

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

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2023年9月

近藤 真之祐

略語一覧

NOX	NADPH oxidase
XO	Xanthine oxidase
IL	Interleukin
TNF	Tumor Necrosis Factor : 腫瘍壊死因子
MCP	Monocyte chemotactic
SOD	Superoxide dismutase
GSH peroxidase	Glutathione peroxidase
GSH reductase	Glutathione reductase
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells : ヒト臍静脈内皮細胞
EPC	Human endothelial progenitor cells : 内皮前駆細胞
CX	Connexin
MMP	Matrix metalloproteinase
GOT	Glutamic Oxaloacetic Transaminase
GPT	Glutamic Pyruvic Transaminase
VCAM	Vascular cell adhesion molecule : 血管細胞接着分子
ICAM	Intercellular adhesion molecule : 細胞内接着分子
MLL 5	ヒストン修飾酵素混合系列白血病 5
SIRT 1	ヒストンデアセチラーゼサーチュイン 1
BCO 1	β -カロテンオキシゲナーゼ 1

目次

P 3 : 序

第一章

P 7 : 序論

P 9 : 材料と方法

P12 : 結果

P15 : 考察

第二章

P18 : 序論

P20 : 材料と方法

P24 : 結果

P34 : 考察

P38 : 総合考察

P40 : 総括、謝辞

P41 : 引用文献

P48 : 論文の要旨

序

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[1]。それゆえ、上記の疾患の発症機序を明らかにし、食生活等の生活習慣を改善し、疾病の発症を予防することが重要である。

これらの疾患の発症には、慢性的な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。活性酸素種には、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、過酸化水素等がある。スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロキシラジカルは反応性が高く、過酸化水素は金属イオンにより容易にヒドロキシラジカルを生成する。活性酸素種を産生する主なものとして、NADPH oxidase (NOX)や電子伝達系の活性化、Xanthine oxidase (XO)によるものがある。NOXはNADPH由来の電子が細胞膜を超えて輸送され、分子状の酸素と反応させることでスーパーオキシドアニオンラジカルを生成する[2]。一方、XOは、ヒポキサンチンを尿酸に変換する過程でスーパーオキシドアニオンラジカルを発生させる[3]。高血糖状態では、電子伝達系等のエネルギー産生から活性酸素種の産生が促進されるほか、解糖系からのグルコースのキャリアオーバーが尿酸合成経路、ペントースリン酸回路、ジアシルグリセロール-プロテインキナーゼC経路等の副路に流入し、活性酸素種や酸化ストレスが生じることも報告されている[4]。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、Interleukin(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・分泌を促進する[5]。これらの炎症因子は、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[6]。

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。活性酸素種を除去する酵素にはカタラーゼ、Superoxide dismutase (SOD)、Glutathione peroxidase (GSH peroxidase)、Glutathione reductase (GSH reductase)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)などがある。カタラーゼは、過酸化水素を酸素と水に分解する酵素として、SODはスーパーオキシドアニオン($\cdot\text{O}_2^-$)から電子を取り除いて酸素と水素分子にする酵素として働いている[7]。しかしながら、上記のような体内の抗酸化酵素のみでは十分に活性酸素種を除去できないため、活性酸素種が産生されないような食生活や、産生されても除去できる食生活をすることが重要である。酸化ストレスや活性酸素種の除去に有用な物質としてカロテノイドやカテキン等の抗酸化成分が知られている。カロテノイド類は、食品添加物として用いられる天然

色素である。この添加物は、食品の色彩に重要であるが、健康維持にも重要な役割を担うと考えられている。カロテノイドには、ビタミン A に変換されるプロビタミン A (α -、 β -、 γ -カロテン、 β -クリプトキサンチン) や変換されないリコペン、ルテイン等が存在する。その中でも食品から摂取量が多いのが β -カロテンである。 β -カロテンは、一重項酸素などの活性酸素種を除去することに加え、肝臓や脂肪組織に蓄積し、体内の脂溶性部位の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ている [8,9]。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る。

現在のところ、 β -カロテンは、プロビタミン A の中でもビタミン A に変換されやすく、なおかつその変換は体内のビタミン A の不足状態に応じて変換されることから過剰障害となるリスクは低いと考えられる。そのため、ビタミン A の耐用上限量の算定に β -カロテンは用いられていない。しかしながら、 β -カロテン等の抗酸化成分はサプリメントなどでも摂取しやすく、また、脂溶性物質であり体内で蓄積されやすいため過剰障害のリスクも考慮する必要があると考える。 β -カロテンなどの抗酸化物質について、自身が酸化される際にラジカルを発生させ、酸化傷害を誘導することも報告されている [10]。また、緑茶に存在する抗酸化物質のカテキンは、カロテン同様に抗酸化物質であるが、酸化促進作用とアポトーシス誘導作用を示すことが報告されている [11]。

これまでにいくつかの疫学研究によって β -カロテンの動脈硬化関連疾患への有効性・安全性に関する研究が行われている。例えばイスラエルの HDL コレステロールが 40 mg/dl 以下でフィブレートによる投薬治療を行っている 24~65 歳の男性を対象とした、比較試験において β -カロテン (60 mg/日) の中期的な投与 (6 週) が、HDL コレステロールを上昇させ、中性脂肪レベルを低下させた報告 [12] や、2 型糖尿病患者 20 人に、 β -カロテンを 3 週間、60 mg の日用量で投与すると、LDL の酸化を正常化し、アテローム性動脈硬化の進行を遅らせた報告 [13] などから、 β -カロテンは、2 型糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病の発症に対して予防効果を持つ可能性があると考えられる。一方で、2012 年 6 月までの期間を対象に 6 つのデータベースから 50 報の無作為化比較試験をまとめたメタアナリシスの結果では、ビタミン A や β -カロテンを含む抗酸化物質のサプリメント摂取は心血管疾患 (心筋梗塞、狭心症、脳卒中、一過性虚血発作) の発症および心血管関連死のリスクに影響を与えなかった [14] というネガティブな結果もある。そのため、一概に β -カロテンの摂取が人体に好影響であると断言はできない。現在、カロテノイド過剰症のメカニズムに関しては、明らかになっていない部分が多いため、 β -カロテンを含むカロテノイドの脂肪肝や動脈硬化関連疾患などの安全性や有効性の評価系が必要であるが、ヒト研究では安全性の検証は難しく、また動物実験ではげっ歯類の β -カロテンの代謝が、ヒトとは大きく異なるために、ほとんど行われていなかった。

上記の先行研究を受け、1 章では、ヒトに近いカロテノイド代謝をすることで知られ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[15]。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。例えば、白色脂肪細胞の発生や代謝に重要な遺伝子のDNAメチル化に対するビタミンの影響を調べた先行研究では、 β -カロテン投与を投与すると、遺伝子発現に影響を与えずに、*Rbp4*の低メチル化と*Pcna*プロモーターの異なるCpGでの高メチル化が観察されることが報告されている[16]。ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)および内皮前駆細胞(EPC)に β -カロテンまたはアラキドン酸を添加し培養すると、ヒト臍静脈内皮細胞でConnexin43(CX)遺伝子プロモーターのCpGアイランドのメチル化を変化によって血管新生遺伝子発現を媒介する可能性が示唆されている[17]。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はまだ明らかになっていない。そこで、2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検討した。

一章 β -カロテン過剰摂取によるスナネズミの肝臓における高脂肪・高シヨ糖食誘発性線維化の増悪

序論

カロテノイドは、食品の着色に使用される天然添加物であり、体内でビタミン A 及び抗酸化物質として作用することにより、健康維持に重要な役割を果たすと考えられている。カロテノイドのうち、 α 、 β 、 γ -カロテンと β -クリプトキサンチンは体内でビタミン A に変換されるため、プロビタミン A と呼ばれる。 β -カロテンは体内でビタミン A の不足時に容易にビタミン A に変換されると考えられている。しかし、リコピン、ルテイン、アスタキサンチンなどのカロテノイドはビタミン A に変換されないため、ビタミン A 過剰症を発症するリスクは低い。 β -カロテンを含むカロテノイドは、一重項酸素[8]などの活性酸素種を除去することができ、肝臓及び脂肪組織に蓄積することができるため、脂肪が豊富な組織における酸化的損傷を効率的に予防することができる[9]。しかし、 β -カロテンはサプリメントの形で大量に摂取することができるため、体内の脂肪組織に蓄積し、他の脂溶性食品成分と同様に、過剰に存在すると何らかの疾患を引き起こす可能性がある。 β -カロテンは *in vitro* で DNA 中の変異原性付加物 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine を誘導する報告があり[18]、培養細胞を用いた研究では、酸化した β -カロテンがヒト包皮線維芽細胞 Hs 68 細胞において DNA 損傷を誘導することが明らかとなっている[19]。また、オーストラリアの 25 歳以上の成人を対象とした横断研究において、血清中カロテノイド濃度(α 、 β 、 γ -カロテン、 β -クリプトキサンチン、リコペン、ルテイン)は、耐糖能異常や 2 型糖尿病の有病率と逆相関することが示されている[20]。さらに、胃癌リスクとカロテン摂取との関連性を評価した 13 の研究のメタアナリシスでは、 α -及び β -カロテンの摂取と癌の発生率が負に関連することが示されている[21]。一方で、50 件の無作為化比較試験を要約したメタアナリシスは、心血管疾患(心筋梗塞、狭心症、脳卒中、及び/又は一過性虚血)の被験者において様々な種類のビタミン及び β -カロテンを含む抗酸化物質のサプリメントの摂取がその後の発症及び血管疾患関連死のリスクに影響しないことも報告されている[14]。加えて 9 件の無作為化比較試験を含む 13 件の研究のシステマティックレビュー及びメタアナリシスでも、 β -カロテンのサプリメント(20~30 mg/日)の摂取が喫煙者及びアスベストを扱う労働歴のある人の肺癌又は胃癌の発生率を増加させることが示された[22]。これらのデータは、 β -カロテン摂取が代謝性疾患又は癌の予防に必ずしも有効ではないことを示している。したがって、 β -カロテンを含むカロテノイドの摂取は、患者の生活や疾患の種類、進行の度合いによって異なる影響を及ぼす可能性があり、それに応じて至適用量及び耐容上限量が異なる可能性がある。したがって、 β -カロテンの有効性と安全性及び各ライフステージと各疾患ステージでの最適用量について動物モデルを用いて検討する必要がある。

生活習慣病の動物モデルでの、食餌中の β -カロテン摂取の有効性と安全性に関する研究はほとんど行われていない。これは、マウス及びラットでは、ほとんどの β -カロテンがビ

タミン A に変換されるためである[23]。例えば、 β -カロテン 2 g/kg 体重をラットに 14 日間投与したときの血清 β -カロテン濃度は $7.9 \pm 0.9 \mu\text{g/L}$ であり、血中のベータカロテン濃度は、摂取量と比較して顕著に低かった。一方で、成人男性に β -カロテン 2.65 mg を単回投与したときの血清中 β -カロテン濃度は $219 \pm 4.2 \mu\text{g/L}$ であり、ラットにおける濃度はヒトの 5%未満であった[23]。上記のラットとヒト得られた投与量を、体重換算で比較してみると、ラットに投与した β -カロテンの用量は、ヒトに投与した用量の約 5,400 倍であった。上記の研究成果は、ラットは、 β -カロテンの有効性および安全性を評価する動物として適していないことを示している。これまでにヒトと同様に肝臓に β -カロテンを効率的に蓄積するモデル動物として Mongolian gerbils(スナネズミ)を用いて、多くの研究が実施されている。スナネズミに β -カロテンを 0.36 g/kg 体重の飼料で 31 日間投与すると、肝臓に $24.2 \pm 9.4 \mu\text{g}$ ($45.1 \pm 17.5 \text{ nmol}$) の β -カロテンが蓄積されることが報告された[15]。スナネズミ(体重 100 g) が 1 日当たり 0.36 g/kg 体重の飼料で β -カロテンを含む飼料を 5 g 摂取した場合、 β -カロテン摂取量は 0.018 g/kg 体重に相当し、これは先にラットに投与した量(体重 2 g/kg) の 1/100 未満である。しかし、これらの研究で使用した β -カロテンの用量は、ヒトのサプリメントで使用される β -カロテンの最高濃度より顕著に高く、その投与期間は比較的短かった。加えて、スナネズミは 8 か月間の高脂肪/高シヨ糖食の摂取で脂肪肝を発症することが報告されている[24]。しかし、脂肪肝スナネズミにおける β -カロテン投与の脂肪肝を含む代謝性疾患に対する効果と安全性を評価した研究はない。そこで本研究では、2 種類の異なる濃度、具体的には、一般的な摂取量とほぼ等しい 0.001%(0.01 g/kg diet) 又は上記の摂取量とほぼ等しい、0.004%(0.04 g/kg diet) を含有した高脂肪/高シヨ糖餌料を 91 日間(13 週)摂取したスナネズミにおいて、 β -カロテンの効果と安全性を血液および肝臓中の生化学的パラメータと、肝臓の病理評価によって検討した。さらに、肝臓組織の線維化と線維化の促進に関与する炎症性タンパク質[Interleukin(IL) -18 と Matrix metalloproteinase(MMP) -9]量を測定した。

<材料と方法>

動物

日本 SLC(Shizuoka, Japan) から購入した 5 週齢の雄スナネズミに通常食(N)である AIN-93M を 1 週間与えた(Table 1(B))。10 週齢時に 12 時間空腹時グルコース値と体重に差がないように、4 群[通常食(N)、高脂肪/高シヨ糖食(対照 C)、低用量(0.001 wt%) のカロテンを含む高脂肪/高シヨ糖食(LC)、高用量(0.004 wt%) のカロテンを含む高脂肪/高シヨ糖食(HC)]に分けた(Table 1(A)(B))。スナネズミは飼育期間を通して食餌及び水を自由摂取させた。飼育室は、安定した温度(23±2°C)、湿度(55±10%) 及び 12 時間の明暗サイクル(明:06:00~18:00 時間) で維持された。試験飼料は 1 週間ごと、空腹時血糖値は 4 週ごとに測定した。試験食開始後 12 週目の 22 週齢時に、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を実施した。この試験では、グルコース負荷 (2g/kg 体重) 後、0、15、30、60、90、120 分にスナネズミの尾静脈から採血を行った。23 週目にスナネズミを剖検し、頸動脈から血清試料、腸間膜及び副睾丸脂肪組織と肝臓を採取した。

Table 1 Composition of the experimental diets and calorie

(A) Control diet, Low β -carotene diet, High β -carotene diet				(B) Normal diet	
Ingredient	Control diet (C)	Low β -carotene diet (LC)	High β -carotene diet (HC)	Ingredient	Normal diet (N)
	%	%	%		%
Casein	19.82	19.82	19.82	Corn starch	46.57
L-Cystine	0.30	0.30	0.30	Milk casein	14.00
β -Cornstarch	3.75	3.75	3.75	α -corn starch	15.50
α -Cornstarch	1.25	1.25	1.25	Granulated sugar	10.00
Sucrose	34.00	34.00	34.00	Soybean oil	4.00
Soybean oil	1.00	1.00	1.00	Cellulose	5.00
Cellulose	5.00	4.9990	4.9960	AIN-93 mineral mix	3.50
AIN-93 vitamin mix	1.00	1.00	1.00	AIN-93G vitamin mix	1.00
AIN-93G mineral mix	3.50	3.50	3.50	L-Cystine	0.18
Choline Bitartrate	0.25	0.25	0.25	Coholine Bitartrate	0.25
Tertiary butyl hydroquinone	0.0042	0.0042	0.0042	Tertiary butyl hydroquinone	0.0008
milk fatty acid	20.00	20.00	20.00		
Malt dextrin	9.98	9.98	9.98		
cholesterol	0.15	0.15	0.15		
β -caroten		0.001	0.004		
Anaglipitin					
Total	100.00	100.00	100.00	Total	100.00
Calorie(kcal/100g)	465.4	465.4	465.4	Calorie(kcal/100g)	381
energy %				energy %	
Protein	17	17	17	Protein	15
Fat	41	41	41	Fat	9
Carbonate	42	42	42	Carbonate	76
Total	100	100	100	Total	100

生化学的パラメータ

血漿中グルコース濃度は市販キット (Rebisu Insulin Rat ELISA Kit; Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan) を用いて測定した。血清トリグリセリド、総コレステロール、及び高密度リポ蛋白質(HDL) - コレステロールを、Assay Kit(tri acylglycerol E-test, cholesterol E-test;

HDL-cholesterol E-test, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した。Glutamic Oxaloacetic Transaminase(GOT) と Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT) はトランスアミナーゼ C II テストキット(Wako Pure Chemical Industries)を用いて測定した。 β -カロテン濃度は、Nikken Seil Co. Ltd. (Tokyo, Japan) に委託し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定された。具体的には、肝臓試料を 0.1%ブチル化ヒドロキシトルエン含有 100%メタノール中で 30 回ホモジナイズした後、ホモジネートを 21,900 g、4°Cで 20 分間遠心分離し、上清を回収して-80°Cで保存し、各試料 200 μ L を α -トコフェロール酢酸エステル 200 μ L でボルテックスし、n-ヘキサン 800 μ L を添加した。2,300 g で 2.5 分間遠心分離後、n-ヘキサン層を分取し、エバポレーターで乾燥した。残渣に酢酸エチル 20 μ L 及びエタノール 105 μ L を加え、ダイオードアレイ (0 min, 325 nm; 6.3 min, 455 nm; 30.0 min, 455 nm) 検出器及び蛍光 (excitation wave length 295 nm/emission wavelength 335 nm) 検出器を用いたシグナル検出器付き HPLC (Wakosil-II 5C18) を用いて溶出した。

肝切片の組織染色

肝臓の病理標本の作成は、New Histro. Science Laboratory Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) に委託した。それぞれの飼料を与えたスナネズミからの肝臓試料を 10%ホルマリンリン酸緩衝液に固定し、パラフィン切片を生成するために処理した。その後、切片をオイルレッド O 及びアザン染色し、位相差顕微鏡 (Olympus CX41, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて肝臓中の脂肪滴とコラーゲン繊維を染色した。米国国立衛生研究所 (Bethesda, MD, USA) で開発された Image J プログラムを用いて、アザン染色とオイルレッド O 染色の陽性領域を数値化した。同一条件(diaphragm, optical source, and magnification) で得られた全画像試料について、アザンにより染色された青色領域とオイルレッド O により染色された赤色領域を抽出・測定し、これらのシグナルを平均化し評価した。

Western blotting によるタンパク質分析

Western blotting のために、N 群の 3 つのサンプル、C 群の 4 つのサンプル、LC 群の 4 つのサンプル、HC 群の 4 つのサンプルをランダムに選択した。肝細胞溶解液を、組織ホモジナイザー処理で定期的に使用されている、プロテアーゼ阻害剤錠(cOmplete™, Miniプロテアーゼインヒビターカクテル, Merck group, Darmstadt, Germany) を含有する Radioimmunoprecipitation assay buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 mM tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, and 150 mM NaCl) にホモジナイザー(Digital Homogenizer, As One, Osaka, Japan) を用いて 20 回ホモジナイザー処理し、17,800 g、4°Cで 30 分間遠心分離して上清を回収し、Lowry 法で総タンパク質量を測定し、それぞれの濃度を 8.5 μ g とした。蛋白質を 10% SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Immobilon メンブレン(Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。0.05% Tween - 20 と 0.5 M NaCl pH 7.4(PBS - Tween - NaCl) を含むリン酸緩衝生理食塩水中の

10%脱脂乳で1時間膜をブロックした。次にメンブレンを10%脱脂乳含有 PBS - Tween - NaCl 中で抗 MMP - 9 又は抗 Interleukin(IL) -18 (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Aichi, Japan) 一次抗体と 4°Cで12時間以上培養した。PBS-Tween-NaCl で洗浄した後、二次抗体としてビオチン(GE Healthcare, Chicago, IL, USA) 標識抗ウサギ免疫グロブリン G con 又は抗マウス免疫グロブリン G con を用いて3%脱脂乳含有 PBS-Tween-NaCl 中で培養した。PBS-Tween-NaCl でさらに洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ビオチン3次抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) と培養した後、発光画像分析装置(ChemiDog™, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた化学発光(ECL Plus; GE Healthcare) により陽性シグナルを検出した。

統計解析

データは平均値±標準誤差(SEM)で示した。2群間の差(N対C)をStudentのt検定で解析し、3群間の差(C、LC、HC)を一元配置解析後にTukey-Kramer検定を実施し解析し、 $p<0.05$ の値を有意とみなした。

結果

組織量及び血液生化学的パラメータに与えるβ-カロテン摂取の影響

基本的なパラメータを Table 2 に示す。試験食開始後 4 及び 8 週間後の空腹時血糖値は N 群に比べ C 群で高かった。体重、肝重量、総エネルギー摂取量、定常時血糖及び総コレステロールの血清濃度は、N 群の剖検と比較して C 群で大きかった。剖検時の副睾丸脂肪量、腸間膜脂肪量、総食餌摂取量、1 日当たりの食餌摂取量、HDL - コレステロール、トリグリセリド、及びインスリンの血清濃度、及び GOT と GPT の血清活性は、N 群と C 群の間で試験終了時に差がなかった。β-カロテンの有無にかかわらず、高脂肪/高ショ糖食を摂取した群の間で、総コレステロールと血清トリグリセリド濃度は C 群と比較して HC 群で大きかった。HDL - コレステロール濃度は群間で異ならなかった。GPT 活性は、C 群及び HC 群と比較して LC 群で有意に高かった。肝臓 β-カロテン含量は C 群で 0.25 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$, LC 群で 4.15 ± 0.85 $\mu\text{g/g}$, HC 群で 25.4 ± 8.9 $\mu\text{g/g}$ であり、C 群及び HC 群より HC 群で高かった。

OGTT は試験飼料を 12 週間与えた後に行った。空腹時血糖値は N 群に比べ C 群で高かった。グルコース負荷後の血中グルコース濃度は C 群、LC 群、HC 群の間で差がなかった。

Table 2 Body weight, tissue weights, levels of blood biochemical parameters in Mongolian gerbils fed a diet containing β-carotene

Groups	N	C	LC	HC
Body weight* ¹ (g)	75.5 ± 13.7	90.6 ± 14.5 *	89.3 ± 12.9	99.7 ± 18.0
Body weight * ²	15.2 ± 12.3	28.7 ± 10.0 *	30.6 ± 11.9	38.2 ± 15.3
Liver weight (/10g body weight)	0.34 ± 0.03	0.40 ± 0.05 *	0.43 ± 0.09	0.48 ± 0.14
Epididymal fat weight (/10g body weight)	0.15 ± 0.08	0.21 ± 0.09	0.23 ± 0.09	0.29 ± 0.09
Mesenteric fat weight (/10g body weight)	0.04 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.04
Total food intake (g)	363.1 ± 43.7	373 ± 28.6	367.4 ± 31.8	404.8 ± 37.4
Total calories intake (kcal)	1383 ± 166	1736 ± 133 *	1710 ± 148	1884 ± 174
Food intake (g/day)	3.99 ± 0.48	4.10 ± 0.31	4.04 ± 0.35	4.45 ± 0.41
Fasting blood glucose level at 4 week (mg/dL)	84.4 ± 10.7	100.0 ± 16.3 *	98.8 ± 12.5	103.3 ± 12.1
Fasting blood glucose level at 8 week (mg/dL)	82.8 ± 6.5	99.5 ± 6.8 *	91.8 ± 7.2	91.5 ± 20.4
Nonfasted blood glucose level(mg/dL)* ³	117.7 ± 13.2	123.3 ± 10.6	128.1 ± 30.5	122.6 ± 23.0
Total cholesterol level (mg/dL)* ³	55.4 ± 12.1	110.2 ± 7.7 *	211.5 ± 30.5	243.1 ± 37.9 #
HDL-cholesterol level (mg/dL)	60.8 ± 11.1	60.1 ± 3.7	77.6 ± 4.8 #	60.3 ± 4.6
Serum triglyceride level	196.1 ± 51.2	201.9 ± 24.2	364.6 ± 67.9	420.9 ± 66.0 #
Plasma insulin level (mg/dL)	705.4 ± 120.7	938.7 ± 107.0	1834 ± 699.2	2611 ± 670.9
Glutamic oxaloacetic transaminase(IU/L, 25°C)	153.3 ± 13.9	140.1 ± 6.3	158.9 ± 9.3	168.4 ± 11.1
Glutamic pyruvic transaminase(IU/L, 25°C)	49.5 ± 3.3	52.6 ± 3.9	124.7 ± 27.6 #	85.3 ± 18.0

Values are indicated as mean ± SEM of 7-8 animals.

*¹ indicates the body weights at the dissect

*² indicates weight gain at the dissect from feeding the test diets

*³ indicates blood levels at the dissect

Abbreviations: N, group fed a normal diet (AIN93G diet); C, group fed a control diet (high-fat, high-sucrose diet), LC, group fed a low β-carotene diet, HC, group fed a high β-carotene diet

*, p<0.05, significant difference N vs C(student's t-test). #; p<0.05, significant differences C vs LC or HC(Dunnet test).

肝臓における脂肪蓄積と線維症に対するβ-カロテンの効果

オイルレッド O 染色及びアザン染色の結果を Fig. 1 に示す。オイルレッド O 染色は、脂

脂肪滴により生じる容量が N 群と比較して C 群で大きいことを示した。脂肪滴は C と LC、HC 群の間で有意差はなかった ($p=0.069$, Fig.1 A)。アザン染色は、C 群と N 群の間で血管周囲の線維により占有される領域に有意差を示さなかった。しかしながら、血管周囲の線維量は、HC 群で LC 群と比べ大きかった (Fig.1 B)。

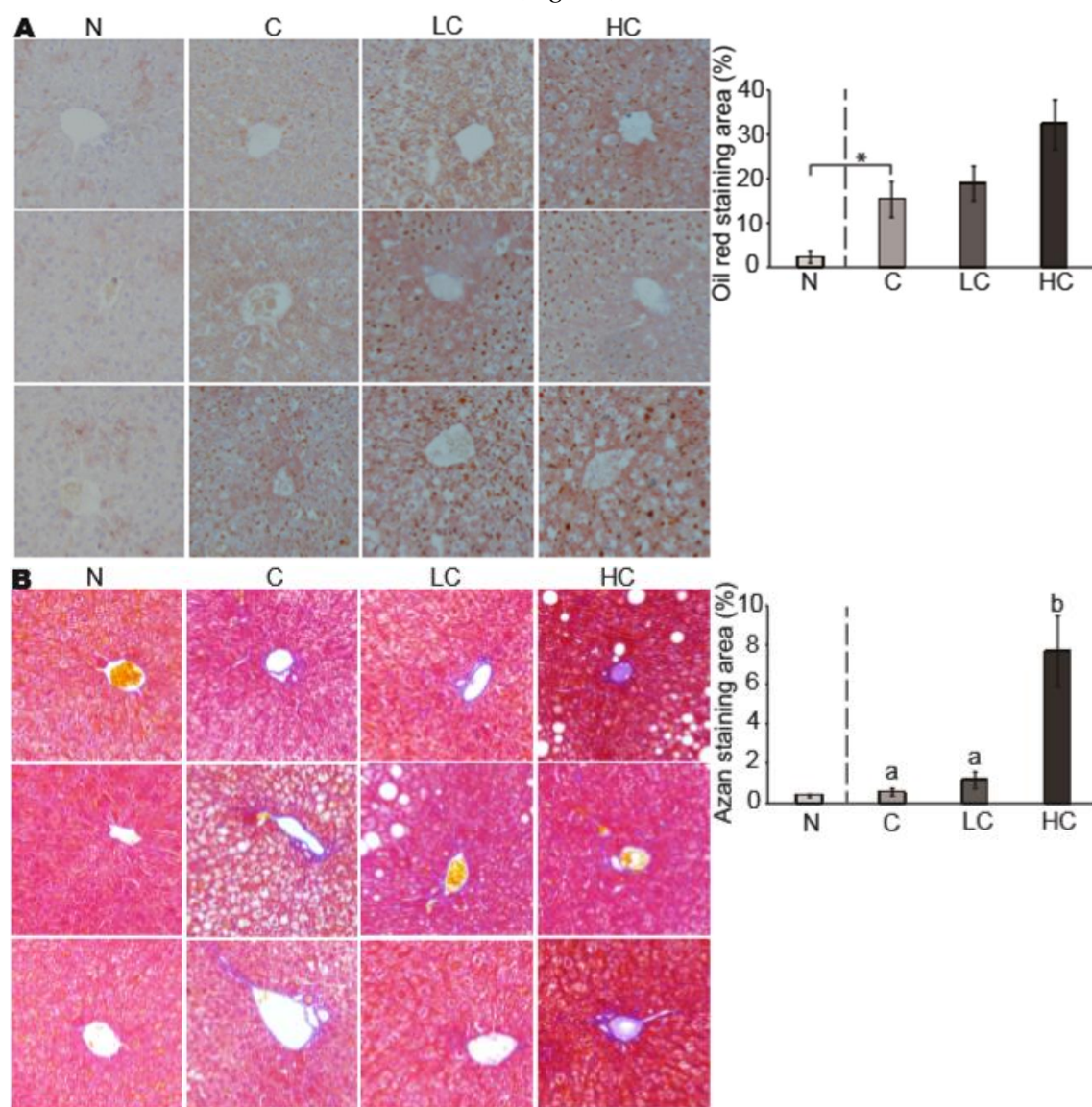


Fig.1. Lipid deposition and fibrosis in the liver of Mongolian gerbils fed a high-fat/high-sucrose diet \pm β -carotene

Normal diet (N), high-fat/high-sucrose diet (C), high-fat/high-sucrose diet containing carotene at a low dose (0.001% by mass) (LC) or high-fat/high-sucrose diet containing carotene at a high dose (0.004% by mass) (HC). A) Oil red O staining. B) Azan staining.

Original magnification $\times 400$. Oil red O and Azan staining were quantified using Image J software. Values are means \pm SEM (n=7-8).

Different letters indicate significant differences among groups (by one-way ANOVA and post-hoc Tukey-Kramer test ($P < 0.05$)). *

significant difference N vs. C by Student's t-test ($P < 0.05$).

肝臓における炎症性タンパク質発現に対する β -カロテンの効果

肝臓における MMP-9 及び IL-18 タンパク質発現量を Fig. 2 に示す。肝臓における MMP-9 タンパク質発現量は C 及び LC 群と比較して HC 群で高かったが、IL-18 発現は β -カロテンの有無にかかわらず高脂肪/高ショ糖食を与えた群間で差は観察されなかった。

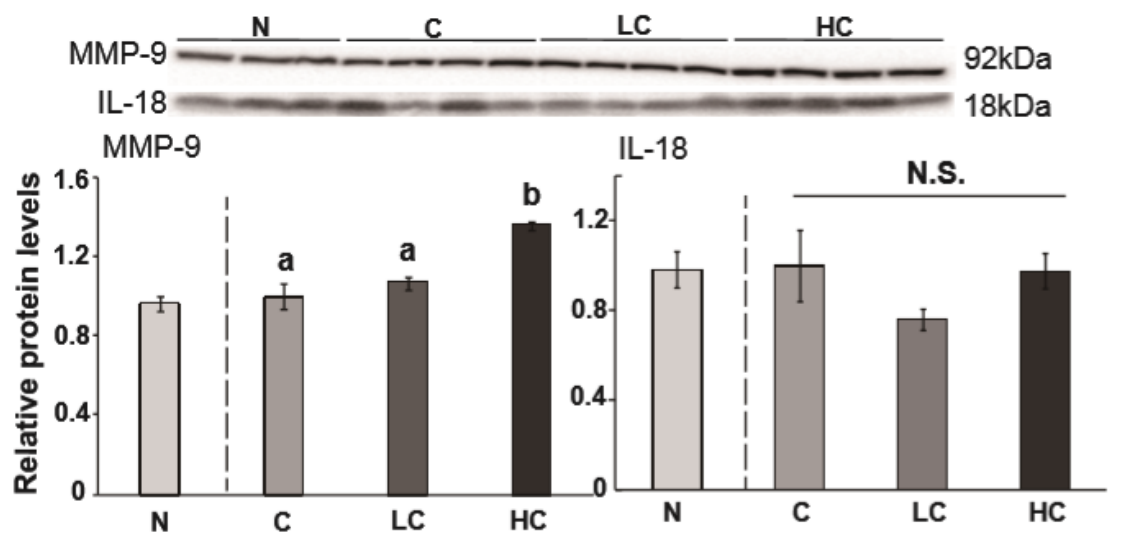


Fig.2. Western blotting analysis of MMP-9 and IL-18 protein expression in the liver of Mongolian gerbils fed a high-fat/high-sucrose diet \pm β -carotene

Normal diet (N), high-fat/high-sucrose diet (C), high-fat/high-sucrose diet containing carotene at a low dose (0.001% by mass) (LC), or high-fat/high-sucrose diet containing carotene at a high dose (0.004% by mass) (HC). Values are means \pm SEM (n=7-8). Different letters indicate significant differences among groups (by one-way ANOVA and post-hoc Tukey-Kramer test; $P < 0.05$).

考察

本研究では、高脂肪/高シヨ糖食に 0.001%又は 0.004%の β -カロテンを添加した食餌を摂取させたスナネズミに対する比較的長期の β -カロテン投与による有効性と安全性を評価した。脳血管疾患などの代謝性疾患を対象とした過去の介入試験では、ヒトに β -カロテンを 20~60 mg/日で投与している[12, 21, 25]。そこで、本研究では基準値として 30 mg β -カロテン/日を選択した。体重 100 g のスナネズミが 1 日に 0.001 %又は 0.004 %の β -カロテンを含む餌を 5 g 摂取すると、 β -カロテン摂取量は 0.05 mg 又は 0.2 mg/100 g 体重であった。これはヒトでは 30 mg/60 kg 体重及び 120 mg/60 kg 体重に相当する。本研究では、スナネズミの肝臓における β -カロテンの実質的な蓄積を示し、この蓄積は用量依存的であった。Ahmad Sulaeman らの研究では、0.036 g/kg の β -カロテンを含む飼料を 4 週間摂取したスナネズミの肝臓の β -カロテン含量は $7.91 \pm 2.48 \mu\text{g}$ であったことが報告されている[26]。本研究では、スナネズミに 10 週間の 0.04 g/kg の用量で β -カロテンを含む食餌を投与すると肝臓中の β -カロテンの蓄積量が、 $25.8 \pm 2.48 \mu\text{g}$ の値になることを示した。先行研究と比較して、本研究で肝臓中の β -カロテンの含有量が高かった理由は、本研究では β -カロテン食の摂取期間が先行研究よりも長く、また本研究の食餌組成が以前の研究よりも脂質を多く含んでいたことに起因する可能性がある。カロテノイドは油脂と同時に摂取することによって吸収効率が上昇することが報告されている[27]。先行研究と本研究を総合すると、スナネズミはヒトのように食事の組成や投与期間に応じて β -カロテンを蓄積するモデルであることが明らかとなった。

本研究では、 β -カロテンを多く含む食餌の摂取による生化学パラメータの有意な変化は見られなかった。しかしながら、対照群 (C) と高カロテン群 (HC) を比較すると体重、体重増加量、解剖時肝臓重量が、多い傾向を示した。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。一方で、試験食開始後 12 週における経口グルコース負荷試験では、有意差こそ付かなかったが 15 分値以降で、対照群 (C)、低カロテン群 (LC) に比べ高カロテン群 (HC) で高い値を示した。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。これは、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。

動物における脂肪性肝炎として線維化を診断する基準は決定されていない。そのため、アザン染色で測定したげっ歯類の肝臓の線維化を示した多くの過去の試験では、特別食群と対照食群との比較により評価しており[28-31]、本試験も同様に、 β -カロテンを含む高脂肪/高シヨ糖食を与えたスナネズミにおける線維化を、 β -カロテンを含まないものと比較して評価した。今後、スナネズミにおける線維化がヒトにおける脂肪性肝炎においてどの程度参考となるか調査する必要がある。

近年の研究では、炎症性サイトカインが肝臓の線維症の発症に関与することが報告され

ている。炎症性サイトカインのうち、IL-18 は肝線維化の発症に関連していることが報告されている。例えば、高脂肪食を摂取させたラットでは、肝臓の *IL-18* 遺伝子発現量が増加すること [32]、脂肪変性を有する肝細胞は IL-18 タンパク質を分泌すること [33]、*IL-18* の遺伝的欠損はマウスの脂肪蓄積と肝臓年齢を低下させること [34] が報告されている。加えて、MMP は肝臓において保護効果を有する。過去の研究では、胎盤抽出物投与マウスによる線維化の改善は MMP-9 の発現低下と密接に関連することが報告されており [35]、MMP-9 は肝臓の線維症の進行のマーカールであると考えられている。そこで本研究では、 β -カロテンを摂取させたスナネズミの肝臓における IL-18 及び MMP-9 の発現に焦点を当てた。本研究では、肝臓における IL-18 タンパク質発現は、スナネズミに β -カロテンの有無にかかわらず高脂肪/高シヨ糖食を与えても変化しなかった。しかし、高 β -カロテン含有高脂肪/高シヨ糖食を摂取させたスナネズミでは、 β -カロテン非含有食を摂取させたスナネズミと比べてタンパク質発現が高かったが、通常食群 (N) と高脂肪/高シヨ糖群 (C) の間に差はなかった。MMP-9 は、炎症反応の一部として肝臓に蓄積するコラーゲンの分解に関与するコラーゲン分解酵素である [36]。NASH 患者の血漿中 MMP-9 値は健康被験者よりも高いことが示され [37]、71%脂肪含有食(w/w) を摂取したラットは高い肝臓中 MMP-9 発現を示した [38]。本研究では、13 週間の高脂肪/高シヨ糖食摂取は肝臓の炎症と線維症を誘発しなかったが、 β -カロテンを添加した群でこれらの病理の発症を引き起こすことを示した。これは β -カロテンにより、他の分子が酸化されたことに起因する可能性があるが、この機構が存在するのか、また β -カロテンの酸化が *in vivo* で NASH を誘導するかどうかは今後検証する必要がある。

NASH 患者は肝硬変及び肝細胞癌 [39] を発症しやすいことが報告されている。肝硬変を有する患者の血清中 MMP-9 濃度は、健康被験者よりも高く [40]、また血清 MMP-9 と MMP-2 の比は、肝細胞癌を伴う慢性 B 型肝炎患者において、健康人よりも高かった [38]。これらの結果は、スナネズミの肝臓における MMP-9 タンパク質発現の増加と過剰な β -カロテン摂取が肝硬変と肝細胞癌発症のリスク増加をもたらす可能性を示唆している。過剰な β -カロテンと高脂肪/高シヨ糖食の摂取について肝硬変や肝細胞癌を誘発するか、また肝臓や血清中の MMP-9 と肝硬変や肝細胞癌との関連性についても更なる検討が必要である。今後の研究では、これらの炎症性サイトカインが肝線維症の発症と関連するかどうかを検討する必要がある。

さらに過剰な β -カロテン摂取によってスナネズミで誘発された肝線維化発症のメカニズムが、ヒトにおいても同様かどうかは不明である。また、スナネズミの通常食における過剰な β -カロテン摂取の影響は評価していない。加えて、スナネズミのゲノムはほぼ調べられていない現状があるため、mRNA 発現パターンの解析にスナネズミを用いることには限界がある。しかしながら、この研究では、 β -カロテンの長期過剰摂取は、ヒトがサプリメントで摂取する量と同等であっても、肝臓で炎症と線維症を誘導することを示した。スナネズミによる過剰な β -カロテン摂取の影響をさらに特性化するために、用量の影響を特定の期

間試験をすることで検討する必要がある。

結論として、本章では、13週間の過剰な β -カロテン摂取が、スナネズミにおける高脂肪/高シヨ糖食誘導性肝線維症を悪化させることを示した。この結果は、スナネズミが肝線維症に関連するものを含む肝損傷の機序を決定するための適切なモデルであることを示唆する。

2章 β -カロテンは、幼若マクロファージ様 THP-1 細胞において、炎症関連遺伝子の発現と、これらの遺伝子周辺のヒストン H3 K9 アセチル化、K4 ジメチル化、K36 トリメチル化を促進する

序論

近年の研究で、虚血性心疾患、不整脈、及び高血圧を含む心血管疾患進行の基礎となる発症機序の 1 つが、単球及びマクロファージを含む先天性白血球によるアテローム性動脈硬化症の形成であることが示唆されている[41]。マクロファージは炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの分泌を誘導することが知られており、細菌感染又は損傷を受けた血管壁及び組織に単球などの白血球を動員することによって免疫応答を増幅する[42]。加えて、Interleukin(IL) - 1β 及び腫瘍壊死因子(TNF) - α のような自然白血球から分泌される炎症性サイトカインによって活性化される血管内皮細胞は、血管細胞接着分子(VCAM) -1、細胞内接着分子(ICAM) -1, P-selectin や E-selectin のような多くの細胞表面接着分子を発現する。したがって、単球の活性化は、血管壁への自然白血球の接着及び各組織への自然白血球の浸潤を促進する[43]。マクロファージの浸潤及び活性化によるアテローム性動脈硬化症の発生は、血管における酸化ストレスによって促進されることが報告されている[44]。単球が血管壁に浸潤すると、マクロファージに分化し、その一部がコレステロールを蓄積して血管壁の泡沫細胞に変化し、アテローム性動脈硬化症が進行する[45]。また、マクロファージの MMP-9 発現の調節が、炎症反応に影響を与える可能性があるメカニズムを示した先行研究もある[46]。最近の研究は、酸化ストレスと活性酸素種(ROS) の産生が単球とマクロファージを含む自然白血球の活性化に関与することを示唆している。例えば、過酸化水素で同時処理した幼若マクロファージ様 U 937 細胞における ROS の除去は、培地への TNF - α タンパク質分泌及びこれらの細胞における脂質過酸化値を減少させた研究成果が報告されている[47]。これら報告は、高血糖により誘導される ROS が単球及びマクロファージのような内在性の白血球の活性化及びこれら細胞での炎症性サイトカイン発現の増強に関わることを示している。

天然食品着色料であるカロテノイドは、身体にビタミン A と抗酸化物質を提供することにより健康維持に重要な役割を果たすと考えられている。カロテノイドのうち、 α -、 β -、 γ -カロテン、 β -クリプトキサンチンは体内でビタミン A に変換されるため、プロビタミン A と考えられている。リコピンやルテインなどのカロテノイドはビタミン A に変換されないため、一般に微量栄養素の過剰摂取は副作用を引き起こす可能性がある。カロテノイドの中には、ビタミン A に変換されやすい β -カロテンを含む食品が多数あるが、この変換は体内のビタミン A 量が不足したときに生じるため、 β -カロテンの摂取によってビタミン A の過剰障害が生じるリスクは低いと考えられている。加えて、 β -カロテンを含むカロテノイドは、一重項酸素のような ROS を除去するため、生活習慣病を含む多くの疾患を抑制する利点を有すると考えられている[8]。 β -カロテンは酸化されるとラジカルを生成し、酸化障

害を誘発する[10]。さらに、2型糖尿病患者(n=20)にβ-カロテン60mg/日を3週間投与したところ、低比重リポタンパク質の酸化が抑制され、アテローム性動脈硬化症の進行が抑制された報告から[13]、β-カロテンは糖尿病患者のアテローム性動脈硬化症の発症を予防する効果がある可能性が考えられている。しかし、β-カロテンはサプリメントからの摂取が容易であること、脂溶性物質として体内に蓄積すること[9]から、β-カロテンの過剰摂取には注意が必要である。実際に、心血管疾患(心筋梗塞、狭心症、脳卒中など)を有する被験者を対象としてビタミン及びβ-カロテンを含む抗酸化物質のサプリメント摂取の効果を検討した50件の無作為化対照試験を要約したメタアナリシスでは、その後の血管関連死イベントやリスクに好影響は認められなかったという報告がある[14]。2014年に実施された1312人の男性と1544人の女性を対象とした国民健康及び栄養データを用いたの横断的試験では、炎症増大を示すC反応性タンパク質(CRP)濃度がβ-カロテン量摂取量及び血清β-カロテン濃度と正に相関することが報告されている[48]。CRPは肝臓から放出される炎症関連タンパク質であり、CRP濃度の上昇は脂肪肝又は肝損傷の発症と関連することも報告されている[49]。したがって、β-カロテンのサプリメントの過剰摂取は、糖尿病患者のアテローム性動脈硬化を増強する可能性がある。RW264.7マクロファージを用いた*in vitro*実験において、2μMのβ-カロテンは発癌物質phorbol 12-myristate 13-acetateで刺激した細胞の炎症反応を減少させたが、20μMのβ-カロテン処理はリポ多糖類刺激細胞においてIL-8とTNF-αの発現上昇を誘導したことが報告されている[50]。しかし、高血糖由来マクロファージ又は単球における炎症性サイトカインの発現がβ-カロテン投与により抑制又は促進されるかどうかは明らかではない。

近年2型糖尿病やその合併症などの生活習慣病の発症に関与する遺伝子発現の変化が、特定の生活習慣因子が長期的に継続されることによって引き起こされることが、クロマチンのインプリンティングに関連づけられて明らかになってきた。例えば、United Kingdom Prospective Diabetes Studyでは、強化グルコース療法を受けた2型糖尿病患者は、従来の食事療法を受けた患者よりも微小血管合併症の発症リスクが低かった。また10年間の追跡調査研究では、糖尿病の初期にHbA1cを標的とした強化血糖コントロールを開始した患者で、標準的な治療を受けた患者と比較して、糖尿病合併症の発生率が低く、心筋梗塞及び全死因死亡のリスクが有意に低いことが示された[51]。身体が記憶している治療の効果は、レガシー効果として知られている。レガシー効果は長期間にわたって持続する体内の記憶であると考えられ、これらの効果はDNAメチル化やヒストン修飾のようなエピジェネティックメモリーとしてクロマチンに記憶される可能性が考えられている。例えば、高グルコース環境下でマクロファージは、IL-6、IL-12p40、マクロファージ炎症性タンパク質-1α(MIP-1α)、及びMIP-1βなどの炎症性サイトカインの発現を増加させ、これらの遺伝子の誘導はこれらの遺伝子周辺のヒストンH3リジン9(K9)トリメチル化値の低下と関連していることが報告された[52]。

β-カロテンに関して、哺乳期間中にβ-カロテンを投与されたラットの白色脂肪組織に

において、CpG プロモーター/enhancer of retinol binding protein 4 (*Rbp4*) の低メチル化と *Pcna* プロモーターの高メチル化が観察されたとの報告があり[16]、さらに β -カロテンとアラキドン酸で 24 時間培養したヒト臍静脈内皮細胞で Connexin43(*CX*) 遺伝子プロモーターの CpG アイランドのメチル化を変化させたことも報告されている[17]。しかし、高グルコース条件下で β -カロテンで処理したマクロファージ様細胞における炎症性サイトカインの発現変化にヒストン修飾が関与するかどうかは不明である。本研究では、高血糖条件下での幼若マクロファージ様 THP-1 細胞への抗酸化食品成分 β -カロテンの投与が炎症関連及び抗酸化関連遺伝子の発現を変化させるかどうか、及びこれらの変化がこれらの遺伝子周辺のヒストン修飾の変化と関連するかどうかを検討した。

材料と方法

細胞培養 THP-1 細胞(ヒト単球性白血病細胞株)は、American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA) から提供された。細胞はインキュベーター(Forma Direct-Heat CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 内で、10%ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、抗生物質抗真菌混合原液(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、1 M HEPES(pH 7.4)、1%非必須アミノ酸、及び RPMI 1640 培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) とともに、10 mM グルコース、37°C、5%二酸化炭素、及び 95%大気圧で培養した。インキュベーション 10 日後、培地を低グルコース(5 mM) 含有 RPMI 1640 培地に交換した。5 日のインキュベーション後、細胞を低グルコース 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 群に分けた。 β -カロテンを DMSO に溶解し、細胞に投与した。培養 1 日後、総 RNA 及びクロマチン免疫沈降(ChIP) のため、各培地で培養した THP-1 細胞を回収した。

リアルタイム RT-PCR

3,300 \times g で 3 分間遠心分離して上清を除去した後、lysis solution(4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sodium N-laurylsarcosine, 0.1% 2-mercaptoethanol) を 500 μ L 分注して攪拌し、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。酸性化グアニジンチオシアネート法を用いて total RNA を抽出した[53]。Total RNA 試料 100 ng を SuperScript III 逆転写酵素(Invitrogen, Waltham, MA, USA) を用いて逆転写し、cDNA に変換した。mRNA 値の定量分析のため、Light - Cyclor Instrument System(Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany) を用いて qRT - PCR を行った。遺伝子特異的プライマー、cDNA、及び SYBR Green I Master(Roche Molecular Biochemicals) を用いて、qRT - PCR を実施した。qRT-PCR で測定した各遺伝子の CT 値を $\Delta\Delta$ CT 法に基づいて信号強度に変換した。 $\Delta\Delta$ CT 法では、CT 値の差を試料間の二倍の差として認識した

[54]。RNA 値は *TF2B* 値を用いて標準化した。プライマーの配列を Table 3 に示す。

Table 3. Sequences of oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Symbol	Sequence
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (#39)	<i>PFKFB3</i>	CAACAGCTTTGAGGAGCATGT GGGAGCCTTTCATGTTTTGT
Interleukin-31 receptor A (#33)	<i>IL31RA</i>	GGAAGGCAGAGTGCAGCTT GAAGGCTGGGAGAGAGAAT
Cluster of differentiation 38 (#61)	<i>CD38</i>	CCTCACATGGTGTGGTGAAT TTGCTGCAGTCCTTTCTCC
Neutrophil cytosolic factor 1B (#20)	<i>NCF1B</i>	CCTGCTGGCTTTGAGAA GACAGGTCCTGCCATTTCAC
Integrin alpha L (#5)	<i>ITGAL</i>	CTTGAAGGGGATGGCTTG CATCAGGGTGACCATATCCA
Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog (#45)	<i>FGR</i>	CATCAAGGACGATGAGTACAACC TTGATGGTGAATCTGCCAAA
Phospholipase C beta 2 (#42)	<i>PLCB2</i>	GGAGATGTCCAGCCTAGTCAA TGACATAACTTCGGTTCITTTGG
Transcription factor II B (#17)	<i>TF2B</i>	AATTGCCAAATTCGTCAAAACT GGAGATTTGTCTACCATGATTGG
Sulfatase 2 (#64)	<i>SULF2</i>	GTGACAGCGGGGACTACAAG CGACTGCGGACATAGCTG
Solute carrier family 43 member 2 (#44)	<i>SLC43A2</i>	CAAGTATGGCCCGAGGAAG GCAATCAGCAAGCAGGAAC
PML-RARA-regulated adapter molecule 1 (#19)	<i>PRAMI</i>	GCTGTATGACGATGTGGAACC AACTGAGGGCGCTTCATCT
Prosaposin (#66)	<i>PSAP</i>	GCTACTGGTGCCAGAACACA GTTTGCAATGCTCGACAGC
Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 (#18)	<i>LRG1</i>	CAGACAGCGACCAAAAAAGC GGAACACCTGGCAGTCTTTG
Colony stimulating factor 3 receptor (#18)	<i>CSF3R</i>	GTCCAAGATCACAAAGCTGGT CCGCACTCCTCCAGACTTC

The numbers in parentheses indicate the ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

mRNA マイクロアレイ解析

各群の 3 試料から全 RNA を抽出し、mRNA マイクロアレイ分析に使用した。各サンプルは乱数表を用いてランダムに選択した。総 RNA 100 ng を使用し cDNA 変換、標識等を、Gene ChIP® Poly-A RNA Control Kit, WT Amplification Kit, Gene ChIP® WT Terminal Labeling Kit(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて製造業者の指示に従って行った。ハイブリダイゼーション、洗浄及び染色は、Affymetrix® HuGene2.1 ST Array Strip 及び GeneAtlas® Hybridization Wash and Stain Kit for WT Assay Strips(Affymetrix) を用いて実施した。洗浄後、HuGene2.1 ST Array Strip を GeneAtlas Imaging Station(Affymetrix) を用いて分析した。データ解析は、Expression Console(Affymetrix)、Transcriptome Analysis Console(Affymetrix)、及び Excel(Microsoft) を用いて実施した。 β -カロテンにより増大が観察された検出遺伝子数が比較的少なく Pathway 解析ができなかったため、遺伝子の機能に関する公表文献を PubMed 検索を用いて、以下のカテゴリーに分類した(metabolism, immune response, signal transduction, protein synthesis, stress/apoptosis, transcription/chromatin, and unknown)。

クロマチン免疫沈降(ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは、以前に報告された論文を参考に実施した[88]。標的細胞を固定液(1% formaldehyde, 4.5 mM HEPES pH 8.0, 9 mM NaCl, 0.09 mM EDTA, and 0.04 mM EGTA) とともに培地中 37°C で 15 分間培養し、反応は最終濃度が 150 mM になるようにグリシンを添加して反応を停止した。2% ウシ血清及び 1×PBS(-) 中の 0.05% NaN₃ で洗浄後、SDS 溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS、cOmplete Mini(1 錠/ 10 mL) SDS 溶解緩衝液) に溶解しサンプルサイズが 200~500 bp になるまで超音波処理を行った。試料の 1/10 を希釈用緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0、167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% sodium deoxycholate) で希釈し、入力画分として 4°C で保存した。H 3 K 4 及び H 3 K 36 のモノメチル化、ジメチル化及びトリメチル化、アセチルヒストン H 3 K 9;NF- κ B p 65(Millipore, Billerica, MA, USA) に対する特異的抗体、及び対照ウサギ IgG(Sigma Aldrich) を用いて、ChIP アッセイを実施した。免疫沈降法によってプロテイン-DNA-プロテイン G セファロース複合体を得て、200 μ L の ChIP 直接溶出緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、0.5% SDS、300 mM NaCl) 中、65°C で一晩解離させた。RNase A、プロテイナーゼ K、及びフェノール/クロロホルム抽出による処理で RNA 及びタンパク質を除去した後、プロモーター/エンハンサー及び Gene body 領域のそれぞれの部位に対応するプライマーを用いて qPCR に DNA 量を測定した。qPCR で検出した ChIP の CT 値と入力信号を、試料間の 2 倍の差として 1 CT 値の差を計算する $\Delta\Delta$ CT method を用いて信シグナル強度に変換した[89]。すべての ChIP シグナルを対応する入力信号に正規化した。使用した式は以下のとおりである: $2^{-(CT_{input} - CT_{acetylated\ histone})}$ 。PCR プライマー対の配列を Table 4 に示す。

Table.4 Sequences of oligonucleotide primers used for ChIP assay of *CD38*, *ITGAL*, and *NCF1B* -interacting nuclear proteins

Region around <i>CD38</i> (bp)	Sequence
-500	ACTCCCGCATAGAGTGCAGTA GCTGCTCAGAGATGCAATTTT
+1	GTGTAACCAGCCACGGA CACCTCCCCTTCTGTTTCACT
+500	AGGTGGGTTGGCGACTAAG GGACTCCCTACTCAGCACCAC
+1000	TGAAATGCATGTGACCAGAGA GTTGCTGCGCCTTATCATCTA
+2000	TCCAAAATCCAGGTATTCCA GGAAAGCATCCCCTCTGATAG
over 2000	CTTGGCTGTCGCTCTATCACT ATGTATCTGTGCAACCGTAA
<hr/>	
Region around <i>ITGAL</i> (bp)	Sequence
-2000	AGGTAGAGAGACCCCATGTC GCGTCCTGAGTAGCTGGAAC
-1000	GGGCAACATAGTAAAAACCA CTCCACCTCTGCTCCTAAGT
-500	TTGATTCCTGGCTTCAAGAGA CAGTGGCTCACTGGCTGTA
+500	ACAAATAAGCAAGGGGTGGAG CCTGGCCCTATCTGCTTTTTT
+1000	CAGCCTCCATGACATTCTAGG CTGTAGATCCCAGCTCCCTTC
+2000	GCCCAGCACACAGTAGGTAAG ATGATCCGCCAGAATGTCTC
+5000	CAAGCCCAGACTTTGAAGAAA CCAGGCCAGTCTTAAACTCCTA
over 2000	CACAATGTGGGCACTTGTAGG GCTCTGACCTCATCAAACACC
<hr/>	
Region around <i>NCF1B</i> (bp)	Sequence
-2000	TTGGAGGCTGCAGTGAGTTAT ACTGTGCCTGGCCCTTTTT
-1000	GATAACCCGGTCATGCCCTA GTGCCTGGCCTGACTTAATTT
+500	TTCCCTGACTAGCCCAGCTAT TGGTGTACCCTACTGGAGAG
+1000	TCAAGTGATCCACCCACCTG CTGCACTCCAGACCTCATTTC
+2000	CCAGCTCGTTTTTGGTAGAGA GTGAGTGGAGATTGTGCCATT
+5000	GGCCTTTTAGGTGGTTTTGAG AAAGACAAGAAGACGTGAAGGA
over 2000	GTTTGAGGCTGCAGTAAGCTG GTGGCTGGCCTTAATTGTTT

統計解析

実験データは平均値±標準誤差(SEM) で表した。群間の qRT - PCR 及び ChIP に対する差の有意性は、Tukey - Kramer's test により決定した。 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意な差と判断した。

結果

mRNA マイクロアレイ解析を用いた高グルコース培地で培養した THP-1 細胞(HG 群)と高グルコース培地に β -カロテンを添加した培地で培養した細胞の mRNA 発現量の比較 mRNA マイクロアレイ解析を用いて行った。低グルコース培地で培養した LG 群及び HG 群と比較して BC 群において上昇した遺伝子(1.5 倍以上) の数は、それぞれ 182、114 及び 72 であった。LG 群及び HG 群と比較して BC 群において低下した遺伝子(-1.5 倍以下) の数はそれぞれ 367、97、及び 80 であった(Fig. 3)。LG 群及び HG 群と比較した BC 群における上昇した遺伝子及び低下した遺伝子の一覧を Table 4 及び Table 5 に示す。上昇した遺伝子の中で、32 が代謝、免疫応答及びシグナル伝達に関連する遺伝子であった(Table 5)。HG 群と比較して BC 群で発現値が上昇した代謝関連遺伝子は、*ECH1*, *FBP1*, *B4GALT5*, 及び *PFKFB3* であった。HG 群と比較して BC 群で発現値が上昇した免疫応答遺伝子は *IL31RA*, *CD38*, *ITGAL*, *ITGAX*, *NCF1B*, *NCF1C*, *CD1D*, *CSF3R*, *TRBY6-5* であった。HG 群と比較して BC 群で発現が上昇したシグナル伝達遺伝子は、*FGR*, *PLCB2*, *GRN*, *SULF2*, *SCUBE1*, *OR2A1*, *SLC43A2*, *TBC1D2*, *PRAM1*, *SPDYE2B*, *HIPK2*, *MERTK*, *PSAP*, *SPDYE2*, *TTL4*, *LRG1*, *OGFR* であった(Table 6)。

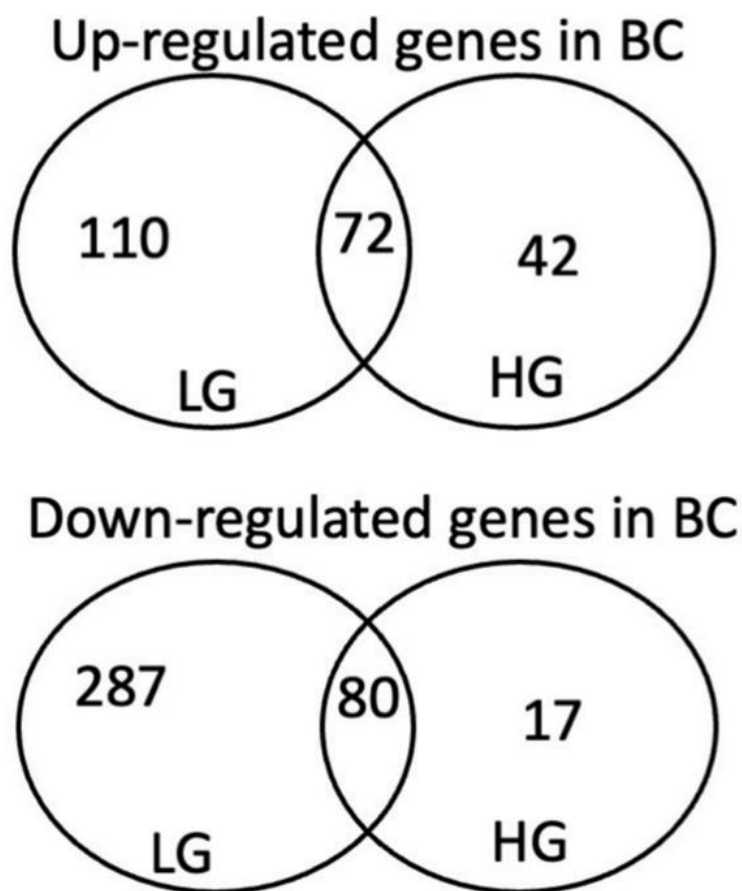


Fig.3. Venn diagrams of up- and downregulated gene expressions in BC compared with LG and/or HG.

Table 5. Genes upregulated in β -carotene-treated THP-1 cells under hyperglycemic conditions

Gene function	Gene symbol	Gene name	Public Gene ID	Ratio (BC vs. HG DM)	P	Ratio (BC vs. LG DM)	P
	<i>ECH1</i>	enoyl-CoA hydratase 1, peroxisomal	BC014786	4.06	<0.001	3.32	0.004
	<i>FBP1</i>	fructose-1,6-bisphosphatase 1	NM_000507	1.79	0.007	1.98	0.001
	<i>ND6</i>	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)	ENST00000361681	1.73	0.089	1.83	0.083
Metabolism	<i>SLC25A3</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	ENST00000401722	1.72	0.003	1.41	0.020
	<i>SLC43A2</i>	solute carrier family 43 (amino acid system L transporter), member 2	NM_001284498	1.72	0.002	1.85	<0.001
	<i>GALM</i>	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	NM_138801	1.57	0.023	1.48	0.015
	<i>PFKFB3</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	NM_001145443	1.5	0.016	1.63	0.007
	<i>IL31RA</i>	interleukin 31 receptor A	NM_001242463	2.74	<0.001	2.69	<0.001
	<i>CD38</i>	CD38 molecule	NM_001775	2.3	<0.001	2.26	<0.001
Immune response	<i>ITGAL</i>	integrin alpha L	NM_001114380	2.14	<0.001	2.21	<0.001
	<i>ITGAX</i>	integrin alpha X	NM_000887	2.01	0.027	2.28	0.019
	<i>NCF1B</i>	neutrophil cytosolic factor 1B pseudogene	NR_003186	1.89	0.012	1.86	0.007
	<i>CD1D</i>	CD1d molecule	NM_001766	1.8	<0.001	1.71	<0.001
	<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor	NM_000760	1.56	<0.001	1.73	<0.001
	<i>FGR</i>	FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	NM_001042729	2.07	<0.001	2.15	<0.001
	<i>PLCB2</i>	phospholipase C, beta 2	NM_001284297	1.96	<0.001	2.06	<0.001
	<i>OR2A1</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 1	NM_001005287	1.73	0.007	1.59	0.008
	<i>CSH1</i>	chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen)	NM_001317	1.71	0.022	1.36	0.217
	<i>TBC1D2</i>	TBC1 domain family, member 2	NM_001267571	1.7	0.002	1.82	<0.001
Signal transduction	<i>HIPK2</i>	homeodomain interacting protein kinase 2	NM_001113239	1.69	<0.001	1.57	<0.001
	<i>SPDYE2</i> ; <i>SPDYE2B</i>	speedy/RINGO cell cycle regulator family member E2; speedy/RINGO cell cycle regulator family member E2B	NM_001031618	1.64	0.001	1.83	0.001
	<i>LRG1</i>	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	NM_052972	1.62	<0.001	1.82	<0.001
	<i>OR2M1P</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 1 pseudogene	NR_002141	1.55	<0.001	1.34	0.002
	<i>PPP2R3B</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	ENST00000381625	1.54	0.005	1.65	0.011

<i>SULF2</i>	sulfatase 2	NM_001161841	1.79	0.010	1.71	0.023
<i>PRAMI</i>	PML-RARA regulated adaptor molecule 1	NM_032152	1.7	<0.001	1.77	<0.001
<i>DCDC1</i>	doublecortin domain containing 1	OITHUMIT0000031 6532	1.69	0.008	1.58	0.010
<i>PSAP</i>	prosaposin	NM_001042465	1.65	<0.001	1.8	<0.001
Others						
<i>TTL4</i>	tubulin tyrosine ligase-like family member 4	NM_014640	1.64	0.002	1.71	<0.001
<i>C9orf9</i>	chromosome9 open reading frame 9	NM_018956	1.58	0.022	1.24	0.345
<i>FBXO9</i>	F-box protein 9	AK095315	1.54	0.000	1.42	0.001
<i>ZC2HC1B</i>	zinc finger, C2HC-type containing 1B	NM_001013623	1.5	0.061	1.41	0.047
<i>C10orf54</i>	chromosome 10 open reading frame 54	NM_022153	1.5	<0.001	1.65	0.000

Table 6. Genes downregulated in β -carotene-treated THP-1 cells under hyperglycemic conditions

Function	Gene Symbol	Gene name	Gene ID	BC/ HG	P	BC/ LG	P
	<i>GCHI</i>	GTP cyclohydrolase 1	NM_000161	-1.82	<0.001	-1.99	<0.001
	<i>UGT3A2</i>	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2	NM_001168316	-1.71	<0.001	-1.96	<0.001
	<i>APOO</i>	apolipoprotein O	NM_024122	-1.69	0.024	-1.97	0.008
	<i>CO46</i>	cytochrome c oxidase assembly factor 6	NM_001012985	-1.66	0.007	-1.76	0.004
	<i>HACD3</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	NM_016395	-1.63	<0.001	-1.72	<0.001
Metabolism	<i>MA6EA</i>	mannosidase, endo-alpha	NM_024641	-1.57	<0.001	-1.74	<0.001
	<i>RV4SE6</i>	ribonuclease, RNase A family, k6	NM_005615	-1.55	0.007	-1.55	0.025
	<i>PS4T1</i>	phosphoserine aminotransferase 1	NM_021154	-1.55	<0.001	-1.52	<0.001
	<i>HPRT1</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194	-1.52	0.010	-1.74	0.004
	<i>RV4SE3</i>	ribonuclease, RNase A family, 3	NM_002935	-1.51	0.007	-1.58	0.010
	<i>GNPD42</i>	glucosamine-6-phosphate deaminase 2	NM_001270880	-1.51	0.001	-1.75	<0.001
Immune response	<i>TRGF9;</i>	T cell receptor gamma variable 9; T cell receptor gamma constant 1; T cell receptor gamma joining P	BC072396	-1.61	<0.001	-1.59	0.004
	<i>TRGJ1;</i>						
	<i>TRGJP</i>						
	<i>RBFP9</i>	retinoblastoma binding protein 9	NM_006606	-2	<0.001	-2.1	<0.001
	<i>PRLR</i>	prolactin receptor	NM_000949	-1.79	<0.001	-1.83	<0.001
	<i>LPAR4</i>	lysophosphatidic acid receptor 4	NM_001278000	-1.75	0.003	-1.59	0.003
	<i>IKBIP</i>	IKBKB interacting protein	NM_153687	-1.68	0.009	-1.7	0.011
	<i>RTKN2</i>	rioretin 2	NM_001282941	-1.6	0.003	-1.65	<0.001
	<i>DEPDC1</i>	DEP domain containing 1	NM_001114120	-1.59	<0.001	-1.85	<0.001
	<i>MNS1</i>	meiosis-specific nuclear structural 1	NM_018365	-1.59	0.003	-1.69	<0.001
	<i>ATL2</i>	atlastin GTPase 2	NM_001135673	-1.57	0.026	-1.57	0.007
Signal transduction	<i>CSNK2A3</i>	casein kinase 2, alpha 3 polypeptide	NM_001256686	-1.55	0.007	-1.58	0.004
	<i>LIN7C</i>	lin-7 homolog C (C. elegans)	NM_018362	-1.55	0.007	-1.61	0.002
	<i>TAXDC16</i>	thioredoxin domain containing 16	NM_001160047	-1.55	<0.001	-1.67	<0.001
	<i>REEP3</i>	receptor accessory protein 3	NM_001001330	-1.53	<0.001	-1.9	<0.001
	<i>GPR183</i>	G protein-coupled receptor 183	NM_004951	-1.53	<0.001	-1.53	<0.001
	<i>PIGY;</i>						
	<i>PYURF</i>	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class Y; PI3Y upstream reading frame	NM_001042616	-1.52	0.031	-1.68	0.015
	<i>KITLG</i>	KIT ligand	NM_000899	-1.51	<0.001	-1.55	0.002
	<i>CDKN3</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	NM_001130851	-1.51	<0.001	-1.68	<0.001
	<i>CCP110</i>	centriolar coiled coil protein 110kDa	NM_001199022	-1.51	<0.001	-1.56	<0.001

<i>MRPL39</i>	mitochondrial ribosomal protein L39	NM_017446	-1.62	0.004	-1.75	0.001
Protein synthesis <i>MRPL1</i>	mitochondrial ribosomal protein L1	NM_020236	-1.62	0.018	-1.69	0.009
<i>EIF5A2</i>	eukaryotic translation initiation factor 5A2	NM_020390	-1.51	0.002	-1.8	<0.001
<i>HSP49</i>	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	AK023317	-1.92	0.049	-1.8	0.042
Stress/apopto sis <i>MT1G</i>	metallothionein 1G	NM_001301267	-1.76	0.036	-2.15	0.002
<i>SERPINB10</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	NM_005024	-1.72	0.001	-1.79	0.002
<i>MT1F</i>	metallothionein 1F	NM_001301272	-1.51	0.015	-1.56	0.005
<i>DSG2</i>	desmoglein 2	NM_001943	-1.54	<0.001	-1.61	0.001
Structural protein <i>CFL2</i>	cofilin 2 (muscle)	NM_001243645	-1.53	0.015	-1.55	0.010
<i>NUP54</i>	nucleoporin 54kDa	NM_001278603	-1.51	0.001	-1.57	<0.001
<i>BBS7</i>	Bardet-Biedl syndrome 7	NM_018190	-1.51	0.020	-1.53	0.017
<i>EBF3</i>	early B-cell factor 3	NM_001005463	-1.92	0.001	-1.68	0.002
<i>HIST1H2AJ</i>	histone cluster 1, H2aj	NM_021066	-1.91	0.006	-2.08	0.003
<i>CENPQ</i>	centromere protein Q	NM_018132	-1.89	0.016	-2.15	0.007
<i>MBTPS2</i>	membrane bound transcription factor peptidase, site 2	NM_015884	-1.72	<0.001	-2.13	<0.001
<i>ERH</i>	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	NM_004450	-1.66	0.011	-1.84	0.004
<i>DPT30</i>	dpy-30 histone methyltransferase complex regulatory subunit	NM_032574	-1.64	0.002	-1.84	<0.001
<i>POLE2</i>	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit	NM_001197330	-1.63	0.003	-1.56	<0.001
<i>FANCB</i>	Fanconi anemia complementation group B	NM_001018113	-1.62	0.027	-1.73	0.017
<i>SNAPC1</i>	small nuclear RNA activating complex polypeptide 1	NM_003082	-1.61	<0.001	-1.87	<0.001
<i>WDR75</i>	WD repeat domain 75	NM_001303096	-1.61	0.034	-1.8	0.001
<i>CETN3</i>	centrin 3	NM_001297765	-1.6	0.004	-1.78	0.002
Transcription /chromatin <i>ZEB1</i>	zinc finger E-box binding homeobox 1	NM_001128128	-1.59	0.003	-1.81	<0.001
<i>E2F7</i>	E2F transcription factor 7	NM_203394	-1.59	0.004	-1.53	0.005
<i>MIR3975</i>	microRNA 3975	NR_039771	-1.59	0.006	-2.05	<0.001
<i>MAD2L1</i>	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	NM_002358	-1.57	0.003	-1.65	0.003
<i>DSCC1</i>	DNA replication and sister chromatid cohesion 1	NM_024094;	-1.56	0.002	-1.86	0.001
<i>ZNF25</i>	zinc finger protein 25	NM_145011	-1.55	0.002	-1.87	<0.001
<i>TAF1D; SNOR48</i>	TATA box binding protein associated factor 1D; small nucleolar RNA, H/ACA box 8	ENST00000525928	-1.55	0.036	-1.57	0.024
<i>BTG3</i>	BTG family, member 3	NM_001130914	-1.55	<0.001	-1.76	<0.001
<i>CENPE</i>	centromere protein E	NM_001286734	-1.53	<0.001	-1.74	<0.001
<i>MIR502</i>	microRNA 502	NR_030226	-1.53	0.001	-1.56	<0.001
<i>ZFP1</i>	ZFP1 zinc finger protein	NM_153688	-1.51	0.004	-1.63	<0.001
<i>MSH2</i>	mutS homolog 2	NM_000251	-1.51	0.005	-1.61	0.004

代謝、炎症及びシグナル伝達関連遺伝子の mRNA の β -カロテンによる発現増大の qRT-PCR による確認

HG 群と比較して BC 群で発現値が mRNA マイクロアレイ解析で上昇した遺伝子及び関連遺伝子に対して qRT-PCR を実施した。代謝関係遺伝子の中で、*FBP1* と *PFKFB3* の発現量は HG 群より BC 群で高く、*FBP1* では LG 群より BC 群で高かった (Fig. 4 A)。*IL31RA*、*NCF1B*、及び *CD38* などの炎症関連遺伝子の発現値は HG 群及び LG 群よりも BC 群で高かった (Fig. 4 B)。*ITGAL*、*FGR*、*PLCB2*、*SULF2*、*SLC43A2*、*PRAM1*、*PSAP*、*LRG1* 及び *CSF3R* などのシグナル伝達経路遺伝子の発現値は HG 群及び LG 群よりも BC 群において高かった (Fig. 5)。

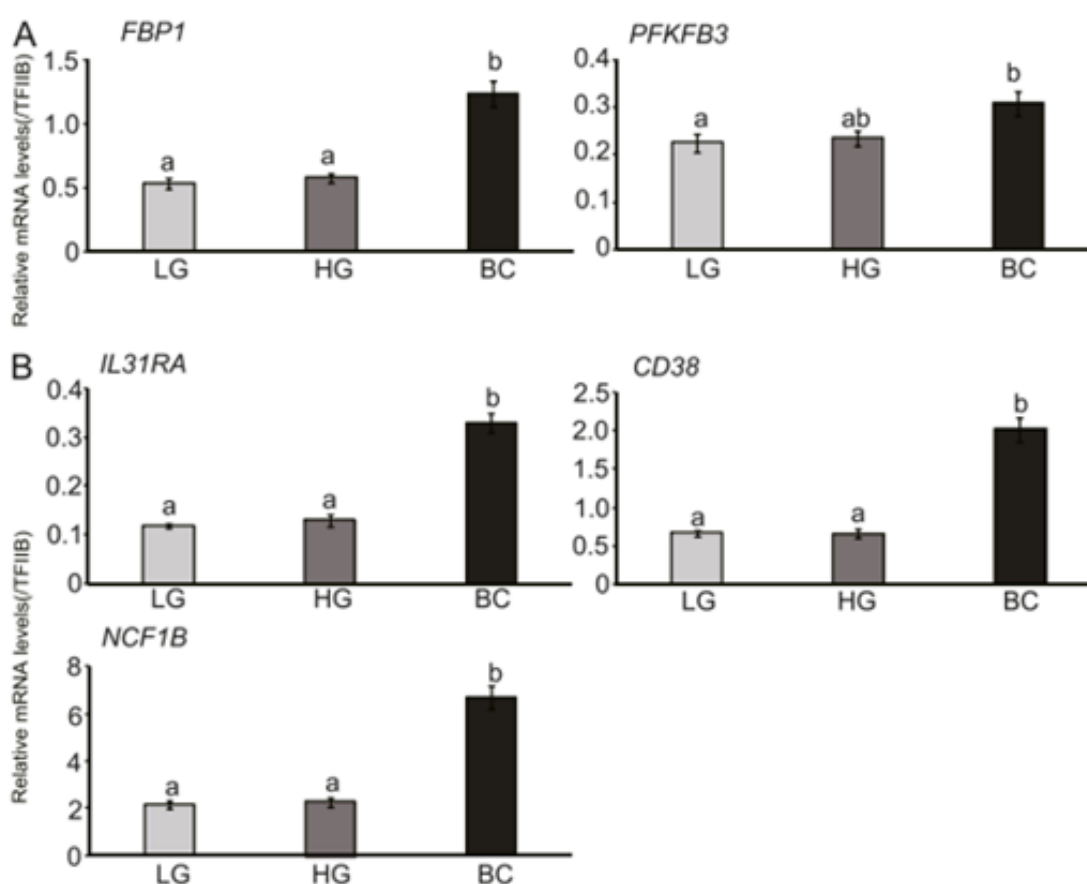


Fig. 4 mRNA expression of metabolism- and inflammation-related genes in THP-1 cells treated with low glucose or high glucose with/without β -carotene. mRNA levels in THP-1 cells treated with low glucose (LG), high glucose (HG), and/or β -carotene (BC) were quantified using qRT-PCR. A) metabolism and B) inflammation. LG, low glucose; HG, high glucose; BC, high glucose with β -carotene. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6). The values were normalized against TFIIB. Significant differences are indicated by different alphabets (p < 0.05).

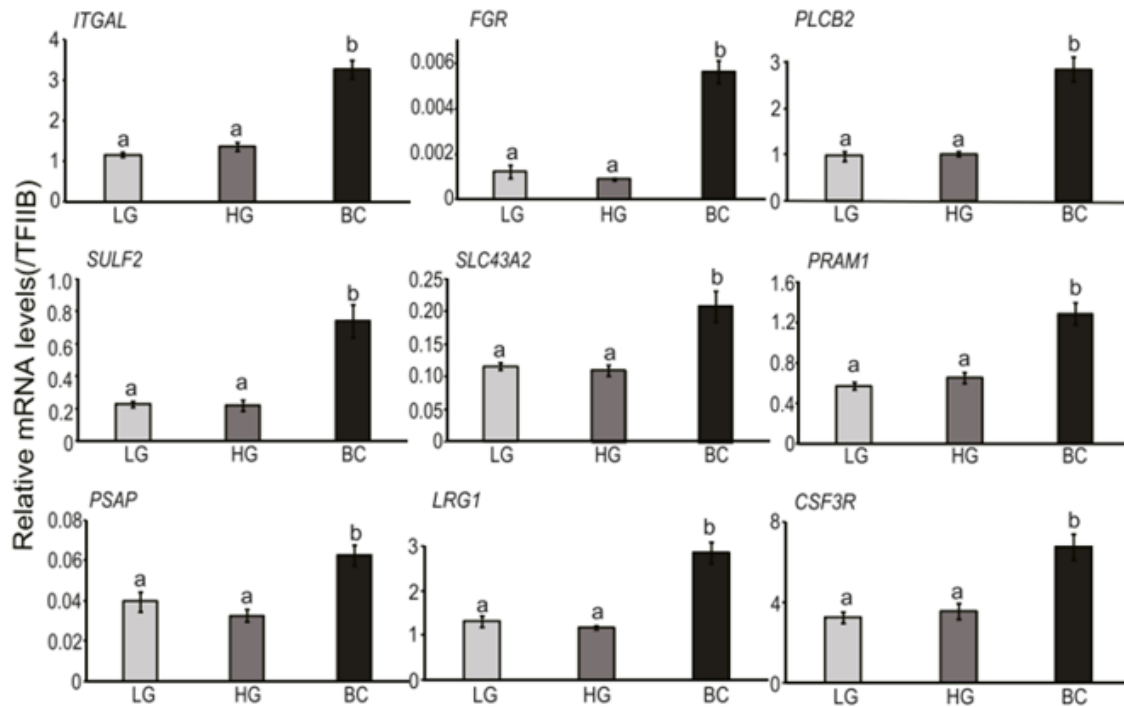


Fig. 5. mRNA expression levels of signaling pathway genes in THP-1 cells treated with low glucose or high glucose with/without β -carotene. mRNA levels in THP-1 cells treated with low glucose (LG), high glucose (HG), and/or β -carotene (BC) were quantified using qRT-PCR. LG, low glucose; HG, high glucose; BC, high glucose with β -carotene. Values are expressed as the mean \pm SEM (n = 6). The values were normalized against TFIIIB. Significant differences are indicated by different alphabets ($p < 0.05$).

ChIP アッセイにより測定した BC 群で発現が上昇した複数の免疫応答遺伝子のヒストン修飾

高グルコース条件下で β -カロテン存在下又は非存在下で処理した THP-1 細胞における免疫応答遺伝子 *CD 38*、*ITGAL*、及び *NCF 1 B* 周辺のヒストン修飾および炎症を促進する転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF κ B) (p 65) を調べるために mono, di, tri メチル化 H3K4 及び H3K36 抗体、抗アセチル化ヒストン H3K9 抗体、及び NF κ B (p 65) 抗体を用いて ChIP アッセイを行った。IgG の平均は他のヒストン値よりも有意に低かった。各群の各領域における *CD 38*、*NCF 1 B* 及び *ITGAL* に対する IgG の平均値は、それぞれ $< 0.26\%$ 、 $< 0.21\%$ 及び $< 0.11\%$ であった。*CD 38* 周辺の H3K4 のジメチル化及び H3K36、AcH3K9 のトリメチル化は HG 群及び/又は LG 群よりも BC 群で高かったが(ジメチル化 H 3 K 4: +500 bp、+1000 bp 及び +2000 bp; トリメチル化 H 3 K 36: +2000 bp 及び 2000 bp 以上)、+500 bp 及び 2000 bp を超える NF κ B の 1000 bp でのモノメチル化 H3K4 は HG 群及び/又は LG 群よりも BC 群で低かった (Fig. 6)。

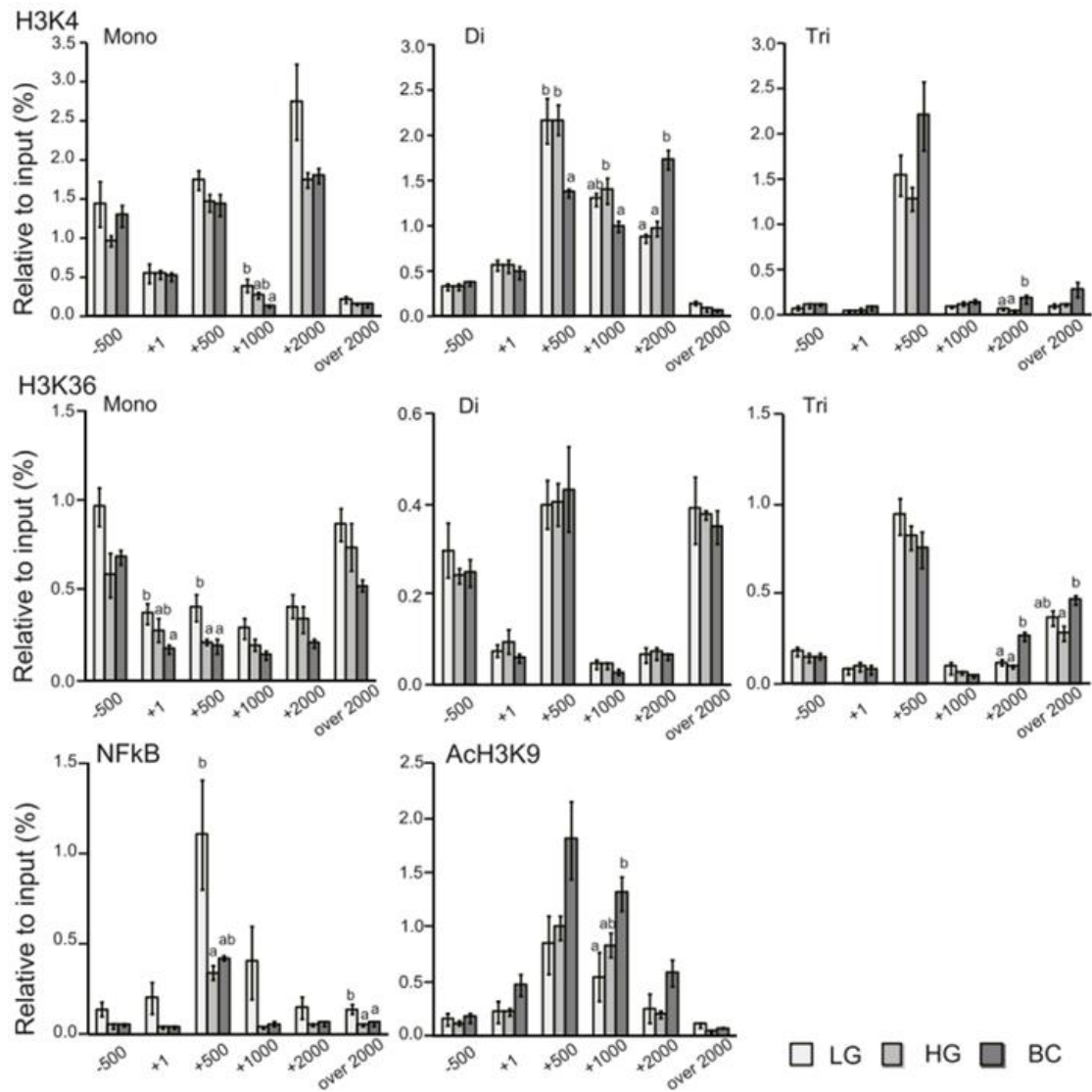


Fig. 6. Methylated histones H3K4 and K36, and acetylated H3K9 around the *CD38* gene in THP-1 cells treated with low glucose or high glucose with/without β -carotene. ChIP signals for anti-acetyl-histone H3K4, anti-acetyl-histone H3K36, anti-NF- κ B, and anti-ACh3K9 were quantified using qPCR in THP-1 cells treated with low glucose (LG), high glucose (HG), and/or β -carotene (BC). LG, low glucose; HG, high glucose; BC, high glucose with β -carotene. Data are expressed as mean \pm SEM for six plates per group. Significant differences are indicated by different alphabets ($p < 0.05$).

NCF1B 周辺の H3K4 のジメチル化及び H3K36 と AcH3K9 のトリメチル化も HG 及び/又は LG 群より BC 群で高かったが(ジメチル化 H3K4:+500 bp、+1000 bp 及び+2000 bp;トリメチル化 H3K4:+2000 bp 及び+500 bp;トリメチル化 H3K36:+2000 bp;AcH3K9:+500 bp、+1000 bp 及び 2000 bp)、+500 bp でのジメチル化 H3K36 は HG 及び LG 群より BC 群で低かった(Fig.7)。

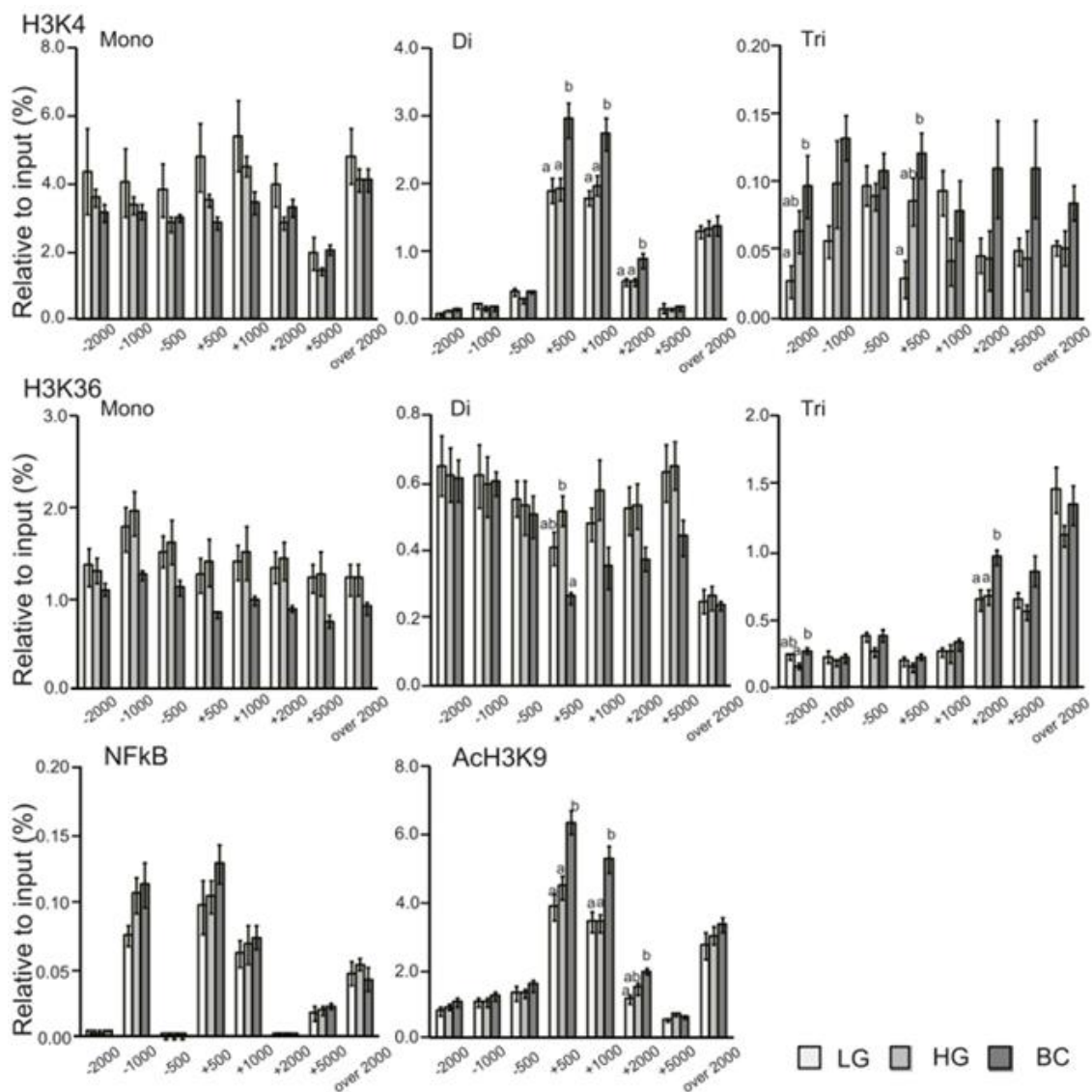


Fig. 7. Methylated histones H3K4 and K36, and acetylated H3K9 around the *ITGAL* gene in THP-1 cells treated with low glucose or high glucose with/without β -carotene ChIP signals for anti-acetyl-histone H3K4, anti-acetyl-histone H3K36, anti-NF- κ B, and anti-AcH3K9 were quantified using qPCR in THP-1 cells treated with low glucose (LG), high glucose (HG), and/or β -carotene (BC). LG, low glucose; HG, high glucose; BC, high glucose with β -carotene. Data are expressed as mean \pm SEM for six plates per group. Significant differences are indicated by different alphabets ($p < 0.05$).

ITGAL 周辺の H3K4 のジメチル化と H3K36 トリメチル化、及び AcH3K9 のは HG 及び LG 群よりも BC 群で高かったが(ジメチル化 H 3 K 4:+500 bp 及び+1000 bp; トリメチル化 H 3 K 36:+2000 bp 及び+5000 bp; AcH 3 K 9:+500 bp、 +1000 bp、 遺伝子外 2000 bp 以上)、モノメチル化 H 3 K 4(500 bp、 +2000 bp、 +5000 bp)、ジメチル化 H 3 K 4(遺伝子外 2000 bp 以上) 及びジメチル化 H 3 K 4(+2000 bp) は HG 及び LG 群よりも BC 群で低かった(Fig.8)

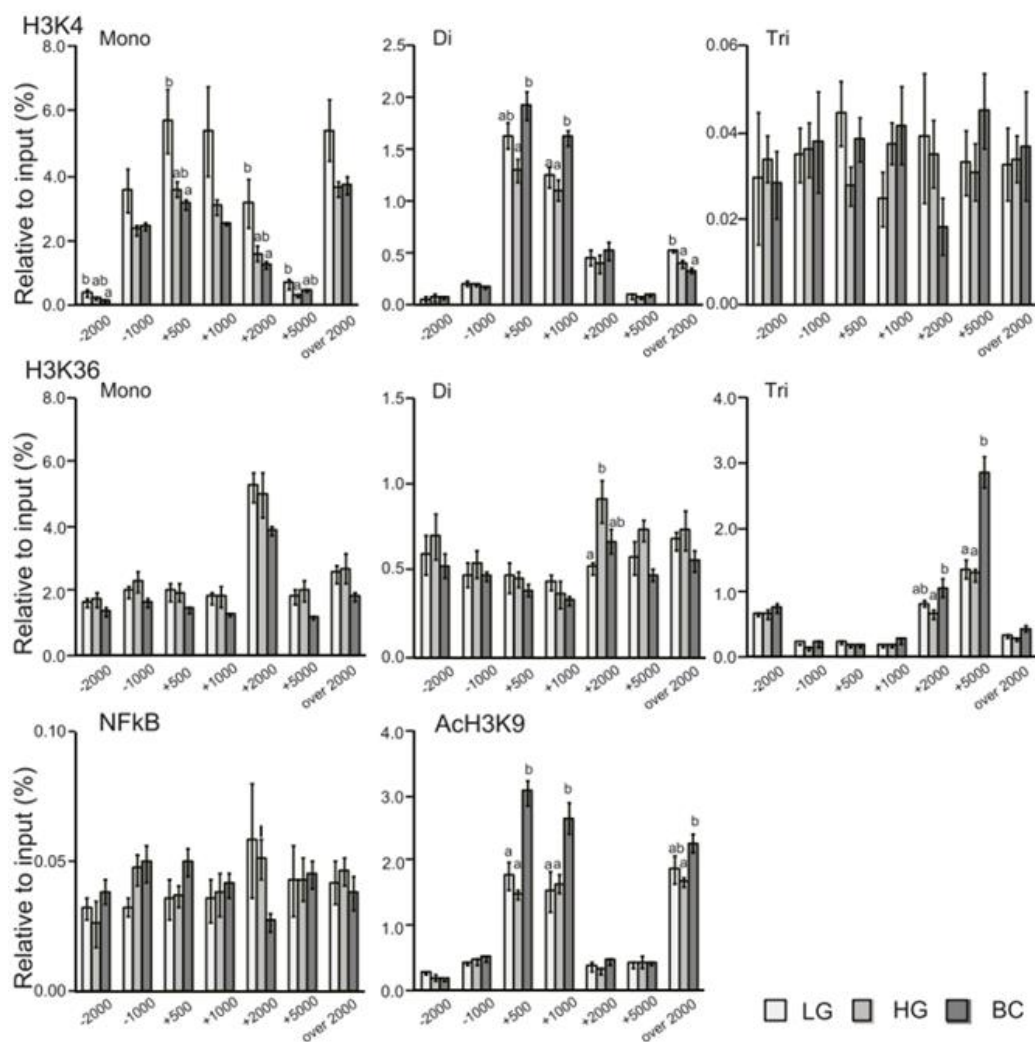


Fig. 8. Methylated histones H3K4 and K36, and acetylated H3K9 around the *NCF1B* gene in THP-1 cells treated with low glucose or high glucose with/without β -carotene. ChIP signals for anti-acetyl-histone H3K4, anti-acetyl-histone H3K36, anti-NF- κ B, and anti-AcH3K9 were quantified using qPCR in THP-1 cells treated with low glucose (LG), high glucose (HG), and/or β -carotene (BC). LG, low glucose; HG, high glucose; BC, high glucose with β -carotene. Data are expressed as mean \pm SEM for six plates per group. Significant differences are indicated by different alphabets ($p < 0.05$).

考察

抗酸化食品成分の摂取が炎症の軽減に有効であることが、近年のいくつかの研究のシステマティックレビューで示唆されている[55]。他方で、 β -カロテンはそれ自身が酸化されると他の分子を酸化することが報告されている[10]。これらの結果は、抗炎症効果が必ずしも体に有益ではないことを示している。一章では、13週間の過剰な β -カロテン摂取が、スナネズミの肝臓におけるMMP-9タンパク質発現の増加と過剰な β -カロテン摂取が脂肪肝炎のリスク増加をもたらす可能性を示唆した。炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの分泌をマクロファージが誘導することが報告されており、マクロファージの浸潤及び活性化によるアテローム性動脈硬化症の発生は、血管における酸化ストレスによって促進されることが報告されている[44]。また、マクロファージのMMP-9発現の調節が、炎症反応に影響を与えるメカニズムを示した先行研究もある[46]ことから、第二章では、マクロファージ様THP-1細胞でマイクロアレイ分析及びqRT-PCRを行い、 β -カロテンがこれら細胞を高グルコース条件下培養した際に慢性炎症を低減又は誘導するかを検討した。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(*FBP1*及び*PFKFB3*)、ROS産生に関連する遺伝子(*NCF1B*、*PLC β 2*及び*PRAM-1*)、及び炎症に関与する遺伝子(*IL31RA*、*FGR*、*CD38*、*SULF2*及び*CSF3R*)の発現量が増大することが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子発現は、低グルコース条件下で培養した細胞と比較して、高グルコース条件下では有意な上昇は観察されなかった。代謝関連遺伝子に関して、*FBP1*はフルクトース1,6-二リン酸からフルクトース6-リン酸及び無機リン酸への不可逆的反応に関与する糖新生の重要な酵素であり[56]、*PFKFB3*はPFK-1のアロステリック活性化因子としてフルクトース2,6-二リン酸を合成する解糖系に関与している[57]。*FBP1*は糖新生に関与する酵素であるが、ナチュラルキラー細胞における*FBP1*の発現は解糖系を阻害し、ROS値を増加させる[58]。しかし、*PFKFB3*の過剰な活性化はROS産生を促進し、オートファジーを増強する[59]。前述のように、 β -カロテンはそれ自身を酸化するときにラジカルを生成し、酸化損傷を誘発する[10]。先行研究はまた、*PFKFB3*タンパク質の発現値増加が肝星細胞における早期かつ持続的な線維形成マーカーであることも報告されている[60]。ROS産生に関連する遺伝子である*NCF1*はNADPHオキシダーゼの重要な成分である[61]。さらにTHP-1細胞における*NCF1*発現はリポ多糖類によって増大することも示されている[62]。*PRAM1*は細胞骨格再構成の下流のシグナル伝達経路に関与し、ROS産生に必要なNADPHオキシダーゼ複合体の構築に関与する[63]。興味深いことにTHP-1における*FGR*、*CD38*、*SULF2*と*CSF3R*のような炎症と関係した遺伝子の発現量は、高グルコース条件下で β -カロテンにより有意に上昇することを見出した。*PFKFB3*は*PRAM-1*の受容体であり、*IL-1 β* 、*IL31RA*及び*PFKFB3*等の炎症性サイトカインの分泌を誘導する[64]。*CSF3R*は顆粒球、単球及びマクロファージの関連サイトカイン受容体である[65]。加えて、白血球遊走に寄与する*CD38*[66]の発現の有意なmRNA発

現の増加が、高グルコース培地での β -カロテン処理によって誘導された。FGR はマクロファージを活性化することが知られている [67]。SULF2 は炎症に対する防御作用を有する (顆粒球コロニー刺激因子及びインターフェロン γ 誘導タンパク質 10) [68]。これらの結果は、 β -カロテンは、炎症誘発性サイトカインと ROS 産生に關与する遺伝子の発現量を上昇させることによって慢性炎症を増強する可能性があり、 β -カロテンが *SULF2* のような抗炎症性遺伝子の発現を誘導することを示唆している。

高グルコース条件下での β -カロテンによる遺伝子発現の増大の分子機構はまだ解明されていない。前述したものを含め、炎症関連遺伝子の発現量は NF- κ B のような核転写因子によって調節される [69]。近年、高グルコース刺激が解糖系を介してアセチル CoA を産生することによりヒストンアセチル化を促進することが報告されている [70]。さらに、解糖系の副路におけるグルコサミン合成経路は、ヒストン修飾酵素混合系列白血病 5 (MLL 5) の O-linked β -N-アセチルグルコサミン修飾を促進することが報告されている [71]。本研究では、免疫応答遺伝子 *CD38*、*ITGAL* 及び *NCF1B* 周辺領域におけるヒストン修飾を、ChIP アッセイを用いて調べた。*NCF1B* 及び他の遺伝子の周りの H3K4 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。H3K4 はヒストンアセチルトランスフェラーゼ [72] をクロマチンに迎合しヒストン H3 のアセチル化を誘導することにより転写活性化をもたらす。さらに、アセチル化 H3K9 は、メチル化 H3K9 との競合及びヘテロクロマチン形成を誘導するヘテロクロマチンタンパク質 1 への結合を破壊し、ユークロマチン形成に關与することが知られている [73]。従って、5 μ M 用量の β -カロテンによる THP-1 細胞の処理は、ヒストンアセチル化とヒストン H3K4 ジメチル化を誘導することによって、免疫応答に關与する遺伝子の転写を促進すると考えられた。ヒストン H3K36 のメチル化は活性クロマチンと正の関連があり、H3K36 メチル化はトランス活性化に關連すると考えられる [74]。しかし、最近の研究では、H3K36 メチル化が、DNA メチル基転移酵素、DMNT3b [75, 76] をリクルートすることにより、活性クロマチンの遺伝子 Gene body 領域で転写伸長の終結に役割を果たすことが明らかにされた。したがって、*CD38*、*ITGAL* 及び *NCF1B* 周辺のヒストン H3K36 のトリメチル化はクロマチンの活性領域に対応すると考えられ、これらの遺伝子周辺のヒストン H3K36 のトリメチル化の増大は、これら遺伝子の過剰な転写伸長段階を停止させる可能性が考えられた。 β -カロテンがどのように炎症関連遺伝子周辺のヒストン修飾を変化させるかはいまだ不明である。以前の研究は、ヒストンデアセチラーゼサーチュイン 1 (SIRT 1) が酸化ストレスの低下に關与することが報告されている。具体的には、網膜幹細胞の SIRT 1 をノックダウンすると、ROS 産生を増加させ、酸化ストレス誘導による細胞損傷をさらに増強することが報告された [77]。対照的に、*Caenorhabditis elegans* の腸組織及び生殖腺におけるヒストン H3K4me3 の酵素である *Ash2* の欠損は、酸化ストレス

耐性を誘導することが報告されている [78]。したがって、酸化ストレスの増加は、THP-1 細胞における炎症関連遺伝子周辺のヒストン H3K9 のアセチル化と H3K4 のメチル化を増強する可能性がある。しかしながら、この仮説は、今後さらに検討する必要がある。さらに、DNA はヒストンに巻きつき、劇的な変化がクロマチン構造に影響を及ぼすと DNA とヒストンがクロマチンに取り込まれる。特に、ヒストン H3 のアイソフォームであるヒストン H3.3 は、活性化クロマチンで高発現し、ヒストン H3.1 よりもアセチル化や H3K4 メチル化などのトランス活性化に関連したヒストン修飾によって容易に修飾されることが複数の研究で示されている [79]。本研究では、上記の遺伝子において、ヒストン H3.3 とヒストン H3.1 の存在比は調べられていない。この点については今後の試験で検討する必要がある。

本研究では、高グルコース条件下での β -カロテン処理が THP-1 細胞において炎症と ROS 生成に関連する遺伝子の発現を促進することを見出した。しかし、低グルコース条件下で培養した細胞と高グルコース条件下で培養した細胞の間の炎症関連遺伝子の発現の違いは有意ではなかった。THP-1 細胞を 15 mmol/l-グルコース培地で 72 時間処理すると、TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 及び IFN- γ などの炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現が誘導されたが、5.5 mmol/l-グルコース培地ではこれらの発現は認められなかった [5]。本研究における高グルコース条件下で炎症関連遺伝子の発現が上昇しなかった要因には、培養時間が比較的短い (24 時間) ことが考えられる。 β -カロテンによる mRNA 発現量の上昇が高グルコース培養条件に依存するかどうかはまだ不明である。今後の研究で総合的に検討する必要がある。この研究では、炎症と関係した遺伝子の周囲の炎症シグナリングで重要な転写因子 NF- κ B の結合活性を測定したが、各群間に有意な差異は検出されなかった。従って、THP-1 細胞において、STAT 3、Nrf2 及び NF- κ B を含む炎症及び酸化ストレスに関与する遺伝子を調節する転写因子の結合活性が高グルコース及び/又は β -カロテンシグナル伝達により変化するかどうかを調査する必要がある。高グルコース培地で処理した THP-1 細胞において、 β -カロテンが ROS 産生、炎症、代謝、及びこれらの遺伝子周辺のヒストン修飾に関連する遺伝子の発現を直接上昇させるかは未だ不明である。抗酸化 β -カロテンはそれ自身が酸化されると他の分子を酸化する [10]。したがって、酸化された β -カロテンは、高グルコース培地で処理した THP-1 細胞において、ROS 産生、炎症、代謝、及びこれらの遺伝子周辺のヒストン修飾に関連する遺伝子の発現を誘導した可能性がある。しかし、以前の研究では、DMEM を用いて同様の培地で培養した 3T3-L1 脂肪細胞を β -カロテンで処理すると、TNF- α 処理細胞の過酸化水素濃度が低下し、インスリン感受性遺伝子の発現が誘導されることが示された [80]。したがって、 β -カロテンが常に培地中で酸化され、酸化された β -カロテンが ROS 産生、炎症、及び代謝に関連する遺伝子の発現を誘導するかについては依然として不明である。また、 β -カロテンをビタミン A に変換する酵素である β -カロテンオキシゲナーゼ 1 (BCO 1) がマウスの骨髄細胞に発現している [81]。したがって、 β -カロテンから変換されるビタミン A は、高グルコース培地で処理された THP-1 細胞において、ROS 産生、炎症、代謝、及びこれらの遺伝子周辺のヒストン修飾の誘導に影響を

及ぼす可能性がある。実際に、all-trans レチノイン酸はマクロファージにおいて食作用を増強したが、CD/TLR 4 発現を減少させた[82]。したがって、 β -カロテンから変換されるビタミン A は、高グルコース培地で処理した THP-1 細胞における ROS 及び炎症の誘導に関連する遺伝子の発現量に影響を及ぼす可能性がある。それゆえ、これらの課題を今後検討する必要がある。加えて、 β -カロテンが高グルコース培地で THP-1 細胞において酸化された β -カロテン、ビタミン A 及び/又は他の代謝産物に代謝されるかどうかを検討すべきである。7.2 \pm 1.5 mg/日のサプリメントを摂取したヒト被験者の 4 週間後の血漿中 β -カロテン濃度は 2.5 μ M であった[83]。4 カ月にわたって 30 mg/日から 180 mg/日までの用量で日光蕁麻疹患者に投与した β -カロテンサプリメントは、35 日目に 7.5 μ M、55 日目に 11.2 μ M、4 カ月目に 14.2 μ M であった[84]。加えて、以前の研究によって、3T3-L1 脂肪細胞における 10 μ M の β -カロテンがインスリン感受性に関連する遺伝子の発現を増強することが示されている[80]。これらの研究は、5 μ M の β -カロテン濃度が適切であることを示唆する。高グルコース培地で処理した THP-1 細胞において、5 μ M 用量と比較して低用量又は高用量の β -カロテンで、ROS 産生、炎症、代謝、及びこれらの遺伝子周辺のヒストン修飾に関連する遺伝子の発現が変化するかどうかを調べる必要がある。本研究では、THP-1 細胞において DNA 損傷が高グルコース及び/又は β -カロテンによって誘導されるかどうかについては検討しなかった。以前の研究では、高グルコース培地で THP-1 細胞を培養すると DNA 損傷が誘発されることが示されている[85]。今後、 β -カロテンが高グルコース培地で培養した THP-1 細胞において DNA 損傷及び/又は酸化を誘導するかどうかを調べる必要がある。本研究のもう一つの限界は、THP-1 細胞において β -カロテンにより発現量が下方制御された遺伝子に焦点を当てなかったことである。さらなる研究でこれらの遺伝子の mRNA 発現量や発現低下に関与するヒストン修飾等を調べる必要がある。

結論として、本章では、高グルコース条件下での THP-1 細胞の β -カロテンによる処理が、酸化ストレス関連遺伝子及び炎症関連遺伝子、並びに遺伝子周辺のヒストン H3 アセチル化、ヒストン H3K 4 ジメチル化、及び K3K 36 トリメチル化の発現を増強したことを明らかにした。これらの結果は、 β -カロテンが糖尿病患者においてヒストン H3 アセチル化及びヒストン H3K 4 ジメチル化を介して酸化ストレス及び炎症関連遺伝子の発現を誘導することにより有害作用を誘導する可能性を示唆している。

総合考察

近年、日本では、食環境の変化や交通機関の発達などによって、肉体的、身体的ストレスによる代謝性疾患の有病率が増大していることが問題視されている。食後高血糖や高脂肪食摂取によって誘導される活性酸素種の産生や酸化ストレスに起因する慢性炎症の増大は動脈硬化関連疾患の発症を誘導する一方で、活性酸素種による酸化ストレスの低減には、カロテノイド、ポリフェノールなどの抗酸化食品成分を摂取することが重要であると考えられている。着色料等として頻繁に使われる天然添加物のカロテノイドは、体内でビタミンAや抗酸化物質として作用し、健康維持に重要な役割を果たすと考えられている。カロテノイドのうち、 α -、 β -、 γ -カロテンと β -クリプトキサンチンは、体内でビタミンAに変換されることからプロビタミンAと呼ばれ、 β -カロテンはビタミンAに変換されやすいが、その変換は、体内でビタミンAが不足したときにのみ生じると考えられている。 β -カロテンを含むカロテノイドは、一重項酸素などの活性酸素種を除去し、肝臓や脂肪組織に蓄積されるため、脂肪が多い組織での酸化障害を効率的に防ぐことができる。しかしながら、 β -カロテンは体内で脂肪に蓄積されるため、他の脂溶性食品成分と同様に、過剰に存在すると障害を引き起こす可能性がある。 β -カロテンを含むカロテノイドの有効性と安全性については、多くの疫学研究が行われているが、 β -カロテンを含むカロテノイドの摂取は、患者の生活や疾患のステージによって効果が異なり、それに応じて至適投与量や耐容上限摂取量も異なる可能性がある。したがって、各ライフステージ、各疾患ステージにおける β -カロテンの有効性、安全性、至適投与量については、動物モデルを用いて検討する必要がある。

これまでの研究では、ヒトと同様に β -カロテンを効率的に肝臓に蓄積するスナネズミを用いた研究が行われてきた。しかし、これらの研究で使用された β -カロテンの用量は、人間のサプリメントに使用されている最高量の β -カロテンよりもかなり高く、その投与期間も比較的短かった。

上記を受け、1章では、高脂肪・高ショ糖食を摂取したスナネズミに2種類の濃度で β -カロテンを投与し、脂肪肝発症に対する β -カロテンの有効性と安全性を評価した。一般的なサプリメント摂取量に相当する0.001% (0.01 g/kg diet) と、サプリメントの上限量に相当する0.004% (0.04 g/kg diet) の2種類の濃度で投与し、肝臓の線維化および炎症性タンパク質 (Interleukin (IL) -18 および Matrix metalloproteinase (MMP) -9) 濃度を測定した。その結果、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肝臓に β -カロテンが大幅に蓄積し、この蓄積は用量依存的であることが示された。加えて、高 β -カロテン食の摂取は、空腹時血清トリグリセリドおよび総コレステロール濃度値を高めるが、空腹時HDL-コレステロールおよび空腹時・食後血糖値は高めないことが明らかになった。さらに、 β -カロテンを高用量含む高脂肪・高糖質食の摂取により、肝臓線維化が亢進することが明らかとなった。以上のことから、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。さらに本章では、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。MMP-9 は、炎症反応の一部として肝臓に蓄積されるコラーゲンの分解に関与するコラーゲン分解酵素であり、血漿中の MMP-9 濃度は、NASH 患者において健常者よりも高いことが示されている。本研究では、高脂肪／高ショ糖食を 13 週間摂取しても肝臓の炎症および線維化は誘導されないが、 β -カロテンの添加により、これらの病態の発現が起こることが示された。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。MMP-9 については、炎症増大時に肝臓のマクロファージが分泌し、肝臓においてコラーゲンを分泌する肝星細胞に作用することが報告されている [36]。

そこで 2 章ではヒト幼若マクロファージ様 THP-1 細胞において、高血糖由来の炎症性サイトカイン等の炎症関連遺伝子の発現増大と、 β -カロテンの炎症促進に関する影響を調査した。mRNA マイクロアレイ解析および qRT-PCR を実施した結果、高グルコース条件下で β -カロテンを投与すると、炎症関連遺伝子や MMP-9 の発現上昇は観察されなかったが、代謝関連遺伝子 (*FBP1*, *PFKFB3*)、活性酸素生成関連遺伝子 (*NCF1B*, *PLC β 2*, *PRAMI*)、炎症関連遺伝子 (*IL31RA*, *FGR*, *CD38*, *SULF2*, *CSF3R*) の発現レベルが上昇することが明らかとなった。さらに *IL31RA*, *FGR*, *CD38*, *SULF2*, *CSF3R* などの炎症関連遺伝子の発現レベルが高グルコース条件下で β -カロテンにより有意に上昇することが確認された。これらの結果から、 β -カロテンは炎症関連遺伝子や活性酸素産生に関与する遺伝子の mRNA 発現レベルを上昇させることで炎症を増強することが示唆された。また、高グルコース条件下における β -カロテンによる遺伝子発現上昇のメカニズムは、未だ解明されていないため、免疫応答遺伝子である *CD38*, *ITGAL*, *NCF1B* の周辺領域におけるヒストン修飾について ChIP アッセイを用いて検討した。これら 3 つの遺伝子周辺のヒストン H3K4 ジメチル化、H3K36 トリメチル化、H3K9 アセチル化は、いずれも β -カロテン処理細胞で未処理細胞より高く、高グルコース条件下で培養された細胞で見られた。

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、H3K36 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引き起こす可能性が示唆された。

研究を通して、抗酸化成分として知られる β -カロテンは炎症に対して、自身の酸化力がかえって炎症関連遺伝子の mRNA やタンパク質の発現を促進し炎症を促進する可能性を示した。また、その炎症は遺伝子のヒストンレベルで変化を及ぼしており、今後その炎症関連遺伝子の発現に繋がる機構についてはさらなる研究が必要である。

総括

第一章では、高脂肪・高シヨ糖食を摂取したスナネズミにおける過剰な β -カロテン摂取が、線維化を促進する MMP-9 タンパク質の発現を上昇させることが明らかとなった。肝臓の損傷は、炎症性サイトカインとケモカインの放出によって肝臓への単球の浸潤が促進され、多数の炎症性単球由来マクロファージを発生させる[86]。活性化されたマウロファージは IL-1 β 、および TNF- α 等の炎症性サイトカインを分泌することによって、肝星細胞を刺激して肝コラーゲン $\alpha 1$ の生成を増加させ、最終的に線維症を引き起こすことが報告されている[87]。これらの報告を基にスナネズミの肝臓では高脂肪・高シヨ糖食由来の炎症を β -カロテンの酸化力がさらに促進させ、肝臓への単球の浸潤が促進に伴い、多数の炎症性単球由来マクロファージが発生していたと推察される。また、炎症性サイトカインが肝星細胞刺激し MMP-9 を生成し、肝臓の線維化を促進していたと考えるが、スナネズミの肝臓におけるマクロファージの働きへの β -カロテンの影響については解析ができなかった。そこで第二章では、高グルコース条件下で 幼若マクロファージ様 THP-1 細胞に β -カロテン処理した際の遺伝子発現や変動した遺伝子状のヒストン修飾への影響を検討した。上述の通り、 β -カロテンは活性酸素産生に関与する炎症関連遺伝子の発現レベルを上昇させることで炎症を増強することが明らかとなった。この炎症関連遺伝子周辺のヒストンは、H3K4ジメチル化、H3K36トリメチル化、H3K9アセチル化が、 β -カロテン処理細胞で未処理細胞より高く、高グルコース条件下で培養された細胞で見られたことから、マクロファージレベルでの炎症促進に β -カロテンが寄与していたと考える。

まとめると、高血糖由来の炎症がスナネズミの肝臓への単球の浸潤を引き起こし、単球由来のマクロファージが炎症関連遺伝子のヒストン修飾の変化をもたらし、肝星細胞の活性化することによって、肝線維化を誘導する可能性が考えられた。しかし、本研究において、細胞での検証はヒトの単球幼若マクロファージ様 THP-1 細胞株で用いたものであるため、スナネズミの肝臓において、単球の浸潤、マクロファージの活性化、それによる肝星細胞の活性化が誘導されたかは、依然として明らかではない。これらは今後の研究によって検証される必要があると考えられた。

謝辞

望月和樹先生、針谷夏代先生には、研究を通じてご指導を頂きましたこと心より御礼申し上げます。加えて、共同研究者の鈴木梨奈さん、中島勇氣さんにも感謝いたします。また、本論文の審査にかかわってくださった先生方、並びに大学関係者の皆様にも御礼申し上げます。重ねて、研究、進路、社会人生活との両立の面で多大なるお力添えを頂きました望月先生に厚く御礼申し上げます。

引用論文

1. Roberts, C.K. and R.J. Barnard, *Effects of exercise and diet on chronic disease*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(1): p. 3-30.
2. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 136-145.
3. Ardan, T., J. Kovaceva, and J. Cejkova, *Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium*. Acta Histochem, 2004. **106**(1): p. 69-75.
4. Reddy, P.Y., N.V. Giridharan, and G.B. Reddy, *Activation of sorbitol pathway in metabolic syndrome and increased susceptibility to cataract in Wistar-Obese rats*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 495-503.
5. Shanmugam, N., et al., *High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1256-1264.
6. Rossi, J.F., et al., *Dynamic Immune/Inflammation Precision Medicine: The Good and the Bad Inflammation in Infection and Cancer*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 595722.
7. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1583-1606.
8. Black, H.S. and J. Gerguis, *Modulation of dietary vitamins E and C fails to ameliorate beta-carotene exacerbation of UV carcinogenesis in mice*. Nutr Cancer, 2003. **45**(1): p. 36-45.
9. Hanachi, P. and F.S. Naghavi, *Evaluation of Antioxidant Activity of R. Slooffiae, R. Mucilaginoso Extracts*. Electron Physician, 2016. **8**(10): p. 3110-3115.
10. Stutz, H., N. Bresgen, and P.M. Eckl, *Analytical tools for the analysis of beta-carotene and its degradation products*. Free Radic Res, 2015. **49**(5): p. 650-680.
11. Zhang, H., et al., *Molecular bases of thioredoxin and thioredoxin reductase-mediated prooxidant actions of (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(12): p. 2010-2018.
12. Shaish, A., et al., *9-cis beta-carotene-rich powder of the alga Dunaliella bardawil increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients*. Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 215-221.
13. Levy, Y., et al., *Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta-carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus*. Ann Nutr Metab, 2000. **44**(2): p. 54-60.
14. Myung, S.K., et al., *Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ, 2013. **346**: p. f10.

15. Lee, C.M., et al., *The mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of beta-carotene to vitamin A*. J Nutr, 1998. **128**(2): p. 280-286.
16. Arreguin, A., et al., *Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats*. Arch Biochem Biophys, 2018. **650**: p. 75-84.
17. Kiec-Wilk, B., et al., *The CpG island methylation regulated expression of endothelial proangiogenic genes in response to beta-carotene and arachidonic acid*. Nutr Cancer, 2011. **63**(7): p. 1053-1063.
18. Marques, S.A., et al., *Induction of 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to beta-carotene oxidation products*. FEBS Lett, 2004. **560**(1-3): p. 125-130.
19. Yeh, S.L. and M.L. Hu, *Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized beta-Carotene and lycopene*. Free Radic Res, 2001. **35**(2): p. 203-213.
20. Coyne, T., et al., *Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(3): p. 685-93.
21. Zhou, Y., et al., *Association of carotenoids with risk of gastric cancer: A meta-analysis*. Clin Nutr, 2016. **35**(1): p. 109-116.
22. Druesne-Pecollo, N., et al., *Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials*. Int J Cancer, 2010. **127**(1): p. 172-184.
23. Takeda, S., et al., *Mayonnaise contributes to increasing postprandial serum beta-carotene concentration through the emulsifying property of egg yolk in rats and humans*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2011. **57**(3): p. 209-215.
24. Liu, Y., et al., *Characteristic, polymorphism and expression distribution of LCAT gene in a Mongolian gerbil model for hyperlipidemia*. Exp Mol Pathol, 2014. **97**(2): p. 266-272.
25. Kataja-Tuomola, M.K., et al., *Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on macrovascular complications and total mortality from diabetes: results of the ATBC Study*. Ann Med, 2010. **42**(3): p. 178-186.
26. Sulaeman, A., et al., *Mongolian gerbils can utilize provitamin-A carotenoids in deep-fried carrot chips*. J Nutr, 2002. **132**(2): p. 211-217.
27. Goltz, S.R., et al., *Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(6): p. 866-877.
28. Arima, S., et al., *Hypertension exacerbates liver injury and hepatic fibrosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats*. Int J Mol Med, 2014. **33**(1): p. 68-76.
29. Imaeda, M., et al., *Long-term pathological and immunohistochemical features in the liver after intraoperative whole-liver irradiation in rats*. J Radiat Res, 2014. **55**(4): p. 665-673.

30. Inami, M., et al., *Reduction of Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis by the Novel Gene Regulator PI Polyamide Targeting Transforming Growth Factor beta1 Gene*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(12): p. 1836-1842.
31. Kolodziejczyk, L., et al., *Immunoexpression of intermediate filaments and morphological changes in the liver and bile duct of rats infected with Fasciola hepatica*. Biotech Histochem, 2015. **90**(7): p. 477-485.
32. Wang, H.N., et al., *Inhibition of hepatic interleukin-18 production by rosiglitazone in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(47): p. 7240-7246.
33. Pan, X., et al., *Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients*. Endocrine, 2015. **48**(3): p. 834-847.
34. Lana, J.P., et al., *TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions*. Appl Physiol Nutr Metab, 2016. **41**(12): p. 1295-1302.
35. Yamauchi, A., et al., *Placental extract ameliorates non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by exerting protective effects on endothelial cells*. Heliyon, 2017. **3**(9): p. e00416.
36. Groblewska, M., et al., *[The role of matrix metalloproteinases in cardiovascular diseases]*. Pol Merkur Lekarski, 2011. **30**(178): p. 235-240.
37. D'Amico, F., et al., *Liver immunolocalization and plasma levels of MMP-9 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatitis C infection*. Acta Histochem, 2010. **112**(5): p. 474-481.
38. Esposito, E., et al., *Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats*. J Nutr, 2009. **139**(5): p. 905-911.
39. Bellentani, S., *The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Liver Int, 2017. **37 Suppl 1**: p. 81-84.
40. Kozłowska, J., et al., *Pigment epithelium-derived factor and matrix metalloproteinase-9 in liver cirrhosis*. Saudi J Gastroenterol, 2016. **22**(5): p. 375-379.
41. Singh, R., S. Devi, and R. Gollen, *Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life*. Diabetes Metab Res Rev, 2015. **31**(2): p. 113-126.
42. Tabas, I. and A.H. Lichtman, *Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis*. Immunity, 2017. **47**(4): p. 621-634.
43. Liao, J.K., *Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 540-541.
44. Forstermann, U., N. Xia, and H. Li, *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 713-735.
45. Maguire, E.M., S.W.A. Pearce, and Q. Xiao, *Foam cell formation: A new target for fighting*

- atherosclerosis and cardiovascular disease*. *Vascul Pharmacol*, 2019. **112**: p. 54-71.
46. Castrillo, A., et al., *Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10443-10449.
 47. Jain, S.K. and K. Kannan, *Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-alpha secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(3): p. 687-691.
 48. Wang, Y., et al., *Dietary carotenoids are associated with cardiovascular disease risk biomarkers mediated by serum carotenoid concentrations*. *J Nutr*, 2014. **144**(7): p. 1067-1074.
 49. Auguet, T., et al., *Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(12): p. 22173-22187.
 50. Yeh, S.L., et al., *Interactions of beta-carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system*. *Chem Biol Interact*, 2009. **179**(2-3): p. 386-393.
 51. Holman, R.R., et al., *10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(15): p. 1577-1589.
 52. Li, M.F., et al., *High Glucose Increases the Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Macrophages Through H3K9 Methyltransferase Mechanism*. *J Interferon Cytokine Res*, 2016. **36**(1): p. 48-61.
 53. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
 54. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
 55. Mannucci, C., et al., *Nutraceuticals against Oxidative Stress in Autoimmune Disorders*. *Antioxidants (Basel)*, 2021. **10**(2).
 56. Ghanem, A., et al., *Mutational analysis of fructose-1,6-bis-phosphatase FBP1 indicates partially independent functions in gluconeogenesis and sensitivity to genotoxic stress*. *Microb Cell*, 2017. **4**(2): p. 52-63.
 57. Van Schaftingen, E., et al., *A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate*. *Eur J Biochem*, 1982. **129**(1): p. 191-195.
 58. Cong, J., et al., *Dysfunction of Natural Killer Cells by FBP1-Induced Inhibition of Glycolysis during Lung Cancer Progression*. *Cell Metab*, 2018. **28**(2): p. 243-255 e5.
 59. Klarer, A.C., et al., *Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy*

- as a survival mechanism. *Cancer Metab*, 2014. **2**(1): p. 2.
60. Mejias, M., et al., *CPEB4 Increases Expression of PFKFB3 to Induce Glycolysis and Activate Mouse and Human Hepatic Stellate Cells, Promoting Liver Fibrosis*. *Gastroenterology*, 2020. **159**(1): p. 273-288.
 61. Volpp, B.D., et al., *Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(18): p. 7195-7199.
 62. Chen, D.F., et al., *Neutrophil Cytosolic Factor 1 Contributes to the Development of Sepsis*. *Inflammation*, 2019. **42**(3): p. 811-817.
 63. Clemens, R.A., et al., *PRAM-1 is required for optimal integrin-dependent neutrophil function*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(24): p. 10923-10932.
 64. Kasraie, S., M. Niebuhr, and T. Werfel, *Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins*. *Allergy*, 2010. **65**(6): p. 712-721.
 65. Ceriello, A., et al., *High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress*. *Diabetes*, 1996. **45**(4): p. 471-477.
 66. Schneider, M., et al., *CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0126007.
 67. Acin-Perez, R., et al., *Fgr kinase is required for proinflammatory macrophage activation during diet-induced obesity*. *Nat Metab*, 2020. **2**(9): p. 974-988.
 68. Yue, X., *Epithelial Deletion of Sulf2 Exacerbates Bleomycin-Induced Lung Injury, Inflammation, and Mortality*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017. **57**(5): p. 560-569.
 69. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. *Cell Res*, 2011. **21**(1): p. 103-115.
 70. Mews, P., et al., *Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory*. *Nature*, 2017. **546**(7658): p. 381-386.
 71. Ding, X., et al., *Mixed Lineage Leukemia 5 (MLL5) Protein Stability Is Cooperatively Regulated by O-GlcNac Transferase (OGT) and Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7)*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0145023.
 72. Maltby, V.E., et al., *Histone H3K4 demethylation is negatively regulated by histone H3 acetylation in Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(45): p. 18505-18510.
 73. Li, F., et al., *Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin*. *Cell*, 2008. **135**(2): p. 272-283.
 74. Bell, O., et al., *Localized H3K36 methylation states define histone H4K16 acetylation*

- during transcriptional elongation in *Drosophila*. EMBO J, 2007. **26**(24): p. 4974-4984.
75. Carrozza, M.J., et al., *Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription*. Cell, 2005. **123**(4): p. 581-592.
 76. Joshi, A.A. and K. Struhl, *Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 971-978.
 77. Peng, C.H., et al., *Sirt1--a sensor for monitoring self-renewal and aging process in retinal stem cells*. Sensors (Basel), 2010. **10**(6): p. 6172-6194.
 78. Nono, M., et al., *Intestine-to-Germline Transmission of Epigenetic Information Intergenerationally Ensures Systemic Stress Resistance in C. elegans*. Cell Rep, 2020. **30**(10): p. 3207-3217 e4.
 79. Nowak, S.J. and V.G. Corces, *Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation*. Trends Genet, 2004. **20**(4): p. 214-220.
 80. Kameji, H., et al., *beta-Carotene accumulation in 3T3-L1 adipocytes inhibits the elevation of reactive oxygen species and the suppression of genes related to insulin sensitivity induced by tumor necrosis factor-alpha*. Nutrition, 2010. **26**(11-12): p. 1151-1156.
 81. Zhou, F., et al., *beta-Carotene conversion to vitamin A delays atherosclerosis progression by decreasing hepatic lipid secretion in mice*. J Lipid Res, 2020. **61**(11): p. 1491-1503.
 82. Li, S., et al., *All-trans retinoic acid promotes macrophage phagocytosis and decreases inflammation via inhibiting CD14/TLR4 in acute lung injury*. Mol Med Rep, 2021. **24**(6).
 83. van het Hof, K.H., et al., *Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(2): p. 261-268.
 84. Mathews-Roth, M.M., et al., *Beta carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases*. Arch Dermatol, 1977. **113**(9): p. 1229-1232.
 85. Kuppen, G., et al., *Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes*. Cytokine, 2010. **49**(2): p. 229-234.
 86. Tacke, F., *Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases*. J Hepatol, 2017. **66**(6): p. 1300-1312.
 87. Nakamura, T., et al., *Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats*. Hepatology, 2000. **32**(2): p. 247-255.
 88. N. Sakurai., et al., *Modifications of histone H3 at lysine 9 on the adiponectin gene in 3T3-L1 adipocytes*, J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2009 Vol. 55 Issue 2 Pages 131-138
 89. K. J. Livak and T. D. Schmittgen ., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*, Methods 2001 Vol. 25 Issue

4 Pages 402-408

論文内容の要旨

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

氏 名 近藤 真之祐

【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による消費カロリーの減少などによって、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、中性脂肪が肝臓に蓄積する脂肪肝や、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、Interleukin(IL)- 1β 、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。

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で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することで知られ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はまだ明らかになっていない。そこで2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検討し

た。

第一章

【方法】

第一章：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。 β -カロテンを摂取させたスナネズミの肝臓におけるIL-18タンパク質発現は、スナネズミに β -カロテンの有無にかかわらず高脂肪/高シヨ糖食を与えても変化しなかった。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、1日培養後、総RNA及びクロマチン免疫沈降(ChIP)用のサンプルを回収し、 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(*FBP1* 及び *PFKFB3*)、ROS 産生に関連する遺伝子(*NCF1B*、*PLC β 2* 及び *PRAM-1*)、及び炎症に関与する遺伝子(*IL31RA*、*FGR*、*CD 38*、*SULF2* 及び *CSF3R*) 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 *CD38*、*ITGAL* 及び *NCF1B* 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 H3K4 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、それらのなかの *CD38*、*ITGAL* 及び *NCF1B* 遺伝子において周辺のヒストン H3 アセチル化、ヒストン H3K4 ジメチル化、H3K36 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引き起こす可能性が示唆された。

【結論】

研究を通して、抗酸化成分として知られる β -カロテンは炎症に対して、自身の酸化力がかえって炎症性サイトカインやタンパク質の発現を促進し炎症を促進する可能性を示した。また、その炎症は遺伝子のヒストンレベルで変化を及ぼしていることが明らかとなった。