

## 論文の内容の要旨

論文題目       ラクトフェリンが脂質代謝に与える影響の多面的検討  
氏名             森下 聡

「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 ;  $0.43 \pm 0.03$  g、LF 群 ;  $0.28 \pm 0.04$  g、 $p < 0.05$ ) と、肝臓中の中性脂肪 (Triglyceride ; TG) (蒸留水群 ;  $16.3 \pm 1.8$  mg/g-liver、LF 群 ;  $6.5 \pm 0.7$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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。