

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380120

研究課題名(和文) 海洋性カロテノイドの慢性炎症疾患予防作用の基盤となる組織・細胞間調節機能の解明

研究課題名(英文) Preventive effects of marine carotenoids on chronic inflammation-related diseases through regulation of cell and tissue communication

研究代表者

細川 雅史 (Hosokawa, Masashi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：10241374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：フコキサンチンは、ケモカインによる脂肪細胞と免疫細胞の相互作用を制御し、肥満脂肪組織での慢性炎症を抑制した。更に、脂肪組織由来の炎症性因子の産生抑制とともに、骨格筋組織における糖代謝を改善した。一方、ヘマトコッカス藻由来のアスタキサンチンが、潰瘍性大腸炎や大腸発癌のモデル系において予防効果を発揮した。その予防機構として、組織細胞に対する直接的な抗炎症作用に加え、マクロファージによる大腸細胞の炎症誘導に対する抑制効果を見出した。以上のように、海洋性カロテノイドは細胞・組織への直接的な作用に加え、それらの相互作用を制御し、効果的に慢性炎症や炎症性疾患の予防に貢献するものと推察する。

研究成果の概要(英文)：Fucoxanthin (Fx) suppressed chronic inflammation in white adipose tissue by the inhibition of macrophage and T cell infiltration. Further, Fx down-regulated mRNA expression of chemokines and adipokines, which recruit immune cells and induce insulin resistance. In diabetic/obese mice fed Fx, GLUT4 activation was observed in skeletal muscle through the improvement of hyperglycemia. On the other hand, Fx and astaxanthin (Asx) extracted from *H. pluvialis* prevent DSS-induced colitis and colon carcinogenesis in mice. In colon of the mice fed Asx, mRNA expression levels of inflammatory cytokines tended to decrease compared to control mice. In addition, Asx down-regulated mRNA expression of inflammatory cytokines in macrophage-like cells and colon cells stimulated by the culture medium of activated macrophages. These results suggest that marine carotenoids prevent chronic inflammation and its-related diseases by the regulation of cell and tissue communication via chemokines and cytokines.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：フコキサンチン アスタキサンチン 慢性炎症 肥満 脂肪組織 潰瘍性大腸炎 ケモカイン 組織・細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームや悪性腫瘍の根底に慢性的な炎症状態が存在することが明らかにされ、抗炎症物質を用いた予防法の開発が期待されている。特に、慢性炎症状態の脂肪組織や大腸組織では、脂肪細胞や大腸上皮細胞などの実質細胞とマクロファージやT細胞などの間質細胞が相互に作用しながら悪循環を形成し臓器機能障害を引き起こす。更に、過剰産生された炎症性因子は生体内を循環して様々な疾病を誘発する。よって、個々の細胞への作用に加え、炎症に関わる細胞および組織間の相互作用を制御できる抗炎症物質を見出し、その分子機構を解明することは、肥満や潰瘍性大腸炎のみならず様々な炎症性疾患に対する効果的な予防法の開発につながる。

研究代表者の細川は、ワカメなどの褐藻に含まれるカロテノイドのフコキサンチン(Fx)が、抗肥満や抗糖尿病効果を有することを明らかにした。その際、炎症誘導に関わるマクロファージの脂肪組織への浸潤が抑制されていた。これらの知見は、Fxが脂肪細胞とマクロファージの相互作用を制御していることを示していると考えた。

一方、研究分担者の安井は、サケなどに含まれるアスタキサンチン(Asx)が潰瘍性大腸炎誘発マウスにおいてTNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインの産生抑制を介して予防効果を示すことに加え、大腸発癌に対しても予防効果を発揮することを見出した。これらの結果は、大腸組織と免疫細胞間の相互作用が大腸発癌に関わっており、海洋性カロテノイドによる予防機能を期待させる結果である。以上の背景から、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、近年、増加の一途をたどる肥満や潰瘍性大腸炎、並びにそれらによって誘発される糖尿病や大腸癌に対する海洋性カロテノイドの予防機能とその分子機構の解明を目的とする。そのため、疾病発症の根底にある慢性炎症に対する海洋性カロテノイドの抑制機能に着目し、組織を構成する脂肪細胞や大腸細胞、マクロファージ、T細胞への直接的な作用のみならず、それら細胞間の相互作用や異なる組織間の炎症性因子を介した相互作用に対する制御機構の解明するため、以下の項目について検討した。

(1) 海洋性カロテノイドの炎症抑制作用とその分子機構の解明

脂肪細胞や腸管細胞、免疫細胞に対する炎症因子の産生抑制作用の評価
脂肪細胞とマクロファージ、T細胞の相互作用におよぼす制御機構の解析
大腸細胞とマクロファージの相互作用におよぼす制御機構の解析
炎症因子の産生抑制に関わる細胞内情報伝達経路の解析

(2) 海洋性カロテノイドの組織間相互調節作用を基盤とした生活習慣病予防機構の解明

脂肪-骨格筋組織間の相互調節作用による血糖値改善機構とその制御に関わるマイオカインの同定
脂肪-大腸組織の相互調節作用による大腸癌抑制機能の解析

3. 研究の方法

(1) 海洋性カロテノイドの炎症抑制作用とその分子機構の解明

脂肪細胞や腸管細胞、免疫細胞に対する炎症因子の産生抑制作用の評価

脂肪細胞、腸管細胞、マクロファージとして、3T3-L1、Caco-2、RAW264.7細胞をそれぞれ用い、それらの培養液中に各種カロテノイドを添加して一定時間培養を行った。その後、サイトカインやケモカインおよびそれらの受容体のmRNA発現量を定量PCR法にて測定した。また、タンパク質産生量はELISA法により測定した。

脂肪細胞とマクロファージ、T細胞の相互作用におよぼす制御機構の解析

肥満/糖尿病KK- A^y マウスにFxを経口投与し飼育後、白色脂肪組織を採取した。その後、total RNAを抽出し、定量PCR法により各種因子のmRNA発現量を解析した。また、ELISA法によりケモカインの産生量を測定した。更に、脂肪組織をコラゲナーゼで処理することにより、脂肪細胞画分と免疫細胞等を含むstromal vascular fraction(SVF)に分離し、それぞれにおけるケモカインおよび受容体のmRNA発現量を測定した。また、3T3-L1脂肪細胞の培養上清を用いてRAW264.7をトランズウェル上で培養し、下層に通過した細胞数を測定することにより遊走能の測定を行った。

大腸細胞とマクロファージの相互作用におよぼす制御機構の解析

Asxを経口投与したICRマウスに、DSSを飲水投与して潰瘍性大腸炎を誘発した。その影響を病理学的観察および炎症因子のmRNA発現量解析から評価した。また、Caco-2細胞とRAW264.7細胞の共培養を行い、LPSを用いたRAW264.7細胞の刺激によるCaco-2細胞での炎症因子のmRNA発現への影響を調べ、細胞間相互作用への影響を解析した。

炎症因子の産生抑制に関わる細胞内情報伝達経路の解析

(1) と同様に細胞培養を行い、炎症因子のmRNA発現制御を担う転写因子の発現やリン酸化についてウエスタンブロッティングにより調べた。

(2) 海洋性カロテノイドの組織間相互調節作用を基盤とした生活習慣病予防機構の解明

脂肪-骨格筋組織間の相互調節作用による血糖値改善機構とその制御に関わるマイオカインの同定

(1) の飼育後に骨格筋組織を採取し、細胞膜画分と細胞質画分に分離後、それぞれに

おけるグルコーストランスポーター4 (GLUT4) の発現量をウエスタンブロッティングにより測定することで、細胞膜移行を評価した。また、骨格筋組織から抽出した total RNA を用いてケモカインの mRNA 発現量を解析した。

脂肪-大腸組織の相互調節作用による大腸癌抑制機能の解析

ICR マウスを AOM/DSS 処理することにより炎症を基盤とする大腸発癌を誘発した。飼育3週目から Asx を混餌投与して、大腸癌の発生に及ぼす影響を病理学的な観察、炎症因子の mRNA 発現解析および免疫染色から総合的に評価した。

4. 研究成果

(1) 海洋性カロテノイドの炎症抑制作用とその分子機構の解明

脂肪細胞や腸管細胞、免疫細胞に対する炎症因子の産生抑制作用の評価

これまでに Fx の生体内代謝物であるフコキサンチノール (FxOH) が、LPS 刺激したマクロファージに対して TNF- α の産生を抑制することを報告しているが、その受容体である TLR に加え、MCP-1 や RANTES の受容体である CCR2 や CCR5 の mRNA 発現量を低下させることが分かった。これらの知見は、炎症性因子の産生抑制に加え、それらの細胞応答性を制御することによって効果的に炎症抑制機能を発揮することを示唆する結果といえる。

一方、Asx やホタテガイ卵巣から分離したペクテノロンは、マクロファージに対する炎症因子の過剰産生を抑制する作用に加え、TNF- α で炎症誘導した大腸細胞からの IL-8 などの炎症性因子の産生も抑制した。これらの結果は、マクロファージと大腸細胞の相互作用による炎症反応の進行に対して抑制作用を示すことを示唆している。以上の結果から、抗炎症作用に関わる細胞・組織間の相互作用に対する海洋性カロテノイドの制御機構について *in vivo* による解析を進めた。

脂肪細胞とマクロファージ、T 細胞の相互作用におよぼす制御機能の解析

Fx を経口投与した肥満/糖尿病 KK-*A*^y マウスでは、肥満の進行に伴い脂肪組織で認められる活性化マクロファージや T 細胞の増加が抑制された。特に、F4/80 や CD3 に加え、M1 および M2 マクロファージのマーカーである CD11c やアルギナーゼ 1、並びに T 細胞バランスを示す CD4 や CD8 の mRNA 発現量がコントロール群と比較して低下していたことから、脂肪組織への免疫細胞の浸潤自体が抑制されていると推察した。

そこで、マクロファージや T 細胞に対して遊走活性を示すケモカインの SDF-1 や RANTES、IP-10 の脂肪組織における mRNA 発現量およびタンパク質産生量を測定した結果、Fx 投与群における発現低下が見られた (図 1)。特に、SDF-1 は脂肪組織中の免疫細胞を含む SVF 画分に加え、脂肪細胞画分によっても産生され

ていることが確認され、Fx の投与によりその産生が抑制されることを見出した。一方、SDF-1 の受容体である CXCR4 の mRNA は SVF 画分が高発現しており、Fx 投与により低下した。また、3T3-L1 脂肪細胞の培養上清により RAW264.7 マクロファージ様細胞の遊走能が活性化したが、Fx 代謝物の一つであるアマロウシアキサンチン A 処理による低下がみられた。その際、培養上清中の IP-10 濃度が Fx 代謝物処理で低濃度であったことから、遊走を導くケモカインとしての役割が推察された。

これらの結果は、脂肪細胞がマクロファージや CD8+T 細胞の浸潤を誘導するケモカインとして、従来の MCP-1 に加え SDF-1 や IP-10 を産生するとともに、Fx がケモカインを介した脂肪細胞と免疫細胞の相互作用を制御するものと考えられる。

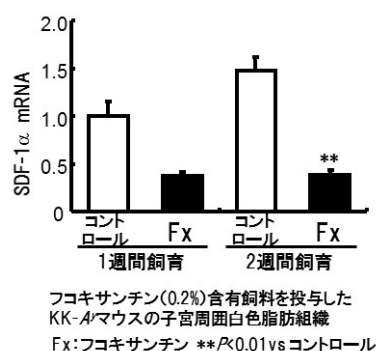


図 1 Fx による白色脂肪組織での SDF-1 の発現抑制

大腸細胞とマクロファージの相互作用におよぼす制御機構の解析

これまでの研究において、化学合成した遊離型 Asx や褐藻由来の Fx に潰瘍性大腸炎に対する予防効果を報告してきた。本研究では、主に脂肪酸エステルとして存在するヘマトコッカス藻由来の Asx やペクテノロンを含むホタテガイ卵巣脂質にも、DSS 誘導性マウス潰瘍性大腸炎に対する予防効果を確認した。特に、ヘマトコッカス藻由来の Asx は既にサプリメント等として広く産業的に利用されていることから、新たな機能性の解明となった。

ヘマトコッカス藻 Asx を投与したマウスでは、大腸組織において TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの mRNA 発現に抑制傾向が見られ、大腸細胞と免疫細胞の相互作用の制御による予防機構が推察される。更に、大腸由来の Caco-2 細胞とマクロファージ様 RAW264.7 細胞を、トランズウェルを用いて非接触条件下で共培養し、LPS にて RAW264.7 細胞を刺激することにより、Caco-2 細胞における IL-8 や COX-2 などの炎症性因子の mRNA 発現が増加した。その際、Asx 処理によってこれらの mRNA 発現が抑制されることを明らかにした。よって、Asx は、マクロファージに

に対する直接的な炎症性因子の産生抑制作用に加え、マクロファージによる大腸細胞刺激による炎症性因子の産生に対しても抑制効果を発揮し、効果的に潰瘍性大腸炎を予防すると推察される。

炎症因子の産生抑制に関わる細胞内情報伝達経路の解析

Asx は、RAW264.7 細胞において LPS によって活性化される p38 のリン酸化を抑制する傾向を示した。一方で、ERK のリン酸化に対する影響は見られなかった。また、Caco-2 細胞に対しては p38 の発現を抑制する傾向を示し、細胞によって情報伝達経路が異なる可能性が示された。

(2) 海洋性カロテノイドの組織間相互調節作用を基盤とした生活習慣病予防機構の解明

脂肪-骨格筋組織間の相互調節作用による血糖値改善機構とその制御に関わるマイオカインの同定

Fx は、糖尿病/肥満 KK-*A*^y マウスに対して血糖値の改善効果を示す。また、本研究において、脂肪組織における慢性炎症を効果的に抑制することを示すとともに、インスリン抵抗性を誘導するアディポカインの mRNA 発現増加を抑制することを報告してきた。それら因子の標的組織である骨格筋組織に着目し、インスリン抵抗性によって活性化の低下が見られる GLUT4 の細胞膜移行を解析した。その結果、Fx 投与群では無添加のコントロール群と比較して、ヒラメ筋では GLUT4 の細胞膜移行が活性化し、長趾伸筋では GLUT4 の発現量が増加することが明らかとなった(図2)。更に、Fx は KK-*A*^y マウスの骨格筋組織においてマイオカインである IL-15 や irisin の mRNA 発現量を増加させた。これらの結果は、Fx が脂肪組織への作用を介して、肥満の進行に伴う骨格筋組織でのインスリン抵抗性発現に対して抑制または改善効果を発揮することを示唆する結果である。更に、マイオカインの産生による骨格筋組織と他の組織との糖代謝に関わる相互作用の可能性を示す興味深い結果である。

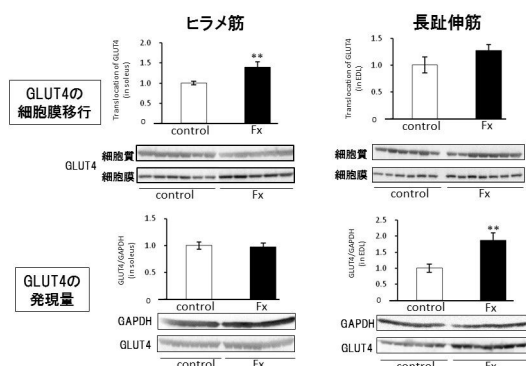


図2 Fx による骨格筋組織での GLUT4 の活性化

一方、Fx を投与した KK-*A*^y マウスではイン

スリンおよびエネルギー代謝の亢進により炎症制御に関わる leptin の血清濃度の低下に加え、それらの生体内感受性亢進の指標である肝臓 SCD1 の発現低下が見られた。これらの結果は、Fx が脂肪組織と肝臓との相互作用にも影響を及ぼし、慢性炎症のみならず生体内のエネルギー代謝にも関わることを示唆する結果であり、糖尿病を含むメタボリックシンドローム予防作用の分子機構として大変興味深い。今後の詳細な検討が期待される。

脂肪-大腸組織の相互調節作用による大腸癌抑制機能の解析

Fx の潰瘍性大腸炎に対する予防効果を既に報告したことから、それがリスクファクターとなる大腸発癌への影響を検討した。

ICR マウスに AOM を腹腔内単回投与し、1 週間後、1.5% DSS を 1 週間飲水投与することで大腸癌を誘発した。Fx は、DSS 投与終了 1 週後の飼育 3 週目から 18 週目まで混餌投与した。その結果、Fx 100 ppm 群、200 ppm 群において大腸腺癌の発生個数に有意な抑制が認められた。更に、腫瘍組織部における細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導、TNF- α 、IL-1 β の発現抑制に加え、その転写制御因子である NF- κ B の活性化抑制が観察された。以上の結果は、炎症を背景とした大腸発癌に対して Fx が予防効果を持つことを示している。既に、Asx の炎症を背景とした大腸発癌に対する予防効果を明らかにしており、ワカメなどの褐藻に含まれる Fx も同様の効果を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. K. Mikami, M. Hosokawa, Biosynthetic pathway and health beneficial effects of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, **14**, 2013, 13763-13781.
2. F. Beppu, M. Hosokawa, M.J. Yim, T. Shinoda, K. Miyashita. Down-regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by fucoxanthin via leptin signaling in diabetic/obese KK-*A*^y mice. *Lipids*, 査読有, **48**, 2013, 449-455.
3. S. Nishikawa, M. Hosokawa, K. Miyashita. Fucoxanthin improves hyperglycemia through promoting translocation and induction of glucose transporter 4 in soleus and EDL muscles in diabetic/obese KK-*A*^y mice. *Phytomedicine*, 査読有, **19**, 2012, 389-394.

4. Y. Yasui, M. Hosokawa, N. Mikami, K. Miyashita, T. Tanaka. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chem. Biol. Interact.*, 査読有, **193**, 2011, 79-87.
5. N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, k. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi. Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethyl- hydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation- associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of gpt delta rats. *Carcinogenesis*. 査読有, **32**, 2011, 1512-1517.

〔学会発表〕(計 37 件)

1. M. Hosokawa, Marine chemical “Fucoxanthin”; high potential for the prevention of obesity and type 2 diabetes-. The 80th Annual Meeting of KoSFoST, 2013/8/29, Cheonan Arts Center/Huracle Resort, Cheonan, Korea.
2. 細川雅史、マリンケミカル“フコキサンチン”の機能性炎、第111回 食用化工油脂技術研究会、2013/6/14、東京、日本油脂工業会館。
3. M. Hosokawa, Y. Yasui, N. Mikami, K. Miyashita, T. Tanaka, Preventive effects of marine carotenoids on inflammatory bowel disease and colon carcinogenesis. World Congress on Oleo Science (WCOS2012) & 29th ISF Congress, 2012/10/02, Arkas Sasebo, Nagasaki, Japan.
4. 細川雅史、海洋性カロテノイドの抗炎症作用を基盤とした健康機能、第5回 オレオサイエンス部会セミナー(日本油化学会)、2012/6/19、東京、東京海洋大学。
5. 安井由美子、田中卓二、炎症関連大腸発がんモデルおよび化学予防研究への活用に対する海洋性カロテノイドに抑制効果、第20回日本癌病態治療研究会、2011/6/18、東京、東京大学。

〔図書〕(計 7 件)

1. M. Hosokawa, Y. Yasui, CRC press, Chapter 15, Chemopreventive effects of astaxanthin on inflammatory bowel disease and inflammation-related colon carcinogenesis. in “Carotenoids and vitamin A in translational medicine”. 2013, p293-308.

2. K. Miyashita, S. Nishikawa, M. Hosokawa, Academic Press, Chapter 19, Therapeutic effect of fucoxanthin on metabolic syndrome and type 2 diabetes. in “Nutritional and therapeutic interventions of diabetes and metabolic syndrome”. 2012, p367-379.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
細川 雅史 (Hosokawa Masashi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：10241374

(2)研究分担者
安井 由美子 (Yasui Yumiko)
酪農学園大学・獣医学部・准教授
研究者番号：90434472

(3)連携研究者
無し