

様式4（公表用）

氏名	近藤 真之祐
博士の専攻分野の名称	博士（農学）
学位記番号	医工農甲 第129号
学位授与年月日	令和5年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	β カロテンの過剰摂取による脂肪肝炎および炎症関連遺伝子の発現増大に関する研究
論文審査委員	主査 教授 望月 和樹
	准教授 大槻 隆司
	教授 岸上 哲士
	教授 舟根 和美
	准教授 久本 雅嗣
	准教授 乙黒 美彩

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

近年、我が国では、食環境の変化や交通機関の発達などによって、肉体的、身体的ストレスに起因する疾患への罹患率が上昇している。具体的に運動不足や睡眠不足、三大栄養素の過剰摂取といった生活習慣は、体内のエネルギー基質の過剰状態を誘導する。特に食の欧米化が進んだ現在、脂肪や糖の摂取過多は、中性脂肪が肝臓に溜まる脂肪肝や、インスリンの作用不足が起因する2型糖尿病、病的な血圧の上昇が観察される高血圧症、さらに、上記の疾患が起因する動脈硬化関連疾患(心血管疾患、脳血管疾患、腎症、網膜症等)の発症を促進する。これらの疾患の発症の根源には、慢性炎症が関与すると考えられ、その根源の一つに活性酸素種がある。これらの活性酸素種は、主に好中球やマクロファージ等の自然免疫細胞を活性化し、インターロイキン(IL)-1 β 、IL-18、腫瘍壊死因子(TNF)、IL-8 や Monocyte chemotactic (MCP) -1 等のケモカインの発現・分泌を促進し、周辺の免疫応答細胞の活性化および遊走促進によって、代謝性疾患および関連する合併症の誘導を促進することが多くの研究によって明らかとなりつつある。

様式 4 (公表用)

このような活性酸素種による酸化ストレスから生体を防護するため、活性酸素種の除去に関連する酵素(抗酸化酵素)群が存在する。カロテノイドやカテキン等の抗酸化成分は、食品添加物として用いられる天然色素である酸化傷害を効率よく改善することが期待され、生活習慣病の予防に有効であると考えられる。それゆえ、 β カロテンは、プロビタミン A として作用するだけでなく、強い抗酸化作用を有することから、健康維持や生活習慣病発症予防に有用であると考えられている。

第一章では、ヒトに近いカロテノイド代謝を示すことが報告されているスナネズミを用いて肥満、脂肪肝等の発生要因となる高脂肪食摂取下の β カロテン摂取の安全性、有効性について、主に炎症に焦点を当てて検討した。また抗酸化成分 β カロテンについては、体内に蓄積し、遺伝子発現を変動させることから、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック制御が関与する可能性がある。しかしながら、高グルコース培地に β カロテンを添加し培養したときの炎症性サイトカイン等の発現変動に、ヒストン修飾を含めたエピジェネティック修飾が関与しているか未だ明らかになっていない。そこで第二章では幼若マクロファージ様 THP-1 を用い、高血糖状況下での抗酸化食品成分 β カロテンの投与が炎症関連遺伝子や抗酸化関連遺伝子の発現やそれらのエピジェネティック制御に影響を与えるかを検討した。

第一章

【方法】

肝臓への脂肪や β カロテンの蓄積がヒトに近いモデル動物スナネズミを通常食(N)群、高脂肪高シヨ糖食(C)群と低カロテン食(LC)群、高カロテン食(HC)群に分け、それぞれの食餌を与え13週間飼育した。飼育終了後、各臓器を回収し、血液成分分析及び組織病理解析等を行った。

【結果・考察】

13週間にわたり高容量の β -カロテンを摂取したスナネズミの生化学パラメータについては、有意差は無かったものの、体重、体重増加量、解剖時肝臓重量が、対照群(C)と比べ高カロテン群(HC)で高い傾向を示した。空腹時血糖値や通常値血糖値は、対照群(C)、低カロテン群(LC)、高カロテン群(HC)の各群間に差はなかった。血清総コレステロール値、中性脂肪値は、 β カロテン投与群で高い傾向があり、高カロテン群(HC)では有意に高かった。しかし、HDLコレステロールは低カロテン群(LC)で向上したが高カロテン群(HC)では変化しなかった。血清総コレステロール値、中性脂肪値は、 β カロテン投与群で高い傾

様式 4 (公表用)

向があり、高カロテン群(HC)では有意に高かった。しかし、HDL コレステロールは低カロテン群 (LC) で向上したが高カロテン群 (HC) では変化しなかった。これらの知見は、特に高用量での β -カロテン摂取が高脂肪/高糖食摂取時の脂質異常を誘導することを示唆している。一方スナネズミにおける過剰な β -カロテン摂取は、肝臓の線維化を促進することが示唆された。さらに、線維化に関連する炎症性サイトカイン IL-18 の肝臓におけるタンパク質の発現量は変化しなかったが、線維化の促進と正の相関を示す MMP-9 タンパク質の発現は、 β -カロテン投与で上昇することが明らかとなった。これらの結果は、スナネズミの肝臓における MMP-9 タンパク質の発現の増加と β -カロテンの過剰摂取が、肝硬変や肝細胞癌の発症リスクの上昇につながることを示唆した。

第二章

【方法】

幼若マクロファージ様 THP-1 を低グルコース RPMI 1640 培地(5 mM) +ジメチルスルホキシド(DMSO) (LG) 群、高グルコース RPMI 1640 培地(25 mM) +DMSO(HG) 群、及び高グルコース RPMI 1640 培地+ β -カロテン(5 μ M) (BC) 群の 3 群に分け、培養 1 日後、総 RNA 及びクロマチン免疫沈降(ChIP) 高血糖状況下での抗酸化食品成分 β カロテンの投与がエピジェネティックに炎症関連遺伝子や抗酸化関連遺伝子の発現に影響を与えるかをリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。

【結果・考察】

THP 1 細胞を高グルコース条件下において β -カロテン処理を実施すると、代謝関連遺伝子(*FBP 1* 及び *PFKFB3*)、ROS 産生に関連する遺伝子(*NCF 1 B*、*PLCB2* 及び *PRAM-1*)、及び炎症に関与する遺伝子(*IL31RA*、*FGR*、*CD 38*、*SULF 2* 及び *CSF 3 R*) の発現量が増大することが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の発現は、低グルコース条件で培養した細胞と比較して、高グルコース条件単独では有意な上昇は観察されなかった。免疫応答遺伝子 *CD 38*、*ITGAL* 及び *NCF 1 B* 周辺領域におけるヒストン修飾を、ChIP アッセイを用いて検討した。*NCF1B* 及び他の遺伝子の周りの H3K 4 のモノ及びジメチル化は、高グルコース条件下で培養した細胞よりも低グルコース条件下で培養した細胞で高かった。しかし、これら 3 遺伝子の周囲の領域のヒストン H3K4 ジメチル化、H3K36 トリメチル化、及び H3K9 アセチル化は、いずれも高グルコース条件下で、未処理細胞よりも β -カロテン処理細胞で高かった。以上より、高グルコース条件下で THP-1 細胞に β -カロテンを処理すると、酸化ストレス関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現が亢進し、遺伝子周辺

のヒストン H3 アセチル化、ヒストン H3K4 ジメチル化、K3K36 トリメチル化が促進されることが明らかとなった。これらの結果から、 β -カロテンは糖尿病患者において、ヒストン H3 アセチル化およびヒストン H3K4 ジメチル化を介して酸化ストレスおよび炎症関連遺伝子の発現を誘導することにより副作用を誘導する可能性が示唆された。

【結論】

スナネズミへの β カロテンの過剰投与は、炎症の増悪を介して肝機能を低下させることより、脂質異常症や肝臓の線維化の発症進展を促進した。幼若マクロファージ様細胞においても、炎症に対して抗酸化成分が過剰となった場合、酸化ストレス関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現が亢進し、エピジェネティックな変化を誘導することが示唆された。以上より、 β カロテンの過剰投与は、肝臓への単球の浸潤の誘導、炎症関連遺伝子のヒストン修飾の変化を介した遺伝子発現誘導、肝星細胞の活性化によって、コラーゲン繊維の大量発生がもたらされ、肝線維化が促進する可能性が推測された。

論文審査結果の要旨

本論文は β カロテンの過剰摂取が肝臓に炎症を与え脂肪肝炎を誘導するか、また肝臓において炎症を促進する細胞にマクロファージがあるが、幼若マクロファージ様培養細胞である THP-1 細胞において、 β カロテンが炎症関連遺伝子の mRNA 発現を促進するかを調べるとともに 炎症関連遺伝子の発現増大機構を調べたものである。

第一章では、ヒトに近いカロテノイド代謝を有することが報告されているスナネズミに対して、高脂肪食摂取下の β カロテン添加食を摂取させた。その結果、スナネズミへの過剰な β カロテン摂取は、肝臓の線維化を促進することが示唆された。さらに、線維化に関連する炎症性サイトカイン IL-18 の肝臓におけるタンパク質の発現量は変化しなかったが、線維化の促進と正の相関を示す MMP-9 タンパク質の発現は β カロテン投与で上昇することが明らかとなった。これらの結果は、スナネズミへの β カロテンの過剰投与が、脂肪肝炎の発症リスクの上昇させることを示唆している。

第二章では、ヒト幼若マクロファージ様 THP-1 細胞において、高グルコース環境下で β カロテンを投与し、炎症関連遺伝子の発現が β カロテンの投与によって上昇するか、その発現増大にヒストン修飾が関与しているかを調べた。その結果、*IL31RA*、*CD38*、*NCF1B* など

様式 4 (公表用)

の炎症関連遺伝子、および *ITGAL*、*PRAMI*、*CSF3R* などの炎症関連シグナル伝達経路遺伝子の mRNA 発現は、高グルコース条件下で β カロテンに投与によって上昇することが明らかとなった。さらに、*CD38*、*NCF1B*、*ITGAL* 遺伝子周辺のヒストン H3 リジン 4 (K4) ジメチル化、H3K36 トリメチル化、および H3K9 アセチル化は、 β カロテン処理により上昇することが明らかとなった。これらの知見は、高グルコース下で培養した幼若マクロファージ様 THP-1 細胞への β カロテン投与は炎症関連遺伝子の発現を上昇させること、その発現はエピジェネティック情報の一つであるヒストン修飾と関連することが明らかとなった。

以上により過剰な β カロテンのスナネズミへの投与は、肝臓において炎症を惹起し脂肪肝炎を誘導すること、幼若マクロファージ様細胞への β カロテンの投与は炎症関連遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。また、 β カロテンによる脂肪肝炎の形成に、マクロファージ等の免疫応答細胞が関与する可能性が示唆された。

上記の結果は、申請者が筆頭著者として、査読付き英論文 2 報として報告したものである。さらに審査会において、委員による質問に適切に答え対応した。以上のことから、本論文は博士 (農学) の学位論文として適格と認め、合格と判定した。