

学位論文要旨

氏名 榎 竜嗣

題目

日本伝統食材に含まれる機能性物質に関する研究：寒天由来アガロオリゴ糖による抗炎症作用並びに明日葉由来カルコンによる抗糖尿病作用
(Study on functional substances in Japanese traditional food ingredient: anti-inflammatory activity of agaro-oligosaccharides from agar and anti-diabetic activity of Ashitaba chalcones)

本研究では、日本において古くより食されてきた食材である寒天及び明日葉について、その機能性を明らかにし、疾患モデル動物を用いて有効性を確認するとともに、作用機序について検討を行った。

寒天由来アガロオリゴ糖は、マイトジェニックな刺激により活性化された単球・マクロファージにおいて、NO、PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6のような炎症性メディエーターの過剰産生を抑制した。この作用はレドックス感受性の転写因子である Nrf2 活性化に伴う抗酸化酵素のヘムオキシゲナーゼ-1 の誘導ならびに炎症性メディエーター産生に深く関与している NF- κ B の活性化抑制によることが確認された。アガロオリゴ糖の効果を *in vivo* でも確認する目的で、持続的な炎症惹起により発がんへとつながる2段階マウス皮膚発がんモデルにおいて試験したところ、アガロオリゴ糖を経口的に摂取させることで、腫瘍の発生を抑制し、発がん予防効果を示した。発がんにおいて PGE₂ は主要因の1つとして知られていることから、TPA 誘発耳浮腫モデルにおいてアガロオリゴ糖の作用を確認したところ、PGE₂ 産生を抑制することを確認した。

明日葉根のエタノール抽出物は、インスリンの持つ多彩な生理活性のうち、糖尿病に関係の深い2つのインスリン様活性である前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導活性と成熟脂肪細胞でのグルコース取り込み促進活性を示した。活性物質として明日葉に特有のカルコンである4-ヒドロキシデリシンとキサントアンゲロールが同定された。分化誘導活性においては、4-ヒドロキシデリシンとキサントアンゲロールはほぼ同程度の活性を示したが、グルコース取り込み促進活性においては、4-ヒドロキシデリシンが数倍高い活性を示した。明日葉カルコンによって、PPAR- γ が活性化されインスリン様活性が示されるのか確認するために、明日葉カルコンの PPAR- γ リガンド活性を試験したが、全く活性化しなかった。また、明日葉カルコンの抗糖尿病作用を確認するために、糖尿病モデルマウスである KK-A γ マウスを用いて試験したところ、糖尿病の予防・治療効果が認められた。また、グルコース取り込み促進活性に及ぼすカルコンの構造の影響を、天然、合成の種々のカルコンについて試験し、クリティカルな部位を明らかにした。

本研究により、寒天由来アガロオリゴ糖及び明日葉カルコンについて、それぞれ抗炎症作用及び抗糖尿病作用が確認でき、またその作用機序、並びに構造活性相関についても一部明らかにした。がん及び糖尿病とも、その患者数が増加している疾患であり、今後、その予防・治療に向けて、本研究を端緒として更に研究が発展することで、日常的に摂取できる機能性食品素材として、寒天由来アガロオリゴ糖及び明日葉カルコンはその一助となることが期待される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Tatsuji Enoki
題 目	Study on functional substances in Japanese traditional food ingredient: anti-inflammatory activity of agaro-oligosaccharides from agar and anti-diabetic activity of Ashitaba chalcones (日本伝統食材に含まれる機能性物質に関する研究:寒天由来アガロオリゴ糖による抗炎症作用並びに明日葉由来カルコンによる抗糖尿病作用)

In this study, I found their functionality and efficacy about Agar and Ashitaba, which are foods taken in Japan for long time, on *in vitro* cell-based assays and *in vivo* animal disease models. Further, I investigated their mechanism of actions and structure-activity relationships.

Agaro-oligosaccharides derived from agar could suppress the over-production of pro-inflammatory mediators such as NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in monocyte / macrophages activated by mitogenic stimuli. This activity was confirmed to result from an induction of heme oxygenase-1, one of antioxidative enzymes, via activation of redox-sensitive transcription factor Nrf2 by using heme oxygenase-1 or Nrf2 siRNA. Moreover, agaro-oligosaccharides suppressed the NF- κ B activation that is deeply involved in pro-inflammatory mediator release, by using reporter system. Therefore, agaro-oligosaccharides appear to exert its anti-inflammatory effect through both Nrf2 activation and NF- κ B suppression. Then, we tested the ability of agaro-oligosaccharides to prevent carcinogenesis on two-stage mouse skin carcinogenesis model. Skin carcinogenesis is known to be caused by chronic inflammation in this mouse model. As a result, AGOs feeding led to delayed tumor appearance and decreased tumor number. It is known that PGE₂ is one of key players in carcinogenesis. Thus, we confirmed that PGE₂ production was suppressed by AGOs intake in TPA-induced ear edema model.

Insulin has a variety of physiological functions. Among these, the induction of preadipocyte differentiation to adipocytes and the enhancement of glucose uptake are deeply related to diabetes melitis. The ethanol extract from Ashitaba, *Angelica keiskei* Koidzumi, showed these two insulin-like activities. We identified their active compounds, 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, which are characteristic of Ashitaba. Both 4-hydroxyderricin and xanthoangelol have almost equal relative activity in preadipocyte differentiation assay, whereas the glucose-uptake-enhancing activity of 4-hydroxyderricin was several times higher than that of xanthoangelol. Then, we evaluated the ability of xanthoangelol or 4-hydroxyderricin to activate PPAR- γ to confirm whether the insulin-like activities by chalcones were due to PPAR- γ activation. In this assay, neither 4-hydroxyderricin nor xanthoangelol could activate PPAR- γ . Thus, both chalcones could exert insulin-like activities via a pathway independent of the PPAR- γ activation. Furthermore, these chalcones, especially 4-hydroxyderricin, showed the activities to prevent and cure hyperglycemia in genetically diabetic KK-*Ay* mice. Then, we examined the structure-activity relationships of chalcones on glucose uptake using natural and synthetic chalcones. As a result, we clarified that both 4'-methoxy group and 3'-large substituted group, such as prenyl, geranyl, farnesyl and benzyl, of ring A part were considered to be essential for glucose uptake activity.

In this report, I described the anti-inflammatory activity of agaro-oligosaccharides and antidiabetic activity of Ashitaba chalcones and at least partly revealed the mechanism of actions and the structure-activity relationships of these substances. The numbers of patients with cancer or diabetes have increased due to the prevalence of western tipe life style. By expanding this study, agaro-oligosaccharides and Ashitaba chalcones that can be consumed daily as functional food are expected to be helpful to prevent or cure these diseases in near future.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	榎 竜 嗣
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 客員教授 向井 博之
	副査 鹿児島大学 客員教授 北川 正成
	副査 鹿児島大学 客員准教授 峰野 純一
審査協力者	
題目	<p>日本伝統食材に含まれる機能性物質に関する研究：寒天由来アガロオリゴ糖による抗炎症作用並びに明日葉由来カルコンによる抗糖尿病作用 (Study on functional substances in Japanese traditional food ingredient: anti-inflammatory activity of agaro-oligosaccharides from agar and anti-diabetic activity of <i>Ashitaba chalcones</i>)</p>
<p>近年、食生活による健康維持および生活習慣病予防が重要視され、食品中の有効成分の適正な摂取が多く、疾病から健康を守るとされるが、食品成分の真の有効性については検証法の問題点も指摘され、これらの有効利用には多くの学術的裏付けが必要である。</p> <p>本研究では、日本の伝統的食材である寒天及び明日葉を用いて、前者ではアガロオリゴ糖の抗炎症性効果、後者においてはカルコンの抗糖尿病性効果について疾患モデルマウスを用いて検証すると共に、作用機序についても考察を行った。</p> <p>第1に、寒天由来アガロオリゴ糖の抗炎症効果の実験において、アガロオリゴ糖はマイトジェニックな刺激により活性化された単球・マクロファージの炎症性メディエーターであるNO、PGE₂、TNF-α、IL-1β、IL-6の過剰産生を抑制することを見出した。この作用はレドックス感受性転写因子Nrf2活性化に伴う抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼの誘導と炎症性メディエーターの産生を賦活するNF-κBの活性化抑制によるものと推定された。次にアガロオリゴ糖の生体内での効果を検</p>	

証するために、持続的な炎症惹起によってガンを発生するマウス2段階皮膚発ガンモデルを用いて、アガロオリゴ糖の発ガン抑制効果を検証した。アガロオリゴ糖の経口摂取はモデルマウスの腫瘍発生を抑制することが確認された。炎症性発ガンの主要因にPGE2の関与があるとされており、耳浮腫をTPAで誘発したモデルマウスにアガロオリゴ糖を投与したところ、PGE2が顕著に抑制されることが観察された。以上のことにより、寒天由来アガロオリゴ糖は炎症性メディエーターの産生抑制にはたらき、抗炎症性作用を有していることを明らかにした。このことによりアガロオリゴ糖は食品素材としての有効性が実証された。

第2に、最近食卓で普及している明日葉の機能性成分であるカルコンの有効性について、糖尿病への適用の可能性について追究した。明日葉カルコンは4-ヒドロキシデリシン(4HD)およびキサントアンゲロール(XA)の2種類が主要成分であり、両カルコンについてインスリン様効果を脂肪細胞への分化誘導促進作用とグルコース取り込み活性で評価を行い、さらに糖尿病モデルマウスを用いて糖尿病発症および改善効果を観察した。インスリン様作用について、両カルコンは前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導を助長し、成熟脂肪細胞内へのグルコース取り込みを促進させた。グルコース取り込み作用については4HDがXAより数倍高い活性を示した。明日葉カルコンのインスリン様作用は主要経路であるPPAR- γ を介したものではなく、別の経路の可能性を示唆した。

糖尿病モデルマウスKK-A^yマウスを用いた経口投与による実験の結果、4HDによって血糖値の低下、多飲症状の改善が見られ、カルコンの糖尿病発症の抑制あるいは病状改善への効果を明らかにした。

天然および合成の多種のカルコン化合物について抗糖尿病効果を検証した結果、明日葉中のキサントアンゲロール-F(XA-F)に強い作用があることを確認した。カルコンのインスリン様作用は分子構造内の置換基によって異なっており、抗糖尿病効果の高いカルコンの合成が期待される。

以上のように、本研究は寒天および明日葉の食品機能成分の有効性を細胞レベルおよび動物実験で明らかにし、これらが抗疾病食品として広く普及する可能性を示唆したもので、食品化学分野だけでなく農業および食品産業界にも貢献するものとなった。このような研究成果は、学術的な価値が認められ、審査委員一同は本論文が博士の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

学力確認結果の要旨

学位申請者 氏名	榎 竜 嗣
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 客員教授 向 井 博 之
	副査 鹿児島 大学 客員教授 北 川 正 成
	副査 鹿児島 大学 客員准教授 峰 野 純 一
審査協力者	
実施年月日	平成24年 8月17日

試験方法（該当のものを○で囲むこと。）

(口答)・(筆答)

主査および副査は、平成24年8月17日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。

また、筆記により、外国語（英語）の学力を確認した。

その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者と同等以上の学力および識見を有すると認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を持つものと判定した。

学位申請者
氏名

榎 竜 嗣

- [質問 1] アガロオリゴ糖が細胞に作用する箇所は何か？受容体などが存在するのか、それともLPSとの競合か？
- [回答 1] 細胞表面に結合するか、細胞内に取り込まれるかは不明である。本研究でアガロオリゴ糖がNrf-2を介していることがわかっており、細胞に対してアガロオリゴ糖が何らかの軽いストレスを与えて抗炎症作用を発揮している可能性が考えられる。TPAにより誘発する2段階発がんモデルに対しても効果があるので、単なるLPSとの競合ではないと考える。
- [質問 2] アガロオリゴ糖の還元末端が抗炎症作用に重要である理由は何か？
- [回答 2] アガロオリゴ糖は中性～弱アルカリ性で還元末端のアンハイドロガラクトースが外れて別の成分になることを確認している。アンハイドロガラクトース単独にも弱いながらNO産生抑制作用があり、また還元末端にアンハイドロガラクトースを有する他の物質でも同様に効果が認められている。
- [質問 3] アガロオリゴ糖以外のオリゴ糖には抗炎症作用は知られていないのか？アガロオリゴ糖にアトピー性皮膚炎を抑制する効果が動物実験で報告されているが、同じような作用機序を介しているのか？
- [回答 3] 私の知る限り、抗炎症作用を発揮するのはオリゴ糖の中でもアガロオリゴ糖のみである。アトピー性皮膚炎の研究は私が担当していないので、はっきりとわからないが、おそらく炎症性メディエーターの産生抑制を介している可能性があると考え。
- [質問 4] アガロオリゴ糖のNF- κ Bの発現抑制にも還元末端が重要か？
- [回答 4] そこまでは調べていないが、NO産生抑制作用でのデータから重要であると考え。
- [質問 5] アガロオリゴ糖はHO-1の発現を高め、HSP-70の発現には影響がなかったが、これはHO-1の方がストレス応答により敏感であるからなのか？
- [回答 5] HSP-70は熱ストレスに応答し、HO-1は酸化ストレスに応答する。ストレスの種類が違う。
- [質問 6] アガロオリゴ糖は体内に吸収されるのか？
- [回答 6] 吸収性については確認していない。培地中でアガロオリゴ糖は別の成分に変換されることがわかっており、おそらく体内でも別の成分になって効果を発揮すると考えている。
- [質問 7] IFN- γ /LPS刺激下でアガロオリゴ糖のHO-1発現誘導作用がさらに高まっているのは何故か？
- [回答 7] IFN- γ 自体にはNF- κ Bを高めてHO-1を誘導することが報告されており、アガロオリゴ糖のNrf-2活性化作用との相乗効果がみられているのではないかと考える。
- [質問 8] HO-1発現誘導作用が6時間をピークにその後徐々に下がっているのは何故か？
- [回答 8] アガロオリゴ糖は培地中で6時間よりも前に別の物質に変換される。その成分の効果が6時間にピークに達し、その後、その成分の消失とともに徐々に弱くなっていると考え。
- [質問 9] Nrf-2の下流にあるHO-1以外の他の遺伝子はどうか？
- [回答 9] Nrf-2の活性化によりphaseII解毒遺伝子が誘導されるが、アガロオリゴ糖によってこれらの解毒遺伝子の発現誘導が認められている。
- [質問 10] アガロオリゴ糖の研究や応用を今後どのように広めてゆくべきと考えているか？
- [回答 10] ヒトで発がん抑制試験等は難しいと考えられるので、関節炎やアトピー性皮膚炎抑制作用など、ヒトでの抗炎症作用の研究を進め、それらの機能性を広く知らしめることなどが重要と考える。

- [質問 1 1] アガロオリゴ糖の安全性は？
- [回答 1 1] 様々な安全性試験によって高い安全性が確認されている。
- [質問 1 2] アガロオリゴ糖のヒトでの有効量は？
- [回答 1 2] 動物試験で用いたアガロオリゴ糖の用量は多く、そのままヒトに適用するのは難しい。ヒトでの有効量は今後研究により確認する必要がある。
- [質問 1 3] 合成カルコンを用いた構造活性相関で、4' 位のメトキシ基、3' 位の側鎖構造が重要であるということだが、さらに活性を高めることは可能か？
- [回答 1 3] 今回示したカルコン以外にも、その他の置換基も含めて種々のカルコンを合成しているが、目立った上昇は確認できていない。ただ、置換基の種類等それほど検討を行ったわけではないので、今回の成果をもとにさらに研究を進めることで、その可能性があると考える。
- [質問 1 4] カルコン以外にインスリン様作用をもつものは報告されているか？また、カルコンの作用機構は何か？
- [回答 1 4] インスリン様作用を示す天然物の報告はあるが、グルコース取り込み促進作用と脂肪細胞の分化誘導作用の両方を併せ持つものは、少なくとも私の知る限りカルコンの他にはない。作用機構については、グルコース取り込み促進の効果発揮には時間がかかることから、何らかの分子を介している可能性があると考えられる。また、4HDとXAの活性の発現が異なることから、グルコース取り込み促進作用と脂肪細胞の分化誘導作用がそれぞれ異なるメカニズムである可能性は考えられる。
- [質問 1 5] インスリン様作用の作用機序は何か？
- [回答 1 5] グルコース取り込み促進作用についてはGLUTの膜移行の誘導が考えられるが脂肪細胞ではうまく確認できなかった。分化誘導作用については、別の作用機序の可能性もあり、種々の遺伝子発現を介していると考えられる。
- [質問 1 6] カルコンで分化誘導された3T3-L1細胞は成熟脂肪細胞と同様の形態を示すか？
- [回答 1 6] デキサメサゾンとインスリンで誘導した場合と同様の形態を示しており、また、インスリンに反応してグルコース取り込み促進することも確認できている。
- [質問 1 7] カルコンの解糖系や脂肪合成系の遺伝子への作用はあるか？
- [回答 1 7] 脂肪細胞の分化誘導に伴って上昇する遺伝子については確認しており上昇が確認できている。
- [質問 1 8] カルコンが脂肪細胞を作り出すことによって肥満になる恐れはないのか？
- [回答 1 8] カルコンによって作り出される小型の脂肪細胞はアディポネクチンを分泌し、糖尿病やメタボリックシンドロームに効果がある。肥満にはならない。動物実験でも体重増加作用はなかった。
- [質問 1 9] 低用量のピオグリタゾンと明日葉カルコンの併用により、ピオグリタゾンの副作用のない血糖値低下効果は見られないか？
- [回答 1 9] 検討はしていないが、両者の作用機序が異なることからその可能性はあると思う。
- [質問 2 0] 脂肪細胞だけではなく、筋肉細胞でのカルコンの糖取り込み促進作用はあるか？
- [回答 2 0] 実験を試みたが確認できなかった。おそらく実験手技上の問題かもしれない。