

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20589

研究課題名(和文) 海洋性カロテノイドによる腸腎関連制御を介した慢性腎臓病発症予防機構の解明

研究課題名(英文) Prevention of chronic kidney disease through regulation of gut-kidney axis by marine carotenoids

研究代表者

高谷 直己 (Takatani, Naoki)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：40801501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病誘導マウスに対して、海洋性カロテノイド・フコキサンチンを摂取させることにより、腎臓中の炎症・浸潤関連因子および線維化関連因子のmRNA発現レベルの増加が抑制されることを見いだした。各種培養細胞を用いた試験から、生体内代謝物のフコキサンチノールが、腎臓-免疫細胞間の炎症性相互作用を負に制御することを介して線維化を抑制する機序が推察された。さらに、他の海洋性カロテノイドであるアスタキサンチンが、培養腎臓細胞に対して抗炎症・抗線維化作用を示すことを見いだした。本成果は、特徴的な分子構造を持つ海洋性カロテノイドが、腎臓の炎症や線維化への予防作用を示す食品因子である可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)は生活習慣病を背景に発症する慢性炎症疾患で、有効な治療薬はないため、食品因子による炎症制御を介した予防方策の開発・拡充が求められている。本研究では、CKDモデルマウスにおいて、海洋性カロテノイド・フコキサンチンの生体内代謝物が、腎臓中の過剰な炎症応答を負に制御することで線維化の進行を抑制する可能性が示唆された。また、培養腎臓細胞を用いて、抗炎症および抗線維化作用を示す食品因子探索のためのアッセイ系を確立した。本研究成果は、海洋性カロテノイドがCKDの発症予防に働く可能性を示すとともに、有望な食品因子を発掘するための技術創出を通して、CKD予防方策の拡充に資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that mRNA expression of inflammation/infiltration-related factors (MCP-1 and F4/80) and fibrosis-related factors (SMA and TGF- $\beta$ ) were downregulated in chronic kidney disease model mouse fed marine carotenoid fucoxanthin. In in vitro experiments using cultured kidney cells and/or macrophages, it was suggested that fucoxanthin-derived metabolite fucoxanthinol suppresses the early phase of fibrosis via negatively regulating the inflammatory interaction between the kidney cells and macrophages. Furthermore, other marine carotenoids, astaxanthin and lutein, exhibited anti-inflammatory and anti-fibrosis activities against cultured kidney cells. These findings indicate the marine carotenoids, which possess characteristic molecular structures, have potential to be beneficial food factors for the prevention on kidney inflammation and fibrosis.

研究分野：水産食品科学、分子栄養学

キーワード：海洋性カロテノイド フコキサンチン フコキサンチノール 慢性腎臓病 カロテノイド生体内代謝物  
炎症 線維化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は生活習慣病を背景に発症する慢性炎症疾患で、透析治療や腎移植が必要となる末期腎不全に陥るのみならず、脳梗塞や心筋梗塞などの心血管イベントの発症リスクを高める。慢性腎臓病の特徴である腎機能低下をもたらす要因の一つに、腎臓における炎症亢進とそれに続く線維化が関与すると考えられている。すなわち、腎臓を構成する細胞に炎症が生じると、炎症関連因子の産生に応じて免疫細胞の臓器浸潤が亢進する。浸潤した免疫細胞は炎症反応を増悪させる結果、慢性炎症を招来する。慢性炎症の長期化により、腎臓に線維化が生じ、最終的に臓器機能が破綻する。線維化の増悪因子の一つに、上皮-間葉転換と呼ばれる現象が報告されている。上皮-間葉転換は、尿細管上皮細胞が筋線維芽細胞に形質転換する現象で、増加した筋線維芽細胞はコラーゲンに代表される細胞外基質の産生を促進することで線維化進展に寄与する。上皮-間葉転換由来の細胞は、特に線維化への寄与が大きいとされている。以上より、腎臓の炎症や線維化が抑制・緩和できれば、慢性腎臓病の発症を効果的に抑制できる可能性がある。現在、慢性腎臓病に対する根本的な薬物療法は確立されておらず、発症予防が第一義的に重要となっている。そこで、日々行われる「食」を通じた予防が望まれるが、そのような効果を示す食品成分に関する知見は十分に蓄積されていない。

近年の研究により、慢性腎臓病発症の一因として、腸-腎連関の制御異常が関わりと考えられている。腸内細菌のバランスが崩れることによって、腸管からのエンドトキシン流入が増加して腎機能低下に繋がる機序が推測されている。実際、プロバイオティクスの投与により、腎機能低下が緩和されることが報告されている。<sup>1)</sup>これらの知見は、腸内環境の改善を図ることにより、慢性腎臓病発症抑制に有効である可能性を示唆する。

海産生物に含まれる海洋性カロテノイドは、陸上生物由来のものには見られないユニークな分子構造を持ち、その構造に依存して多様な生理活性を示す。我々はこれまで、ワカメなど褐藻類に特徴的に含まれる海洋性カロテノイドのフコキサンチンが、慢性炎症疾患である糖尿病<sup>2)</sup>や肥満<sup>3)</sup>、非アルコール性脂肪肝炎<sup>4)</sup>に対して発症抑制効果を示すことを報告してきた。また、エビなどに含まれるアスタキサンチンや、ノリなど紅藻類に含まれるルテインについても、抗酸化ストレス作用をはじめとした健康機能性が報告されている。しかしながら、これら海洋性カロテノイドが慢性腎臓病発症に与える影響はよく分かっていない。

以上の背景のもと、本研究では、海洋性カロテノイドが腎臓の炎症や線維化の増悪、腸内環境の悪化に与える影響を調べる。また、食品成分が生体調節機能(食の三次機能)を発現するには、その生体内代謝動態が関連すると予想される。そこで本研究では、海洋性カロテノイドの臓器蓄積プロファイルにも着目する。腎臓に蓄積するカロテノイド代謝物と、腎臓・免疫細胞に与える影響との関連を精査することにより、慢性腎臓病に対する効果的な発症予防法構築に向けた基礎知見が得られることを期待して実験を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、海洋性カロテノイドによる慢性腎臓病に対する発症抑制・緩和効果と、その作用機序の一端を解明することを目的とする。まずは、慢性腎臓病モデルマウスに海洋性カロテノイドを投与して、腎臓における炎症や線維化の増悪に対する影響や、腸内環境悪化の指標となる腸内細菌由来代謝産物への影響を調べる (in vivo)。次いで、食品成分による生体調節機能発現には当該成分の生体内での代謝動態と関連するという予想のもと、臓器に蓄積するカロテノイドの同定を試みる。そして、同定したカロテノイド代謝物を用いて培養細胞実験を進める (in vitro)。特に、慢性腎臓病の増悪には、腎臓細胞と免疫細胞の細胞間相互作用を介した臓器炎症が関連するため、個々の細胞のみならず共培養による細胞間相互作用に対する、カロテノイド生体内代謝物の抗炎症活性を評価する。さらに、腎臓の線維化と関連の深い上皮-間葉転換に対するカロテノイド代謝物の抑制効果を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 慢性腎臓病モデルマウスに対する海洋性カロテノイド・フコキサンチンの影響

C57BL/6J マウスに AIN-93G を基本組成とした粉末飼料を給餌した。飼料に対して 0.2% (w/w) のアデニンを添加することで慢性腎臓病を誘導した。また、フコキサンチンは、ワカメ油から抽出・精製したものを 0.2% (w/w) となるように添加した。腎臓における炎症・浸潤関連因子および線維化関連因子の mRNA 発現レベルは定量 PCR 法にて測定した。また、腸内容物中のアンモニウム量を吸光法にて、短鎖脂肪酸量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量した。

### (2) マウス臓器に蓄積するカロテノイド代謝物の解析

C57BL/6J マウスに AIN-93G を基本組成とした粉末飼料を給餌した。フコキサンチンをはじめとする海洋性カロテノイド (ルテイン、アスタキサンチン) は、飼料に対して 0.2% (w/w) となるように添加した。解剖後採取した各種生体臓器から、Folch 法にて総脂質成分を抽出し、高速液体クロマトグラフィー—質量分析装置 (LC-MS) にて代謝物の分析を行った。観察されたピークはカロテノイド標準品と比較して同定した。未同定ピークに関しては、薄層クロマトグラフィーおよび HPLC にて精製後、核磁気共鳴分光法 (NMR) にて分子構造を決定した。



以降の実験ではフコキサンチノールを用いることとした。また、ルテインやアスタキサンチンを投与したマウスの腎臓では、これらカロテノイドが分子構造を保持した形で蓄積されていたため、以降の実験ではルテインおよびアスタキサンチンを用いることとした。

### (3) 腎臓細胞およびマクロファージに対するカロテノイドの抗炎症活性

HK-2 細胞を TNF $\alpha$  刺激することによって、炎症性サイトカインである IL-8 および MCP-1 の mRNA 発現が著増した。一方、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ルテインをそれぞれ前処置した HK-2 細胞ではこれらの発現増加が減弱した。さらに、THP-1 細胞を LPS 刺激することによって、IL-8 や MCP-1 の mRNA 発現が著増したが、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ルテインをそれぞれ前処置した細胞ではこれらの発現増加が減弱した。これらの結果から、海洋性カロテノイドは腎臓および免疫細胞における過剰な炎症を制御することが示唆された。慢性腎臓病態下での腎臓では、腎臓細胞と免疫細胞の炎症性相互作用により、臓器炎症が増悪する。そこで、これらの相互作用に与える海洋性カロテノイドの影響を調べるため、HK-2 細胞と THP-1 マクロファージの共培養を行った。共培養によって IL-8 および MCP-1 の mRNA 発現が著増するが、フコキサンチノールを前処置しておくことによって、これらの発現増加が有意に抑制された。

### (4) 腎臓細胞の上皮-間葉転換に対するカロテノイドの抑制効果

HK-2 細胞を TGF $\beta$  刺激することによって、間葉系細胞マーカーである vimentin の mRNA 発現が著増した。一方、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ルテインを前処置した HK-2 細胞ではこの発現増加が減弱した。さらに、上皮-間葉転換した細胞は遊走活性を獲得する。この性質を利用して、トランスウェルの小孔を通過した細胞のみを染色する方法で、細胞の遊走活性を評価した。HK-2 細胞を TGF $\beta$  刺激することによって、染色される細胞数は増加（遊走活性が上昇）したが、フコキサンチノール、アスタキサンチン、ルテインをそれぞれ前処置した細胞では有意に抑制した（図 3）。したがって、海洋性カロテノイドは腎臓の線維化進展の一因である上皮-間葉転換に対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

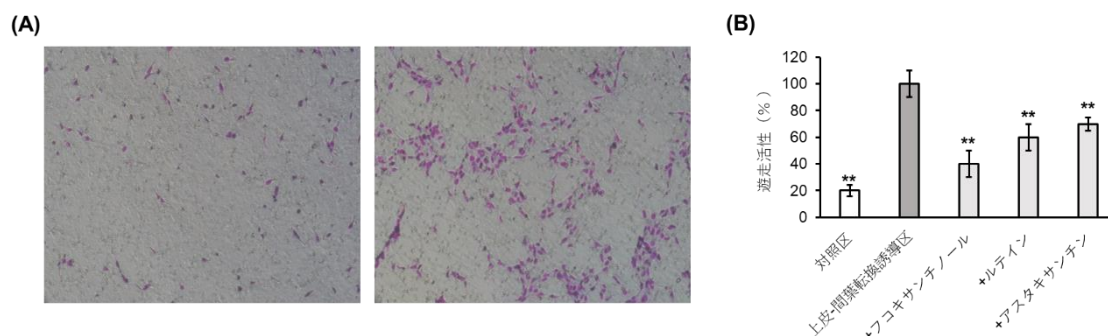


図 3. HK-2細胞の上皮-間葉転換による遊走活性の獲得と海洋性カロテノイドによる抑制効果

(A)遊走細胞を染色し、細胞数をカウントした。対照区（左図）と比べ、上皮-間葉転換誘導区（右図）では染色される細胞数が増えている。(B)上皮-間葉転換誘導区の細胞数を100%として、相対値を算出した（ $p < 0.01$  vs 上皮-間葉転換誘導区）

### (5) まとめ

本研究では、慢性腎臓病誘導マウスに対して、海洋性カロテノイド・フコキサンチンを摂取させることにより、腎臓中の炎症・浸潤関連因子および線維化関連因子の mRNA 発現レベルの増加が抑制されることを見いだした。各種培養細胞を用いた試験から、生体内代謝物のフコキサンチノールが、腎臓-免疫細胞間の炎症性相互作用や線維化を抑制する機序が推察された。さらに、他の海洋性カロテノイドであるアスタキサンチンやルテインも、培養腎臓細胞に対して抗炎症・抗線維化作用を示すことを見いだした。これらの結果は、特徴的な分子構造を持つ海洋性カロテノイドが、腎臓の炎症や線維化への予防作用が期待できる食品因子である可能性を示唆するものである。また、培養腎臓細胞および免疫細胞を用いて、抗炎症および抗線維化作用を示す食品因子探索のためのアッセイ系を確立することができた。したがって本研究成果は、慢性腎臓病に対する予防方策拡充に向けた基礎知見となることが期待される。

## 5. 引用文献

- 1) Koppe, L. et al.: *Kidney Int.*, **88**, 958 (2015)
- 2) Maeda, H. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7701 (2007)
- 3) Maeda, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 392 (2005)
- 4) Takatani, N. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **528**, 305 (2020).
- 5) Takatani, N. et al.: *Food Chem.*, **410**, 135318 (2023).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Kakimoto Masaki, Takatani Naoki, Hosokawa Masashi, Beppu Fumiaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Reduction of serum lipid levels in diabetic obese KK-Ay mice using monoalkyldiacylglycerol-rich oil derived from <i>Berryteuthis magister</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-022-01655-5	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 Takatani Naoki, Beppu Fumiaki, Yamano Yumiko, Maoka Takashi, Miyashita Kazuo, Hosokawa Masashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Preparation of Apoastaxanthinols and Evaluation of Their Anti-inflammatory Action against Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages and Adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 22341 ~ 22350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c01164	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 Nagata Kodai, Takatani Naoki, Beppu Fumiaki, Abe Aya, Tominaga Etsuko, Fukuhara Tomohisa, Ozeki Makoto, Hosokawa Masashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Monocaprin Enhances Bioavailability of Fucoxanthin in Diabetic/Obese KK-Ay Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 446 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md20070446	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 Takatani Naoki, Sakimura Kana, Nagata Kodai, Beppu Fumiaki, Yamano Yumiko, Maoka Takashi, Hosokawa Masashi	4. 巻 410
2. 論文標題 Identification and tissue distribution of fucoxanthinol and amarouciaxanthin A fatty acid esters in fucoxanthin-fed mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 135318 ~ 135318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2022.135318	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 高谷 直己	4. 巻 7
2. 論文標題 アポカロテノイドの細胞機能調節作用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 338 ~ 341
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 Takatani Naoki, Beppu Fumiaki, Yamano Yumiko, Maoka Takashi, Hosokawa Masashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Seco-type -Apocarotenoid Generated by -Carotene Oxidation Exerts Anti-inflammatory Effects against Activated Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 549 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess20329	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 Chen Liping, Beppu Fumiaki, Takatani Naoki, Miyashita Kazuo, Hosokawa Masashi	4. 巻 87
2. 論文標題 n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylglycerol suppresses inflammation in RAW264.7 cells through Nrf2 activation via alteration of fatty acids in cellular phospholipids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 727 ~ 737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01542-5	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14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高谷 直己、向村 奏、別府 史章、山野 由美子、眞岡 孝至、細川 雅史
2. 発表標題 フコキサンチン由来新規生体内代謝物の同定と組織分布解析
3. 学会等名 第34回カロテノイド研究談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高谷 直己、向村 奏、永田 航大、田谷 大輔、別府 史章、細川 雅史
2. 発表標題 海洋性カロテノイド fucoxanthin の新規生体内代謝物の同定と組織分布解析
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高谷 直己、向村 奏、別府 史章、細川 雅史
2. 発表標題 海洋性カロテノイド astaxanthin の生体内代謝物の同定と組織分布
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富樫 咲、別府 史章、高谷 直己、細川 雅史
2. 発表標題 n-3PUFA 結合ホスファチジルグリセロールの細胞内脂肪酸調節機構の解明
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takatani Naoki、Hosokawa Masashi
2. 発表標題 Identification of novel carotenoids from marine bacteria and their bioactivity
3. 学会等名 The 2nd World Congress on Oleo Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 健朗、亀山 美宇、高谷 直己、細川 雅史、別府 史章
2. 発表標題 水産物由来アルキルグリセロールによるC2C12筋管サイズ増大効果
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富樫 咲、陳 莉萍、別府 史章、高谷 直己、細川 雅史
2. 発表標題 高度不飽和ホスファチジルグリセロールの抗炎症作用に関わる細胞内n-3系脂肪酸強化
3. 学会等名 2022年度第4回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Miyafusa, Naoki Takatani, Fumiaki Beppu, Yumiko Yamano, Masashi Hosokawa
2. 発表標題 Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in macrophages treated with apocarotenoids
3. 学会等名 The 2nd World Congress on Oleo Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Takatani, Fumiaki Beppu, Takashi Okitsu, Yumiko Yamano, and Masashi Hosokawa
2. 発表標題 Identification of novel fucoxanthin cleavage metabolites and anti-inflammatory action against activated macrophages
3. 学会等名 The 1st Virtual International Conference on Carotenoids (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 高谷 直己, 別府 史章, 細川 雅史
2. 発表標題 褐藻由来フコキサンチンによる非アルコール性脂肪肝炎抑制効果
3. 学会等名 第7回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向村 奏, 永田 航大, 高谷 直己, 別府 史章, 細川 雅史
2. 発表標題 生体内におけるフコキサンチン代謝物の構造解析
3. 学会等名 2021年度 日本農芸化学会北海道支部第1回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富樫 咲, 陳 莉萍, 別府 史章, 高谷 直己, 細川 雅史
2. 発表標題 n-3 系多価不飽和脂肪酸結合ホスファチジルグリセロールの細胞内脂肪酸修飾と抗炎症作用
3. 学会等名 日本油化学会第60回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷脇 拓実, 和根崎 智, 高谷 直己, 別府 史章, 細川 雅史
2. 発表標題 n-3 系多価不飽和脂肪酸と $\gamma$ -コングリシニンの併用による糖・脂質代謝改善効果
3. 学会等名 日本油化学会第60回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 史章, 福島 葵, 高谷 直己, 細川 雅史
2. 発表標題 イトマキヒトデ脂質成分によるC2C12細胞の筋管形成促進効果
3. 学会等名 令和4年度公益社団法人日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022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