

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14912

研究課題名(和文) 紅藻・ダルスによる免疫機能の変動と非アルコール性脂肪性肝疾患予防・緩和の検討

研究課題名(英文) Regulation of immune function by dulse (*Palmaria palmata*) and prevention of non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

趙 佳賢 (JOE, GA-HYUN)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：80829052

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)：未利用紅藻・ダルス由来のフィコビリタンパク質画分(PP)とクロロフィルa関連化合物画分(Chls)に着目し、非アルコール肝疾患(NAFLD)の予防と症例緩和を期待する機能性食品素材としての利用可能性を調査した。NAFL(非アルコール性脂肪肝)とNASH(非アルコール肝炎)モデルを用いて動物実験を行ったところ、PPとChlsの経口投与が、肥満におけるアディポネクチンの分泌を改善し、肝臓への脂質蓄積を抑制することでNAFLDの初期段階を予防する可能性が示唆された。以上の成果は、ダルスがNAFLDを予防する機能性食品素材となり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日本の水産資源の持続可能な活用に向けた重要な貢献を提供している。未利用紅藻由来成分が、肥満の抑制を介してNAFLDの進行抑制(予防)に寄与する可能性を示した。これは、紅藻の健康機能に関する新知見であり、学問的な創造性や意義を持つ。そして、本知見の活用は「未利用水産物の付加価値化」による水産業の六次産業化にも寄与し、「廃棄物の低減化」によって環境の維持にも貢献でき、社会的意義が非常に高い。本研究の成果は、水産資源の付加価値創出、環境保全、新たな健康機能性の発見に寄与することから、水産業の持続可能性や健康への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, my objective was to explore the potential use of underutilized red alga dulse (*Palmaria palmata*), as a functional food material aimed at preventing and alleviating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Initially, utilizing two models, NAFL (non-alcoholic fatty liver) and NASH (non-alcoholic steatohepatitis), we examined the effects of dulse-derived obtain phycobiliprotein-derived peptides (PP) fractions and chlorophyll related components (Chls) fractions. Our results revealed that oral administration of PP fractions and Chls fractions led to an enhancement in plasma adiponectin secretion in obesity, suggesting their ability to potentially mitigate the initial stages of NAFLD by suppressing lipid accumulation in the liver. These findings underscore the distinct physiological functions of PP fractions and Chls fractions derived from untapped marine resources like red algae dulse, highlighting their promising role as functional foods in the prevention of NAFLD.

研究分野：水産食品科学

キーワード：紅藻・ダルス 非アルコール肝疾患 NAFLD 非感染疾患 肥満 アディポネクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) の患者が世界的に急増している。NAFLD では、非飲酒者の肝臓に中性脂質の蓄積がおり、重症化すると肝炎を発症する。NAFLD の発症にはインスリン抵抗性や酸化ストレスなど様々な原因があるが、炎症状態を常態化させる炎症性サイトカインが強く関わっている。しかし、明確な治療法がないため予防が最も重要である。

本研究で対象とした紅藻ダルス (*Palmaria palmata*) は、北部大西洋沿岸で「海の野菜」と呼ばれる食用紅藻で、北海道沿岸の資源量は極めて大きい。しかし、日本では産業利用は進んでおらず、開発余地の残る数少ない水産資源である。Lee らの先行研究では、凍結乾燥藻体から抽出したダルスから抽出されたフィコビリタンパク質 (PP) 画分とクロロフィル a 関連化合物 (Chls) 画分が、カラギーナンによる足趾での局所炎症が抑制されたことが明らかになった (Lee et al., Food Res Int., 2017)。また、我々の直近の研究では、凍結乾燥と比べて低コストである熱風乾燥をしたダルスから、複数の酵素処理と pH シフトを組み合わせた有効成分画法を確立し、両画分が炎症を抑制することを *in vitro* で確認した (Joe et al., Mar Drugs., 2023)。特に、NAFLD の進行に免疫系が深く関与していることから、抗炎症作用が認められた PP 画分と Chls 画分が NAFLD の進行に影響を及ぼすことが予想される。そこで本研究では、ダルス由来の両画分が、NAFLD の予防・緩和に及ぼす効果を検討した。

## 2. 研究の目的

申請者の最終目標は、豊富な資源量をもつ未利用紅藻・ダルスをもつ、非感染疾患の一つである NAFLD の予防と症例緩和を期待する機能性食品素材として利用することである。これを実現するため本研究では、NAFLD の動物病態モデルを用いて、その予防と症例緩和に対する作用を検証した。

## 3. 研究の方法

NAFLD の病態は、非アルコール性の NAFL (脂肪肝) と NASH (肝炎) の二段階を経る Two hit theory が提唱され、その進行メカニズムが次の様に提唱されている (Xu H, Wang L. Front Mol Biosci., 2021)。まず過栄養によって脂肪組織に脂質が蓄積する。脂質の過剰な蓄積は代謝障害を引き起こし、肝臓に脂質が蓄積する。これらを「1st hit」として NAFL が発症する。そして炎症性サイトカインや酸化ストレスなどに起因して、肝臓における慢性炎症の増悪と肝組織の線維化が進行する。これらを「2nd hit」として NAFL から NASH に病態が進行する。本研究では、初期段階の NAFL と進行・悪化段階である NASH の両方に対応した病態モデル動物を準備した。すなわち、高脂肪高糖食で脂肪肝を誘導して NAFL モデルとし、続いて、細菌外膜のリポ多糖 (LPS) と D ガラクトサミン (D-GalN) を同時に腹腔投与して肝障害を誘導し、これを NASH モデルとした。

まず、NAFL 誘導のために、C57BL/6J マウス (5 週齢) を 4 群に分け (1 群あたり 7 匹)、飼育実験を開始した。そのうち 1 群は Control 群として飼料を AIN-93G とし、また他の 3 群は高脂肪高糖食 (HFHS 食: 脂肪と糖質がそれぞれ 30% および 40% 含まれる) を飼料として、それぞれ飼育した。そして、

AIN-93G と HFHS 食で飼育する 2 群をそれぞれ陰性および陽性対照群（それぞれ Control および HFHS 群）とし、さらに、HFHS 食で飼育する 2 群に、HFHS+PP 群（PP 画分（100mg/kg BW）と Chls 画分（10mg/kg BW）を毎日経口投与した）（両試料投与群をそれぞれ HFHS+PP 群および HFHS+Chls 群と称する）。

続いて、NASH 誘導のために、C57BL/6J マウス（5 週齢）を 5 群に分け（1 群あたり 6-7 匹）、飼育実験を開始した。そのうち 2 群は CT 群および CT+LPS 群として飼料を AIN-93G とし、また他の 3 群は高脂肪高シヨ糖食（HFHS 食：脂肪と糖質がそれぞれ 30% および 40% 含まれる）を飼料として、それぞれ飼育した。そして、HFHS 食で飼育する群を陽性対照群（HFHS 群）とし、さらに、HFHS 食で飼育する 2 群に、PP 画分と Chls 画分をそれぞれ投与した。また、CT 群以外の 4 群では 10 週間の摂取実験後、生理食塩水に溶解した LPS と D-GalN を、それぞれ各マウスに 400  $\mu$ L ずつ腹腔注射した（投与量はそれぞれ 4 mg/kg BW と 400 mg/kg BW）。これによって、肝臓および全身での炎症を誘導し、投与 6 時間後に解剖した。

#### 4. 研究成果

まず、マウス由来マクロファージ Raw267.4 細胞を用いた実験では、フィコビリタンパク質（PP）画分とクロロフィル a 関連化合物（Chls）画分が LPS による炎症性サイトカイン産生（TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ ）を強く抑制することが明らかになった（Joe et al., Mar Drugs., 2023）。また、PP 画分と Chls 画分がマクロファージの E.coli に対する貪食能を抑制することから、両画分がマクロファージの免疫応答を調節して、炎症を抑制することも、同時に示唆された。一方、獲得免疫系に及ぼす影響を明らかにするため、T 細胞依存性抗体産生を調べた結果、両画分の投与による有意な変化は見られなかった。以上の結果は、ダルス由来の PP 画分と Chls 画分が自然免疫細胞、特にマクロファージの免疫応答を介して炎症を抑制し、NCDs 予防に繋がる可能性が示唆された。

##### （1）ダルスの有効成分が非アルコール性脂肪肝（NAFL）に及ぼす影響

PP 画分と Chls 画分が NAFL に及ぼす影響を調査した。その結果、HFHS 群では、脂肪組織重量（表 1）、血中の総コレステロール（TC）と肝臓の中性脂質（TG）で増加傾向が見られた。一方、体重、肝臓重量、AST・ALT 値では、Control 群と明瞭な差が見られなかったことから、HFHS 食を 9 週間連続摂取したマウスは、NAFL モデルの初期段階にあると判断した。そこで、これを前提にして次の実験結果を解析した。

PP 画分を投与した HFHS+PP 群では、脂肪組織重量、肝臓 TG、および AST・ALT が、HFHS 群と比較して減少傾向を示し、血中アディポネクチンは増加傾向を示した（図 1）。NAFLD では、内臓脂肪の蓄積によりアディポネクチン分泌が低減し、肝臓に脂質が蓄積する。それゆえ上記の結果は、PP 画分が脂肪組織における脂質蓄積を抑制してアディポネクチンの分泌低減を抑制することで、肝臓への脂質蓄積が抑制されたことを示唆している。そこで、肝臓において遺伝子分析を行なったところ、Peroxisome proliferator-activated receptor（*Ppar*）の発現に増加傾向が見られた（図 1）。肝臓における *Ppar* の発現は、炎症や線維化を抑制することが報告されている（Cariou B et al., Trends Endocrinol Metab., 2012）。これらの結果は、PP 画分の投与が、肥満によるアディポネクチン分泌を改善し、脂肪組織の肥大

化及び慢性炎症を抑制するとともに、肝臓での *Ppar* の発現量を増加させ、肝臓における炎症・線維化を抑制する可能性を示唆している。

**ChIs 画分を投与した HFHS+ChIs 群では**、肝臓 TG が HFHS 群よりも減少傾向を示し、このとき血中アディポネクチンが有意な増加を示した（図 1）。この結果は PP 画分と同様に、ChIs 画分がアディポネクチンの分泌低減を抑制し、肝臓への脂質蓄積を抑制することを示唆している。また肝臓の遺伝子解析によると、ChIs 経口投与群では、*Ppar* の有意な増加（図 1）し、アディポネクチン遺伝子である *Adipoq* の増加傾向が見られた。このことから、ChIs 画分は、*Adipoq* の転写を活性化し、アディポネクチンの分泌を促進させることが考えられる。また、肝臓で *Ppar* の発現量を誘導し、炎症・線維化を抑制することで、NAFLD の予防に寄与する可能性を示唆している。また、PPAR は、脂肪組織で最も高い発現量を持ち、アディポカイン分泌を促進することから（Skat-Rørdam J, et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol., 2019.），今後、脂肪組織における PPAR 遺伝子発現を検討する必要がある。

表 1 . PP 画分および ChIs 画分の摂取がマウス体重と各組織重量に及ぼす影響

	Control	HFHS	HFHS+PP	HFHS+ChIs
Growth parameters (g)				
Initial BW	19.07 ± 0.21	19.07 ± 0.25	19.07 ± 0.26	19.06 ± 0.25
Final BW	26.98 ± 0.89	30.87 ± 1.68	29.52 ± 0.65	31.28 ± 1.93
Total calorie (kcal)				
Total calorie	617.1 ± 17.4	682.9 ± 31.5	657.1 ± 4.1	691.6 ± 25.3
Tissue weight (mg/g body weight)				
Liver	39.67 ± 1.20	38.11 ± 0.99	38.585 ± 0.79	38.14 ± 1.21
Kidney	10.52 ± 0.31	10.53 ± 0.36	10.68 ± 0.35	9.91 ± 0.48
Epididymal fat	29.64 ± 2.90 <sup>b</sup>	50.64 ± 4.64 <sup>a</sup>	42.02 ± 4.30 <sup>ab</sup>	50.61 ± 4.35 <sup>a</sup>
Mesenteric fat	11.56 ± 1.02 <sup>a</sup>	13.27 ± 1.37 <sup>a</sup>	10.99 ± 1.16 <sup>a</sup>	13.07 ± 1.62 <sup>a</sup>
Retroperitoneal fat	9.51 ± 1.14 <sup>b</sup>	15.33 ± 1.01 <sup>a</sup>	16.23 ± 1.83 <sup>a</sup>	18.38 ± 1.00 <sup>a</sup>
Total fat	50.70 ± 4.96 <sup>b</sup>	79.23 ± 6.71 <sup>a</sup>	69.23 ± 6.86 <sup>ab</sup>	82.07 ± 6.76 <sup>a</sup>

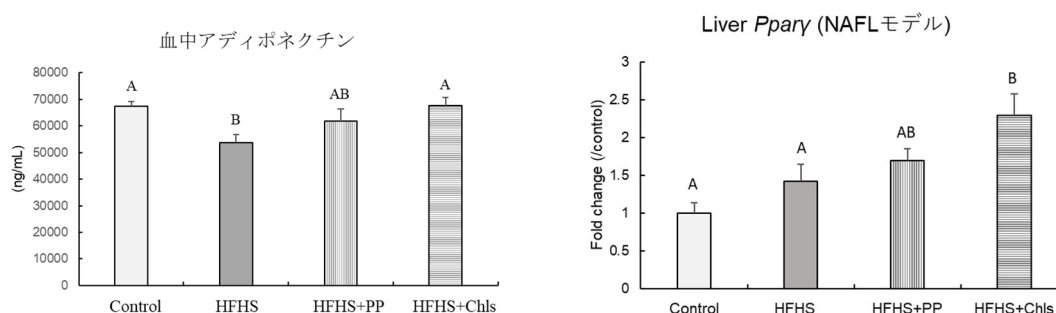


図 1. PP および ChIs 画分の経口投与が血中アディポサイトカインと、肝臓の *Ppar* 遺伝子発現に及ぼす影響

## (2) ガルスの有効成分が非アルコール性肝炎 (NASH) に及ぼす影響

続いて、PP 画分と ChIs 画分が NASH に及ぼす影響を調査した。NFLD モデルと同様に HFHS 群における体重、脂肪組織重量および肝臓脂質が CT 群に比べて増加した。さらに、LPS と D-GalN の投与群では、

血中の炎症性サイトカイン類 (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) と肝臓障害マーカー (AST および ALT) が有意に増加した。このような結果は, HFHS 食によって初期段階の NAFL を誘導した後, LPS/D-GaIN を投与することで肝障害を増悪させて NASH を誘導できたと判断した。

**PP 画分を投与した HFHS+PP 群では,** TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  及び AST・ALT 値が, HFHS 群と比べて, 有意差がないものの減少傾向を示した。この結果は, PP 画分が, 2nd hit 因子の1つである炎症性サイトカインの産生をわずかに抑制して, 肝障害を改善する可能性を示唆している。また, HFHS+PP 群における脂肪組織重量, 肝臓脂質 (TG, NEFA) も HFHS 群と比べて有意差がないものの減少傾向を示した。炎症性サイトカインは, 脂肪細胞への脂質蓄積により分泌が増加するため, NAFLD モデルで示した PP 画分による脂質蓄積抑制効果が, 肝障害の改善に寄与している可能性を示唆している。また, 肝臓での炎症関連遺伝子を調べた結果, HFHS 群と比較して, HFHS+PP 群での有意な差は見られなかった。

**次に ChIs 画分を投与した HFHS+ChIs 群では,** 肝臓脂質と ALT が, HFHS 群と比較して, 有意差がないものの減少傾向を示した。そこで肝臓における炎症関連遺伝子の発現を調べたところ, HFHS 群と比較して, HFHS+PP 群での有意な差は見られなかった。今後, 脂肪組織における関連遺伝子の分析とともに, 肝臓におけるマクロファージ分布の変動を検討することでメカニズム解明を続ける。

本研究では, 次の事実を明らかにすることができた。PP 画分と ChIs 画分は, 肥満におけるアディポネクチンの分泌を改善し, 肝臓への脂質蓄積を抑制することで NAFL を初期段階から予防することが示唆された。一方, NASH への悪化における改善効果わずかであった。以上の成果は, 未利用水産資源である紅藻・ダルスから抽出した PP 画分と ChIs 画分が異なる生理機能を有し, NAFLD を予防する機能性食品となり得ることを示唆している。

#### 参考文献

1. Lee D, Nishizawa M, Shimizu Y, Saeki H., Anti-inflammatory effects of dulse (*Palmaria palmata*) resulting from the simultaneous water-extraction of phycobiliproteins and chlorophyll a, *Food Res Int.*, 2017, Oct;100(Pt 1):514-521.
2. Xu H, Wang L., The Role of Notch Signaling Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, *Front Mol Biosci.*, 2021, Nov 24;8:792667.
3. Joe G, Masuoka M, Reisen R, Tanaka S, Saeki H., Development of a Sequential Fractionation-and-Recovery Method for Multiple Anti-Inflammatory Components Contained in the Dried Red Alga Dulse (*Palmaria palmata*), *Marine Drugs*, 2023, 21: 276.
4. Cariou B, Charbonnel B, Staels B., Thiazolidinediones and PPAR agonists: time for a reassessment, *Trends Endocrinol Metab.*, 2012, May;23(5):205-15.
5. Skat-Rørdam J, Højland Ipsen D, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P., A role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in non-alcoholic fatty liver disease, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 2019 May;124(5):528-537.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 趙佳賢
2. 発表標題 健康機能から見た未利用・廃棄水産資源の高度利用
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 東北支部(第55回大会)・北海道支部(第51回大会) 合同支部大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤離空、趙佳賢、佐伯宏樹
2. 発表標題 ダルス由来クロロフィルa関連化合物の経口投与がマウスT細胞依存性抗体産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第77回 日本食糧・栄養学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富村 千遥, 佐藤 璃空, 青木 貴哉, 佐伯 宏樹, ○趙 佳賢
2. 発表標題 紅藻ダルス (Palmaria palmata)由来の光合成関連物質が 食事誘導性肥満マウスの血中アディポカイン分泌に及ぼす影響
3. 学会等名 第78回 日本食糧・栄養学会（5月24日-26日）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------