

氏名	北野 敦子
学位の種類	博士 (学術)
学位授与年月日	令和5年3月31日
学位論文名	黒にんじん抽出物によるアルコール性肝疾患予防効果とその作用メカニズム (Preventive effects of black carrot extract on alcoholic liver disease and its mechanism)
論文審査委員	主査 羽生 大記 副査 増田 俊哉 副査 由田 克士 副査 小島 明子

論文内容の要旨

アルコールの多量摂取は、全身の臓器に様々な障害を引き起こすが、特にアルコールの代謝を担う肝臓においては深刻な障害、いわゆるアルコール性肝疾患が発症することが知られている。アルコール性肝疾患の初期症状として脂肪肝を呈すが、過度な飲酒を持続するとアルコール性肝炎を発症する。アルコール性肝炎は肝細胞の壊死・変性をきたす病変であり、さらにその後も飲酒を継続するとアルコール性肝線維症やアルコール性肝がんへと進行する。そのため、比較的初期の段階で疾病の進行を予防することは極めて重要である。

肝細胞におけるエタノールの代謝は、通常、細胞質に存在するアルコール脱水素酵素 (Alcohol dehydrogenase: ADH) によって毒性の高いアセトアルデヒドが産生され、さらにアルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase: ALDH) によって酢酸へと無毒化される。これに対して、高濃度かつ慢性的な飲酒を続けることによって、ミクロソーム-エタノール酸化システム (microsomal ethanol oxidizing system: MEOS) がはたらき、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 2E1 (cytochrome p450 2E1: CYP2E1) によってアルコールがアセトアルデヒドへと代謝される。CYP2E1 によるアルコール代謝では、副産物として活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の産生が亢進することが知られている。ROS は過剰に産生されると、細胞内の脂質や DNA が酸化され、細胞の機能障害が生じることから、アルコールによる肝障害の主な原因には、CYP2E1 による ROS の過剰産生が関与していると考えられている。

黒にんじん (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) は中央アジア原産のセリ科にんじん属にんじんの一品種である。フェノール化合物やビタミン C やビタミン E などを含有しており抗酸化作用、抗炎症作用などを有することが報告されているため、ヒトの健康増進への有用性が注目されている食品である。しかしながら、黒にんじんのアルコール性肝疾患に対する予防効果についてはいまだ明らかにされていない。そこで本研究では、黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) のアルコール性肝疾患予防効果とその作用メカニズムについて検討した。

第1章では、アルコール性肝疾患モデル動物を使用して、BCE によるアルコール性肝疾患予防効果について検討した。ラットに 5%エタノール (EtOH) を3週間自由摂取させ、単独投与では肝傷害を惹起しない低濃度の四塩化炭素を週2回腹腔内投与することで、簡便かつ有効なアルコール性肝疾患モデル動物を作製した。このアルコール性肝疾患モデル動物に BCE を摂食させ、肝機能マーカーである血清アミノ基転移酵素 (AST および ALT) 活性の測定および肝組織像の観察を行った。その結果、

モデル動物でみられた AST および ALT 活性の上昇は、BCE を摂食させることで有意に低下し、また肝組織像においても脂肪肝やアルコール性肝線維化は認められなかった。これらの結果より、BCE はアルコール性肝疾患を予防することが *in vivo* 動物実験レベルで確認された。

第 2 章では、初代培養肝細胞を用いて、培養液に 100 mM EtOH を添加することによって *in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを作製し、BCE によるアルコール性肝細胞障害に対する予防効果について検討した。その結果、BCE は 100 mM EtOH を添加することによって有意に低下した細胞生存率をコントロールレベルにまで回復させた。さらに、BCE の有効成分を明らかにするために、BCE を各種有機溶媒によって分画し、得られた各抽出画分をクロロホルム抽出画分 (BCE-CHCl₃ 抽出画分)、酢酸エチル抽出画分 (BCE-AcOEt 抽出画分)、ブタノール抽出画分 (BCE-BtOH 抽出画分)、水溶性画分 (BCE-water 画分) として、EtOH によって誘導される肝細胞障害に対する保護効果を調べたところ、BCE-BtOH 抽出画分に最も強い保護効果が認められたため、以降の実験には、BCE-BtOH 抽出画分を用いた。

次に、EtOH によって誘導される肝細胞障害に対する BCE-BtOH 抽出画分の保護効果について、詳細な作用メカニズムを明らかにするために、アルコール代謝関連酵素 (ADH、ALDH、CYP2E1) に着目した。その結果、BCE-BtOH 抽出画分は、ADH および ALDH 活性を亢進させる一方で、過剰な ROS を産生する CYP2E1 活性を抑制した。さらに、各酵素の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルを測定したところ、ADH は翻訳レベル、ALDH は転写レベル、CYP2E1 は翻訳後で制御されていることが明らかとなった。次に、アルコール代謝関連酵素の活性や発現調節に関与することが報告されている cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase A (PKA) 経路に着目して検討したところ、BCE-BtOH 抽出画分は細胞内 cAMP 量を有意に増加させたこと、また PKA 阻害剤である H-89 を用いた結果、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性調節作用が抑制されたことから、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性には、cAMP/PKA 経路が関与していることが示唆された。さらに、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量の亢進作用メカニズムを明らかにするために、cAMP の分解に関与する酵素である phosphodiesterase 4b (PDE4b) の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルを測定した。その結果、BCE-BtOH 抽出画分は、PDE4b 発現を転写レベルで制御していることを見出した。

第 3 章では、BCE-BtOH 抽出画分による PDE4b 発現の抑制メカニズムとして、エピジェネティック制御について検討した。肝細胞はエタノール処理に伴って、DNA のメチル化やヒストン H3 のアセチル化修飾を受けることによって遺伝子発現制御機構が変化することや PDE4b の発現がヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化レベルで調節されていることが報告されている。H3K9 はアセチル化、メチル化両方の修飾を受けること、さらに、アセチル化修飾を受けることで転写活性が亢進し、メチル化されることで転写活性が抑制されることが明らかにされている。BCE-BtOH 抽出画分は、ヒストン H3K9 アセチル化レベルを抑制する一方で、メチル化レベルを亢進させた。この BCE-BtOH 抽出画分によるヒストン修飾の変化は、ヒストン脱アセチル化酵素である Sirtuin 1 (SIRT1) 発現が亢進したことで、ヒストン H3K9 アセチル化レベルが抑制されたことによるものであることが示唆された。さらに、BCE-BtOH 抽出画分は、メチル化基質となる S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM) 合成に関与する methionine adenosyl transferase2 (Mat2) および SAM 量を増加させることによって、ヒストン H3K9 のメチル化レベルを亢進させたことが示唆された。

これらのことから、黒にんじん抽出物 (BCE) は *in vivo* および *in vitro* 実験系において、アルコール代謝関連酵素活性を調節することによってアルコール性肝疾患を予防することが明らかとなった。その作用メカニズムとして、ヒストン H3K9 のエピジェネティックな修飾の変化を介して、PDE4b を抑制することによって cAMP 量を増加させ、肝細胞障害の主となる ROS 産生の原因酵素である CYP2E1 活性を転写レベルで制御することが見出された。

論文審査の結果の要旨

黒にんじん (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) は中央アジア原産のにんじんの一品種である。本博士論文は、黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) のアルコール性肝障害抑制効果とその作用メカニズムについて検討した。

第1章では、アルコール性肝疾患モデル動物を使用して、BCEによるアルコール性肝障害抑制効果について検討した。結果、モデル動物でみられたASTおよびALT活性の上昇は、BCEを摂食させることで有意に低下し、肝組織像において脂肪肝やアルコール性肝線維化は認められなかった。

第2章では、*in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを作製し、BCEによるアルコール性肝細胞障害抑制効果について検討した。その結果、BCEは100 mM EtOHを添加することによって有意に低下した細胞生存率をコントロールレベルにまで回復させた。BCEの有効成分を明らかにするために、BCEを各種有機溶媒によって分画した結果、クロロホルム抽出画分 (BCE-BtOH) に最も強い保護効果が認められた。BCE-BtOH抽出画分は、ADHおよびALDH活性を亢進させる一方で、過剰なROSを産生するCYP2E1活性を抑制した。さらに、ADHは翻訳レベル、ALDHは転写レベル、CYP2E1は翻訳後で制御されていることを示した。次にBCE-BtOH抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性に与える効果は、cAMP/PKA経路が関与していることが示唆された。さらに、BCE-BtOH抽出画分は、PDE4b発現を転写レベルで制御していることを見出した。

第3章では、BCE-BtOH抽出画分は、ヒストンH3K9アセチル化レベルを抑制する一方で、メチル化レベルを亢進させた。このBCE-BtOH抽出画分によるヒストン修飾の変化は、ヒストン脱アセチル化酵素であるSirtuin 1 (SIRT1) 発現が亢進したことで、ヒストンH3K9アセチル化レベルが抑制されたことによるものであることが示唆された。さらに、BCE-BtOH抽出画分は、メチル化基質となるS-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM) 合成に関与するmethionine adenosyl transferase2 (Mat2) およびSAM量を増加させることによって、ヒストンH3K9のメチル化レベルを亢進させたことが示唆された。

以上、本論文は、食品である黒にんじん抽出物を用いたアルコール性肝障害抑制効果に関して有用な新知見を見出しており、本審査委員会は本論文が博士(学術)の授与に値するものと認めた。