

博士論文

ラクトフェリンが脂質代謝に与える
影響の多面的検討

森下 聡

目次

略語表	p 3
序章	p 5
第1章 ラクトフェリンの ICR マウスに対する内臓脂肪低減作用	p 15
序	p 16
材料・方法	p 17
結果	p 20
考察	p 22
第2章 ラクトフェリンの脂肪肝モデル細胞に対する細胞死抑制作用	p 32
序	p 33
材料・方法	p 38
結果	p 43
考察	p 46
第3章 高コレステロール血症・動脈硬化症モデル動物に対する 腸溶性ラクトフェリンの効果	p 62
序	p 63
材料・方法	p 67
結果	p 72
考察	p 74
総合討論及び将来展望	p 103
参考文献	p 110
要旨	p 124
謝辞	p 128

略語表

MetS : metabolic syndrome
LF : lactoferrin (ラクトフェリン)
eLF : enteric lactoferrin (腸溶性ラクトフェリン)
iLF : immunoreactive lactoferrin
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ
LRP1 : low density lipoprotein-related protein 1
HSL : hormone-sensitive lipase
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
CT : computed tomography
BMI : body mass index
Glu : glucose
Cho : cholesterol
TG : triglyceride
NEFA : non-esterified fatty acids
FA : fatty acid
HDL : high density lipoprotein
LDL : low density lipoprotein
NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease
NASH : non-alcoholic steatohepatitis
PBS : phosphate buffered saline
MES : 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
FBS : fetal bovine serum

DMEM : dulbecco's modified eagle medium

HepG2 : hepatocarcinoma G2

BSA : bovine serum albumin

LDH : lactate dehydrogenase

ER : endoplasmic reticulum

SDS : sodium dodecyl sulfate

PAGE : poly-acrylamide gel electrophoresis

TBS : tris-buffered saline

JNK : c-Jun N-terminal kinase

PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase

MAPK : mitogen-activated protein kinase

HMGCR : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase

SREBP-2 : Sterol regulatory element-binding protein 2

SD : standard deviation

SE : standard error

ANOVA : analysis of variance

MS : mass spectrometry

序章

「メタボリックシンドローム」は、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖・高血圧・脂質異常症のうち、2つ以上を合併した状態と定義され、動脈硬化性疾患のリスクファクターとして認知されている。2008年の日本政府の調査によると、40歳から75歳までの人のうち、25%の男性と10%の女性がメタボリックシンドローム（MetS）に罹患していることが強く疑われており[1]、その数は過去20年間において、顕著に増加しているとの結果が得られている。さらに近年、生活習慣病の末期である動脈硬化の発症と内臓脂肪量が強い相関を示すことが明らかにされたことから[2, 3]、内臓脂肪の蓄積がMetS形成の主な原因の一つであることが認知されるようになった。社会環境としては、先進国は基より、発展途上国の富裕層においても、栄養過多、運動不足、ストレスの増加などの生活習慣の変化を背景にし、世界中でMetSの患者が急増し、大きな社会問題となっている。すなわち、国民の健康維持及び高騰する医療費の抑制には、MetSに罹患する前の内臓脂肪の蓄積を予防することが非常に重要である。

日本において、2008年4月より、MetSの診断を目的とした「特定健康調査・特定保健指導」が施行され、行政レベルでの対応の開始と併せて、国民にも広く知れ渡るきっかけとなった。MetSの診断基準としては、内臓脂肪面積100 cm²に相当する「ウエスト周囲径」として、男性85 cm以上、女性90 cm以上に加え、血糖値、血中脂質濃度、血圧のいずれか2項目以上が、表0-1に示した条件を満たす場合をMetSと規定している。従来、脂肪組織はエネルギーの貯蔵庫として考えられてきたが、近年の研究により、多彩なアディポカインを産生する巨大な内分泌臓器であることが明らかとなってきた：善玉アディポカインとして脂肪酸の燃焼作用が報告されているアディポネクチンや、悪玉アディポカインとして、炎症性サイトカインであるTNF α やPAI1等が報告されている[4]。内臓脂肪の過剰な蓄積は、これらアディポカインの分泌バランスに異常をきたすことから、内臓脂肪のコントロールが非常に重要である。

ラクトフェリン（以下、LF）は、1939年にSørensenらによって乳中から発見された分

子量約 8 万（アミノ酸残基数 ヒト；682 残基、ウシ；689 残基）の糖タンパク質である。粉末は赤色を呈することから（図 0-1）、赤いタンパク質ともよばれ、その赤色は、LF 分子への鉄原子の結合（最大 2 原子）によるものであることが明らかとなっている。また、構造的特徴としては、N ロープと C ロープから構成されており、それぞれに鉄原子を 1 つずつ配意することができる[5]。母乳、特に初乳中に高濃度含まれる事から（表 0-2、表 0-3）[6]、新生児の初期免疫防御に重要な役割を示すことが考えられていた。LF の主たる生理作用の一つである抗菌作用に関しては、LF がグラム陰性菌の主たる表面成分である Lipopolisaccharide (LPS) と結合し中和すること[7]、その作用機序として、カチオン性タンパク質（等電点 8.2~8.9）であることが報告されている[8]。その他にも、アポラクトフェリン等の鉄が飽和していない LF による静菌作用が報告されており、生育に必要な鉄原子をキレートすることにより、効果が発揮されることが知られている[9]。LF の抗菌作用に関して、より効果の強いフラグメントが同定されている。N 末端側に塩基性アミノ酸が集合した領域が存在し、LF が胃の消化酵素であるペプシンで分解されることにより、切り出されることが報告されている[10]。ヒトでは N 末端 47 残基が、ウシでは、N 末端 25 残基が該当し、ラクトフェリンシンと呼ばれている。抗菌作用以外にも、抗ウイルス作用を示す報告があるなど[11-13]、様々な作用機序にて感染を抑えることを示唆する報告がされている。ヒトにおける有効性についても、多くの臨床試験が行われており、メタアナリシスにおいて、ヘリコバクターピロリ菌に対する感染防御作用や早産時に対する敗血症の抑制効果に関して、LF の効果が期待できる結果が得られている[14, 15]。

上記感染防御作用だけでなく、抗癌作用[16, 17]、抗貧血作用[18]、免疫調節作用[19]、脂質代謝改善作用[20]等も報告されている。母乳中に含まれる成分である事から安全性も高く、ウシ由来 LF 原料に関して、アメリカでは、いわゆる一般的に安全な食品（Generally Recognized as Safe ; GRAS）として登録されており、欧州では、欧州内での食経験が十分ではない新規食品のうち、安全性が担保されている食品に分類される「Novel Food」にも登

録されている。日本でも、食品添加物として認可されていることもあり、人の健康に寄与する成分として、様々な分野での基礎研究及び応用研究が進められている。

我々は、LFのこれら機能のうち、脂質代謝改善作用に着目して研究を進めている。脂質代謝研究に関する先行知見としては、Takeuchiらによって、ICRマウスにウシ由来のLFを投与することにより、遊離脂肪酸（NEFA）に加え、血漿中の中性脂肪（TG）濃度、肝臓中のコレステロール（Cho）およびTGが有意に低下することが報告されていた[21]。一方、我々は、LFに強いLPS中和効果があることに着目し、歯周病予防シーズとしての開発を進めていた。その中で、歯周病と全身健康の関連性を示す疫学研究の報告もされ出したことから、全身健康に関するパラメータも含めて検討していた。マウスに対してLFを経口投与することにより、LPS誘導性の脂質代謝異常を抑制するのに加え、LF投与群では、内臓脂肪組織が小さいということに気付いたことを契機に、我々はLFの脂質代謝改善作用、特に内臓脂肪低減作用に着目した研究を開始した。我々は、ターゲットとなる内臓脂肪に対するLFの作用を明らかにするため、ラット腸間膜脂肪由来前駆脂肪細胞を用いた検討を行った。その結果、既報[22]と同様、LFの添加により、脂肪蓄積が抑制されると共に、脂肪細胞への分化に必要な主要転写因子（PPAR γ 等）の遺伝子発現上昇が抑制されたことから、脂肪細胞への分化が抑制されていることを確認した[23]。また、同培養系において、成熟脂肪細胞にまで分化させた脂肪細胞に対するLFの作用も検討し、培養上清中のグリセロール濃度が有意な増加を示すことから、脂肪分解促進にも効果があることを明らかにした[24]。これら報告において、代表的な胃の消化酵素であるペプシンによって分解したLFの効果も検証したところ、両評価系においてその効果は認められなかった。このことから、LFの本作用を発揮するには、一定以上の大きさのフラグメントが必要であることが明らかとなった。また、Sprague-Dawleyラットを用いて経口投与したLFの体内動態を解析し、LFが主に腸間膜脂肪組織で検出されることを見出した[23]。これら知見より、我々は、LFの内臓脂肪低減作用に対し、腸溶加工されたLFが効果的であろうとの仮説を立てた。そこで我々は、胃の

分解を避けるために腸溶性 LF (eLF) 錠剤を用いて、腹部肥満傾向の日本人男女を対象とした二重盲検群間比較試験を行ったところ、8 週間の eLF の摂取により、プラセボ群と比較して腹部臍帯部の内臓脂肪面積が有意に低下することを確認した (図 0-2)。本試験により、ヒトにおいて LF の内臓脂肪低減効果を証明した。本作用機序を明らかにするため、成熟脂肪細胞に対する脂肪分解作用に関する作用受容体の同定を進めた。LF の受容体は複数同定されており、代表的な受容体としては、小腸においては、小腸上皮細胞に存在し、LF のエンドサイトーシスに関わる *Intelectin* が同定されている[25, 26]。肝臓においては、カイロミクロレムナントの取り込み受容体として知られる LRP1 受容体が、LF の受容体であることが明らかにされている[27]。これら受容体のうち、腸間膜脂肪組織に発現している LRP1 受容体に着目し、関与を検証した。その結果、LRP1 受容体のサイレンシングにより、LF 添加による培養上清中のグリセロール濃度の上昇およびホルモン感受性リパーゼ (HSL) のリン酸化が減弱し、有意差が認められなくなったことから、LF の脂肪分解作用に LRP1 受容体が関与していることを明らかにした[28]。

しかしながら、LF の内臓脂肪低減機序については、先に述べた脂肪細胞に対する作用に関する報告のみであり、全貌は明らかになっていない問題点があり、動物モデル確立が重要課題である。また、ヒトにおける内臓脂肪低減効果を確認しているが、その他の *MetS* 諸症状に対する効果も未検討であった。そこで本論文では、LF の内臓脂肪低減機序解明を目指した動物モデルの確立と、*MetS* 症状に対する LF の有効性を明らかにする事を目的とした。

第 1 章では、LF の内臓脂肪低減効果を検出可能な動物モデルの確立を検討した。第 2 章では、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) モデル細胞を用いて、肝臓に対する LF の直接効果を検討した。第 3 章では、高コレステロール血症および動脈硬化症に対する LF の効果を *in vivo* で明らかにするため、ヒトと食事・睡眠習慣や脂質代謝機構が近く、かつ、短期間 (8 週間) でアテローム性動脈硬化症を誘導可能なマイクロミニピッグを用いて eLF の有効性を検討した。

表 0-1. メタボリックシンドローム診断基準

検査項目	基準値
腹囲	男性 85 cm 以上 女性 90 cm 以上
上記条件を満たし、かつ、下記 3 項目のうち 2 項目以上	
①血糖値 (高血糖)	空腹時血糖値が 110 mg/dL 以上
②血中脂質濃度 (脂質異常症)	中性脂肪が 150 mg/dL 以上 または HDL コレステロールが 40 mg/dL 未満
③血圧 (高血圧)	収縮期血圧が 130 mmHg 以上 または 拡張期血圧 85 mmHg 以上

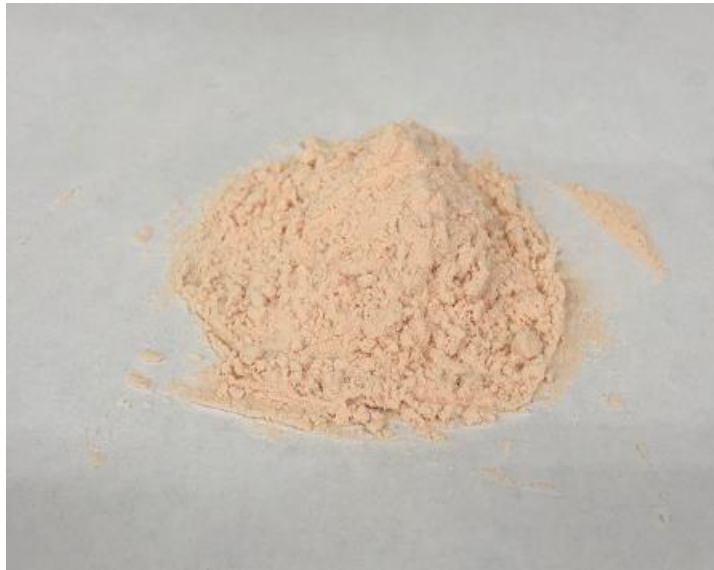


図 0-1. LF 粉末の外観

表 0-2. 乳中 LF 濃度($\mu\text{g} / \text{mL}$)

人乳 (母乳)	初乳	6,000~8,000
	常乳	2,000~4,000
牛乳	初乳	~1,000
	常乳	20~350

表 0-3. ヒト外分泌液中の LF 濃度 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

唾液	5~10
耳下腺唾液	2~3
涙	700~2,200
鼻汁	100
胆汁	10~40
膵液	500
尿	1
血液	0.1~2.5

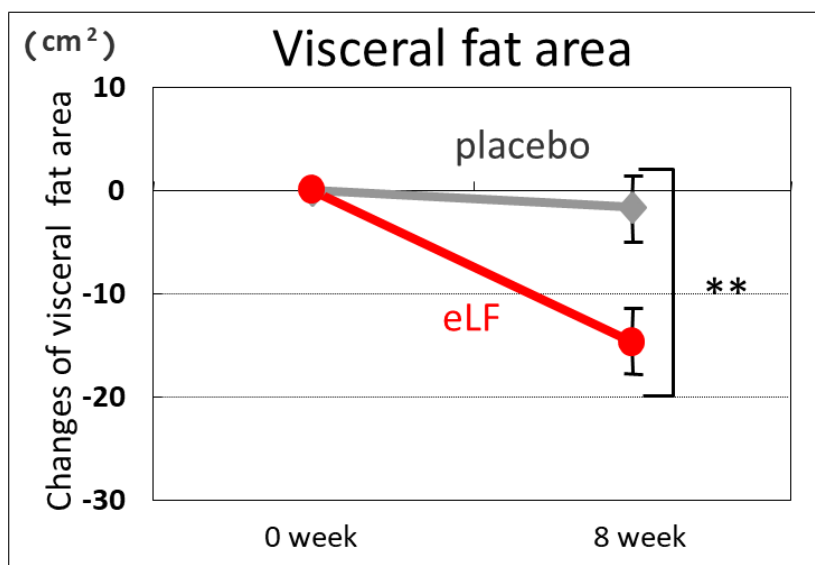


図 0-2. 二重盲検群間比較試験による腸溶 LF の内臓脂肪低減効果の検証
 腹部肥満傾向の日本人男女 26 名に対し、プラセボ錠 (n=13、LF を乳糖に置き換えた錠剤)、
 もしくは腸溶 LF 錠 (n=13、LF として 300 mg/day) を 8 週間摂取してもらい、摂取 8 週
 後の臍帯部の内臓脂肪面積を CT にて測定した。

(Ono, T., et al. Br J Nutr, 2010. 104(11): p1688-95.の結果を図として掲載)

第1章 ラクトフェリンの ICR マウスに対する内臓脂肪低減作用

<序>

LFによる内臓脂肪低減機序を明らかにするため、内臓脂肪減少効果を検出可能な動物モデルの構築を検討した。LF投与による内臓脂肪低減モデルはほとんど報告されておらず、先行報告としては、Shiらが、50日間の食餌制限条件において、C57BL6/Jマウスに対し、LFを混餌投与することにより、内臓脂肪を含む体脂肪率が有意に低下することを報告していた[29]。しかし、Shiらの報告では、食餌制限を加えているため、MetSの諸症状及び内臓脂肪蓄積を抑制するモデルとしては不適切であると考え、カロリー制限の無い条件でのモデル確立が重要であると考えた。参考になる文献として、内臓脂肪には着目していないが、LFの脂質代謝改善作用についてSprague-Dawleyラットを用いた高脂肪食餌誘発性肥満モデル(Diet-induced Obesityモデル; DIOモデル)での検討結果が報告されていた[21]。しかしながら、血清脂質パラメータ、肝臓中のTGおよび総Cho濃度に対するLFの効果について有意差をもって確認できていなかった。我々もトレース実験を行ったが、上記パラメータに加え、内臓脂肪組織重量においても有意な低減効果は認められなかった。著者らは、通常食モデルにおいては、LFによる血中脂質の有意な低下効果を報告していることから、カロリー摂取量が高すぎることを原因と考え、通常食の自由摂取条件での内臓脂肪低減モデルの確立を行う事とした。その際、序章にも記載したように、LFが分解されずに腸に届くことも重要である。混餌投与と比較し、ゾンデ投与の方がインタクトなLF及び免疫反応性LF((ELISAで定量したLF;iLF)共に、腸での検出量が顕著に多いことから[30]、投与方法を強制胃内投与(ゾンデ投与)に設定し、モデル確立を検討した。

<材料・方法>

動物と飼育餌

すべての動物実験は、ライオン（株）が制定した「実験動物のケアおよび飼養」のガイドラインに従って実施した。7週齢の雄性 ICR マウスを日本 SLC（静岡、日本）から購入し、12時間の明暗サイクル下及び一定温度下（22 ± 1°C）で飼育した。実験用粉餌（対照食；RD12450B、Research Diet（株）、New Brunswick、USA）（表 1-1、1-2）の摂取および蒸留水の飲水は自由とした。8週齢の時点において、平均体重が等しくなるようにマウスを2群に分けた。一方の群に 0.5 mL の蒸留水（Distilled water; DW 群）を投与し、他方の群に、0.5 mL の DW 中に溶解した 100 mg の LF（Friesland Campina、Amersfoort、Netherlands）を投与した（LF 群）。両群共ゾンデ投与により、毎日 1 回、同じ時刻に投与した。28 日目に、マウスを 16 時間絶食させ、ペントバルビタール麻酔下で解剖を行った。血液を下大静脈から採取した後、マウスを放血により安楽死処置を行った。腸間膜脂肪組織および肝臓を採取・秤量後、-80°C で保存した。血液は、室温で 2 時間静置後、遠心処理を行い、上清を回収して血清とした。

血清中及び肝臓中脂質分析

血清中の総 Cho、NEFA、TG およびグルコース（Glu）濃度は、各々、コレステロール E-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセリド E-テストワコー、およびグルコース C-テストワコー（和光純薬工業、大阪、日本）を用いて測定した。肝臓脂質は Folch らの方法を用いて抽出した。肝臓脂質を 2-プロパノールに再溶解し、対応する Wako 試験キットを用いて肝臓中の TG および総 Cho 濃度を測定した。

LF の体内動態解析

8 週齢の ICR マウスを 1 週間飼育し、16 時間絶食させた。その後、100 mg の LF (20%(w/v) 水溶液を 0.5 mL) をゾンデ投与によりマウスに投与した。ペントバルビタール麻酔下で LF 投与の 15、30、60 および 120 分後に解剖した (各群 n = 6)。対照マウスに対しては、0.5 mL の DW を投与した後、ペントバルビタール麻酔下で解剖を行った。解剖の手順としては、血液を下大静脈から採取した後、放血によりマウスの安楽死処置を行った。その後、腸間膜脂肪組織および肝臓を採取・秤量後、 -80°C で保存した。さらに、小腸を採取し、小腸の中心で胃側 (小腸上部) と大腸側 (小腸下部) に分割後、それぞれの内容物を 1% protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) 及び 1 mM メシル酸カモスタット (035-17763、和光純薬工業) 含有生理食塩水で溶出した後、超音波破碎を 1 分を行った。本溶液を生理食塩水で 10 倍希釈を行った後に -80°C で保存した。

腸間膜脂肪および肝臓は、組織を裁断後、1% protease inhibitor cocktail を添加した生理食塩水を組織重量の 10 倍量 (w/v) 添加し、ヒスコトロン (マイクロテック・ニチオン) で破碎した。水溶液を 4°C 、10,000 rpm で 5 分間遠心して回収した上清を、組織抽出液とした。これら組織抽出液、小腸内容物および血清中の LF 濃度を、ELISA 法もしくは SDS-PAGE 法によって定量した。iLF 濃度を定量するために、Bovine Lactoferrin ELISA Quantification kit (Bethyl Laboratory, Montgomery, TX, USA) および ELISA Starter Accessory Package (Bethyl Laboratory) を使用した。SDS-PAGE による分析には、NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (NP0342BOX, Invitrogen) を購入し、MES ランニングバッファーを用いた。ゲルイメージにおける全長 LF の定量のために、LabWorks ver4.6.00.0 Image Acquisition および分析ソフトウェア (共に Ultra-Violet Products Limited, Cambridge, UK) を使用した。

統計解析

データは平均 ± 標準誤差 (SE) にて示した。体重、血中脂質及び肝臓中脂質データに関しては、Student t 検定を用いた。ELISA による iLF の定量値に関しては、Dunnett 検定を用いて比較した。統計的有意水準を $p < 0.05$ に設定し、解析には、JMP ver5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

<結果>

LF 投与が ICR マウスの内臓脂肪蓄積と脂質代謝関連指標に与える影響

図 1-1a および 1b に、LF および DW 群における体重の経時変化と、評価期間中の体重増加量を示した。LF 群の成長曲線は、DW 群の成長曲線より上回ったが、評価開始 1 週間から 4 週間いずれの時点においても、2 群間の体重に統計学的に有意な差は認められなかった (図 1-1a)。また、評価期間中の体重増加量に関しても、LF 群が 7.3 ± 2.3 g、DW 群が 5.5 ± 2.0 g であり、2 群間に統計学的有意差は認められなかった (図 1-1b)。食餌摂取カロリーについても、LF 群と DW 群で有意な差は認められなかった (図 1-1c)。次に、肝臓、腸間膜脂肪重量、血清脂質及び肝臓脂質パラメータについて比較した結果を示す (表 1-3)。肝臓重量に関して、DW 群と LF 群との間に有意な差は認められなかったが、腸間膜脂肪重量に関しては、DW 群と比較して LF 群で有意に低かった (DW 群 ; 0.43 ± 0.03 g、LF 群 ; 0.28 ± 0.04 g、 $p < 0.05$)。血清脂質に関しては、4 指標 (NEFA、Glu、TG、総 Cho 濃度) 全てにおいて 2 群間で有意な差は認められなかった。一方、肝臓中脂質に関しては、TG 濃度において、DW 群と比較して LF 群で有意に低かった (DW 群 ; 16.3 ± 1.8 mg/g-liver、LF 群 ; 6.5 ± 0.7 mg/g-liver、 $p < 0.01$)。腸間膜脂肪重量と肝臓中 TG 濃度との相関解析を行った結果、両指標間には、有意な正の相関が認められた ($R = 0.581$ 、図 1-2)。

経口投与 LF の小腸、内臓脂肪、肝臓及び血中分布

図 1-3 では、LF 投与後の小腸における全長 LF 量の経時変化を示した。小腸上部において、全長 LF のバンド (80 kDa 付近) が 15 分および 30 分後で観察されたが、小腸下部においてはどの時間帯でも観察されなかった (図 1-3a および 3b)。デンストメーターを用いて定量した結果、小腸上部における全長 LF の最大量は、投与後 15 分で 0.38 mg であり、その後減少し、60 分後では検出されなかった (図 1-3c)。一方、小腸下部ではいずれの時点でも全長 LF は検出されなかった (図 1-3d)。iLF は、小腸上部において LF 投与 15 分後、

小腸下部では、30分後に最大の検出量を示した（それぞれ 1.33 および 0.47 mg ; 図 1-4a および b）。DW 群で検出された iLF の値は本 ELISA 系の検出限界以下であったが、有意差検定を行ったところ、小腸上部及び下部共に LF 投与 15 分および 30 分後で、iLF の有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。腸間膜脂肪組織においては、LF 投与 15 分後で、DW 群と比較して有意な増加が認められた ($p < 0.05$ 、図 1-5)。投与後 30~120 分で、LF 群の平均 iLF 量は DW 群より高かったが、統計学的な有意な差は認められなかった。肝臓および血清においては、DW 群および LF 投与後いずれの時点でも、全て検出限界以下であった（データ未掲載）。

< 考察 >

本研究では、LF 摂取による内臓脂肪減少メカニズムを解析するために、動物モデルの確立を試み、ゾンデ投与による 4 週間の LF 投与が腸間膜脂肪重量および肝臓中 TG の濃度を有意に減少させることを明らかにした (表 1-3)。原著論文が公開された時点において、食餌自由摂取条件における LF の内臓脂肪低減効果に関する報告はされておらず、本研究は、カロリー制限を加えない動物モデルにおいて、LF の内臓脂肪減少効果を示した最初の報告である。一方、脂質代謝に及ぼす LF の有益な効果に関しては、動物レベルの検討ですでに報告されている。Takeuchi らは、通常食に 1%濃度で LF を含有させることにより、ICR マウスにおける血漿中の TG、NEFA、肝臓中の TG および Cho 濃度を有意に減少させることを報告した[21]。Kawashima らは、LF を 2%濃度で食餌に含有した条件で評価を行い、10 ヶ月齢の C57BL/6Cr マウスにおいて血清 NEFA 濃度が有意に低下することを報告している[31]。本研究では、先行研究とは異なり、血清中の脂質パラメータに有意な変化は認められなかった。先行研究と条件が異なるためと考えられるが、NEFA、TG、Cho に関しては、LF 投与群では平均値として低値を示していたこと、肝臓中 Cho に関しても平均値として低値を示していたことから (表 1-3)、より長期間の評価を行う等、評価系を改良することにより、有意差が得られるものと考えられた。

LF の体内動態解析に際し、投与量の設定を下記の考え方にに基づき設定した。我々の以前の報告では、DW に溶解した LF (1000 mg) を Sprague-Dawley ラット (平均体重 約 330 g) に投与することにより、小腸における全長 LF の存在を確認した[23]。本研究では、16 時間絶食後の ICR マウス (9 週齢) の平均体重は約 35g であり (データ未掲載)、単位体重当たりの投与 LF 量を以前の検討と一致させるため、本検討では 100 mg の LF を投与した。その結果、小腸における全長 LF の最大量は 0.38 mg (0.38%) であった (図 3c)。本実験では、投与 15 分後に全長 LF が検出されたが、検出された量は、前報告の 1/10 未満であった。マウスの胃におけるプロテアーゼ酵素活性はラットよりも高く、マウスの胃における滞

留時間はラットのそれよりも長い可能性が考えられた。体内動態解析の結果においては、腸間膜脂肪組織においてのみ、LF が検出された (図 1-5)。Fischer らは、経口投与した LF の体内動態解析を実施し、肝臓だけでなく、腎臓および脾臓等における LF 量の比較を行い、肝臓で最も LF が検出されたことを報告している[32]。本章における結果と本先行知見を併せ、LF を経口投与した場合、腸間膜脂肪は最も高濃度で到達する臓器の一つであることが考えられた。一方、上記 Fischer らの報告では、全長 LF を血漿中でも検出している。その理由として、著者らは、自身で作成した LF 抗体を用いており、我々が用いている検出系より、検出感度が 5~10 倍程度高いことが挙げられる。また、静脈注射で LF を投与した場合は、肝臓に最も局在することも報告されている[33]。こうしたことから、我々の検討において肝臓や血清において LF が検出されなかった原因としては、用いた ELISA キットの検出感度が十分でなかったことが挙げられ、肝臓等においても LF が到達・局在している可能性は十分に考えられる。そのため、肝臓にも LF が到達していると考え前提に立ち、腸間膜脂肪重量および肝臓中の TG 濃度が、LF 投与で有意に減少し、これら項目の間には正の相関が認められた結果について考察を加えたい (表 1-3、図 1-2)。序章でも述べたように、肝臓や腸間膜脂肪に存在する LF の受容体として LRP1 受容体が同定されている。LRP1 受容体は、食物由来の脂質を肝臓に運ぶカイロミクロンレムナントの取り込みに関与する重要な受容体としても知られている。Crawford と Borensztajn らは、尾静脈投与した LF が肝臓で LRP1 受容体と結合し、カイロミクロンレムナントの血漿からのクリアランスを抑制することを報告している[27]。また、脂肪組織における LRP1^{-/-}マウスを用いた研究により、全身性に脂肪量が減少し、DIO を抑制できることを示した[34]。これらの報告より、本研究で得られた、内臓脂肪および肝臓中の TG の減少は、LF が LRP1 受容体へ結合し、脂質吸収を阻害することによって誘導されている可能性が考えられた。しかしながら、我々の検討において、血漿中の脂質関連パラメータは、LF 投与の影響を受けなかった。したがって、血液からクリアランスされなかった脂質の代謝の主要組織を同定することは非常に重要で

あり、LF が単に吸収の阻害因子として働いているだけでなく、エネルギー消費の主な組織である筋肉や脂肪酸代謝の主要組織である肝臓に対して作用している可能性を検証していくことが重要である。特に肝臓では、LRP1 受容体が高発現していることが知られていることから、すでに述べたように cAMP 経路や ERK1/2 経路を活性化することが報告されている LRP1 受容体を介した検証が優先課題である[24, 28, 35]。また、LF が最も高濃度で到達しているのは小腸であり、LF が小腸に影響を与える可能性も考えられる。Takeuchi らは、LF 添加飼料を摂取したラットと非添加餌を摂取させた群の比較において、LF 摂取群の胸部リンパ液中の TG 値の低下を報告しており、LF が食餌中の TG の吸収を阻害することが示唆されている[21]。このメカニズムは依然として不明であるが、本仮説検証には、*in vivo* での検証が適しており、本章で確立した動物モデルを用いた更なる検討が必要である。

表 1-1. RD12450B の組成

Class description	Ingredient	Grams
Protein	Casein, Lactic, 30 Mesh	200.00 g
Protein	Cystine, L	3.00 g
Carbohydrate	Sucrose, Fine Granulated	354.00 g
Carbohydrate	Starch, Corn	315.00 g
Carbohydrate	Lodex 10	35.00 g
Fiber	Solka Flocc, FCC200	50.00 g
Fat	Soybean Oil, USP	25.00 g
Fat	Lard	20.00 g
Mineral	S10026B (RD-96 Mineral Mix)	50.00 g
Vitamin	Choline Bitartrate	2.00 g
Vitamin	V10001C (AIN-76A Vitamin Mix (10X Concentration))	1.00 g
Dye	Dye, Yellow FD&C #5, Alum. Lake 35-42%	0.05 g
Total:		1055.05 g

Research Diet 社 HP 情報に基づき作成

表 1-2. RD12450B のカロリー比率

Caloric Information	
Protein:	20% kcal
Fat:	10% kcal
Carbohydrate:	70% kcal
Energy Density:	3.82 kcal/g

Research Diet 社 HP 情報に基づき作成

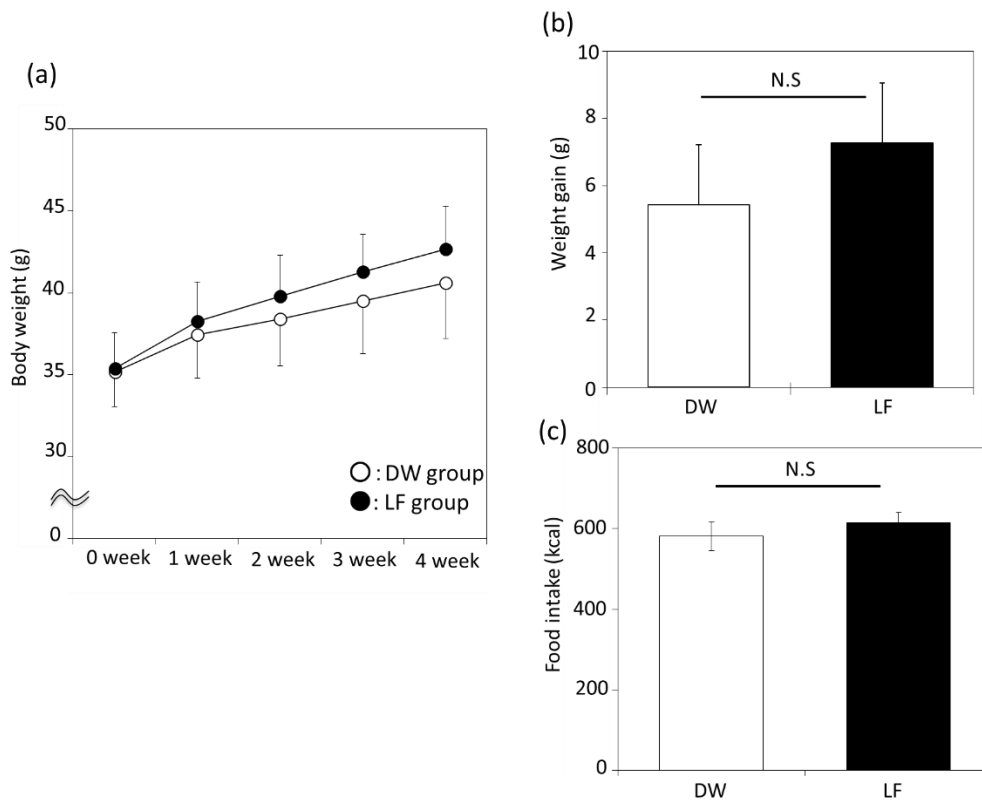


図 1-1 LF が ICR マウスの体重に与える影響

(a) 成長曲線 (各群 n = 9)、(b) 4 週間の体重増加量 (各群 n = 9)、
(c) 摂取量 (kcal ; 各群 n = 9)。
データは平均 ± SE で表記した。 DW 群; (○) 、 LF 群; (●)。

表 1-3. LF が組織重量、肝臓脂質及び血清脂質パラメータに与える影響

Measurement		DW	LF	p-value
Tissue weight	Liver (g)	1.53 ± 0.05	1.67 ± 0.08	0.15
	Mesenteric fat (g)	0.43 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.01*
Serum lipids	NEFA (mEq/L)	0.90 ± 0.05	0.83 ± 0.07	0.37
	Glucose (mg/dL)	111 ± 6	125 ± 8	0.18
	Triglyceride (mg/dL)	104 ± 18	91 ± 17	0.61
	Cholesterol (mg/dL)	109 ± 10	104 ± 8	0.68
Liver lipids	Triglyceride (mg/g-liver)	16.3 ± 1.8	6.5 ± 0.7	0.0001**
	Cholesterol (mg/g-liver)	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.14

LF を 4 週間経口投与した後、マウスを 16 時間絶食させ、ペントバルビタール麻酔下で解剖した。血液を下大静脈から収集して血清を調製した。その後、腸間膜脂肪及び肝臓を採取し、重量を測定した。肝臓脂質は、Folch 法に従い抽出し、脂質パラメータは、テストワコーキットを用いて測定した。データは、平均 ± SE として表示した

(各群 n = 9)。* p < 0.05、** p < 0.01 (vs DW 群、Unpaired Student-t)。

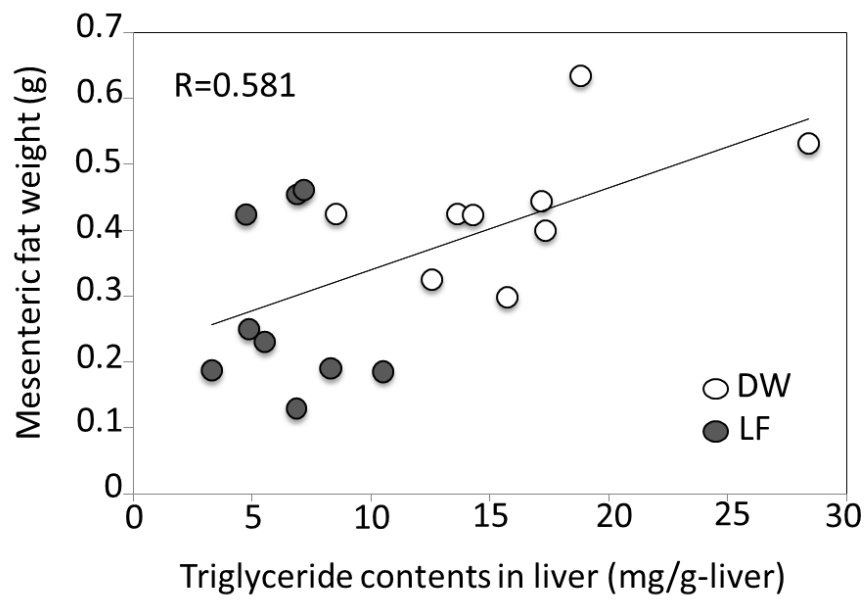


図 1-2. 腸間膜脂肪重量と肝臓中 TG 濃度との相関

DW 群; (○)、LF 群; (●)。ピアソンの相関係数検定表に基づいて検定を行った。

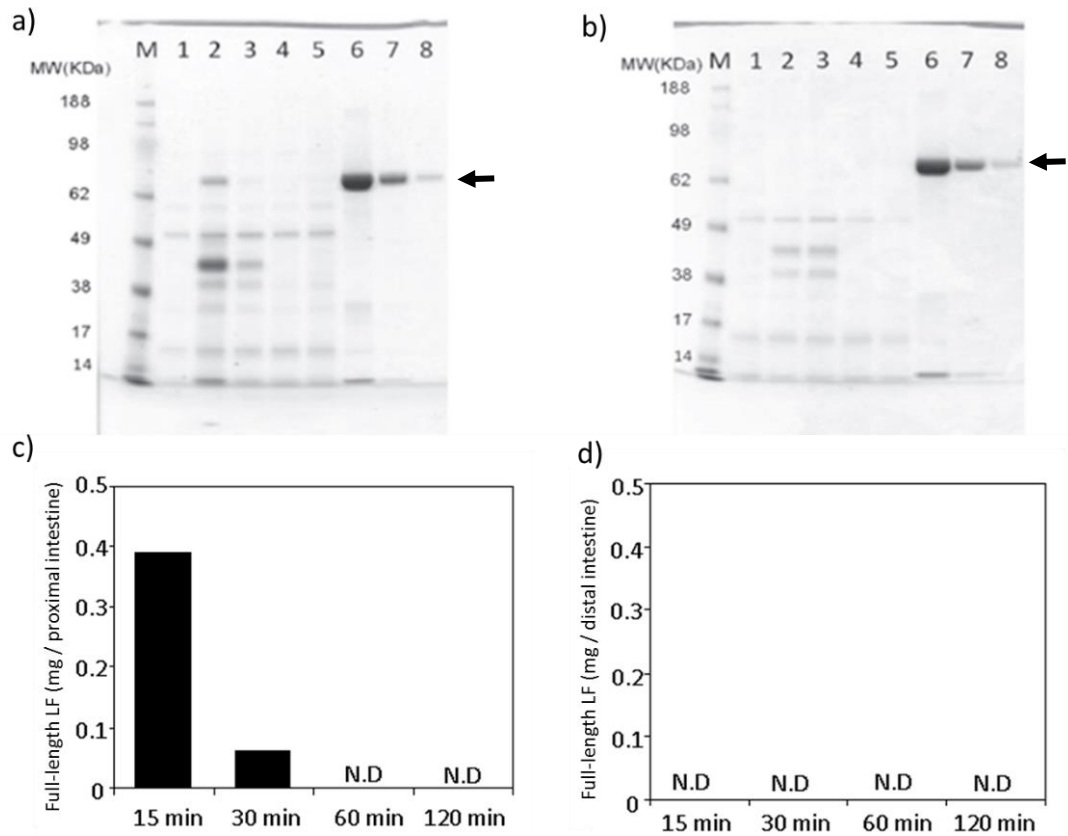


図 1-3. LF 経口投与後の小腸における全長 LF 量

小腸上部および下部のサンプルを各々プールし (各群 $n = 6$)、SDS-PAGE により分析した。(a) 小腸上部内容物の SDS-PAGE 画像、(b) 小腸下部内容物の SDS-PAGE 画像。M : 分子量マーカー、レーン 1 : DW 投与 15 分後、レーン 2~5 : LF 投与 15 分後、30 分後、60 分後および 120 分後、レーン 6~8 : LF コントロール (0.2、0.05、0.01 mg/mL ; ←)。全長 LF 量を、デンストメーターを用いて定量化した ((c) 小腸上部 (d) 小腸下部)。

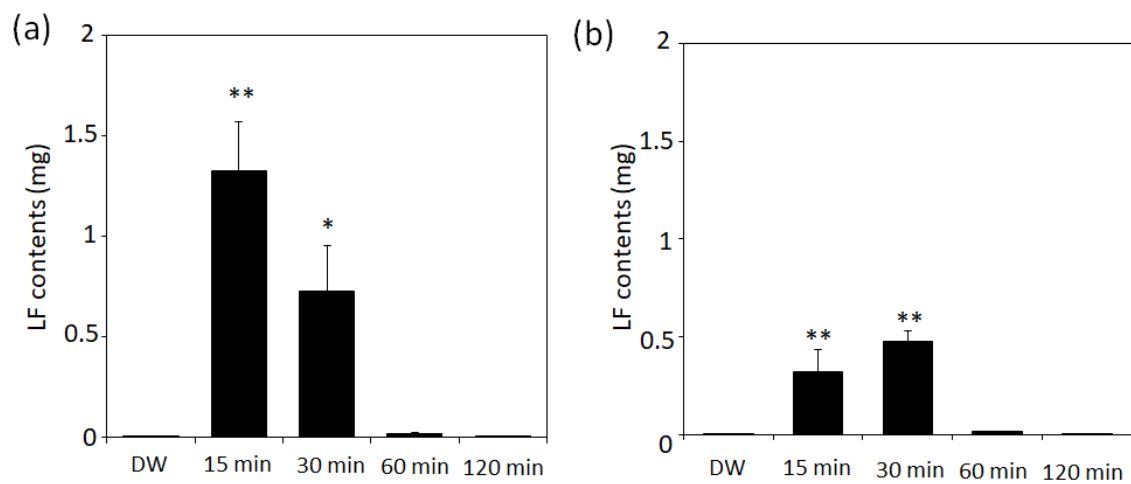


図 1-4. ELISA 法による小腸上部及び下部における iLF の定量結果

iLF の量を ELISA 法により定量した ((a) 小腸上部、(b) 小腸下部)。

データは平均 ± SE で表示した (DW 群 ; n=4、LF 投与 15、30、60、120 分 ; n = 6)。

* p < 0.05、** p < 0.01 (vs DW 群、Dunnett 検定)。

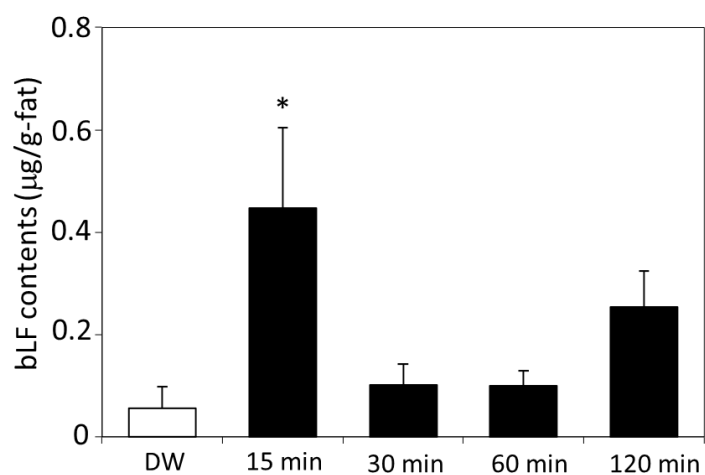


図 1-5. ELISA 法による腸間膜脂肪における iLF の定量結果

腸間膜脂肪組織を 1%プロテアーゼ阻害剤カクテル含有の PBS 中でホモジナイズし、遠心分離後上清を回収した。腸間膜脂肪組織における iLF 濃度を ELISA 法により定量した。データは平均 ± SE として表示した (DW 群 ; n=4、LF 投与 15、30、60、120 分 ; n = 6) *p < 0.05 (vs DW 群、Dunnett 検定)。

第2章 LFの脂肪肝モデル細胞に対する細胞死抑制作用

<序>

肥満およびインスリン抵抗性と密接に関連する非アルコール性脂肪肝（NAFLD）は、MetSの肝臓での表現形と考えられている[36, 37]。さらに、NAFLDは、単純脂肪肝から、重度の肝障害を伴った脂肪肝、すなわち細胞死や炎症が認められる非アルコール性脂肪肝炎（NASH）のような脂肪肝までに及ぶ範囲を指す（図 2-1）。NAFLDの有病率は世界的に増加を続けており、約10%の患者がNASHと診断され、しばしば肝硬変や肝細胞癌のような末期症状に進行する。しかし、NAFLDの病因の正確な分子メカニズムは不明なままであり、現在の医療では効果的な治療および予防戦略は限定されている。例としては、過体重および肥満患者に対する減量栄養指導が挙げられる。現在の研究では、NAFLDの発症要因として、「multi hit model」が支持されている。「最初のヒット」として、インスリン抵抗性が血清脂肪酸（FA）濃度の上昇および肝臓への過剰な流入を引き起こし、単純脂肪肝をもたらす[38]。この際、過剰に蓄積した脂質のバランスが有害な脂質に偏ることによって、脂肪毒性（細胞の機能不全、細胞障害、細胞死；図 2-2）[39]やそれに伴う炎症などが「多様な次のヒット」となって、肝機能障害を引き起こし、NASHへの進行をもたらす[38]。特に、血清FA濃度の上昇とNAFLDの重症度との間に密接な関係があることが示されており[37, 40]、肝臓へのFA供給の増加が、肝臓に対する脂肪毒性の主要因であることが強く示唆されている。このため、NAFLDの発症原因を明らかにするため、ヒト肝臓細胞を用いて、FA処置を行った細胞モデルが作製されている[41-44]。FAの中では、パルミチン酸等の飽和脂肪酸が、不飽和脂肪酸と比較して、アポトーシスや炎症を強く誘導することから、強い毒性を示すものと考えられており、これらを含んだFA構成を用いた脂肪肝モデル細胞での評価が進められている。

LFの効果については、ヒトにおいて、脂肪肝に対する有効性を示した報告は未だないが、第1章で示したように、動物実験において、継続的なLF摂取が、肝臓中の脂質蓄積抑制効果を示すことを確認している。また、近年、高フルクトース含有コーンシロップで誘導した

NAFLD モデル動物に対し、LF の投与が、血清中の脂質プロファイルの悪化予防および肝臓中の TG 蓄積に有益な効果を示したことが報告されている[45]。この報告では、LF が、血中からリポ多糖類が減少したことが報告されており、リポ多糖類に起因する「次のヒット」として作用する炎症性サイトカイン誘導を抑制することも示唆されている。しかしながら、上記 NAFLD モデル動物において食餌に用いたフルクトースは、解糖系に直接入り、肝臓中の遊離 FA の蓄積を増加させるため、血中由来の FA の肝臓への過剰流入に対する LF の効果を検討した報告ではなく、本課題に対する LF の効果は明らかとなっていなかった。

LF の体内動態に関する報告においては、経口投与した LF が肝臓に到達するか否かに関して結果が分かれているのが現状である[23, 32, 46]。そこで、我々は事前検討として、十二指腸に 100 mg の LF (十分量の LF) を投与すると、ごく一部ではあるが肝臓において LF を検出できる、すなわち、経口摂取であっても LF が肝臓に到達し得ることを確認した(図 2-3、未公開データ)。LF が到達した際に、FA 蓄積による脂肪毒性に対して期待できる効果として、細胞死(アポトーシス)抑制効果が挙げられる。LF は、複数の細胞種において、細胞の生存性に関わることが知られているシグナル経路(ERK1/2 及び Akt)を活性化(リン酸化)することが報告されている[28, 47-50]。一方、FA による脂肪毒性機序から述べると、アポトーシスに関しては、JNK 経路を介して誘導されることが報告されており、リン酸化 Akt は、その JNK シグナル経路の下流でアポトーシスに誘導に関わる Bim、Bax 等をリン酸化して不活性化することが報告されている[51, 52]。これらのことから、LF は脂肪毒性に対して、有益な効果を示すことが考えられる。

そこで、本研究では、FA 誘導性の NAFLD モデルに対する LF の直接効果を検討し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

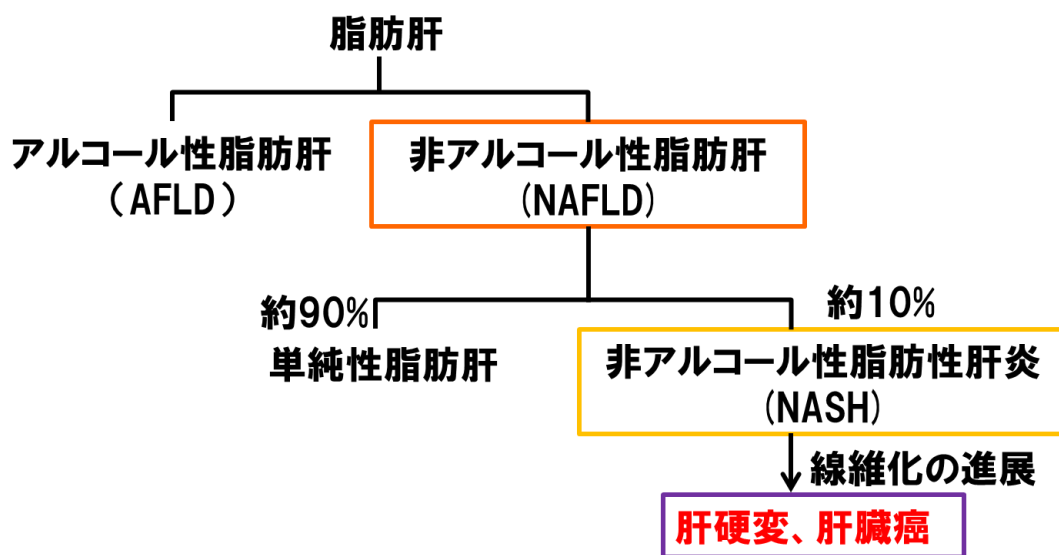


図 2-1. 脂肪肝の分類

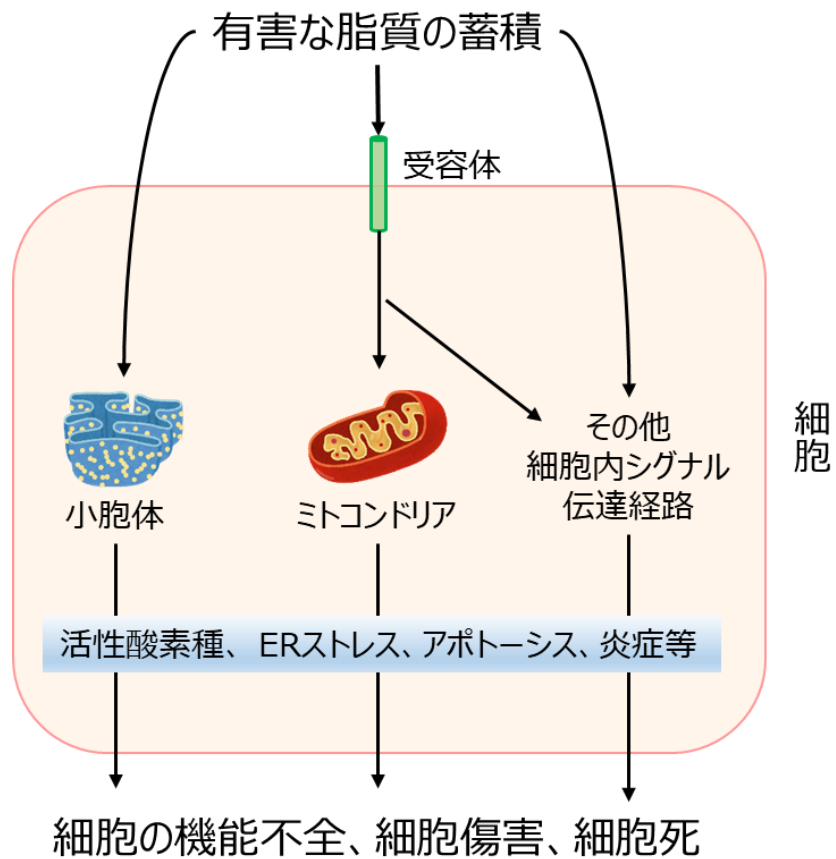


図 2-2. 脂肪毒性とその分子機構の概要について（【39】を一部改変して掲載）
 脂肪毒性は、脂質環境 and/or 細胞内の脂質組成の調節の異常によって有害な脂質が蓄積し、細胞の機能不全、細胞傷害、細胞死を起こすこと、と定義される。

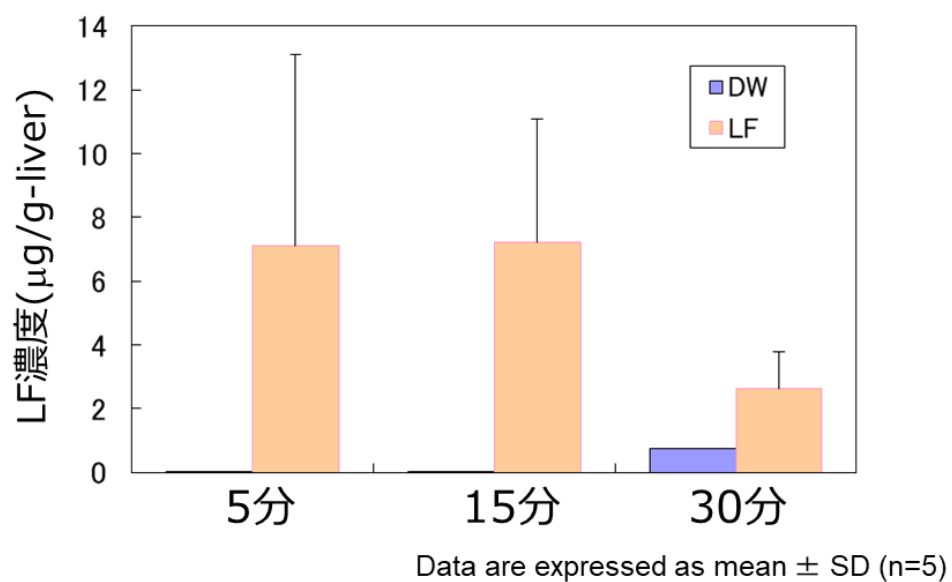


図 2-3. 十二指腸投与時の LF の肝臓への到達性

C57BL/6J マウス (♂8 週齢) の十二指腸に麻酔下で LF100 mg を投与し、5、15、30 分後に放血の上、肝臓を採取し、ELISA 法にて LF 量を定量した。

<材料・方法>

材料

ウシ LF は FrieslandCampina (Amersfoort, The Netherlands) から購入した。分析証明書によると、タンパク質純度は約 98%であった。ペプシン消化 LF (pepsin-digested LF; pdLF) は以前に報告した方法に従って調製した (図 2-4) [23]。FA 非含有の BSA、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸は、Sigma-Aldrich から購入した (St. Louis, Missouri, USA)。SP600125 (JNK 阻害剤) およびツニカマイシンは、和光純薬工業株式会社 (東京, 日本) から購入した。Akt inhibitor VIII は Sigma-Aldrich から購入した。ERK1/2、phospho-ERK1/2、Akt、phospho-Akt (Ser473)、SAPK/JNK、Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) および actin に対する一次抗体および horseradish peroxidase 結合抗ウサギ IgG 二次抗体は、Cell Signaling Technology 社 (Beverly, Massachusetts, USA) から購入した。

遊離脂肪酸混合物の作成

FA/BSA 混合物 (FA mixture; FAm) は以前の報告に従って調製した[43]。オレイン酸 (C18 : 1)、パルミチン酸 (C16 : 0)、リノール酸 (C18 : 2)、リノレン酸 (C18 : 3)、アラキドン酸 (C20 : 4) を 25 : 40 : 15 : 15 : 5 の割合で 70°C の 0.1N NaOH 溶液中で混合し、その混合液を 55°C で温めておいた FA 非含有の 2%BSA 溶液と 1 : 1 の割合で混合し、10 分間インキュベートした。FA/BSA 混合物 (FAm として 50 mM) を 0.45 μ m 孔の膜フィルターで滅菌ろ過し、-20°C で保存した。使用時は、FAm を溶解し、55°C の水浴中で 10 分間インキュベートした。

細胞培養

10%FBS (Cell Culture Bioscience、日本)、100 U/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ス

トレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加した DMEM (Sigma-Aldrich) で HepG2 細胞を 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。細胞をウェスタンブロット分析のために 6 ウェルプレート (1.0×10⁶ cells/well)、細胞内脂質定量のために 24 ウェルプレート (2.0×10⁵ cells/well)、および脂肪毒性関連指標の解析のために 96 ウェルプレート (5.0×10⁴ cells/well) で継代培養した。その後、細胞を 70%コンフルエントになるまで増殖させ、その後、無血清 DMEM 中で培養した。24 時間後、HepG2 細胞に対して、FAm を添加すると同時に、LF (5、20、100 µg/mL)、pdLF (100 µg/mL) または SP600125 (50 µmol/L) を添加し、2、4、8、20 時間培養した。Akt シグナル経路の阻害のために、FAm および LF で処理した HepG2 細胞に、Akt inhibitor VIII (50 µmol/L) を 2.5 時間添加し、その後 Akt inhibitor VIII を除去した状態で 17.5 時間培養した。また、小胞体 (ER) ストレスを誘導するために、HepG2 細胞に対し、ツニカマイシン (2、10 µg/mL) を LF と同時に添加した。20 時間インキュベートした後、上記脂肪毒性関連指標を解析した。

オイルレッド O 染色

細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、10%ホルマリン中で 60 分間固定した。固定後、室温条件にて、細胞をオイルレッド O 溶液で 15 分間染色した。染色後、細胞を蒸留水で 2 回洗浄し、細胞内脂肪滴を位相差顕微鏡下で観察した。

細胞内脂質定量

既報に従って、HepG2 細胞における細胞内脂肪蓄積量を定量した[53]。FAm 処理の 20 時間後、細胞を 1 mL の氷冷 PBS で 2 回洗浄し、室温条件にて、細胞内脂質を 1 mL のヘプタン：イソプロパノール (3 : 2、v/v) 混合液で 30 分間抽出した。濃縮した脂質を 2-プロパノールで再溶解し、トリグリセリド E-テストワコー脂質アッセイキット (和光純薬工業株式会社) を用いて TG 濃度を分析した。また、1 mL の 0.1N NaOH を用いて細胞タン

パク質を可溶化し、Bradford 法により定量した。

脂肪毒性関連指標の分析

細胞培養上清を用いて乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を分析し、細胞を用いて Caspase-3/7 活性および細胞生存率を測定した。LDH 活性は LDH 細胞傷害性試験キット (和光純薬工業株式会社) を用いて分析した。Caspase-3/7 活性は、Caspase-3/7 アッセイ (Promega Corporation、Madison、Wisconsin、USA) または ApoONE™ Homogeneous Caspase-3/7 アッセイ (Promega Corporation) を用いて分析した。細胞生存率の指標として、Resazurin 還元活性を、CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay (Promega Corporation) を用いて分析した。全ての測定は、Spectra MAX 分光光度計 (Life Technologies、Grand Island、New York、USA) を用い、添付のプロトコルに従って測定を行った。

ウェスタンブロット解析

細胞溶解液は、0.2% プロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich) および 1% ホスファターゼ阻害剤 (ナカライテスク (株)、日本) を含有する溶解バッファー (10 mM Tris (pH7.4)、150 mM NaCl、10 mM Na₄P₂O₇·10H₂O、1.0 mM EDTA、1.0 mM EGTA、0.5% Nonidet P-40 および 1% Triton-X) を用いて調製した。抽出物中のタンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay キット (Bio-Rad Laboratories Inc.、Hercules、California、USA) を用いて測定した。細胞溶解液 (タンパク質として 10~20 μg) を、8% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した。ブロッキング緩衝液 (3% BSA 及び 0.05% Tween20 を含む TBS) で 1 時間処理した Immobilon-P メンブレン (EMD Millipore Corporation、Bedford、Massachusetts、USA) を用い、分離したタンパク質を転写した。その後、そのメンブレンを、5% BSA を含む 0.1% Tween 20 含有 TBS で希釈した 1 次抗体で、4℃で一晩インキュベートした。洗浄後、メンブレンを二次抗体とともに TBS 中で 1 時間インキュベートし

た。その後、メンブレンを洗浄し、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (GE Healthcare、Waukesha、Wisconsin、USA) 及び LightCapture 機器 (AE-6981; ATTO (株)、日本) を用いて、標的タンパク質の画像を取り込んだ。各標的タンパク質の免疫反応性領域の定量は、LightCapture 機器を用いて行った。一次抗体は 1 : 1000 に希釈し、二次抗体は 1 : 5000 に希釈した。

統計解析

データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。基本的に、データは one-way ANOVA post hoc Tukey-Kramer 検定を使用して比較した。経時データは、two-way ANOVA post hoc Student-t 検定及び Bonferroni 補正を使用して比較した。脂質蓄積データは、Dunnett 検定を用いて比較した。統計学的な有意水準は、 $p < 0.05$ とした。データは SPSS 統計ソフトウェア ver19 を用いて分析した (IBM-SPSS(株)、Chicago、USA)。

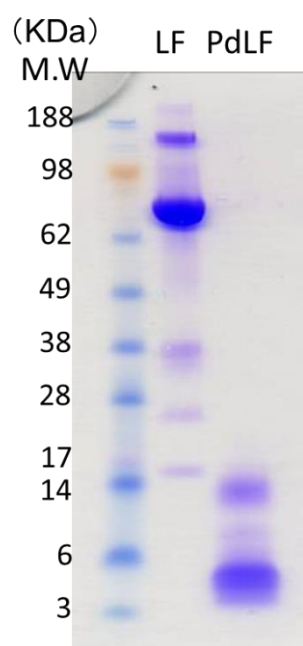


図 2-4. ペプシンで分解した LF の電気泳動結果

<結果>

細胞生存率と脂肪蓄積を指標にした脂肪肝モデル細胞の条件設定

FAm を HepG2 細胞に対し、0.1~2 mM の濃度で添加した結果、細胞生存率は、濃度依存的に低下したのに対し、細胞内 TG 濃度は、FAm 濃度依存的に増加し、1 mM の条件で飽和した (図 2-5A 及び B)。これらの結果より、FAm の添加濃度を 1 mM に設定し、以下の検討を行った。

LF 添加が FAm 誘導性 NAFLD モデルの細胞生存率と脂肪蓄積に与える影響

FAm 処理 (1 mM) は、細胞生存率を有意に低下させた (図 2-6A)。それに対して、FAm と同時に LF (100 µg/mL) を添加すると細胞生存率は低下せず、Control 群と同程度であった。pdLF (100 µg/mL) の添加によっては、細胞生存率は、FAm 単独群と同程度低下した。細胞生存率に対する LF の効果は、20 および 100 µg/mL の濃度で有意差をもって観察された (図 2-6B)。HepG2 細胞の細胞内脂質蓄積については、FAm 添加によって有意に増加し、FAm と同時に LF を添加しても、LF は細胞内の脂質蓄積に影響を及ぼさなかった (表 2-1)。位相差顕微鏡下での観察結果から、LF (100 µg/mL) は脂質蓄積に影響を及ぼさずに、FAm 誘発性の細胞死を抑制することを確認した (図 2-7A、B および C)。

FAm 誘導性の細胞障害およびアポトーシスに対する LF の効果

LDH 活性および Caspase-3/7 活性は、FAm 処理後 20 時間で有意に増加した (図 2-8A-D)。FAm が誘導した LDH 活性は、LF (5-100 µg/mL) によって用量依存的に有意に阻害された (図 2-4A)。FAm + LF (100 µg/mL) 群では、FAm 単独処置群と比較して、LDH 活性が 42% 低く、有意な差が認められた。一方、無処置群との比較においては、FAm + LF (100 µg/mL) 群の方が、有意に LDH 活性が高く、LF は、FAm が誘導する LDH 活性を完全には抑制しなかった。Caspase-3/7 活性に対する LF の効果は、LDH 活性と同様の結

果を示した。しかし、無処置群と FAm + LF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 群間に有意差は認められず、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LF の添加で、FAm による Caspase3/7 活性の上昇がほぼ抑制された (図 2-8C)。FAm が誘導する分子シグナル経路に、JNK シグナルを介した Caspase-3 の活性化が関与しているという報告があるため、JNK 経路の阻害実験を行った。JNK 特異的阻害剤である SP600125 (50 μM) により、FAm 誘導性の LDH および Caspase-3/7 活性の有意な阻害を示した (図 2-8B および D)。次に、20 時間より前の時点における各指標の経時変化を解析した。未添加群と比較して、FAm 処理によって、全時点 (2、4 および 8 時間) で LDH 活性が有意に増加した (図 2-9A)。LF は、FAm が誘導する LDH 活性を 4 時間後のみ有意に阻害したが (21%減少)、2 時間および 8 時間後では有意な効果は認められなかった (それぞれ 16%および 14%減少) (図 2-9A)。Caspase-3/7 活性については、FAm 処理 4 時間後から、Caspase-3/7 活性の有意な増加が観察され、LF は、8 時間後において有意に Caspase-3/7 活性の上昇を抑制した (46%減少) (図 2-9B)。対照群と比較して、FAm 処理による JNK リン酸化は 2 および 4 時間で検出されなかったが (データ未掲載)、8 時間で JNK リン酸化を増加する傾向が認められた (図 2-10A および B)。LF は、8 時間で FAm によって誘導される JNK リン酸化を阻害しなかった。

ER ストレス誘導性の細胞毒性およびアポトーシスに対する LF の効果

HepG2 細胞をツニカマイシン (2 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で処理して ER ストレスを誘導した。図 2-11A に示すように、細胞生存率は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のツニカマイシンによって有意に減少した。FAm 処理の時とは対照的に、LF による細胞生存率の低下抑制効果は認められなかった。LDH および Caspase-3/7 活性は、ツニカマイシン処理 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 後に有意に増加した (図 2-11B および C)。一方、LF は、ツニカマイシンが誘導する LDH および Caspase-3/7 活性の上昇を抑制しなかった。

Akt および ERK1/2 シグナル経路に対する FAm 及び LF の影響

HepG2 細胞に、FAm もしくは、FAm と同時に LF を添加 (FAm + LF 添加) し、2 時間後に Akt および ERK1/2 のリン酸化を解析した。その結果、FAm 単独では、Akt (Ser473) のリン酸化が認められず、FAm + LF の添加条件においてのみ、リン酸化が確認された (図 2-12)。一方、ERK1/2 に関しては、FAm 単独でもリン酸化が確認され、FAm + LF 添加では、より強いリン酸化が認められた。

LF の脂肪毒性抑制効果に対する Akt シグナルの寄与

LF による Akt リン酸化の経時変化解析を行い、2 時間後までリン酸化 Akt を検出した (図 2-13A)。リン酸化が最大となった時間を明らかにするために、LF 処理 30 分後までの詳細な経時変化解析を行った結果、LF 添加 10~20 分以内に最も強い Akt リン酸化の誘導が観察されたが、FAm 処理は Akt リン酸化を誘導しなかった (図 2-13B および C)。本タイムポイントにおいては、Akt inhibitor VIII (50 μ M) によって、Akt リン酸化は完全に抑制されることを確認した (図 2-13D)。また、20 μ M であれば部分的な抑制であった (91% 阻害)。したがって、50 μ M の Akt inhibitor VIII 処理の条件下で、Akt シグナルの寄与を評価した。100 μ g/mL での LF 処理は、FAm によって減少する細胞生存率の低下を有意に抑制すると共に、FAm が誘導する LDH および Caspase-3/7 活性の上昇を抑制した (図 2-14A-C)。50 μ M の Akt inhibitor VIII 処理により、LDH 活性に対する LF の効果を有意に減少させ、細胞生存率および Caspase-3/7 活性については、LF の効果は完全に認められなくなった。

< 考察 >

本章では、HepG2 NAFLD モデルにおいて、LF が FAm 誘発性の脂肪毒性を抑制し、細胞生存率の低下を抑制することを確認した (図 2-6、図 2-8)。一方、pdLF は細胞生存率に対して効果を示さなかった。これは、LF がペプシンによる消化を受けずにインタクトな形で肝臓に到達することが重要であることを示唆している。げっ歯類における経口投与 LF の体内動態を報告している複数の研究がある。経口投与された LF は、マウスの多くの組織で検出され、ELISA 法によって肝臓で最も高濃度で検出された[32]。また、マウス血漿中において、インタクトな LF が検出されたことも報告している。さらに、高フルクトース含有コーンシロップで誘導された NAFLD マウスに対する経口 LF 投与 (50–200 mg/kg/日) の 8 週間投与は、NAFLD 発症の減弱はもちろんのこと、肝臓における LF 蓄積の有意な増加を誘導したことが報告されている ($14.2 \pm 1.7 - 22.8 \pm 5.1 \mu\text{g/g-liver}$) [45]。本章で示した我々の予備検討においても、マウス十二指腸に 100 mg の LF を投与すると、投与 5 分後から肝臓で LF が検出された (図 2-3)。本検討に用いた Bethyl 社の ELISA キットでは、ペプシンで分解した LF は検出できないが、トリプシンで分解した LF は検出できることを確認しており、肝臓にはある一定以上の大きさの LF フラグメントが到達していることが示唆され、*vivo* においても同様の作用で効果を示す可能性が考えられた。一方、脂肪蓄積抑制作用 (表 2-1、図 2-7) は認められなかったことから、肝臓に到達した LF は、上記記載の通り、FAm 誘発性の脂肪毒性の減弱により NAFLD 進展の抑制に寄与していることが考えられた。一方、マウスへの 4 週間の LF 投与は、摂食後の胸部リンパ液中の TG 濃度を有意に減少させることが報告されており、LF が小腸からの TG 吸収を阻害し得ることを示唆している[21]。また、我々は、Cho 高含有食摂取ラットに対し、LF を給餌することにより、糞便中の Cho が有意に増加する (排出される) ことを確認している[54]。これら報告に基づき、*in vivo* における LF の効果として考えると、LF の経口投与が、肝臓における「最初のヒット」となる脂質吸収を腸管で抑制すると共に、NAFLD 発症を促進する FA 由来の「次

のヒット」を減弱している可能性が考えられた。

次に、FAmによって誘導される脂肪毒性関連指標の結果について考察する。培養上清中のLDH活性測定では、細胞膜が障害を受けた結果、サイトゾルから培地中に溶出してきたLDHの活性を検出している。すなわち、FAmによる直接的な細胞膜の障害と、Caspase-3/7活性上昇によるアポトーシス誘導の結果を受けた細胞膜障害の2つの影響が混在していると考えられる。FAm処理は、2時間でLDH活性を有意に増加させ、4時間でCaspase-3/7活性を増加させたことから、本実験の早い時間帯における細胞傷害はFAm自体によって誘導されたことが示唆された(図2-9A及びB)。FAm処理後8時間までに認められたLDH活性に対するLFの効果は、FAm処理20時間後に認められたその効果より弱かった(図2-8Aおよび9A)。これらの結果から、LFはFAmが直接誘導する細胞膜障害およびアポトーシスの結果誘導される細胞膜障害の両方を抑制すると思われるが、主に後者を抑制していることが示唆された。LFがFAm誘導性のCaspase-3/7活性をほぼ完全に阻害する一方で、LDH活性は完全には阻害しないという結果(図2-8A-D)も、我々の考察を支持する。これまでの報告では、FA、特にパルミチン酸(C16:0)などの飽和FAが、JNKおよびERストレス経路の両方のシグナル伝達を活性化する活性酸素種(ROS)の過剰産生を誘導し、最終的にCaspase-3を活性化することが報告されている[55, 56]。近年、Ogasawaraらは、LFがキレート効果を介さずにROSを直接除去したと報告した[57]。そこで、LFの作用点を明らかにするため、ERストレス経路に対するLFの作用を検討した。その結果、ツニカマイシンによる細胞生存率の低下をLFは抑制せず、脂肪毒性を抑制しなかったことから(図2-11A-C)、LFは、ERストレスシグナル経路やCaspase-3/7活性を直接抑制するのではなく、JNKシグナル経路の途中経路を阻害していることが強く示唆された。また、LFはJNKのリン酸化は阻害しないようであった(図2-10)。FAm添加後、2、4時間後において、JNKのリン酸化自体がほとんど観察されなかったことから、実験系のスケールアップ等による再現性検証は必要であるが、LFの主たる作用機序がROS除去と

は異なることを示唆しているものと考える。

FAによって誘導される JNK リン酸化は、Bim および Bax などの Bcl ファミリータンパク質のミトコンドリアへの移行を誘導すると共に、Bim の発現上昇を促進し、続いてミトコンドリアからサイトゾルへのシトクロム c の放出を引き起こす[58-61]。サイトゾル中の過剰なシトクロム c は、Apaf-1 タンパク質と複合体を形成し、複合体は Caspase-9 の前駆酵素を活性型に切断し、Caspase-3 の活性化をもたらす[62]。対照的に、リン酸化された Akt (Ser473 リン酸化を指標) は、Bim の Ser87 リン酸化および Bax の Ser184 リン酸化を誘導し、14-3-3 タンパク質に結合することによって Bim および Bax のサイトゾルからミトコンドリアへの移動を阻害する[51, 52]。LF 刺激は、HepG2 細胞を含む複数の細胞種において Akt リン酸化を誘導することができる[47, 48, 63]。また、LF は ERK1/2 リン酸化も誘導することが報告されているが、飽和 FA 自体も ERK1 / 2 リン酸化を誘導し得ることが報告されている[64]。本研究においても、FAm 処理による Akt (Ser473) および ERK1/2 リン酸化への影響を解析し、FAm 処理単独では、Akt ではなく ERK1/2 のリン酸化が誘導されることを確認した (図 2-12)。そこで、LF が誘導する Akt シグナルに焦点を当て、この仮説を検証するための実験を行った。Akt inhibitor VIII を用いた阻害実験により、LF が誘導する Akt シグナルが脂肪毒性の抑制に寄与していることを明らかにした (図 2-14)。すなわち、FAm が誘導する JNK シグナルに関し、LF が Akt リン酸化を介して、Bim および Bax のミトコンドリアへの移行を阻害することにより減弱したことが示唆された。推定された LF の作用機序を図 2-15 に示した。

さらに、肝細胞における Akt シグナルの活性化がインスリン抵抗性からの回復に寄与していることはよく知られている。実際、Li らは、マウスを用いた検討において、経口投与した LF が、高フルクトース含有コーンシロップ食誘導性のインスリン抵抗性を減弱させることを実証した[45]。Moreno-Navarrete らは、ヒト LF の添加により、HepG2 細胞におけるインスリンが誘導する Akt リン酸化を増加させることを報告している[48]。これらの

知見は、LF が誘導する Akt シグナルが、脂肪毒性およびインスリン抵抗性の両方緩和することによって NAFLD 発症の抑制に寄与する可能性を示唆する。したがって、今後の研究において、この HepG2 NAFLD モデルにおいて、FA が誘導するインスリン抵抗性に対する LF の効果を確認することも重要である。

本研究では、HepG2 を用いた NAFLD モデルにおいて、LF が FAm 誘導性の脂肪毒性に対して保護効果を有することを明らかにし、主要作用機序の候補として、Akt シグナル経路の活性化を同定した。

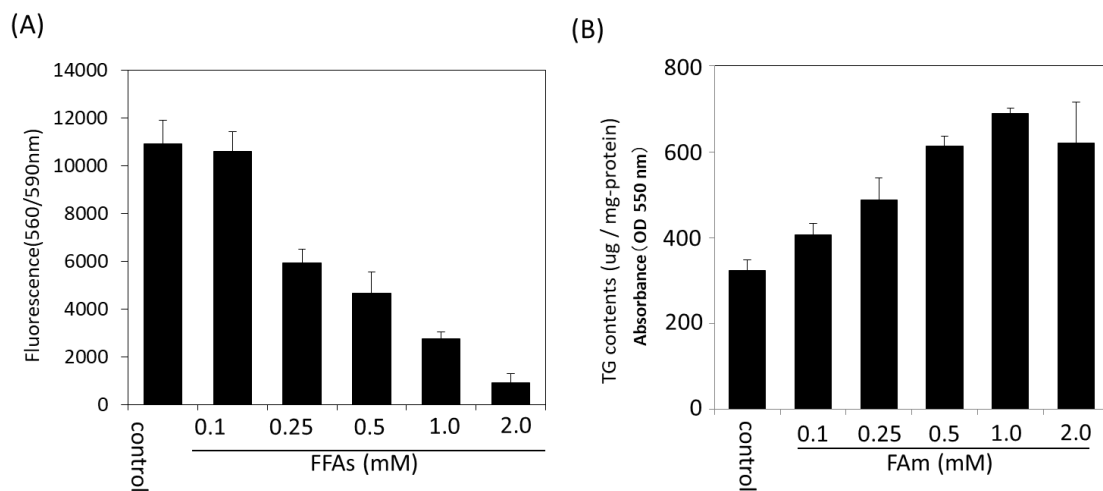


図 2-5. FAm 添加に対する脂肪毒性関連指標の濃度依存性

HepG2 細胞を 70%コンフルエントになるまで増殖させ、その後、無血清 DMEM 中で培養した。24 時間後、HepG2 細胞に対して FAm (0.1–2.0 mM) を添加し、20 時間後に (A) 細胞生存率 (レサズリン還元活性) と (B) TG 蓄積量を定量した。すべてのデータは、平均 \pm SD (各群 n = 3) で表示した。

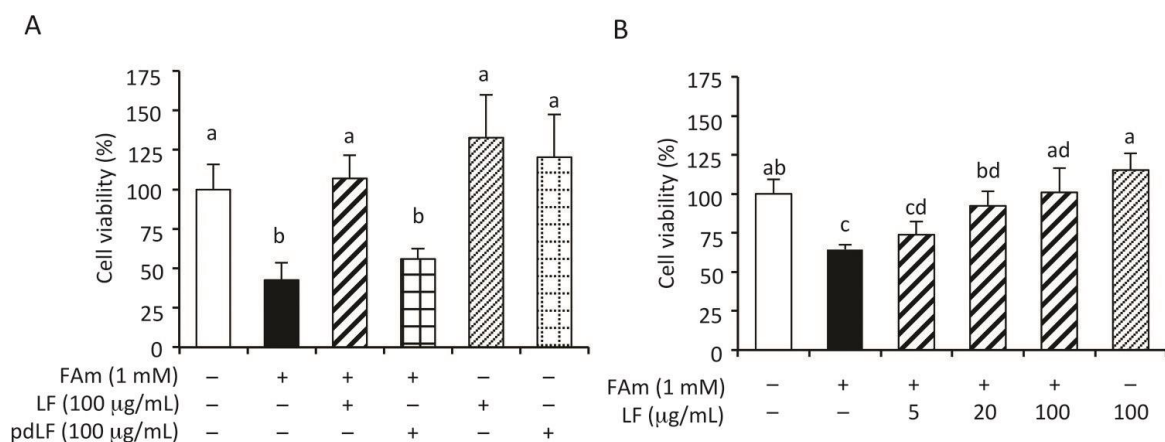


図 2-6. FAm 誘導性 NAFLD モデルにおける細胞生存率に対する LF の効果

(A) LF (100 µg/mL) およびペプシン消化 LF (pdLF) (100 µg/mL) を HepG2 細胞に FAm (1 mM) と共に 20 時間添加し、細胞生存率の指標として、レサズリン還元活性を測定した。(B) LF (5、20、100 µg/mL) を FAm (1 mM) と共に HepG2 細胞に 20 時間添加し、レサズリン還元活性を測定した。すべてのデータは、平均 ± SD (各群 n=4) で表示した。統計解析は、one-way ANOVA post hoc Tukey-Kramer 検定によって実施した ($p < 0.05$)。異なるアルファベットは、統計的に群間に有意差があることを示す。

表 2-1. 脂質蓄積に対する LF の効果

Group	細胞内脂質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)	* <i>P</i>
Control	228 \pm 45	< 0.001
FAm 1 mM	1095 \pm 58	—
FAm 1 mM + LF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1038 \pm 74	N. S

**p* < 0.05 ; 統計処理は Dunnett 検定にて行った (vs FAm(1 mM))。

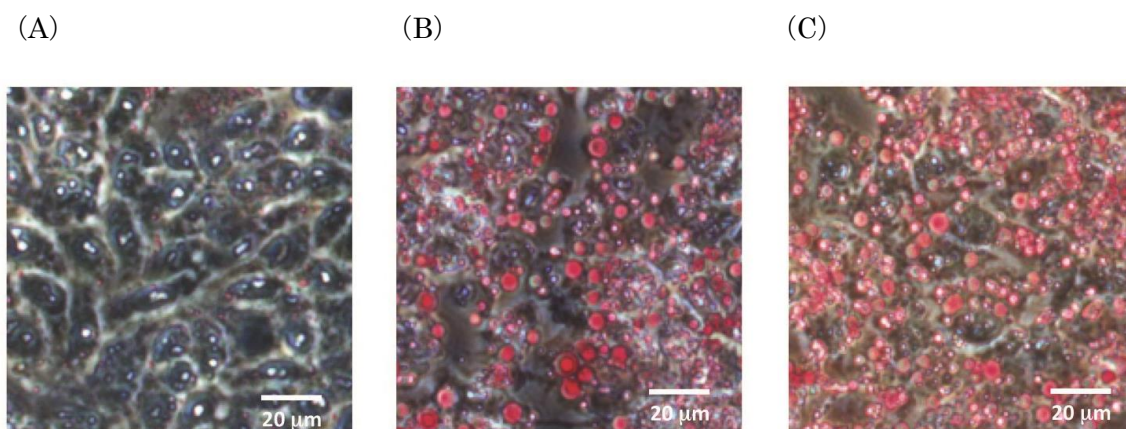


図 2-7. FAm 及び LF 添加による HepG2 細胞の観察像

HepG2 細胞への FAm 及び LF 処理の 20 時間後に、Oil-red O 染色を行い。位相差顕微鏡を用いて観察した。

(A) 未添加、(B) FAm (1 mM)、および (C) FAm (1 mM) + LF (100 μg/mL)

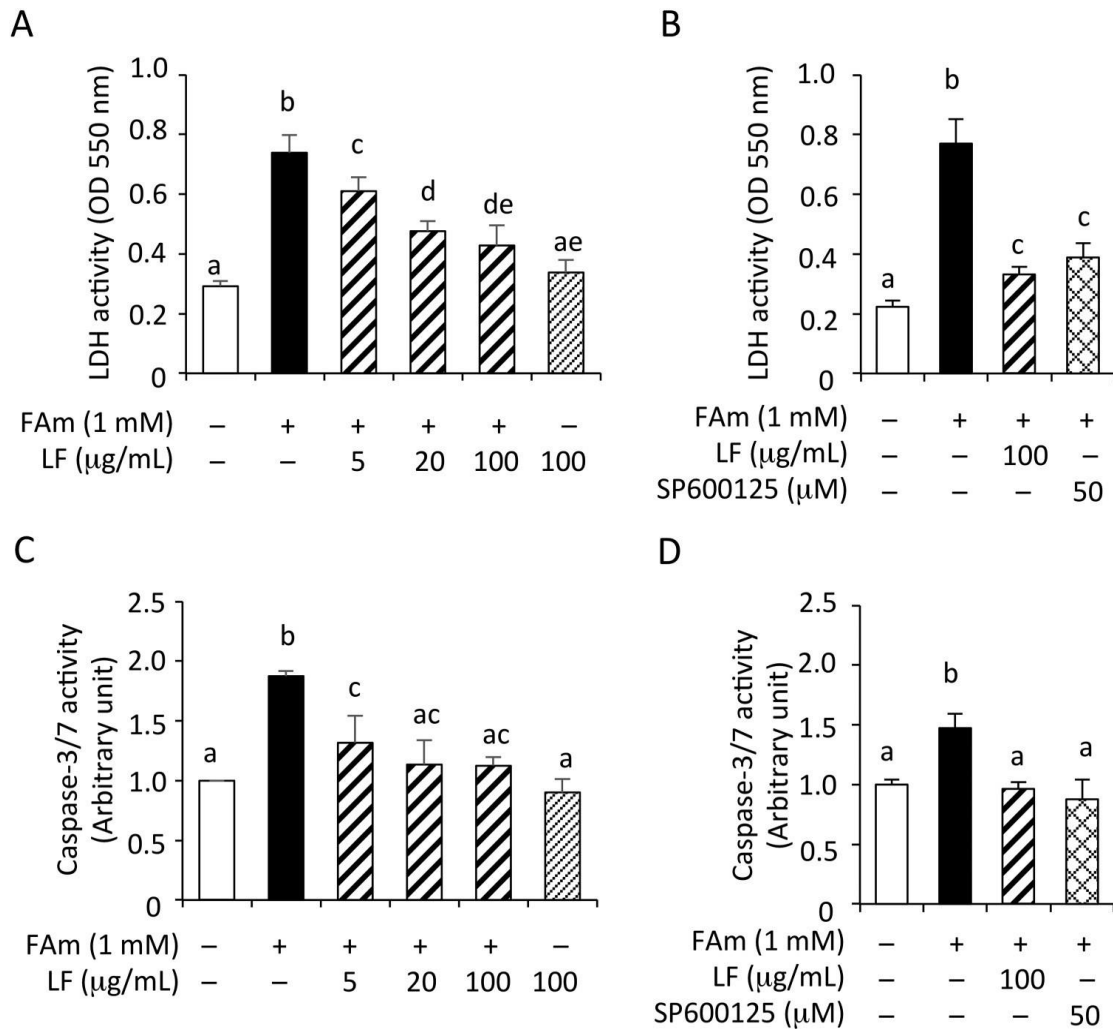


図 2-8. FAm 誘導性の細胞障害及びアポトーシスに対する LF の効果

HepG2 細胞に LF (5、20 および 100 µg/ mL) または SP600125 (50 µg/ mL ; JNK Inhibitor) を FAm と同時に添加し、20 時間後に脂肪毒性関連指標を測定した。(A および B) 培地中の LDH 活性。(C および D) Caspase-3/7 活性。(A および C) すべてのデータは、平均 ± SD (各群 n=4) で示した。(B および D) すべてのデータを平均 ± SD (各群 n=3) で示した。統計解析は、one-way ANOVA post hoc Tukey-Kramer 検定によって実施した (p<0.05) 異なるアルファベットは、統計的に群間に有意差があることを示す。

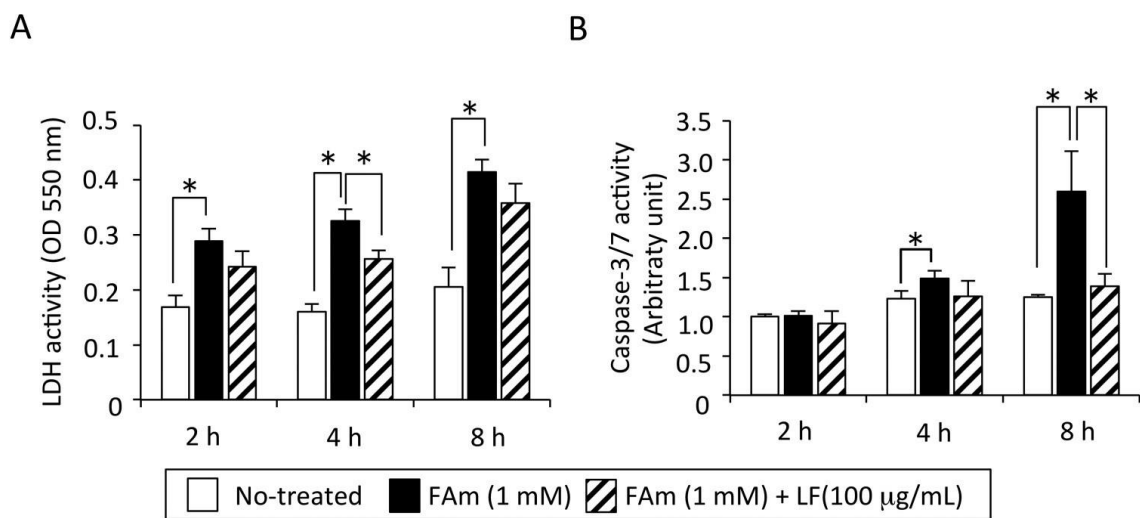
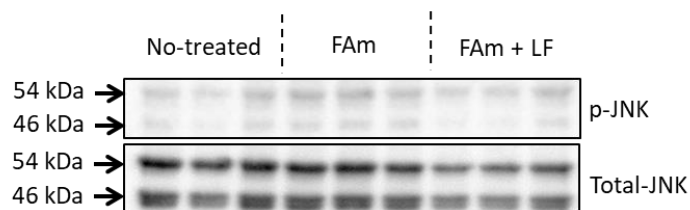


図 2-9. FAm 誘導性の脂肪毒性に関する各指標の経時変化と LF の効果

HepG2 細胞に対して LF (100 µg/mL) を FAm (1 mM) と同時に添加し、LF 処理の 2、4 および 8 時間後に脂肪毒性関連項目を測定した。(A) 培地中の LDH 活性、(B) 細胞における Caspase3/7 活性。LDH 測定時における 8 時間後の FAm 処置群 (n = 4) を除いて、n = 5 で実験を行った。全てのデータを平均 ± SD で示した。統計解析は、one-way ANOVA post hoc Student-t 検定及びボンフェローニ補正を行い、p 値を算出した (*p < 0.05)。

A



B

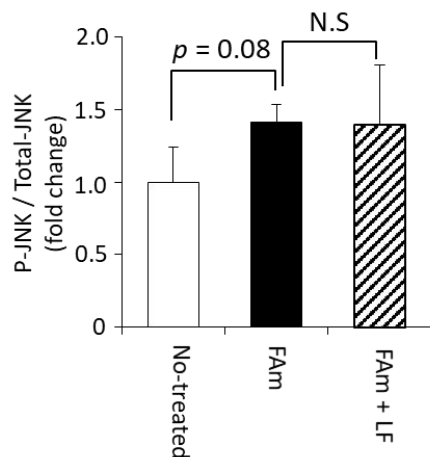


図 2-10. JNK リン酸化に対する LF の影響

HepG2 細胞に対して LF (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を FAm (1 mM) と同時に添加し、LF 処理の 8 時間後に細胞を溶解した。本溶解液を用いて、phospho-JNK (Thr183/Tyr185) および total-JNK を Western Blotting 法によって検出した。(A) Western Blotting 画像 (B) phospho-JNK/total-JNK の定量結果。

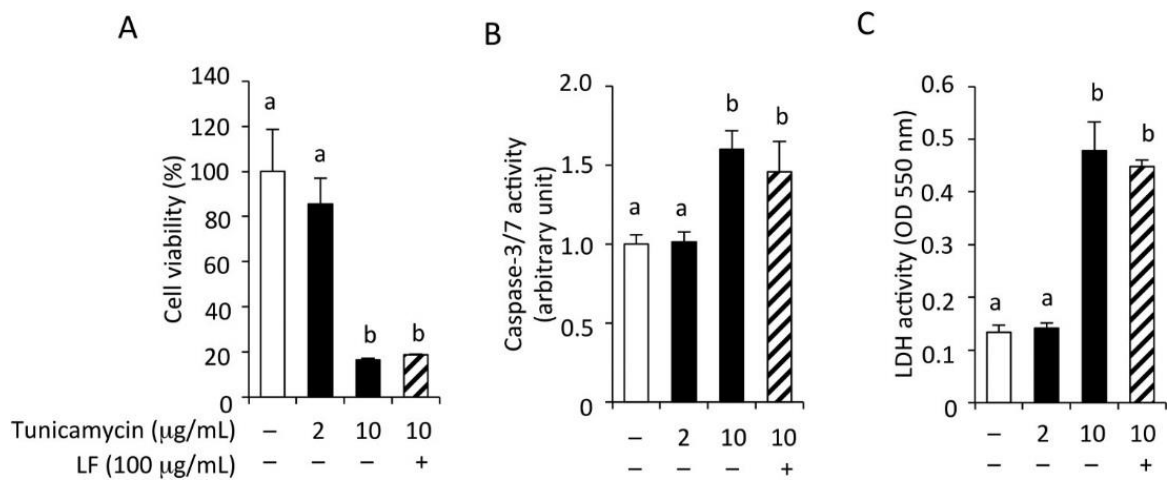


図 2-11. 小胞体 (ER) ストレスが誘導する脂肪毒性に対する LF の効果

ツニカマイシン (2, 10 μg/mL) と共に LF (100 μg/mL) を HepG2 細胞に添加し、20 時間後に脂肪毒性関連指標を測定した。(A) 細胞生存率、(B) Caspase-3/7 活性、(C) 培地中の LDH 活性。すべてのデータは平均 ± SD (n = 4) で表示した。統計解析は、one-way ANOVA post hoc Tukey-Kramer 検定によって実施した (p < 0.05)。異なるアルファベットは、統計的に群間に有意差があることを示す。

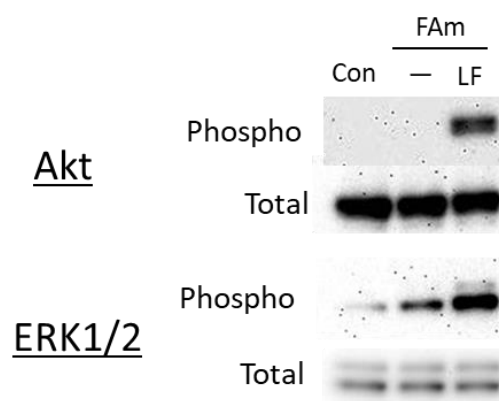


図 2-12. FAm 及び LF 添加による Akt 及び ERK1/2 のリン酸化に対する影響

FAm (1 mM) のみ、もしくは、LF (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を FAm (1 mM) と共に HepG2 細胞に添加し、2 時間後に細胞を溶解した。各群の試料 (n = 2) を各々プールし、phospho-Akt (Ser473)、total-Akt、phospho-ERK1/2 および total-ERK1/2 を Western Blotting 法によって検出した。

t t

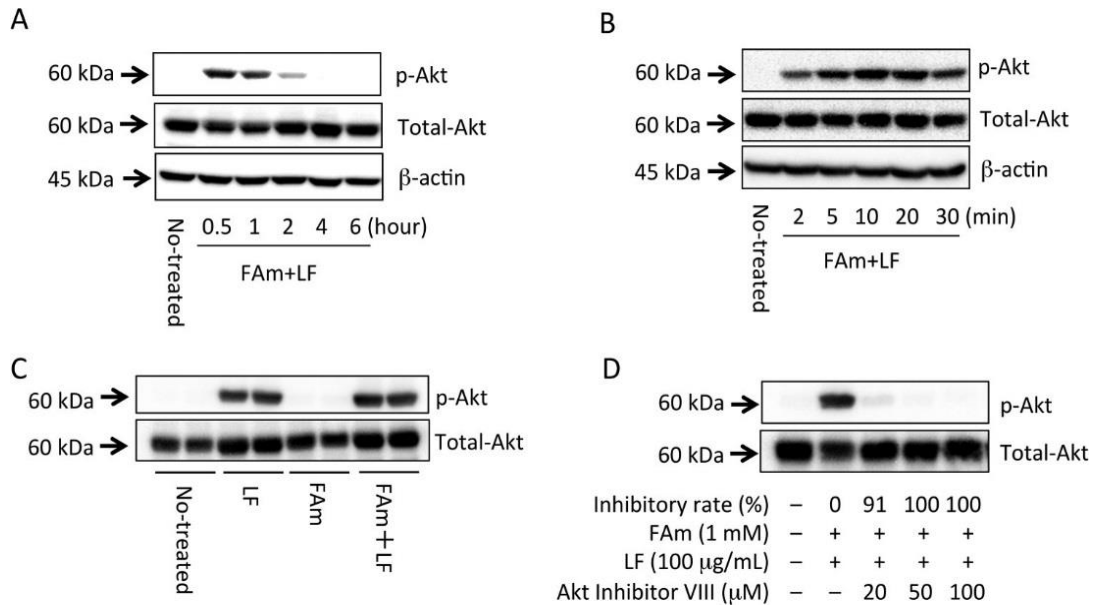


図 2-13. LF による Akt リン酸化の経時変化と Akt inhibitor VIII の阻害条件設定

LF (100 μg/mL) を FAm (1 mM) と共に HepG2 細胞に添加し、細胞を様々な時間で溶解させた。各群の試料 (n=2) を各々プールし、phospho-Akt (Ser473) および total-Akt を Western Blotting 法によって検出した。(A) Akt リン酸化の経時変化 (0-6 時間)、(B) Akt リン酸化の詳細な経時変化 (0-30 分)。(C) FAm 存在下での、LF によるリン酸化 (添加 20 分後)。(D) Akt inhibitor VIII (20-100 μM) を LF および FAm と共に、HepG2 細胞に添加し、Akt のリン酸化を添加 20 分後に検出した。phospho-Akt/total-Akt の比は、LightCapture 機器を用いて測定し、Akt inhibitor VIII によるリン酸化抑制率を算出した。

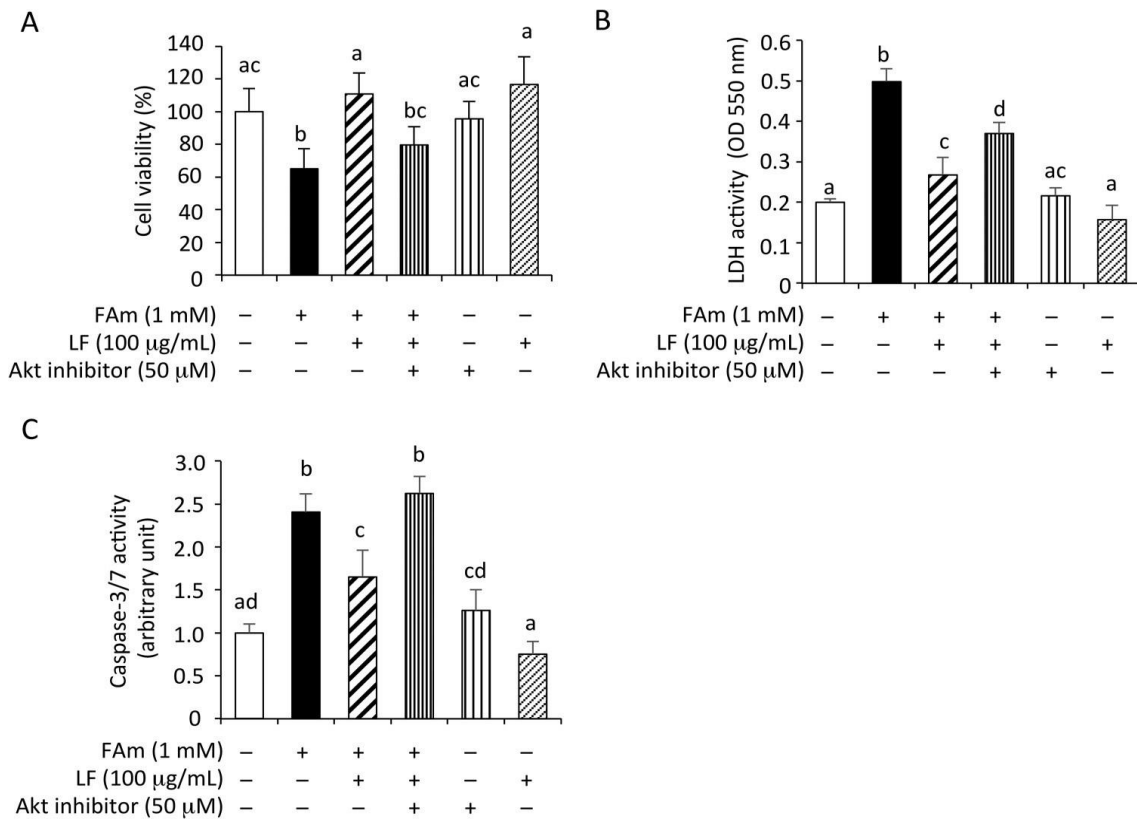


図 2-14. LF の効果に対する Akt シグナルの関与の検証

HepG2 細胞を FAm (1 mM)、LF (100 μ g/mL)、および Akt inhibitor VIII (50 μ M) で 2.5 時間処理した。その後、培地を交換して、Akt inhibitor VIII を除去し、細胞を FAm (1 mM) および LF (100 μ g/mL) と共に 17.5 時間培養した。その後、脂肪毒性関連指標を測定した。(A) 細胞生存率、(B) 培地中の LDH 活性、(C) Caspase-3/7 活性。すべてのデータを平均 \pm SD (n=4) で表示した。統計解析は、one-way ANOVA post hoc Tukey-Kramer 検定によって実施した (p < 0.05)。異なるアルファベットは、統計的に群間に有意差があることを示す。

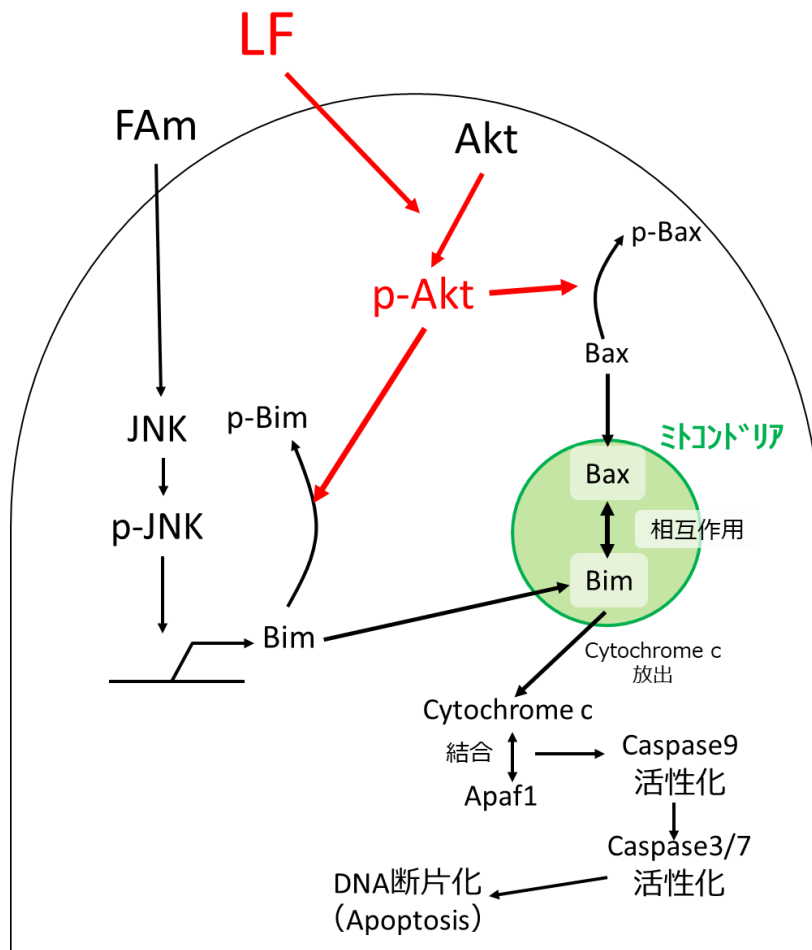


図 2-15. 本研究により示唆された LF の脂肪毒性抑機序

第3章 高コレステロール血症・動脈硬化症モデル動物に対する
腸溶性 LF の効果

<序>

アテローム性動脈硬化症は、循環器系疾患を代表するリスクファクターであり、高血圧、高脂血症、高血圧などのMetSに密接に関連している[65, 66]。アテローム性動脈硬化症は、マクロファージ内の脂質の蓄積を特徴とし、その蓄積が炎症とアテロームプラーク形成へと繋がる。このプロセスと、血液を循環している低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化的修飾との関連が認められており、動脈の損傷が血流を阻害するほど重症になるまで症状が顕在化しないことが多い。これらサイレント疾患としての特徴が、アテローム性動脈硬化の進行のリスクを高めるため、治療および予防手段を確立することが重要である。

我々は、二重盲検の臨床試験において、eLF錠剤 (LFとして300 mg/日) を経口摂取することにより、MetSの主原因である内臓脂肪蓄積が有意に減少することを見出した[20]。さらに、ラット腸間膜脂肪由来の前脂肪細胞を用いた*in vitro*実験により、LFによる脂肪合成 (脂肪細胞への分化) 抑制作用および脂肪分解効果を確認し、これら効果がeLFの作用機序である可能性を見出している [23, 24]。さらに、ペプシンで分解したLFはこれら効果を示さないことを見出した。これらのことから、腸溶性製剤は、LFが脂質代謝改善作用を発揮するために必要な要素であることが示唆されている。

我々はさらに、予備的な検討として、動物における高Cho血症に対するLFの効果を評価した。マウスに対して、LFを飲水投与すると、高Cho食によって誘導される高Cho血症の進行を抑制することが分かった (図3-1)。Takeuchiらも、通常食にLFを含有させることにより、マウスの血清総ChoおよびTG濃度が有意に低下することを報告している[21]。これらの結果は、LFが、高Cho血症が誘導するアテローム性動脈硬化症に対して予防作用を示す可能性を示している。しかし、これまでの先行知見により、一般的にマウスは、高Cho食誘導性アテローム性動脈硬化症に耐性があり、Cho代謝はマウスとヒトの間で異なることが明らかにされている[67]。ヒトアテローム性動脈硬化を実験的に再現した研究を推進するには、遺伝的および環境的要因の両方が関与していることから、ヒトの生理的および病態を模倣

する適切な動物モデルが必要となる。

ブタは、解剖学的のみならず、生理学的側面、摂食習慣および睡眠習慣がヒトと非常に酷似しており、有用な動物モデルであると考えられている(表3-1)[68, 69]。近年、ClawnとGöttingenのような実験ミニブタとは異なる、最小のミニブタ、マイクロミニピッグ(Microminipigs[™]; MMPig)を用いた高Cho血症誘発性のアテローム性動脈硬化症モデルが報告された[69-71]。また、別の研究では、MMPigの肝臓組織において、LDL受容体(LDLR)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAレダクターゼ(HMGCR)及び肝臓でのCho代謝を調節するステロール調節エレメント結合タンパク質(SREBP-2)等のCho代謝を制御する遺伝子発現が相関しており、高脂肪・高Cho食(High Fat and High Cholesterol Diet; HFCD)の摂取により、これら遺伝子の発現が顕著に低下することを報告している[72]。MMPigにおけるこれら遺伝子の制御とLDL-Choに富む脂質プロファイルは、ヒトと非常に類似している。本研究では、eLFの抗アテローム効果を明らかにするために、MMPigを用いて、HFCD誘発性の高Cho血症・アテローム性動脈硬化症に対するeLFの効果を検討した。

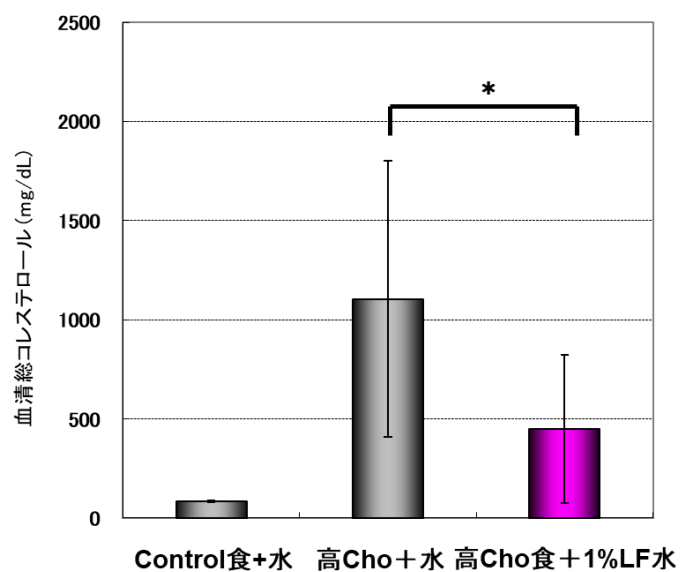


図3-1. 高Cho食摂取マウスに対するLFの効果

C57BL/6Jマウス（5週齢、雄）に高Cho飼料摂取（1%Cho、0.5%コール酸）と同時に水あるいは1%LF水溶液を8週間投与した（各群n = 7）。16時間絶食処置後、血清中総Cho濃度を測定した。

（鈴木苗穂ら、マウス肝臓におけるLFの脂質代謝異常予防効果、
第61回日本栄養・食糧学会講演要旨集(2007)、p192

表3-1. 各動物種間の遺伝要因及び摂食習慣の比較 ([69] を一部改変)

Species	Genetic factors		Environmental factors		
	Lipid metabolism (dominant LDL-Cho fraction)	Anatomy of coronary arteries (number of arteries)	Diet	Mealtime	Active period
Human	Yes	3	Polyphagia	Schedule	diurnal
Swine (MMPig)	Yes	3	Polyphagia	Schedule	diurnal
Dog	No	2	Monophagia	Schedule	diurnal
Monkey	Yes	3	Monophagia	Schedule	diurnal/nocturnal
Rabbit	No	3	Monophagia	<i>ad libitum</i>	nocturnal
Mouse	No	4	Polyphagia	<i>ad libitum</i>	nocturnal

<材料・方法>

材料

LFは、Friesland campina DMV (LE、Amersfoort、Netherlands) から購入した。分析証明書によると、タンパク質純度は約98%であった。

動物と飼料

16週齢の雄性MMPigを、室温：24 ± 3℃、相対湿度：50 ± 20%、明暗サイクル：12時間、の環境条件で飼育し、水道水は自由飲水とした。食餌は、朝に1日1回、体重の3%重量分を摂取させ、食餌の後に、LF含有もしくは非含有の4つの腸溶性カプセル(E-カプセル、長軸：1.6cm、短軸：0.6cm、三星医薬)を投与した。9匹のMMPigを3群(3匹/群)に分けた。対照群には、通常の食餌(Kodakara73; 丸紅日清飼料)を与え、空の腸溶性カプセルを投与した。高脂肪・高Cho食(HFCD)群には、HFCDを与え、空の腸溶性カプセルを投与した。HFCD+eLF群には、HFCDを与え、LF(500 mg LF/個体/日、125 mg LF/カプセル)を充填したカプセルを投与した。通常の食餌組成は、9.0%未満の炭水化物(w/w)、15.0%以上のタンパク質(w/w)、2.0%以上の脂肪(w/w)、および9.0%繊維(w/w)である。HFCDは、通常の食餌に、6%ラード(w/w)(ミヨシ油脂)と0.5%Cho(w/w)(和光純薬工業)を混合した。毎週体重を測定し、投与8週間後、すべてのMMPigについて、麻酔下にて腋窩動脈より放血して、安楽死処置を行った。すべてのプロトコルは、鹿児島大学の動物実験委員会の承認を受けており(A09001)、全ての研究は、「動物愛護および管理に関する法律(法律第105号及び通知第6号)」に基づいて制定された鹿児島大学の動物実験ガイドラインに従って行った。本研究は、新日本生物医学研究所の動物福祉条例に従って実施し、その施設は、国際実験動物ケア評価認証協会(AAALAC International)の認定を受け、International Animal Care and Use Committeeの認可を受けた施設である。

生化学分析

血中の脂質組成を調べるために、2週間ごとに血液サンプルを採取した。総Cho、LDL-Cho、HDL-Cho、およびTG濃度を、自動アガロースゲル電気泳動装置（Epalyzer 2; Helena Laboratories、日本）を用いて分析した。

肝臓脂質の抽出

Folch法に従って、肝臓の一部から脂質を抽出した。濃縮した脂質を2-プロパノールで再溶解し、TGおよび総Cho濃度をトリグリセリドE-テストワコーおよび総コレステロールE-テストワコー（和光純薬工業）を用いて分析した。

病理検査

剖検中、各動物から大動脈、動脈、肝臓、脾臓、心臓、腎臓および大網脂肪を採取し、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、および大網脂肪を計量した。各大動脈および動脈は約3 mm切片に切断し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。4 μm厚のパラフィン包埋組織切片として処理した後、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。各動物のアテローム性動脈硬化症の発症の程度は、Stary Type Classificationに従って分類した（図3-2） [73]。アテローム性動脈硬化病変の免疫染色に関しては、パラフィン包埋切片に対し、一次抗体およびEnvisionキット（Dako Cytomation、日本）を用いて実施した。用いた1次抗体と希釈倍率は以下とした：anti-ionized calcium-binding daptor molecule-1(Iba-1) ポリクローナル抗体（1：250; 和光純薬工業）、anti- α smooth muscle actin (α -SMA) モノクローナル抗体（1：100; クローン1A4; Dako Cytomation、日本）。

DNAマイクロアレイ分析

TRIzol (Invitrogen Japan、日本) を用いて、HFCDおよびHFCD + eLF群の肝臓サンプルからTotal RNAを抽出し、続いて、RNeasy Mini Kit (Qiagen、東京) を用いて精製した。Total RNAのクオリティおよび量は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Japan、東京) を用いて評価した。クオリティの基準となるRNA integrity numberは7以上とした。これらの動物からのTotal RNAを、報告されている方法に従い、DNAマイクロアレイ分析に供した[74]。Affymetrix Porcine Genome Array™ (Affymetrix、Santa Clara、CA) を用い、蛍光シグナルをAffymetrix GeneChip Systemでスキャンした。Affymetrix GeneChip Command Consoleソフトウェアを使用してアレイイメージを各プローブの蛍光強度値に変換した (CELファイル)。

DNAマイクロアレイデータ解析

Rソフトウェア (バージョン2.7.1; The R Project、<http://www.r-project.org>) を使用して、CELファイルをDistribution Free Weighed (DFW) 法に従って定量化した[75]。HFCDとHFCD + eLF群の遺伝子発現の比較は、RankProductsおよびBenjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) を用いて行った[76]。Porcine Genome Arrayのアノテーションファイルは、AffymetrixのWebサイト [Porcine Annotations、CSV形式、Release 33 (2012年6月22日 ver)]からダウンロードして使用した。選択されたプローブセットは、機能アノテーションツールである Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID)[77]を使用して得られたGene Ontology (GO) と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathwayの分類に従った。GO分析は、「生物学的プロセスにおける機能」に基づいて分類するGOTERM_BP_ALLのカテゴリを用いた。関連する統計解析は、Fisher's exact testとFDR補正を用いて実施した。有意水準は、FDR補正後のp値について、 $p < 0.05$ として定義した。

統計解析

データは全て、「平均 ± 標準偏差」で表示した。他の動物に対するCho投与実験と同様、本実験で得られたデータが正規分布することを想定して、HFCDとHFCD + eLF群の群間比較を、Welch検定により行った。統計的有意差の判定基準は $p < 0.05$ に設定した。データはJMP ver11.2.0を用いて分析した (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

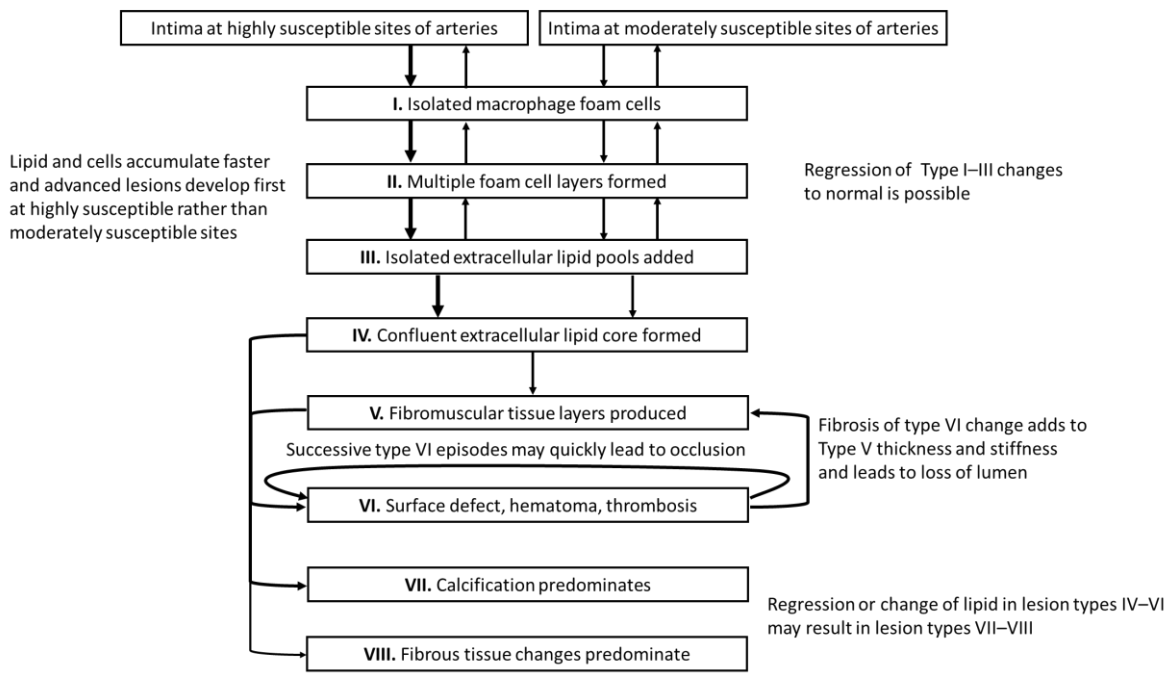


図3-2. Stary Type Classification(【73】を一部改変して掲載)

<結果>

HFCD誘導性の高Cho血症およびアテローム性動脈硬化症に対するeLFの影響

HFCD + eLF群の成長曲線は、HFCD群の成長曲線よりわずかに低かった（図3-3A）。しかし、8週の時点で、その差に統計学的な有意は認められなかった。食餌摂取量も、いずれの時点でも有意差がなかった（図3-3B）。HFCDとHFCD + eLF群との間で重量に有意差のある臓器は認められなかった（表3-2）。肝臓中のTGおよびCho濃度も、HFCDとHFCD + eLF群との間に有意差は認められなかった。しかし、eLF投与は、HFCD誘導性のCho濃度（35%減少）を減少させる傾向が認められた。血清中脂質濃度については、HFCD群では、総Cho値、LDL-Cho値およびHDL-Cho値は摂取2週後から上昇し、2週目でプラトーに達した（図3-4A-D）。それと比較して、HFCD + eLF投与群では、第2週で総Cho（42%）およびLDL-Cho値（52%）に関して低値を示した。これらの効果は、実験期間中、継続して認められた。血清総Cho、LDLおよびHDL-Cho値は2週目にプラトーに達したため、2週目のデータを用いて、eLFの高Cho血症予防効果に関する統計解析を行った（表3-3）。その結果、HFCD + eLF群で明らかに低値を示していた血清中総ChoおよびLDL-Cho値に関して、両群間で有意な差が認められた（ $p < 0.01$ ）。また、血清中総ChoおよびLDL-Cho値は、肝臓Cho値と正の相関が認められた（図3-5）。剖検において、対照群の右冠動脈（Right Coronary Artery; RCA）ではアテローム性動脈硬化病変は観察されなかった（図3-6AおよびB）。HFCD群の動脈は、泡沫細胞浸潤を伴う内膜肥厚を示した（図3-6CおよびD）。免疫組織染色により、RCAの内膜において、マクロファージ由来のIba1陽性細胞及び α SMA陽性細胞の存在も確認した（図3-7AおよびB）。HFCD + eLF群（Animal No.8、表3-4）では、一部の領域を除いて、アテローム性動脈硬化病変は観察されなかった（図3-6EおよびF）。アテローム性動脈硬化症の程度は、Stary Type分類（図3-2）に従って分類し、各個体の各動脈の分類を行った（表3-4）。対照群のRCAにおけるアテローム性動脈硬化症のタイプは、病変が発生していないため分類できなかった。HFCD群においては、3匹のRCAは全て、アテ

ローム性動脈硬化症タイプIIと分類された。HFCD + eLF群では、1匹はタイプIに分類され、他の2匹のRCAは分類できなかった。他の14の動脈の分類結果を含め、アテローム性動脈硬化症の発症に関してeLFが顕著な抑制効果を示すことが明らかとなった（表3-4）。

肝臓中の遺伝子発現プロファイルに対するeLFの影響

HFCDおよびHFCD + eLF群の遺伝子発現データの比較結果をRankProducts法により順位付けを行いBenjamini and HochbergのFDR（FDR-corrected $p < 0.05$ ）を指標に抽出した結果、計444個のプローブセットが抽出された（HFCD群 > HFCD + eLF群；227個（表3-5-1）、HFCD群 < HFCD + eLF群；217個（表3-5-2））。これらのプローブセットのうち、Cho取込み受容体（LDL Receptor；*LDLR*）とCho合成の律速酵素（*HMGCR*）の遺伝子発現がeLF群で共に発現が上昇し、これらの遺伝子の重要な転写因子である*SREBP-2*も遺伝子発現が上昇する傾向を示した（ $P = 0.055$ 、表3-6、図3-8）。次に、DAVIDを使用して、選択された444プローブのGO分析の結果、eLF投与の効果として、GOTERM_BP_ALLのうち、酸化還元プロセス（GO：005514、表3-7-1および3-7-2）に有意な変化が認められた。KEGGPathway分析により、有意な影響を受けた7つの経路が明らかになった（表3-8-1）。その内、ステロイド生合成（ssc00100）カテゴリーにおいて変動した遺伝子は、NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like（*NSDHL*）、Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1（*CYP51*）、Squalene epoxidase（*SQLE*）およびMethylsterol monooxygenase 1（*MSMO1*）であり、それらの全てがCho合成を促進する酵素であった（表3-8-2）。これらの遺伝子は全てHFCD群と比較してHFCD + eLF群で遺伝子発現が高値を示した。

< 考察 >

本研究では、MMPigへのeLF投与により、HFCD誘発性の高Cho血症およびアテローム性動脈硬化症の発症が減弱することを明らかにした。脂質代謝に対するLFの効果は臨床試験や動物実験で報告されているが[20, 21, 29, 31, 46]、Choの恒常性制御等、様々な点でヒトと類似性の高いMMPigに対する高Cho血症やアテローム性動脈硬化症に対するLFの有益な効果は報告されていなかった。

哺乳類では、Choの恒常性は主に肝臓で制御され、血中Cho濃度とCho合成-異化バランスを調節している。そのため、本研究では、肝臓の遺伝子発現プロファイルについて、DNAマイクロアレイ法を用いて解析し、eLFの肝機能への影響を明らかにした。近年、DFW法によって前処理を行った後のRankProducts法は、有意な発現変動が認められる遺伝子の正確な検出のための最適な組み合わせであることが報告されている[75]。そこで、我々は、DNAマイクロアレイデータの正規化方法としてDFWを適用した。GO解析においては、HFCD群とHFCD+eLF群間に、酸化還元プロセスにおいてのみ有意な変化が認められた。eLF投与群では、肝臓中コレステロール濃度が平均値で低値を示していたこと（表3-3）、また、血中の脂質濃度においても、複数のパラメータが低値を示していたことから、(図3-4)、HFCD群と比較して、身体の酸化状態が悪化していない結果が表れているものと考えられた。本検討においては、パスウェイ解析の結果のうち、コレステロール合成に関わるSteroid合成経路に着目した。HFCD+eLF群では、HFCD群と比較して、Cho代謝 (*LDLR*および*HMGCR*) およびCho合成促進酵素 (*CYP51*, *MSMO1*, *NSDHL*および*SQLE*) に関連する遺伝子の発現が高かった (表3-6および表3-8-2) [62, 78-80]。また、これらの遺伝子の発現は、対照群と比較すると、HFCD群において有意に低下していることを確認した (データ未掲載)。血中Cho濃度の上昇に伴い、恒常性を保つために肝臓へのCho取り込みやCho合成が抑制されることが知られている。本結果は、eLF投与により、HFCD群と比較して血中Cho濃度の上昇が抑制されたことにより、肝臓におけるCho取り込みおよびCho合成の機能が抑

制されていない状態が反映された結果であることが示唆された。さらに、eLF投与は肝臓中Cho濃度を35%低下させ（表3-2）、血清中総ChoおよびLDL-Cho濃度は肝臓中Cho濃度と強く相関した（図3-5AおよびB）。これらの結果と併せて、eLFは、血清中Cho濃度の増加抑制を通じて、肝臓におけるHFCD誘発性のCho代謝調節異常から恒常性を守ることが示唆された。作用機序の1つとして、eLFは小腸からのCho吸収を阻害していることが考えられる。LFはカチオン性のタンパク質（等電点：8.2-8.9）である[8]。同じくカチオン性の樹脂であるコレステラミンは、陰イオン性物質である胆汁酸と結合し、Choのミセルへの可溶化を抑制して糞便中への排泄を促進することが明らかにされており[81]、複数の国で脂質低下薬として承認されている。LFも同作用機序である可能性が考えられたため、我々は、LFと胆汁酸が結合すること、また、Cho含有食にLFを混餌することにより、ラットにおいて糞便中へのCho排出が有意に増加することも確認しており[54]、MMPigに対する本作用機序の寄与を強く示唆する結果を得ている。一方、Takeuchiらは、高脂肪および高Cho食を与えたマウスに対するLF投与は糞便中の胆汁酸およびCho排泄を促進しないことを報告した[21]。しかし、我々の検討条件とは異なり、食餌に高濃度の胆汁酸（0.25%）が添加されている。胆汁酸の量が過剰であったために、LFがミセル形成を十分に抑制できなかった可能性が考えられる。

高Cho血症の予防は、アテローム性動脈硬化症抑制の主メカニズムの1つである。ここでは、循環系におけるeLFのさらなる作用機序仮説を提案する。内皮細胞損傷は、アテローム性動脈硬化症の初期段階において、平滑筋細胞およびマクロファージの内膜への浸潤を引き起こすことが報告されている[82]。次のステップとして、マクロファージは、スカベンジャー受容体を介して血管壁から酸化されたLDL沈着物を取り込み、続いて泡沫細胞に発達することが報告されている[83, 84]。LF（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）はヒト大動脈内皮細胞の血管形成および細胞増殖を促進することが報告されている[85]。Kajikawaらは、ウシLF（200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1 mg/mL ）が、マクロファージにおけるスカベンジャー受容体を介したChoエステル蓄

積を顕著に阻害することを報告している[86]。また、Fischerらは[32]、マウスへの強制胃内投与法で投与されたウシLFは、血漿中においてインタクトな形で検出されることを報告した。したがって、内皮細胞機能不全およびマクロファージからの泡沫細胞発生の抑制は、eLFの抗アテローム効果の作用機序として有り得る。一方、本研究では、Fischerの報告(35 mg/kg/body)と同じ範囲の37~65mg/kg/bodyの投与量でeLFをMMPigに投与したが、Fischerの報告では、血清中における最大のLF検出濃度は約50~60 ng/mLであった[32]。したがって、低濃度のLFによる内皮細胞傷害およびマクロファージにおけるコレステリルエステル蓄積の阻害効果を明らかにすることは重要な課題である。

本研究では、eLFがMMPigの高Cho血症およびアテローム性動脈硬化症発症に対して抑制作用を示すことを実証した。これらの結果およびLFの食品としての安全性情報から、eLFは、高Cho血症およびアテローム性動脈硬化症の予防のための有望な食品添加物であると考えられる。

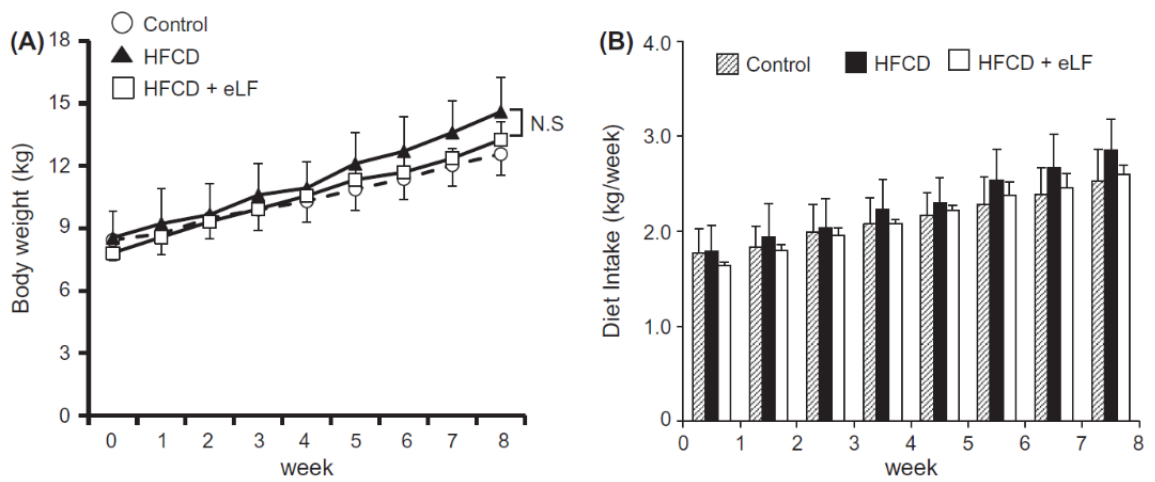


図3-3. 8週間の試験期間における体重変化と食餌摂取量

対照群（Control群）には通常食を与え、空の腸溶性カプセルを投与した。HFCD群にはHFCDを与え、空の腸溶性カプセルを投与した。HFCD + eLF群にはHFCDを与え、LF（500mg LF/body/day）で満たされたカプセルを投与した。

(A) 成長曲線；Control群（○）、HFCD群（▲）、HFCD + eLF群（□） (B) 食餌摂取量；HFCD群（■）、HFCD + eLF群（□）。全てのデータは平均 ± SD（n = 3）で表示した。HFCDとHFCD + eLF群との間の統計分析はWelch検定にて行った（ $p < 0.05$ ）。

表3-2. 8週時点での組織重量及び肝臓中脂質濃度

	Control	HFCF	HFCF + eLF	<i>P</i> *
Organs				
Liver (g)	224.1 ± 9.6	275.3 ± 13.0	256.3 ± 29.2	N.S
Spleen (g)	34.0 ± 6.7	33.1 ± 3.8	32.8 ± 4.5	N.S
Heart (g)	60.8 ± 3.1	61.8 ± 4.6	64.2 ± 3.8	N.S
Kidney (g)	57.6 ± 5.0	57.8 ± 11.0	62.6 ± 6.5	N.S
Omental fat (g)	16.6 ± 4.5	20.6 ± 4.7	15.6 ± 1.6	N.S
Hepatic lipid concentration				
Triglyceride (mg/g-liver)	2.4 ± 0.3	4.2 ± 0.8	4.5 ± 1.0	N.S
Cholesterol (mg/g-liver)	1.8 ± 0.2	9.1 ± 2.8	5.9 ± 2.2	N.S

データは、平均 ± SDで表示した。

*HFCF群とHFCF + eLF群間の統計処理は、Welch検定にて行った($p < 0.05$)。

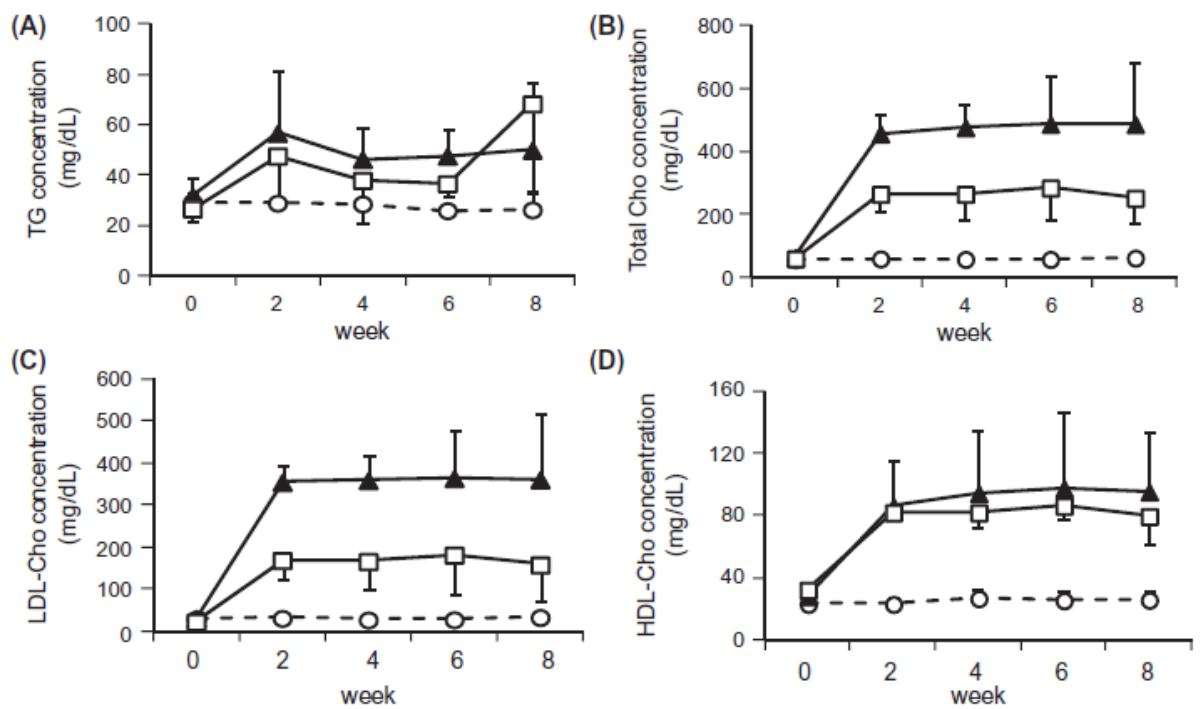


図3-4. 8週間の血清中脂質濃度変化

群表示；対照群 (○)、 HFCD 群 (▲)、 HFCD + eLF 群 (□)

血清中脂質データ；(A) TG、(B) 総Cho、(C) LDL-Cho、(D) HDL-Cho濃度。

データは、平均 ± SD (n = 3) で表示した。

表 3-3. 2 週時点での血清中脂質濃度に対する eLF の効果

Parameter	Group	Δvalue at week 2		*P
		Mean	SD	
Triglyceride	HFCD	25.0	± 28.7	N.S
	HFCD + eLF	21.0	± 13.0	
Total cholesterol	HFCD	392.3	± 52.6	<0.01
	HFCD + eLF	205.0	± 55.1	
HDL cholesterol	HFCD	57.7	± 24.7	N.S
	HFCD + eLF	49.7	± 2.9	
LDL cholesterol	HFCD	323.7	± 37.8	<0.01
	HFCD + eLF	146.3	± 48.7	

データは、平均 ± SDで表示した。

*HFCD群とHFCD + eLF群間の統計処理は、Welch検定にて行った(p < 0.05)

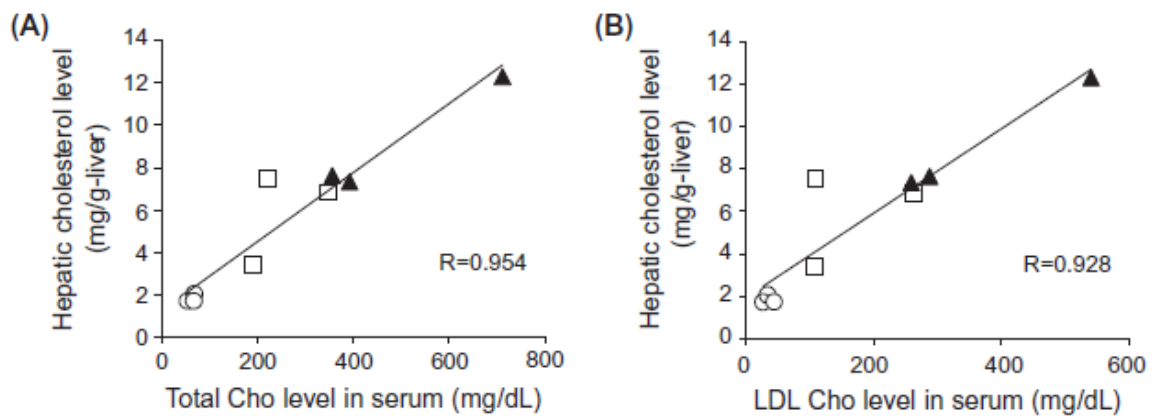


図3-5. 8週時点における血清中Cho濃度と肝臓中Cho濃度の相関
群表示；対照群（○）、HFCD群（▲）、HFCD + eLF群（□）

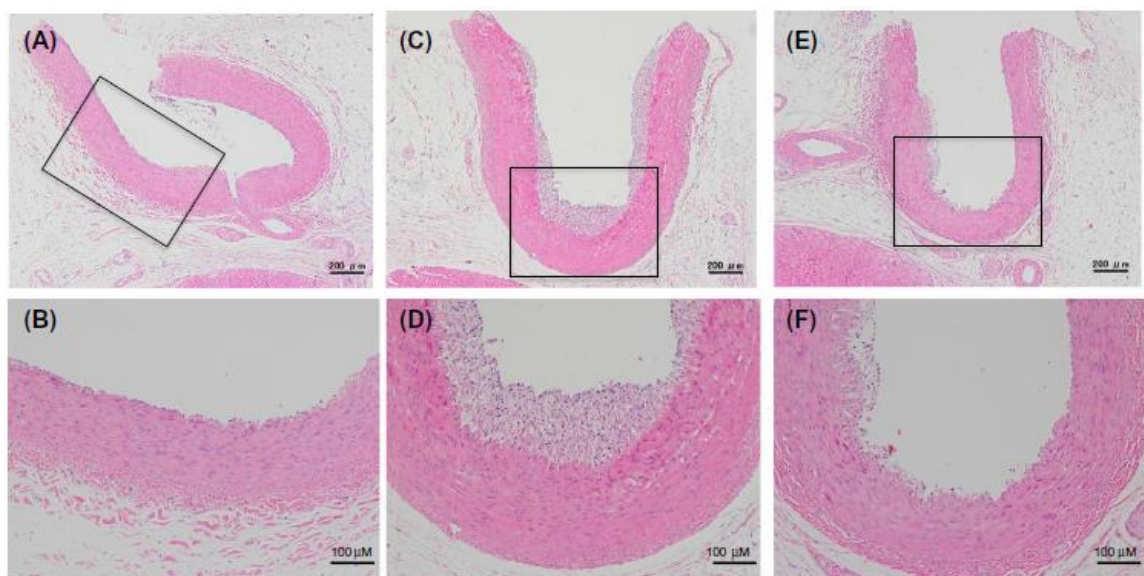


図3-6. 8週時点での右冠状動脈の組織学的解析

組織学的解析は、H&E染色された右冠状動脈において行った。代表的な結果を図に示した。(A) と (B) ; 対照群、(C) と (D) ; HFCD群、(E)と(F) ; HFCD + eLF群。(A)、(C)及び(E)に記したバースケールは200 μm であり、(B)、(D)及び(F)に記したバースケールは100 μm である。

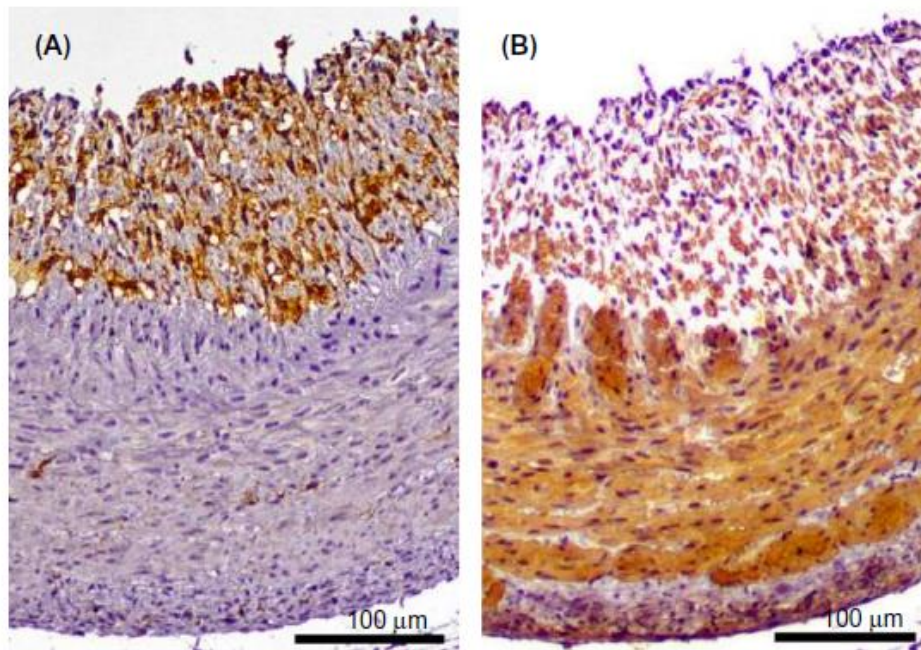


図3-7. HFCD群のアテローム性動脈層の免疫組織学的解析

右冠状動脈について、免疫組織学的解析を行った。一次抗体は、anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) と anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) を使い、Envisionキットを用いて検出を行った。各図は、(A)が Iba-1陽性細胞を (B)が α -SMA陽性細胞を示している。バースケールは100 μ mで示した。

表3-4. Stary Type分類に従ったアテローム性動脈硬化スコア

Group Animal No	Control			HFCD			HFCD + eLF		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LAD Coronary Artery (左冠動脈前下行枝)	-	-	-	II	II	II	-	I	-
Right Coronary Artery (右冠動脈)	-	-	-	II	II	II	-	I	-
Pulmonary artery (肺動脈)	-	-	-	I	I	I	-	-	-
Aortic arch (大動脈弓)	-	-	-	II	II	II	-	-	-
Common carotid artery (総頸動脈)	-	-	-	I	-	-	-	-	-
Thoracic aorta (胸大動脈)	-	-	-	II	I	II	-	-	-
Abdominal aorta (腹大動脈)	-	-	-	II	II	II	-	-	-
External iliac arteries (外腸骨動脈)	-	-	-	II	II	I	-	-	-
Internal iliac arteries (内腸骨動脈)	-	-	-	-	II	-	-	I	-
Renal artery (腎動脈)	-	-	-	II	II	-	-	-	-
Pancreatic artery (膵動脈)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rostral cerebral artery (上大脳動脈)	-	-	-	I	-	-	-	-	-
Internal carotid artery (内頸動脈)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caudal communicating artery (内頸動脈尾側分枝)	-	-	-	II	-	-	-	-	-
Basilar artery (脳底動脈)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

－：病変無し、I：泡沫化マクロファージが観察される、II：泡沫化細胞の多層化が認められる

表 3-5-1. 抽出されたプローブセット (HFCD > HFCD + eLF)

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	FDR-corrected
			p value
			HFCD 群 > HFCD + LF 群
Ssc.15742.2.S1_a_at	cytochrome P450 2A19	<i>CYP2A19</i>	0.000
Ssc.20101.1.S1_at	---	---	0.000
Ssc.8295.1.A1_at	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1-like	<i>LOC100519324</i>	0.000
Ssc.600.1.S1_s_at	metallothionein 1A	<i>MT1A</i>	0.000
Ssc.12504.1.A1_at	putative ISG12(a) protein	<i>ISG12(A)</i>	0.000
Ssc.18889.1.S1_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	<i>HSD17B13</i>	0.000
Ssc.13780.11.S1_x_at	MHC class I antigen 2	<i>SLA-2</i>	0.000
Ssc.137.1.S1_at	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2 (hucolin)	<i>FCN2</i>	0.000
Ssc.29840.1.A1_at	aquaporin 9	<i>AQP9</i>	0.000
Ssc.23538.1.S1_at	flavin containing monooxygenase 5	<i>FMO5</i>	0.000
Ssc.14246.1.S1_at	gelsolin	<i>GSN</i>	0.000
Ssc.19629.2.S1_s_at	early growth response 1	<i>EGR1</i>	0.000
Ssc.1008.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.29449.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.5538.1.S1_at	carbonic anhydrase II	<i>CA2</i>	0.000
Ssc.15741.1.S1_s_at	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	<i>CYP2E1</i>	0.000
Ssc.8308.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.16125.1.S1_x_at	Metallothionein 1A	<i>MT1A</i>	0.001
Ssc.18889.2.A1_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	<i>HSD17B13</i>	0.001
Ssc.26146.1.S1_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	<i>CXCL9</i>	0.001
Ssc.11098.1.S1_at	interferon-induced transmembrane protein 3-like	<i>LOC100627740</i>	0.001
Ssc.7266.1.A1_at	periostin, osteoblast specific factor	<i>POSTN</i>	0.001
Ssc.18216.1.S1_at	---	---	0.001
Ssc.1856.1.A1_at	acetyl-CoA acyltransferase 2	<i>ACAA2</i>	0.001
Ssc.18572.1.S1_at	Glycoprotein (transmembrane) nmb	<i>GPNUMB</i>	0.001
Ssc.1252.1.S1_at	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	<i>SPATS2L</i>	0.001
Ssc.15046.1.A1_at	nuclear receptor coactivator 7	<i>NCOA7</i>	0.001
Ssc.9392.3.A1_at	---	---	0.001
Ssc.15816.1.S1_at	myo-inositol oxygenase	<i>MIOX</i>	0.001
Ssc.8177.1.A2_at	proteolipid protein 1	<i>PLP1</i>	0.001

Ssc.20006.1.S1_at	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	<i>SULT1A1</i>	0.001
Ssc.9637.1.S2_at	Glutamate-ammonia ligase	<i>GLUL</i>	0.002
Ssc.17335.1.S1_at	organic anion transporter OATv1	<i>OATV1</i>	0.002
Ssc.208.1.S1_at	cytochrome P450 1A1	<i>CYP1A1</i>	0.002
Ssc.18673.1.A1_at	claudin 14	<i>CLDN14</i>	0.002
Ssc.12284.1.A1_at	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	<i>SGK1</i>	0.002
Ssc.8811.1.S1_at	---	---	0.002
Ssc.1555.1.A1_at	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>FOS</i>	0.002
Ssc.575.1.S1_at	acid phosphatase 5, tartrate resistant	<i>ACP5</i>	0.002
Ssc.16169.1.S1_x_at	MHC class II histocompatibility antigen SLA-DRB1	<i>SLA-DRB1</i>	0.002
Ssc.29620.1.A1_at	D-aspartate oxidase	<i>DDO</i>	0.002
Ssc.1527.1.A1_at	---	---	0.002
Ssc.19629.1.A1_at	---	---	0.002
Ssc.6172.1.S1_at	---	---	0.002
Ssc.15640.1.S1_at	metallothionein isoform	<i>MT-2B</i>	0.002
Ssc.9392.1.S1_at	---	---	0.002
Ssc.13780.2.S1_x_at	patr class I histocompatibility antigen, A-126 alpha chain-like	<i>LOC100513601</i>	0.002
Ssc.221.1.S1_at	interferon-induced GTP-binding protein Mx2-like	<i>LOC100518095</i>	0.003
Ssc.9392.2.S1_at	---	---	0.003
Ssc.9707.1.A1_at	BTG family, member 2	<i>BTG2</i>	0.003
Ssc.13780.10.S1_x_at	patr class I histocompatibility antigen, A-126 alpha chain-like	<i>LOC100622689</i>	0.003
Ssc.17286.1.A1_at	BTG family, member 2	<i>BTG2</i>	0.003
Ssc.17815.1.S1_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	<i>LGALS3</i>	0.003
Ssc.13780.4.S1_x_at	patr class I histocompatibility antigen, A-126 alpha chain-like	<i>LOC100513601</i>	0.003
Ssc.9075.1.A1_at	C-JUN protein	<i>C-JUN</i>	0.003
Ssc.19866.1.S1_at	carbonic anhydrase III, muscle specific	<i>CA3</i>	0.003
Ssc.8438.1.A1_at	---	---	0.003
Ssc.286.1.S1_s_at	inflammatory response protein 6	<i>IRG6</i>	0.003
Ssc.13780.5.S1_x_at	MHC class I antigen 2	<i>SLA-2</i>	0.004
Ssc.3039.1.S1_at	---	---	0.004
Ssc.10960.1.S1_at	carbonic anhydrase III, muscle specific	<i>CA3</i>	0.004
Ssc.2588.1.S1_at	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	<i>SPATS2L</i>	0.004
Ssc.14340.1.S1_at	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	<i>LOC100518302</i>	0.004

Ssc.9637.1.S1_at	glutamate-ammonia ligase	<i>GLUL</i>	0.004
Ssc.4203.1.S1_at	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3-like	<i>LOC100525045</i>	0.004
Ssc.22550.1.A1_at	---	---	0.004
Ssc.13780.1.S1_x_at	patr class I histocompatibility antigen, A-126 alpha chain-like	<i>LOC100513601</i>	0.004
Ssc.11557.1.A1_at	ISG15 ubiquitin-like modifier	<i>ISG15</i>	0.004
Ssc.16466.1.A1_at	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3-like	<i>LOC100738612</i>	0.004
Ssc.7234.1.A1_at	aquaporin 9	<i>AQP9</i>	0.005
Ssc.13778.1.S1_at	IgG heavy chain	<i>LOC396781</i>	0.005
Ssc.9720.1.A1_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	<i>CYR61</i>	0.005
Ssc.26469.1.A1_at	MACRO domain containing 1	<i>MACROD1</i>	0.006
Ssc.8177.1.A1_at	proteolipid protein 1	<i>PLP1</i>	0.006
Ssc.6822.1.A1_at	nuclear receptor coactivator 7	<i>NCOA7</i>	0.006
Ssc.526.1.S1_at	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	<i>PKIA</i>	0.006
Ssc.16460.1.S1_at	early growth response 1	<i>EGR1</i>	0.007
Ssc.22443.1.S1_at	---	---	0.007
Ssc.20585.1.S1_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	<i>GADD45G</i>	0.007
Ssc.10131.1.A1_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<i>PK4</i>	0.007
Ssc.11269.1.A1_at	immediate early response gene 2 protein-like	<i>LOC100525209</i>	0.007
Ssc.11260.1.A1_at	---	---	0.007
Ssc.5327.1.S1_at	cytochrome P450 2J2-like	<i>LOC100524940</i>	0.007
Ssc.18572.2.S1_at	Glycoprotein (transmembrane) nmb	<i>GPMB</i>	0.007
Ssc.30801.1.A1_at	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like	<i>LOC100620996</i>	0.007
Ssc.29305.1.A1_at	---	---	0.007
Ssc.16366.1.S1_at	Rho family GTPase 3	<i>RND3</i>	0.007
Ssc.15845.1.S1_at	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	<i>MBL2</i>	0.007
Ssc.5448.1.S1_at	multiple PDZ domain protein	<i>MPDZ</i>	0.007
Ssc.9450.1.S1_at	---	---	0.007
Ssc.6356.1.S1_at	ornithine decarboxylase	<i>ODC</i>	0.008
Ssc.16769.1.S1_at	cathepsin Z	<i>CTSZ</i>	0.008
Ssc.23933.1.A1_at	multiple PDZ domain protein	<i>MPDZ</i>	0.009
Ssc.7534.2.S1_at	chromosome 16 open reading frame 80	<i>C6H16orf80</i>	0.010
Ssc.24239.1.S1_at	---	---	0.010
Ssc.19692.1.S1_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<i>CXCL2</i>	0.010
Ssc.4127.2.A1_at	Rho family GTPase 3	<i>RND3</i>	0.010

Ssc.2879.1.S1_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	<i>SLC25A25</i>	0.010
Ssc.9114.1.S1_at	STEAP family member 4	<i>STEAP4</i>	0.011
Ssc.22959.1.S1_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	<i>PCK1</i>	0.011
Ssc.6323.1.S1_at	perilipin 2	<i>PLIN2</i>	0.011
Ssc.1121.1.S1_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<i>PDK4</i>	0.011
Ssc.29365.1.A1_at	---	---	0.011
Ssc.5030.1.A1_at	tripartite motif-containing protein 5-like	<i>LOC100738990</i>	0.012
Ssc.6014.1.S1_at	RAR-related orphan receptor C	<i>RORC</i>	0.013
Ssc.7158.1.A1_a_at	glutathione peroxidase 3 (plasma)	<i>GPX3</i>	0.013
Ssc.5038.1.S1_at	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4-like	<i>LOC100738856</i>	0.013
Ssc.6462.1.A1_at	lipid phosphate phosphohydrolase 3-like	<i>LOC100512419</i>	0.013
Ssc.8099.1.S1_at	chromosome 10 open reading frame 58 ortholog	<i>C14H10orf58</i>	0.013
Ssc.22082.2.A1_at	disabled homolog 1 (Drosophila)	<i>DAB1</i>	0.013
Ssc.25948.1.S1_at	---	---	0.013
Ssc.2834.1.A1_at	---	---	0.013
Ssc.23929.1.A1_at	Phospholipid scramblase 1	<i>PLSCR1</i>	0.013
Ssc.18933.1.A1_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	<i>ADH4</i>	0.013
Ssc.13292.1.A1_at	disabled homolog 1 (Drosophila)	<i>DAB1</i>	0.013
Ssc.1447.1.A1_at	---	---	0.014
Ssc.3880.1.S1_at	uncharacterized LOC100739791	<i>LOC100739791</i>	0.014
Ssc.13780.9.S1_a_at	MHC class I antigen 3	<i>SLA-3</i>	0.014
Ssc.8562.3.A1_at	connective tissue growth factor	<i>CCN2</i>	0.015
Ssc.6189.1.A1_at	---	---	0.015
Ssc.1332.1.S1_at	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1	<i>SULT2A1</i>	0.015
Ssc.25045.1.S1_at	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	<i>KDR</i>	0.015
Ssc.10588.1.A1_at	interferon-induced protein 44-like	<i>IFI44L</i>	0.016
Ssc.7458.1.A1_at	---	---	0.016
Ssc.23408.1.A1_s_at	GTPase SLIP-GC-like	<i>LOC100157947</i>	0.016
Ssc.31140.1.S1_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	<i>IFIT3</i>	0.016
Ssc.8868.1.S1_at	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	<i>FCGR2B</i>	0.016
Ssc.22082.1.A1_at	disabled homolog 1 (Drosophila)	<i>DAB1</i>	0.017
Ssc.12999.1.S1_at	glutathione S-transferase P-like	<i>LOC100739163</i>	0.017

Ssc.29281.1.A1_at	---	---	0.017
Ssc.21828.1.S1_at	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	<i>SLC37A4</i>	0.017
Ssc.23126.1.S1_at	uncharacterized LOC100521600	<i>LOC100521600</i>	0.018
Ssc.5008.1.A1_at	glutathione S-transferase alpha 4	<i>GSTA4</i>	0.018
Ssc.14418.1.A1_at	---	---	0.018
Ssc.1037.1.S1_at	integral membrane protein 2B	<i>ITM2B</i>	0.018
Ssc.2674.1.S1_at	---	---	0.018
Ssc.10965.1.A1_at	transcription factor MafB-like	<i>LOC100518227</i>	0.018
Ssc.27550.1.S1_at	ceramide glucosyltransferase-like	<i>LOC100625476</i>	0.018
Ssc.11561.1.A1_at	protein kinase C-binding protein NELL2-like	<i>LOC100738381</i>	0.018
Ssc.14503.1.S1_at	apolipoprotein A-IV	<i>APOA4</i>	0.018
Ssc.9229.1.S1_at	mannose receptor, C type 1	<i>MRC1</i>	0.018
Ssc.9269.1.S1_at	vacuole membrane protein 1-like	<i>LOC100524644</i>	0.019
Ssc.6886.1.A1_at	protein osteopotential homolog	<i>LOC100622624</i>	0.019
Ssc.29333.1.A1_at	---	---	0.019
Ssc.21418.1.S1_at	uncharacterized LOC100521496	<i>LOC100521496</i>	0.020
Ssc.9136.1.S1_at	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>CCRN4L</i>	0.020
Ssc.336.1.S1_at	ubiquitin specific peptidase 18	<i>USP18</i>	0.021
Ssc.2033.1.S1_at	cryptochrome 1 (photolyase-like)	<i>CRY1</i>	0.021
Ssc.30752.2.A1_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	<i>IFIT1</i>	0.021
Ssc.8758.1.A1_at	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	<i>PCOLCE2</i>	0.021
Ssc.21161.1.S1_at	UDP-glucuronosyltransferase 2C1-like	<i>LOC100515394</i>	0.021
Ssc.3895.1.A1_at	CD46 molecule, complement regulatory protein	<i>CD46</i>	0.021
Ssc.6707.1.A1_at	---	---	0.021
Ssc.1447.3.S1_at	---	---	0.021
Ssc.13786.1.A1_at	---	---	0.021
Ssc.13780.12.S1_x_at	MHC class I antigen 3	<i>SLA-3</i>	0.021
Ssc.13780.6.S1_x_at	patr class I histocompatibility antigen, A-126 alpha chain-like	<i>LOC100622689</i>	0.022
Ssc.10237.1.S1_at	heat shock 27kDa protein 8	<i>LOC100155338</i>	0.022
Ssc.16377.1.A1_at	glutathione S-transferase alpha 2	<i>GSTA2</i>	0.022
Ssc.2884.1.S1_at	villin 1	<i>VIL1</i>	0.022
Ssc.12348.2.S1_at	beta-2-microglobulin	<i>B2M</i>	0.023
Ssc.30899.1.A1_at	---	---	0.023
Ssc.6550.1.A1_at	tetraspanin-7-like	<i>LOC100526026</i>	0.023

Ssc.973.1.A1_at	protein FAM149A-like	<i>LOC100157674</i>	0.024
Ssc.7446.1.S1_a_at	peptidylprolyl isomerase D	<i>PPID</i>	0.025
Ssc.6169.1.S1_at	extracellular matrix protein 1	<i>ECM1</i>	0.025
Ssc.11070.1.S1_at	Ig gamma 2b chain constant region	<i>IGG2B</i>	0.026
Ssc.14465.1.A1_at	sodium-coupled neutral amino acid transporter 2-like	<i>LOC100525644</i>	0.027
Ssc.29483.1.A1_at	frizzled-5-like	<i>LOC100519058</i>	0.027
Ssc.4521.2.S1_at	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	<i>PRPS2</i>	0.027
Ssc.9453.1.A1_at	Rho family GTPase 3	<i>RND3</i>	0.027
Ssc.9440.1.A1_at	---	---	0.027
Ssc.6783.1.S1_at	tetraspanin 12	<i>TSPAN12</i>	0.027
Ssc.16963.1.S1_at	---	---	0.028
Ssc.9307.1.A1_at	Protein SPT2 homolog	<i>LOC100524607</i>	0.028
Ssc.30467.1.A1_at	elongation of very long chain fatty acids protein 2-like	<i>LOC100153368</i>	0.028
Ssc.28012.1.A1_a_at	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	<i>CDK5RAP2</i>	0.028
Ssc.5704.1.S1_at	tetranectin-like	<i>LOC100620511</i>	0.028
Ssc.28782.1.A1_at	solute carrier family 38, member 1	<i>SLC38A1</i>	0.029
Ssc.25221.1.A1_at	dual specificity protein phosphatase CDC14B-like	<i>LOC100626260</i>	0.029
Ssc.9778.1.S1_at	proteoglycan 1 precursor-like	<i>LOC100049692</i>	0.030
Ssc.24923.1.S1_at	hepatocyte growth factor-like protein-like	<i>LOC100626310</i>	0.031
Ssc.5299.1.S1_at	laminin, beta 1	<i>LAMB1</i>	0.031
Ssc.11076.1.S1_at	serine dehydratase	<i>SDS</i>	0.031
Ssc.4808.1.S1_at	chromosome 7 open reading frame 41 ortholog	<i>C18H7orf41</i>	0.031
Ssc.11746.1.A1_at	---	---	0.031
Ssc.16114.1.S1_at	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	<i>CACNA2D1</i>	0.032
Ssc.21905.1.S1_at	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	<i>SLC37A4</i>	0.032
Ssc.7460.1.A1_at	influenza virus NS1A binding protein	<i>IVNS1ABP</i>	0.033
Ssc.4753.1.A1_at	TEK tyrosine kinase, endothelial	<i>TEK</i>	0.033
Ssc.2290.1.S1_at	---	---	0.035
Ssc.19431.1.S1_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3-like	<i>LOC100621671</i>	0.035
Ssc.19163.1.S1_at	MAX interactor 1	<i>MXI1</i>	0.035
Ssc.8865.1.A1_at	dual specificity phosphatase 6	<i>DUSP6</i>	0.037
Ssc.22000.1.S1_at	carbonyl reductase [NADPH] 1-like	<i>LOC100622246</i>	0.037
Ssc.12996.1.A1_at	uncharacterized LOC100519166	<i>LOC100519166</i>	0.037

Ssc.21805.1.S1_at	C4b-binding protein beta chain-like	<i>LOC100520583</i>	0.037
Ssc.19205.2.S1_at	gamma-glutamylcyclotransferase-like	<i>LOC100512447</i>	0.037
Ssc.6301.1.S1_at	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	<i>DDC</i>	0.038
Ssc.2290.2.S1_at	caseinolytic peptidase B protein homolog	<i>LOC100524385</i>	0.038
Ssc.29895.1.S1_at	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>RAD50</i>	0.039
Ssc.17203.1.A1_at	Cathepsin S	<i>LOC100153090</i>	0.039
Ssc.16538.1.S1_at	---	---	0.039
Ssc.13780.12.S1_a_at	HLA class I histocompatibility antigen, A*3 alpha chain-like	<i>LOC100622791</i>	0.039
Ssc.16785.1.A1_at	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	<i>CYP1A2</i>	0.040
Ssc.6733.1.S1_at	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	<i>LOC100155925</i>	0.040
Ssc.13826.1.S1_at	lactate dehydrogenase A	<i>LDHA</i>	0.040
Ssc.21173.1.S1_at	EF-hand domain-containing protein D2-like	<i>LOC100520743</i>	0.040
Ssc.1137.1.S1_at	Porcine inhibitor of carbonic anhydrase	<i>ICA</i>	0.040
Ssc.226.1.S1_at	high mobility group box 2	<i>HMGB2</i>	0.042
Ssc.17674.1.A1_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	<i>UGCG</i>	0.044
Ssc.12449.1.S1_at	---	---	0.044
Ssc.15598.1.S1_at	insulin induced gene 1	<i>INSIG1</i>	0.045
Ssc.6233.1.S1_at	lipid phosphate phosphohydrolase 3-like	<i>LOC100512419</i>	0.045
Ssc.21582.1.S1_at	ubiquitin D	<i>UBD</i>	0.045
Ssc.14366.2.S1_at	---	---	0.045
Ssc.14218.1.S1_at	maspardin-like	<i>LOC100622567</i>	0.045
Ssc.7763.1.S1_at	protein FAM171A1-like	<i>LOC100525944</i>	0.046
Ssc.17849.1.A1_at	solute carrier family 30, member 10	<i>SLC30A10</i>	0.046
Ssc.9586.1.S1_at	serum deprivation-response protein-like	<i>LOC100627544</i>	0.047
Ssc.13439.1.A1_at	---	---	0.047
Ssc.19290.2.A1_at	---	---	0.048
Ssc.9896.1.A1_at	alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase-like	<i>LOC100621251</i>	0.048
Ssc.30637.1.A1_at	tripartite motif-containing protein 34-like	<i>LOC100738479</i>	0.048
Ssc.20655.1.S1_at	---	---	0.049
Ssc.3187.1.S1_at	ELL associated factor 1	<i>EAF1</i>	0.050
Ssc.30255.2.S1_at	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>PCF11</i>	0.050

表 3-5-2. 抽出されたプローブセット (HFCD < HFCD + eLF)

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	FDR-corrected
			p value
			HFCD 群 < HFCD + LF 群
Ssc.16041.1.S1_at	dimeric dihydrodiol dehydrogenase	<i>SUS2DD</i>	0.008
Ssc.3345.1.A1_at	mevalonate kinase-like	<i>LOC100152230</i>	0.011
Ssc.22020.1.S1_at	feline leukemia virus subgroup A receptor	<i>LOC100155620</i>	0.015
Ssc.8436.1.S1_at	---	---	0.013
Ssc.376.1.S1_at	hepcidin antimicrobial peptide	<i>HAMP</i>	0.024
Ssc.16261.1.S1_at	cytochrome P450 2C36	<i>CYP2C36</i>	0.000
Ssc.8925.1.S1_at	hemoglobin, beta	<i>HBB</i>	0.004
Ssc.3092.1.S1_at	homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>HGD</i>	0.005
Ssc.9718.1.A1_at	cbp/p300-interacting transactivator 2-like	<i>LOC100156022</i>	0.017
Ssc.1969.1.A1_at	---	---	0.013
Ssc.3295.2.A1_at	---	---	0.039
Ssc.26730.1.S1_at	homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>HGD</i>	0.005
Ssc.1354.1.S1_at	alpha-hemoglobin-stabilizing protein-like	<i>LOC100620111</i>	0.025
Ssc.929.1.S1_at	cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 22	<i>CYP3A22</i>	0.008
Ssc.232.1.S1_at	D-amino acid oxidase	<i>DAO1</i>	0.023
Ssc.24921.3.S1_a_at	Aminolevulinate, delta-, synthase 1 pseudogene	<i>ALAS1</i>	0.014
Ssc.18458.1.S1_at	nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19, mitochondrial-like	<i>LOC100524317</i>	0.018
Ssc.8184.1.A1_at	---	---	0.024
Ssc.5102.1.S1_at	28S ribosomal protein S27, mitochondrial-like	<i>LOC100519229</i>	0.030
Ssc.28973.1.S1_at	---	---	0.040
Ssc.19182.1.A1_at	ankyrin repeat domain-containing protein 29-like	<i>LOC100739254</i>	0.013
Ssc.7146.1.A1_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	<i>ABCA1</i>	0.027
Ssc.5991.1.A1_at	keratin 18	<i>KRT18</i>	0.039
Ssc.15727.1.A1_at	lathosterol oxidase-like	<i>LOC100520925</i>	0.005
Ssc.25198.1.A1_at	ornithine aminotransferase	<i>OAT</i>	0.007
Ssc.26122.1.A1_at	insulin induced gene 2	<i>INSIG2</i>	0.044
Ssc.1341.1.S1_at	transketolase	<i>TKT</i>	0.047
Ssc.6345.1.S1_at	---	---	0.032
Ssc.18280.1.A1_at	alpha-methylacyl-CoA racemase	<i>AMACR</i>	0.002

Ssc.26321.1.S1_s_at	cytochrome P450 2C32	<i>CYP2C32</i>	0.039
Ssc.29106.1.S1_at	---	---	0.035
Ssc.732.1.S1_at	carbonyl reductase 2	<i>CBR2</i>	0.000
Ssc.8385.1.A1_at	squalene epoxidase	<i>SQLE</i>	0.000
Ssc.6714.1.A1_at	isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1-like	<i>LOC100625049</i>	0.000
Ssc.12202.2.S1_at	farnesyl diphosphate synthase	<i>FDPS</i>	0.000
Ssc.5712.1.S1_at	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP51</i>	0.000
Ssc.10285.1.A1_at	gametocyte-specific factor 1-like	<i>LOC100521495</i>	0.000
Ssc.5045.1.S1_at	emopamil binding protein (sterol isomerase)	<i>EBP</i>	0.000
Ssc.250.1.S1_at	carbonyl reductase 1	<i>CBR1</i>	0.000
Ssc.24298.1.S1_at	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	<i>TMEFF1</i>	0.000
Ssc.4426.1.S1_at	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	<i>LOC100152303</i>	0.000
Ssc.29232.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.8774.1.S1_at	methysterol monooxygenase 1	<i>MSMO1</i>	0.000
Ssc.10764.1.S1_at	neuron-specific protein family member 1-like	<i>LOC100621607</i>	0.000
Ssc.16989.1.A1_at	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	<i>CAV1</i>	0.000
Ssc.670.1.S1_at	lysozyme	<i>LYZ</i>	0.000
Ssc.12842.1.S1_at	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	<i>CAV1</i>	0.000
Ssc.30373.1.A1_at	acetoacetyl-CoA synthetase-like	<i>LOC100156545</i>	0.000
Ssc.16124.1.S1_a_at	cytochrome P450 C42	<i>CYP2C42</i>	0.000
Ssc.5557.1.S1_at	PWWP domain-containing protein MUMIL1-like	<i>LOC100739251</i>	0.000
Ssc.7785.1.S1_at	uncharacterized LOC100622759	<i>LOC100622759</i>	0.000
Ssc.1291.1.A1_at	caveolin 2	<i>CAV2</i>	0.000
Ssc.26968.1.A1_at	neuron-specific protein family member 1-like	<i>LOC100621607</i>	0.000
Ssc.4523.1.S1_at	carnitine O-octanoyltransferase	<i>CROT</i>	0.000
Ssc.10362.1.S1_at	---	---	0.000
Ssc.6441.2.S1_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	<i>DHRS7</i>	0.000
Ssc.18067.1.S1_at	glycine N-phenylacetyltransferase-like	<i>LOC100517803</i>	0.000
Ssc.14400.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.31165.1.S1_at	caveolin 2	<i>CAV2</i>	0.000
Ssc.22427.1.A1_at	---	---	0.000
Ssc.1276.1.S1_at	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	<i>ID1</i>	0.000
Ssc.6441.1.A1_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	<i>DHRS7</i>	0.000

Ssc.6418.1.S1_at	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	<i>FDFT1</i>	0.000
Ssc.12.1.S1_at	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	<i>SULT1E1</i>	0.000
Ssc.27613.1.S1_at	optineurin	<i>OPTN</i>	0.001
Ssc.3753.1.S1_at	transferrin receptor (p90, CD71)	<i>TFRC</i>	0.001
Ssc.12842.1.S2_at	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	<i>CAV1</i>	0.000
Ssc.16234.1.S1_at	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	<i>TCN1</i>	0.001
Ssc.14463.1.S1_at	four and a half LIM domains 1 protein, isoform C	<i>FHL1C</i>	0.001
Ssc.4715.1.S1_at	transmembrane 7 superfamily member 2	<i>TM7SF2</i>	0.001
Ssc.3654.1.A1_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6, E3 ubiquitin protein ligase	<i>MARCH6</i>	0.001
Ssc.6918.1.A1_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	<i>ACSL4</i>	0.001
Ssc.31141.1.A1_at	glycine N-acyltransferase-like protein 2-like	<i>LOC100525206</i>	0.001
Ssc.974.1.S1_at	---	---	0.001
Ssc.4685.1.S1_at	---	---	0.002
Ssc.20239.1.A1_at	retinol dehydrogenase 11	<i>LOC100154684</i>	0.001
Ssc.13336.1.A1_at	---	---	0.002
Ssc.29354.1.A1_at	gametocyte-specific factor 1-like	<i>LOC100521495</i>	0.002
Ssc.12695.1.S1_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	<i>ACSL4</i>	0.002
Ssc.5022.1.A1_at	---	---	0.002
Ssc.2176.1.A1_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	<i>ACSL3</i>	0.002
Ssc.4426.2.S1_at	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	<i>LOC100152303</i>	0.001
Ssc.30779.1.S1_at	claudin 10	<i>CLDN10</i>	0.002
Ssc.16650.1.S1_at	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	<i>BCKDHA</i>	0.003
Ssc.28083.1.A1_at	Cytochrome P450 2U1-like	<i>LOC100518620</i>	0.003
Ssc.7311.1.A1_at	transmembrane protein 161B	<i>TMEM161B</i>	0.003
Ssc.7265.1.A1_at	---	---	0.002
Ssc.27105.1.A1_at	Cytochrome P450 2U1-like	<i>LOC100518620</i>	0.004
Ssc.1664.1.A1_at	neuritin-like	<i>LOC100737220</i>	0.002
Ssc.884.2.S1_a_at	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	<i>CMBL</i>	0.004
Ssc.229.1.S1_at	flavin containing monooxygenase 1	<i>FMO1</i>	0.005
Ssc.4900.2.S1_at	cysteine-rich motor neuron 1 protein-like	<i>LOC100525394</i>	0.006
Ssc.17347.1.S1_at	pyruvate carboxylase	<i>PC</i>	0.005
Ssc.3253.1.S1_at	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	<i>NSDHL</i>	0.005

Ssc.8774.2.A1_at	Methylsterol monooxygenase 1	<i>MSMO1</i>	0.005
Ssc.183.1.S1_at	glutathione S-transferase omega 1	<i>GSTO1</i>	0.008
Ssc.4434.1.S1_at	calmodulin-like 4	<i>CALML4</i>	0.007
Ssc.13241.1.A1_at	---	---	0.008
Ssc.16013.1.S1_at	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	<i>MMP1</i>	0.008
Ssc.12241.1.A1_at	annexin A2	<i>ANXA2</i>	0.006
Ssc.11067.1.S1_a_at	multiple EGF-like-domains 9	<i>MEGF9</i>	0.007
Ssc.8918.1.A1_at	---	---	0.006
Ssc.10392.1.A1_at	myosin-11-like	<i>LOC100621533</i>	0.008
Ssc.10931.1.S1_at	crystallin, alpha B	<i>CRYAB</i>	0.010
Ssc.14391.1.A1_at	amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 8 protein-like	<i>LOC100627358</i>	0.009
Ssc.3469.1.S1_at	---	---	0.010
Ssc.17237.1.A1_at	---	---	0.012
Ssc.14866.1.S1_at	plakophilin 2	<i>PKP2</i>	0.012
Ssc.26326.1.S1_at	cytochrome P450 3A46	<i>CYP3A46</i>	0.012
Ssc.94.1.A1_at	myosin VI	<i>MYO6</i>	0.012
Ssc.31104.1.A1_at	---	---	0.049
Ssc.5254.1.A1_at	zinc finger, FYVE domain containing 1	<i>ZFYVE1</i>	0.012
Ssc.4958.1.A1_at	regulating synaptic membrane exocytosis protein 2-like	<i>LOC100624568</i>	0.012
Ssc.22221.1.S1_a_at	glycerol kinase	<i>GK</i>	0.012
Ssc.25850.1.A1_at	inactive progesterone receptor, 23 kD	<i>LOC100155956</i>	0.013
Ssc.5930.1.S1_at	sortilin 1	<i>SORT1</i>	0.012
Ssc.5062.1.S1_at	selenoprotein W, 1	<i>SEPW1</i>	0.014
Ssc.28316.1.S1_at	uncharacterized protein KIAA0564-like	<i>LOC100511470</i>	0.012
Ssc.2820.1.A1_at	RAB6A, member RAS oncogene family	<i>RAB6A</i>	0.016
Ssc.26334.1.S1_at	deiodinase, iodothyronine, type I	<i>DIO1</i>	0.014
Ssc.13733.1.A1_at	---	---	0.017
Ssc.4271.1.S1_at	oxidoreductase HTATIP2-like	<i>LOC100521603</i>	0.015
Ssc.13777.2.S1_at	---	---	0.016
Ssc.18454.1.A1_at	transducin-like enhancer protein 1-like	<i>LOC100739836</i>	0.016
Ssc.27465.1.S1_at	---	---	0.016
Ssc.2847.1.S1_at	ankyrin repeat domain-containing protein 9-like	<i>LOC100739812</i>	0.018
Ssc.8278.1.S1_at	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	<i>EPHX2</i>	0.016
Ssc.1428.1.A1_at	chromosome 20 open reading frame 108 ortholog	<i>C17H20orf108</i>	0.019

Ssc.5987.1.A1_at	rhophilin-2-like	<i>LOC100620673</i>	0.017
Ssc.18546.1.S1_at	cysteine-rich motor neuron 1 protein-like	<i>LOC100525394</i>	0.020
Ssc.7893.2.A1_at	---	---	0.020
Ssc.14178.1.A1_at	---	---	0.014
Ssc.7233.1.A1_at	---	---	0.021
Ssc.25096.1.A1_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	<i>ALDH1B1</i>	0.012
Ssc.10449.1.S1_at	---	---	0.020
Ssc.8337.1.S1_a_at	lemur tyrosine kinase 2	<i>LMTK2</i>	0.023
Ssc.29044.2.A1_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6, E3 ubiquitin protein ligase	<i>MARCH6</i>	0.024
Ssc.86.1.S1_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	<i>DHRS4</i>	0.025
Ssc.31166.1.S1_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	<i>ABCA6</i>	0.025
Ssc.9914.1.A1_at	creatine kinase, brain	<i>CKB</i>	0.025
Ssc.9170.1.A1_at	serine/threonine-protein kinase D1-like	<i>LOC100737243</i>	0.024
Ssc.29044.1.A1_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6, E3 ubiquitin protein ligase	<i>MARCH6</i>	0.027
Ssc.15705.1.A1_at	keratin 8	<i>KRT8</i>	0.024
Ssc.8956.2.A1_at	---	---	0.025
Ssc.29495.1.A1_at	---	---	0.022
Ssc.16369.1.S1_at	gulonolactone (L-) oxidase	<i>GULO</i>	0.025
Ssc.9376.1.A1_at	---	---	0.027
Ssc.18314.2.A1_at	3-ketodihydrosphingosine reductase-like	<i>LOC100152988</i>	0.028
Ssc.2085.1.S1_at	choline kinase alpha-like	<i>LOC100524478</i>	0.025
Ssc.18385.1.S1_at	---	---	0.029
Ssc.19133.1.A1_at	basic, immunoglobulin-like variable motif containing	<i>BIVM</i>	0.025
Ssc.21594.1.S1_at	---	---	0.029
Ssc.30664.1.S1_at	---	---	0.027
Ssc.20060.1.A1_at	thyroid hormone receptor interactor 12	<i>TRIP12</i>	0.033
Ssc.16481.1.S1_at	HEAT repeat containing 1	<i>HEATR1</i>	0.020
Ssc.17287.1.A1_at	P311 protein	<i>P311</i>	0.027
Ssc.8630.1.A1_at	aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)	<i>AKR1C4</i>	0.034
Ssc.12475.1.A1_at	phosphoserine phosphatase	<i>PSPH</i>	0.032
Ssc.7357.1.A1_at	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	<i>FAT1</i>	0.016

Ssc.20531.1.S1_at	---	---	0.033
Ssc.12906.1.S1_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	<i>ALDH1L1</i>	0.036
Ssc.21101.1.S1_at	Aminolevulinate, delta-, synthase 1 pseudogene	<i>ALAS1</i>	0.001
Ssc.26189.1.S1_a_at	---	---	0.038
Ssc.18314.1.S1_at	3-ketodihydrosphingosine reductase-like	<i>LOC100152988</i>	0.039
Ssc.6752.1.S1_at	basic, immunoglobulin-like variable motif containing	<i>BIVM</i>	0.029
Ssc.17942.1.A1_at	---	---	0.035
Ssc.30173.1.A1_at	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, cytoplasmic-like	<i>LOC100623755</i>	0.039
Ssc.10037.1.A1_at	serine/threonine-protein kinase NLK-like	<i>LOC100623881</i>	0.039
Ssc.24888.1.S1_at	---	---	0.041
Ssc.7067.1.A1_at	tetraspanin 6	<i>TSPAN6</i>	0.041
Ssc.28701.1.S1_at	sorbin and SH3 domain containing 2	<i>SORBS2</i>	0.038
Ssc.3633.1.S1_at	coproporphyrinogen oxidase	<i>CPOX</i>	0.045
Ssc.1620.1.A1_at	torsin A interacting protein 2	<i>TOR1AIP2</i>	0.036
Ssc.18188.2.A1_at	---	---	0.025
Ssc.14129.1.A1_at	---	---	0.046
Ssc.16844.1.A1_at	tandem C2 domains, nuclear	<i>TC2N</i>	0.044
Ssc.6772.1.A1_at	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5-like	<i>LOC100626266</i>	0.033
Ssc.1697.1.S1_at	nucleobindin 1	<i>NUCB1</i>	0.044
Ssc.9582.1.S1_at	coiled-coil domain containing 167	<i>CCDC167</i>	0.046
Ssc.16315.1.S1_at	citrate synthase	<i>CS</i>	0.048
Ssc.31167.1.S1_at	cytokine receptor-like factor 3	<i>CRLF3</i>	0.034
Ssc.8139.1.S1_at	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	<i>PHYH</i>	0.047
Ssc.8271.1.S1_at	neuropilin and tolloid-like protein 2-like	<i>LOC100626670</i>	0.046
Ssc.26803.1.S1_at	---	---	0.046
Ssc.5509.1.S1_at	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	<i>LOC595121</i>	0.039
Ssc.13650.1.A1_at	regulating synaptic membrane exocytosis protein 2-like	<i>LOC100624568</i>	0.049
Ssc.27671.1.S1_at	---	---	0.050
Ssc.7708.1.S1_at	lipoic acid synthetase	<i>LIAS</i>	0.045
Ssc.20196.1.A1_at	---	---	0.034
Ssc.19304.2.S1_at	inhibin beta A chain-like	<i>LOC100517068</i>	0.041
Ssc.3755.1.A1_at	---	---	0.046
Ssc.11458.1.S1_at	Uncharacterized LOC100312958	<i>0610007P14RIK</i>	0.014
Ssc.24693.2.S1_at	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	<i>LOC100153977</i>	0.046

Ssc.18648.1.A1_at	---	---	0.009
Ssc.23857.1.S1_at	5-aminolevulinate synthase, erythroid-specific, mitochondrial-like	<i>LOC100518817</i>	0.005
Ssc.5455.1.S1_at	7-dehydrocholesterol reductase-like	<i>LOC100627707</i>	0.001
Ssc.11126.1.A1_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	<i>HMGCS1</i>	0.000
Ssc.13736.1.A1_at	---	---	0.009
Ssc.4360.1.A1_at	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary- derived growth inhibitor)	<i>FABP3</i>	0.004
Ssc.11012.1.A1_at	methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial-like	<i>LOC100624041</i>	0.050
Ssc.1015.1.S1_at	annexin A5-like	<i>LOC100521982</i>	0.039
Ssc.3666.1.A1_at	---	---	0.027
Ssc.9340.1.A1_at	Adiponutrin	<i>LOC100049690</i>	0.002
Ssc.6170.1.S1_at	General transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa	<i>GTF2F2</i>	0.050
Ssc.12454.1.A1_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	<i>HSD17B7</i>	0.009
Ssc.8790.1.A1_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	<i>HMGCS1</i>	0.002
Ssc.8274.1.A1_at	profilin-2-like	<i>LOC100621523</i>	0.050
Ssc.12456.1.A1_at	---	---	0.029
Ssc.22142.1.A1_at	---	---	0.024
Ssc.4308.1.A1_at	---	---	0.007
Ssc.16088.1.S1_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	<i>HMGCR</i>	0.014
Ssc.5380.1.S1_at	peroxiredoxin 1	<i>PRDX1</i>	0.042
Ssc.30871.1.A1_at	tumor protein p53-inducible nuclear protein 1-like	<i>LOC100157451</i>	0.042
Ssc.4328.1.S1_at	vacuolar protein sorting 13 homolog D (S. cerevisiae)	<i>VPS13D</i>	0.042
Ssc.27786.1.S1_at	---	---	0.013
Ssc.21926.1.S1_at	low density lipoprotein receptor	<i>LDLR</i>	0.005
Ssc.17512.1.S1_at	---	---	0.042

表3-6. 主要なCho代謝関連遺伝子の変化

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Change	FDR-corrected p value
Ssc.16088.1.S1_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	<i>HMGCR</i>	UP	0.014
Ssc.21926.1.S1_at	low density lipoprotein receptor	<i>LDLR</i>	UP	0.005
Ssc.16976.1.S1_at	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	<i>SREBF2</i>	UP	0.055

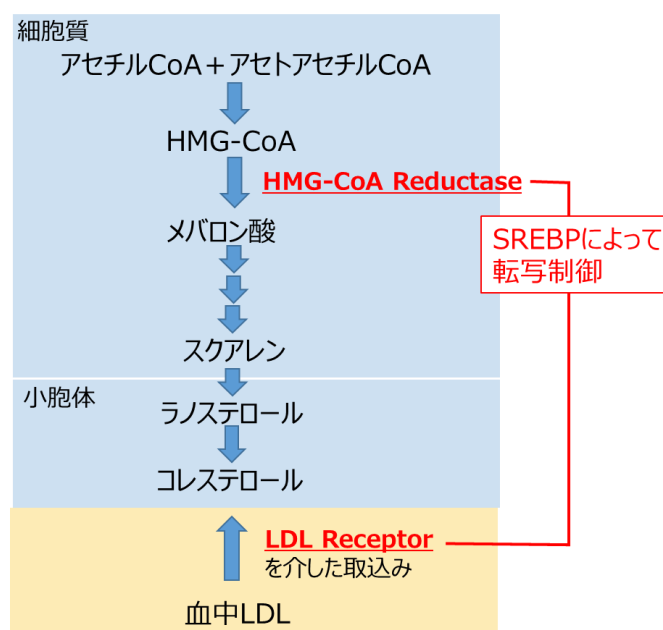


図 3-8. 肝臓におけるコレステロール合成・取り込み経路

表 3-7-1. 有意に変動した生物学的プロセス (GO 解析)

GO_ID	Term	FDR-corrected p-value
0055114	oxidation reduction	1.26E-03

Significant GO terms in GOTERM_BP_ALL

統計処理は、Fisher's exact test を用い、FDR 補正を行った p 値を表記した(有意水準 ; $p < 0.05$)。

表3-7-2. 有意に変動した酸化還元関連遺伝子

Affy_ID	Ref_seq	Change	Gene Title	Gene Symbol
Ssc.250.1.S1_at	NM_214073	UP	carbonyl reductase 1	CBR1
Ssc.732.1.S1_at	NM_213827	UP	carbonyl reductase 2	CBR2
Ssc.16124.1.S1_a_at	NM_001167835	UP	cytochrome P450 C42	CYP2C42
Ssc.26326.1.S1_at	NM_001134824	UP	cytochrome P450 3A46	CYP3A46
Ssc.5712.1.S1_at	NM_214432	UP	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	CYP51
Ssc.232.1.S1_at	NM_214066	UP	D-amino acid oxidase	DAO1
Ssc.86.1.S1_at	NM_214019	UP	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	DHRS4
Ssc.26334.1.S1_at	NM_001001627	UP	deiodinase, iodothyronine, type I	DIO1
Ssc.229.1.S1_at	NM_214064	UP	flavin containing monooxygenase 1	FMO1
Ssc.16369.1.S1_at	NM_001129948	UP	gulonolactone (L-) oxidase	GULO
Ssc.8774.1.S1_at	NM_213752	UP	methylsterol monooxygenase 1	MSMO1
Ssc.8774.2.A1_at	NM_213752	UP	methylsterol monooxygenase 1	MSMO1
Ssc.8385.1.A1_at	NM_001101026	UP	squalene epoxidase	SQLE
Ssc.16041.1.S1_at	NM_214166	UP	dimeric dihydrodiol dehydrogenase	SUS2DD
Ssc.208.1.S1_at	NM_214412	DOWN	cytochrome P450 1A1	CYP1A1
Ssc.15742.2.S1_a_at	NM_214417	DOWN	cytochrome P450 2A19	CYP2A19
Ssc.15741.1.S1_s_at	NM_214421	DOWN	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	CYP2E1
Ssc.29620.1.A1_at	NM_001097426	DOWN	D-aspartate oxidase	DDO
Ssc.15816.1.S1_at	NM_214102	DOWN	myo-inositol oxygenase	MIOX

表 3-8-1. 有意に変動したパスウェイ

Pathway_ID	Term	FDR-corrected <i>p</i> -value
ssc00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	9.33E-05
ssc00982	Drug metabolism	1.29E-04
ssc00830	Retinol metabolism	1.54E-03
ssc00100	Steroid biosynthesis	1.94E-02
ssc00900	Terpenoid backbone biosynthesis	2.64E-02
ssc00380	Tryptophan metabolism	3.20E-02
ssc00480	Glutathione metabolism	3.14E-02

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)分析を行った。

統計処理は、Fisher's exact testを用い、FDR補正を行ったp値を表記した(有意水準 ; $p < 0.05$)。

表3-8-2. 有意に変動したステロイド合成関連遺伝子

Affy_ID	Ref_seq	Change	Gene title	Gene symbol
SSC.3253.1.S1_AT	NM_001167636	UP	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NSDHL
SSC.5712.1.S1_AT	NM_214432	UP	Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	CYP51
SSC.8385.1.A1_AT	NM_001101026	UP	Squalene epoxidase	SQLE
SSC.8774.1.S1_AT	NM_213752	UP	Methylsterol monooxygenase 1	MSMO1
SSC.8774.2.A1_AT		UP		

総合討論および将来展望

本研究は、LFの内臓脂肪低減機序解明を目指した動物モデルの確立と、メタボリックシンドローム症状に対するLFの有効性の明確化を目的とした。LFは多機能性タンパク質として知られており、抗菌、抗ウイルス作用の感染防御作用に加え、抗癌作用、抗貧血作用、免疫調節作用、脂質代謝改善作用等、様々な機能をもつことが報告されているが、脂質代謝改善作用に関しては、比較的新しい知見であり、特にMetS関連諸症状に対する有効性に関する報告はなかった。

第1章では、内臓脂肪低減効果の作用機序解明に向けたモデル動物の確立を検討した。通常食の自由摂取条件におけるICRマウスに対し、4週間LFを強制胃内投与することにより有意に内臓脂肪が減少することを明らかにした。内臓脂肪重量と肝臓中のTG濃度との有意な相関が認められたことから、LFの肝臓への作用を確認することが重要であると考え、第2章では、MetSの肝臓での表現型といわれる脂肪肝モデル細胞に対するLFの直接効果を検討した。その結果、LFは肝臓へのTG蓄積を抑制しないが、Aktシグナル経路を介して脂肪毒性を減弱することを明らかにした。第3章においては、短期間でアテローム性動脈硬化症を発症するMMPigを用いて、腸溶性LFの有効性を検討し、血中LDL-Cho濃度の抑制と共に、アテローム性動脈硬化症状の軽減が認められた。

これらを踏まえ、1. LFの内臓脂肪低減機序、2. MetS諸症状への展開、の2つの項目について、今後の取り組みについて下記に記載する。

1. LFの内臓脂肪低減機序について

MetS への罹患率の高さは、社会問題化しており、日本に留まらず、アジアおよび世界において罹患者は増加の一途を辿っている。そうした中において、予防アプローチの確立は非常に重要であり、特に安全性が高い食品の果たす役割は大きい。LF の機能をより効果的に発揮可能な製剤開発を行うことに加え、健康維持・増進のための活用を促すためにも、LF の作用機序解明は重要課題である。

我々は、LF の内臓脂肪低減機序として、内臓脂肪の一種である腸間膜脂肪由来前駆細胞を用いた検討により、脂肪合成（脂肪細胞への分化）抑制作用[23]、脂肪分解促進作用[24, 28]を報告している。Fischer らによる体内動態解析の結果[32]と、本研究における LF の体内動態解析の結果から、腸間膜脂肪は、LF が主に到達する組織の一つであることが強く推察されることから、上記作用が LF の主たる作用機序の一つであると考えている。本作用を中心とした *vivo* における作用機序の解明に向け、本研究にて、内臓脂肪低減モデルを確立した。その中で、腸間膜脂肪重量と連動して、肝臓中の TG が低下することを確認したことから[46]、LF は肝臓での脂質代謝も高めている可能性が考えられた。今後は、本モデルを最大限活用し、LF 投与による基礎代謝や呼吸商変化の解析、また、筋肉等のエネルギー代謝臓器における作用検証が今後の重要課題である。一方、2018 年には、別の研究チームから、C57BL6/J マウスを用いた高脂肪食負荷モデルにおいて、15 週間の LF の経口投与により、脂肪肝に対する有効性を示した報告がなされた[87]。本モデルでは、体重増加量や内臓脂肪重量の低減に加え、血中パラメータにも改善作用が認められたと報告されている。第 2 章で報告した脂肪肝モデルに対する作用を *in vivo* で検証する際には、本モデルが適していることも考えられ、第 1 章で報告した上記モデルと併せて、多面的に作用機序解析を進めることが重要であると考えられる。

さらに、本研究にて、HepG2 細胞に対する LF による Akt シグナル経路の活性化を確認したが[88]、インスリン抵抗性予防・改善（糖取込促進）の観点においても、Akt シグナル

は非常に重要である。また、Akt は、Fatty Acid Synthase や SREBP-1 及び 2 の合成に関わることから[89]、経口摂取した LF が、有効濃度で肝臓に到達していると仮定すると、肝臓における脂質代謝の調整に直接寄与している可能性も考えられる。これら知見からも、未だ同定されていない Akt シグナル誘導の起点となる LF 受容体を同定することも重要課題である。

LF の既知受容体としては、Low density lipoprotein- related protein 1 (LRP1) 受容体が良く知られている。本受容体は、肝臓におけるカイロミクロンレムナントの取込み受容体として知られていたが、LF が本受容体に結合することから、LF 受容体として認識されるようになった[90]。培養細胞に対する LF 刺激は、複数の細胞種において、ERK 経路と PI3K (Akt) 経路を活性化することが報告されている[35, 47, 91]。これらシグナル経路の活性化受容体を同定するため、ブロッキング抗体やサイレンシング方法を用いた検討が行われ、ERK 経路の活性化が LRP1 受容体を介していることが明らかにされている[35, 91](図 1)。一方、上記論文において、PI3K (Akt) 経路の活性化には、少なくとも LRP1 受容体に関与しないことが明らかにされている。PI3K を活性化する代表的な受容体として、G タンパク質共役受容体 (G protein coupling receptor; GPCR) 系の受容体やサイトカインレセプター等が挙げられ、これら受容体が有力な候補として考えられる。更に、体内動態の観点からも、LF の作用部位を明確化することが重要である。これまでに、抗体抗原反応を原理とした ELISA 法による LF の体内動態解析を実施し、腸間膜脂肪に主に LF が到達することを明らかにしているが[23]、より詳細な解析が必要である。具体的には、LF の認識部位が明確な抗体の確保、より高感度の ELISA 系の確立、質量分析計 (MS) を用いた検討により、到達臓器を明らかにする必要がある。これら結果を統合した上で考察することにより、LF の作用機序の全貌が明らかになるものと考えられる。

一方、個人差についての検討も重要課題である。疾病の発症リスク、薬の薬効および副作用の発現には、個人差があることがよく知られている。個人差の要因としては、生活習慣は

もちろんのこと、タンパク質の発現量、遺伝子多型、腸内菌叢等、多岐にわたるが、その個人差を踏まえ、がん診療・治療領域を筆頭に、様々な領域で個別化医療、Precision Medicine（精密医療）化が進んでいる。我々は、これまでの検討により、LFがLRP1受容体を介して脂肪分解促進作用を発揮していることを確認しており[28]、LFの効果発揮の有力なターゲット分子として捉えている。LRP1受容体にも遺伝子多型が存在すること、また、その遺伝子多型によって、BMIが1程度異なることが報告されている[92]。これらのことから、LRP1受容体の多型を起点とした検討も重要課題であると考え。また、腸内細菌とMetSの関係については、2006年にLeyらが、肥満の程度とFirmicutes/Bacteroidetes比の関連性を報告して以降[93]、研究報告が相次ぎ、腸内細菌叢とBMIや糖尿病等との関連性が数多く報告されている[94-97]。LFが抗菌作用を示すことを述べてきたが、実際に、LF摂取による腸内細菌叢への影響も報告されている[98-100]。これらのことから、LFの機能をより効果的に発揮するためには、本切り口からの検討も今後の重要課題と捉えている。

2. MetS諸症状への展開に関して

2-1. 脂肪肝について

本研究にて、LFによる動物モデルにおける肝臓へのTG蓄積抑制効果と、脂肪肝モデルに対する脂肪毒性減弱効果を確認した。LFによる動物における肝臓中のTG減少効果については、同様の報告が複数されており、人においても十分に期待できる効果であると考えている。そのため、研究課題としては、脂肪肝モデル動物を用いたLFの有効性の証明が最も重要であり、その後、ヒト試験へと移行することが望ましいと考える。一方、脂肪肝については、罹患者が多い働き盛りの年代が定期的に受ける企業健診においても、直接測定する術がなく（少なくとも超音波診断が必要）、日常生活において気づきにくい（意識しづらい）症状であると言える。そのため、脂肪肝を意識して予防してもらうためには、単純脂肪肝の進展先のNASHについての情報を継続発信する等、啓発活動も重要と考える。

2-2. アテローム性動脈硬化について

本研究にて、アテローム性動脈硬化に対する腸溶 LF の有効性を確認した。本検討では、37~65 mg/kg/body の容量で MMPig に投与しており、成人に置き換えると 1.5 g~3.0 g 程度の摂取量になる。予防の観点での使用を考えると、長期間の使用になるため、より少量での有効性の確認が必要となる。また、本検討では、統計学的有意差は得られているが、1群 n=3 での検討であり、N 数が十分とは言い難い。今後は、N 数を増やした条件にて、低用量の有効性を確認することが重要課題である。また、LF の有力な作用機序として、摂取した Cho の糞便中への排出促進作用を確認している[54]。本検討は、ラットを用いた検討であるため、MMPig を用いた上記検討において、糞便中への Cho 排出促進効果および、胸部リンパ節へのカニューレーション法を用いた吸収された Cho 量の減少を同時に確認することにより、頑健な eLF の有効性と作用機序エビデンスを同一評価系にて取得できるものと考ええる。これらエビデンスを揃えた上で、特定保健用食品や機能性表示食品開発へと繋げていきたい。

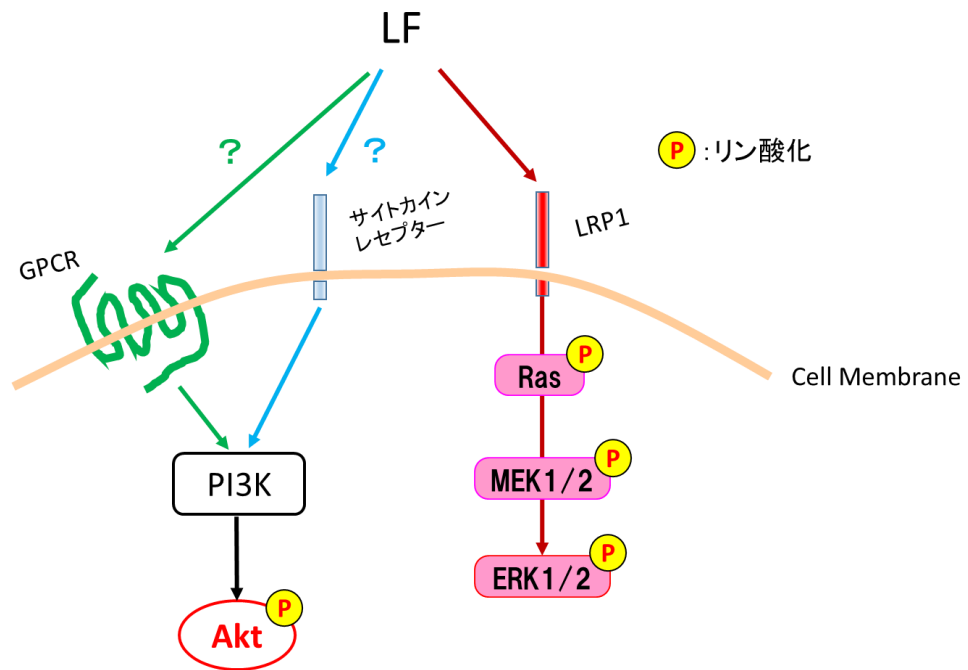


図1. LFが誘導する代表的なシグナル経路と受容体候補

既報有：LRP1受容体を介したERK1/2経路

仮説：GPCR、サイトカインレセプターを介したPI3K-Akt経路

参考文献

1. 平成20年国民健康・栄養調査報告 第7部 メタボリックシンドロームの状況. 2008: p. 80-81.
2. Anan, F., Masaki, T., Umeno, Y., Iwao, T., Yonemochi, H., Eshima, N., Saikawa, T., and Yoshimatsu, H., *Correlations of visceral fat accumulation and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus*. *Metabolism*, 2008. **57**(2): p. 280-4.
3. Nakamura, T., Kobayashi, H., Yanagi, K., Nakagawa, T., Nishida, M., Kihara, S., Hiraoka, H., Nozaki, S., Funahashi, T., Yamashita, S., Kameda-Takemura, K., and Matsuzawa, Y., *Importance of intra-abdominal visceral fat accumulation to coronary atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolaemia*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1997. **21**(7): p. 580-6.
4. Kwon, H. and Pessin, J.E. *Adipokines mediate inflammation and insulin resistance*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013. **4**, 71 DOI: 10.3389/fendo.2013.00071.
5. Anderson, B.F., Baker, H.M., Dodson, E.J., Norris, G.E., Rumball, S.V., Waters, J.M., and Baker, E.N., *Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(7): p. 1769-73.
6. 島崎敬一, ミルクのラクトフェリン, 乳業技術. 2001. p. 1-21.
7. Ellass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., and Spik, G., *Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide*. *Biochem J*, 1995. **312 (Pt 3)**: p. 839-45.
8. Shimazaki, K., Kawaguchi, A., Sato, T., Ueda, Y., Tomimura, T., and Shimamura, S., *Analysis of human and bovine milk lactoferrins by Rotofor and chromatofocusing*. *Int*

- J Biochem, 1993. **25**(11): p. 1653-8.
9. Oram, J.D. and Reiter, B., *Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents*. Biochim Biophys Acta, 1968. **170**(2): p. 351-65.
 10. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., and Kawase, K., *Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin*. J Dairy Sci, 1991. **74**(12): p. 4137-42.
 11. Iwasa, M., Kaito, M., Ikoma, J., Takeo, M., Imoto, I., Adachi, Y., Yamauchi, K., Koizumi, R., and Teraguchi, S., *Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in chronic hepatitis C patients with high viral loads and HCV genotype 1b*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(3): p. 766-7.
 12. Superti, F., Agamennone, M., Pietrantonio, A., and Ammendolia, M.G. *Bovine Lactoferrin Prevents Influenza A Virus Infection by Interfering with the Fusogenic Function of Viral Hemagglutinin*. Viruses, 2019. **11**, DOI: 10.3390/v11010051.
 13. Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K., and Abe, F., *Lactoferrin for prevention of common viral infections*. J Infect Chemother, 2014. **20**(11): p. 666-71.
 14. Zou, J., Dong, J., and Yu, X.F., *Meta-analysis: the effect of supplementation with lactoferrin on eradication rates and adverse events during Helicobacter pylori eradication therapy*. Helicobacter, 2009. **14**(2): p. 119-27.
 15. Razak, A. and Hussain, A. *Lactoferrin Supplementation to Prevent Late-Onset Sepsis in Preterm Infants: A Meta-Analysis*. Am J Perinatol, 2019. DOI: 10.1055/s-0039-1696676.
 16. Kozu, T., Iinuma, G., Ohashi, Y., Saito, Y., Akasu, T., Saito, D., Alexander, D.B., Iigo, M., Kakizoe, T., and Tsuda, H., *Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical*

- trial. Cancer Prev Res (Phila)*, 2009. **2**(11): p. 975-83.
17. Tsuda, H., Kozu, T., Iinuma, G., Ohashi, Y., Saito, Y., Saito, D., Akasu, T., Alexander, D.B., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Xu, J., Kakizoe, T., and Iigo, M., *Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. Biometals*, 2010. **23**(3): p. 399-409.
 18. Paesano, R., Pietropaoli, M., Gessani, S., and Valenti, P., *The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. Biochimie*, 2009. **91**(1): p. 44-51.
 19. Miyauchi, H., Kaino, A., Shinoda, I., Fukuwatari, Y., and Hayasawa, H., *Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. J Dairy Sci*, 1997. **80**(10): p. 2330-9.
 20. Ono, T., Murakoshi, M., Suzuki, N., Iida, N., Ohdera, M., Iigo, M., Yoshida, T., Sugiyama, K., and Nishino, H., *Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. Br J Nutr*, 2010. **104**(11): p. 1688-95.
 21. Takeuchi, T., Shimizu, H., Ando, K., and Harada, E., *Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents. Br J Nutr*, 2004. **91**(4): p. 533-8.
 22. Yagi, M., Suzuki, N., Takayama, T., Arisue, M., Kodama, T., Yoda, Y., Numasaki, H., Otsuka, K., and Ito, K., *Lactoferrin suppress the adipogenic differentiation of MC3T3-G2/PA6 cells. J Oral Sci*, 2008. **50**(4): p. 419-25.
 23. Ono, T., Morishita, S., Fujisaki, C., Ohdera, M., Murakoshi, M., Iida, N., Kato, H., Miyashita, K., Iigo, M., Yoshida, T., Sugiyama, K., and Nishino, H., *Effects of pepsin*

- and trypsin on the anti-adipogenic action of lactoferrin against pre-adipocytes derived from rat mesenteric fat.* Br J Nutr, 2011. **105**(2): p. 200-11.
24. Ono, T., Fujisaki, C., Ishihara, Y., Ikoma, K., Morishita, S., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Kato, H., Miyashita, K., Yoshida, T., and Nishino, H., *Potent lipolytic activity of lactoferrin in mature adipocytes.* Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(3): p. 566-71.
25. Shin, K., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Yaeshima, T., and Iwatsuki, K., *Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides.* Biol Pharm Bull, 2008. **31**(8): p. 1605-8.
26. Akiyama, Y., Oshima, K., Kuhara, T., Shin, K., Abe, F., Iwatsuki, K., Nadano, D., and Matsuda, T., *A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells.* J Biochem, 2013. **154**(5): p. 437-48.
27. Crawford, S.E. and Borensztajn, J., *Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway.* J Lipid Res, 1999. **40**(5): p. 797-805.
28. Ikoma-Seki, K., Nakamura, K., Morishita, S., Ono, T., Sugiyama, K., Nishino, H., Hirano, H., and Murakoshi, M., *Role of LRPI and ERK and cAMP Signaling Pathways in Lactoferrin-Induced Lipolysis in Mature Rat Adipocytes.* PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141378.
29. Shi, J., Finckenberg, P., Martonen, E., Ahlroos-Lehmus, A., Pilvi, T.K., Korpela, R., and Mervaala, E.M., *Metabolic effects of lactoferrin during energy restriction and weight regain in diet-induced obese mice.* J Funct Foods, 2012. **4**(1): p. 66-78.
30. 小野知二, 東京大学博士論文 腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果とその作用機序に関する研究 第2章 第一節

31. Kawashima, M., Kawakita, T., Inaba, T., Okada, N., Ito, M., Shimmura, S., Watanabe, M., Shinmura, K., and Tsubota, K. *Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice.* PLoS One, 2012. **7**, e33148 DOI: 10.1371/journal.pone.0033148.
32. Fischer, R., Debbabi, H., Blais, A., Dubarry, M., Rautureau, M., Boyaka, P.N., and Tome, D., *Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues.* Int Immunopharmacol, 2007. **7**(10): p. 1387-93.
33. Retegui, L.A., Moguevsky, N., Castracane, C.F., and Masson, P.L., *Uptake of lactoferrin by the liver. I. Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments.* Lab Invest, 1984. **50**(3): p. 323-8.
34. Hofmann, S.M., Zhou, L., Perez-Tilve, D., Greer, T., Grant, E., Wancata, L., Thomas, A., Pfluger, P.T., Basford, J.E., Gilham, D., Herz, J., Tschöp, M.H., and Hui, D.Y., *Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice.* J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3271-82.
35. Grey, A., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., and Cornish, J., *Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway.* Mol Cell Endocrinol, 2006. **251**(1-2): p. 96-102.
36. Eguchi, Y., Eguchi, T., Mizuta, T., Ide, Y., Yasutake, T., Iwakiri, R., Hisatomi, A., Ozaki, I., Yamamoto, K., Kitajima, Y., Kawaguchi, Y., Kuroki, S., and Ono, N., *Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease.* J Gastroenterol, 2006. **41**(5): p. 462-9.
37. Nehra, V., Angulo, P., Buchman, A.L., and Lindor, K.D., *Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis.* Dig Dis Sci, 2001. **46**(11): p. 2347-52.

38. Tilg, H. and Moschen, A.R., *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-46.
39. Marra, F. and Svegliati-Baroni, G., *Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis*. J Hepatol, 2018. **68**(2): p. 280-295.
40. Zhang, J., Zhao, Y., Xu, C., Hong, Y., Lu, H., Wu, J., and Chen, Y. *Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study*. Sci Rep, 2014. **4**, 5832 DOI: 10.1038/srep05832.
41. Chavez-Tapia, N.C., Rosso, N., and Tiribelli, C. *Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease*. BMC Gastroenterol, 2012. **12**, 20 DOI: 10.1186/1471-230X-12-20.
42. Gomez-Lechon, M.J., Donato, M.T., Martinez-Romero, A., Jimenez, N., Castell, J.V., and O'Connor, J.E., *A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis*. Chem Biol Interact, 2007. **165**(2): p. 106-16.
43. Lin, C.L., Huang, H.C., and Lin, J.K., *Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells*. J Lipid Res, 2007. **48**(11): p. 2334-43.
44. Wu, X., Zhang, L., Gurley, E., Studer, E., Shang, J., Wang, T., Wang, C., Yan, M., Jiang, Z., Hylemon, P.B., Sanyal, A.J., Pandak, W.M., Jr., and Zhou, H., *Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1905-15.
45. Li, Y.C. and Hsieh, C.C. *Lactoferrin dampens high-fructose corn syrup-induced hepatic manifestations of the metabolic syndrome in a murine model*. PLoS One, 2014. **9**, e97341 DOI: 10.1371/journal.pone.0097341.
46. Morishita, S., Ono, T., Fujisaki, C., Ishihara, Y., Murakoshi, M., Kato, H., Hosokawa,

- M., Miyashita, K., Sugiyama, K., and Nishino, H., *Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice*. J Oleo Sci, 2013. **62**(2): p. 97-103.
47. Lee, S.H., Pyo, C.W., Hahm, D.H., Kim, J., and Choi, S.Y., *Iron-saturated lactoferrin stimulates cell cycle progression through PI3K/Akt pathway*. Mol Cells, 2009. **28**(1): p. 37-42.
48. Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F.J., Ricart, W., and Fernandez-Real, J.M., *Lactoferrin increases (172Thr)AMPK phosphorylation and insulin-induced (p473Ser)AKT while impairing adipocyte differentiation*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(9): p. 991-1000.
49. Huang, H.C., Lin, H., and Huang, M.C., *Lactoferrin promotes hair growth in mice and increases dermal papilla cell proliferation through Erk/Akt and Wnt signaling pathways*. Arch Dermatol Res, 2019. **311**(5): p. 411-420.
50. Jiang, R., Lopez, V., Kelleher, S.L., and Lonnerdal, B., *Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells*. J Cell Physiol, 2011. **226**(11): p. 3022-31.
51. Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasca, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M., *Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21085-95.
52. Qi, X.J., Wildey, G.M., and Howe, P.H., *Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 813-23.
53. Avramoglu, R.K., Cianflone, K., and Sniderman, A.D., *Role of the neutral lipid*

- accessible pool in the regulation of secretion of apoB-100 lipoprotein particles by HepG2 cells.* J Lipid Res, 1995. **36**(12): p. 2513-28.
54. Nakamura, K., Morishita, S., Ono, T., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Kato, H., Ikeda, I., and Nishino, H., *Lactoferrin interacts with bile acids and increases fecal cholesterol excretion in rats.* Biochem Cell Biol, 2017. **95**(1): p. 142-147.
55. Cui, W., Ma, J., Wang, X., Yang, W., Zhang, J., and Ji, Q. *Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of beta-cells by Ca²⁺/calpain-2 pathways.* PLoS One, 2013. **8**, e59921 DOI: 10.1371/journal.pone.0059921.
56. Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K., and Kaneko, S., *Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria.* J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 14809-18.
57. Ogasawara, Y., Imase, M., Oda, H., Wakabayashi, H., and Ishii, K., *Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(1): p. 1003-13.
58. Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J.C., *Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions.* J Cell Biol, 1998. **143**(1): p. 217-24.
59. Jin, H.O., Park, I.C., An, S., Lee, H.C., Woo, S.H., Hong, Y.J., Lee, S.J., Park, M.J., Yoo, D.H., Rhee, C.H., and Hong, S.I., *Up-regulation of Bak and Bim via JNK downstream pathway in the response to nitric oxide in human glioblastoma cells.* J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 477-86.

60. Lei, K. and Davis, R.J., *JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2432-7.
61. Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y., *JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1889-99.
62. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
63. Xu, X.X., Jiang, H.R., Li, H.B., Zhang, T.N., Zhou, Q., and Liu, N., *Apoptosis of stomach cancer cell SGC-7901 and regulation of Akt signaling way induced by bovine lactoferrin*. J Dairy Sci, 2010. **93**(6): p. 2344-50.
64. Oh, E., Yun, M., Kim, S.K., Seo, G., Bae, J.S., Joo, K., Chae, G.T., and Lee, S.B., *Palmitate induces COX-2 expression via the sphingolipid pathway-mediated activation of NF-kappaB, p38, and ERK in human dermal fibroblasts*. Arch Dermatol Res, 2014. **306**(4): p. 339-45.
65. Dekker, J.M., Girman, C., Rhodes, T., Nijpels, G., Stehouwer, C.D., Bouter, L.M., and Heine, R.J., *Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study*. Circulation, 2005. **112**(5): p. 666-73.
66. Hunt, K.J., Resendez, R.G., Williams, K., Haffner, S.M., and Stern, M.P., *National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1251-7.
67. Breslow, J.L., *Mouse models of atherosclerosis*. Science, 1996. **272**(5262): p. 685-8.

68. Forster, R., Ancian, P., Fredholm, M., Simianer, H., Whitelaw, B., and Project, S.G.o.t.R., *The minipig as a platform for new technologies in toxicology*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010. **62**(3): p. 227-35.
69. Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Miura, N., Fujiki, M., Horiuchi, M., Izumi, Y., Miyajima, H., Nagata, R., Misumi, K., Takeuchi, T., Tanimoto, A., and Yoshida, H., *Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet*. J Pharmacol Sci, 2011. **115**(2): p. 115-21.
70. Akioka, K., Kawaguchi, H., Kitajima, S., Miura, N., Noguchi, M., Horiuchi, M., Miyoshi, N., and Tanimoto, A., *Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of atherosclerosis in microminipigs*. In Vivo, 2014. **28**(1): p. 81-90.
71. Miyoshi, N., Horiuchi, M., Inokuchi, Y., Miyamoto, Y., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., Izumi, Y., Miyajima, H., Nagata, R., Misumi, K., Takeuchi, T., Tanimoto, A., Yasuda, N., Yoshida, H., and Kawaguchi, H., *Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan*. In Vivo, 2010. **24**(5): p. 671-80.
72. Kawaguchi, H., Yamada, T., Miura, N., Ayaori, M., Uto-Kondo, H., Ikegawa, M., Noguchi, M., Wang, K.Y., Izumi, H., and Tanimoto, A., *Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Microminipig Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet*. J Atheroscler Thromb, 2014. **21**(3): p. 186-203.
73. Stary, H.C., *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1177-8.
74. Saito, K., Ohta, Y., Sami, M., Kanda, T., and Kato, H., *Effect of mild restriction of food*

- intake on gene expression profile in the liver of young rats: reference data for in vivo nutrigenomics study.* Br J Nutr, 2010. **104**(7): p. 941-50.
75. Chen, Z., McGee, M., Liu, Q., and Scheuermann, R.H., *A distribution free summarization method for Affymetrix GeneChip arrays.* Bioinformatics, 2007. **23**(3): p. 321-7.
76. Kadota, K., Nakai, Y., and Shimizu, K. *Ranking differentially expressed genes from Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity.* Algorithms Mol Biol, 2009. **4**, 7 DOI: 10.1186/1748-7188-4-7.
77. Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A., *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.
78. Hidaka, Y., Hotta, H., Nagata, Y., Iwasawa, Y., Horie, M., and Kamei, T., *Effect of a novel squalene epoxidase inhibitor, NB-598, on the regulation of cholesterol metabolism in Hep G2 cells.* J Biol Chem, 1991. **266**(20): p. 13171-7.
79. Ohashi, M., Mizushima, N., Kabeya, Y., and Yoshimori, T., *Localization of mammalian NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein on lipid droplets.* J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36819-29.
80. Tuck, S.F., Patel, H., Safi, E., and Robinson, C.H., *Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol biosynthesis downstream of lanosterol.* J Lipid Res, 1991. **32**(6): p. 893-902.
81. Hassan, A.S. and Rampone, A.J., *Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and beta-sitostanol in the rat.* J Lipid Res, 1979. **20**(5): p. 646-53.
82. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.

83. Hazell, L.J. and Stocker, R., *Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages.* Biochem J, 1993. **290 (Pt 1)**: p. 165-72.
84. Jialal, I. and Devaraj, S., *The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.* J Nutr, 1996. **126**(4 Suppl): p. 1053s-7s.
85. Ikeda, Y., Tajima, S., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Yoshida, S., Aihara, K., Tsuchiya, K., and Tamaki, T., *Bovine milk-derived lactoferrin exerts proangiogenic effects in an Src-Akt-eNOS-dependent manner in response to ischemia.* J Cardiovasc Pharmacol, 2013. **61**(5): p. 423-9.
86. Kajikawa, M., Ohta, T., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., and Matsuda, I., *Lactoferrin inhibits cholesterol accumulation in macrophages mediated by acetylated or oxidized low-density lipoproteins.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(1): p. 82-90.
87. Xiong, L., Ren, F., Lv, J., Zhang, H., and Guo, H., *Lactoferrin attenuates high-fat diet-induced hepatic steatosis and lipid metabolic dysfunctions by suppressing hepatic lipogenesis and down-regulating inflammation in C57BL/6J mice.* Food Funct, 2018. **9**(8): p. 4328-4339.
88. Morishita, S., Tomita, K., Ono, T., Murakoshi, M., Saito, K., Sugiyama, K., Nishino, H., and Kato, H., *Lactoferrin attenuates fatty acid-induced lipotoxicity via Akt signaling in hepatocarcinoma cells.* Biochem Cell Biol, 2015. **93**(6): p. 566-73.
89. Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y.L., Delpuech, O., Griffiths, J.R., Downward, J., and Schulze, A., *PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP.* Oncogene, 2005. **24**(43): p. 6465-81.
90. Ziere, G.J., van Dijk, M.C., Bijsterbosch, M.K., and van Berkel, T.J., *Lactoferrin*

- uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues.* J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11229-35.
91. Jiang, R. and Lonnerdal, B., *Apo- and holo-lactoferrin stimulate proliferation of mouse crypt cells but through different cellular signaling pathways.* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(1): p. 91-100.
 92. Frazier-Wood, A.C., Kabagambe, E.K., Borecki, I.B., Tiwari, H.K., Ordovas, J.M., and Arnett, D.K. *Preliminary evidence for an association between LRP-1 genotype and body mass index in humans.* PLoS One, 2012. **7**, e30732 DOI: 10.1371/journal.pone.0030732.
 93. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
 94. Tsai, Y.T., Cheng, P.C., and Pan, T.M., *Anti-obesity effects of gut microbiota are associated with lactic acid bacteria.* Appl Microbiol Biotechnol, 2014. **98**(1): p. 1-10.
 95. Sasaki, M., Ogasawara, N., Funaki, Y., Mizuno, M., Iida, A., Goto, C., Koikeda, S., Kasugai, K., and Joh, T. *Transglucosidase improves the gut microbiota profile of type 2 diabetes mellitus patients: a randomized double-blind, placebo-controlled study.* BMC Gastroenterol, 2013. **13**, 81 DOI: 10.1186/1471-230X-13-81.
 96. Xiao, S., Fei, N., Pang, X., Shen, J., Wang, L., Zhang, B., Zhang, M., Zhang, X., Zhang, C., Li, M., Sun, L., Xue, Z., Wang, J., Feng, J., Yan, F., Zhao, N., Liu, J., Long, W., and Zhao, L., *A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome.* FEMS Microbiol Ecol, 2014. **87**(2): p. 357-67.
 97. Franks, I. *Obesity: New light shed on obesity-associated gut microbiota.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**, 537 DOI: 10.1038/nrgastro.2011.159.

98. Hu, P., Zhao, F., Zhu, W., and Wang, J., *Effects of early-life lactoferrin intervention on growth performance, small intestinal function and gut microbiota in suckling piglets*. Food Funct, 2019. **10**(9): p. 5361-5373.
99. Mastromarino, P., Capobianco, D., Campagna, G., Laforgia, N., Drimaco, P., Dileone, A., and Baldassarre, M.E., *Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces*. Biometals, 2014. **27**(5): p. 1077-86.
100. Suzuki, N., Murakoshi, M., Ono, T., Morishita, S., Koide, M., Bae, M.J., Totsuka, M., Shimizu, M., Sugiyama, K., Nishino, H., and Iida, N., *Effects of Enteric-coated Lactoferrin Tablets Containing Lactobacillus brevis subsp. coagulans on Fecal Properties, Defecation Frequency and Intestinal Microbiota of Japanese Women with a Tendency for Constipation: a Randomized Placebo-controlled Crossover Study*. Biosci Microbiota Food Health, 2013. **32**(1): p. 13-21.

要旨

「メタボリックシンドローム」(Metabolic Syndrome; MetS)は、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖・高血圧・脂質異常症のうち、2つ以上を合併した状態と定義され、動脈硬化性疾患のリスクファクターとして認知されている。近年、生活習慣病の末期である動脈硬化の発症と内臓脂肪量が強い相関を示すことが明らかにされ、内臓脂肪の蓄積がメタボリックシンドローム形成の主な原因の一つであることが認知されるようになった。先進国はもとより、発展途上国の富裕層においても、栄養過多、運動不足、ストレスの増加などの生活習慣の変化を背景にし、世界中で MetS の患者が急増し、大きな社会問題となっている。すなわち、国民の健康維持及び高騰する医療費の抑制には、MetS に罹患する前の内臓脂肪の蓄積を予防することが非常に重要である。

ラクトフェリン (lactoferrin; LF) は、母乳、特に初乳中に高濃度含まれる事から、新生児の初期免疫防御に重要な役割を示すことが考えられていたが、近年では、抗菌・抗ウイルス作用に加え、様々な生理作用（抗癌、抗貧血、免疫調節、脂質代謝改善等）が報告されており、多機能性タンパク質として認知されている。母乳中に含まれる成分である事から安全性も高く、ウシ由来 LF 原料に関して、アメリカでは、いわゆる一般的に安全な食品 (Generally Recognized as Safe ; GRAS) として登録されている。日本でも、食品添加物として認可されていることもあり、人の健康に寄与する成分として、様々な分野での基礎研究及び応用研究が進められている。

我々は、LF のこれら機能のうち、脂質代謝改善作用に着目して研究を進めている。これまで、①LF による脂肪細胞分化抑制効果は知られていたが、ラット腸間膜脂肪由来前駆脂肪細胞を用いた検討において、胃の消化酵素であるペプシンで分解した LF ではその効果が認められなかったこと、②体内動態解析の結果から、経口投与した LF は腸間膜脂肪組織で高濃度検出されたこと、以上の 2 点から、我々は、LF が内臓脂肪低減作用を発揮するには、

腸溶加工された LF が効果的であろうとの仮説を立てた。そこで、胃での分解を避けるために腸溶性 LF (entericLF ; eLF) 錠剤を用いて、腹部肥満傾向の日本人男女を対象とした二重盲検群間比較試験を実施した。その結果、8 週間の eLF の摂取により、プラセボ群と比較して腹部臍帯部の内臓脂肪面積が有意に低下することを確認し、ヒトにおける LF の内臓脂肪低減効果を証明した。しかしながら、LF の内臓脂肪低減機序についての全貌は明らかにできておらず、動物モデルの確立が重要課題であった。また、内臓脂肪以外の MetS 症状に対する効果も未検討であった。そこで本論文では、LF の内臓脂肪低減機序解明を目指した動物モデルの確立と、MetS 諸症状に対する LF の有効性を明らかにする事を目的とした。

まず、内臓脂肪低減効果の作用機序解明に向けたモデル動物の確立を検討した。LF 投与による内臓脂肪低減モデルはほとんど報告されておらず、先行報告としては、食餌制限条件において、LF 投与により、内臓脂肪を含む体脂肪率が有意に低下することが報告されていた。食餌制限という条件は、MetS の諸症状及び内臓脂肪蓄積を抑制するモデルとしては不適切であると考え、カロリー制限の無い条件でのモデル確立が重要であると考えた。本条件においては、内臓脂肪に着目した報告はされておらず、血中脂質パラメータの改善が認められた条件として、通常食摂取の報告が複数されていた。一方、LF が分解されずに腸に届くことも重要である。これまでの検討で、混餌投与と比較し、強制胃内投与（ゾンデ投与）の方が、インタクトな LF 及び iLF 共に小腸への到達量が顕著に多いことを確認していたことから、投与方法を強制胃内投与に設定し、モデル確立を検討した。その結果、通常食の自由摂取条件における ICR マウスに対し、4 週間 LF (100 mg/body) を強制胃内投与することにより、腸間膜脂肪重量 (蒸留水群 ; 0.43 ± 0.03 g、LF 群 ; 0.28 ± 0.04 g、 $p < 0.05$) と、肝臓中の中性脂肪 (Triglyceride ; TG) (蒸留水群 ; 16.3 ± 1.8 mg/g-liver、LF 群 ; 6.5 ± 0.7 mg/g-liver、 $p < 0.01$) が有意に減少することを明らかにした。また、本投与条件において、小腸内に全長 LF が到達していること、および、腸間膜脂肪組織に免疫反応性 LF が到達していることを確認した。これらの結果から、LF の内臓脂肪低減作用を検出可

能なモデル動物を確立した。また、内臓脂肪重量と肝臓中の TG 濃度との間に、有意な相関が認められたことから ($R = 0.581$, $p < 0.05$)、LF の肝臓への作用を確認することが重要であると考え、次に、MetS の肝臓での表現型といわれる脂肪肝のモデル細胞に対する LF の直接効果を検討することとした。脂肪肝モデルとしては、肥満およびインスリン抵抗性と密接に関連する非アルコール性脂肪肝 (Non Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD) モデルを選定した。本モデルは、NAFLD の重症度との関連が知られている血中脂肪酸 (Fatty Acid ; FA) を脂肪肝の誘導トリガーとしている。本研究では、先行知見に基づき、ヒトの血中に存在する代表的な FA であるパルミチン酸 (C16 : 0)、オレイン酸 (C18 : 1)、リノール酸 (C18 : 2)、リノレン酸 (C18 : 3)、アラキドン酸 (C20 : 4) の FA 混合物 (FA mixture; FAm) を誘導トリガーとして使用した。FAm 誘導性 NAFLD モデルに対し、LF は 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度から、FAm (1 mM) によって低下する細胞生存率 (レサズリン還元活性) を有意に上昇させた。一方、細胞内への TG 蓄積には影響を与えなかった。TG の蓄積を抑制せずに、細胞生存率を回復させることから、FAm によって誘導される細胞障害 (Lactic Dehydrogenase ; LDH 活性) とアポトーシス (Caspase-3/7 活性) への影響を確認した。その結果、FAm によって増加した LDH 活性および Caspase-3/7 活性を LF は有意に低下させたことから、LF は主にアポトーシス経路に作用している可能性が考えられた。次に、同じく Caspase-3 の活性を誘導するツニカマイシン刺激による ER ストレスに対する作用を検討した。その結果、LF は、ツニカマイシンによって誘導された Caspase-3/7 活性を阻害しなかったことから、LF は、Caspase-3 への直接的な阻害効果ではなく、アポトーシス誘導の途中のシグナル経路を阻害している可能性が考えられた。FA 誘導性のアポトーシスは主に JNK 経路によって誘導されるという報告に基づき、LF が誘導するシグナル経路との交差ポイントを調べた結果、Akt シグナル経路が候補として抽出された。そこで、Akt のリン酸化阻害剤である Akt inhibitor VIII (50 μM) を用いて、LF の効果への影響を検討した結果、LDH 活性に対する LF の効果を有意に減少させると共に、細胞生存率および

Caspase-3/7 活性については、LF の効果は完全に消失した。これらの結果から、NAFLD モデル細胞に対して、LF は Akt シグナル経路を介して脂肪毒性を減弱することを明らかにした。

最後に、高コレステロール血症および動脈硬化症に対する LF の効果を *in vivo* で明らかにするため、ヒトと食事・睡眠習慣や脂質代謝機構が近い実験動物であり、かつ、短期間（8 週間）でアテローム性動脈硬化症を誘導可能なマイクロミニピッグ (Porcine) を用いて eLF の有効性を検討した。その結果、高脂肪・高コレステロール食 (HFCD) 摂取群と比較して、HFCD 摂取に加え eLF (500 mg/body/day) を投与した群では、投与第 2 週において、総 Cho および LDL-Cho 値の有意な低下が認められた (総 Cho; 42%低下、 $p < 0.01$, LDL-Cho; 52%低下、 $p < 0.01$)。15 箇所動脈において、通常食群ではアテローム性動脈硬化病変は全く観察されなかったのに対し、HFCD 群では、泡沫細胞浸潤を伴う内膜肥厚を示す動脈が 9 カ所認められた。それに対し、eLF 投与群では、泡沫細胞浸潤が 3 カ所の動脈で認められるに留まった。eLF の効果を遺伝子レベルでも確認するため、DNA マイクロアレイ法により、HFCD および HFCD + eLF 群間の遺伝子発現データの比較を行った。KEGGPathway において、7つのパスウェイに有意な変化が認められ、そのうち、Cho 代謝に関わるステロイド生合成 (ssc00100) パスウェイにも有意な差が認められた。そのパスウェイ内で変化した遺伝子を確認したところ、Cho 合成を促進する酵素である NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like、Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1、Squalene epoxidase および Methylsterol monooxygenase 1 の遺伝子発現が HFCD + eLF 群で有意に増加していた。これらのことから、eLF は、HFCD 誘発性の高 Cho 血症およびアテローム性動脈硬化症の発症を減弱させることを明らかにし、血中 Cho 濃度を低下させることにより、肝臓機能を保護していることが示唆された。

謝辞

本研究は、多くの方々のご助力のもと、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 健康栄養機能学社会連携講座 特任教授 加藤久典先生（～2017年；東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」 特任教授）及び 同応用生命化学専攻 食品生化学研究室 教授 佐藤隆一郎先生にご指導を賜り、博士論文として纏めることができました。ここに謝意を述べさせていただきます。

本研究を推進するにあたり、研究全体を統括して頂いた京都府立医科大学名誉教授 西野輔翼先生に御礼申し上げます。先生には、ライオン株式会社研究顧問として、当社ライフサイエンス分野の研究の方向性設定に際し、親身になってご相談に乗って頂きました。先生のご助力がなければ、当社の LF 研究のここまでの発展は実現できませんでした。心より御礼申し上げます。

動物モデルの確立に関しては、北海道大学大学院水産科学研究院 教授 宮下和夫先生、同教授 細川雅史先生にご指導を頂きました。先生方にご指導頂いたノウハウを元に、栄養学の専門家である加藤久典先生のご指導の下、検討を進め、モデル確立を達成できました。ここに深く感謝申し上げます。

脂肪肝モデル細胞における検討および DNA マイクロアレイ解析では、東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」 特任教授 加藤久典先生、同講座特任研究員 齋藤憲司先生、中澤京子先生にご指導いただきました。また、受託研究員として、研究室で一緒に過ごさせて頂いた1年間は、何物にも代えがたい経験となりました。ここに深く感謝申し上げます。

マイクロミニピッグを用いた検討では、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻腫瘍学病理学分野 教授 谷本昭英先生、同衛生学・健康増進医学分野 准教授

川口博明先生にご指導を賜りました。動脈硬化諸症状を評価することが必須である中、当社には実験動物として最適なモデルを保有していないことに加え、扱いのノウハウがありませんでした。先生方のご助力・ご指導がなければ、LFの動脈硬化に対する予防効果を見出すことはできませんでした。ここに深く感謝申し上げます。

更に、本研究に携わる機会を与えて下さり、本研究の遂行に際してご指導を頂きました立命館大学客員教授（元ライオン株式会社 常務執行役員） 杉山圭吉博士、ライオン株式会社 研究フェロー（元生命科学研究所長） 村越倫明博士、ウェルネス研究所（元生命科学研究所 主研） 小野知二博士、また、共同研究者として、実験・解析を共に行った、管理栄養士（元東京家政大学修士） 富田景子様、ライオン株式会社 薬品第1研究所 鈴木則行主研、生命科学研究所 鈴木苗穂副主研、生駒（関）桂子副主研、石原康晴研究員、藤崎（石原）央子研究員、中村啓亮研究員、中村佳菜恵研究員と、その他様々な実験において、ご協力を頂いた皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、私的ではございますが、本研究の遂行および論文の執筆にあたり、支え励ましてくれた 妻 巧雲、長女 嘉帆、長男 皓世、次女 莉央に心からの感謝の意をここに記します。