

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07786

研究課題名(和文)パプリカキサントフィルによる慢性炎症疾患の改善作用機構の解明

研究課題名(英文) Research of preventing effects of chronic inflammatory diseases by paprika xanthophyll

研究代表者

前多 隼人 (Maeda, Hayato)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：80507731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：パプリカに含まれる色素成分であるキサントフィルによる慢性炎症の抑制作用を検討した。培養細胞による検討の結果、パプリカに特徴的に含まれるカプサンチン、ククルビタキサントフィルAが強い慢性炎症抑制作用を示した。また糖尿病肥満モデルマウスによる動物実験の結果、パプリカのキサントフィルは肝臓と脂肪組織での肥満による慢性炎症を抑制し、その作用はマクロファージのバランスの調整が関係することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キサントフィルはカロテノイドの一種であり、抗酸化や抗がん、抗肥満作用を示す機能的な成分が注目されている。パプリカは緑黄色野菜の中でも特にキサントフィルが多く、抽出した色素は天然色素として食品にも使われている。本研究によりパプリカの主要なキサントフィルであるカプサンチンは、肥満による慢性炎症を改善する作用を示すことが示唆された。また体内への吸収効率が高い報告があるククルビタキサントフィルAも強い効果を示すことが、初めて明らかになった。肥満による慢性炎症は、糖尿病などの他の生活習慣病の原因となる。パプリカのキサントフィルの食事から摂取は、これらの疾患の予防・改善に役立つことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The inhibitory effects of chronic inflammation related to obesity by paprika xanthophyll was examined. Capsanthin and cucurbitaxanthin A, which a specific xanthophyll in paprika, showed strong suppressing effects of chronic inflammation in adipocyte and macrophage co-culture cells. Further, dietary paprika xanthophyll suppressed inflammation in liver and adipose tissue in diabetic obesity model mouse. The mechanism was related to regulation of macrophage balance. These results suggest that paprika xanthophyll are useful food components to improve obesity related life style diseases.

研究分野：食品科学、脂質栄養学

キーワード：肥満 パプリカ キサントフィル 脂肪細胞 慢性炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる色素成分であるカロテノイドは、プロビタミン A 活性の他、抗酸化活性や生活習慣病、がんの予防作用などの健康維持に關する重要な食品成分である。カロテノイドはプロビタミン A 活性を示すカロテンと、分子内に酸素を有するキサントフィルに分類される。カロテンと比較しキサントフィルは、抗肥満や抗糖尿病作用などの特異的な生理機能性を有することが報告されている。

パプリカはカロテノイドを有する野菜であり、野菜の中でもキサントフィルの割合が高いことが特徴である。またパプリカはキサントフィル類であるカプサンチン(CA)、カプサンチン 3,6-エポキシド、ククルビタキサンチン A(CU)、カプソルピン(CS)などが含まれる(図 1)。パプリカに含まれるキサントフィルの約 50%は CA である。CA、CS、クリプトカプシン、カプサンチン 3,6-エポキシドはエンドグループに五員環構造を有する。また CU のように環状構造内に酸素原子を有するものもある(図 1)。これらの物質は他の食品では含有量が少なく、ユニークな構造である。

これまでの研究でパプリカ色素混合物が脂肪細胞での慢性炎症を改善し、肥満によるインスリン抵抗性の改善につながることを報告している。更にパプリカ色素を摂取することにより、ヒトの赤血球中にキサントフィル類が特に増加することが報告されている。このことからパプリカには、体内への吸収効率が高い性質のキサントフィルが含まれることが推測される。一方でこれらの生理機能が、パプリカに含まれるどのキサントフィルによるものであるか明らかになっていない。また細胞や組織内での慢性炎症抑制の作用メカニズムも不明である。

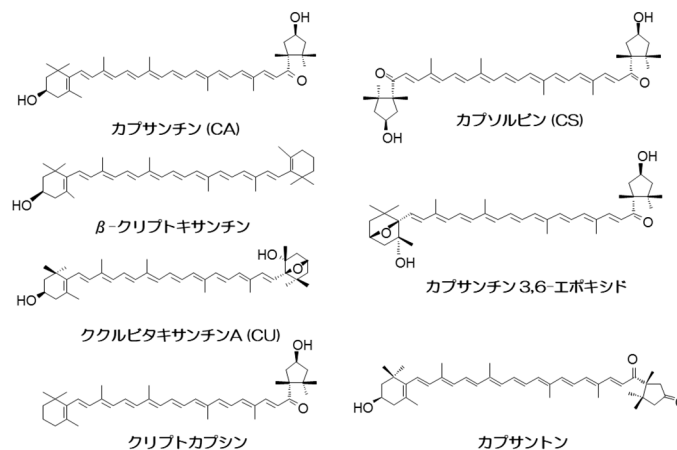


図1 パプリカに含まれる主要なキサントフィルの構造

### 2. 研究の目的

本研究では、パプリカに含まれるキサントフィルのうち、特に強い慢性炎症抑制作用を示す物質を明らかにすることを目的とした。更に、動物実験により肥満によっておこる慢性炎症の改善効果について、*in vivo* 試験にて評価した。また細胞へのキサントフィルの細胞種による取り込みの違いについても検討をおこなった。主な検討項目を以下に示した。

- (1) 脂肪細胞での慢性炎症改善作用を示すパプリカに含まれるキサントフィルを明らかにする。
- (2) 肥満による慢性炎症に關する脂肪細胞とマクロファージ細胞内へのキサントフィル類の吸収や蓄積量を分析し、パプリカキサントフィルの体内動態について明らかにする。
- (3) パプリカキサントフィルによる肥満動物に投与し、肝臓と白色脂肪組織での慢性炎症の緩和作用と作用メカニズムについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) パプリカキサントフィルによる慢性炎症改善作用の比較検討

マウス由来脂肪細胞(3T3-L1)とマウス由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)を共培養することで、肥満によって誘導される脂肪細胞での慢性炎症を再現することができる。この共培養の細胞にパプリカキサントフィルを添加し、それぞれのキサントフィルによる慢性炎症抑制作用を比較した。また慢性炎症の惹起に關する炎症性サイトカインの変化についても分析をおこなった。

3T3-L1 細胞を分化誘導培地にて培養し脂肪細胞へと分化させた。その後、RAW264.7 細胞をパプリカキサントフィルと共に培地に添加し、24 時間後に炎症関連因子(TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6 (Interleukin-6), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1), COX-2 (Cyclooxygenase-2), iNOS (inducible nitric oxide synthase) )の mRNA 発現量の変化を定量 RT-PCR 法にて評価した。パプリカキサントフィルはパプリカ色素から分取することで調整し、CA、CU、CS、 $\beta$ -クリプトキサンチン、クリプトカプシン、カプサンチン 3,6-エポキシド、カプサントンを試料とした。次に検討した試料の中で高い活性を示したキサントフィルについて、炎症惹起に關するサイトカインの培地中の濃度を ELISA 法にて測定した。炎症に關連する一酸化窒素(NO)の産生に關わる

iNOS、及びプロスタグランジンの産生に關与する COX-2 のタンパク質の発現量は Western blot 法にて評価した。

次に脂肪細胞とマクロファージ細胞のそれぞれに炎症刺激を与える条件で培養し、パブリカキサントフィルの作用を評価した。3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導した後、培地へ TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) を添加した。その際に CA、CU、CS を添加し、炎症関連因子の mRNA 発現量と培地中のサイトカイン濃度を測定した。また、脂肪細胞を CA、CU、CS 添加培地で 24 時間培養した後、TNF- $\alpha$  にて 1 時間刺激し、炎症関連因子の遺伝子発現調整に關わる ERK (Extracellular signal-regulated kinase) と JNK (c-Jun N-terminal kinase) のタンパク質のリン酸化を Western blot 法にて評価した。マクロファージ細胞に対する効果は、RAW264.7 細胞へリポポリサッカライド(LPS)を添加し炎症を誘導する実験系で評価した。RAW264.7 細胞を 24 時間の前培養の後、試料と LPS を含む培地で 24 時間培養した。その後、培地中の炎症系サイトカインと NO の濃度を評価した。また、RAW264.7 細胞をパブリカキサントフィル添加培地で 24 時間培養後、1 時間 LPS で細胞を刺激し、ERK のタンパク質のリン酸化に与える効果についても Western blot 法にて評価した。

#### (2) パブリカキサントフィルの細胞内での動態についての分析

培養細胞へ添加したキサントフィルの代謝物の分析をおこなった。3T3-L1 脂肪細胞、及び RAW264.7 細胞にキサントフィルを添加し、24 時間後細胞を回収した。その後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて細胞内に蓄積したキサントフィルとその含量を測定した。

#### (3) パブリカキサントフィルによる肥満動物に対する機能の解明

5 週齢の雄の肥満糖尿病モデルマウス(NSY/Hos)に対してパブリカキサントフィルを投与し、肥満による慢性炎症の抑制効果とその作用メカニズムを検討した。実験飼料は脂質 20% 及びコレステロール 2% 添加の高脂肪食を使用した。実験群はコントロール群、パブリカキサントフィル 0.1% 含有飼料投与群(0.1%群)、パブリカキサントフィル 0.5% 含有飼料投与群(0.5%群)とした。1 週間の予備飼育の後、実験飼育を 17 週間おこなった。実験飼育後、解剖し体重、臓器重量測定、血清成分測定をおこなった。また肝臓、及び精巣周囲白色脂肪組織での各種遺伝子の mRNA 発現量の変化を定量 RT-PCR 法にて分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) パブリカキサントフィルによる慢性炎症改善作用の比較検討

3T3-L1 細胞と RAW264.7 細胞の共培養系でパブリカキサントフィルの慢性炎症抑制作用を評価した。添加試料のうち、CA、CU、CS が TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、COX-2、iNOS の mRNA 発現量の低下作用が強い傾向が認められた。また、これらのキサントフィルを 10  $\mu$ M で添加した結果、培地中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 濃度が低下及び低下傾向を示した。(図 2)。また炎症に關与するプロスタグランジン産生に關与する COX-2 の mRNA とタンパク質の発現量が、低下及び低下傾向を示した。この効果は CU で最も高い効果であった(図 3)。

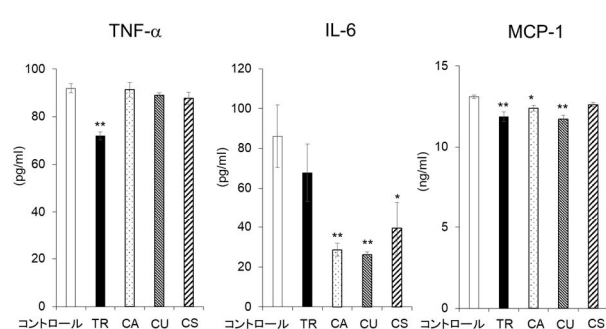


図2 共培養細胞の培地中の炎症関連サイトカイン濃度の抑制作用

3T3-L1脂肪細胞とRAW264.7マクロファージ様細胞を共培養し、それぞれのサンプルを10  $\mu$ Mで添加した。(TR: Troglitazone, CA: カブサンチン, CU: クルビタキサンチン A, CS: カブソルビン)

\*\* :  $p < 0.01$  vs コントロール, \* :  $p < 0.05$  vs コントロール

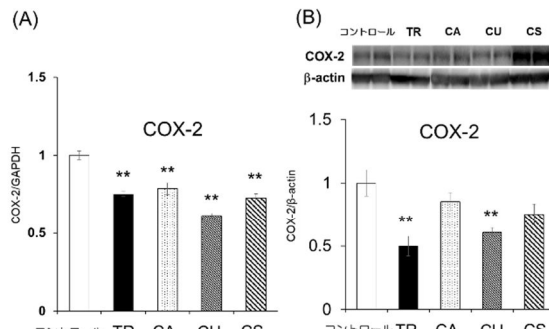


図3 共培養細胞でのCOX-2の発現抑制作用

3T3-L1脂肪細胞とRAW264.7マクロファージ様細胞を共培養し、それぞれのサンプルを10  $\mu$ Mで添加した。(A)COX-2のmRNA発現量の変化 (B)COX-2のタンパク質の発現量の変化 (TR: Troglitazone, CA: カブサンチン, CU: クルビタキサンチン A, CS: カブソルビン)

\*\* :  $p < 0.01$  vs コントロール

次に 3T3-L1 脂肪細胞に TNF- $\alpha$  添加による刺激を与える実験系で評価をおこなった。その結果、CA、CU、CS は MCP-1、IL-6 の mRNA 発現と培地中の濃度の上昇を抑制した。更に CA と CU は MAPK のうち JNK のリン酸化を抑制した(図 4)。

また RAW264.7 細胞を LPS 添加により炎症を誘導し、同様に炎症抑制作用を評価した。その結果、脂肪細胞に添加した際と同様に CA、CU、CS は LPS によって誘導された培地中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 および NO の産生を抑制した。更にこれらの炎症の誘導の制御に關与する ERK のリン酸化が CA、CU 添加細胞で有意に低下した(図 5)。

#### (2) パブリカキサントフィルの細胞内での動態についての分析

脂肪細胞やマクロファージへパブリカキサントフィルを添加した際の動態と蓄積量の分析をおこなった。3T3-L1 脂肪細胞、及びマクロファージ細胞に CA 及び CU を添加し、細胞内への蓄積量を測定した。その結果、脂肪細胞では CA、CU 共にほぼ同量の蓄積が認められた(CA:

9.38±0.53 ng/mg protein、CU: 8.69±0.88 ng/mg protein)。一方、マクロファージ細胞では CU の方が CA よりも取り込み量が高いことが明らかになった(CA: 3.29±0.22 ng/mg protein、CU: 18.29±0.82 ng/mg protein)。

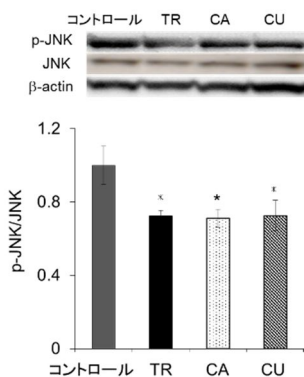


図4 脂肪細胞でのJNKタンパク質のリン酸化抑制作用

3T3-L1脂肪細胞にそれぞれのサンプルを10 μMで培養後、TNF-αを添加した。(TR: Troglitazone, CA: カブサンチン, CU: ククルピタキサンチン A)  
\*: p<0.05 vs コントロール

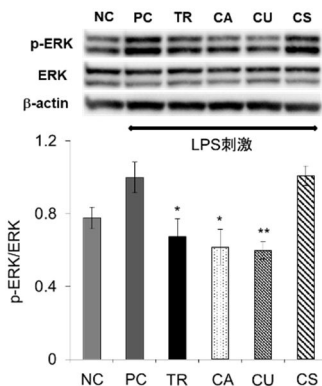


図5 マクロファージ様細胞でのERKタンパク質のリン酸化抑制作用

RAW264.7細胞にそれぞれのサンプルを10 μMで培養後、LPSを添加した。(NC: LPS刺激なしコントロール, PC: LPS刺激有コントロール, TR: Troglitazone, CA: カブサンチン, CU: ククルピタキサンチン A, CS: カブソルビン)  
\*: p<0.05 vs PC, \*\*: p<0.01 vs PC

### (3) パプリカキサントフィルによる肥満動物に対する機能の解明

糖尿病肥満モデルマウスにパプリカキサントフィルを 0.1%、0.5% 含む高脂肪食を投与し、肥満によって誘導される各組織での慢性炎症の改善作用を評価した。コントロール群と比較して 0.1% 群、0.5% 群では血糖値が低下傾向を示した。また肝臓での炎症に関与する AST、ALT 値が低下傾向を示した。さらに、0.5% 群で肝臓中の IL-1β の mRNA 発現が有意に低下し、IL-6、TNF-α の mRNA 発現が低下傾向を示した。

肝臓脂質の蓄積含量はコントロール群、0.1% 群、0.5% 群で変化が認められなかった。しかし、パプリカキサントフィル投与群で AST、ALT の低下傾向がみられたことから、炎症に関与するマクロファージの変化に着目した評価をおこなった。マクロファージには M1 と M2 のマクロファージが存在する。M1 マクロファージは炎症誘発型であり、炎症性メディエーターを産生する。一方、M2 マクロファージは炎症抑制型であり、IL-10 などの抗炎症性メディエーターを産生する。そこで両マクロファージのマーカー遺伝子の発現量を評価することで、どちらのマクロファージが優勢か分析をおこなった。その結果、肝臓において M1 マクロファージマーカーである CD80 の mRNA 発現量が 0.5% 群で有意に低下していた(図 6)。一方 M2 マクロファージマーカーである CD206 の mRNA 発現量が上昇した(図 6)。精巣周囲白色脂肪組織でも同様の傾向が認められ、特に 0.5% 群ではコントロール群と比較し、抗炎症作用を示す IL-10 の mRNA の発現量が有意に上昇した。このことからパプリカ色素はマクロファージに作用し、臓器中の M2 マクロファージの数を増加させることが示唆された。

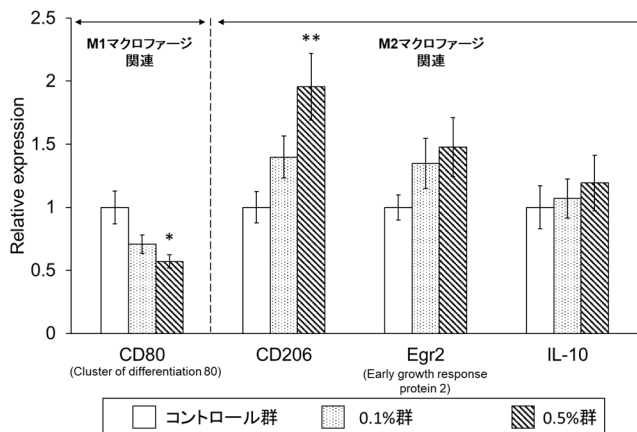


図6 パプリカキサントフィルを投与したマウスの肝臓でのM1、M2マクロファージマーカー遺伝子の mRNA 発現量の変化

\*: p<0.05 vs コントロール群、 \*\*: p<0.01 vs コントロール群

以上の結果から、パプリカキサントフィルのうち、CA、CU、CS は脂肪細胞やマクロファージでの炎症を抑制することが示唆され、パプリカキサントフィルの慢性炎症抑制作用を示す活性成分であることが考えられた。また、動物試験により M1 と M2 のマクロファージのバランスを調整し、肥満による慢性炎症を関与することが示唆された。本研究結果から、パプリカキサントフィルが生活習慣病を予防する食品成分として活用されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 前多隼人, 泉ひかり, 福田寛	4. 巻 3
2. 論文標題 カロテノイドによる慢性炎症抑制作用、及び海藻に含まれるフコキサンチンの季節変動	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 66-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Hayato, Fukuda Satoru, Izumi Hikari, Saga Naotsune	4. 巻 16
2. 論文標題 Anti-Oxidant and Fucoxanthin Contents of Brown Alga Ishimozuku ( <i>Sphaerotrichia divaricata</i> ) from the West Coast of Aomori, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 255 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md16080255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Hayato, Mikami Shohei, Hokari Saori, Nishino Azusa, Takaha Takeshi, Maoka Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of paprika xanthophyll on chronic inflammation in adipocyte.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carotenoid Science	6. 最初と最後の頁 45 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terasaki Masaru, Iida Tatsuya, Kikuchi Fubuki, Tamura Kanae, Endo Tetsuya, Kuramitsu Yasuhiro, Tanaka Takuji, Maeda Hayato, Miyashita Kazuo, Mutoh Michihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Fucoxanthin potentiates anoikis in colon mucosa and prevents carcinogenesis in AOM/DSS model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 198 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2018.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda Masaki, Maeda Hayato, Fukaya Tetsuya, Goto Motonobu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Z-Isomerization on the Bioavailability and Functionality of Carotenoids: A Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Progress in Carotenoid Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.78309	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 前多隼人, 泉ひかり, 福田寛	4. 巻 2
2. 論文標題 カロテノイドの機能性研究と有用食品素材の探索	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ 2018年 6月号	6. 最初と最後の頁 58~62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 前多隼人, 小館めい, 三上翔平	4. 巻 1(7)
2. 論文標題 カロテノイドの機能性とその吸収に対する食品成分の影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ 2017年 7月号	6. 最初と最後の頁 82~86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaru Terasaki, Hayato Maeda, Kazuo Miyashita, Takuji Tanaka, Shingo Miyamoto, Michihiro Mutoh	4. 巻 61
2. 論文標題 A marine bio-functional lipid, fucoxanthinol, attenuates human colorectal cancer stem-like cell tumorigenicity and sphere formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 25~32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.16-112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原潤, 前多隼人
2. 発表標題 食事性肥満マウスに対するパプリカ色素の慢性炎症抑制作用
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前多隼人
2. 発表標題 食品に含まれる色素成分の健康機能性
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会北海道支部大会および公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前多隼人
2. 発表標題 食品に含まれるカロテノイドの機能性研究
3. 学会等名 第30回夏期油脂・コレステロール研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前多隼人, 三上翔平, 穂苅早織, 西野梓, 鷹羽武史, 眞岡孝
2. 発表標題 パプリカキサントフィルによる脂肪細胞での脂質代謝・糖代謝改善作用
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三上翔平, 穂苅早織, 西野梓, 鷹羽武史, 眞岡孝至, 前多隼人
2. 発表標題 パブリカキサントフィルによる脂肪細胞での慢性炎症状態の改善作用
3. 学会等名 2017年度 日本油化学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前多隼人, 三上翔平, 穂苅早織, 西野梓, 鷹羽武, 眞岡孝至
2. 発表標題 パブリカキサントフィルによる脂肪細胞での慢性炎症状態の改善作用
3. 学会等名 第31回カロテノイド研究談話会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学 研究者総覧 前多隼人 <a href="http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000068_ja.html">http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000068_ja.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考