

審査の結果の要旨

森下 聡

動脈硬化性疾患等のリスクファクターとなる「メタボリックシンドローム」(Mets)の罹患者は世界中で増加しており、大きな社会問題となっている。国民の健康維持及び高騰する医療費の抑制には、Metsの罹患につながる内臓脂肪の蓄積を予防することが非常に重要である。本課題を解決すべく、申請者らのグループはその摂取によって内臓脂肪蓄積予防を実現する食品素材を探索し、先行知見としてヒト試験により腸溶性ラクトフェリン(LF)摂取による内臓脂肪低減作用を報告していた。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、内臓脂肪以外におけるMetS症状に対する効果も未検討であった。

本研究は、まずICRマウスに対するLF投与により内臓脂肪が減少することを確認し、作用機序解析に供することができる動物モデルを確立した。次に遊離脂肪酸添加による*in vitro*脂肪肝モデルを用いて、LFの脂肪毒性を緩和する効果を示している。さらに、LFの高コレステロール血症・動脈硬化症の発症予防効果を、モデル動物であるマイクロミニピッグを用いて確認している。論文は、序章と3章からなる本編、総合討論・将来展望よりなる。

序章では、本研究の背景ならびに意義を概説し、目的ならびに構成について述べている。

第1章では、LFの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について述べている。LFによるMetSの諸症状及び内臓脂肪蓄積の抑制効果を検証するモデルとしては、ICRマウスをカロリー制限の無い条件で飼育する条件が適切と考えられた。血中脂質パラメーターの改善が認められた報告を参考にし、食餌としては、高脂肪食ではなく通常食摂取を選定した。一方、LFが分解されずに腸に届くことも重要であることから、これまでの検討で、より多くのラクトフェリンが腸に到達することが判明している投与方法(強制胃内投与)を選定し、内臓脂肪低減効果を検証した。その結果、腸間膜脂肪重量と肝臓中の中性脂肪(TG)が有意に減少することを確認している。本投与条件において、小腸内にインタクトな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ており、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と結論付けている。

第2章では、MetSの肝臓での症状である脂肪肝について、そのモデル細胞に対するLFの直接効果の検討について述べている。遊離脂肪酸添加をトリガーとする非アルコール性

脂肪肝は、肥満およびインスリン抵抗性と密接に関連することから、本研究における脂肪肝モデルとして適切であると考え選択している。HepG2 細胞への遊離脂肪酸添加によって、TG 蓄積が誘導され、レサズリン還元活性（細胞生存性の指標）が低下し、Caspase-3/7 活性および LDH 活性が増加することを確認した。次に、遊離脂肪酸とともに LF を添加し、LF の効果を検証した結果、TG 蓄積量には変化が認められない一方、遊離脂肪酸添加による上記 3 指標の変化を抑制することを明らかにした。その作用機序仮説として、LF による Akt シグナル経路の活性化を設定し、Akt 阻害剤を用いて検証を行い、阻害剤添加によって LF の効果が減弱することを確認した。これら結果を受け、脂肪肝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と結論付けている。

第 3 章では、高コレステロール血症・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を用いて検証をおこなっている。また、本検討では、腸溶性 LF としての有効性を評価するため、LF 粉末を腸溶性カプセルに充填したものをを用いている。高脂肪・高コレステロール（Cho）食を給餌して 8 週間評価した結果、腸溶性 LF 投与群では、LF 非投与群と比較して、血清中総 Cho 濃度および LDL Cho 濃度が低値を示すと共に、全身の動脈において観察されたアテローム性動脈硬化層が明らかに少なかった。DNA マイクロアレイ解析による肝臓中の遺伝子発現プロファイルの比較により、コレステロール代謝系に関わる遺伝子の多くの発現が、腸溶性 LF 投与群で増加していた。肝臓における Cho 合成は、恒常性を保つため血中 Cho 濃度の上昇で抑制されることが良く知られており、本結果は、腸溶性 LF により血中 Cho 濃度の上昇が抑制されたことで肝機能が正常に保たれたことを示唆すると述べている。

総合討論・将来展望では、本研究の成果をまとめるとともに、ラクトフェリンの作用機序解明および応用展開に向け、残された課題と展望に関して論議している。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。