また、NASH 肝ではマクロファージが肝臓細胞を取り囲む冠状構造(hepatic crown like structure)が認められ⁷⁸⁾、その相互作用が炎症や線維化の起点となって NASH の病態形成に関与することが推察される。そこで、マウス由来マクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、LPS 刺激により誘導される炎症に対するフコキサンチン代謝物の抑制作用を評価した。LPS 刺激した RAW264.7 細胞から産生される IL-6 量は著増した一方、フコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A およびパラセントロンはいずれもその増加を抑制した(**Figure 1.2.3 (C)**)。以上の結果は、フコキサンチン代謝物は肝臓細胞のみならずマクロファージにおける炎症反応をも制御することを示している。

以上より、肝臓細胞においてフコキサンチノールは肝脂肪化ならびに炎症、アマロウシアキサンチン A は炎症に対して抑制的に働くことで NASH 発症を防ぐことが推察される。さらに、いずれの代謝物も NASH をはじめとする組織慢性炎症に深く関わるマクロファージに対する炎症反応制御能を示した。**Table 1.2.1** から血中のフコキサンチン代謝物濃度はそれぞれパラセントロン 2.0 μM 、アマロウシアキサンチン A 5.0 μM 、フコキサンチノール 2.3 μM と算出される。*in vitro* 実験で供した濃度(2.5 μM , **Figure 1.2.3 (C)**)は、血中濃度と同程度かそれ以下であり、生体内においてフコキサンチンから代謝されて生じた代謝物がマクロファージにおける炎症反応をそれぞれ制御することで慢性炎症疾患の発症や進展阻止に寄与すると考えられる。

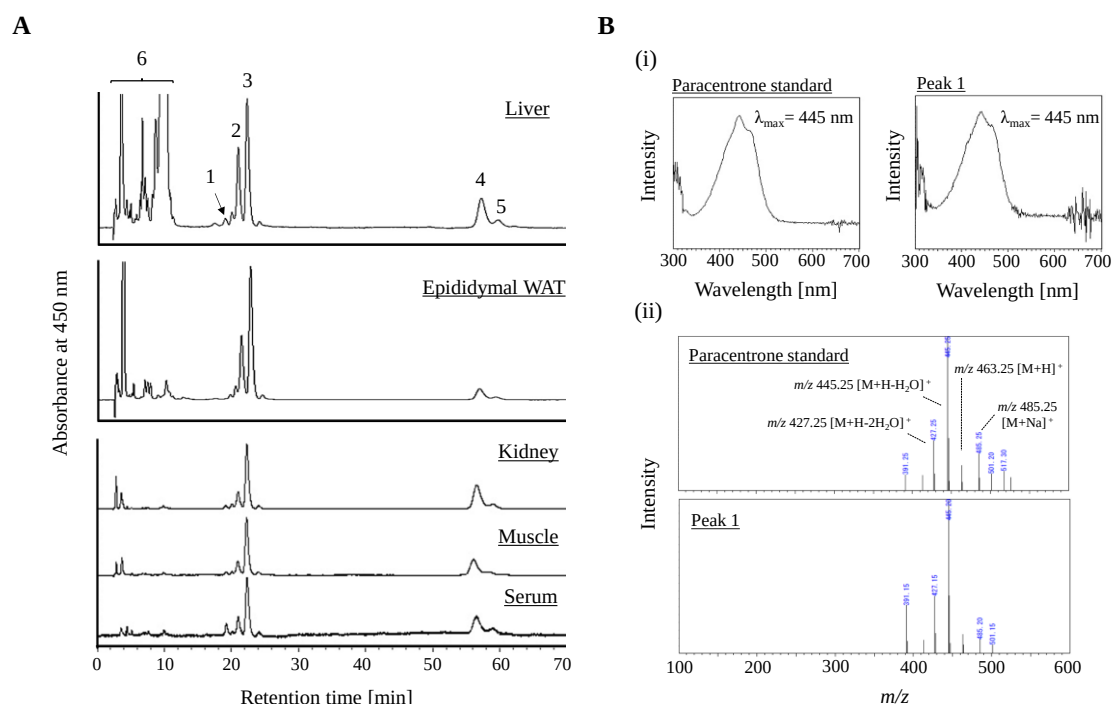


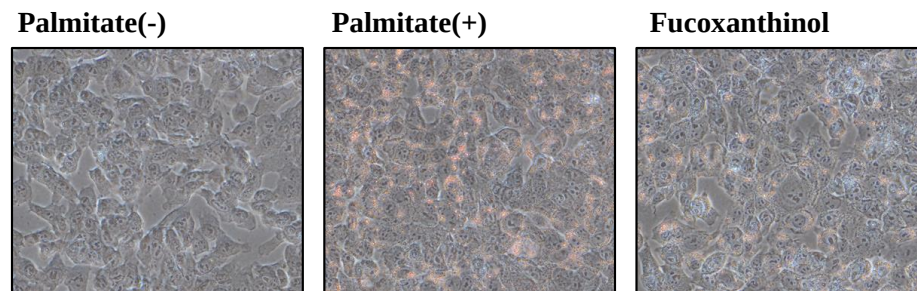
Figure 1.2.1 Detection of fucoxanthin metabolites in tissues of fucoxanthin-fed NASH model mouse. (A) HPLC chromatogram of total lipid extracted from each tissue. 1, paracentrone; 2, unidentified; 3, amarouciaxanthin A; 4, fucoxanthinol; 5 and 6, unidentified. (B) Absorption spectra (i) and mass spectra (ii) of paracentrone standard and Peak 1 in the liver. (i) Both paracentrone standard and Peak 1 show absorption maxima of 445 nm. (ii) The characteristic ion signal with the highest relative abundance is observed at m/z 445.25 $[M+H-H_2O]^+$, corresponding to the elimination of water from paracentrone. Other fragment ions of peak 1 correspond to those of the paracentrone standard.

Table 1.2.1 Tissue distribution of fucoxanthin metabolites.

		Paracentrone	Amarouciaxanthin A	Fucoxanthinol
Liver	[$\mu\text{g/g}$ tissue]	2.04 ± 0.11	32.2 ± 0.9	13.2 ± 1.1
Epididymal WAT	[$\mu\text{g/g}$ tissue]	2.30 ± 0.08	67.0 ± 1.2	11.0 ± 0.3
Kidney	[$\mu\text{g/g}$ tissue]	0.93 ± 0.02	19.9 ± 0.4	13.8 ± 0.9
Skeletal muscle	[$\mu\text{g/g}$ tissue]	0.43 ± 0.01	7.6 ± 0.2	3.4 ± 0.3
Serum	[$\mu\text{g/mL}$ serum]	0.92 ± 0.05	3.0 ± 0.2	1.4 ± 0.1

WAT, white adipose tissue. Fucoxanthinol, amarouciaxanthin A, and paracentrone was quantified by each standard curve. Data are shown as mean $\pm$ SEM ($n=7$).

A



B

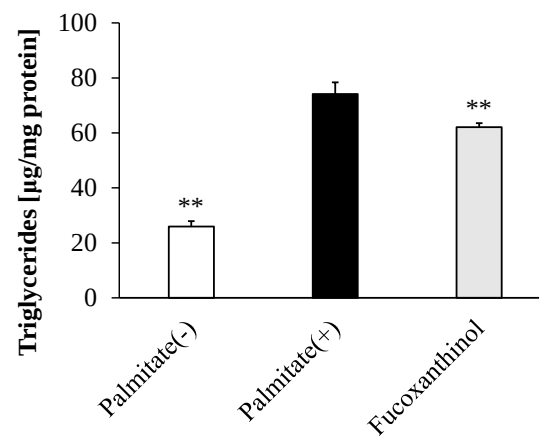


Figure 1.2.2 Fucoxanthinol inhibits lipid accumulation induced by palmitate in Hepa 1-6 cells.

The cells were treated with fucoxanthinol (2.5 μ M) for 24 h and then stimulated with palmitate (100 μ M) in the presence of fucoxanthinol (2.5 μ M) for further 24 h. After incubation, the cells were collected and evaluated their lipid accumulation. (A) Intracellular lipid droplet was visualized by Oil red O staining. (B) Intracellular triglyceride was quantified by commercialized kit. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01 vs. palmitate (+).

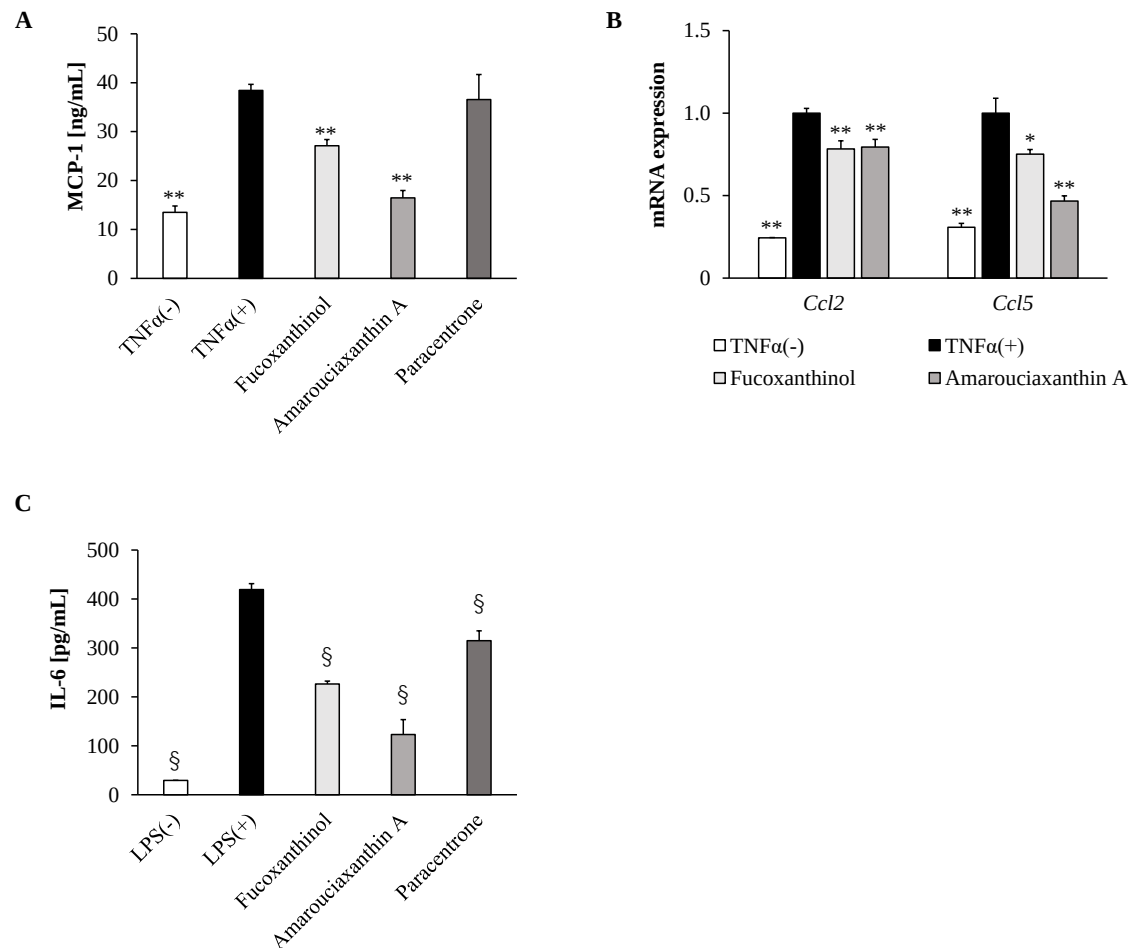


Figure 1.2.3 Fucoxanthin metabolites suppresses inflammation in hepatocytes and macrophages.

(A and B) Hepal-6 cells were treated with the metabolites (2.5 μ M) for 24 h followed by stimulated by TNF α (10 ng/mL) for 24 h (A) and 3 h (B). (A) MCP-1 level in the culture media was quantified by commercialized ELISA kit. (B) Relative mRNA expression of chemokines. *Rps18* was used as endogenous control. (C) RAW264.7 macrophages were treated with the metabolites (2.5 μ M) for 24 h followed by stimulated by LPS (100 ng/mL) for 24 h. IL-6 level in the culture media was quantified by commercialized ELISA kit. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01 and * p < 0.05 vs. TNF α (+). § p < 0.01 vs. LPS (+).

第2章

フコキサンチン由来アポカロテノイドによる

Nrf2 活性化を介した抗酸化酵素の発現促進と抗炎症機構解析

序論

前章では、NASH 誘導モデルマウスにおけるフコキサンチンの予防効果を見出すとともに、生体組織に蓄積する代謝物として少なくともフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A ならびにパラセントロンを同定した。さらに、これら代謝物が血中濃度と同程度かそれ以下の濃度でマクロファージに対して炎症抑制作用を示すことが分かった。一方、田谷⁷⁹⁾はフコキサンチンを1週間摂取させた KK-*4*¹ マウスや C57BL/6J マウスの生体組織中にエポキシド側エンドグループを有するフコキサンチン由来アポカロテノイド(アポフコキサンチノイド)である apo-10'-fucoxanthinal の存在を示している。また、LPS 刺激した RAW264.7 細胞に対して抗炎症作用を示すことを報告している⁷⁹⁾。これらの知見は、摂取されたフコキサンチンが生体内に吸収された後、開裂反応を含む様々な代謝を受けることを意味しており、フコキサンチンの示す生理活性の一部に代謝物が関わることを予想させる。さらに近年、多様なカロテノイドを基質として認識する開裂酵素 BCO2 の酵素機能解析に関する報告⁸⁰⁾や、マウスのみならずヒト生体組織中のアポカロテノイドの存在に関する報告^{48,49)}が相次いでなされている。しかしながら、アポカロテノイド、特にキサントフィル類由来のアポカロテノイドの生物活性については未だ不明な点が多く、その解明はカロテノイドの健康機能性を明らかにする上で重要と考える。

生体はその恒常性を維持するために、酸化-抗酸化のバランスを絶えず調整し、細胞内酸化還元状態を一定に保っている。このバランスが酸化の方向に傾いた状態(=酸化ストレス)は様々な疾患の原因になりうる。酸化ストレスから細胞を保護するための生体防御機構の一つに抗酸化酵素が知られ、heme oxygenase-1 (HO-1)、NAD(P)H quinone oxidoreductase-1

(NQO-1)、catalase などが挙げられる。これら抗酸化酵素の発現を制御する主要な因子として Nrf2 が同定された⁸¹⁾。Nrf2 は CNC 転写因子群に属し、塩基性領域/ロイシンジッパー構造を有する転写因子である⁸¹⁾。通常、生合成された Nrf2 は細胞質にて Keap1 と複合体を形成することで、ユビキチン-プロテアソーム経路に導かれて分解される(**Figure 2**)。このターンオーバーにより、Nrf2 の細胞内濃度が保たれている。しかしながら、一旦 Keap1 による捕捉が解除されると、分解を免れた Nrf2 が細胞質から核内へと移行し、ゲノム上の抗酸化応答配列(antioxidant response element, ARE)への結合を介して、標的遺伝子である抗酸化酵素の発現が誘導される⁸¹⁾(**Figure 2**)。この一連の機序において、Keap1 分子内システインのチオール基が重要な役割を担っており、チオール基が修飾を受けると、Keap1 のコンフォメーションが変化して Nrf2 のユビキチン化が減弱する結果、Nrf2 が安定化する⁸²⁾。Nrf2 活性化は、酸化ストレスのみならず親電子性物質によっても生じることが分かっている。内因性の親電子性物質として代表的なものにアラキドン酸由来酵素反応物 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2)が挙げられる⁸³⁾。15d-PGJ2 はシクロペンテノン環上に α,β -不飽和カルボニル基を有しており、親電子性 β 炭素と Keap1 タンパク質分子中のチオール基とのマイケル付加により共有結合を形成する可能性が考えられている⁸³⁾。修飾された Keap1 はオートファジー経路により分解される⁸⁴⁾。近年 Nrf2 は、がんや神経変性疾患、生活習慣病などの慢性炎症疾患との関連が明らかになってきており、Nrf2 の活性化がこれら疾患の治療や予防に役立つことが期待されている⁸⁵⁾。Nrf2 は創薬のみならず、日々の食事による健康の維持増進からの観点からも注目を集めており、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファン⁸⁶⁾や、ターメリックに含まれるクルクミン⁸⁷⁾などのファイトケミカルをはじめとした Nrf2 活性化食品因子の探索や研究が活発に行われている。

アポカロテノイドによる Nrf2 活性化については、ヒト血中において見出されているリコペン由来開裂物 apo-8'-lycopenal を用いた報告がある⁸⁸⁾。ヒト肝臓細胞 HepG2 において、apo-8'-lycopenal は Nrf2 の活性化を介して抗酸化酵素の発現を上昇させた。その機序とし

て、分子末端の α,β -不飽和カルボニル基の親電子性 β 炭素と Keap1 チオール基とのマイケル付加を介する可能性を考察している。先述したスルホラファンやクルクミンもまた、分子内親電子性炭素と Keap1 チオール基との共有結合を介した Nrf2 活性化機構が考えられている。一方、アポフコキサンチノイドにおいて、Nrf2 活性化やそれによって制御される抗酸化酵素の発現についての報告はない。他のアポカロテノイドと同様に、アポフコキサンチノイドも開裂末端に α,β -不飽和カルボニル基を有することから、Nrf2 活性化能を予想した。そこで、本章ではアポフコキサンチノイドの新たな生物活性の探索として、Nrf2 活性化を介した抗酸化酵素の発現誘導機構の解明を試みた。さらに、Nrf2 は炎症との関わりも明らかになってきていることから、アポフコキサンチノイドによる Nrf2 活性化能と炎症抑制作用との関連を調べた。

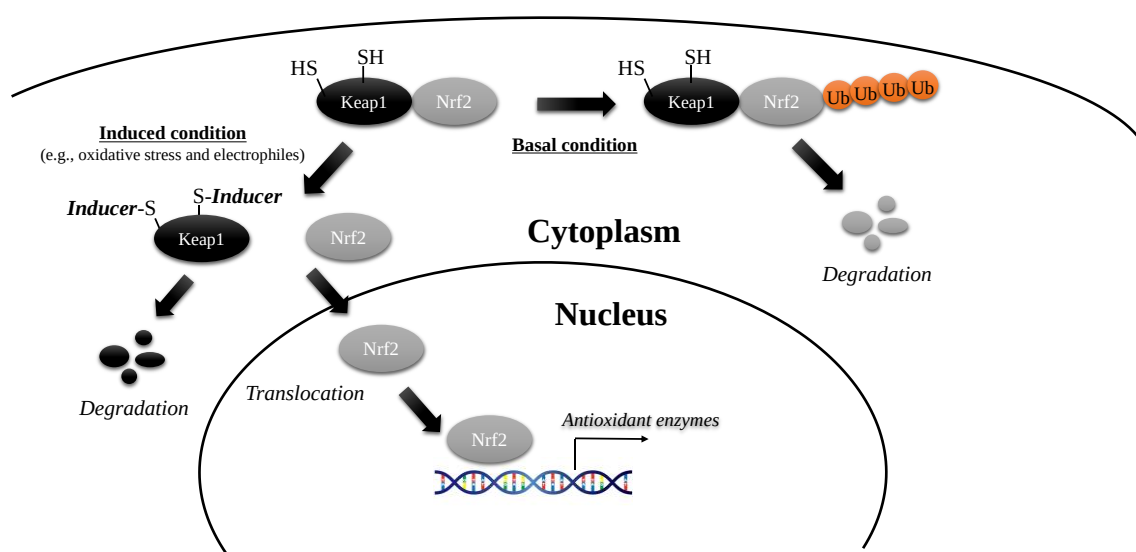


Figure 2 Induction of antioxidant enzyme gene expression through Nrf2 activation.

In basal condition, Nrf2 is sequestered in cytoplasm by Keap1 and degraded by ubiquitin-proteasome pathway. Upon stimulation by oxidative stress or electrophiles, Keap1 which is modified its cysteine residues is degraded through autophagy followed by Nrf2 translocates into nucleus and promotes gene expression of antioxidant enzymes. Ub, ubiquitin.

実験方法

2.1 試料と試薬

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)はナカライテスク株式会社より購入した。過マンガン酸カリウム(KMnO_4)、*N*-アセチルシステイン(NAC)は富士フィルム和光純薬より購入した。Phosphatase inhibitor cocktail 2、phosphatase inhibitor cocktail 3、スルファニルアミドおよび *N*-[1-naphtyl] ethylenediamine dihydrochloride は Sigma-Aldrich Japan から購入した。Anti-heme oxygenase-1 (HO-1/HMOX1)抗体(10701-1-AP)、anti-nuclear factor erythroid-derived 2 like 2 (NRF2/NFE2L2)抗体(16396-1-AP)、anti-Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)抗体(10503-2-AP)、anti-lamin B1 抗体(66095-1-Ig)は Proteintech Group Inc.より、anti- β -actin (C4)抗体(sc-47778)は Santa Cruz Biotechnology, Inc.より、anti-NF- κ B p65 (D14E12)抗体(#8242S)は Cell Signaling Technology, Inc.より購入した。Apo-10'-fucoxanthinal 合成品、apo-12'-fucoxanthinal 合成品、deepoxy-apo-12'-fucoxanthinal 合成品は神戸薬科大学山野由美子准教授より供与頂いた(純度>99%)。β-Apo-12'-carotenal および apo-12'-zeaxanthinal は、β-カロテンおよびルテインを過マンガン酸カリウムで酸化分解し精製したものを用いた (Supplementary Figure 2.1)。その他使用した試薬は第1章と同様のものを用いた。

2.2 細胞培養

1.2.4 と同様の方法でマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞の培養を行った。抗酸化関連因子の解析には、播種(5×10^4 cells/mL)して 24 時間前培養を行った後、DMSO に溶解したカロテノイドを一定時間処置し、細胞を回収した。NAC (終濃度 1 mM)を添加する際は、カロテノイドとともに添加して一定時間培養後に細胞を回収した。炎症関連因子の解析には、前培養を行った RAW264.7 細胞に NAC (終濃度 1 mM)存在下あるいは非存在下でカロテノイドを 24 時間処置した後、同濃度の NAC およびカロテノイド存在下で LPS(終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$)を処置して一定時間培養後に細胞および培養上清を回収した。

2.3 RAW264.7 細胞における抗酸化および炎症関連因子の mRNA 発現解析

1.2.5 と同様の方法で行った。使用したプライマーは以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Heme oxygenase 1 [HO-1]	<i>Hmox1</i>	Mm00516005_m1
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	<i>Nqo1</i>	Mm01253561_m1
Catalase	<i>Cat</i>	Mm00437992_m1
Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 [Nrf2]	<i>Nfe2l2</i>	Mm00477784_m1
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
Ribosomal protein S18	<i>Rps18</i>	Mm02601777_g1

2.4 RAW264.7 細胞における抗酸化および炎症関連因子のタンパク質発現解析

カロテノイドで一定時間処置した RAW264.7 細胞を 300 μ L の PBS で 2 回洗浄した後、PBS 600 μ L で細胞を懸濁し、エッペンチューブに移した。遠心分離(3,000 rpm, 15 分, 4°C)後、上清を除去した。細胞ペレットに溶解バッファー(20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1%(v/v) NP-40、0.1%(w/v) デオキシコール酸ナトリウム、0.1%(w/v) SDS、1 mM EDTA、1 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム、1 mM PMSF、1%(v/v) protease inhibitor cocktail、1%(v/v) phosphatase inhibitor cocktail 2、1%(v/v) phosphatase inhibitor cocktail 3) (pH7.4) 50 μ L を加えてよく攪拌し、10 分間氷上にてインキュベートした。遠心分離(12,000 $\times$ g, 10 分, 4°C)して上清を回収し、全細胞抽出タンパク質を得た。一方、細胞質画分および核画分におけるタンパク質の抽出は、LysoPure Nuclear and Cytoplasmic Extractor kit (富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて、使用説明書に従い行った。すなわち、回収した細胞ペレットに Nuclear Fractionation buffer (試薬①)を 100 μ L 加えて攪拌し、氷上で 10 分間インキュベートした後、遠心分離(500 $\times$ g, 10 分, 4°C)を行った。上清を新しいエッペンチューブに移した後、再度遠心分離

(20,000×g, 10 分, 4°C)して上清を回収した(細胞質画分)。一方、先述の 500×g での遠心分離で得たペレットには、再度試薬①500 μL を加えて攪拌し、遠心分離(500×g, 10 分, 4°C)して上清を除去した。次いで、ペレットに SDS Lysis buffer (試薬③)を 50 μL 加えて攪拌と超音波処理を繰り返しペレットの消失を確認した後、遠心分離(20,000×g, 10 分, 4°C)して上清を回収した(核画分)。各々の画分中のタンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて測定した。一方、上清 30 μL に Sample buffer, Laemmli 2× Concentrate 30 μL を加えて攪拌し、95°Cで 5 分間加熱することにより変性処理を行った後、10%または 7.5%ポリアクリルアミドゲルにタンパク質量が 10 μg になるよう負荷し、1.1.7 と同様にしてウェスタンブロッティングによるタンパク質発現解析を行った。尚、一次抗体はいずれも 1:2500 で、二次抗体は 1:20000 の希釈率で使用した。

2.5 RAW264.7 細胞培養上清中の NO 濃度の測定

上清中の NO 濃度は Griess 法⁸⁹⁾にて測定した。すなわち、培養上清 100 μL を 96-well マイクロプレートに移し、Griess 試薬(2.5%(v/v)リン酸、1%(w/v) スルファニルアミド、0.1%(w/v) *N*-[1-naphtyl] ethylenediamine dihydrochloride)100 μL を加えて、室温にて 15 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて 550 nm における吸光度を測定した。各濃度に調整した亜硝酸ナトリウムを用いて作成した検量線から NO 濃度を算出した。

2.6 統計

データは平均±SEM で示した。統計計算は一元配置分散分析を行った後、*Dunnett* あるいは *Tukey-Kramer* の多重比較法を用いた。二群間の比較は *t* 検定を行った。

結果および考察

Apo-fucoanthinal による抗酸化酵素発現促進作用

細胞生存に与える apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal (**Figure 2.1**)の影響を調べたところ、2.5 μM までは毒性を認めなかった(**Figure 2.2**)ので、以降はこの濃度以下で実験を行った。はじめに、エポキシド側エンドグループを持つ apo-12'-fucoxanthinal を RAW264.7 細胞に添加したところ、抗酸化酵素 HO-1 タンパク質の顕著な発現誘導が観察された(**Figure 2.3 (A)**)。次に、完全鎖長を持つフコキサンチノール、アレン結合側のエンドグループを有するパラセントロンとの比較を行った(**Figure 2.1**)。その結果、HO-1 遺伝子(*Hmox1*)の mRNA 発現は、apo-12'-fucoxanthinal 処置 6 時間後で最大の発現上昇を示した(**Figure 2.3 (B)**)。開裂物であるパラセントロンにおいても、対照区と比較して有意な増加は見られたものの、その程度は apo-12'-fucoxanthinal よりも小さかった。また、フコキサンチノールではいずれの時間においても対照区と有意な差は見られなかった。興味深いことに、同じエポキシド側のエンドグループを持つ apo-10'-fucoxanthinal においても顕著な発現上昇が認められた(**Figure 2.3 (B,C)**)ことから、開裂物におけるエポキシド側エンドグループの構造依存的な *Hmox1* mRNA 発現誘導が示唆された。さらに、*Nqo1* および *Cat* の mRNA 発現を調べたところ、いずれについても apo-fucoanthinal 添加によって、その発現が誘導された(**Figure 2.3 (D)**)ことから、apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal は HO-1 のみならず他の抗酸化酵素についても発現誘導能を示すことが分かった。

Apo-fucoanthinal によるフコキサンチン特有の構造に依存した抗酸化酵素発現促進作用

Apo-fucoanthinal の分子構造が抗酸化酵素発現に与える影響をより詳細に調べるため、同じ鎖長(C-12',11'位で開裂)を持つがエンドグループ構造が異なる apo-12'-carotenoids を調製し、構造間での活性の比較を行った(**Figure 2.4 (A)**、**Supplementary Figure 2.1**)。RAW264.7

細胞にそれぞれの apo-12'-carotenoids を 6 時間処置した後の *Hmox1* mRNA 発現レベルを調べた結果、apo-12'-fucoxanthinal のみに顕著な発現誘導が見られた(**Figure 2.4 (B)**)。この傾向は他の抗酸化酵素遺伝子である *Nqo1* mRNA 発現においても同様に認められた(**Figure 2.4 (B)**)。一方、エポキシドを持たない点で構造的に異なる deepoxy-apo-12'-fucoxanthinal では、apo-12'-fucoxanthinal による顕著な発現誘導能が消失したことから、少なくともエポキシドの存在が抗酸化酵素発現に影響する可能性が示唆された。他の apo-12'-carotenoids において、2.5 μ M の添加では、対照区と比較して有意差は認めないものの共通して 1.5 倍程度の *Hmox1* および *Nqo1* mRNA の発現増加傾向が見て取れた。これは共通構造である C-12'位のアルデヒド末端(α,β -不飽和カルボニル基)の影響が推察されるとともに、 β -イオノン環上の C-3 ヒドロキシ基や C-4 カルボニル基の抗酸化酵素発現に与える影響は小さいと思われた。カロテノイドではないが、Wang ら⁹⁰⁾は、分子内に α,β -不飽和カルボニル基およびエポキシドを両方持つリノール酸誘導体 12,13-epoxy-9-keto-(10)trans-octadecenoic acid (EKODE)が ARE レポーター活性と NQO-1 発現の顕著な増加を誘導する一方で、 α,β -不飽和カルボニル基あるいはエポキシドの片一方のみ持つリノール酸誘導体では EKODE ほどの強い誘導能が見られないことを報告した。Apo-12'-fucoxanthinal の構造的特徴として、分子内の近接する位置にエポキシド(C-5,6 位)および α,β -不飽和カルボニル基(C-8 位)を有しており(**Figure 2.4 (A)**)、この部分構造が抗酸化酵素発現誘導能に関与する可能性が推察される。

Apo-fucoxanthinal による Nrf2 活性化機構

先の実験により、apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal が、エンドグループの特徴的な構造、特にエポキシドの有無に依存して顕著な抗酸化酵素の発現誘導能を示すことが分かった。そこで、抗酸化酵素発現を制御する転写因子 Nrf2 の発現を調べた。Nrf2 遺伝子(*Nfe2l2*)の mRNA 発現について、対照区と比較して、apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal はいずれの処置時間、濃度においてもその発現に影響を及ぼさなかった(**Figure 2.5**)。次いで、種々の細胞

画分中の Nrf2 タンパク質量を調べたところ、対照区と比較して、apo-12'-fucoxanthinal 処置により、全細胞抽出物中の Nrf2 タンパク質発現量の有意な増加が観察された(**Figure 2.6 (A)**)。さらに、細胞質画分および核画分中の Nrf2 発現も増加した(**Figure 2.6 (B)**)。また、apo-12'-fucoxanthinal 処置により、Keap1 タンパク質発現レベルが低下した(**Figure 2.6 (C)**)。対照区に対する、全細胞抽出物中の Nrf2 の増加分と細胞質/核画分中の Nrf2 増加分の和がほぼ同等であること(**Figure 2.6 (A,B)**)、*Nfe2l2* mRNA 発現には変化がなかったこと(**Figure 2.5**)を併せて考えると、以下のような制御機構が推察される。すなわち、apo-12'-fucoxanthinal はその特徴的構造であるエポキシドに依存して、Nrf2 の遺伝子発現よりもむしろ Keap1 分解による Nrf2 安定化を促進する。細胞内 Nrf2 レベルの上昇に伴って、核内への Nrf2 移行量が増える結果、抗酸化酵素の発現が誘導される。同じく抗酸化酵素発現を顕著に誘導した apo-10'-fucoxanthinal についても、処置後に Nrf2 核内蓄積量が増加したことから、同様の制御機構が推察される(**Figure 2.6 (D)**)。一方、**Figure 2.7** には、チオール基を有し親電子剤による Nrf2 活性化を阻害する ⁹¹NAC を共に処置した際の影響について示した。NAC 共存下では、apo-12'-fucoxanthinal による HO-1 タンパク質発現が低下する(**Figure 2.7 (A)**)とともに、種々の抗酸化酵素の mRNA 発現も低下した(**Figure 2.7 (B)**)。さらに、Nrf2 核内蓄積レベルにおいても、apo-12'-fucoxanthinal 単独処置群と比べて、その蓄積レベルが低下した(**Figure 2.7 (C)**)。これらの結果は、apo-12'-fucoxanthinal による Nrf2 活性化能が Keap1 のチオール基の修飾を介する可能性を示唆している。

Apo-fucoxanthinal による Nrf2 活性化を介した炎症抑制作用

先の実験では、apo-fucoxanthinal が Nrf2 活性化能を示すことを見出したので、apo-fucoxanthinal による抗炎症作用との関連を調べた。まずは、LPS 刺激した RAW264.7 細胞における炎症性因子の過剰発現に対する抑制能を試験したところ、apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal 処置により、炎症性因子である NO の産生が抑制された(**Figure 2.8 (A)**)。さら

に、これらアポフコキシチノイドは *Il6* および *Il1b* の mRNA 発現上昇も阻害する(**Figure 2.8 (B)**)とともに、炎症性遺伝子の発現に関わる転写因子 Nuclear factor (NF)- κ B p65 の核内蓄積レベルの増加も抑制した(**Figure 2.8 (C)**)。以上より、炎症関連シグナル伝達経路を阻害することにより、抗炎症活性を示すことが推察された。次いで、apo-fucoanthinal による Nrf2 活性化を抑制する NAC の存在下で、炎症抑制能に与える影響を調べたところ、NO 産生に対する阻害作用が NAC 存在下ではキャンセルされる(**Figure 2.9 (A)**)とともに、*Il6* および *Il1b* の mRNA 発現についても、apo-12'-fucoxanthinal による抑制能がキャンセルされた(**Figure 2.9 (B)**)。これらの結果により、apo-12'-fucoxanthinal は Nrf2 活性化を介して炎症性因子の発現を抑制する機序が考えられた。Nrf2 活性化による炎症抑制作用にはいくつかの機序が報告されている⁹²⁻⁹⁴⁾。抗酸化酵素 HO-1 は基質であるヘムを、遊離鉄、一酸化炭素(carbon monoxide, CO)およびビルベリジンに分解するが、反応生成物である CO やビルベリジンは抗炎症作用を示す⁹²⁾。一方、Nrf2 が、NF- κ B p65 と転写共役因子である CBP-P300 複合体との相互作用に競合することにより、NF- κ B p65 によって制御される炎症性因子の発現を抑制することも報告されている⁹³⁾。さらに最近、小林ら⁹⁴⁾は、*Il6* および *Il1b* をコードする塩基配列上流に存在する調節領域へ Nrf2 が結合することによって、RNA ポリメラーゼのリクルートが阻害され、これら遺伝子の転写が抑制されることを見出している。本実験においても、apo-fucoanthinal は *Il6* および *Il1b* の mRNA 発現上昇を強く抑制したが、NAC 存在下ではそのような発現抑制効果は消失した(**Figure 2.9 (B)**)。したがって、apo-fucoanthinal によって核内に蓄積した Nrf2 が、炎症性因子の mRNA 発現を転写レベルで調節することで抗炎症活性を発揮する可能性があり興味深い。

以上より、本章ではアポフコキシチノイドによる抗酸化酵素発現誘導や Nrf2 活性化能を初めて見出すとともに、抗酸化酵素発現能にはエポキシドを含む部分構造が重要であることを示した。また、Nrf2 活性化機序として、Keap1 の分解に伴う Nrf2 の分解抑制と核内

移行の増大によるものと推定された。さらに、apo-fucoxanthinal による抗炎症機構は少なくとも Nrf2 活性化を介することを明らかにした。アポフコキサンチノイドによる Nrf2 を介した抗酸化酵素誘導という新たな生物活性とともに炎症抑制との関連を見出したことは、フコキサンチンによる慢性炎症抑制の作用メカニズムの解明に向けた意義深い知見になると考える。

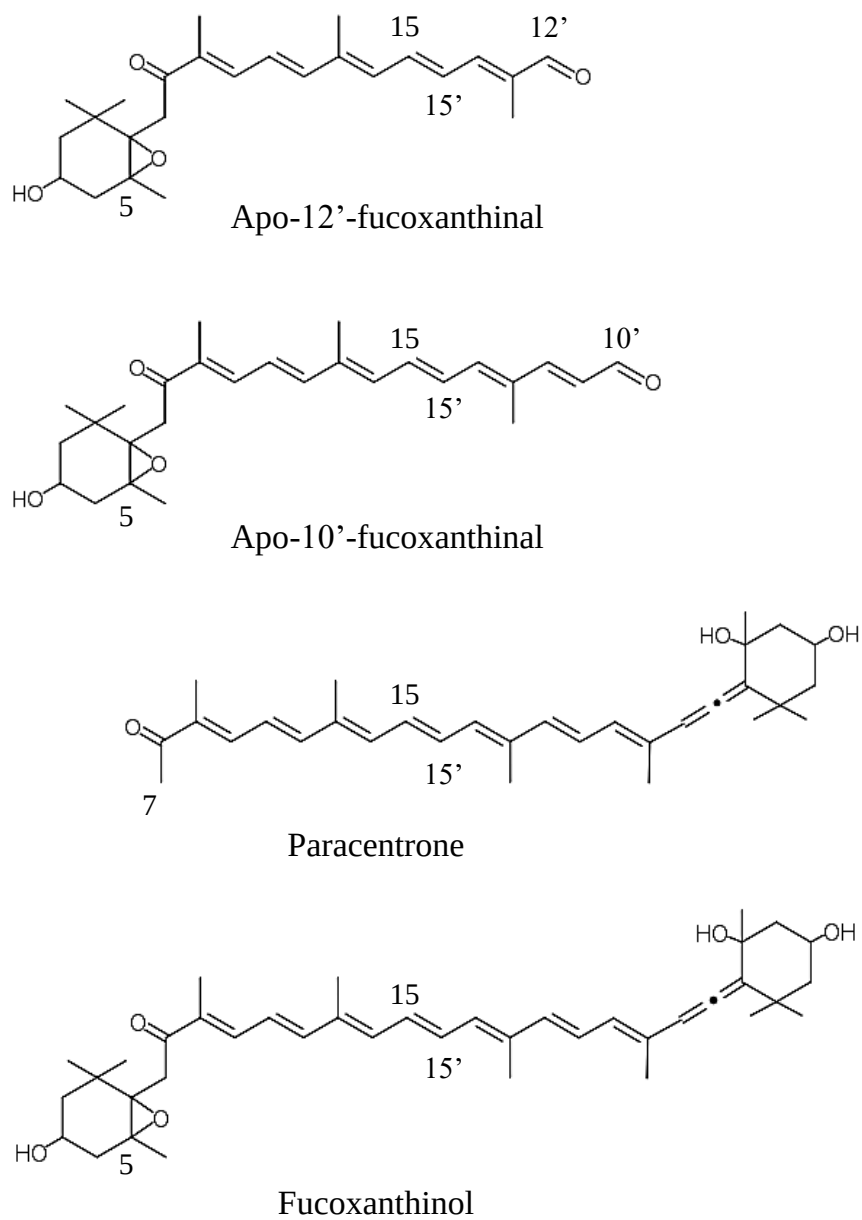


Figure 2.1 Molecular structure of apofucoxanthinoids and fucoxanthinol used in this study.

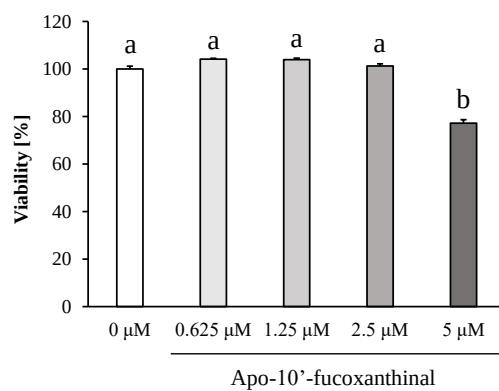
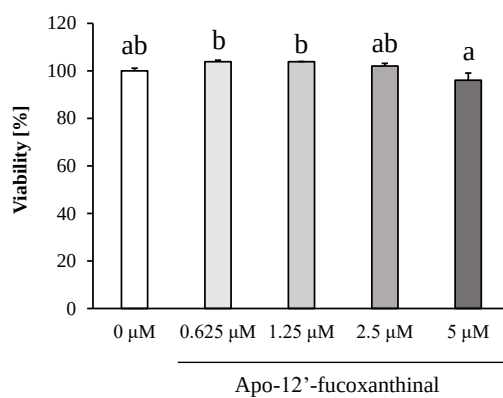


Figure 2.2 Cell viability of RAW264.7 macrophages treated with apo-12'- and apo-10'-fucosanthinal. After treating cells with apo-12'- and apo-10'-fucosanthinal at each concentration for 24 h, cell viability was determined by WST-1 assay. Data are mean $\pm$ SEM (n=4). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

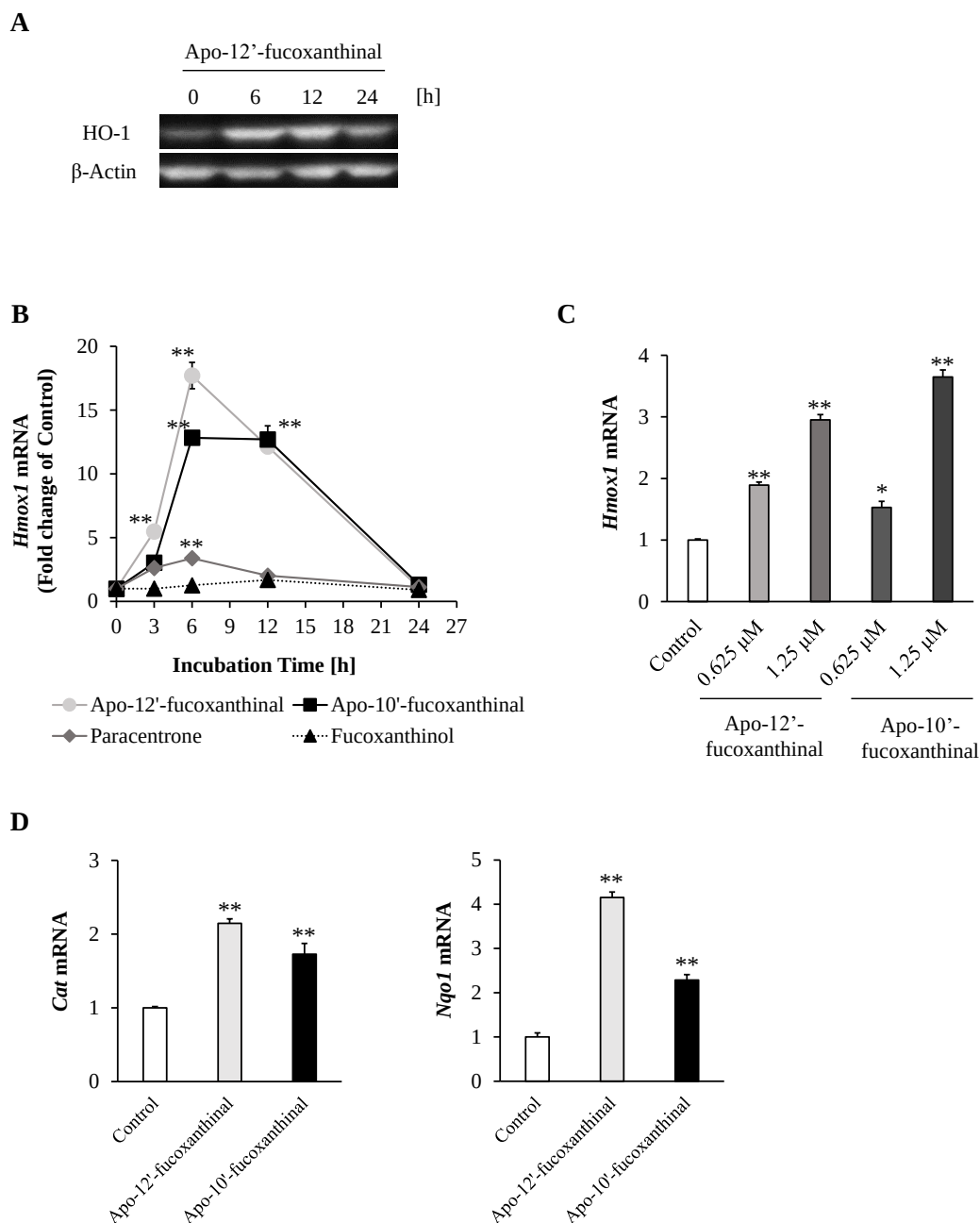
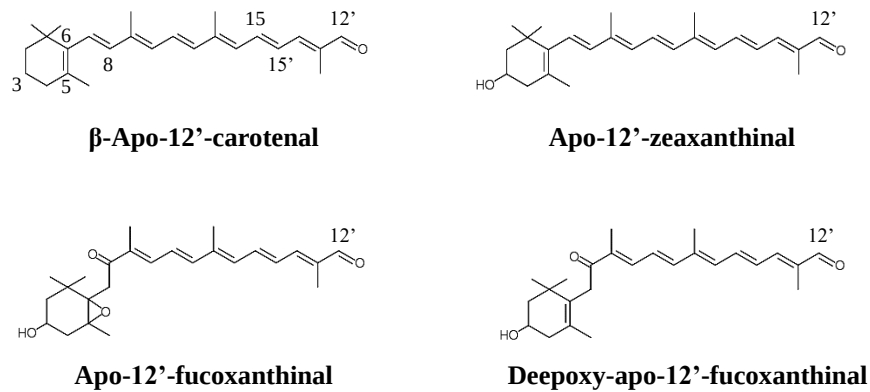


Figure 2.3 Apo-fucoxanthinals promote the expression of antioxidant enzymes in RAW264.7 macrophages.

(A) Time-course experiment of HO-1 protein in the cells treated with apo-12'-fucoxanthinal (2.5 μM). (B) Time-course experiment of *Hmox1* mRNA expression in the cells treated with each carotenoid (2.5 μM). (C) Relative *Hmox1* mRNA expression in the cells treated for 6 h. (D) Relative mRNA expression of other antioxidant enzymes catalase (*Cat*) and NQO-1 (*Nqo1*) in the cells treated for 6 h. Data are shown as mean ± SEM (n=3) ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. Control.

A



B

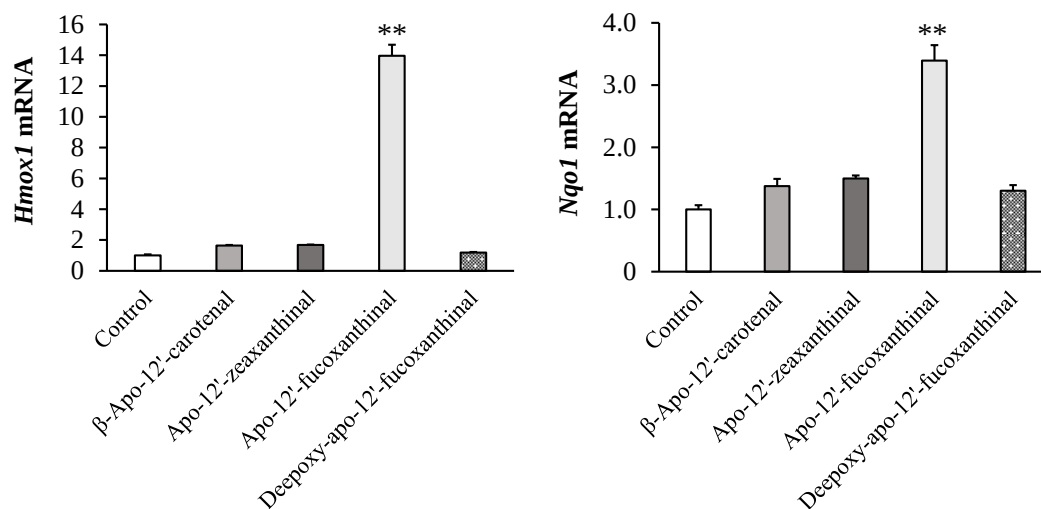


Figure 2.4 Apo-12'-fucoxanthinal upregulates *Hmox1* and *Nqo1* mRNA expression depending on its characteristic structure in RAW264.7 macrophages.

(A) Molecular structure of apocarotenoids used in this experiment. (B) The cells were treated with each apocarotenoid (2.5 μ M) for 6 h. *Hmox1* and *Nqo1* mRNA levels were quantified by RT-qPCR. *Gapdh* was used as endogenous control. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01 vs. Control.

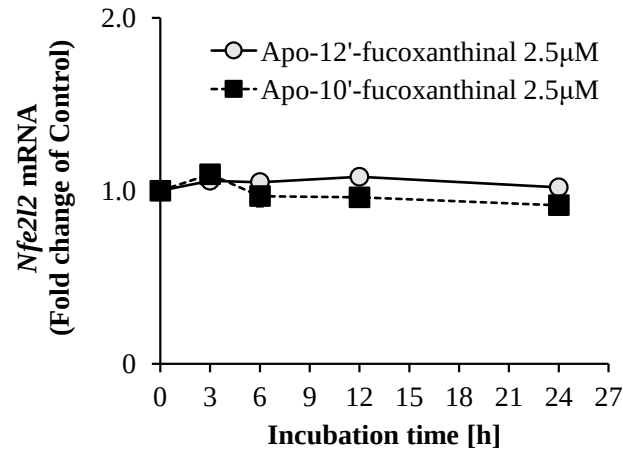
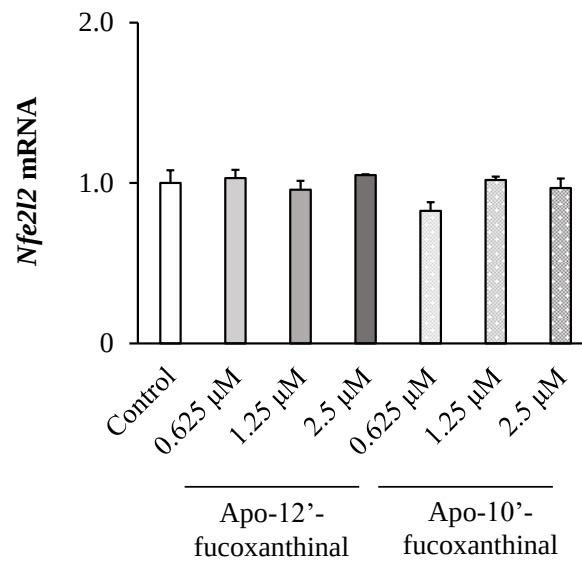
A**B**

Figure 2.5 The mRNA expression of Nrf2 (*Nfe2l2*) is not influenced by apo-fucoxanthinal treatment in RAW264.7 macrophages.

(A) Time-course experiment of *Nfe2l2* mRNA expression in the cells treated with apo-12'- and apo-10'-fucoxanthinals (2.5 μM). (B) *Nfe2l2* mRNA expression level in the cells treated with apo-12'- and apo-10'-fucoxanthinals for 6 h. The mRNA levels were quantified by RT-qPCR. *Gapdh* was used as endogenous control.

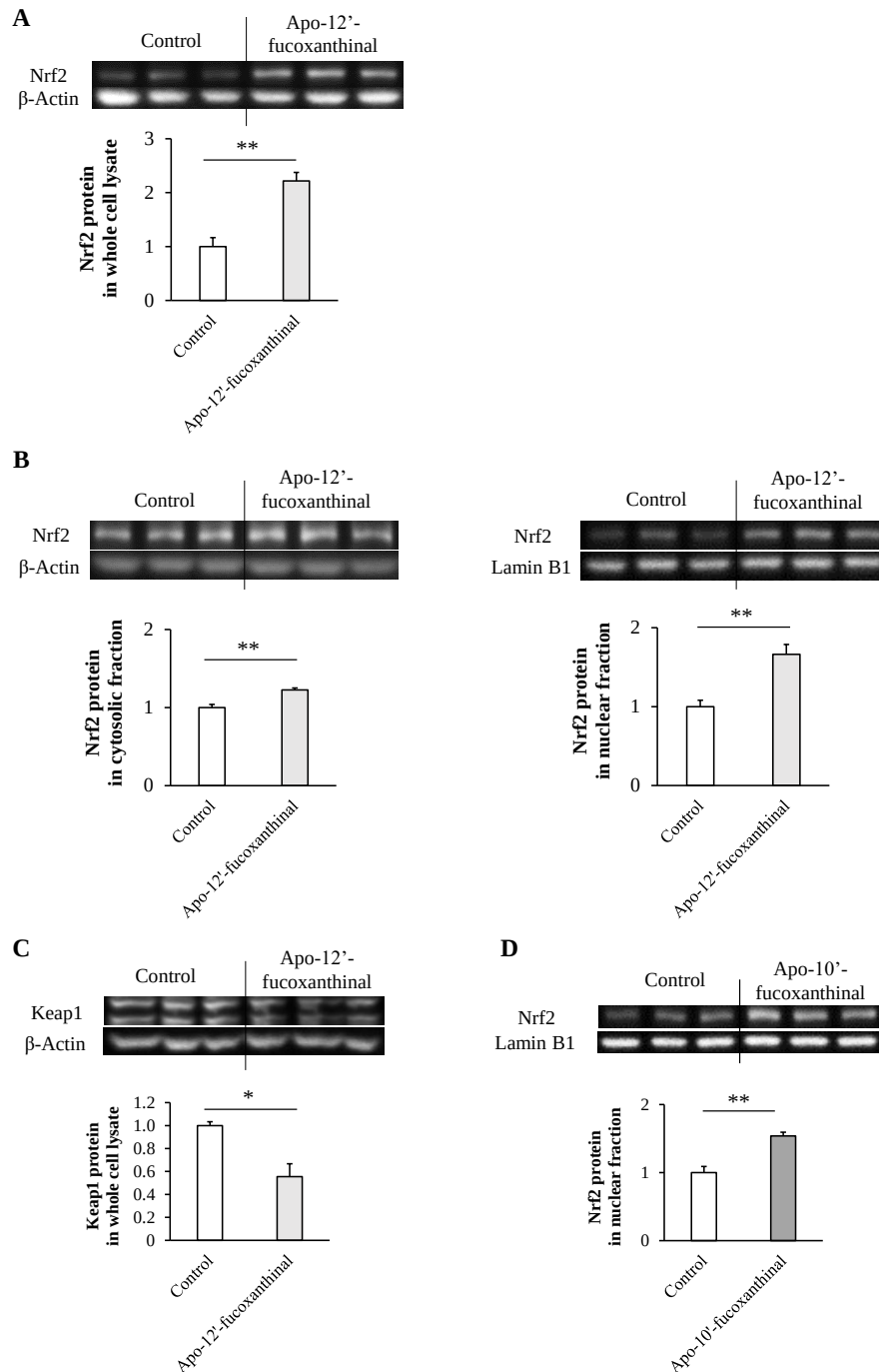


Figure 2.6 Apo-fucoanthinals regulate Nrf2 activation in RAW264.7 macrophages.

(A and B) Nrf2 protein levels in the cells treated with apo-12'-fucoxanthinal (2.5 μ M) for 2 h. (A) Whole cell lysate. (B, left) Cytosolic fraction. (B, right) Nuclear fraction. (C) Keap1 protein levels in whole cell lysate of the cells treated with apo-12'-fucoxanthinal (2.5 μ M). (D) Nuclear Nrf2 protein levels in the cells treated with apo-10'-fucoxanthinal (2.5 μ M). Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01, * p < 0.05.

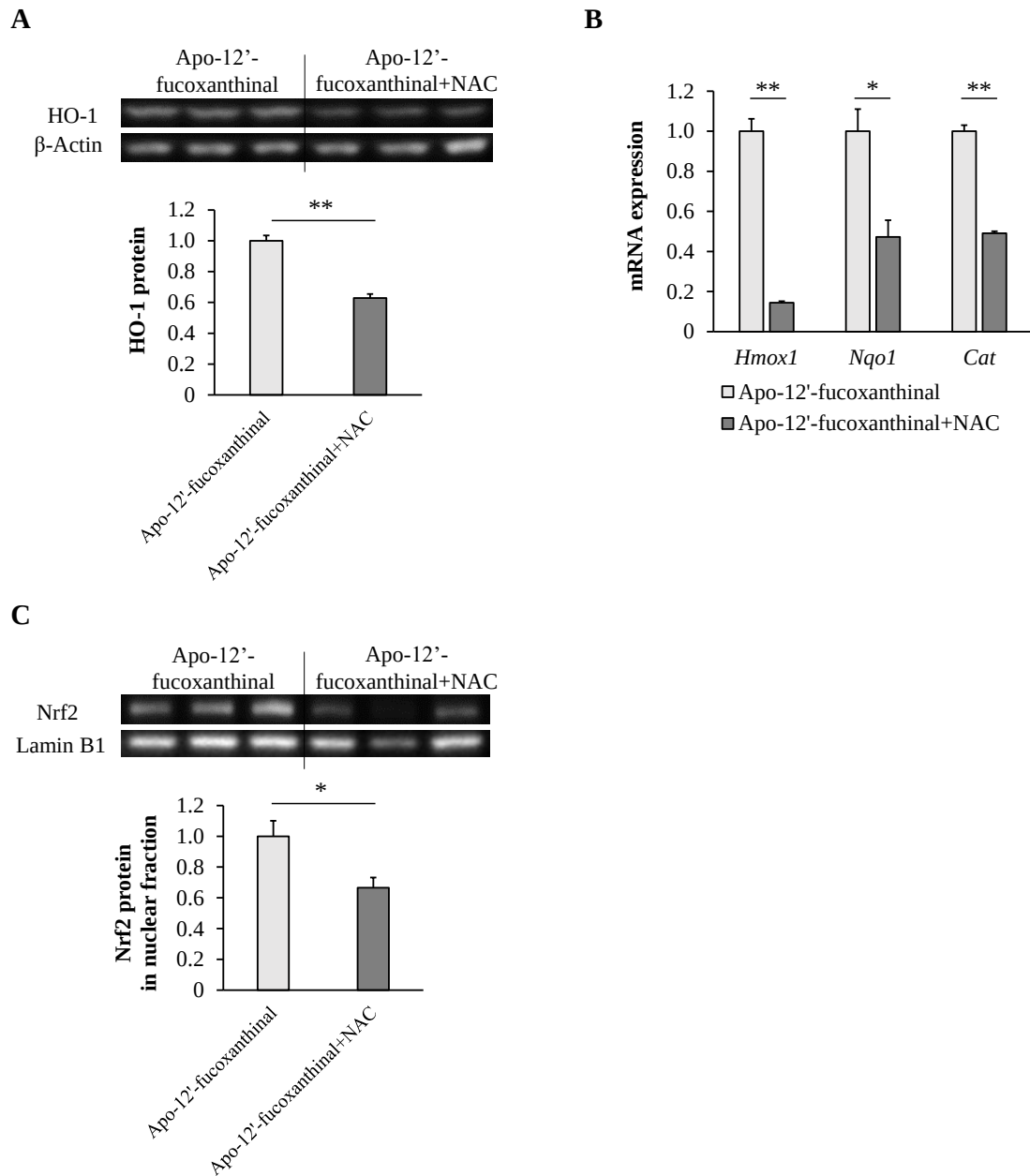


Figure 2.7 *N*-acetyl-cysteine (NAC) inhibits the expression of antioxidant enzyme and the nuclear accumulation of Nrf2 induced by apo-12'-fucoxanthinal in RAW264.7 macrophages.

The cells were treated with apo-12'-fucoxanthinal (2.5 μ M) for 6 h (A and B) or 2 h (C) in the presence or absence of NAC (1 mM). (A) HO-1 protein level in whole lysate. (B) Relative mRNA expression of each antioxidant enzyme. *Gapdh* was used as endogenous control. (C) Nuclear Nrf2 levels. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01, * p < 0.05.

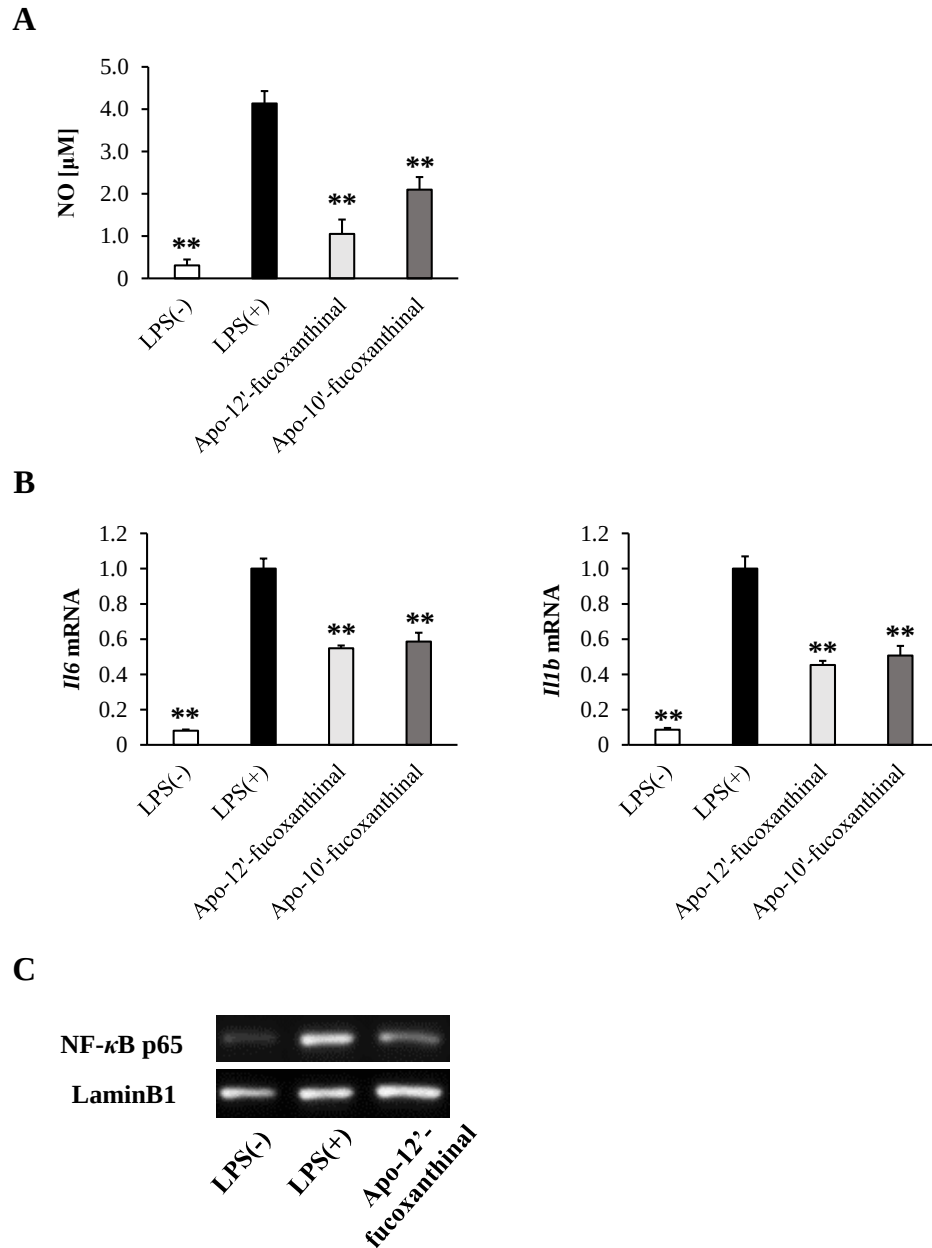


Figure 2.8 Apo-fucoxanthinals exert anti-inflammatory action against LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.

The cells were treated each apo-fucoxanthinal (2.5 μ M) for 24 h and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h (A), 6 h (B), or 2 h (C) in the presence or absence of apo-fucoxanthinal. (A) NO level in the culture media. (B) Relative mRNA expression of inflammatory cytokines. *Rps18* was used as endogenous control. (C) Nuclear NF- κ B p65 level. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3) ** p < 0.01 vs. LPS (+).

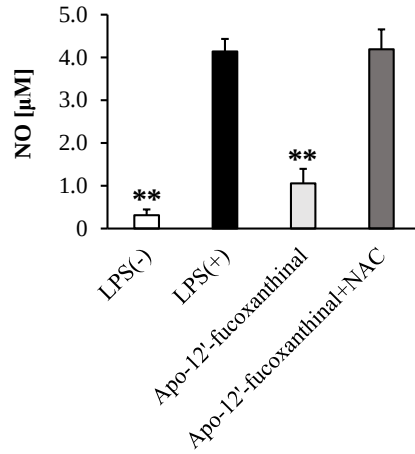
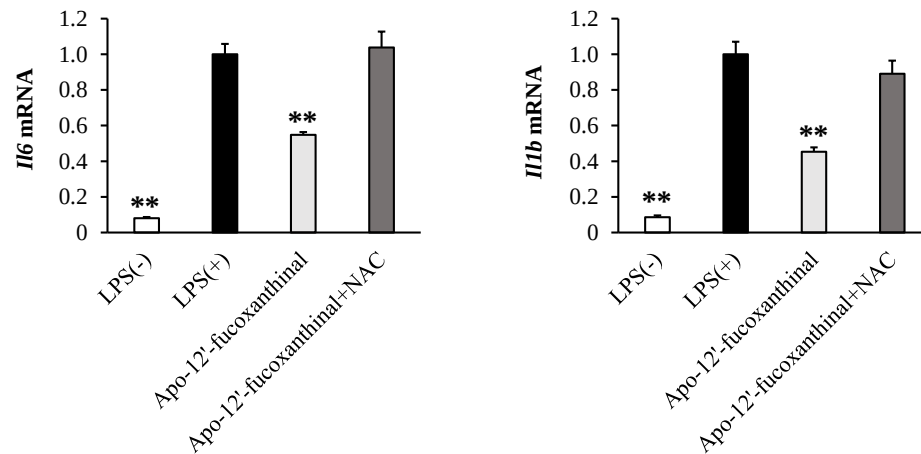
A**B**

Figure 2.9 Anti-inflammatory activity of apo-12'-fucoxanthinal against LPS-stimulated RAW264.7 macrophages is cancelled in the presence of NAC.

The cells were treated apo-12'-fucoxanthinal (2.5 μM) and NAC (1 mM) for 24 h followed by stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h (A) and 6 h (B). (A) NO level in the culture media. (B) Relative mRNA expression of inflammatory cytokines. *Rps18* was used as endogenous control. Data are shown as mean ± SEM (n=3) ** $p < 0.01$ vs. LPS (+).

第3章

β-カロテン由来アポカロテノイドの調製と抗炎症機構解析

序論

β-カロテンは野菜や果物、海藻などに広く含まれ、自然界で最も豊富なカロテノイドの一つである。8つのイソプレヌユニットが直鎖上に結合した共役ポリエン骨格に、両末端が環化(β-イオノン環)された構造を持ち、炭素および水素原子から構成されるカロテン類に分類される(**Figure 3.2**)。これまでに、抗酸化活性をはじめ、プロビタミン A 活性や抗がん作用、生活習慣病予防作用など多様な生理機能が報告されている^{95,96)}。

β-カロテン由来アポカロテノイド(β-アポカロテノイド)のうち、最もよく調べられているものは、レチノイド(ビタミン A)である。レチノイドはβ-カロテンの共役ポリエン直鎖上の中央部(C-15,15'位)における酸化的開裂によって生成し、視覚⁹⁷⁾や生殖⁹⁸⁾、免疫⁹⁹⁾など多様かつ重要な生理プロセスに関わる。一方、レチノイド以外のβ-アポカロテノイドに関する報告も複数ある。β-Apo-12'-carotenal や β-apo-10'-carotenal などをはじめとする種々の鎖長を持つβ-アポカロテノイドが、ヒト血中などの生体組織中に見出される^{48,49)}のみならず、生鮮野菜や加工食品中にも含まれることが明らかとなっている¹⁰⁰⁾。また、β-apo-8'-carotenal は食品添加物として食用色素に使用されている¹⁰¹⁾。β-アポカロテノイドは BCO1 や BCO2 により酵素的に生成されるのみならず、非酵素的にも容易に生成する。β-カロテンの自動酸化²⁵⁾や熱分解²⁶⁾、そして食品製造加工中に一連のβ-アポカロテノイドが生成する。さらに、過マンガン酸カリウム^{29,102)}やオゾン¹⁰³⁾などの酸化剤を用いたβ-カロテンの酸化開裂反応によるβ-アポカロテノイドの調製についても報告がある。このように、レチノイドを含むβ-アポカロテノイドは、生体組織のみならず食品や製造加工においてもその存在が広く認められることが分かってきており、β-アポカロテノイドの生理活性を明らかにすることは、カロテノイドによる健康機能性を考える上で重要であると思われる。しかしながら、β-アポカ

ロテノイドの生理機能に関する報告は β -apo-13'-carotenone や β -apo-14'-carotenal による核内受容体アンタゴニスト作用など一部に限られており^{36,104)}、様々な疾患の発症基盤にある炎症に対する影響を調べた例はない。そこで、本章では β -アポカロテノイドによる炎症抑制機能について明らかにすることを目的に、酸化剤を用いた化学的酸化反応により調製した β -アポカロテノイドの分子構造を決定するとともに、炎症誘導したマクロファージに対する抗炎症機能を検証した。さらに、類縁構造を持つ β -アポカロテノイドとの比較により抗炎症機能に関与する活性分子構造を推定した⁵¹⁾。

実験方法

3.1 試料と方法

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞は European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)から入手したものをを用いた。 β -カロテンは富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。 β -Apo-8'-carotenal は Sigma-Aldrich Japan より購入した。Anti-I κ B α 抗体(10268-1-AP)は Proteintech Group Inc.より、anti-phospho-I κ B α (Ser32/36) (5A5)抗体(#9246S)、anti-SAPK/JNK 抗体(#9252S)および anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)抗体(#9251S)は Cell Signaling Technology, Inc.より購入した。その他の試薬は前章までと同様のものをを用いた。

3.2 β -カロテン開裂物の調製およびクロマトグラフィー分析

β -カロテン 5 mg と cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 0.8 mg をクロロホルム 40 mL に溶解し、過マンガン酸カリウム水溶液(180 mg/ 10 mL 水)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応後、クロロホルム/メタノール/水(10:5:3, v/v/v)にて液相分離を行い、クロロホルム層(下層)を回収した。薄層クロマトグラフィー(thin layer chromatography, TLC)分析は、RP-18 F_{254S} plate (Merck KGaA)上でメタノールを用いて展開した。また、HPLC 分析は以下に示す条件にて行った。

ポンプ：LC-20AD (株式会社島津製作所)

検出器：SPD-M20A (株式会社島津製作所)

カラム：Develosil C30-UG-5 (250 × 4.6 mm、野村化学株式会社)

温 度：30°C

移動相：メタノール

流 量：1.0 mL/min

3.3 β -カロテン開裂物の液体クロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析

β -カロテン開裂物の LC-MS 分析は、トリプル四重極型システム LCMS8040 (株式会社島津製作所)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法によるポジティブイオンモードにて行った。ネブライザーガス流量 2.0 L/min、ドライイングガス流量 15.0 L/min、DL 温度 250°C、ヒートブロック温度 400°C の環境下で、 m/z 50–700 の範囲で全イオンモニタリングを行った。その他 LC 部で用いた装置、カラム、溶媒等は以下の通り。

ポンプ：LC-10AD (株式会社島津製作所)

検出器：SPD-20A (株式会社島津製作所)

カラム：Develosil ODS-UG-3 (150 × 2.0 mm、野村化学株式会社)

温度：30°C

移動相：メタノール

流量：0.2 mL/min

3.4 核磁気共鳴分光法(nuclear magnetic resonance, NMR)

^1H -NMR (500 MHz)および ^{13}C -NMR (125 MHz)分析は、UNITY INOVA 500 spectrometer (Varian Medical Systems)を用いて、重クロロホルム溶液で行った。NMR 分析およびスペクトル解析は、一般財団法人 生産開発科学研究所 眞岡孝至博士のご協力のもと行われた。

3.5 細胞培養

1.2.4 と同様の培地で培養を行った。RAW264.7 細胞を播種(5×10^4 cells/mL)して 24 時間前培養を行った後、DMSO に溶解したカロテノイドを 2 時間処置した。次いで、同濃度のカロテノイド存在下で LPS(終濃度 100 ng/mL)を処置して一定時間培養を行い、細胞および培養上清を回収した。

3.6 細胞毒性試験

β -カロテン開裂物の RAW264.7 細胞毒性への影響を WST-1 アッセイにより調べた。すなわち、RAW264.7 細胞を 96-well マイクロプレートに播種して 24 時間前培養を行った後、種々の濃度に調整したカロテノイドを 24 時間処置した。その後 WST-1 試薬 10 μ L を加え、37°C にて 2 時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーにて 450 nm における吸光度を測定した。ブランクとして、細胞を含まない培地にカロテノイドを添加して、その吸光度を測定した。

3.7 RAW264.7 細胞培養上清中の NO 濃度の測定

LPS で 24 時間処置した RAW264.7 細胞の培養上清中の NO 濃度は、2.5 と同様の方法で測定した。

3.8 RAW264.7 細胞における炎症性因子の mRNA 発現解析

LPS で 6 時間処置した RAW264.7 細胞における炎症関連因子の mRNA 発現解析は、1.2.5 と同様の方法で行った。各 mRNA 発現に使用したプライマーは以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
Chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

3.9 RAW264.7 細胞における炎症関連因子のタンパク質発現解析

LPS で 30 分あるいは 2 時間処置した RAW264.7 細胞における炎症関連因子のタンパク質発現解析は、2.4 と同様の方法で行った。尚、一次抗体の希釈率はそれぞれ、JNK; 1:2500、

phospho-JNK; 1:2000、NF- κ B p65; 1:2500、I κ B α ; 1:5000、phospho-I κ B α ; 1:3000、 β -actin; 1:3000、lamin B1; 1:3000 で、二次抗体は 1:20000 の希釈率で使用した。

3.10 RAW264.7 細胞培養上清中の IL-6、IL-1 β 、MCP-1 濃度の測定

LPS で 24 時間処置した RAW264.7 細胞の培養上清中の IL-6、IL-1 β および MCP-1 濃度は、それぞれ Mouse IL-6 Uncoated ELISA kit、Mouse IL-1 β Uncoated ELISA kit および Mouse MCP-1 Uncoated ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて、添付の使用説明書に従い測定した。操作は、1.1.8 と同様に行った。

3.11 統計

データは平均 $\pm$ SEM で示した。統計計算は一元配置分散分析を行ったのち、*Tukey-Kramer* の多重比較法を用いた。有意水準は 5%とした。

結果および考察

In vitro 酸化反応による β -カロテン開裂物の調製

β -カロテンを KMnO_4 にて 3 時間酸化後、TLC にて酸化生成物を確認したところ、 β -カロテンとは異なる移動度に複数のスポットが観察された(**Figure 3.1 (A)**)。これらの酸化分解物のうち、アスタリスクを付した橙赤色のスポットに相当し、HPLC クロマトグラム上で最大を示した Peak1 (**Figure 3.1 (B)**)に着目し分析を進めた。Peak1 において、極大吸収波長 462 nm を示す(**Figure 3.1 (B) inset**)とともに、分子イオンピーク 449.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ やナトリウムが付加した 471.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ のイオンを認めた(**Figure 3.1 (C)**)。この Peak1 (30 μg)を同定するため、 β -カロテンの酸化分解を繰り返し行い、Peak1 1 mg を分取した後、NMR 分析に供した。 ^1H -NMR ピークの帰属は、 ^1H - ^1H COSY ならびに NOESY スペクトルおよびカロテノイドの末端構造に関する既報 ^1H -NMR データ¹⁰⁵⁾との比較により行った(**Table 3.1**, **Supplementary Figure 3.1-4**)。 ^1H -NMR スペクトルにおいて、7 つのメチル基、6 つのメチレン基、12 のオレフィンメチン基、および 1 つのアルデヒド基を認めた。一方、 δ 1.17 (H_3 -16 および H_3 -17) ならびに δ 2.11 (H_3 -18)のメチルシグナル、それぞれ δ ~1.54 (H_2 -2)、 δ ~1.49 (H_2 -3)、 δ 2.40 (H_2 -4)のメチレンシグナル、 δ 6.55 (H -7)および δ 7.40 (H -8)のメチンシグナルは、本化合物の末端構造に seco- β エンドグループを有することを示している¹⁰⁵⁾。また、特徴的なアルデヒドシグナルである δ 9.46 は、ポリエン鎖末端の H -8'位に帰属された。ポリエン鎖構造(H -19, 20, 19', 20'位のメチル基を含む H -7 から H -10'位間の直鎖構造)の ^1H -NMR シグナルおよびその all-*E* (*trans*)型の立体配置は ^1H - ^1H COSY ならびに NOESY 解析より決定した。以上より、本化合物を、seco- β -apo-8'-carotenal ((2*E*,4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*,14*E*,16*E*)-2,6,11,15,19,19-hexamethyl-18,23-dioxo-2,4,6,8,10,12,14,16-tetracosaoctaenal)と同定した(**Figure 3.2 (A)**)。Gurak ら¹⁰²⁾もまた、 β -カロテンの KMnO_4 酸化生成物中に本化合物と同等の分子イオンピークを有する開裂物を推定したが、その分析は LC-MS のみで構造決定はなされていなかった。したがって、

本研究により初めて seco- β -apo-8'-carotenal の構造を同定した。Rodriguez and Rodriguez-Amaya ら²⁹⁾は、KMnO₄ によるカロテノイドの酸化開裂機序として、ポリエン鎖上の二重結合の位置で *E* 型から *Z* 型へのシス-トランス異性化に続いて、過マンガン酸イオンが *syn* 付加することで環状の過マンガン酸エステルが形成され、最終的に二重結合が開裂することにより、一連の鎖長の β -アポカロテナールが生成すると推定しており、 β -イオノン環上の *Z* 型二重結合部位(C5,6 および C5',6'位)への反応を介して開環型(Seco 型)アポカロテノイドが生成したと予想される。

現時点で seco 型カロテノイドのヒト生体組織における存在に関する報告はない。しかしながら、植物種子や葉¹⁰⁶⁾、シジミやカキ等の食用二枚貝¹⁰⁷⁾から seco 型カロテノイドが見出されている。一方、食用色素として使用されているアポカロテノイドの β -apo-8'-carotenal は経口投与後、生体組織にて β -apo-8'-carotenal や酸化された β -apo-8'-carotenoic acid、あるいは還元型の β -apo-8'-carotenol として見出される¹⁰¹⁾。Seco 型アポカロテノイドの調製法の確立や、これを用いた生体内代謝物の同定は代謝研究にも有用であり、さらなる進展が期待される。

RAW264.7 細胞への LPS 刺激により誘導される炎症性因子の過剰産生に対する seco- β -apo-8'-carotenal の抑制作用

β -アポカロテノイドのうち、いくつかの化合物は核内受容体アンタゴニストとして働くことが報告されているものの、炎症に対する抑制機能を検討した例はない。そこで、LPS により炎症誘導した RAW264.7 細胞中の炎症性因子産生に対する、seco- β -apo-8'-carotenal の阻害能を評価した。まずは、細胞生存に与える seco- β -apo-8'-carotenal の影響を調べるため、WST-1 法による細胞生存率を算出したところ、seco- β -apo-8'-carotenal 5 μ M では毒性は認められない一方で、10 μ M では 60%まで生存率が低下した(Figure 3.3)。従って、以降の実験では 5 μ M 以下の濃度で実験を行った。LPS 刺激により、炎症性因子である MCP-1 および NO の

産生量が増加したが、seco- β -apo-8'-carotenal 処置群では有意に低値を示した(**Table 3.2**)。一方、完全鎖長を有する β -カロテンは NO 産生に対する阻害活性は示したものの、MCP-1 の過剰産生を抑制しなかった(**Table 3.2**)。以上の結果は、 β -カロテンは酸化開裂を受けることによって抗炎症能が増強される可能性を示している(**Figure 3.2**)。次に、抗炎症活性に寄与する部分構造を明らかにするため、seco- β -apo-8'-carotenal と類似の構造を有する β -apo-8'-carotenal との比較を行った。本化合物は seco- β -apo-8'-carotenal と同様に C-7'-8'位で開裂した構造を持ち、閉環した β -イオノン環を有する(**Figure 3.2 (C)**)。Seco- β -apo-8'-carotenal は、LPS によって著増する培地中 IL-6、IL-1 β 、NO および MCP-1 レベルを有意に減少させるとともに、これら因子の mRNA 発現レベル(*Il6*, *Il1b*, *Ccl2*)も低下させた(**Figure 3.4**)。このことは seco- β -apo-8'-carotenal が炎症性因子の mRNA 発現制御を介してタンパク質産生を阻害することを示している。対照的に、閉環 β -イオノン環を有する β -apo-8'-carotenal ではいずれの炎症性因子に対しても、mRNA 発現およびタンパク質産生ともに抑制作用が認められなかった(**Figure 3.4**)。以上より、seco- β -apo-8'-carotenal の開環構造は、RAW264.7 細胞における炎症抑制活性に重要な役割を持つことが推察される。

先述のように、seco- β -apo-8'-carotenal は炎症性因子の mRNA 発現制御を介してタンパク質産生を阻害することが推察されたため、炎症に関わるシグナル伝達経路に与える seco- β -apo-8'-carotenal の影響を検討した(**Figure 3.5**)。主要な炎症関連シグナル伝達経路である mitogen activated kinases (MAPK)ファミリーの一つである c-Jun-N-terminal kinase (JNK)は、LPS 等の炎症刺激によりリン酸化を受けると、c-Jun 等の下流の因子のリン酸化を介して炎症性因子の遺伝子発現を誘導する¹⁰⁸⁾。**Figure 3.5 (A)**に示されるように、seco- β -apo-8'-carotenal は、LPS による JNK のリン酸化レベルの上昇を有意に抑制した。一方、NF- κ B 経路もまた主要な炎症シグナルである。LPS 等の炎症刺激により、I κ B kinase (IKK)によって I κ B がリン酸化されると、I κ B の分解に伴って、捕捉されていた p50/p65 複合体が遊離する。次いで、p50/p65 複合体は細胞質から核内へと移行し、転写因子として働き炎症性遺伝子の

発現を促進する¹⁰⁹⁾。LPS は I κ B のリン酸化とともに I κ B の分解を促進するが、seco- β -apo-8'-carotenal 処置により、I κ B のリン酸化と分解が減弱した(**Figure 3.5 (A)**)。さらに、seco- β -apo-8'-carotenal は LPS 処置によって誘導される NF- κ B p65 の核内蓄積に対して顕著な阻害作用を示した(**Figure 3.5 (B)**)。以上より、seco- β -apo-8'-carotenal の抗炎症メカニズムとして、MAPK 経路の JNK および NF- κ B 経路の I κ B におけるリン酸化阻害と、NF- κ B p65 の核内蓄積の阻害を介して炎症性因子の mRNA 発現を抑制することが示唆される。

Seco- β -apo-8'-carotenal の分子構造において、 β -apo-8'-carotenal の β 環が開環することにより、新たに α,β -不飽和カルボニル基が導入されているという特徴をもつ(**Figure 3.2**)。炎症抑制活性と α,β -不飽和カルボニル基の関連が示されている¹¹⁰⁾。 β -Apo-8'-carotenal にも共役ポリエン部分の末端に α,β -不飽和カルボニル基をもつが、本実験において抗炎症作用が認められなかったことから、 β -アポカロテノイドの抗炎症機能発現には、少なくとも 2 つ以上の α,β -不飽和カルボニル基が必要であると思われる。Linnewiel-Hermoni ら¹¹¹⁾は、直鎖構造を持ち共役ポリエン部の両末端に α,β -不飽和アルデヒド基を有するリコペン誘導体が、がん細胞や骨細胞において、TNF α や MCP-1 の mRNA 発現を減弱させることを報告している。その分子メカニズムとして、リコペン誘導体分子内の α,β -不飽和カルボニル基の反応性 β 炭素と IKK β タンパク質のチオール基とのマイケル付加を介した修飾により酵素活性が減弱する結果、NF- κ B p65 の核内移行を抑制すること、さらに NF- κ B p65 タンパク質のチオール基にも作用して DNA 結合活性を低下させることが推察されている。興味深いことに、それらリコペン誘導体の構造は、直鎖構造で共役ポリエン部両末端に α,β -不飽和カルボニル基を有するという点で、seco- β -apo-8'-carotenal の分子構造と類似している。**Figure 3.5** に示されるように、seco- β -apo-8'-carotenal もまた I κ B のリン酸化および NF- κ B p65 の核内蓄積を抑制した。これらの結果は、seco- β -apo-8'-carotenal が IKK β 等の細胞内タンパク質のチオール基と相互作用することによって、炎症性因子の発現を制御するメカニズムを予想させる。

以上、本研究では、 β -カロテン由来アポカロテノイドとして、 β -カロテンの C-7',8'位および β -イオノン環の C-5,6 位で開裂した、*seco*- β -apo-8'-carotenal を調製し、その分子構造を初めて決定した。LPS により炎症誘導した RAW264.7 細胞において、*seco*- β -apo-8'-carotenal は MAPK や NF- κ B シグナル経路を阻害することにより、炎症性因子の過剰産生を抑制した。一方で、閉環構造を有する β -apo-8'-carotenal では抗炎症活性は認められなかったことから、*seco*- β -apo-8'-carotenal の炎症抑制能は β -イオノン環が開環した部分構造に依存している可能性が考えられる。本実験により、 β -アポカロテノイドによる抗炎症作用という新たな細胞機能を明らかにした。また、これまで *seco* 型カロテノイドの機能性についての知見はなかったが、自然界に見られる *seco* 型カロテノイドの生理的意義や役割の理解への一助になることが期待される。

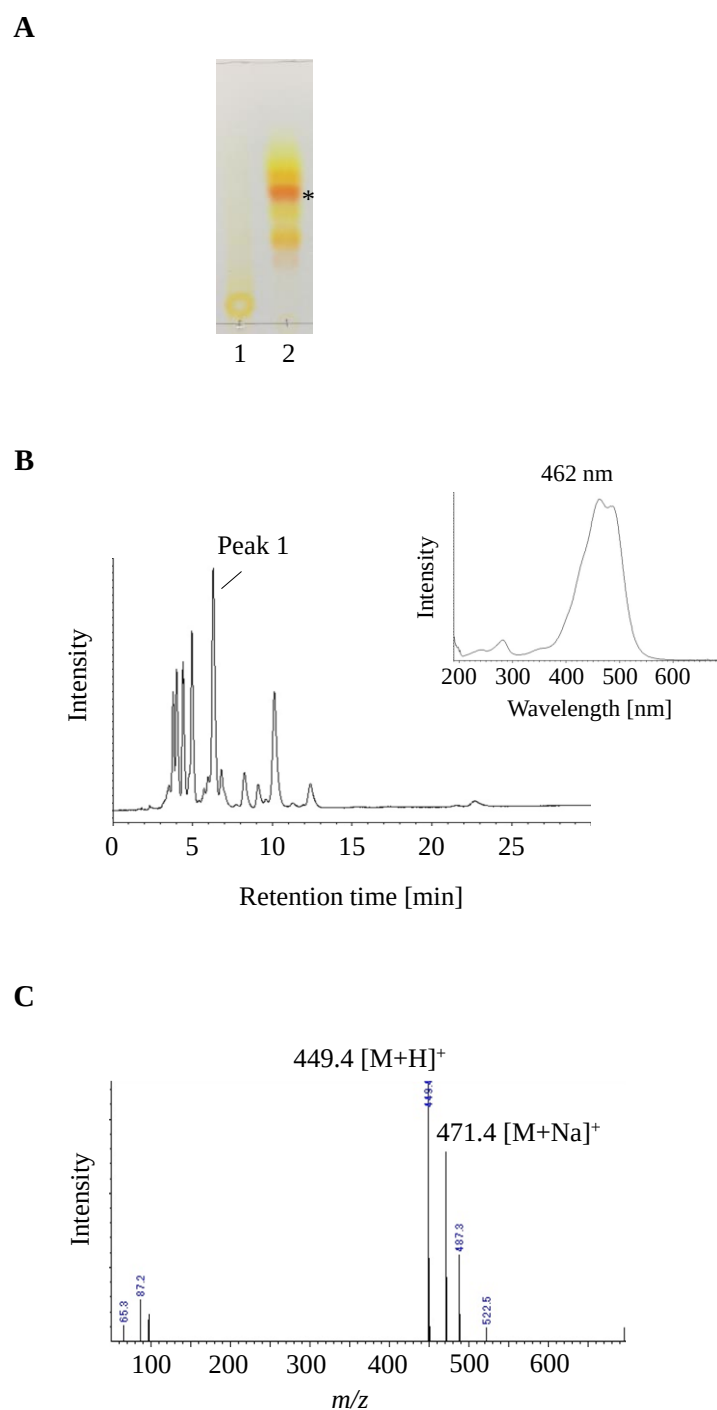


Figure 3.1 Analysis of β -carotene oxidation products by KMnO_4 .

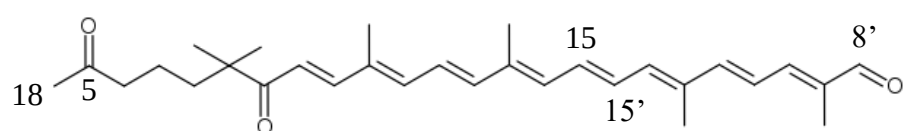
(A) Reverse-phase TLC chromatogram. Lane 1: β -carotene authentic standard. Lane 2: β -carotene oxidation mixture. The asterisk represents the spot corresponding to Peak 1 in HPLC. (B) Reverse-phase HPLC chromatogram of β -carotene oxidation products at 450 nm. (C) MS spectrum of Peak 1.

Table 3.1 NMR spectra of seco- β -apo-8'-carotenal (Peak 1)

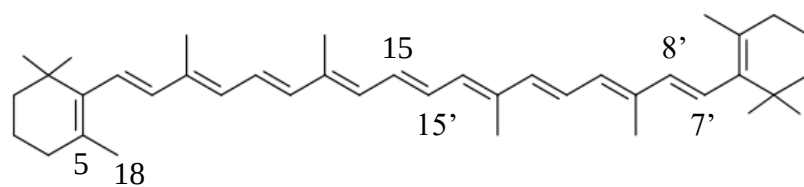
Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ mult. <i>J</i> Hz
1	46.4	
2	39.3	~1.54 m
3	19.2	~1.49 m
4	44.0	2.40 t (7)
5	208.7	
6	204.0	
7	119.3	6.55 d (15)
8	147.3	7.40 d (15)
9	134.5	
10	140.2	6.56 d (11)
11	125.1	6.68 dd (15, 11)
12	137.1	6.53 d (15)
13	137.1	
14	132.5	6.37 d (11)
15	130.7	6.77 dd (15, 11)
16	24.5	1.17 s
17	24.5	1.17 s
18	29.7	2.11 s
19	12.9	1.99 s
20	12.9	2.01 s
8'	194.5	9.46 s
9'	136.2	
10'	149.0	6.94 d (11)
11'	122.2	6.70 dd (15, 11)
12'	145.7	6.75 d (15)
13'	136.2	
14'	134.5	6.45 d (11)
15'	125.1	6.70 dd (15, 11)
19'	9.7	1.91 s
20'	12.9	2.02 s

m, multiplet; t, triplet; d, doublet; dd, doublet of doublets; s, singlet.

A



B



C

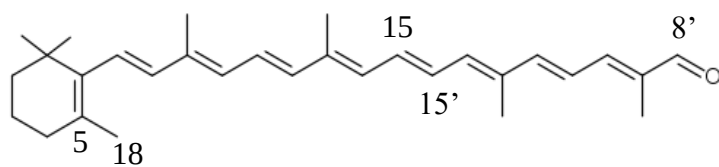


Figure 3.2 The molecular structure used in this study.

(A) Seco-β-apo-8'-carotenal. (B) β-Carotene. (C) β-Apo-8'-carotenal.

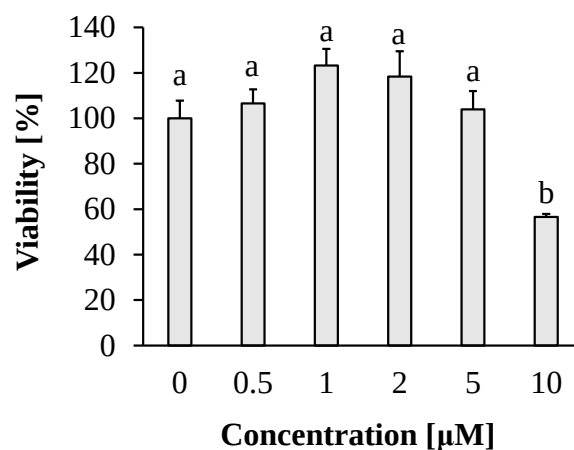


Figure 3.3 Cell viability of RAW264.7 macrophages treated with seco-β-apo-8'-carotenal. After treating cells with seco-β-apo-8'-carotenal at each concentration for 24 h, cell viability was determined by WST-1 assay. Data are mean ± SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3.2 Concentration of inflammatory mediators in the culture media of LPS-activated RAW264.7 macrophages treated with seco-β-apo-8'-carotenal (Seco).

	LPS(-)	LPS(+)	Seco	β-Carotene
NO [μM]	N.D. ^a	6.3 ± 0.5 ^b	0.4 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.3 ^a
MCP-1 [ng/ml]	19.6 ± 0.3 ^a	62.8 ± 2.50 ^b	23.1 ± 1.4 ^a	58.7 ± 2.6 ^b

The cells were treated with each carotenoid (4 μM) for 2 h followed by stimulated with LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of carotenoids for 24 h. Inflammatory factor secretion in the culture media was quantified by the Griess method (NO) and commercialized ELISA kits (MCP-1). Data are presented as mean ± SEM (n=3). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

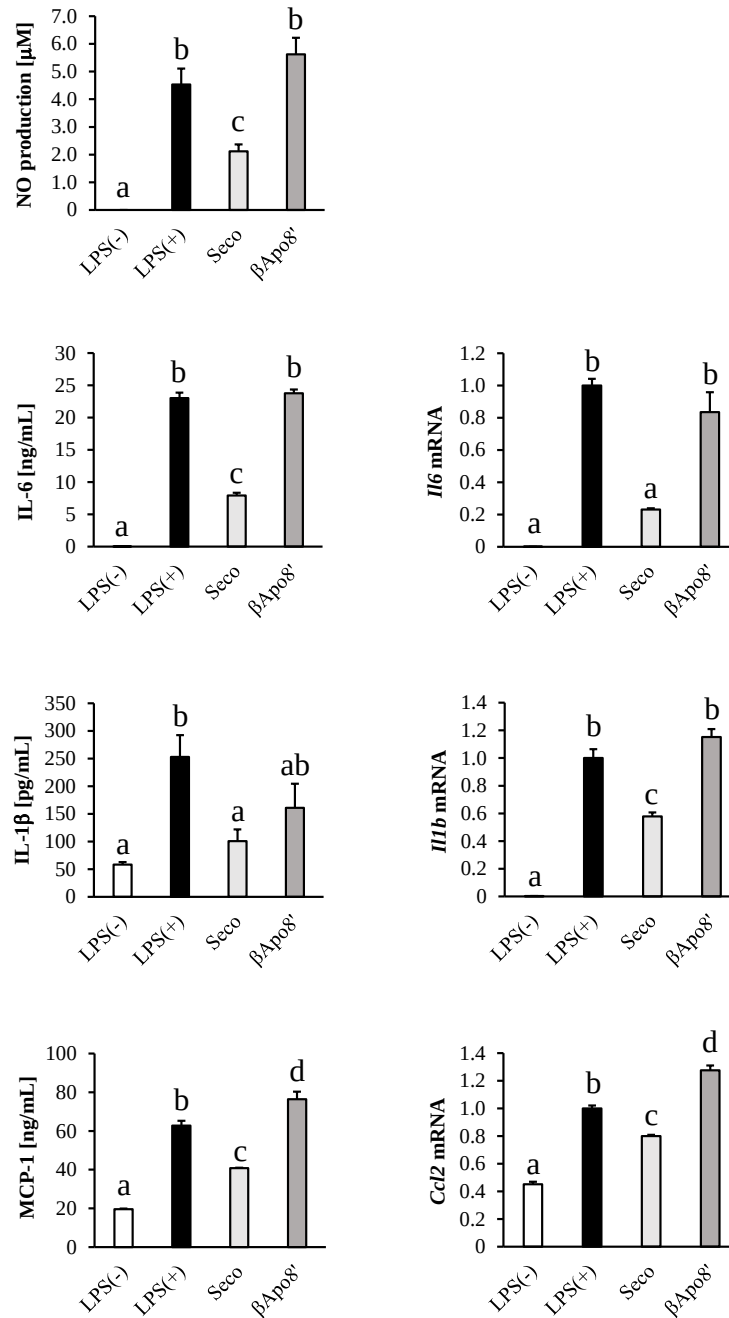


Figure 3.4 Seco-β-apo-8'-carotenal exerts anti-inflammatory effects on LPS-activated RAW264.7 macrophages.

The cells were treated with each carotenoid (5 μM; IL-6 and *Il6* mRNA, 2 μM; the others) for 2 h followed by stimulated with LPS (100 ng/mL). The levels of inflammatory factors in the culture media (left panels) and mRNA expression (right panels) after LPS stimulation for 24 h and 6 h, respectively. Data are mean ± SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Seco, seco-β-apo-8'-carotenal; βApo8', β-apo-8'-carotenal.

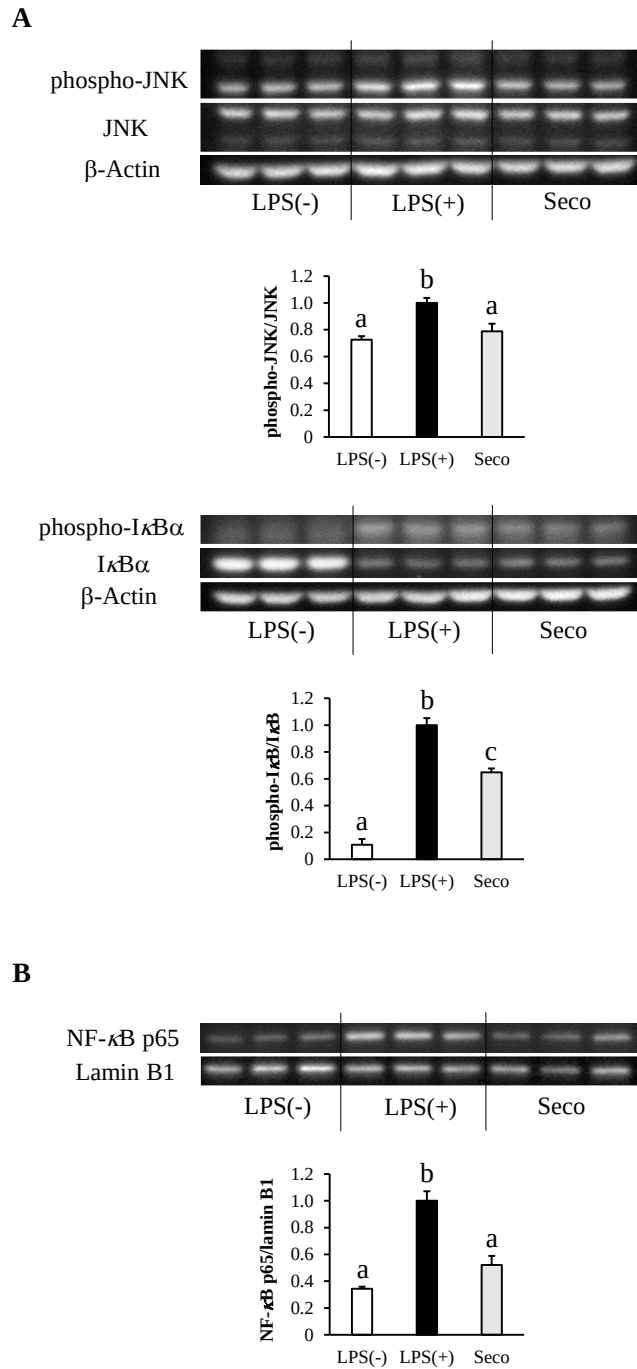


Figure 3.5 Seco-β-apo-8'-carotenal inhibits the phosphorylation of c-Jun-*N*-terminal kinase (JNK) and inhibitor of nuclear factor (NF)-κB (IκB) and the nuclear accumulation of NF-κB p65.

The cells were treated with seco-β-apo-8'-carotenal (4 μM) for 2 h and then stimulated with LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of seco-β-apo-8'-carotenal. Phosphorylation (A) and nuclear accumulation (B) levels of each protein after LPS stimulation for 30 min and 2 h, respectively. Data are mean ± SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Seco, seco-β-apo-8'-carotenal.

第4章

アスタキサンチン由来アポカロテノイドによる炎症抑制機能と脂肪細胞分化抑制能の解析

序論

アスタキサンチンは微細藻類や甲殻類、魚類に含まれ、深赤色を呈する海洋性カロテノイドである¹¹²⁾。多くのカロテノイドと同様に共役ポリエン直鎖の両末端に β -イオノン環を有しており、それら β -イオノン環のC-4(4')位にカルボニル基、C-3(3')位にヒドロキシ基を有する。アスタキサンチンは、強力な抗酸化活性に加えて、視覚に対する作用や心血管疾患抑制作用、脳機能改善作用など多様で優れた機能性を有しており、食品や化粧品など多くの分野で注目されている¹¹³⁻¹¹⁵⁾。

一方、アスタキサンチン由来アポカロテノイド(アポアスタキサンチノイド)についての知見は未だ多くない。アスタキサンチン投与したヒト血中やヒト培養肝細胞において、3-hydroxy-4-oxo- β -ionone および 3-hydroxy-4-oxo- β -ionol が見出される¹¹⁶⁾。最近、ヒト血中や初乳において、apo-zeaxanthinal、apo-luteinal、apo-capsorubinal、apo-canthaxanthinal などの種々の鎖長を有するゼアキサンチン、ルテイン、カプソルビン、カンタキサンチン由来アポカロテノイドが見出された^{48,49)}。また、いくつかの微細藻類においても、複数のキサントフィル由来アポカロテノイドの存在を認めている³⁴⁾。さらに、Hayakawa ら³¹⁾は、生体にも存在する活性窒素種であるペルオキシナイトライトとアスタキサンチンとの *in vitro* 反応生成物中に、apo-12'-astaxanthinal や apo-10'-astaxanthinal を見出した。加えて、Etoh ら²⁸⁾は、アスタキサンチンの自動酸化により、種々の鎖長を有するアポアスタキサンチノイドの生成を報告している。このように、キサントフィル由来のアポカロテノイドが生体組織や生物中に広く認められること、アスタキサンチンの非酵素的な開裂反応によりアポアスタキサンチノイドが容易に生成されることを踏まえると、アスタキサンチンの優れた健康機能性にアポアスタキサンチノイドが少なからず関与する可能性が考えられる。

肥満病態下の脂肪組織では、肥大化した脂肪細胞から $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、MCP-1 などの炎症性因子が過剰に分泌されるとともに、脂肪組織へのリンパ球やマクロファージなど免疫細胞の浸潤が増加している¹¹⁷⁾。浸潤した免疫細胞は、炎症性サイトカインや飽和脂肪酸を介して脂肪組織での炎症反応を促進する⁷⁾。これにより、さらなる免疫細胞の浸潤が誘発され、脂肪組織における炎症が増悪する。慢性炎症状態にある脂肪組織ではアディポサイトカインの産生調節が破綻しており、このような組織機能不全はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病やメタボリックシンドロームの発症進展に大きく関与すると考えられている¹¹⁸⁾。一方、経口摂取されたアスタキサンチンは、高脂肪食給餌マウスにおける内臓脂肪重量の増加を抑制すること¹¹⁹⁾、脂肪組織における炎症性因子の発現を抑制すること¹²⁰⁾が報告されている。さらに、アスタキサンチンは $\text{PPAR}\gamma$ の活性化阻害を介して、3T3-L1 脂肪細胞の分化を抑制する¹²¹⁾。以上の知見は、肥満や肥満に関連する炎症に対してアスタキサンチンが抑制的に働くことを示している。しかしながら、アポアスタキサンチノイドのこれらに対する作用は明らかでない。そこで、本章ではアポアスタキサンチノイドによる肥満や肥満に関わる炎症に対する抑制作用の検証を行った。第1節では *in vitro* 酸化反応によるアスタキサンチン由来アポカロテノイドの調製と同定を行い、それらアポアスタキサンチノイドを用いて、炎症誘導したマクロファージに対する抑制作用を検証した。さらに、マクロファージと脂肪細胞との共培養による肥満誘導性炎症モデルに対する抑制効果についても検討した。また、第2節では、肥満と密接に関わる脂肪細胞の分化に対するアポアスタキサンチノイドの抑制作用を検証した。

第 1 節

アスタキサンチン由来アポカロテノイドの調製と抗炎症機能解析

実験方法

4.1.1 試料と試薬

マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞は ATCC から、RAW264.7 細胞は ECACC から入手した。アスタキサンチンは富士フィルム和光純薬より購入した。3T3-L1 細胞を分化させるために使用した、insulin、dexamethasone および isobutylmethylxanthine (IBMX) は Sigma-Aldrich Japan より購入した。その他の試薬は前章までと同様のものを用いた。Apo-15-astaxanthinal 合成品、apo-14'-astaxanthinal 合成品および apo-12'-astaxanthinal 合成品は神戸薬科大学山野由美子准教授より供与頂いた(純度>99%)。

4.1.2 アスタキサンチン開裂物の調製

アスタキサンチン 5 mg と CTAB 0.8 mg をクロロホルム 40 mL に溶解し、過マンガン酸カリウム水溶液(180 mg/ 10 mL 水)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応後、クロロホルム/メタノール/水(10:5:3, v/v/v)にて液相分離を行い、クロロホルム層(下層)を回収した。

4.1.3 クロマトグラフィーおよび NMR

TLC および HPLC は 3.2、LC-MS は 3.3、NMR は 3.4 と同様の方法で行った。

4.1.4 細胞培養

RAW264.7 細胞の培養は 3.5 と同様の方法で行った。

マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞は、37°C、5% CO₂ 存在下で、10%(v/v) FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM にて培養を行った。3T3-L1 細胞を播

種してコンフルエントになるまで培養を行い(day 0)、新しい DMEM に交換してさらに 48 時間培養を行った(day 0-2)。その後、分化誘導培地 (differentiation mix; 1 μ M dexamethasone、0.5 mM IBMX、10 μ g/mL insulin を含む DMEM)に交換してさらに 48 時間培養を行った(day 2-4)。Day 4 において、維持培地(5 μ g/mL insulin を含む DMEM)に切り替えて 48 時間培養を行った(day 4-6)。維持培地への交換は 2 日毎に一回行った(day 6-8 および day 8-10)。Day 10 まで培養した 3T3-L1 細胞を更なる実験に供した。

4.1.5 3T3-L1 細胞と RAW264.7 細胞の接触共培養による炎症誘導

既報⁷⁾を基本とした方法にて行った。すなわち、4.1.4 に示した方法で分化させた 3T3-L1 脂肪細胞(day 10)の上に、RAW264.7 細胞を播種(1×10^5 cells/mL)し、カロテノイド(DMSO に溶解)存在下あるいは非存在下で 24 時間培養後、細胞および培養上清を回収した。対照区として、同じ細胞密度の 3T3-L1 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ単独で培養し、細胞および培養上清を回収後に両者を混合して用いた。対照区には DMSO を 0.1%になるように添加した。

4.1.6 RAW264.7 細胞由来条件培地(RAW264.7-conditioned media, RAW-CM)による 3T3-L1 脂肪細胞への炎症誘導

既報^{117,122)}を基本とした方法にて行った。すなわち、播種(5×10^4 cells/mL)した RAW264.7 細胞を DMEM にて 48 時間前培養を行った後、LPS(100 ng/mL)を含有あるいは非含有の DMEM に交換して 12 時間培養を行った。次いで、LPS を含まない DMEM に交換して 12 時間培養を行った後、培養上清を回収し、フィルターろ過(Millex-GP 0.22 μ m)して得られたろ液を RAW-CM とし、使用まで -80°C で保存した。尚、48 時間前培養後に LPS を含む DMEM で培養した細胞から得られた CM を RAW-CM(+), LPS を含まない DMEM で培養した細胞から得られた CM を RAW-CM(-)とした。4.1.4 に示した方法で分化させた 3T3-L1 脂肪細胞

(day 10)に RAW-CM を加えてカロテノイド(DMSO に溶解)存在下あるいは非存在下で 24 時間培養を行った後、細胞及び培養上清を回収した。RAW-CM(-)区には 0.1%になるよう DMSO を添加した。

4.1.7 細胞毒性試験

RAW264.7 細胞における毒性試験は、3.6 と同様の方法で行った。

3T3-L1 細胞における毒性試験は、4.1.4 に示した方法で分化させた 3T3-L1 脂肪細胞(day 10)をカロテノイドで 24 時間処置した後、3.6 と同様の方法で行った。

4.1.8 RAW264.7 細胞培養上清中の NO 濃度の測定

LPS で 24 時間処置した RAW264.7 細胞の培養上清中の NO 濃度は、2.5 と同様の方法で測定した。

4.1.9 細胞中の炎症性因子の mRNA 発現解析

細胞中の炎症関連因子の mRNA 発現解析は、1.2.5 と同様の方法で行った。使用したプライマーは以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [COX2]	<i>Ptgs2</i>	Mm00478374_m1
Nitric oxide synthase 2, inducible [iNOS]	<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
Actin, beta	<i>Actb</i>	Mm00607939_s1

4.1.10 培養上清中の IL-6、IL-1 β 、MCP-1 濃度の測定

LPS で 24 時間処置した RAW264.7 細胞の培養上清中の IL-6、IL-1 β および MCP-1 濃度、

RAW264.7 細胞と 3T3-L1 脂肪細胞を 24 時間共培養した後の上清中の IL-6 濃度、RAW-CM にて 3T3-L1 細胞を 24 時間培養した後の上清中の IL-6 濃度は、3.10 と同様の方法で測定した。

4.1.11 統計

データは平均 $\pm$ SEM で示した。統計計算は一元配置分散分析を行ったのち、*Tukey-Kramer* の多重比較法を用いた。有意水準は 5%とした。

結果および考察

In vitro 酸化反応によるアスタキサンチン開裂物の調製

アスタキサンチンを KMnO_4 にて 3 時間反応させた酸化生成物を TLC 分析に供したところ、反応前物質であるアスタキサンチンに加えて複数の新たなスポットが観察された (Figure 4.1.1 (A))。次に、このアスタキサンチン酸化生成物を、C30 カラムを用いた逆相 HPLC に供したところ、アスタキサンチンを含む 7 つのピークを分離することができた (Figure 4.1.1 (B))。Peak 1-6 が示す極大吸収波長は、いずれについてもアスタキサンチンのそれと比べて短波長側に有していた (Figure 4.1.1 (B))。加えて、アスタキサンチン酸化生成物の LC-MS 分析の結果から、Peak 1-6 はアスタキサンチン (分子量 596.8) よりも低分子量であることが示された (Figure 4.1.1 (C))。以上の結果と、自動酸化によるアスタキサンチン酸化生成物に関する Etoh ら²⁸⁾の既報の値と比較したところ、Peak 1-6 はアスタキサンチンの開裂物であることが予想された。そこで、合成標品を用いて HPLC 保持時間と吸収スペクトルの比較を行った結果、Peak 2、3、4 はそれぞれ apo-15-、apo-14'-、apo-12'-astaxanthinal と同定された。一方、Peak 1、5、6 を同定するため、アスタキサンチンの酸化分解と逆相 HPLC による精製を繰り返し、各々 1 mg を ^1H -NMR 分析に供した。その結果、Peak 1、5、6 はそれぞれ apo-11-、apo-10'-、apo-8'-astaxanthinal と同定された (Table 4.1.1、Supplementary Figure 4.1.1-9)。以上より、 KMnO_4 によるアスタキサンチンの酸化によって、apo-11-、apo-15-、apo-14'-、apo-12'-、apo-10'-、apo-8'-astaxanthinal を調製することができた (Figure 4.1.2)。一方、生体内アスタキサンチン開裂物に関するこれまでの報告は 3-hydroxy-4-oxo- β -ionone および 3-hydroxy-4-oxo- β -ionol が見出されているのみである¹¹⁶⁾。しかしながら、最近ヒト血中から多様なキサントフィル由来アポカロテノイドが同定されており、アポアスタキサンチノイドについても今後動物実験により検討する必要がある。今回得られた種々の鎖長のアポアスタキサンチノイドを標品として使用することで、アスタキサンチン生体内代謝について

更なる研究が期待できる。

RAW264.7 細胞への LPS 刺激により誘導される炎症性因子の過剰発現に対するアポアスタキサンチノイドの抑制作用

アスタキサンチン開裂物の抗炎症作用に関する知見は未だない。一方、アスタキサンチンは RAW264.7 細胞を LPS 刺激した際に分泌される NO に対して 5 μ M 以上の濃度で阻害能を示すことが報告されている¹²³⁾。そこで、まず本節では炎症に対するアポアスタキサンチノイドによる抑制活性を比較評価した。RAW264.7 細胞の生存に与えるアポアスタキサンチノイドの影響を調べるため、WST-1 法による細胞生存率を算出したところ、5 μ M の濃度では毒性は認められなかった(**Figure 4.1.3 (A)**)ため、5 μ M の濃度で各種実験を行った。RAW264.7 細胞をアポアスタキサンチノイドである apo-12'-astaxanthinal あるいは完全鎖長のアスタキサンチンで 2 時間前処置して LPS で 24 時間刺激を行った後、培養上清中の炎症性因子の濃度を測定した。その結果、apo-12'-astaxanthinal 処置により、いずれの炎症性因子についても過剰産生が強く阻害された(**Figure 4.1.4**)。一方、アスタキサンチンは IL-6 および NO の過剰産生を阻害した。しかしながら、5 μ M では IL-1 β および MCP-1 濃度の低下は認めなかった(**Figure 4.1.4**)。また、IL-6 および NO 産生への阻害活性において、apo-12'-astaxanthinal は、アスタキサンチンよりも強い活性を示した(**Figure 4.1.4**)。これらの結果は、アスタキサンチンの酸化開裂反応により、抗炎症活性が増強される可能性を示している。

アポアスタキサンチノイドによる抗炎症作用が示されたので、続いて種々の鎖長を有するアポアスタキサンチノイド間で、RAW264.7 細胞における炎症性因子の mRNA 発現に対する抑制能を比較した。**Figure 4.1.5** に示されるように、実験に供した全てのアポアスタキサンチノイドで、炎症性因子である *Il6*、*Il1b*、*Ptgs2* mRNA 発現上昇を抑制した。一方、*Nos2* mRNA レベルについては apo-10'-astaxanthinal 以外のアポアスタキサンチノイドで有意な低下が見られた(**Figure 4.1.5**)。アポアスタキサンチノイド間では、apo-11'-、apo-10'-、apo-8'-

astaxanthinal では同程度の活性が認められる一方、apo-12'-および apo-14'-astaxanthinal ではより強い阻害活性を示した。また、*Il1b* mRNA 発現レベルにおいて、apo-12'-astaxanthinal 処置では apo-14'-astaxanthinal 処置の場合よりも有意に低値を示した(**Figure 4.1.5**)。以上より、LPS により炎症誘導された RAW264.7 細胞において、種々の鎖長のアポアスタキサンチノイドは炎症性因子の mRNA 発現を制御すること、そしてその抑制活性の程度には鎖長が関連する可能性が示唆された。

マクロファージと脂肪細胞間の相互作用に対するアポアスタキサンチノイドの制御能

肥満やインスリン抵抗性は、脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞の相互作用によって生じる炎症と関連する。脂肪細胞から分泌される IL-6 は血中におけるその 30%以上を占めるが、肥満病態下ではさらにその濃度が増加する¹²⁴⁾。IL-6 は肝臓や脂肪組織のインスリン抵抗性を惹起する¹²⁵⁾。先の実験では、アポアスタキサンチノイドがマクロファージに対して過剰な炎症を制御する可能性が示された。そこで本実験では、*in vitro* 肥満誘導性炎症モデルに対するアポアスタキサンチノイドの制御機能を検証した。まず、5 μ M のアポアスタキサンチノイド処置では 3T3-L1 脂肪細胞に対する細胞毒性が見られないことを確認した(**Figure 4.1.3 (B)**)。次いで、マクロファージと脂肪細胞との接触共培養による炎症誘導を行った。対照区(非共培養区)と比較して、共培養により IL-6 発現がタンパク質および mRNA 発現レベルで著増した(**Figure 4.1.6 (A)**)。しかしながら、アポアスタキサンチノイド処置により、IL-6 の過剰産生が有意に抑制された(**Figure 4.1.6 (A)**)。特に、apo-14'-astaxanthinal でその活性が顕著であり、mRNA 発現レベルにおいても同様の傾向を示した(**Figure 4.1.6 (A)**)。以上より、アポアスタキサンチノイドは共培養による RAW264.7 細胞および 3T3-L1 細胞からの IL-6 過剰産生を、mRNA 発現制御を介して抑制することが示された。次に、炎症誘導したマクロファージから産生される液性因子が 3T3-L1 細胞に与える影響とアポアスタキサンチノイドによる抑制能を評価した。RAW-CM(-)と比較して、RAW-CM(+)では 3T3-

L1 脂肪細胞からの IL-6 のタンパク質産生を促進するとともに *Il6* mRNA 発現の上昇が認められた(**Figure 4.1.6 (B)**)。一方、apo-11-astaxanthinal を除くアポアスタキサンチノイドおよびアスタキサンチン処置により、RAW-CM(+)と比較して培養上清中 IL-6 レベルが有意に低値を示した。興味深いことに、接触共培養時の結果と同様に、apo-14'-astaxanthinal 処置した細胞において最も抑制されていた(**Figure 4.1.6 (B)**)。また、apo-14'-astaxanthinal ほどではないが、apo-10'-astaxanthinal にも強い抑制能が認められた。これらの結果は、アポアスタキサンチノイドは脂肪細胞とマクロファージの相互作用による炎症反応に対して制御機能を有すること、特に apo-14'-astaxanthinal の 3T3-L1 細胞における炎症性因子の発現抑制作用が強いことを示している。

以上より、アポアスタキサンチノイドはマクロファージからの炎症性因子の産生を抑制するのみならず、マクロファージから分泌される液性因子による脂肪細胞の炎症も抑制するとともに、直接的相互作用による炎症誘導に対しても阻害することが明らかとなった。ごく最近 Nishida ら¹²⁶⁾は、アスタキサンチンが食事誘導性肥満モデルマウスの脂肪組織において、炎症性因子の過剰発現やマクロファージの浸潤を抑制することを報告している。また、BCO2 ノックアウトマウスでは野生型と比べてアスタキサンチン蓄積量が増加すること¹²⁷⁾は、BCO2 がアスタキサンチンの代謝開裂に関わる可能性を示している。本実験では、マクロファージと脂肪組織間の相互作用に対して、apo-14'-astaxanthinal に加えて、apo-10'-astaxanthinal においても強い IL-6 発現抑制能が認められており(**Figure 4.1.6**)、アスタキサンチンのみならず apo-10'-astaxanthinal をはじめとしたアポアスタキサンチノイドが生体内における抗炎症作用に関与することが予想される。

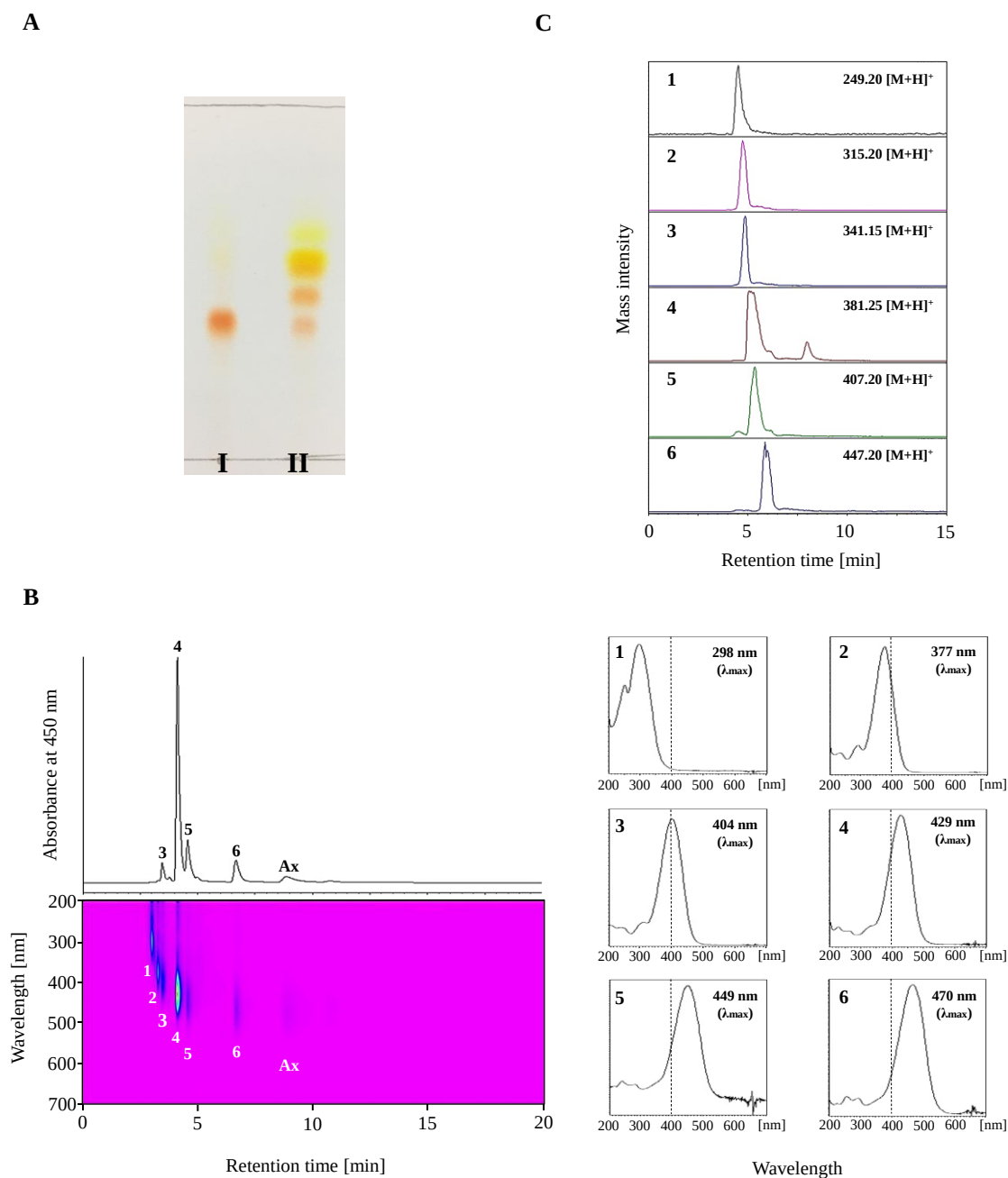


Figure 4.1.1 Analysis of astaxanthin oxidation products by KMnO_4 .

(A) Reverse-phase TLC analysis. Lane I, astaxanthin standard. Lane II, astaxanthin oxidation mixture. (B) HPLC analysis using C30 column. Photodiode array (PDA) detector read the wavelength among 200 nm and 700 nm. Absorption spectra of each peak were showed in right 6 panels. Dotted lines were drawn at 400 nm in each panel. (C) LC-MS analysis using ODS column. Peak number on HPLC chromatogram (B, left upper panel) corresponds to those on PDA contour map (B, left lower panel), on absorption spectra (B, right 6 panels), and on mass chromatogram (C).

Table 4.1.1 ¹H-NMR spectrum of Peak 1, 5, and 6 in astaxanthin oxidation products

	Peak 1	Peak 5	Peak 6
Position	δ (ppm) mult. <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) mult. <i>J</i> (Hz)	δ (ppm) mult. <i>J</i> (Hz)
H-2 α	2.2 dd (13, 5)	2.18 dd (13, 5)	2.16 dd (13.5, 6)
H-2 β	1.88 dd (13, 13)	1.84 dd (13, 13)	1.82 dd (13.5, 13.5)
H-3	4.35 ddd (13, 5, 2)	4.35 ddd (13, 5, 2)	4.33 ddd (13.5, 6, 2)
H-7	6.7 d (17)	6.27 d (17)	6.23 d (15.5)
H-8	6.36 d (17)	6.45 d (17)	6.43 d (15.5)
H-10	6.03 d (7)	6.32 d (11)	6.3 d (11)
H-11	10.18 d (7)	6.76 dd (15, 11)	6.68 dd (15, 11)
H-12		6.49 d (15)	6.45 d (15)
H-14		6.36 d (11)	6.33 d (11)
H-15		6.88 dd (15, 11)	6.77 dd (15, 11)
H ₃ -16	1.34 s	1.35 s	1.33 s
H ₃ -17	1.19 s	1.23 s	1.21 s
H ₃ -18	1.89 s	1.96 s	1.95 s
H ₃ -19	2.35 s	2.04 s	2.02 s
H ₃ -20		2.05 s	2.02 s
H-8'			9.46 s
H-10'		9.62 d (9)	6.94 d (11)
H-11'		6.23 dd (15, 9)	6.69 dd (15, 11)
H-12'		7.18 d (15)	6.75 d (15)
H-14'		6.64 d (11)	6.45 d (11)
H-15'		6.68 dd (15, 11)	6.7 dd (15, 11)
H ₃ -19'			1.91 s
H ₃ -20'		1.94 s	2.02 s
OH	3.68 d (2)	3.4 d (2)	3.68 d (2)

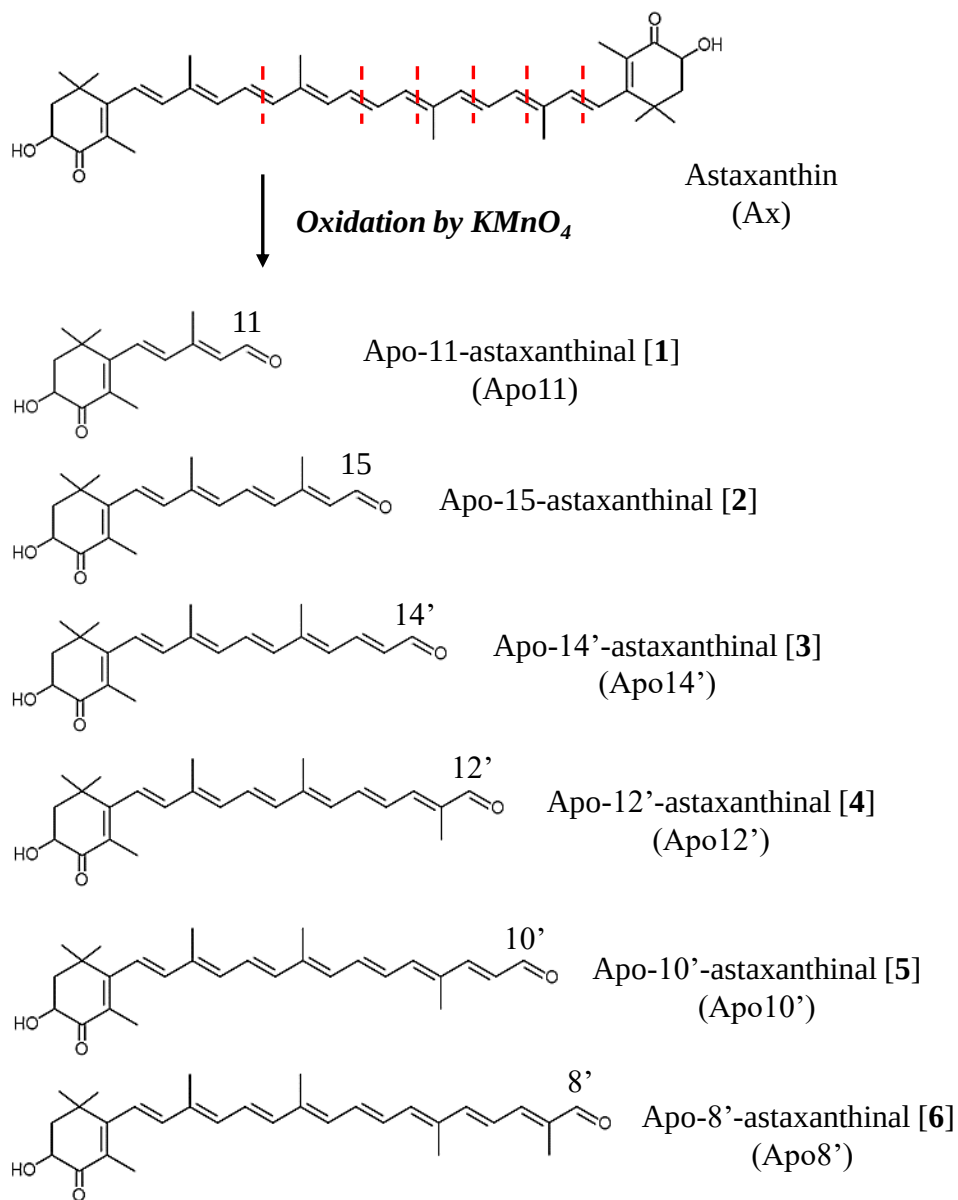


Figure 4.1.2 Identified apoastaxanthinoids in this study.

KMnO_4 oxidation cleaved at the double bonds of the polyene backbone in astaxanthin (red dotted line) and generated each apoastaxanthinoid with various chain-length. The numbers between brackets after each compound name corresponds to the peaks described in **Figure 4.1.1**.

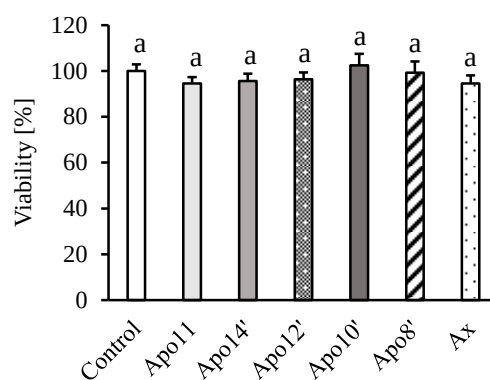
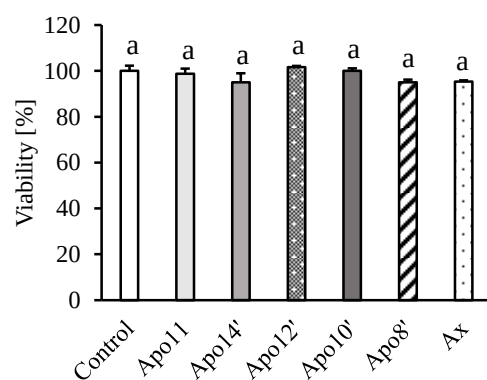
A**B**

Figure 4.1.3 Cell viability of RAW264.7 (A) and differentiated 3T3-L1 (B) cells treated with apoastaxanthinoids and astaxanthin.

After treating cells with each carotenoid at 5 μ M for 24 h, cell viability was determined by WST-1 assay. Data are mean $\pm$ SEM (n=5 (A) or n=3 (B)). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

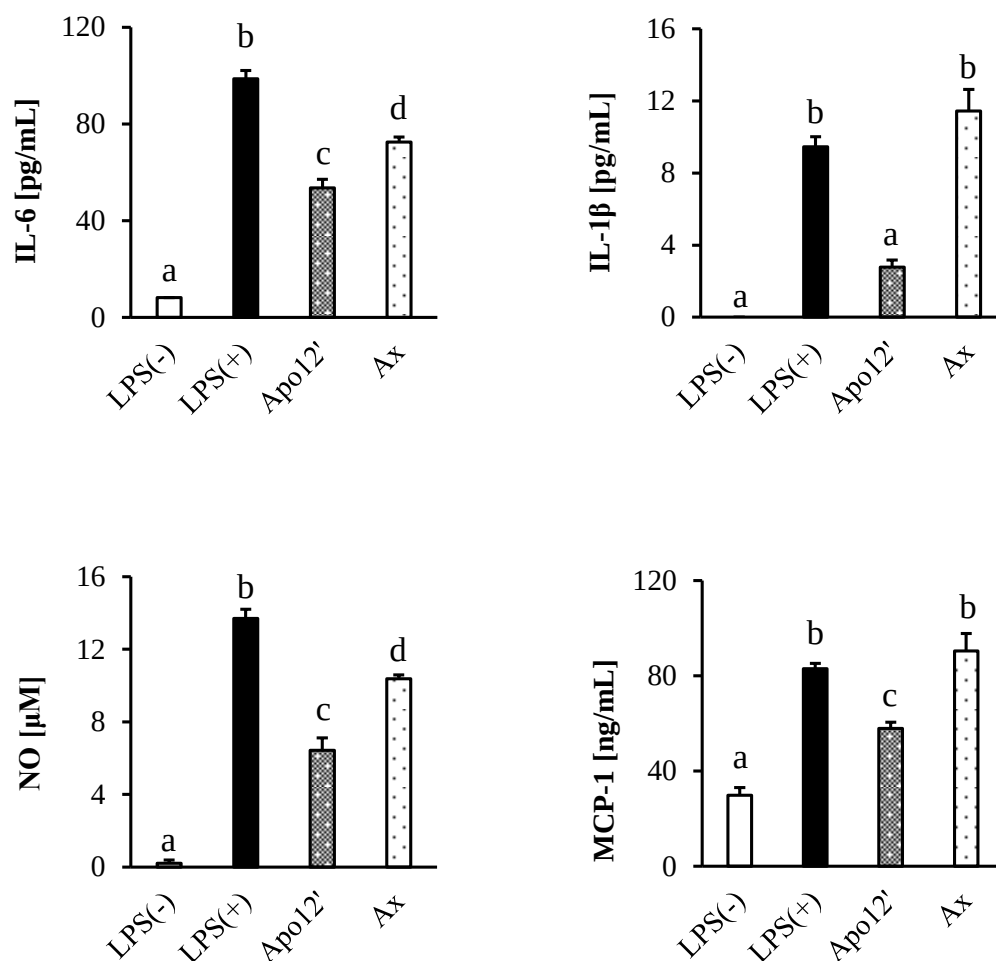


Figure 4.1.4 Apo-12'-astaxanthinal more potently inhibits the production of anti-inflammatory factors than parental astaxanthin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.

The cells were pretreated with each carotenoid at 5 μ M for 2 h and then stimulated with LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of carotenoids. Inflammatory factor concentrations in the culture media after LPS stimulation for 24 h were quantified by Griess method (NO) and commercialized ELISA kits (IL-6, IL-1 β , and MCP-1). Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

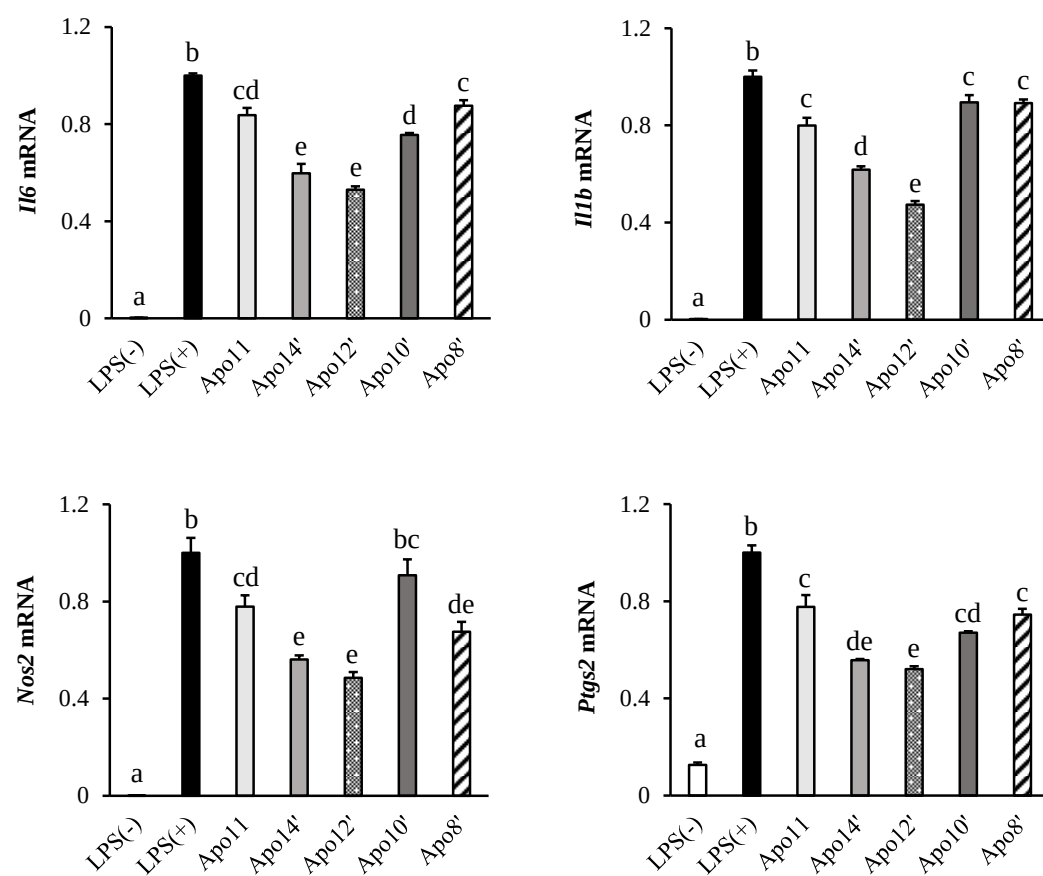
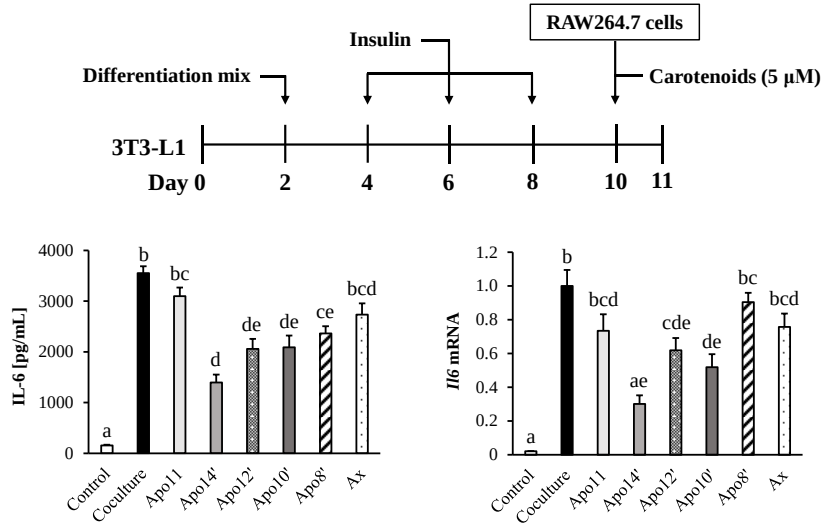


Figure 4.1.5 Apoastaxanthinoids downregulate the mRNA expression of inflammatory factors in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.

The cells were pretreated with each carotenoid at 5 μ M for 2 h followed by stimulated with LPS (100 ng/mL) in the presence or absence of carotenoids. The relative mRNA expression of inflammatory factors after LPS stimulation for 6 h was quantified by RT-qPCR analysis. *Gapdh* was used as the endogenous control. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

A



B

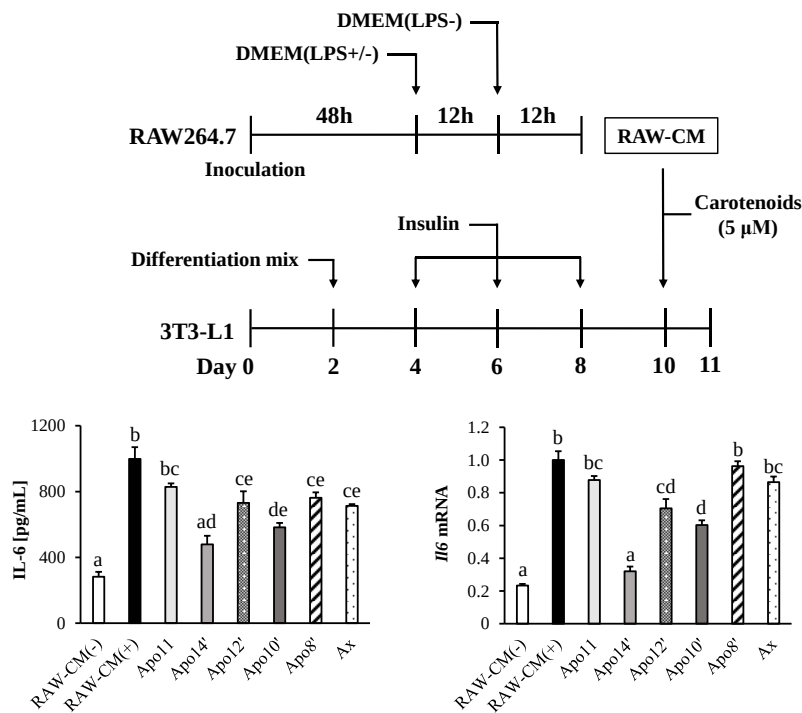


Figure 4.1.6 Apoastaxanthinoids and astaxanthin suppress the IL-6 production and mRNA expression induced by the interaction between RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes.

(A) Contact coculture system. (B) Incubation of 3T3-L1 cells in RAW264.7-derived conditioned media (RAW-CM). IL-6 level in the culture media was determined by commercialized ELISA kits and *I/6* mRNA was quantified by RT-qPCR analysis. *Actb* was used as the endogenous control. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

第2節

アスタキサンチン由来アポカロテノイドによる脂肪細胞分化抑制機能

実験方法

4.2.1 試料と試薬

Rosiglitazone は Enzo Life Sciences, Inc. より購入した。All-*trans*-retinal は富士フィルム和光純薬より購入した。Apo-15-astaxanthinal、apo-14'-astaxanthinal および apo-12'-astaxanthinal はそれぞれ合成品を、apo-11-astaxanthinal、apo-10'-astaxanthinal および apo-8'-astaxanthinal はそれぞれアスタキサンチンの酸化分解物から精製したものをを用いた。その他試薬は前章と同様のものを使用した。

4.2.2 細胞培養

マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞は 4.1.4 に示した方法で分化させた。分化誘導時(分化誘導初期)からカロテノイドを添加する場合は、分化誘導培地および維持培地の交換時に毎回新しいカロテノイドを添加した。分化誘導後期(1 回目の維持培地への交換時)からカロテノイドを添加する場合は、維持培地への交換時にカロテノイドを添加し、培地交換毎に新たなものを添加した。Rosiglitazone 添加の場合、分化誘導培地および維持培地の両方にそれぞれ 10 μ M の濃度で含むように混合した。

4.2.3 オイルレッド O 染色

Day 10 まで培養した分化 3T3-L1 脂肪細胞のオイルレッド O 染色は、1.2.6 と同様の方法で行った。

4.2.4 細胞内トリグリセライドの定量

Day 10 まで培養した分化 3T3-L1 脂肪細胞中のトリグリセライド量の測定は 1.2.7 と同様の方法で行った。

4.2.5 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

3T3-L1 脂肪細胞中の GPDH 活性は GPDH 活性測定キット(コスモ・バイオ株式会社)を用いて、使用説明書に従い行った。すなわち、Day 10 まで培養した分化 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を除去して PBS 300 μ L で 2 回洗浄を行った後、600 μ L の PBS で細胞を懸濁しエッペンチューブに移した。遠心分離(3,000 rpm, 15 分, 4°C)し、上清を除去後、細胞ペレットに酵素抽出溶液を 100 μ L 加えて、超音波で細胞を破碎しながら抽出を行った。遠心分離(12,800 $\times$ g, 5 分, 4°C)後、上清 40 μ L を、予め 80 μ L の反応基質溶液を入れた UV 透過 96-well マイクロプレートに移して、マイクロプレートリーダーにて 340 nm における吸光度を 30 秒毎に測定することで、基質である NADH の減少を追跡した。1 分間に 1 μ mol の NADH を消費する活性を 1U とし、検体液 1 mL あたりの GPDH 活性を以下の式にて算出した。尚、光路長はウェルを円柱とみなし、反応総量 0.12 mL を 96 ウェルプレートの底面積 0.32 cm² で除することにより求めた。

$$\text{GPDH 活性(U/mL)} = \frac{\Delta\text{O.D.}}{6.22 \times 0.375 (\text{cm 光路長})} \times \frac{0.12 (\text{mL 反応総量})}{0.04 (\text{mL 検体量})}$$

Δ O.D. : 1 分間あたりの 340 nm における吸光度の変化量

6.22 : NADH のミリモル吸光係数

4.2.6 脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現解析

Day 10 まで培養した分化 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現解析は、1.2.5 と同様の方法で行った。使用したプライマーは以下の通り。

Gene Name [Gene Aliases]	Gene Symbol	Assay ID
Fatty acid binding protein 4, adipocyte [aP2]	<i>Fabp4</i>	Mm00445878_m1
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>Pparg</i>	Mm01184322_m1
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	<i>Cebpa</i>	Mm00514283_s1
Actin, beta	<i>Actb</i>	Mm00607939_s1

4.2.7 統計

データは平均±SEM で示した。統計計算は一元配置分散分析を行ったのち、*Tukey-Kramer* の多重比較法を用いた。有意水準は 5%とした。

結果および考察

3T3-L1 前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化に対する apo-15-astaxanthinal の抑制作用

脂肪細胞の分化過程において、分化誘導開始直後にマスター転写因子である CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β および C/EBP δ の一過性発現上昇が起こり、これらがリン酸化を介して活性化することで PPAR γ や C/EBP α 発現が誘導される(分化開始 24-48 時間)¹²⁸⁾。PPAR γ や C/EBP α は相互に転写因子として働いてその発現を維持しながら、PPAR γ は脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導するとともに脂肪蓄積能を獲得させる¹²⁹⁾。一方、C/EBP α はインシュリン感受性を獲得させる¹³⁰⁾。3T3-L1 前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へ分化させる際、分化誘導初期(day 2)から種々のアポアスタキサンチノイドを添加した(**Figure 4.2.1 (A)**)。培養後にオイルレッド O 染色を行ったところ、特に apo-15-astaxanthinal 処置した細胞において、呈色度合いが低下した(**Figure 4.2.1 (B)**)。オイルレッド O は細胞内の中性脂質画分(脂肪滴)に溶け込み赤色を呈することから、apo-15-astaxanthinal 処置により成熟脂肪細胞の特徴である脂肪滴の蓄積の減弱を意味しており、脂肪細胞への分化が抑制されたことが推察された。そこで、脂肪細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を定量 PCR により測定した。その結果、PPAR γ および C/EBP α 遺伝子(*Pparg* および *Cebpa*)の mRNA 発現レベルが、apo-15-astaxanthinal 処置細胞において顕著に低下した(**Figure 4.2.1 (C)**)。さらに、PPAR γ 標的因子の一つであり、分化マーカーとして汎用される aP2 遺伝子(*Fabp4*)の mRNA 発現もまた apo-15-astaxanthinal 処置により有意に低下した(**Figure 4.2.1 (C)**)。一方、他のアポアスタキサンチノイドによる脂肪蓄積抑制や分化マーカーの発現抑制は多少の程度の差はあるものの、apo-15-astaxanthinal と比較して低いものであった(**Figure 4.2.1 (B,C)**)。また、apo-15-astaxanthinal は処置濃度依存的に、分化マーカーの mRNA 発現を抑制する(**Figure 4.2.2 (A)**)とともに、細胞内トリグリセライド量の蓄積も抑制した(**Figure 4.2.2 (B)**)。これらの結果と一致するように、脂肪合成の律速酵素の一つである GPDH 活性も apo-15-astaxanthinal 処置

濃度依存的に抑制された(**Figure 4.2.2 (C)**)。以上より、apo-15-astaxanthinal は鎖長特異的に脂肪細胞の分化を強く抑制することが明らかとなった。

次いで、分化誘導後期(誘導開始 48 時間後)の脂肪細胞に対する影響を調べるため、day 4 で維持培地に交換するタイミングで apo-15-astaxanthinal を添加した(**Figure 4.2.3 (A)**)。その結果、apo-15-astaxanthinal 処置によって、分化誘導群と比較して *Pparg* および *Fabp4* mRNA 発現レベルが低下した(**Figure 4.2.3 (B)**)。さらに、細胞内トリグリセライド量に関して、分化誘導初期に添加した場合ほどではないものの、その蓄積を阻害する(**Figure 4.2.3 (C)**)とともに、GPDH 活性も低値を示した(**Figure 4.2.3 (D)**)。これらの結果より、apo-15-astaxanthinal は既に PPAR γ が発現している誘導後期においても、その発現レベルを低下させることで脂肪蓄積を抑制する可能性が推測される。

エンドグループの構造が分化抑制能に与える影響—retinal と apo-15-astaxanthinal の比較

Ziouzenkova ら¹³¹⁾は、マウス脂肪組織中に all-*trans*-retinal を見出すとともに、*in vivo* で肥満やインスリン抵抗性に対して抑制作用を示すことを明らかにした。さらに、3T3-L1 細胞の分化に対して all-*trans*-retinal が抑制活性を示すことも報告した。**Figure 4.2.4 (A)**に示すように、retinal は β -carotene の中央部(C-15,15'位)で切断されたアルデヒドであり、apo-15-astaxanthinal と同じ鎖長を有する。そこで、エンドグループが脂肪細胞分化抑制能に与える影響について検討するため、all-*trans*-retinal と apo-15-astaxanthinal (all-*trans* 型)の比較を行った(**Figure 4.2.4 (B)**)。 *Pparg* および *Fabp4* mRNA 発現を調べたところ、apo-15-astaxanthinal、all-*trans*-retinal とともにこれら mRNA 発現上昇を抑制したが、all-*trans*-retinal においてより強い抑制活性が見られた(**Figure 4.2.4 (C)**)。また、Ziouzenkova ら¹³²⁾は、retinal と鎖長が異なる β -apo-8'-carotenal では 3T3-L1 細胞に対する分化抑制能が見られないとしている。本実験より得られた結果も踏まえると、脂肪細胞分化抑制能にはエンドグループの β -イオノン環上に存在する官能基のみならず、C-15,15'位(ポリエン鎖中央部)での開裂構造、すなわち鎖

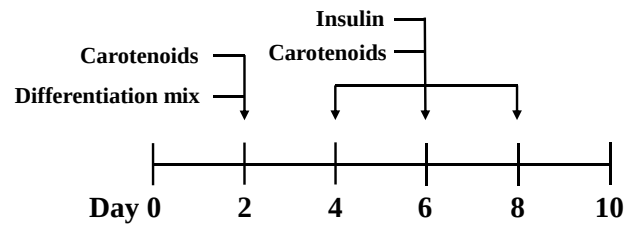
長も重要である可能性を示している。

PPAR γ アゴニストによる脂肪細胞の分化促進に対する apo-15-astaxanthinal の減弱作用

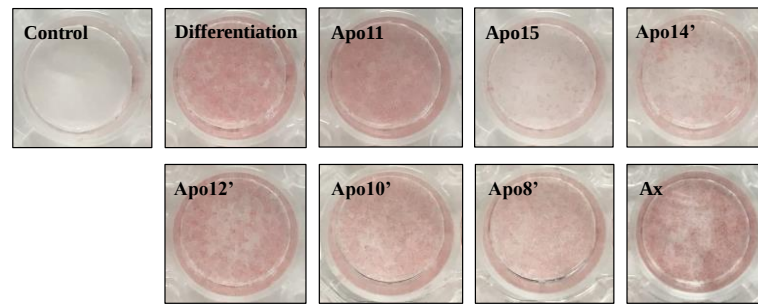
PPAR γ アゴニストの一種であるロシグリタゾンは PPAR γ /retinoid X receptor (RXR) α 複合体の活性化を介して、3T3-L1 脂肪細胞の分化を促進する。一方、all-*trans*-retinal が PPAR γ アゴニストによる PPAR γ /RXR α 複合体の活性化阻害を介して 3T3-L1 細胞の分化を抑制することが示された¹³¹⁾。そこで、apo-15-astaxanthinal がロシグリタゾンによる分化促進を阻害するかどうかを調べた(Figure 4.2.5 (A))。Pparg および Fabp4 mRNA 発現を調べたところ、apo-15'-astaxanthinal はロシグリタゾンによるこれら mRNA の発現上昇を有意に抑制した(Figure 4.2.5 (B))。同様に、GPDH 活性についてもロシグリタゾン添加による増加が apo-15-astaxanthinal 処置によって抑制された(Figure 4.2.5 (C))。以上より、apo-15-astaxanthinal は PPAR γ アゴニストによる分化促進作用を阻害することが示された。その作用機序として、retinal と同様の鎖長を有する apo-15-astaxanthinal もまた PPAR γ /RXR α 活性化を直接的に阻害した可能性が予想される。

以上、種々のアポアスタキサントイドを用いた比較試験から、apo-15-astaxanthinal が鎖長特異的に 3T3-L1 脂肪細胞の分化に対して抑制的に働くことが示された。また、その活性は誘導後期に処置しても見られ、同鎖長を有する all-*trans*-retinal に及ばないものの強い抑制活性を示した。All-*trans*-retinal は PPAR γ アンタゴニスト活性が示されているため、apo-15-astaxanthinal において RRPA γ アゴニストであるロシグリタゾン共存下で検討を行ったところ、本化合物はロシグリタゾンによる分化促進作用を抑制することが分かった。

A



B



C

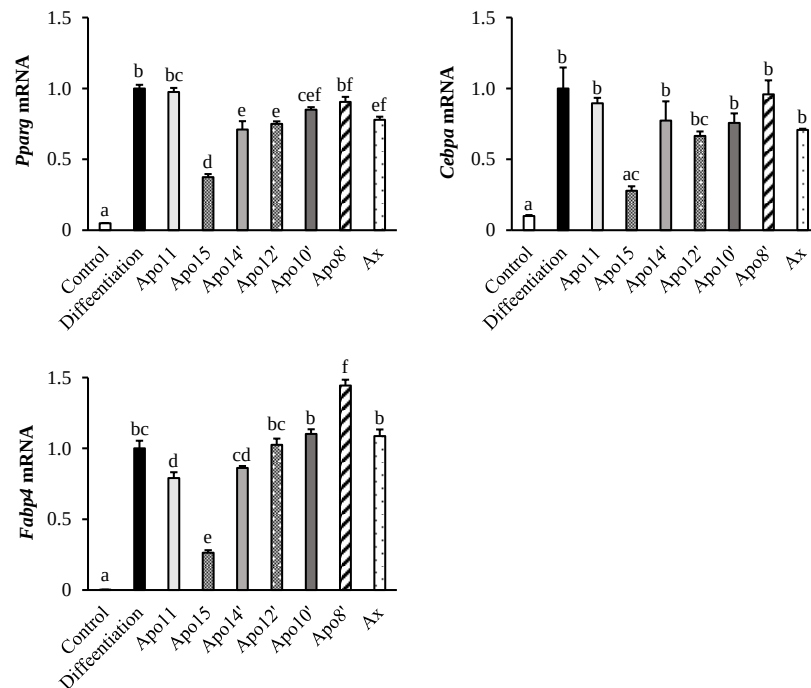


Figure 4.2.1 Apo-15-astaxanthinal inhibits the differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

(A) Differentiation scheme. (B) Intracellular lipid droplet was visualized by Oil red O staining. (C) Relative mRNA expression of each differentiation marker. *Actb* was used as endogenous control. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

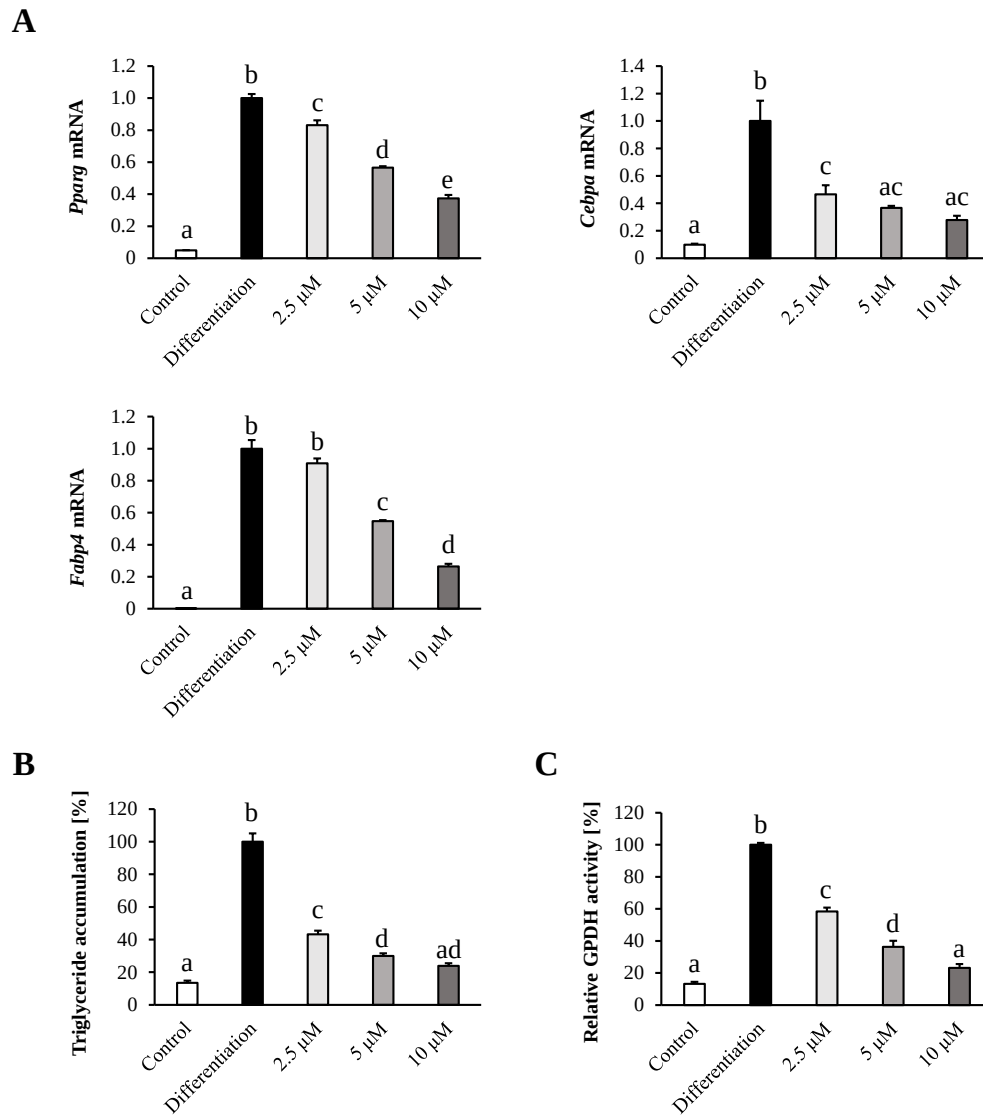
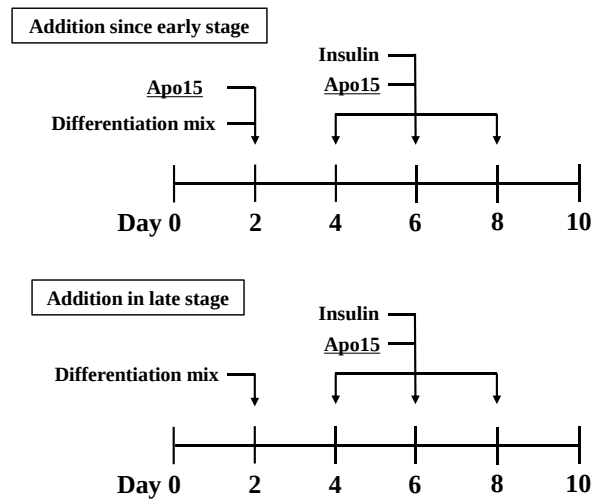
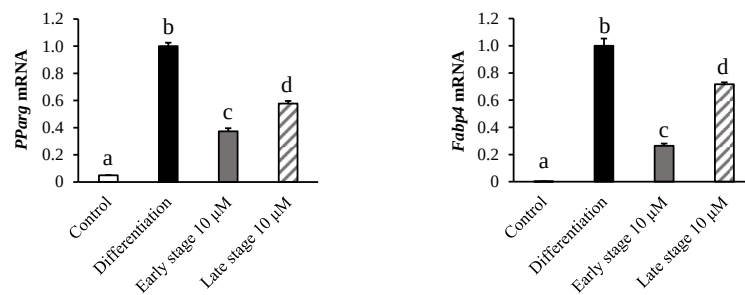


Figure 4.2.2 Apo-15-astaxanthinal dose-dependently inhibits the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. (A) Relative mRNA expression of each differentiation marker. *Actb* was used as endogenous control. (B) Intracellular triglyceride was quantified by commercialized kit. (C) Rate-limiting enzyme for adipogenesis glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity was evaluated by commercialized kit. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

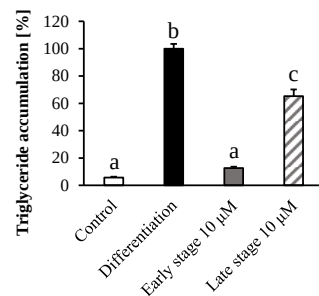
A



B



C



D

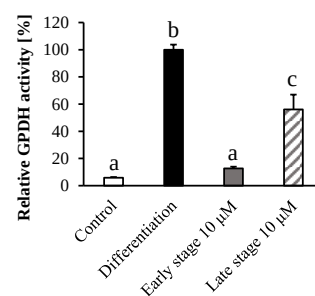


Figure 4.2.3 Apo-15-astaxanthinal suppresses the differentiation of 3T3-L1 adipocytes by addition in late stage.

(A) Differentiation schemes. Addition since early stage; apo-15-astaxanthinal was added in both differentiation and maintenance media (upper). Addition in late stage; apo-15-astaxanthinal was added only in maintenance media (lower). (B) Relative mRNA expression of each differentiation marker. *Actb* was used as endogenous control. Intracellular triglyceride (C) and GPDH activity (D) was evaluated by commercialized kit. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

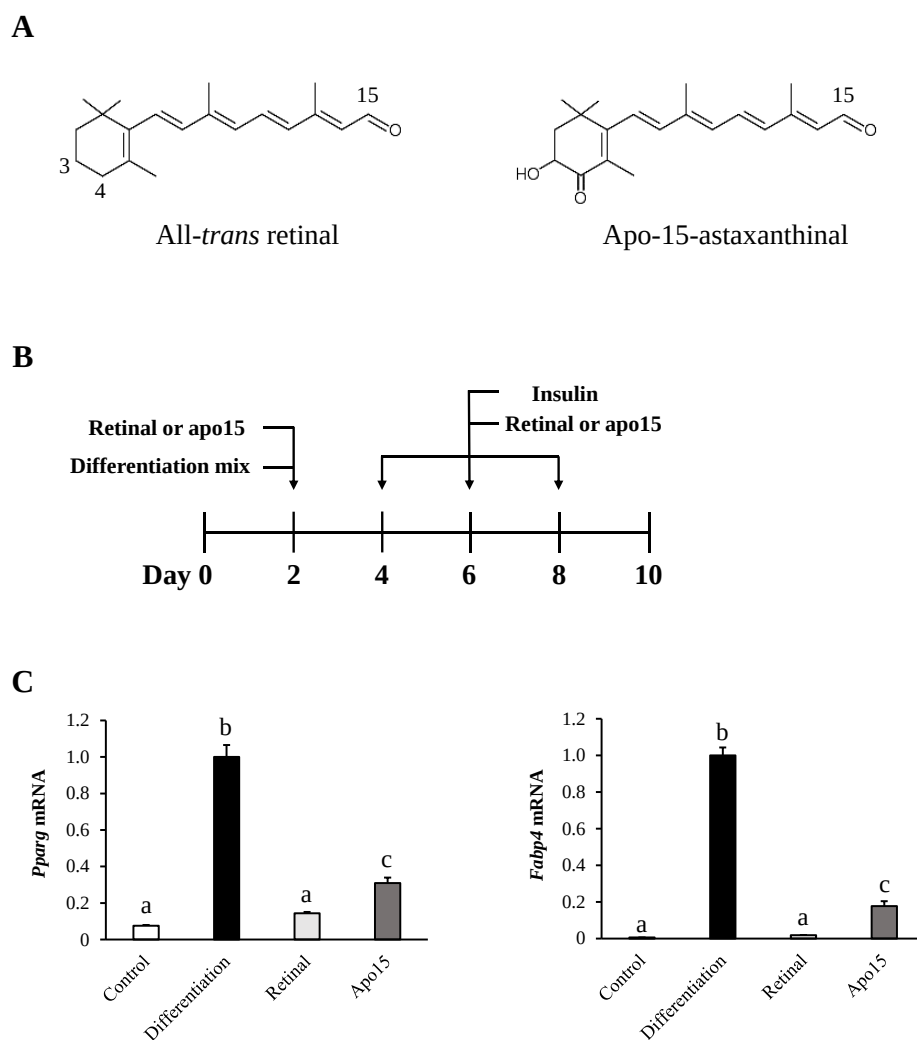
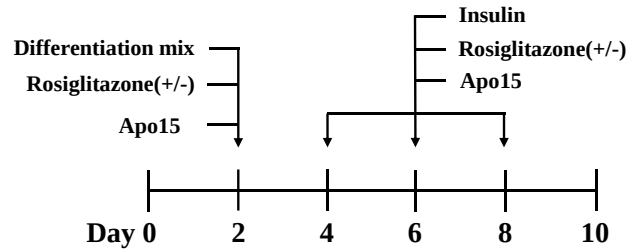


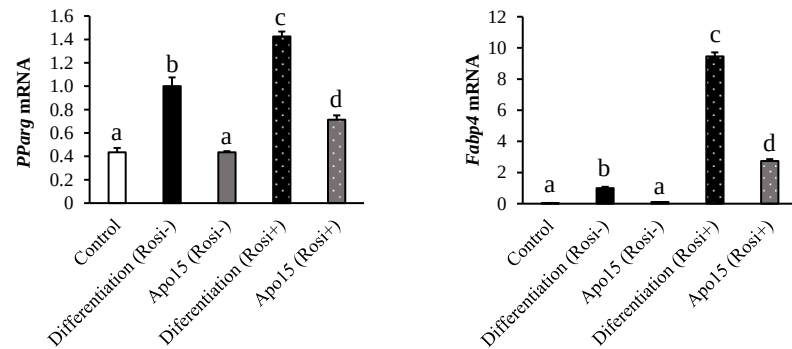
Figure 4.2.4 Comparison of suppressive activity against 3T3-L1 adipocyte differentiation between apo-15-astaxanthinal and all-*trans*-retinal.

(A) Molecular structure of all-*trans*-retinal and apo-15-astaxanthinal. Both have the same chain-length (cleaved at C-15,15'). Apo-15-astaxanthinal has C-3 hydroxyl and C-4 carbonyl groups, although all-*trans*-retinal does not. (B) Differentiation schemes. Both were added at 10 μ M concentration. (C) Relative mRNA expression of each differentiation marker. *Actb* was used as endogenous control. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

A



B



C

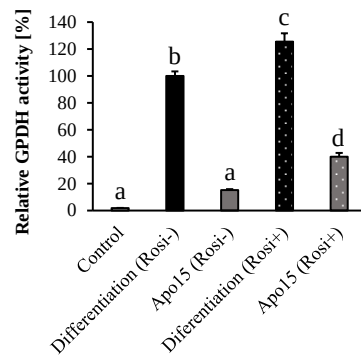


Figure 4.2.5 Apo-15-astaxanthinal attenuates the promotion of 3T3-L1 adipocyte differentiation by potent PPAR γ agonist rosiglitazone.

(A) Differentiation scheme. Differentiation and maintenance with or without rosiglitazone is represented as Rosi+ or Rosi-, respectively. (B) Relative mRNA expression of each differentiation marker. *Actb* was used as endogenous control. (C) GPDH activity was evaluated by commercialized kit. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

総合考察

近年、がんや生活習慣病に代表される NCD に共通した基盤病態として慢性炎症が潜在することが分かってきている。このような慢性炎症疾患はサイレントキラーとも言われ、自覚症状がないまま病態が進行し、臨床的な症状が顕在化したときには重症化していることも稀ではない。したがって、慢性炎症疾患を未然に防ぐ(予防する)ことが第一義的に重要である。それには運動習慣や健康的な食事が不可欠であるが、日々の食事から摂取される食品因子によって炎症を制御・抑制できれば、その意義は大きいと考える。本研究では、慢性炎症を制御するための食品因子として、多様な健康機能性が報告されているカロテノイドに着目した。一方、摂取されたカロテノイドは腸管を介して生体内に吸収され、肝臓から末梢組織に運ばれる過程で一部は代謝物に変換される。ヒトをはじめとした動物の生体組織中では、摂取したカロテノイドに加えて、ヒドロキシ基からカルボニル基への脱水や脱アシル化などの加水分解、そして炭素鎖が短縮する開裂などの様々な修飾を受けたカロテノイド代謝物が認められる¹⁸⁾。哺乳類においてカロテノイドの開裂反応を触媒する酵素が2種類同定されている。小腸や肝臓などに豊富に存在する BCO1 は、カロテノイドのポリエン直鎖の中央部部分(C-15,15'位)を開裂する酵素であり、レチノイド生合成に不可欠であることが分かっている²²⁾。また、肝臓などに豊富に存在する BCO2 はポリエン直鎖上の C-9,10'位を開裂する。その生理的役割は未だ決定的ではないが、BCO2 ノックアウトマウスでは非開裂カロテノイドの組織蓄積量が増加するとともに、肝臓において脂肪蓄積亢進や酸化ストレス増加などが生じる²⁴⁾。以上のことは、カロテノイドが代謝開裂されることが生体恒常性維持に重要であることを意味している。また、食品中にもアポカロテノイドが含まれる³⁵⁾とともに、 β -カロテンやリコペンを強化した食品を摂取したヒトでは血中のアポカロテノイド濃度が増加することが分かっている¹³³⁾。さらに最近、ヒト血中や母乳中においてキサントフィル類由来の多様なアポカロテノイドが見出された^{48,49)}。このように、アポカロテノイ

ドが生体組織のみならず生物や食品中に広範に分布することが分かってきている一方で、その生理的役割についての研究はほとんど見られない。しかしながら、カロテノイドによる生理作用メカニズムを理解するためには、アポカロテノイドをはじめとした代謝物の観点からの研究も必要であると考え。本研究では、慢性炎症疾患に対するカロテノイドの炎症制御能を調べるとともに、アポカロテノイドによる炎症制御機能をはじめとした生物活性について研究を行った。

第 1 章では、慢性肝疾患である非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)に着目した。NAFLD は単純性脂肪肝(NAFL)と非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の 2 つの疾患概念に分けられる。NASH は線維化を伴い肝硬変や肝がんへと不可逆的に進展することから、NASH を抑制することが臨床的に重要となる。しかしながら、その成因が複雑であるために薬物療法が未だ確立されていない。フコキサンチンはこれまで肥満モデルにおける脂肪組織⁴²⁾や潰瘍性大腸炎モデル⁴³⁾における腸管での過剰な炎症を抑制することが報告されていたが、NASH に対する作用は明らかではなかった。そこで、食事誘導性 NASH モデルマウスを用いてフコキサンチンの抑制効果を評価した⁵⁰⁾。その結果、フコキサンチン摂取群において、NASH 食によって誘導される肝臓障害(**Table 1.1.2**)をはじめ、肝臓における脂質蓄積(**Figure 1.1.1**)や酸化ストレス(**Figure 1.1.2**)が大きく低減した。さらに、NASH の特徴である肝臓における炎症や免疫細胞の浸潤亢進は、フコキサンチン摂取により抑制された(**Figure 1.1.3**)。一方、組織リモデリングに重要な線維化について、NASH 食によって肝臓組織中の線維化関連因子の発現増加や肝星細胞の活性化が認められたが、フコキサンチン摂取群では大きく減弱した(**Figure 1.1.4**)。以上のように、フコキサンチンは食餌誘導性 NASH モデルマウスに対して強い抑制作用を示すことが分かったが、この作用メカニズムを明らかにするには、フコキサンチンの生体内代謝も考慮する必要がある。そこで、生体組織中カロテノイドを調べたところ、既報⁴⁵⁾通りフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A、そしてアポカロテノイドであるパラセントロンの蓄積が認められた(**Figure 1.2.1**、**Table 1.2.1**)。さらに、培養細胞を

用いた検討の結果、これら代謝物は肝臓細胞やマクロファージにおける脂質蓄積や炎症に対して阻害作用を示すことが分かった(**Figure 1.2.2-3**)。以上より、経口摂取されたフコキサンチンによる NASH 抑制作用メカニズムの一つとして、生体内代謝物であるフコキサンチノール、アマロウシアキサンチン A およびパラセントロンがそれぞれ、肝臓組織中の肝臓細胞や免疫細胞に対して抗炎症効果を示すことが推察される。一方、臓器機能破綻をきたす組織リモデリングに重要な線維化に対しても、食品因子であるフコキサンチンが抑制効果を示した結果は興味深い。最近、フコキサンチンが肝星細胞に対して直接的に活性化を抑制することが報告された⁷⁰⁾。抗線維化作用を持つ食品因子の研究は多くなく、今後フコキサンチン代謝物による肝星細胞活性化抑制作用やその分子メカニズム解明が待たれる。フコキサンチンは NASH をはじめとする慢性炎症疾患の予防・抑制のみならず、抗線維化作用を示す新たな食品因子として期待される。

第2章では、フコキサンチン由来アポカロテノイドによる新たな生物活性として、抗酸化酵素発現とその制御因子 Nrf2 の活性化に与える影響について調べた。近年、Nrf2 の活性化が慢性炎症疾患の治療や予防に繋がる可能性が明らかになるとともに、Nrf2 活性化を誘導する食品因子の探索も活発に行われている。フコキサンチン摂取したマウス生体組織中に、アレン結合側エンドグループを持つパラセントロンに加えて、エポキシド側エンドグループを持つ apo-10'-fucoxanthinal の存在が示唆されている(**Figure 2.1**)⁷⁹⁾ため、これらアポカロテノイドによる抗酸化酵素の発現を調べた。その結果、マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞において、apo-12'-および apo-10'-fucoxanthinal に強い HO-1 発現誘導能が認められた(**Figure 2.3**)。さらに、異なるエンドグループを持つアポカロテノイド間の比較によって、少なくともエポキシドが抗酸化酵素発現誘導能に影響を与える可能性が示唆された(**Figure 2.4**)。次いで、apo-fucoxanthinal による Nrf2 発現への影響を調べたところ、apo-fucoxanthinal は Nrf2 それ自身の mRNA 発現には影響を与えず、その細胞内挙動を制御することが明らかとなった。すなわち、apo-fucoxanthinal が Nrf2 抑制因子である Keap1 の分解を促進するこ

とにより Nrf2 安定化をもたらすとともに、Nrf2 の核内移行が進み、抗酸化酵素の発現を促進する機序が推察された(**Figure 2.5,6**)。Keap1 は Nrf2 と複合体を形成しその活性を抑制しているが、Keap1 分子中システインのチオール基が Nrf2 抑制に影響を与えることが知られる⁸²⁾。先の結果から、apo-fucoanthinal による抗酸化酵素発現誘導にはエポキシドの関与が強く推察されたが、このエポキシドが Keap1 と相互作用する可能性が予想される。チオール基を持つ NAC 共存下で、すなわちチオールが過剰の条件下で apo-fucoanthinal による Nrf2 活性化や抗酸化酵素発現誘導が減弱したことは、この可能性を示唆する(**Figure 2.7**)。一方、分子内の近接する位置にエポキシドと α,β -カルボニル基を有する EKODE は、ARE レポーター活性や抗酸化酵素発現を強く誘導するが、どちらか一方のみの官能基ではその誘導活性が大きく低下する⁹⁰⁾。したがって、apo-fucoanthinal の場合もまた、エポキシドおよび近接する C-8 位の α,β -不飽和カルボニル基が Keap1 チオール基との相互作用に重要かもしれない。これを確かめるためには、C-8 カルボニル基を持たず、C-5,6 エポキシドを持つ apo-12'-carotenoids である apo-12'-violaxanthinal の抗酸化酵素発現誘導能を評価することによる活性分子構造の特定や、Keap1 チオール基と apo-fucoanthinal の付加反応物の解析を行う必要がある。また、apo-fucoanthinal はマクロファージに対して炎症抑制能を示し(**Figure 2.8**)、これには少なくとも Nrf2 活性化が関与することを見出した(**Figure 2.9**)。Nrf2 は抗酸化酵素発現を介した炎症抑制のみならず NF- κ B p65 の転写活性を阻害する機構が知られる^{93,94)}。今後、ゲノム上の NF- κ B p65 調節配列に結合する Nrf2 量の解析を行うことなどを通してその作用メカニズムの解明が待たれる。以上、エポキシドおよび C-8 カルボニル基を両方有する構造はフコキサンチンに特有の構造であり、本研究で見出された Nrf2 活性化を伴う炎症抑制能もまたフコキサンチン代謝物(特にアポカロテノイド)に特徴的な生物活性であると考えられる。この詳細を明らかにすることは、フコキサンチンによる生理作用の本質を解明するための手がかりとなるかもしれない。

次いで、第 3 章では、自然界に最も豊富に存在するカロテノイドである β -カロテンに着

目した。β-カロテン由来のアポカロテノイドについては、発生や視覚などの重要な生理プロセスに参与するレチノイドが最もよく研究が進められているが、それ以外の β アポカロテノイドの分布や生物活性に関する報告もいくつかある。一方、β-アポカロテノイドの生物活性に関しては、β-apo-13-carotenone や β-apo-14'-carotenal において、PPAR や RXR などの核内受容体に対するリガンド活性を示し、核内受容体のアゴニストによって誘導される標的遺伝子発現を阻害することが報告されている¹²⁷⁾。しかしながら、β-アポカロテノイドによる炎症に対する抑制作用を検討した例はなかった。β-カロテンを過マンガン酸カリウム処理して得られた酸化生成物の解析を進めたところ、β-イオノン環の C-5,6 位と C-7',8'位が開裂した seco-β-apo-8'-carotenal を同定(Figure 3.1-2、Table 3.1)し、本化合物が RAW264.7 細胞に対して β-カロテンと同等以上の抗炎症作用を示すことが分かった(Table 3.2)。対照的に、同じく C-7',8'位で開裂し、閉環 β-イオノン環を持つ β-apo-8'-carotenal では抗炎症作用を示さなかった(Figure 3.4)ことから、β-イオノン環の開環部分構造が抗炎症活性に寄与することが推察された⁵¹⁾。現時点でこのような開環型(seco 型)カロテノイドの生体組織における蓄積に関する報告はないが、自然界においては植物や食用二枚貝中に seco 型カロテノイドが見出される¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。今回、β-イオノン環開環部分構造の抗炎症活性への寄与が明らかになったことから、自然界に分布する seco 型カロテノイドについても何らかの生物活性を示す可能性が考えられる。Seco-β-apo-8'-carotenal を含む seco 型カロテノイドの生体組織での同定を進めることで、カロテノイドの多様な生理機能解明のための研究進展が期待される。

第4章では、優れた抗酸化作用をはじめとして多様な生理機能が注目を集め、食品や化粧品などの用途が広がっているアスタキサンチンに着目した。アスタキサンチン由来のアポカロテノイドとしては、ヒト血中やヒト培養肝細胞を用いた検討から、3-hydroxy-4-oxo-β-ionone などの短鎖長のアポカロテノイドが見出されている¹²⁷⁾。さらに、BCO2 ノックアウトマウスでは野生型と比べてアスタキサンチン蓄積量が増えることから¹²⁷⁾、生体内でアスタキサンチンが BCO2 を介して代謝開裂される可能性が示唆される。しかしながら、他の

アスタキサンチン由来アポカロテノイドの分布や生物活性に関する研究は見られない。そこで、まずはアポアスタキサンチノイドの調製の検討を行った。その結果、過マンガン酸カリウム処理によって、6 種類のアポアスタキサンチノイドの単離と同定に成功した(**Figure 4.1.1-2, Table 4.1.1**)。さらに、これらアポアスタキサンチノイドの RAW264.7 細胞に対する抗炎症活性を比較したところ、全ての化合物で RAW264.7 細胞に対する炎症性メディエーターの過剰発現を抑制した (**Figure 4.1.4-5**)。興味深いことに、鎖長に関連して抑制活性に違いが認められ、apo-14'-astaxanthinal や apo-12'-astaxanthinal において特に強い抗炎症能を示した。リコペン由来アポカロテノイドである lycopenal は鎖長に応じて核内受容体リガンド活性が異なり、長鎖長の apo-6'-lycopenal や apo-8'-lycopenal では PPAR γ への結合性は見られず、apo-12'-lycopenal においてのみ濃度依存的な PPAR γ 活性の増加を認めた¹³⁴⁾。比較的広い基質認識性を示す PPAR γ は抗炎症的に作用することが知られる¹³⁵⁾。長鎖長の apo-8'-astaxanthinal や短鎖長の apo-11'-astaxanthinal とは異なり、apo-14'-ならびに apo-12'-astaxanthinal は PPAR γ への結合を介することでより強い抗炎症作用を示したのかもしれない。一方、肥満病態下の脂肪組織では、脂肪組織へのマクロファージの浸潤亢進の所見が認められ、組織炎症が増悪しているが、この両細胞間の相互作用の制御は炎症に伴う臓器機能不全の抑制に繋がる可能性がある。そこで、マクロファージと脂肪細胞との共培養による肥満誘導性炎症に対するアポアスタキサンチノイドの抑制能を検証した。その結果、アポアスタキサンチノイドは、共培養により誘導される IL-6 過剰産生を抑制した(**Figure 4.1.6 (A)**)。さらに、RAW264.7 細胞条件培地(RAW-CM(+))では 3T3-L1 細胞中の IL-6 産生が増加する一方、アポアスタキサンチノイド処置によってその産生が阻害された(**Figure 4.1.6 (B)**)。Apo-14'-astaxanthinal 処置によって両試験において IL-6 濃度の顕著な低下が認められ、マクロファージのみならず脂肪細胞に対しても強い IL-6 発現抑制作用を示すことが分かった。また、マクロファージと脂肪組織間の相互作用に対して、apo-14'-astaxanthinal に加えて、apo-10'-astaxanthinal においても強い IL-6 発現抑制能が認められた(**Figure 4.1.6**)。BCO2 ノックアウト

トマウスでは野生型と比べてアスタキサンチン蓄積量が増えることから¹²⁷⁾、apo-10'-astaxanthinal が BCO2 による反応生成物として生じる可能性が予想され興味深い。アポアスタキサンチノイドによる核内受容体へのリガンド活性を精査するとともに、生体内における分布や種々のカロテノイド開裂酵素のアスタキサンチンへの反応性を明らかにすることで、アスタキサンチンの真の作用メカニズム解明が待たれる。

次いで、肥満と関連の深い脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化に対する抑制作用について検討したところ、アポアスタキサンチノイドのうち、apo-15-astaxanthinal において鎖長特異的かつ強い抑制活性が認められた(**Figure 4.2.1-2**)。また、誘導後期に apo-15-astaxanthinal を処置した場合においても、脂肪蓄積を抑制した(**Figure 4.2.3**)。続いて、PPAR γ アゴニスト存在下での apo-15-astaxanthinal による分化抑制活性を調べたところ、ロシグリタゾンによる分化促進作用が減弱した(**Figure 4.2.5**)。PPAR γ は、誘導初期(day 2)に一過的に増加する C/EBP β と C/EBP δ によって、その発現が誘導され(day 4~)、次いで PPAR γ は *Fabp4* などの脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導するとともに脂肪蓄積能を獲得させる^{128,129)}。既に PPAR γ が発現している誘導後期(Day 4~)に apo-15-astaxanthinal 処置した場合でも、標的遺伝子である *Fabp4* の mRNA 発現レベルや脂肪蓄積を低下させること(**Figure 4.2.3**)、PPAR γ アンタゴニストとして働く all-*trans* retinal と類似の構造を有すること(**Figure 4.2.4**)、PPAR γ アゴニストによる分化促進作用を減弱させる(**Figure 4.2.5**)ことを考慮すると、apo-15-astaxanthinal は PPAR γ のアンタゴニストとして作用する可能性が推察される。Apo-15-astaxanthinal の核内受容体へのリガンド活性の調査とともに、生体内における同定を進めることで、アスタキサンチンの生理作用メカニズムの解明への研究進展が期待される。

以上、本研究では、肝臓における慢性炎症疾患である NASH に対するフコキサンチンの抑制作用を初めて明らかにするとともに、その活性本体としてアポカロテノイドを含む代謝物が肝臓やマクロファージに対して炎症抑制能を示す機序を見出した。さらに、近年その

広い存在分布が明らかとなってきたアポカロテノイドの生物活性の探索を進めたところ、フコキサンチン由来アポカロテノイドが転写因子 Nrf2 の活性化を介して抗酸化酵素発現を促進するとともに炎症抑制能を発揮することが分かった。また、NMR により新たな β -カロテン由来アポカロテノイドの同定に加えて、その炎症制御に関わる活性部分構造を明らかにした。さらに、アスタキサンチン由来アポカロテノイドの調製法を確立するとともに、その生物活性としてマクロファージや脂肪細胞に対する炎症抑制能と、脂肪細胞の分化抑制能を見出した。本研究成果は未だ知見の少ないアポカロテノイドについての調製法と新たな生物活性を提供すると同時に、生体内におけるカロテノイドの代謝の意義や健康機能性の作用メカニズムを明らかにするためのさらなる研究の発展に貢献することが期待される。

A

CC1=C(C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=O)C

β -Apo-12'-carotenal

Chromatogram showing Absorbance at 400 nm versus Retention time [min]. A single sharp peak is observed at 5.0 min.

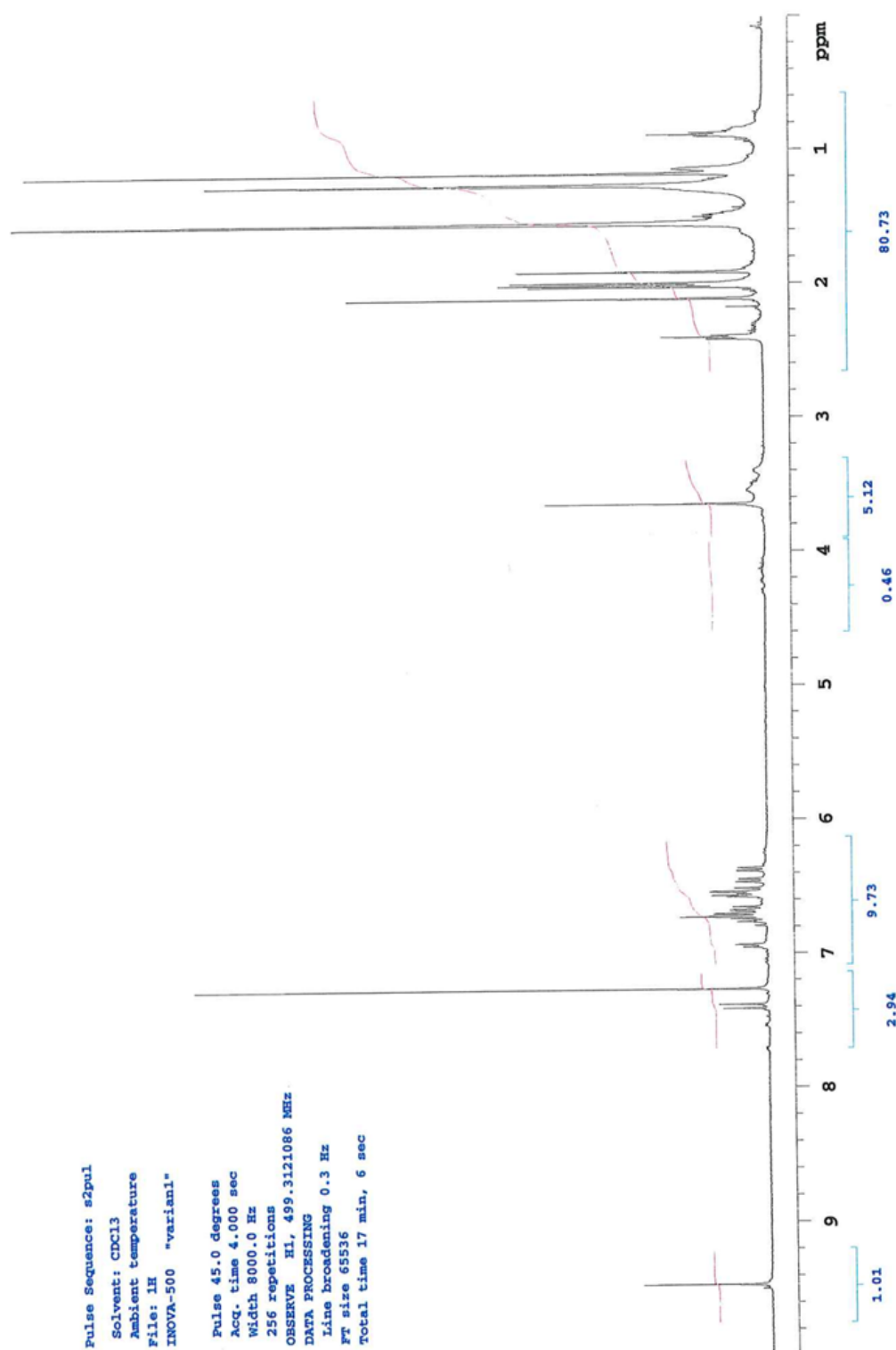
B

CC1=C(C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=C(C)C)C(=O)C

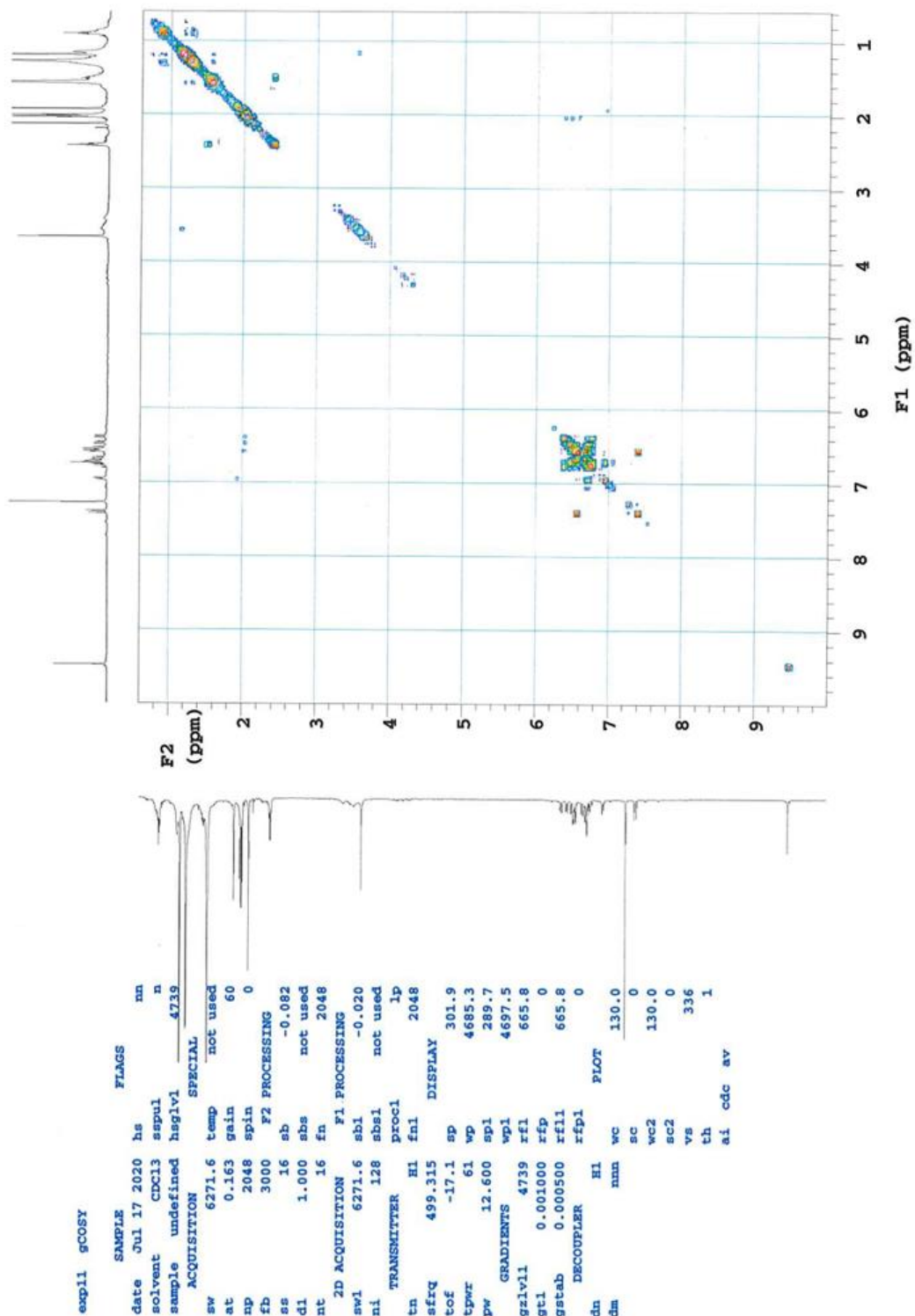
Apo-12'-zeaxanthinal

Chromatogram showing Absorbance at 400 nm versus Retention time [min]. A single sharp peak is observed at 2.5 min.

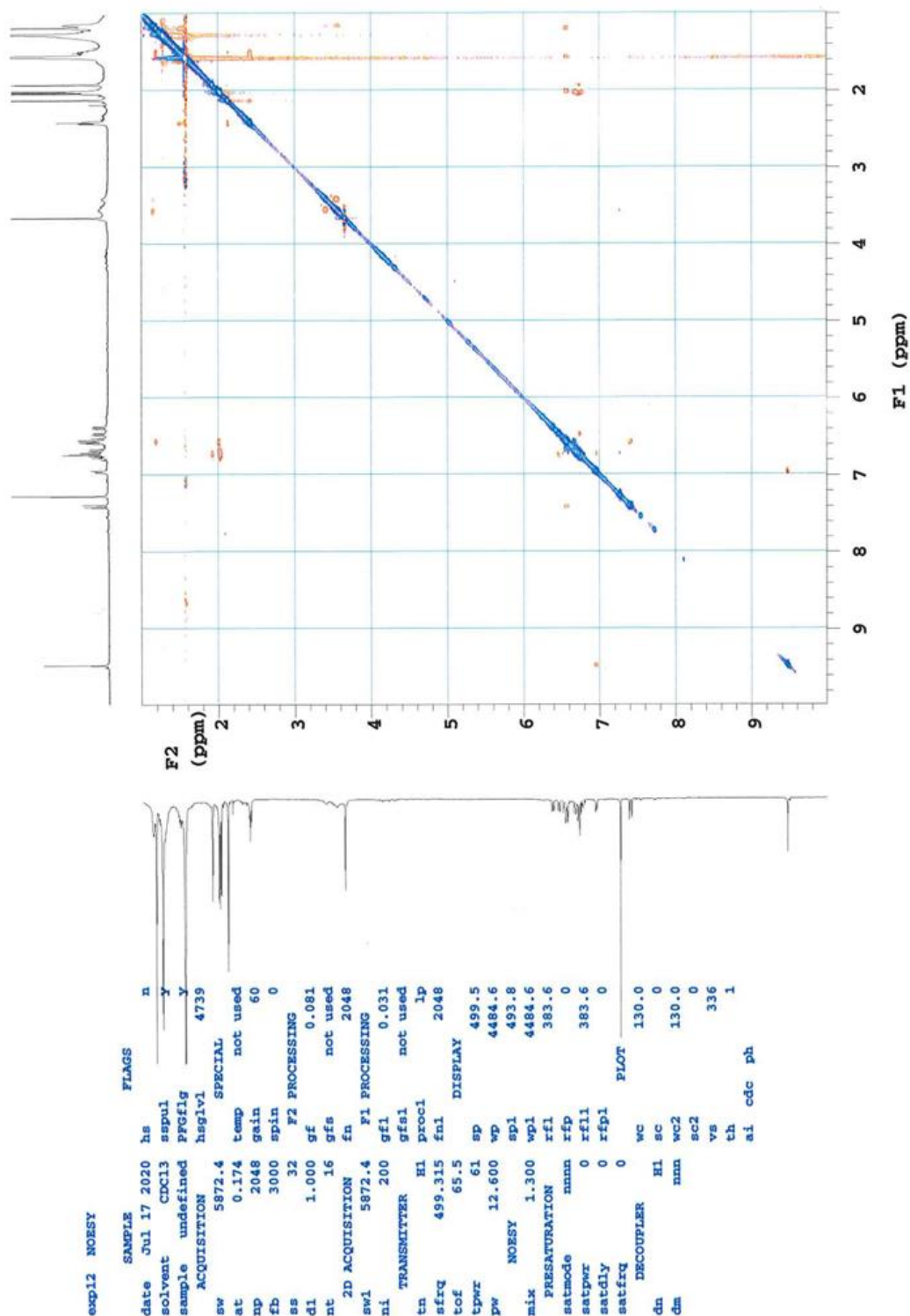
Five mg of β -carotene or lutein and 0.8 mg of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were dissolved in 40 mL of chloroform and added 10 mL of KMnO_4 solution (180 mg/10 mL distilled water). After 3 h incubation at room temperature, the oxidation mixture was separated with chloroform:methanol:water (10:5:3, v/v/v). The chloroform phase was collected and dried with a rotary evaporator. β -Apo-12'-carotenal (A) and apo-12'-zeaxanthinal (B) in the KMnO_4 oxidation products were purified by reverse-phase HPLC as following conditions: Column, Develosil C30-UG-5 (250×4.6 mm, Nomura Chemical Co., Inc.); Eluent, methanol; Flow rate, 1.0 mL/min; Wavelength, 400 nm. Purified compounds were analyzed using LCMS8040 system (Shimadzu) as follows: Column, Develosil ODS-UG-3 (150×2.0 mm, Nomura Chemical Co., Inc.); Eluent, methanol; Flow rate, 0.2 mL/min; Ionization, electrospray ionization (positive ion mode); Nebulizer nitrogen gas, 2.0 L/min; Drying nitrogen gas, 15.0 L/min; DL temperature, 250 °C; Heat block temperature, 400 °C.



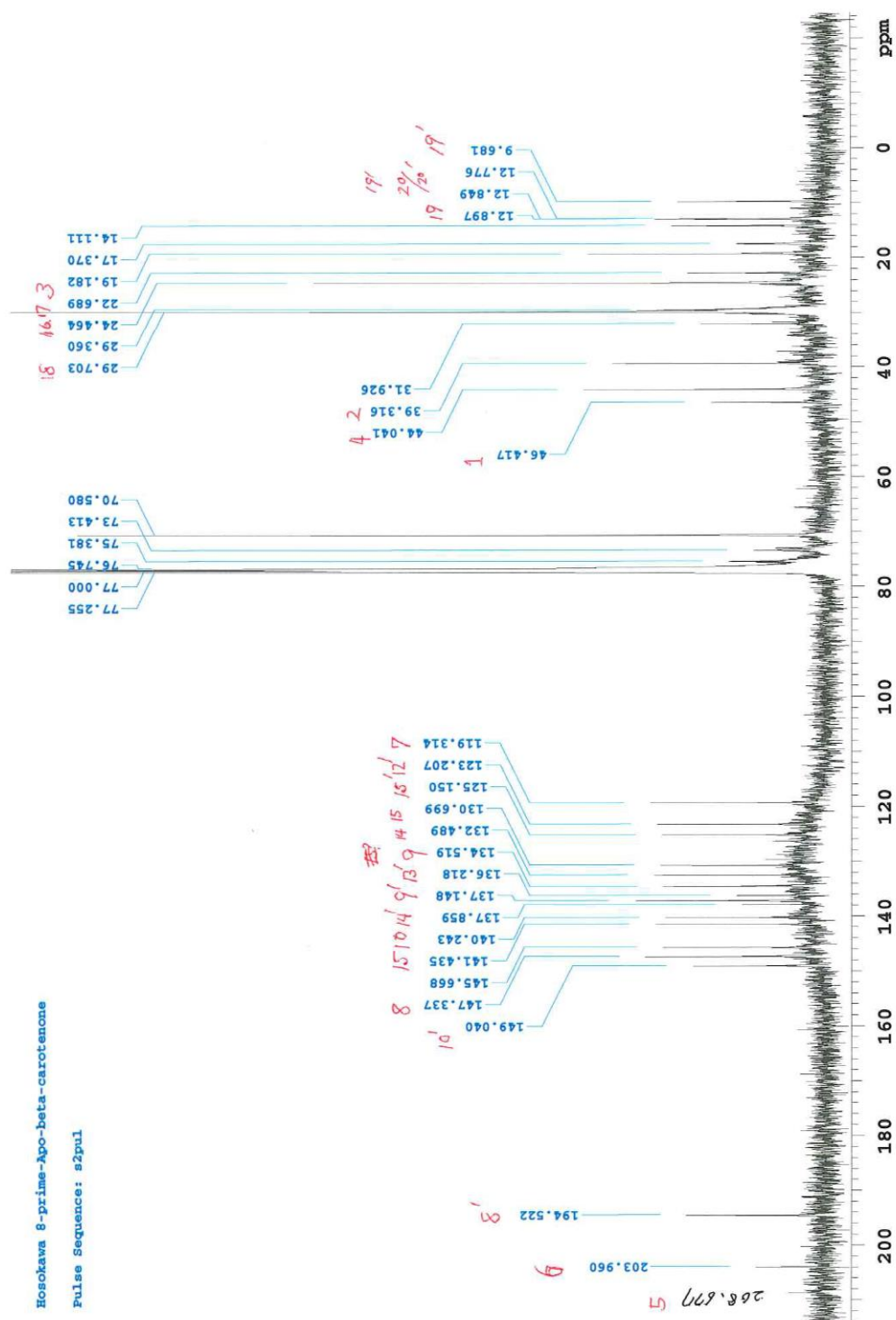
Supplementary Figure 3.1 ¹H-NMR analysis of seco-β-apo-8'-carotenal



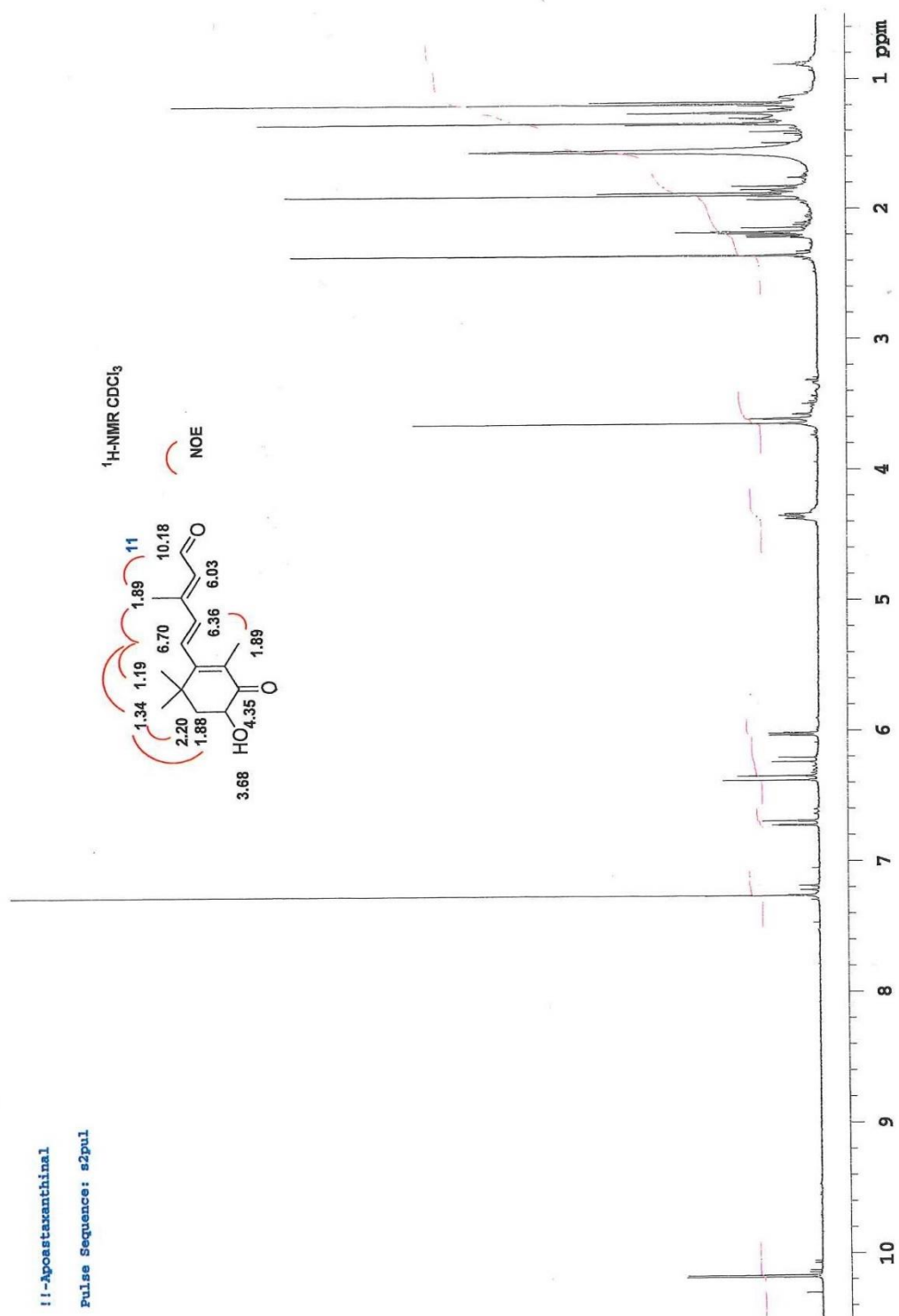
Supplementary Figure 3.2 H-H COSY of seco- β -apo-8'-carotenal



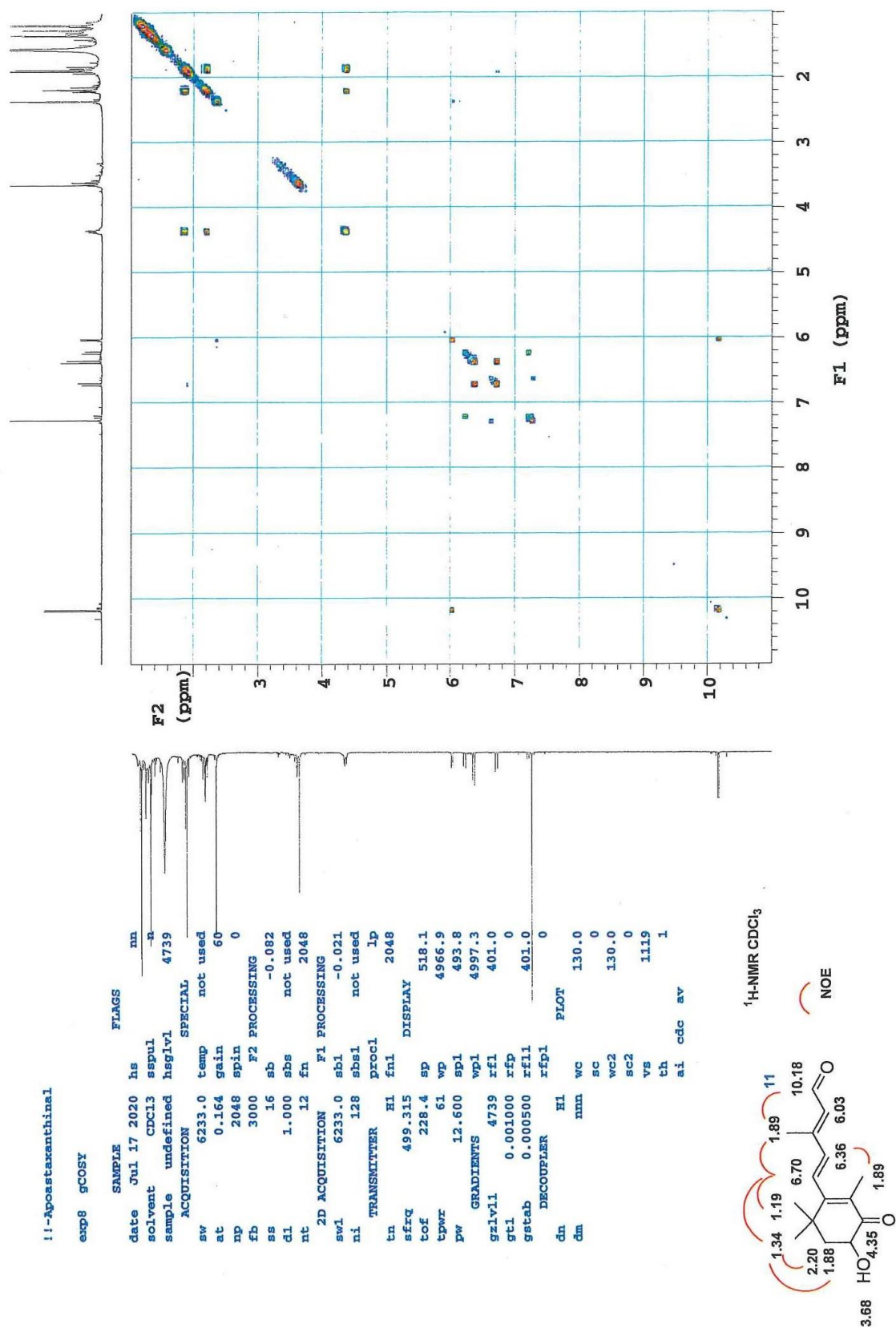
Supplementary Figure 3.3 NOESY of seco- β -apo-8'-carotenal



Supplementary Figure 3.4 ^{13}C -NMR analysis of seco- β -apo-8'-carotenal



Supplementary Figure 4.1.1 ¹H-NMR analysis of apo-11-astaxanthinal



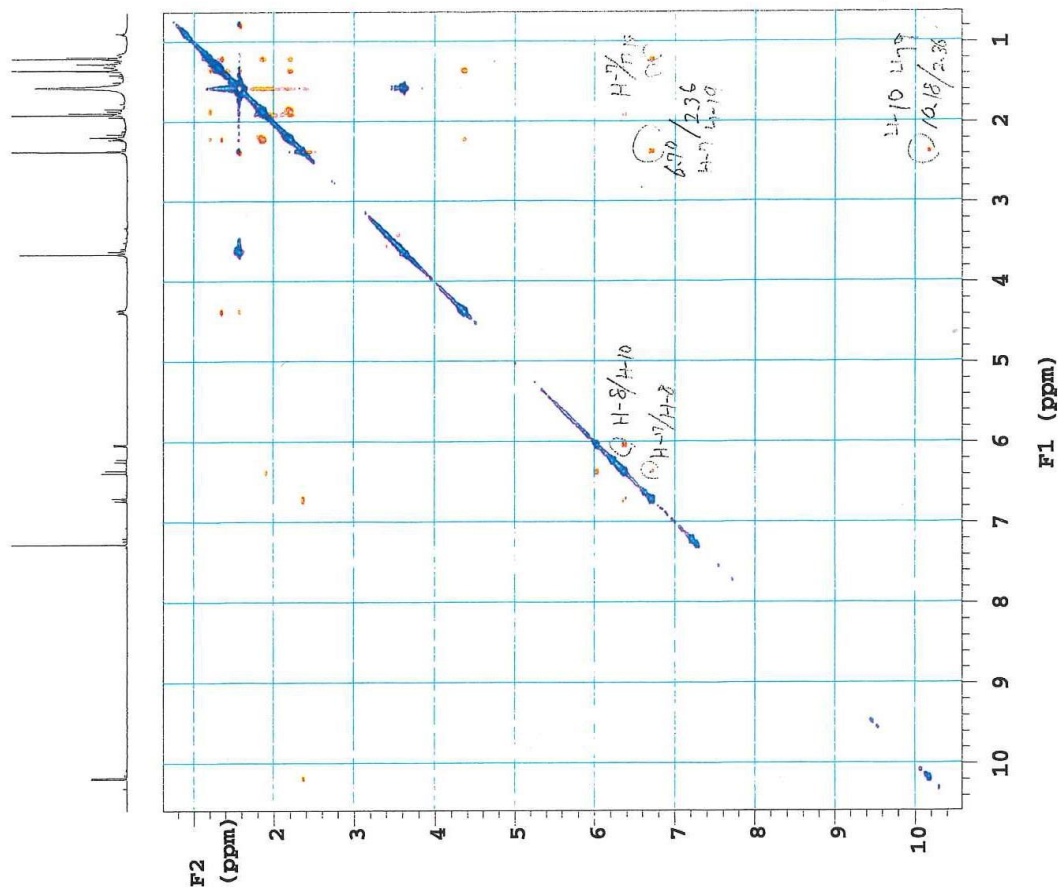
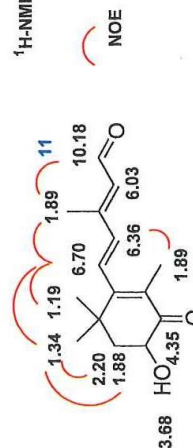
Supplementary Figure 4.1.2 H-H COSY of apo-11-astaxanthinal

!!-Apostaxanthinal

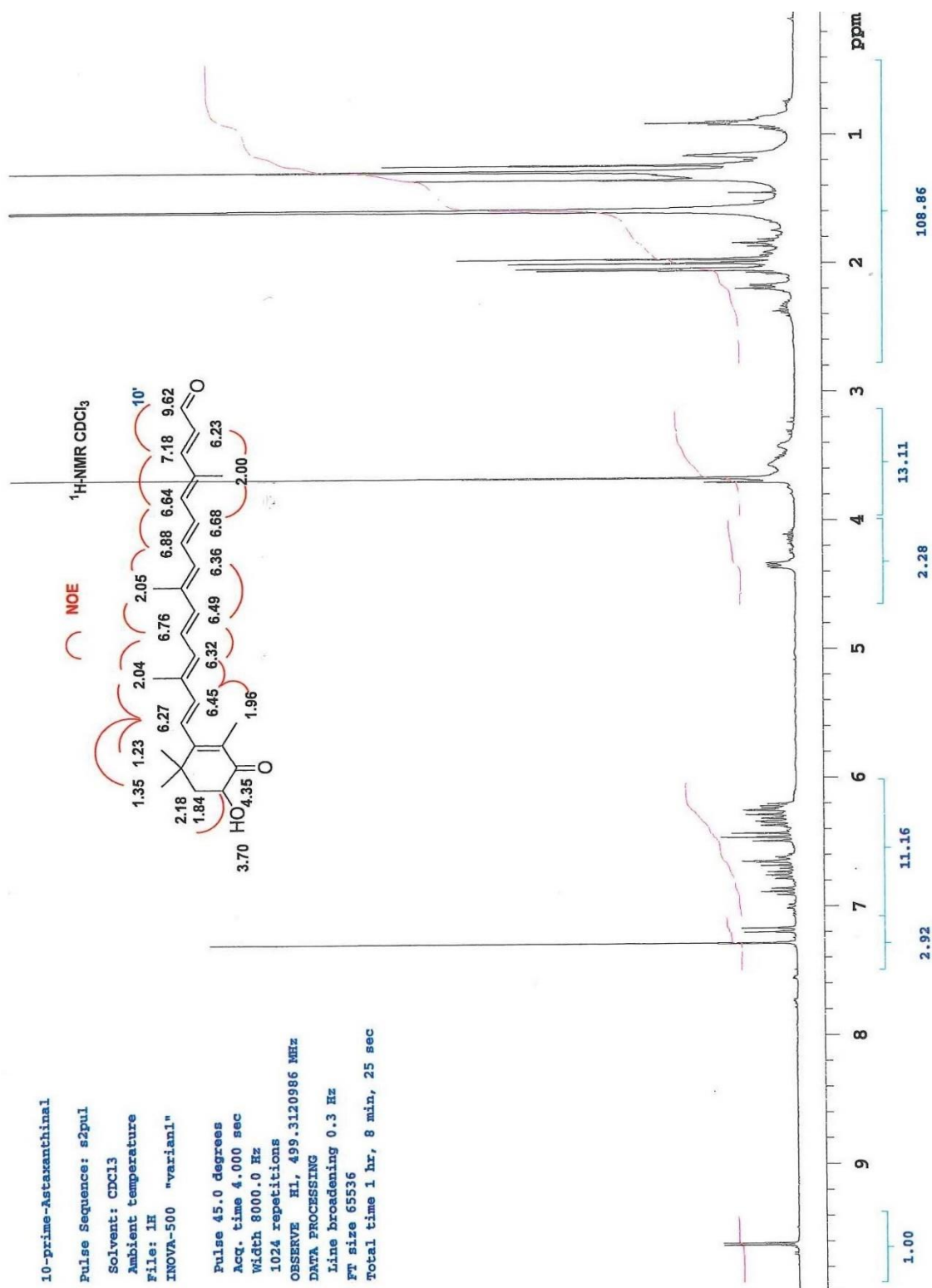
exp7 NOESY

SAMPLE		FLAGS	
date	Jul 20 2020	hs	n
solvent	CDCl ₃	sspl	y
sample	undefined	pfeflg	y
ACQUISITION	hsglwl	4739	
sw	6061.1	SPECIAL	
at	0.169	temp	not used
np	2048	gain	60
fb	3000	spin	0
ss	32	F2 PROCESSING	
dl	1.000	gf	0.078
nt	8	gfs	not used
2D ACQUISITION	fn	2048	
sw1	6061.1	F1 PROCESSING	
ni	200	gf1	0.030
tn	HL	procl	lp
sfrq	499.315	fn1	2048
tof	195.3	DISPLAY	
tpwr	61	sp	308.9
pw	12.600	wp	4972.0
NOESY		sp1	308.9
mix	1.300	wp1	4972.0
PRESATURATION	rfl	348.1	
satmode	nmn	rpf	0
satpwr	0	rfl1	348.1
satdly	0	rpf1	0
satfrq	0	PLOT	
DECOUPLER	wc	130.0	
dn	HL	sc	0
dm	nmn	wc2	130.0
		sc2	0
		vs	280
		th	2
		ai	cdc
		ph	

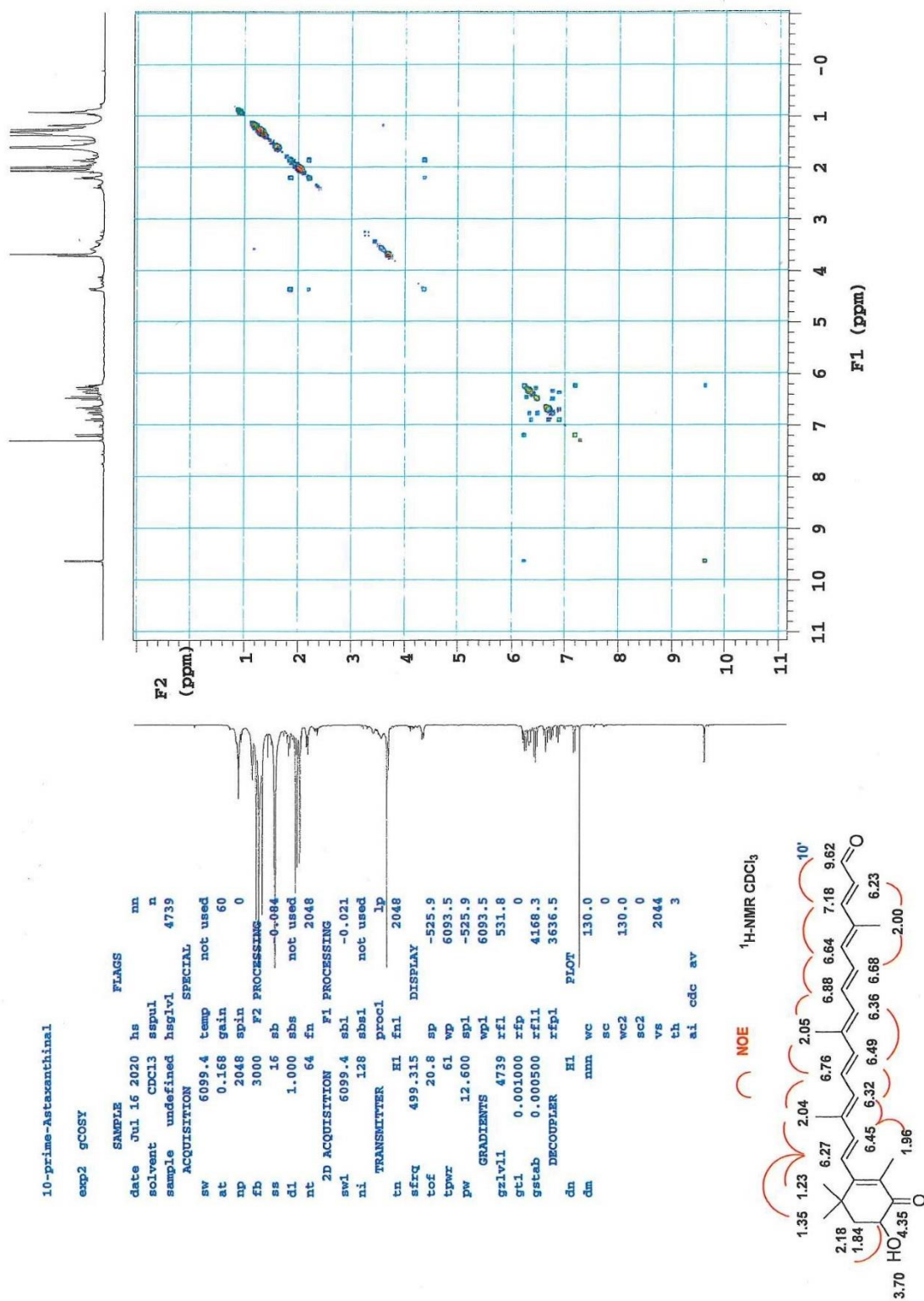
¹H-NMR CDCl₃



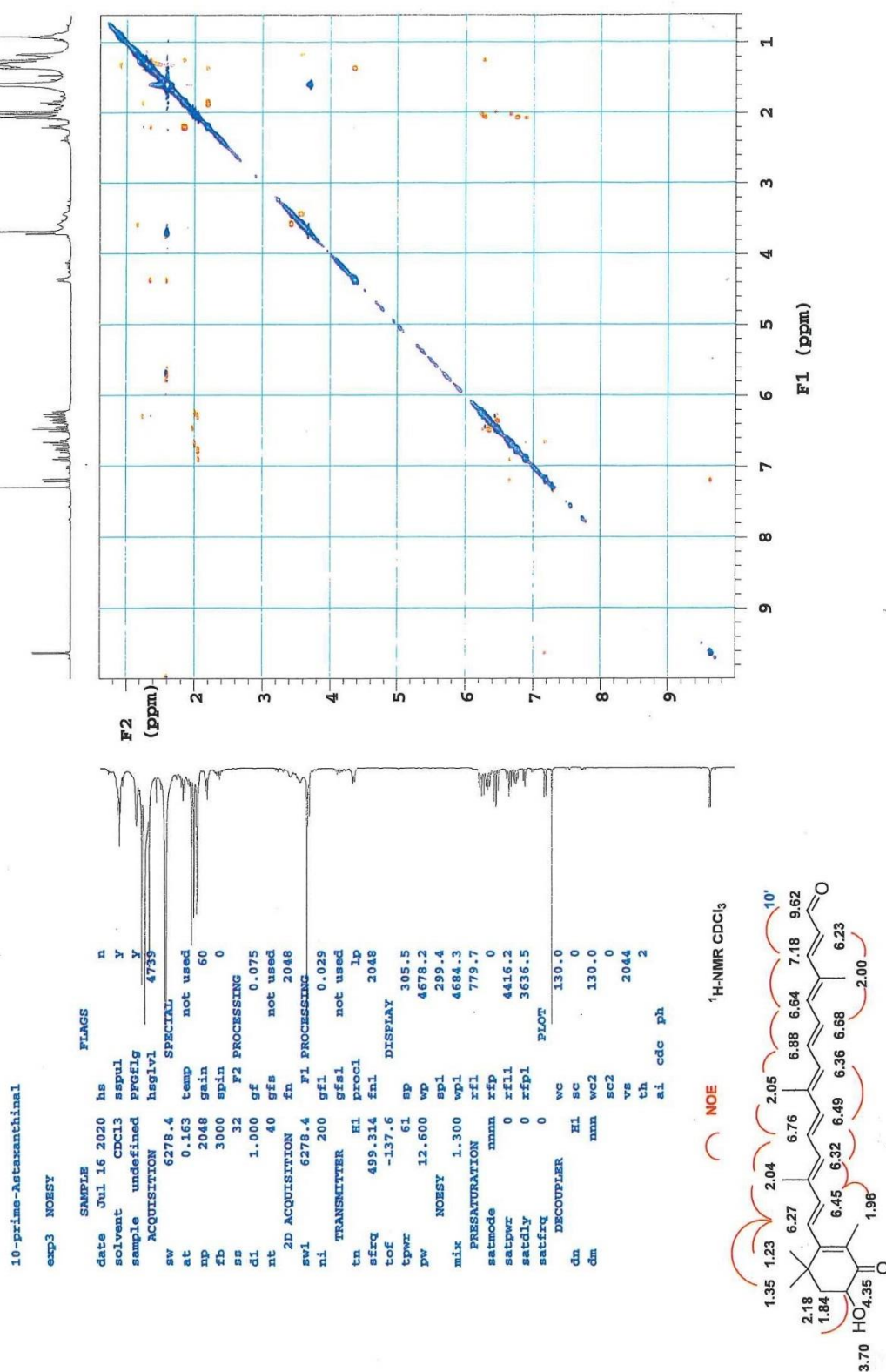
Supplementary Figure 4.1.3 NOESY of apo-11-astaxanthinal



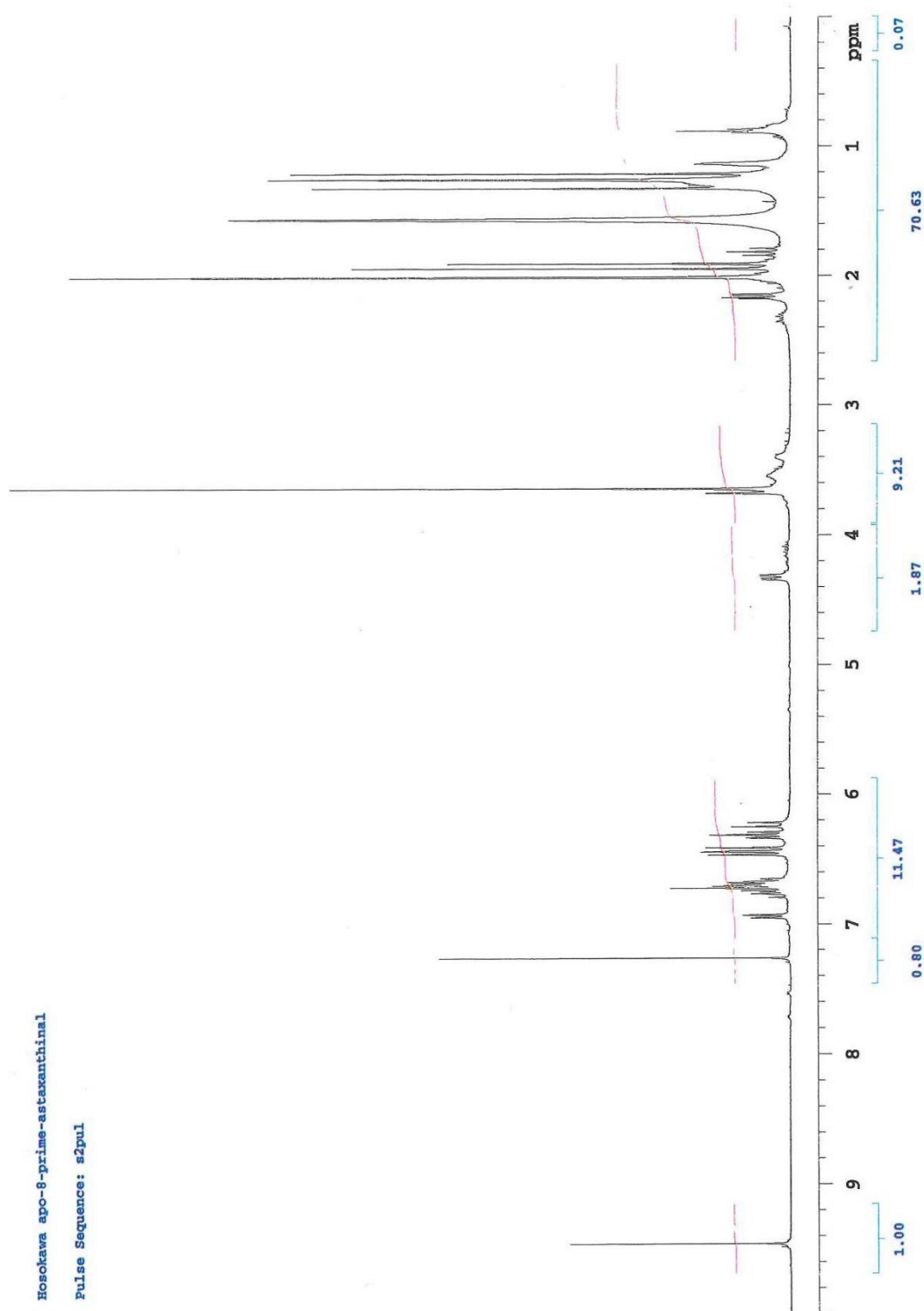
Supplementary Figure 4.1.4 ¹H-NMR analysis of apo-10'-astaxanthinal



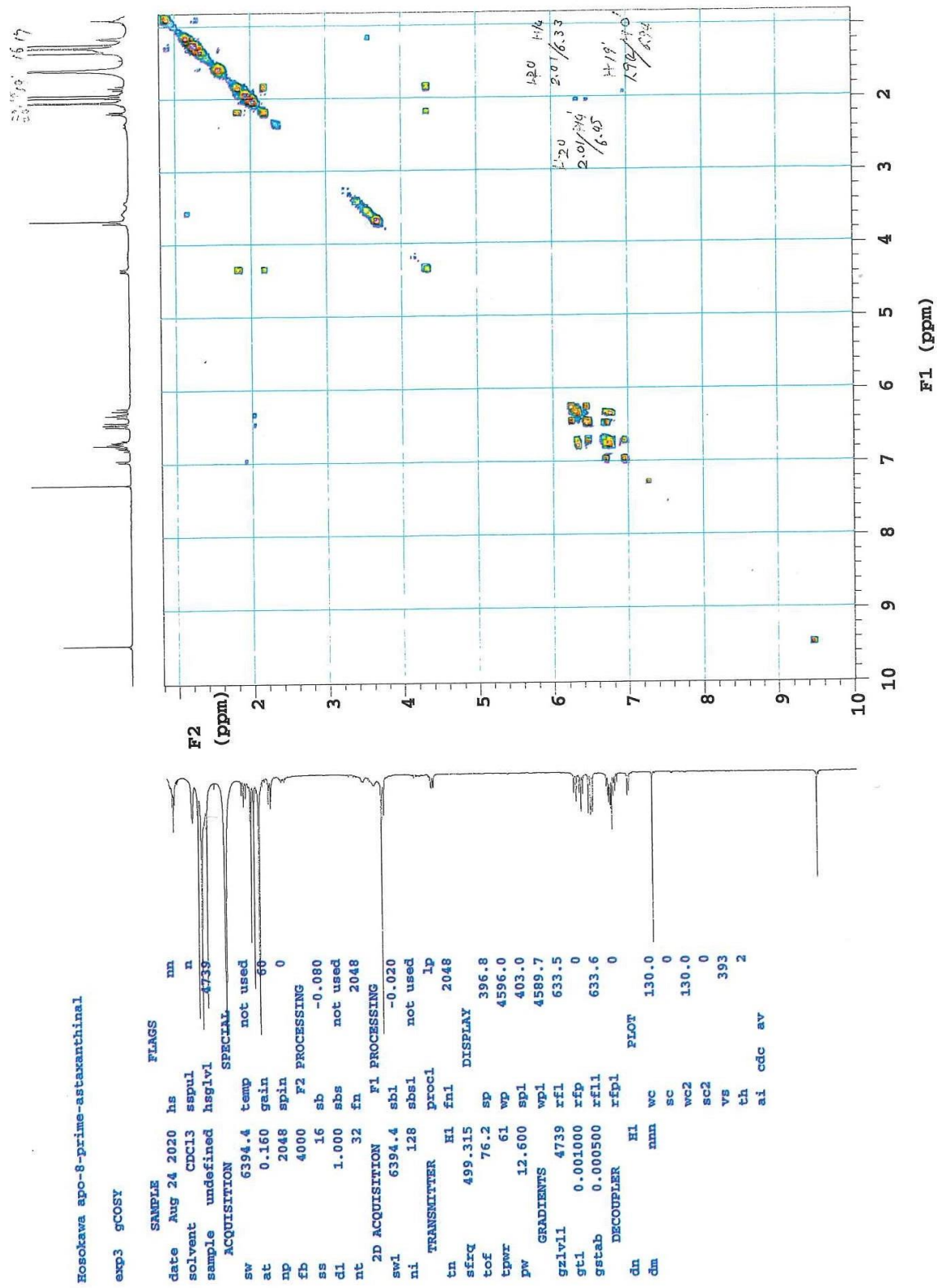
Supplementary Figure 4.1.5 H-H COSY of apo-10'-astaxanthinal



Supplementary Figure 4.1.6 NOESY of apo-10'-astaxanthinal



Supplementary Figure 4.1.7 ^1H -NMR analysis of apo-8'-astaxanthinal

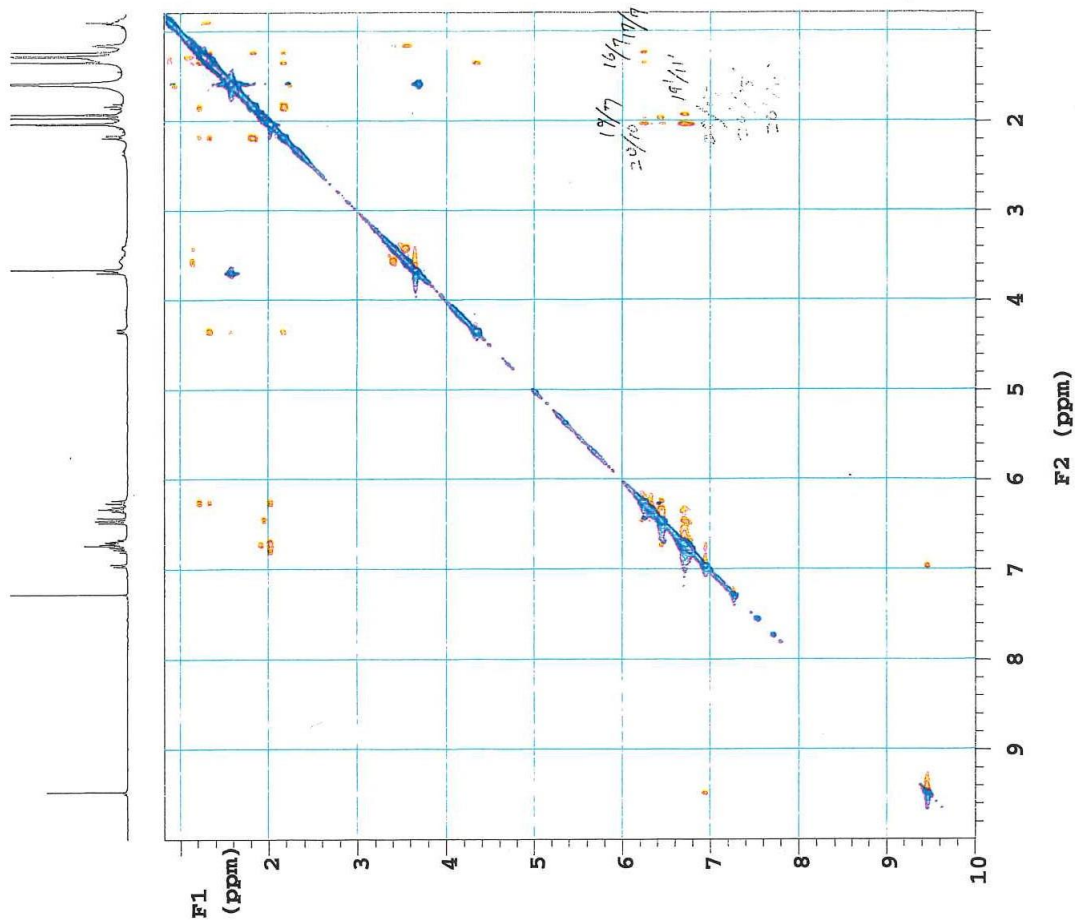


Supplementary Figure 4.1.8 H-H COSY of apo-8'-astaxanthinal

Hosokawa apo-8-prime-astaxanthinal

exp4 NOESY

SAMPLE		FLAGS	
date	Aug 24 2020	hs	n
solvent	CDCl3	sspul	y
sample	undefined	pfqflg	y
ACQUISITION	hsq1v1	4739	
sw	5729.8	SPECIAL	
at	0.179	temp	NOT USED
np	2048	gain	60
fb	3000	spin	0
ss	32	F2 PROCESSING	
d1	1.000	gf	0.083
nt	8	gfs	not used
2D ACQUISITION	fn	2048	
sw1	5729.8	F1 PROCESSING	
ni	200	gf1	0.032
TRANSMITTER		gf1	not used
tn	H1	proc1	lp
sfrq	499.315	fn1	2048
tof	-6.8	DISPLAY	
tpwr	61	sp	387.8
pw	12.600	wp	4599.5
NOESY		sp1	410.2
mix	1.300	wp1	4582.8
PRESATURATION		rfl	384.4
satmode	nmnn	rfp	0
satpwr	0	rf11	384.4
satdly	0	rfp1	0
satfrq	0	PLOT	
DECOUPLER		wc	130.0
dn	H1	sc	0
dm	nmnn	wc2	130.0
		sc2	0
		vs	393
		th	2
		ai	cdc ph



Supplementary Figure 4.1.9 NOESY of apo-8'-astaxanthinal

参考文献

- 1) World Health Organization. Global Health Observatory data, Noncommunicable diseases <https://www.who.int/data/gho/data/themes/noncommunicable-diseases> (accessed 2020-12-12)
- 2) International Food Policy Research Institute. The Global Nutrition Report 2017, Nourishing the SDGs. <https://globalnutritionreport.org/reports/2017-global-nutrition-report/> (accessed 2020-12-12)
- 3) Roberts CK and Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol*. 2005, **98**, 3.
- 4) 小川佳宏、真鍋一郎、大島正伸、竹田潔 編 実験医学増刊「慢性炎症-多様な疾患の基盤病態」羊土社 2011 年 第 29 巻 第 10 号
- 5) 小川佳宏 企画 実験医学「慢性炎症の分子プロセス」羊土社 2010 年 第 28 巻 第 11 号
- 6) 真鍋一郎「慢性炎症と加齢関連疾患」日本老年医科学会雑誌 2017 年 第 54 巻 105 頁
- 7) Suganami T et al. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005, **25**, 2062.
- 8) Weisberg SP et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003, **112**, 1796.
- 9) Suganami T and Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leuko Biol* 2010, **88**, 33.
- 10) Martinez FO and Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Fl000Prime Rep* 2014, **6**, 13.
- 11) Castoldi A et al. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol* 2016, **6**, 637.
- 12) Fujisaka S et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009, **58**, 2574.
- 13) 高市真一 編「カロテイド-その多様性と生理活性-」裳華房 2006 年
- 14) Palace VP et al. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 1999, **26**, 746.
- 15) 宮下和夫 監修 「カロテノイドの科学と最新応用技術」シーエムシー出版 2009 年
- 16) Anouk K and Torsten B. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res* 2014, **34**, 907.
- 17) Bohn T. Carotenoids, chronic disease Prevention and dietary recommendations. *Int J Vitam Nutr Res* 2017, **87**, 121.

- 18) Nagao A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *Biofactors* 2011, **37**, 83.
- 19) Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander, H. (Eds.) Carotenoids Vol. 3. Birkhäuser Verlag, 1998, Chapter 2.
- 20) Lindqvist A and Andersson S. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem* 2002, **277**, 23942.
- 21) Kiefer C et al. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 2001, **276**, 14110.
- 22) Hessel S et al. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 2007, **282**, 33553.
- 23) Amengual J et al. Two carotenoid oxygenases contribute to mammalian provitamin A metabolism. *J Biol Chem* 2013, **288**, 34081.
- 24) Wu L et al. Lack of β , β -carotene-9', 10'-oxygenase 2 leads to hepatic mitochondrial dysfunction and cellular oxidative stress in mice. *Mol Nutr Food Res* 2017, **61**, 1600576.
- 25) Handelman GJ et al. Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene. *Free Radic Biol Med* 1991, **10**, 427.
- 26) Marty C and Berset C. Factors affecting the thermal degradation of all-trans-beta-carotene. *J Agric Food Chem* 1990, **38**, 1063.
- 27) Kim SJ et al. Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids* 2001, **36**, 191.
- 28) Etoh H et al. Auto-Oxidation Products of Astaxanthin. *J Oleo Sci* 2012, **61**, 17.
- 29) Rodriguez EB and Rodriguez-Amaya DB. Formation of apocarotenals and epoxycarotenoids from β -carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chem* 2007, **101**, 563.
- 30) Rodriguez EB and Rodriguez-Amaya DB. Lycopene epoxides and apo-lycopenals formed by chemical reactions and autoxidation in model systems and processed foods. *J Food Sci* 2009, **74**, C674.
- 31) Hayakawa T et al. Reaction of astaxanthin with peroxyxynitrite. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008, **72**, 2716.
- 32) Kopec RE et al. Production, separation, and characterization of apo-luteinoids by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018, **1102**, 45.
- 33) Hou X et al. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends Plant Sci* 2016, **21**, 792.
- 34) Zoccali M et al. First apocarotenoids profiling of four microalgae strains. *Antioxidants* 2019, **8**, 209.
- 35) Fleshman MK et al. Carotene and novel apocarotenoid concentrations in orange-fleshed *Cucumis melo melons*: determinations of β -carotene bioaccessibility and bioavailability. *J Agric Food Chem* 2011, **59**,

4448.

- 36) Harrison EH et al. The formation, occurrence, and function of β -apocarotenoids: β -carotene metabolites that may modulate nuclear receptor signaling. *Am J Clin Nutr* 2012, **96**, 1189S.
- 37) Ford NA et al. Lycopene and apo-12'-lycopenal reduce cell proliferation and alter cell cycle progression in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 2011, **63**, 256.
- 38) Hosokawa M et al. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. *Food Sci Technol Res* 1999, **5**, 243.
- 39) Iwasaki S et al. In vivo antioxidant activity of fucoxanthin on obese/diabetes KK- A^y mice. *Food Nutr Sci* 2012, **3**, 1491.
- 40) Maeda H et al. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK- A^y mice. *J Agric Food Chem* 2007, **55**, 7701.
- 41) Maeda H et al. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **332**, 392.
- 42) Hosokawa M et al. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK- A^y mice. *Arch Biochem Biophys* 2010, **504**, 17.
- 43) Yang YP et al. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nat Prod Res* 2020, **34**, 1791.
- 44) Asai A et al. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metab Dispos* 2004, **32**, 205.
- 45) Takatani N et al. Identification of paracentrone in fucoxanthin-fed mice and anti-inflammatory Effect against lipopolysaccharide-stimulated macrophages and adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2020 in press.
- 46) Mikami N et al. A protocol for human serum fucoxanthinol quantitation using LC-MS/MS system. *J Nutri Med Diet Care* 2016, **2**, 019.
- 47) Hashimoto T et al. Pharmacokinetics of fucoxanthinol in human plasma after the oral administration of kombu extract. *Br J Nutr* 2012, **107**, 1566.
- 48) Zoccali M. et al. Carotenoids and apocarotenoids determination in intact human blood samples by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2018, **1032**, 40.
- 49) Zoccali M et al. Determination of free apocarotenoids and apocarotenoid esters in human colostrum. *Anal Bioanal Chem* 2020, **412**, 1335.

- 50) Takatani N et al. Fucoxanthin inhibits hepatic oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2020, **528**, 305.
- 51) Takatani N et al. Seco-type β -apocarotenoid generated by β -carotene oxidation exerts anti-inflammatory effect against activated macrophages. *J Oleo Sci* 2020 in press.
- 52) 「NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014」日本消化器病学会 2014 年
- 53) Younossi ZM et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016, **64**, 73.
- 54) Romero-Gómez M et al. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 2017, **67**, 829.
- 55) Day CP and James OF. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998, **114**, 842.
- 56) Chang YH et al. Fucoxanthin attenuates fatty acid-induced lipid accumulation in FL83B hepatocytes through regulated Sirt1/AMPK signaling pathway *Biochem Biophys Res Commun* 2018, **495**, 197.
- 57) Folch J et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, **226**, 497.
- 58) Kikugawa K et al. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal Biochem* 1992, **202**, 249.
- 59) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**, 680.
- 60) Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984, **10**, 203.
- 61) Alkhoury et al. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009, **3**, 445.
- 62) Park HJ et al. Beneficial effects of *Undaria pinnatifida* ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice. *Food Chem Toxicol* 2011, **49**, 727.
- 63) Woo MN et al. Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chem Biol Interact* 2010, **186**, 316.
- 64) Zheng J et al. Protective effects of fucoxanthin against alcoholic liver injury by activation of Nrf2-mediated antioxidant defense and inhibition of TLR4-mediated inflammation. *Mar Drugs* 2019, **17**, E552.
- 65) Vonghia L et al. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 2013, **14**, 19867.
- 66) Chiba T et al. Evaluation of methionine content in a high-fat and choline-deficient diet on body weight

- gain and the development of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One* 2016, **11**, e0164191.
- 67) Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007, **131**, 1728.
- 68) Bae M et al. Food components with antifibrotic activity and implications in prevention of liver disease. *J Nutr Biochem* 2018, **55**, 1.
- 69) Li JT et al. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 2008, **43**, 419.
- 70) Kim MB et al. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2019, **513**, 657.
- 71) Tsukui T et al. Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KK-*A^y* obese/diabetic mice. *J Agric Food Chem* 2007, **55**, 5025.
- 72) Ricchi M et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009, **24**, 830.
- 73) Brauersreuther V et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012, **18**, 727.
- 74) Li BH et al. Steatosis induced CCL5 contributes to early-stage liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease progress. *Transl Res* 2017, **180**, 103.
- 75) 池嶋健一「NAFLD の複雑な病因と病態」日本内科学会雑誌 2016 年 第 105 巻 15 頁
- 76) Harte AL et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm* 2010, **7**, 15.
- 77) Miele L et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009, **49**, 1877.
- 78) Itoh M et al. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One* 2013, **8**, e82163.
- 79) 田谷大輔 北海道大学大学院水産科学院修士論文 2018 年
- 80) Thomas LD et al. The human mitochondrial enzyme BCO2 exhibits catalytic activity toward carotenoids and apocarotenoids. *J Biol Chem* 2020, **295**, 15553.
- 81) Itoh K et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **236**, 313.
- 82) Dinkova-Kostova AT et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**, 11908.
- 83) Kansanen E et al. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-

- prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med* 2009, **47**, 1310.
- 84) Taguchi K et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**, 13561.
- 85) Cuadrado A et al. Transcription Factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach. *Pharmacol Rev* 2018, **70**, 348.
- 86) Kubo E et al. Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. *Sci Rep* 2017, **7**, 14130.
- 87) Maria SM et al. Modulation of Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway by curcuma- and garlic-derived hybrids. *Front Pharmacol* 2020, **10**, 1597.
- 88) Yang CM et al. Apo-8'-lycopenal induces expression of HO-1 and NQO-1 via the ERK/p38-Nrf2-ARE pathway in human HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 2012, **60**, 1576.
- 89) Kim HK et al. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1999, **58**, 759.
- 90) Wang R et al. Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009, **81**, 53.
- 91) Kim SC et al. (2017). Thiol-reducing agents prevent sulforaphane-induced growth inhibition in ovarian cancer cells. *Food Nutr Res* 2017, **61**, 1368321.
- 92) Ahmed SMU et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017, **1863**, 585.
- 93) Wardyn, JD et al. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans* 2015, **43**, 621.
- 94) Kobayashi EH et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 2016, **7**, 11624.
- 95) Cooper DA. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J Nutr* 2004, **134**, 221S.
- 96) Grune T et al. β -Carotene is an important vitamin A source for humans. *J Nutr* 2010, **140**, 2268S.
- 97) Palczewski K. G protein–coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 2006, **75**, 743.
- 98) Clagett-Dame M and Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* 2011, **3**, 385.
- 99) Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 2001, **21**, 167.
- 100) Harrison EH and Quadro L. Apocarotenoids: Emerging roles in mammals. *Annu Rev Nutr* 2018, **38**, 153.

- 101) Aguilar F et al. Scientific Opinion on the re-evaluation of β -apo-8'-carotenal (E 160e) as a food additive. *EFSA Journal* 2012, **10**, 2499.
- 102) Gurak PD et al. Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of β -carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives. *Food Chem* 2014, **147**, 160.
- 103) Benevides CMJ et al. A chemical study of β -carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products. *Food Chem* 2011, **126**, 927.
- 104) Eroglu A et al. The eccentric cleavage product of β -carotene, β -apo-13-carotenone, functions as an antagonist of RXRa. *Arch Biochem Biophys* 2010, **504**, 11.
- 105) Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander, H. (Eds.) Carotenoids Vol. 1B. Birkhäuser Verlag, 1995, Chapter 6.
- 106) Britton FCG and Selva A. A seco-carotenoid from leaves of two cycads. *Phytochemistry* 1989, **28**, 2793.
- 107) Maoka T et al. Carotenoids in three species of Corbicula clams, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula* sp. (Chinese freshwater corbicula clam). *J Agric Food Chem* 2005, **53**, 8357.
- 108) Cui J et al. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* 2007, **28**, 601.
- 109) Li Q and Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**, 725.
- 110) Arshad L et al. Immunosuppressive effects of natural α , β -unsaturated carbonyl-based compounds, and their analogs and derivatives, on immune cells: a review. *Front pharmacol* 2017, **8**, 22.
- 111) Linnewiel-Hermoni K et al. Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. *Free Radic Biol Med* 2014, **75**, 105.
- 112) Higuera-Ciajara I et al. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006, **46**, 185.
- 113) Hussein G et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 2006, **69**, 443.
- 114) Visioli F and Artaria C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct* 2017, **8**, 39.
- 115) Grimmig B et al. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *GeroScience* 2017, **39**, 19.
- 116) Kistler A et al. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch Toxicol* 2002, **75**, 665.
- 117) Permana PA et al. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance.

Biochem Biophys Res Commun 2006, **341**, 507.

118) Burhans MS et al. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr Physiol* 2018, **9**, 1.

119) Ikeuchi M et al. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, **71**, 893.

120) Kim B et al. Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet-induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem* 2017, **43**, 27.

121) Inoue M et al. Astaxanthin functions differently as a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator in adipocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol* 2012, **84**, 692.

122) Yang HE et al. Synthesized enone fatty acids resembling metabolites from gut microbiota suppress macrophage-mediated inflammation in adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2017, **61**, 1700064.

123) Ohgami K et al. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**, 2694.

124) Yudkin JS et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000, **148**, 209.

125) Kim JH et al. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm* 2009, **80**, 613.

126) Nishida Y et al. Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020, **11**, 241.

127) Lei Wu et al. Astaxanthin-shifted gut microbiota is associated with inflammation and metabolic homeostasis in mice. *J Nutr* 2020, **150**, 2687.

128) Rosen ED et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000, **14**, 1293.

129) Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 2006, **4**, 263.

130) Rosen ED et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 2002, **16**, 22.

131) Ziouzenkova O et al. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 2007, **13**, 695.

132) Ziouzenkova O et al. Asymmetric cleavage of β -carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 2007, **21**, 77.

133) Cooperstone JL et al. Limited appearance of apocarotenoids is observed in plasma after consumption of tomato juices: a randomized human clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2018, **108**, 784.

134) Takahashi S et al. Apo-12'-lycopenal, a lycopene metabolite, promotes adipocyte differentiation via

peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. *J Agric Food Chem* 2018, **66**, 13152.

135) Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res* 2010, **690**, 57.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、博士課程という新たな道を教示下さるとともに、素晴らしい研究環境と終始懇切なる御指導・御助言を賜りました北海道大学大学院 水産科学研究院 細川雅史 教授に心より感謝申し上げます。本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言と御校閲を賜りました北海道大学大学院 水産科学研究院 酒井隆一 教授に感謝申し上げます。北海道大学大学院 水産科学研究院 別府史章 准教授には研究に関する貴重な御助言と御校閲を賜るとともに、生活に関する相談に親身にご対応頂きました。ここに心より感謝申し上げます。また、本研究の核心であるアポカロテノイドの合成と研究を遂行する上での貴重な御助言を賜りました神戸薬科大学 山野由美子 准教授に深謝申し上げます。アポカロテノイドの構造解析に関して御助言を賜りました一般財団法人生産開発科学研究所 眞岡孝至 博士に感謝申し上げます。本研究にあたり、貴重な御指導・御鞭撻を賜りました帯広畜産大学 宮下和夫 教授に心より感謝申し上げます。そして、研究生活を送る上で、苦楽を共に分かち合った北海道大学 大学院水産科学院 生物資源化学分野 機能性物質化学研究室の同志の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、自身の進む道をいつ何時も応援してくれた母と妹に心から感謝します。本当にありがとうございました。