

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

高野研一郎より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第614号

学位申請者： 高 野 研 一 郎

学位審査論文： Curcumin inhibits age-related vascular changes in aged mice fed a high-fat diet

(クルクミンは、高脂肪食を給餌された加齢マウスにおける老化性血管変化を抑制する)

著 者： Kenichiro Takano, Junko Tatebe, Naohiro Washizawa, Toshisuke Morita

公 表 誌： Nutrients 2018, 10, 1476 ; DOI: 10.3390/nu10101476

論文内容の要旨：

【背景と目的】加齢や脂肪由来のエネルギー摂取の増加が動脈硬化性疾患の危険因子であることが明らかとなっている。したがって、超高齢化社会を迎えるとともに食生活の欧米化に伴い脂肪の摂取量が増加しているわが国では動脈硬化性疾患の発症予防と再発抑制は重要な社会的課題である。

「健康な肝臓機能の維持」で届出されている機能性表示食品のクルクミンは、抗酸化作用、抗炎症作用、脂肪代謝改善効果などを有することが明らかとなっており、クルクミン摂取は、高脂肪食(HFD)による様々な障害を軽減する可能性が期待できる。しかしながら HFD を摂取しながら高齢化していく健康な人に増え続ける動脈硬化性疾患に対するクルクミンの効果は明らかではない。

抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は、クルクミンの多彩な作用を仲介するメカニズムのひとつである。HO-1 は、体内でヘムを代謝して鉄イオン、ビリベルジンと一酸化炭素 (CO) を生成する酵素であり、HO-1 とその反応産物は、抗酸化、抗炎症、抗老化、免疫制御などの作用を発揮することが知られている。

これらを背景に、HFD を摂取しながら高齢化していくマウスに長期間にわたりクルクミンを摂取させ、動脈硬化性疾患の基盤である炎症性反応と老化性血管病変に与えるクルクミンの影響を HO-1 に着目して解析した。

【方法】8週齢のマウス(C57BL/6J)を4群に分け(各群 n=20)、80週齢まで標準飼料を給餌した群をMF群、HFD(32% safflower oil, 33.1% casein, 0.5% DL-methionine, 17.6% sucrose, 1.4% vitamin mixture, 9.8% mineral mixture, 5.6% cellulose powder)

を給餌した群をHFD群、0.1%クルクミン混餌HFDを給餌した群をHFD+Cu群、0.1%クルクミン混餌HFDにHO-1酵素活性阻害薬SnMP(10 μ mol/Kg)を毎週1回投与した群をHFD+Cu+SnMP群、8週齢マウスを若年コントロール(y-CTL群)とした。

体重は毎週、飼料摂取量は4週間毎に測定した。80週齢飼育終了時に血圧測定した後、蓄尿と採血ならびに大動脈の採取を行った。血液で血糖値、総コレステロール値(TC)、ビリルビン、MCP-1を、尿で8OHdGを評価した。大動脈で、HO-1とSirt1の蛋白発現をWestern Blot法で、MCP-1のmRNA発現をReal-Time RT-PCRで評価し、さらにビリルビン染色、DHE染色、SA-beta Gal染色を行い評価した。

【結果】 食餌摂取量はMF、HFD、HFD+Cuの3群間に有意差はなかったが、HFD+Cu+SnMP群は有意に減少していた。体重、血糖値、TCはHFD+Cu群でHFD群と比較して有意に抑制されMF群と同等であった。HFD+Cu+SnMP群ではクルクミンの血糖値抑制効果は消失したが、体重は、HFD+Cu群と比較して有意に減少しており、TCは、HFD+Cu群と同程度であった。収縮期血圧は全ての群で有意差を認めなかった。

大動脈HO-1蛋白発現と、HO-1酵素活性産物である大動脈血管平滑筋細胞のビリルビン発現と血中ビリルビン濃度はHFD+Cu群でMF群、HFD群と比較して有意に増加していた。一方、HFD+Cu+SnMP群では大動脈平滑筋ビリルビン発現と血中ビリルビン濃度は抑制されていた。

酸化ストレスの指標である尿中8OHdG及び大動脈DHE染色はy-CTL群と比較してMF群で増加しておりHFD群ではさらに増加していた。また、長寿関連遺伝の大動脈Sirt1発現は、y-CTL群と比較してMF群で減弱しておりHFD群ではさらに減弱していた。血管老化の指標である大動脈SA β -Gal活性、炎症性変化を示す大動脈MCP-1発現ならびに血中MCP-1濃度はy-CTL群と比較してMF群で増加しておりHFD群ではさらに増加していたが、HFD+Cu群では、HFD群と比較してこれらの変化は解除されy-CTL群と同等となった。一方、HFD+Cu+SnMP群では全てのクルクミンによる効果は消失していた。

【考察】 HFDを摂取しながら加齢していくマウスにおいてクルクミンの長期摂取は、HO-1の活性化を介して血糖値を抑制すること、酸化ストレスを減弱し、大動脈における老化細胞の蓄積を減少させるとともに炎症性変化を抑制することが示された。そしてこのクルクミンの抗老化作用にはSirt1が関与している可能性が考えられた。これに対して、クルクミンによる体重とTCの抑制効果がSnMP投与でも消失していないことは、HO-1活性を介さない経路で脂肪代謝を改善している可能性を示唆している。しかしながら、本研究では脂肪組織の解析を実施していないのでその詳細を解明するに至っていない。他方、SnMP投与による食餌摂取量の有意な減少が体重とTCに影響を与えた可能性も否定できず、HO-1を他の手法、例えばsiRNA、を用いて阻害することにより、クルクミンの肥満・糖脂質代謝改善効果、抗酸化、抗炎症、抗血管老化効果へのHO-1の関わり方を一層明確にすることが期待できる。

【結語】 今回の研究でクルクミンは、加齢に加えて長期間のHFD給餌によってより増悪する動脈硬化性疾患の基盤である炎症性反応と老化性血管病変を抑制することが示された。以上の結果は、クルクミンが動脈硬化性疾患の予防機能を有する機能性表示食品となる可能性を示唆している。今後、クルクミンの効果を臨床で検証する必要がある。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 614 号	氏 名	高 野 研 一 郎
学位審査担当者	主 査	龍 野 一 郎
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	弘 世 貴 久
	副 査	武 城 英 明
	副 査	杉 山 篤

学位審査論文の審査結果の要旨 :

「健康な肝臓機能の維持」で届出されている機能性表示食品のクルクミンはウコン（ターメリック）などに含まれる黄色のポリフェノール化合物で、スパイスや食品領域の着色剤としても使用されているが、抗酸化作用、抗炎症作用、抗ガン作用、抗ウイルス作用など多彩な効果を有することが明らかとなっており、その作用の一部は抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) による活性化を介するとされる。HO-1 は体内でヘムを代謝して鉄イオン、ビリベルジン（直ちにビリルビンに変換される）と一酸化炭素 (CO) を生成する酵素で、抗酸化、抗炎症、抗老化、免疫制御などの作用にかかわっている。そこで申請者はクルクミンの抗酸化、抗炎症、抗老化作用に着目し、マウスの肥満・加齢モデルを用いて、クルクミンの肥満・代謝パラメータ・動脈硬化に及ぼす影響を HO-1 発現とその効果に焦点をあて検討を行った。

研究では 8 週齢のマウス (C57BL/6J) を 4 群に分け (各群 n=20)、80 週齢まで標準飼料を給餌した群 (MF 群)、高脂肪食 (HFD) を給餌した群を HFD 群、0.1%クルクミン混餌 HFD を給餌した群を HFD+Cu 群、0.1%クルクミン混餌 HFD に HO-1 酵素活性阻害薬 SnMP (10 μmol/Kg) を毎週 1 回投与した群を HFD+Cu+SnMP 群、8 週齢マウスを若年コントロール (y-CTL 群) とした。その結果、食餌摂取量は MF、HFD、HFD+Cu の 3 群間に有意差はなかったが、HFD+Cu+SnMP 群は有意に減少していた。体重、血糖値、TC は HFD+Cu 群で HFD 群と比較して有意に抑制され MF 群と同等であった。HFD+Cu+SnMP 群ではクルクミンの血糖値抑制効果は消失したが、体重は HFD+Cu 群と比較して有意に減少しており、TC は、HFD+Cu 群と同程度であった。収縮期血圧は全ての群で有意差を認めなかった。また、大動脈 HO-1 蛋白発現、HO-1 酵素活性産物である大動脈血管平滑筋細胞のビリルビン発現及び血中ビリルビン濃度は HFD+Cu 群で MF 群、HFD 群と比較して有意に増加していた。一方、HFD+Cu+SnMP 群では大動脈平滑筋ビリルビン発現と血中ビリルビン濃度は抑制されていた。加えて、酸化ストレスの指標である尿中 8OHdG 及び大動脈 DHE 染色は y-CTL 群と比較して MF 群で増加しており HFD 群ではさらに増加していた。また、長寿関連遺伝子 Sirt1 の大動脈での発現は、y-CTL 群と比較して MF 群で減弱しており HFD 群ではさらに減弱していた。血管老化の指標である大動脈 SA β-Gal 活性、炎症性変化を示す大動脈 MCP-1 発現ならびに血中 MCP-1 濃度は y-CTL 群と比較して MF 群で増加しており HFD 群ではさらに増加していたが、HFD+Cu 群では、HFD 群と比較してこれらの変化は解除され、y-CTL 群と同等となった。一方、HFD+Cu+SnMP 群では全てのクルクミンによる効果は消失していた。

以上の事から、肥満・加齢マウスにおいてクルクミンの長期摂取は体重増加を抑制、血糖値を改善、HO-1 の活性化を介して酸化ストレスを減弱、大動脈における老化細胞の蓄積・炎症性変化を抑制することによって動脈硬化性疾患の予防機能を有する機能性表示食品となる可能性を示唆していると結論付けた。

学位審査会においては高脂肪食負荷の加齢マウスで認められた大動脈の変化とその動脈硬化としての意義、クルクミンの投与量と臨床応用の可能性、クルクミンによる体重抑制・糖脂質代謝改善とその作用機構、特にエネルギー消費に及ぼす効果、これらの改善作用が HO-1 依存性なのか？、クルクミンと転写因子 Nr1f1 (NF-E2-related factor 1) の関与、遺伝子改変動物での成績の有無、大動脈以外の臓器、特に膵臓での β 細胞の状況、HO-1 酵素活性阻害薬 SnMP の体重抑制と薬物毒性などの質問に的確に答えた。

本研究は肥満加齢マウスを用いてクルクミンの長期摂取が体重増加の抑制と代謝改善、HO-1 の活性化を介して炎症抑制をもたらす、動脈硬化性疾患の予防機能を有する機能性表示食品となる可能性を明らかにした学位に値する論文である。

審査員一同は高野研一郎氏に十分な学識があることを確認し、学位に値する研究内容であると評価した。