

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380117

研究課題名 (和文) 海洋性カロテノイドの抗炎症作用をターゲットとした生活習慣病予防機能の解明

研究課題名 (英文) Preventive effects of marine carotenoids on life-style-related diseases based on anti-inflammatory effects as molecular targets

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

研究成果の概要 (和文)：

アスタキサンチンが、潰瘍性大腸炎や大腸発癌に対して予防効果を示すことを見出した。その作用機構として、アスタキサンチンが大腸組織においてNF- κ Bの活性化抑制を介して炎症性サイトカインの遺伝子発現を制御することが推察された。一方、褐藻に含まれるフコキサンチンは、内臓脂肪の増加抑制と血糖値改善効果を示す。フコキサンチンは脂肪組織における炎症性アディポサイトカインの遺伝子発現を抑制するとともに、炎症に関わるマクロファージの浸潤を抑制し脂肪細胞とマクロファージの相互作用を調節することを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Astaxanthin exhibited inhibitory effects on dextran sodium sulfate-induced colitis and inflammatory-related colon carcinogenesis in mice. In colon of the mice fed astaxanthin, mRNA expression levels of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β were suppressed through inhibition of NF- κ B activation. After feeding for 20 weeks, colonic mucosal ulcers, dysplastic crypts and colonic adenocarcinoma were inhibited by 200 ppm astaxanthin-containing diet. In addition, astaxanthin, pectenolone, alloxanthin and diatoxanthin isolated from marine organisms attenuated excessive mRNA expression of inflammatory cytokines and COX-2 and iNOS in macrophages activated by LPS. On the other hand, dietary 0.2% fucoxanthin markedly suppressed mRNA expression of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 to induce insulin resistance and inhibited macrophage infiltration in white adipose tissue through suppression of MCP-1 mRNA expression after 4 weeks feeding. Further, fucoxanthinol, which is one of fucoxanthin metabolites, also regulated cross talk of adipocytes and macrophages via palmitic acid and TNF- α . These results suggest that anti-inflammatory effects are molecular mechanism for anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：食品化学、分子栄養学

1. 研究開始当初の背景

ライフスタイルの欧米化に伴い動脈硬化症等の循環器系疾患に加え、癌を含めた生活習慣病の罹患率が急増し社会的に大きな問題となっている。最近の研究により、これらの疾病と炎症との関わりが明らかになってきており、抗炎症性物質を利用した予防法の開発が期待されている。特に、多くの生活習慣病のリスクファクターとなる肥満では、肥大化した脂肪細胞と浸潤したマクロファージから炎症性因子が過剰産生され、慢性的炎症状態に陥っていると考えられている。また、肥満は大腸癌のリスクとしても知られており、プロスタグランジン E_2 (PGE₂) や一酸化窒素 (NO) に加え脂肪細胞やマクロファージが産生する炎症性サイトカインとの関係も指摘されている。よって、脂肪細胞やマクロファージ、大腸細胞により産生される炎症性因子の産生制御機能をターゲットとした抗炎症物質を見出すことができれば、メタボリックシンドロームや癌を含めた生活習慣病の予防への利用が期待できる。

研究代表者の細川は、抗肥満作用を示す水産成分として、ワカメなどの褐藻中に含まれるカロテノイドのフコキサンチンを同定した。また、ホヤ中に含まれるアロキサンチンやディアトキサンチンが、マクロファージによって過剰産生される炎症性サイトカインやシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)、一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA 発現を抑制することを明らかにした。一方、研究分担者の安井は、大腸での炎症が大腸発癌を顕著に亢進することを明らかにし、そのモデル実験系を確立した。本研究では、これまでの知見より、ある種の海洋性カロテノイドが抗炎症作用を介して肥満予防効果を示すことを推測した。更に、肥満や炎症性腸疾患とのかかわりが報告されている大腸発癌に対しても予防効果が期待できる天然物であると考えた。これらの背景から、海洋性カロテノイドの抗炎症作用をターゲットとした生活習慣病予防機能の解明に関する研究に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、1. 海洋性カロテノイドの抗炎症作用とそれに関わる分子機構の解明、2. 海洋性カロテノイドによる炎症性の生活習慣病に対する予防効果の解明を目的に、以下の項目について検討した。

(1) 海洋性カロテノイドの抗炎症作用とそれに関わる分子機構の解明

① 脂肪細胞の炎症性アディポサイトカ

イン産生に対する抑制効果の検討

- ② マクロファージによる炎症性サイトカインの産生および炎症関連酵素の発現に対する抑制効果の検討
 - ③ 大腸細胞で産生される炎症性サイトカインおよび炎症関連酵素の発現に対する抑制効果の検討
 - ④ 炎症性因子の発現制御に関わる転写因子の活性化や情報伝達経路の解明
- (2) 海洋性カロテノイドによる炎症性疾患の予防効果の解明
- ① 炎症に起因する糖尿病とそれに関わるインスリン抵抗性に対する予防効果の解明
 - ② 潰瘍性大腸炎により誘発される大腸発癌に対する予防効果の解明
 - ③ 生体内の抗炎症作用に関わる組織・細胞間の相互作用の解析

3. 研究の方法

(1) 海洋性カロテノイドの抗炎症作用とそれに関わる分子機構の解明

① 脂肪細胞のアディポサイトカイン産生制御機能の検討

脂肪細胞の培養液中に各種カロテノイドを添加し一定時間培養を行った。その後、アディポサイトカイン mRNA 発現量を調べた。

② マクロファージの炎症性サイトカインおよび炎症関連酵素の産生に対する抑制効果の検討

RAW264.7 マクロファージ様細胞に TNF- α 及び LPS を用いて刺激を与え、炎症を惹起した。その際、各種カロテノイドを添加し炎症性サイトカインや炎症関連酵素の mRNA 発現量、およびタンパク質産生量を測定し、抗炎症作用について調べた。

③ 大腸細胞で産生される炎症性サイトカインおよび炎症関連酵素に対する抑制効果の検討

HT-29 大腸癌細胞を用いて、TNF α で炎症を誘発し、それに対する各種カロテノイドの抑制効果を検討した。

④ 海洋性カロテノイドの抗炎症作用に関わる分子機構の解明

抗炎症効果の認められたカロテノイドについて、その作用機構を明らかにするため、種々の炎症性因子の発現に関わる NF- κ B や AP-1 等の転写因子の発現量やリン酸化量および DNA への結合能を評価することによる活性化への影響を解析した。

(2) 海洋性カロテノイドによる炎症性の生活習慣病に対する予防効果

① 海洋性カロテノイドの糖尿病予防効果

肥満/糖尿病マウス (KK-*A*^Jマウス) にカロテノイドを経口投与し、その糖尿病予防・改善効果を検討した。特に、炎症によって引き起こされるインシュリン抵抗性を指標として抗糖尿病効果を評価するとともに、生体内での炎症に関わるサイトカインの産生量との関連性を解析した。

② 海洋性カロテノイドの潰瘍性大腸炎および大腸発癌抑制効果

カロテノイドを経口投与し、大腸発癌やその早期段階で見られる潰瘍性大腸炎に対する予防効果を調べた。特に、生体内における炎症性サイトカインや COX-2、iNOS 発現への影響と予防効果との関連性を調べ、抗炎症作用の有効性を評価した。

③ 海洋性カロテノイドの抗炎症作用に関わる細胞・組織間相互作用の解析

海洋性カロテノイドの糖尿病や大腸発癌に対する予防効果に関わる作用機構を明らかにする上で、異なる細胞間および組織間の相互作用を調べることが重要である。そこで、脂肪細胞やマクロファージ、大腸上皮組織で産生される炎症因子による他細胞への影響を検討し、細胞・組織間の相互作用について調べた。

4. 研究成果

(1) 海洋性カロテノイドの抗炎症作用とそれに関わる分子機構の解明

① 脂肪細胞の炎症性アディポサイトカイン産生に対する抑制効果の検討

経口投与したフコキサンチンは、生体内でフコキサンチノールやアマロウシアキサンチン A に変換されて、白色脂肪組織に蓄積した。フコキサンチンを経口投与した糖尿病/肥満 KK-*A*^Jマウスでは、インシュリン抵抗性に関わる TNF- α や IL-6、MCP-1、PAI-1 などの炎症性アディポサイトカインの遺伝子発現量に顕著な低下が見られた (図 1)。また、フコキサンチノールは、3T3-L1 細胞に対する TNF- α の炎症誘導に対して抑制効果を示すことを見出した。マクロファージの浸潤やインシュリン抵抗性に関わる MCP-1 や IL-6、更には炎症因子である PGE2 や NO の産生に関わる COX-2 や iNOS の遺伝子発現も抑制することを明らかにした。

② マクロファージの炎症因子産生に対する抑制効果の検討

アスタキサンチンは、LPS で炎症を惹起させたマクロファージ様 RAW264.7 細胞における炎症性サイトカインの IL-6 及び IL-1 β の産生を抑制した。これまでマボヤ中に見出したアロキサンチン、ディアトキサンチンに加え、ホタテ卵巣に含まれ

るアセチレンカロテノイドのペクテノロンも、LPS で刺激した RAW264.7 の IL-6 及び IL-1 β 、COX-2 の mRNA およびタンパク質産生を抑制することを明らかにした (図 2)。

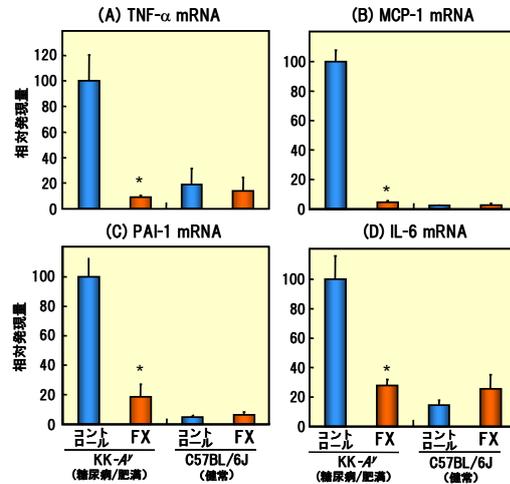


図1 白色脂肪組織のアディポサイトカイン遺伝子の発現量 (腸管膜周囲の白色脂肪組織を使用した。)
FX: フコキサンチン群 (0.2%) **P*<0.05 vs コントロール

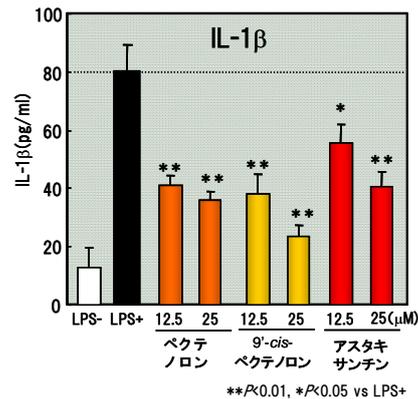


図2 ペクテノロンおよびアスタキサンチンのマクロファージに対するIL-1 β 産生抑制作用
***P*<0.01, **P*<0.05 vs LPS+

③ 大腸細胞の炎症因子産生に対する抑制効果

アロキサンチンとディアトキサンチンは、TNF- α で刺激した大腸癌 HT-29 細胞に対しても IL-1 β の mRNA 発現を抑制したことから、炎症に起因する大腸発癌に対する予防効果が期待された。

④ 炎症性因子の発現制御に関わる転写因子の活性化や情報伝達経路の解明

アスタキサンチンとペクテノロンは、炎症性サイトカインの遺伝子発現を制御する NF- κ B の DNA 結合による活性化を抑制した。その作用機構の一つとして I κ B のリン酸化に対する抑制機構が推察された。また、アスタキサンチンは、AP-1 の活性化も抑制したことから、複数の経路

に対して抗炎症作用を發揮することが推察される。

以上より、フコキサンチンの生体内代謝物であるフコキサンチノールに加え、海洋生物に特徴的なアスタキサンチンやアロキサンチン、ディアトキサンチン、ペクテノロンの抗炎症作用が示された。

(2) 海洋性カロテノイドによる炎症性の生活習慣病に対する予防効果

① 海洋性カロテノイドの糖尿病予防効果

褐藻より分離したフコキサンチンは、これまでの報告のように糖尿病/肥満マウス KK-*A'* の血糖値を改善した。一方、健常マウスである C57BL/6J マウスに対しては影響を示さず、高血糖マウスに特徴的な改善作用であることが推察された。フコキサンチンの経口投与により、インスリン抵抗性に関わる TNF- α や IL-6、MCP-1 の白色脂肪組織における遺伝子発現の低下が認められたことから、それらの過剰産生の抑制を介したインスリン抵抗性の改善による分子機構が推察された。

一方、アロキサンチンやディアトキサンチンに加え、フコキサンチンと類縁構造を有するハロシンチアキサンチンやフコキサンチノールを含むマボヤのエタノール抽出物も KK-*A'* の血糖値を改善した。今後、活性成分の同定と分子機構の解明が期待される。

② 海洋性カロテノイドの潰瘍性大腸炎および大腸発癌抑制効果

ICR マウスに予め4週間アスタキサンチン含有飼料を与えた後、1.5%DSS を飲水投与し、潰瘍性大腸炎の発症への影響を調べた。その結果、アスタキサンチン 200 ppm 群では炎症スコアがコントロール群と比較して低い値であり予防効果が示された(図3)。更に、大腸粘膜組織において IL-6、IL-1 β の mRNA 発現量に低下傾向がみられたことから、アスタキサンチンの抗炎症作用を介した予防効果が示唆された。

このような DSS の飲水投与による潰瘍性大腸炎の誘発実験系において、フコキサンチンやマボヤの粗カロテノイド画分でも同様に IL-6、IL-1 β 、COX-2 の mRNA 発現量の低下が認められたことから、炎症性因子の産生抑制を介した予防効果が示唆された。更に、マボヤ粗カロテノイド画分は抗酸化因子の転写制御を担う Nrf-2 の DSS による発現低下を抑制するとともに、その制御遺伝子である HO-1 mRNA の発現低下に対しても抑制効果を示した。よって、新たな分子機構として、酸化ストレス防御機構の低下抑制を介した潰瘍性大腸炎の予防機構が示唆された。

一方、ICR マウスに AOM を腹腔内単回投与し、1週間の休薬後、1.5% DSS を1週間飲水投与することで大腸癌を誘発した。アスタキサンチンは、DSS 投与終了1週間より17週間混餌投与した。その結果、アスタキサンチン 200 ppm 群において大腸の腺癌と異型陰窩の発生頻度に低下がみられた。

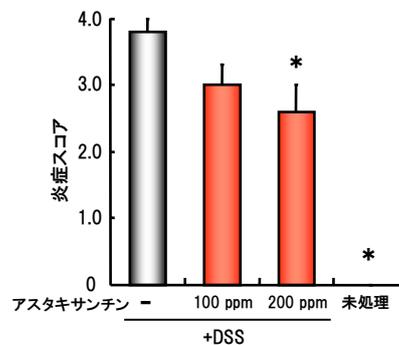
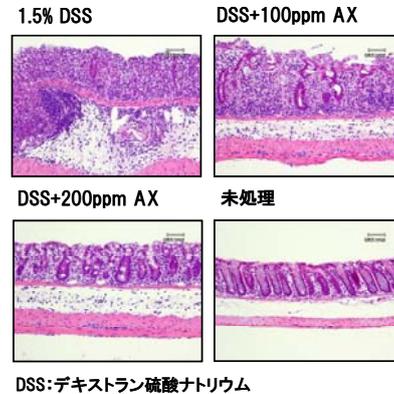


図3 大腸組織のHE染色と炎症スコア

* $P<0.05$ vs +DSS

更に、腫瘍組織部における PCNA の低下とアポトーシス細胞の増加がみられたことから、炎症後の大腸発癌に対するアスタキサンチンの予防効果が明らかとなった。アスタキサンチン投与群では、大腸上皮組織の免疫化学染色の結果、TNF- α 、IL-1 β に加え NF- κ B 発現量の有意な減少がみられた。よって、NF- κ B の活性化を抑制することで炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制する分子機構が推察された。また、フコキサンチンの投与によっても同様大腸腺癌の発生個数の低下、腫瘍組織部における PCNA (細胞増殖) の低下並びにアポトーシスの誘導がみられた。

以上の結果より、炎症を背景とした大腸発癌に対して、アスタキサンチンやフコキサンチンは予防効果を示し、その作用機構として NF- κ B の活性化の抑制を介した抗炎症作用が推察された。

⑦ 海洋性カロテノイドの抗炎症作用に関する細胞・組織間相互作用の解析

肥満の脂肪組織では、構成細胞である脂肪細胞とマクロファージが TNF- α と遊離脂肪酸を分泌し、他方の細胞を刺激する相互作用により慢性炎症が引き起こされる。フコキサンチンの抗肥満作用に関わる作用機構の一つとして、その生体内代謝物であるフコキサンチノールが脂肪細胞とマクロファージの相互作用に対して調節機能を示すことを見出した。更に、肥満の進展に伴い見られる脂肪組織へのマクロファージの浸潤を抑制することを明らかにした (図 4)。

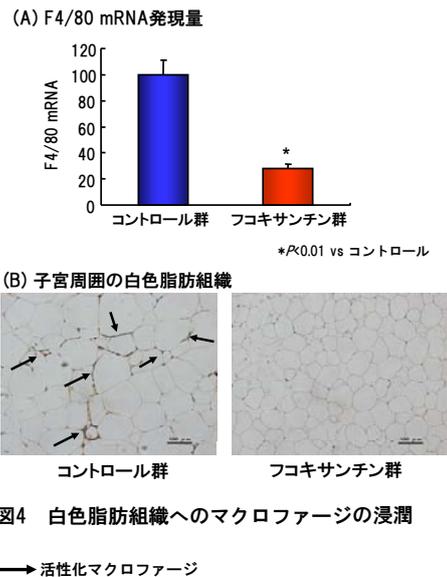


図4 白色脂肪組織へのマクロファージの浸潤

本研究では、海洋生物に特徴的なフコキサンチン、アスタキサンチン、アロキサンチン、ディアトキサンチン、ペクテノロンが脂肪組織や大腸組織、およびマクロファージに対して炎症性因子の産生抑制やそれらを介した細胞間相互作用を制御することを見出した。それに基づく抗炎症作用は、海洋性カロテノイドの投与によって認められた抗肥満作用や潰瘍性大腸炎及び大腸発癌に対する予防効果における作用機構であることが推察される。

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 11 件)

1. M.J. Yim, M. Hosokawa, Y. Mizushima, H. Yoshida, Y. Saito, K. Miyashita, Suppressive effects of amarouciaxanthin A on 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of PPAR γ and C/EBP α mRNA expression. *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 59, 2011, 1646-1652.

2. T. Okada, Y. Mizuno, S. Sibayama, M. Hosokawa, K. Miyashita, Antiobesity effects of *Undaria* lipid capsules prepared with scallop phospholipids. *J. Food Sci.*, 査読有, 76, 2011, H2-H6.
3. M. Hosokawa, T. Miyashita, S. Nishikawa, S. Emi, T. Tsukui, F. Beppu, T. Okada, K. Miyashita, Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-*A*^J mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 査読有, 504, 2010, 17-25.
4. N. Mikami, M. Hosokawa, K. Miyashita, Effects of sea squirt (*Halocynthia roretzi*) lipids on white adipose tissue weight and blood glucose in diabetic/obese KK-*A*^J mice. *Mol. Med. Reports*, 査読有, 3, 2010, 449-453.
5. Y. Yasui, M. Kim, T. Oyama, T. Tanaka, Colorectal carcinogenesis and suppression of tumor development by inhibition of enzymes and molecular targets. *Curr. Enzyme Inhibition*, 査読有, 5, 2009, 1-26.
6. Y. Yasui, T. Tanaka, Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J. Carcinogenesis*, 査読有, 8, 2009, 10(1-8).
7. M. Hosokawa, T. Okada, N. Mikami, I. Konishi, K. Miyashita, Bio-functions of marine carotenoids. *Food Sci. Biotechnol.*, 査読無, 18, 2009, 1-11.
8. I. Konishi, M. Hosokawa, T. Sashima, T. Maoka, K. Miyashita, Suppressive effects of alloxanthin, and diatoxanthin from *Halocynthia roretzi* on the LPS-induced expression of pro-inflammatory genes in RAW264.7 cells. *J. Oleo. Sci.*, 査読有, 57, 2008, 181-189.

[学会発表] (計 23 件)

1. M. Hosokawa, Marine carotenoid fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese mice. International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, 2010/11/18, Korea·Soul.
2. 細川雅史、褐藻由来フコキサンチンの抗肥満・抗糖尿病効果とその分子機構、第1回機能性油脂懇話会、2010/10/2、神奈川・湘南国際村センター。

3. Y. Yasui, Inhibitory effects of fucoxanthin on colitis-related colon carcinogenesis in mice. 第69回日本癌学会、2010/9/22-24、大阪・リーガロイヤルホテル大阪。
4. 細川雅史、アスタキサンチンのデキストラン硫酸ナトリウム誘発マウス大腸炎に対する抑制効果、第63回 日本栄養食糧学会大会、2009/5/22、長崎市、長崎ブリックホール。
5. M. Hosokawa, Anti-inflammatory effects of marine carotenoids. 100th A OCS Annual Meeting & Expo, 2009/5/5, Orlando, USA.

〔図書〕（計 5 件）

1. 前多隼人, 細川雅史、シーエムシー出版、第 12 章 アレンカロテノイドの機能性、in 「カロテノイドの科学と最新応用技術」、2009、201-210.
2. K. Miyashita, M. Hosokawa, Wiley-Blackwell, Chapter 11, Antiobesity effect of allenic carotenoid, fucoxanthin. in “*Nutrigenomics and proteomics in health and disease*”, 2009, 145-160.
3. 安井由美子、田中卓二、シーエムシー出版、第 7 章 予防医学とカロテノイド. in 「カロテノイドの科学と最新応用技術」、2009、153-160.
4. H. Maeda, M. Hosokawa, 他、ACS, Chapter 32. Antiobesity effect of fucoxanthin from edible seaweeds and its multibiological functions., in “*Functional Food and Health*”, 2008, 376-388.

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・講師
研究者番号：90434472

(3) 連携研究者

無し