

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

高谷 直己・細川 雅史*

はじめに

カロテノイドは黄色～赤色を呈する脂溶性の天然色素化合物で、微生物、植物、動物に至るまで幅広く分布し、現在750種類以上が同定されている¹⁾。8つのイソプレヌユニットが直鎖上に結合したポリエン骨格と両端のエンドグループを基本構造とし、水酸基の導入、不飽和化、環化反応、配糖体や脂肪酸エステル形成などさまざまな修飾が行われることで、多様なカロテノイドが生じる。たとえば、ニンジンをはじめ多くの野菜に含まれるβ-カロテンは、両エンドグループがβ環を形成している一方、トマトに豊富なりコペンは非環化末端である。また、ミカンに多く含まれるβ-クリプトキサンチンは一方のβ環のみに水酸基が導入されており、エビなどの赤色素であるアスタキサンチンは両末端のβ環に水酸基およびカルボニル基を有する(図1)。微生物や植物は自らカロテノイドを生合成し、光合成色素や酸化ストレスからの保護物質として利用する。一方、ヒトを含む動物はカロテノイドを生合成できないが、食事により摂取・吸収されたのち一部は代謝変換を受け、血中を介して多くの組織中で多様なカロテノイドが見いだされる。カロテノイドはプロビタミンA活性や抗酸化作用がよく知られるが、近年、視覚に対する作用や免疫制御機能、抗メタボリックシンドローム効果などの新たな生理作用が明らかとなり、その健康機能性が注目されている²⁾。

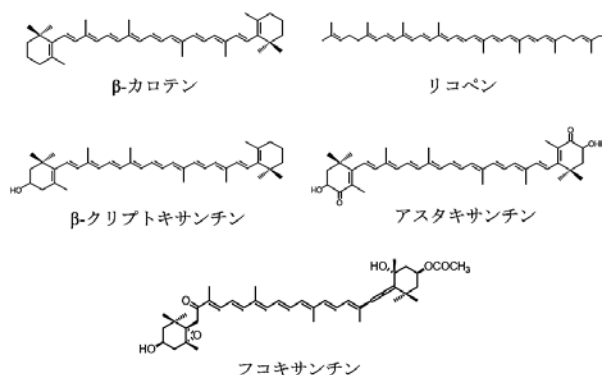


図1. 多様な構造を呈するカロテノイド

海洋性カロテノイド・フコキサンチン

フコキサンチンは、ワカメやコンブなどの大型褐藻や珪藻類に含まれる橙色を呈する海洋性カロテノイドで、その分子内にアレン結合、エポキシド、共役カルボニル基を有しており、陸上植物には見られないユニークな構造を示す(図1)。フコキサンチン含量は種差や季節変動などで大きく差があるが、新鮮藻体100g重量あたり、おおそコンブ19mg、ワカメ11mg、アラメ7.5mg、ホンダワラ6.5mg、ヒジキ2.2mgとの報告³⁾があり、褐藻の中ではもっとも主要なカロテノイドである。フコキサンチンの代謝中間体や生合成を担う酵素遺伝子については、一部しか明らかになっておらず、生合成経路の全容は未だ不明である。

フコキサンチンの生理作用として、がん細胞へのアポトーシス誘導作用⁴⁾をはじめ、酸化ストレス軽減作用⁵⁾や血糖値改善作用⁶⁾が報告されている。さらに筆者らは、糖尿病/肥満モデルKK-*A^y*マウスにフコキサンチンを4週間与えたところ、体重増加や内臓脂肪蓄積の抑制を認めるとともに、この作用機序の一つとして、白色脂肪組織(white adipose tissue; WAT)中の脱共役タンパク質を含むミトコンドリア因子の発現誘導を伴う、脂肪酸消費亢進の関与を見いだしている⁷⁾。また、ヒト試験においても抗肥満効果が認められており、BMI(body mass index, 体格指数)25以上の日本人被験者に対して、フコキサンチンを3mg/日、4週間摂取することにより、体重やBMI、内臓脂肪面積の低下がみられている⁸⁾。一方、肥満状態下ではWATにおける炎症の亢進と、免疫細胞のWATへの浸潤の所見が認められるが、フコキサンチンを摂取したKK-*A^y*マウスのWATでは炎症関連因子の発現および細胞浸潤が抑制された⁹⁾。さらに最近、潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して、フコキサンチンは炎症性メディエーターの産生抑制を介して保護作用を示すことが報告された¹⁰⁾。これらの知見は、フコキサンチンが、慢性疾患の基盤にある「炎症」に対して制御機能を有することを示唆している。

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

非アルコール性脂肪肝疾患(non-alcoholic fatty liver

diseases; NAFLD) とは飲酒量がエタノール換算で、1日20 g以下で脂肪肝を呈する疾患概念である。NAFLDの多くは、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などを基盤に発症することから、メタボリックシンドロームの肝病変として捉えられている。近年、NAFLDは世界的に増加の一途にあり、その有病率はヨーロッパ23.71%、北米24.13%、南米30.45%、中東31.79%、アジア27.37%、アフリカ13.48%との報告がある¹¹⁾。NAFLDは単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)に分けられる。NASH発症のメカニズムは未だ解明されていないが、Day and James¹²⁾のtwo-hit theoryによると、肝細胞への脂肪沈着(脂肪肝)をfirst hitとして、そこに酸化ストレスや炎症性サイトカインなどのsecond hitが作用することによって、NASHへと病態が進行する。NASHは炎症のみならず肝臓の線維化を生じ、より重篤な肝疾患である肝硬変や肝がんの発症リスクを増加させる。そのため、NASHの抑制は臨床的に重要な意味を持つが、現在NASHに対する有効な治療薬はない。一方で、運動習慣や食生活の改善の有効性が指摘されており¹³⁾、日々の食事から摂取される食品因子によるNASHの予防・抑制が期待される。

先述のように、フコキサンチンは生体組織における慢性炎症に対して制御機能を有することが期待されるが、NASHへの作用は不明であった。そこで筆者らは、肝臓での過剰な炎症や線維化を伴うNASHに対するフコキサンチンの抑制作用を検討するため、コリン欠乏メチオニン減量食による食餌誘導性NASHモデルを用いて

評価を行った¹⁴⁾。健常タイプC57BL/6Jマウスに、対照食(コリン・メチオニン充足)、NASH食(コリン欠乏メチオニン減量)、フコキサンチン食(フコキサンチン+NASH食)をそれぞれ4週間与えたところ、対照食群と比較して、NASH食群の肝臓において、肝重量増加、酸化ストレス指標の一つであるチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)値の上昇、トリグリセリドの蓄積が認められた(図2)。さらに、肝臓障害マーカーであるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の血中レベルが顕著に上昇した。しかしながら、フコキサンチン食群では、これら肝臓および血液における値の増加は大きく抑制された(図2)。NASHの特徴の一つである肝臓への過剰な脂肪蓄積に起因する脂肪毒性は、活性酸素種の産生を促進し、酸化ストレスや小胞体ストレスを増大させて肝臓細胞死を伴う肝障害を誘起する¹⁵⁾。フコキサンチンは、脂肪蓄積や酸化ストレス蓄積を軽減させることで肝臓障害から保護する可能性が示唆された¹⁴⁾。

一方、NASH病態下の肝臓組織では、炎症の亢進および免疫細胞の肝臓組織への浸潤が認められる¹⁶⁾。肝臓細胞から分泌される炎症性サイトカインやケモカインは、肝常在性マクロファージからのケモカイン産生を促進し、単球などの免疫細胞を肝臓へリクルートすることで炎症を増悪させる¹⁷⁾。図3に示すように、NASH食群において、肝臓中の炎症関連因子tumor necrosis factor α (TNF α), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), interleukin-1 β (IL-1 β)および細胞浸潤マーカーである

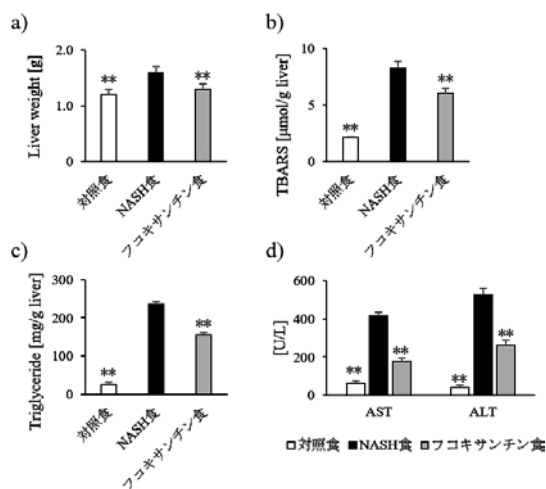


図2. フコキサンチンによる肝臓での脂質蓄積および酸化ストレス抑制効果と肝臓障害軽減作用(文献14より改変)。a) 肝臓重量, b) 肝臓中TBARS値, c) 肝臓中トリグリセリド量, d) 血中ASTおよびALTレベル, 値は平均 \pm 標準誤差(n=7)を示す。**p < 0.01 vs NASH食群。

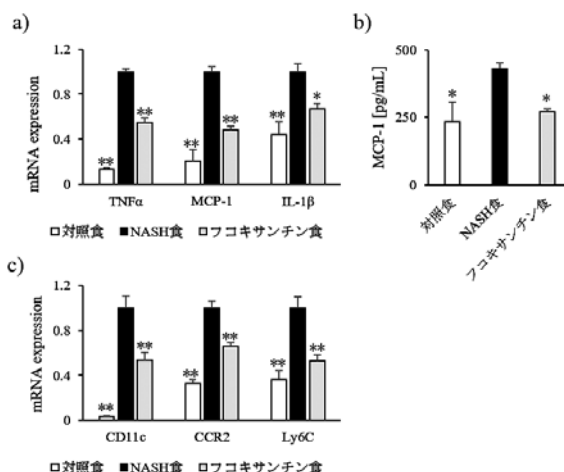


図3. フコキサンチンによる肝臓での炎症および細胞浸潤抑制効果(文献14より改変)。a) 炎症関連因子のmRNA発現, b) 血中MCP-1レベル, c) 細胞浸潤マーカーのmRNA発現, 値は平均 \pm 標準誤差(n=7)を示す。**p < 0.01, *p < 0.05 vs NASH食群。

CD11c, Ly6C, C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) のmRNA発現が大きく増加したことに加えて、血中MCP-1レベルも上昇した。一方、フコキサンチン食群ではこれらmRNA発現が強く抑制されるとともに、血中MCP-1レベルの上昇も抑制された。以上より、フコキサンチンは、NASHモデルに対して肝臓での炎症ならびに細胞浸潤を抑制することが示された。

NASH発症に伴い生じる肝線維化は、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) の産生増加と分解低下による、ECM蓄積によってもたらされる¹⁸⁾。肝線維化には肝星細胞が重要な役割を担っている¹⁹⁾。NASH肝臓において、肝臓細胞や免疫細胞から分泌されるtransforming growth factor β 1 (TGF β 1) やTNF α , IL-1などの因子によって肝星細胞が活性化され、筋線維芽細胞への形質転換を介してECM産生が促進される²⁰⁾。本モデルにおける線維化を評価するため、肝臓中のサイトカインTGF β 1, ECMタンパクの一種であるI型コラーゲン (Col1 α 1), およびECM分解を阻害するtissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) のmRNA解析を行ったところ、図4に示すように、NASH食群においてこれらのmRNA発現が著増している一方で、フコキサンチン摂取により大きく下方制御された。さらに、フコキサンチン食群の肝臓では、NASH食で誘導される肝星細胞の活性化マーカー α smooth muscle actin (α SMA) のタンパク質発現の増加が抑制された (図4)。これらのことから、フコキサンチンは肝星細胞の活性化ならびに線維化関連因子のmRNA発現を下方制御することにより、肝線維化の進行を防ぐ可能性が示唆された。

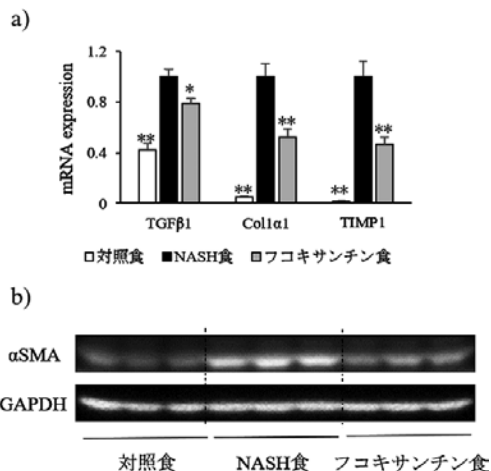


図4. フコキサンチンによる肝臓での線維化関連因子の発現抑制効果 (文献14より改変). a) 線維化関連因子のmRNA発現. b) 肝星細胞活性化マーカー α SMAのタンパク質発現. 値は平均 \pm 標準誤差 (n = 7) を示す. **p < 0.01 vs NASH食群.

以上より、フコキサンチンは食餌性NASHモデルに対して、肝臓の脂肪化、酸化ストレス、炎症を抑制するのみならず、線維化の初期段階も強く抑制することが推察された。

フコキサンチン代謝物による炎症抑制作用

フコキサンチンは摂取後、消化管にて脱アセチル化されフコキサンチノールに代謝・吸収されたのち、肝臓にてエポキシドが開環したアマロウシアキサンチンAに代謝変換される²¹⁾。そのため、フコキサンチンを経口摂取した際に見られる生理作用の活性本体として、これら代謝物の関与が推測される。しかしながら、フコキサンチン代謝物それぞれを用いて活性を評価した例はきわめて少ない。そこで、筆者らはフコキサンチンによるNASH抑制作用メカニズムの一端を明らかにする目的で、生体組織中のフコキサンチン代謝物の分析と、培養細胞を用いた炎症抑制機能の評価を行った。フコキサンチン摂取したマウスから肝臓をはじめとする各生体組織を採取したのち、総脂質成分を抽出しHPLC分析を行ったところ、図5に示すように、既知の代謝物であるフコキサンチノールおよびアマロウシアキサンチンAに加え、開裂物であるパラセントロンを新たに見いだした。アレン結合を有するエンドグループを残してポリエン直鎖上のC-6,7位で切断された分子構造から、フコキサンチノールあるいはアマロウシアキサンチンAから酸化的開裂を経て生成すると推測された。また、これら代謝物は肝臓、WAT、腎臓、筋肉、血液などの組織で幅広く検出され、健常タイプC57BL/6Jのみならず、病態モデルKK- A^y においても同様に見いだされることを確認している (投稿中)。以上より、摂取したフコキサンチンは生体内でフコキサンチノール、アマロウシアキサンチンA、さらにはパラセントロンに代謝変換されることが推察される。

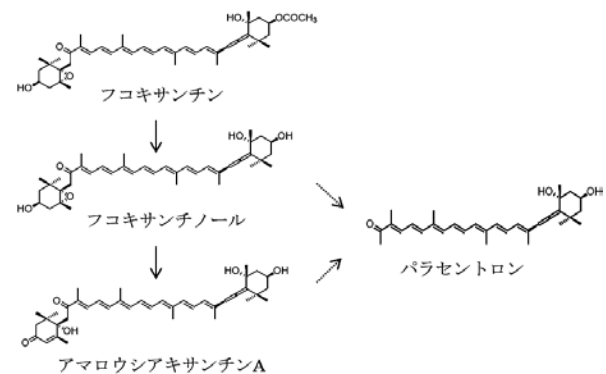


図5. フコキサンチンの生体内代謝物. パラセントロンはフコキサンチノールあるいはアマロウシアキサンチンAのC-6,7位が開裂して生成すると推定される。

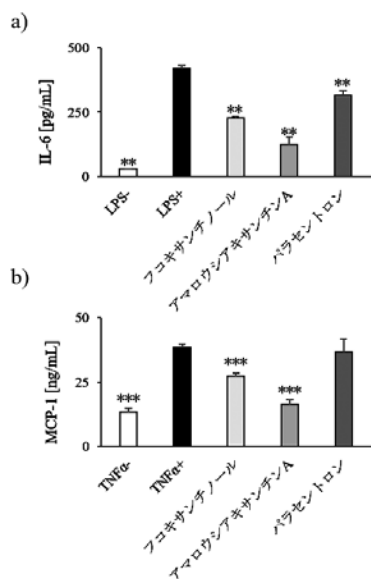


図6. フコキサンチン代謝物による炎症因子の過剰産生に対する抑制効果. a) RAW264.7細胞におけるIL-6産生量, b) Hepa1-6細胞におけるMCP-1産生量, 値は平均±標準誤差 (n = 3) を示す. **p < 0.01 vs LPS+, ***p < 0.01 vs TNFα+

次に、これら代謝物の炎症抑制機能を調べるために、培養細胞を用いた検討を進めた。マウスマクロファージ様細胞RAW264.7はリポポリサッカライド (LPS) による刺激に応じて炎症性因子を過剰産生する。図6に示すように、フコキサンチン代謝物存在下では、炎症性サイトカインIL-6の産生増加が抑制された。一方、マウス肝臓細胞Hepa1-6にTNFα処理した際にケモカインMCP-1が過剰産生されたが、フコキサンチノールおよびアマロウシアキサンチンA存在下では有意に増加が抑制された。

以上より、フコキサンチン代謝物であるフコキサンチノール、アマロウシアキサンチンA、そしてパラセントロンは抗炎症能を有することが示唆された。

おわりに

本研究で行った動物実験において、経口摂取されたフコキサンチンはNASH抑制作用を示した。その作用メカニズムの一つとして、フコキサンチン生体内代謝物であるフコキサンチノール、アマロウシアキサンチンAおよびパラセントロンがそれぞれ、肝臓組織中の肝臓細胞や免疫細胞に対して協調的に作用して抗炎症効果を示すことが推察される。一方、臓器機能破綻をきたす組織リモデリングに重要な線維化に対しても、食品因子である

フコキサンチンが抑制効果を示した結果は興味深い。最近、フコキサンチンが肝星細胞に対して直接的に活性化を抑制することが報告された²²⁾。抗線維化作用を持つ食品因子の研究は多くなく、今後肝星細胞中のフコキサンチン代謝物の分析をはじめ、代謝物による活性化抑制作用やその分子メカニズム解明が待たれる。フコキサンチンはNASHをはじめとする慢性炎症疾患の予防・抑制のみならず、抗線維化作用を示す新たな食品因子として期待される。

謝 辞

本研究は、JSPS科研費・基盤研究 (B) (JP18H02274) および特別研究員奨励費 (JP19J11147) の助成によって執り行われました。また、アマロウシアキサンチンA、パラセントロンを化学合成および供与くださいました神戸薬科大学・山野由美子先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 高市真一 編集：カロテノイド—その多様性と生理活性—, 裳華房 (2006).
- 2) 宮下和夫 監修：カロテノイドの科学と最新応用技術, シーエムシー出版 (2009).
- 3) Kanazawa, K. *et al.*: *Food Sci. Technol. Res.*, **14**, 573 (2008).
- 4) Hosokawa, M. *et al.*: *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 243 (1999).
- 5) Iwasaki, S. *et al.*: *Food Nutr. Sci.*, **3**, 1491 (2012).
- 6) Maeda, H. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7701 (2007).
- 7) Maeda, H. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 392 (2005).
- 8) Hitoie, S. Shimoda, H.: *Funct. Food Health Dis.*, **7**, 246 (2017).
- 9) Hosokawa, M. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **504**, 17 (2010).
- 10) Yang, Y. P. *et al.*: *Nat. Prod. Res.*, **29**, 1 (2018).
- 11) Younossi, Z. M. *et al.*: *Hepatology*, **64**, 73 (2016).
- 12) Day, C. P. and James, O. F.: *Gastroenterology*, **114**, 842 (1998).
- 13) Romero-Gómez, M. *et al.*: *J. Hepatol.*, **67**, 829 (2017).
- 14) Takatani, N. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **528**, 305 (2020).
- 15) Alkhoury, N. *et al.*: *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 445 (2009).
- 16) Chiba, T. *et al.*: *PLoS One*, **11**, e0164191 (2016).
- 17) Vonghia, L. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 19867 (2013).
- 18) Bae, M. *et al.*: *J. Nutr. Biochem.*, **55**, 1 (2017).
- 19) Moreira, R. K.: *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **131**, 1728 (2007).
- 20) Li, J. T. *et al.*: *J. Gastroenterol.*, **43**, 419 (2008).
- 21) Asai, A. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 205 (2004).
- 22) Kim, M. B. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **513**, 657 (2019).