

紅麴の新規食品機能である脂肪肝抑制機構の解明

吉崎 隆之

鹿児島大学産学官連携推進センター
〒890-0065 鹿児島市郡元 1-2-1-40
TEL: 099-285-8497

要旨

近年問題となっている脂肪肝の進行を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし、高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスに紅麴粉末を投与して肝臓への影響を調べた。その結果、紅麴粉末が体重増加抑制および脂肪肝進行を抑える効果があることを確認した。そこで、紅麴が持つ食品機能としての脂肪肝抑制機構を明らかにするため、肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現量を調べた。その結果、近年肥満に関与する重要な遺伝子として注目されている cell death-inducing DNA Fragmentation Factor, alpha subunit-like effector A (CIDEA) の発現上昇を強く阻害していることが明らかになった。これは脂肪肝の進行を抑える新しい制御機構と考えられ、今後はこの機能性分子の同定などにより、非アルコール性脂肪生疾患研究の新しい展開が期待される。

1. 緒言

近年の脂肪摂取量増大や身体活動量の低下などによって肥満、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病が増加し、それに伴い脂肪肝を呈する人が増えている。従来「脂肪肝は良性疾患で、可逆性の病態で進行することはない」と考えられてきたが、その内10%程度に非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) の発症が認められ、さらにこの病態は10年間で約2割が肝硬変に進展して肝不全や肝細胞癌まで発症しうることが明らかとなったことから、メタボリックシンドロームに付随する非アルコール性肝疾患全体が脚光を浴びている。しかしながら、NASHの治療法は食事・運動療法を主体とした生活習慣の改善が中心であり、薬物療法に関してはインスリン抵抗性や脂質異常症、そして酸化ストレスなど、それぞれを分子標的とした治療が試みられているものの、効果は限定的で十分確立しているとは言い難い。このことから、NASHの直接的な抑制、あるいはその病態に拘わらず脂肪肝そのものを改善する治療薬の開発が望まれている。

このため私たちの研究グループでは脂肪肝形成を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし、その分子メカニズムの解明を試みてきた。これまで、高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスを使用し、核内受容体である PPAR γ や脂肪滴表面構成分子 ADRP、そしてパンテテイナーゼ Vanin-1 が肝細胞内の脂肪蓄積に関与することなどを報告している¹⁾⁻³⁾。これらの研究の一環で、私たちは血中コレステロールと中性脂肪を下げる

ことなどで知られる“紅麴粉末”を本実験系に取り入れ、体重増加と脂肪肝進行を抑制することを見出した。さらに、この時の肝臓の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ技術を用いて網羅的に解析を行ったところ、脂質代謝調節遺伝子である Lipin-1 の発現が上昇する一方、cell death-inducing DNA Fragmentation Factor, alpha subunit -like effector A (CIDEA) の発現を抑制することなどが明らかになった。どちらも近年肥満に關与する重要な遺伝子として注目されているものであるが⁴⁾⁵⁾、大変興味深いことに、紅麴粉末あるいは既知の紅麴由来代謝産物との關連を示す報告はこれまでなされていない。

本研究では、紅麴粉末が持つ上述の食品機能としての脂肪肝抑制機構を明らかにするため、体重、肝重量および脂肪組織重量の経時的变化、またこの時の肝臓における脂肪蓄積量および脂質代謝關連遺伝子の発現量を測定した。

2. 実験

2.1. 紅麴粉末の調製

紅麴菌 (*Monascus anka*) は秋田今野商店より購入した。紅麴粉末の調製は下記の通り行った。市販の米を一時間浸漬し、さらに1時間水切りした後、1時間蒸煮を行った。30℃まで冷却後、紅麴菌を植菌し、ペトリ皿 (直径 21cm) にて 35℃、10 日間培養した。以上の操作で作製した紅麴を凍結乾燥し、ブレンダーを使い粉碎し紅麴粉末とした。コントロールには米のみを同様に処理した米粉を用いた。

2.2. 高脂肪食投与による脂肪肝形成マウスへの紅麴粉末の投与

2 週齢の C57Bl/6Ncrj マウス (Charles River Japan, Tokyo, Japan) に脂質カロリー比 82% の食餌 (F2HFD2, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) に 10% (w/w) の米粉または紅麴粉末を混ぜたものを投与した。1 週間おきにすべてのマウスの体重と血糖値を測定し、0 週、2 週、4 週間後それぞれのマウスについては肝重量および脂肪組織重量を測定した。同時に肝臓については組織切片を作製して HE 染色およびオイルレッド O 染色により脂肪肝の程度を評価し、さらにリアルタイム PCR により脂質代謝關連遺伝子の発現量変化を測定した。

3. 結果

マウスへの高脂肪食投与による脂肪肝形成モデル実験系において、1 ヶ月間紅麴粉末を投与した結果、コントロールと比べて体重増加が抑えられること、さらには血糖値の上昇を穏やかにすることを確認した (Fig.1)。ただし血糖値は 4 週間後にはコントロールとの差はなくなった。

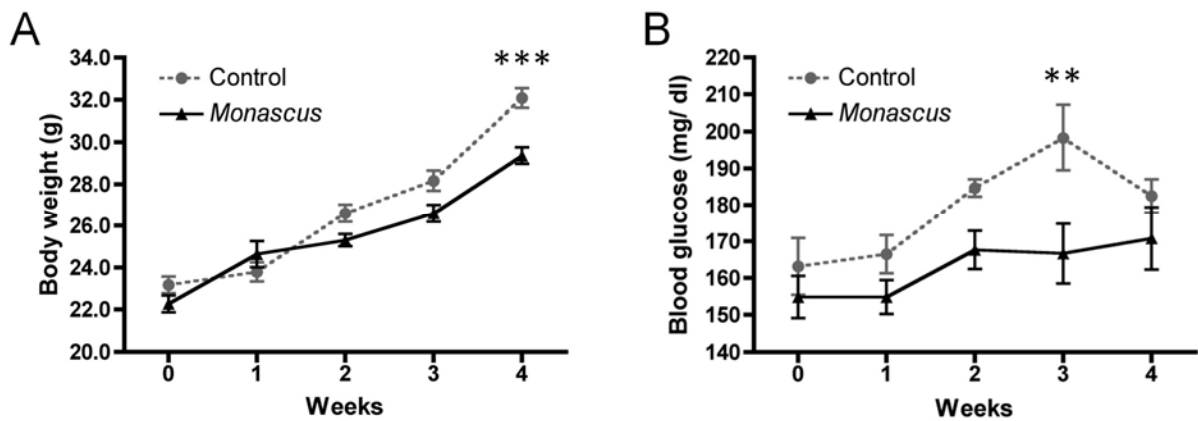


Fig. 1. Body weight (A), blood glucose (B) in mice fed with high-fat diet containing rice powder (control) or high-fat diet containing *Monascus* powder.

次に、紅麴粉末を含む高脂肪食を投与開始後 2 週間および 4 週間の肝重量および脂肪組織重量の比較したところ、肝重量においては 2 週間、4 週間両方でコントロールと比べ増加が抑えられていること、脂肪組織重量においては 2 週間では有意差はなかったものの、4 週間でやはりコントロールと比べ増加が抑えられていることが分かった (Fig. 2).

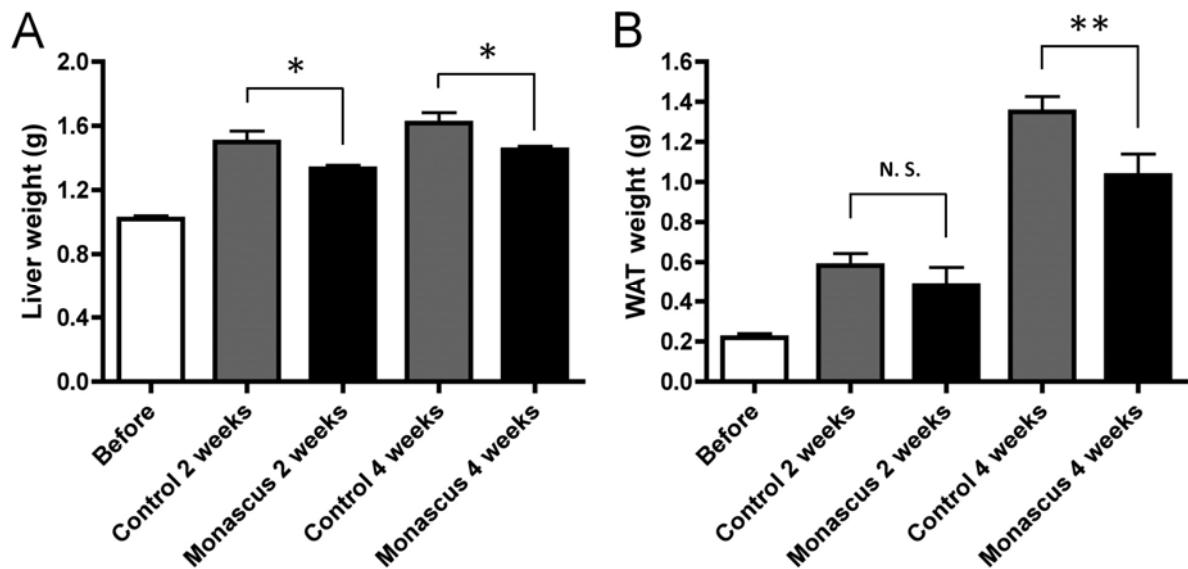


Fig. 2. Liver weight (A), white adipose tissue (wat) weight (B) in mice fed with control or high-fat diet containing *Monascus* powder.

またこの時取り出した肝臓で作製した肝臓組織切片の HE 染色およびオイルレッド O 染色を行った結果、投与開始後 2 週間では HE 染色においてはコントロールと明確な差は認められなかったが、オイルレッド O 染色ではコントロールで脂肪が染色されているのに対し、紅麴粉末を与えた方ではほとんど染色されなかった。投与開始後 4 週

間においては、HE 染色のコントロールで間隙のようなものが認められるのに対し、紅麴粉末を与えた方では異常は認められなかった。一方、オイルレッド O 染色ではコントロールに加え、紅麴粉末を与えた方でも僅かに染色が確認された (Fig. 3)。

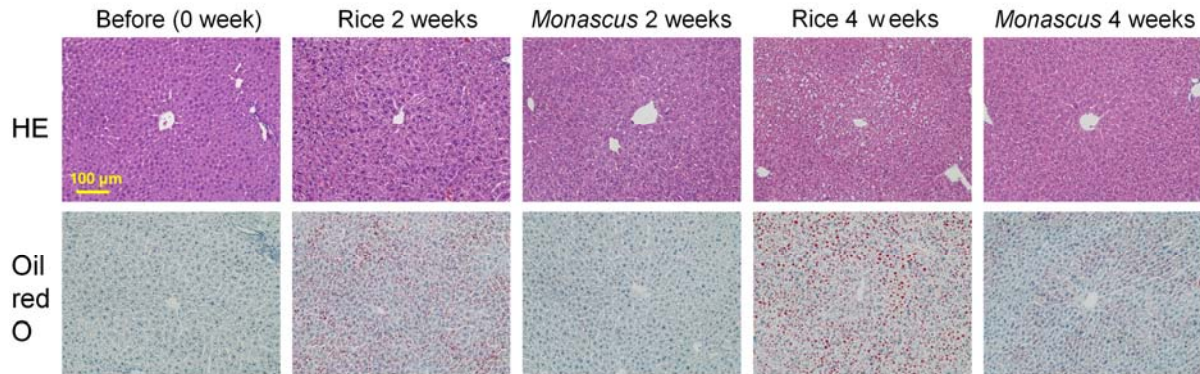


Fig. 3. Representative HE (upper panel) and Oil red O (under panel) staining of liver tissue in mice fed with control or high-fat diet containing *Monascus* powder.

最後に、紅麴粉末の投与によって既知の脂質代謝関連遺伝子の発現にどのような影響を与えているかを調べた。その結果、今回調べた遺伝子の中では唯一 cell death-inducing DNA Fragmentation Factor, alpha subunit -like effector A (CIDEA) (CIDEA) のみ有意差が付き、紅麴粉末の投与によってこの遺伝子の発現上昇を抑えていることが明らかとなった。

Table 1. Relative mRNA expression levels relating lipid metabolism in the mouse liver fed the high-fat diet with *Monascus* fermented products

Group	Before (0 week)	2 weeks		4 weeks	
		Rice	<i>Monascus</i>	Rice	<i>Monascus</i>
PPAR α	1.00 \pm 0.14	0.63 \pm 0.09	0.84 \pm 0.10	1.10 \pm 0.07	0.79 \pm 0.08
PPAR γ	1.00 \pm 0.09	0.96 \pm 0.22	0.60 \pm 0.12	1.68 \pm 0.13	1.45 \pm 0.29
srebf1	1.00 \pm 0.12	0.70 \pm 0.14	0.66 \pm 0.10	0.78 \pm 0.09	0.74 \pm 0.07
RXR α	1.00 \pm 0.13	0.66 \pm 0.12	0.70 \pm 0.12	0.65 \pm 0.04	0.87 \pm 0.06
scd1	1.00 \pm 0.13	0.16 \pm 0.05	0.16 \pm 0.06	0.35 \pm 0.06	0.19 \pm 0.08
AcetylCoACarbo	1.00 \pm 0.18	0.35 \pm 0.05	0.42 \pm 0.06	0.47 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04
Fasn	1.00 \pm 0.28	0.26 \pm 0.07	0.27 \pm 0.04	0.41 \pm 0.06	0.35 \pm 0.05
Ehhadh	1.00 \pm 0.18	1.12 \pm 0.27	1.55 \pm 0.15	2.42 \pm 0.04	2.00 \pm 0.22
Acadv1	1.00 \pm 0.08	0.89 \pm 0.08	0.95 \pm 0.13	1.06 \pm 0.04	1.27 \pm 0.06
Cpt2	1.00 \pm 0.14	1.16 \pm 0.18	1.02 \pm 0.13	1.13 \pm 0.10	1.18 \pm 0.07
ACOX1	1.00 \pm 0.12	0.92 \pm 0.09	0.90 \pm 0.20	1.57 \pm 0.06	1.54 \pm 0.17
ADRP	1.00 \pm 0.15	1.07 \pm 0.15	1.11 \pm 0.14	1.62 \pm 0.09	1.45 \pm 0.09
Lipin-1	1.00 \pm 0.24	0.47 \pm 0.12	0.82 \pm 0.29	0.28 \pm 0.12	0.63 \pm 0.14
CIDEA	1.00 \pm 0.11	2.17 \pm 0.46	1.61 \pm 0.39	38.4 \pm 12.1	9.08 \pm 3.34**

Data were expressed as mean \pm S.E.M of 6 experiments.

** $P < 0.01$ vs. Rice control of each time point.

4. 考察

本研究の予備実験で紅麴粉末を4週間投与することによって体重増加が抑えられること、DNAマイクロアレイ解析で脂質代謝関連遺伝子である Lipin-1 の発現量が増加、CIDEA が減少することなどが分かっていたが（データは示していない）、今回これを経時的に行いさらにリアルタイム PCR で詳細に検討を行った。高脂肪食投与によって4週間後までは HE 染色で脂肪肝はほとんど確認できないが、オイルレッド O 染色ではそれよりも前の時点から紅麴粉末投与によって脂肪の蓄積が抑えられていることが分かった。この時の脂質代謝関連遺伝子は今回の実験では CIDEA のみ有意に発現上昇が抑えられていることが分かった。CIDEA は代謝疾患の進行に重要な脂質代謝の調節因子であり⁵⁾、先の DNA マイクロアレイの結果では大きく変動した遺伝子は限られていたこととも考え合わせ、紅麴粉末が特異的に CIDEA の発現上昇を抑えて脂肪肝形成抑制効果を発揮しているメカニズムが考えられた。紅麴はこれまで多くの二次代謝産物が含まれていることが報告されており、その中の一つが CIDEA の発現上昇を抑えるものと考えられ、今後この分子の同定を進めていきたい。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深謝いたします。

6. 引用文献

- 1) M. Inoue, T. Ohtake, W. Motomura, N. Takahashi, Y. Hosoki, S. Miyoshi, Y. Suzuki, H. Saito, Y. Kohgo, T. Okumura. (2005) Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **336**: 215-222.
- 2) W. Motomura, M. Inoue, T. Ohtake, N. Takahashi, M. Nagamine, S. Tanno, Y. Kohgo, T. Okumura. (2006) Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **340**: 1111-1118.
- 3) W. Motomura, T. Yoshizaki, N. Takahashi, S. Kumei, Y. Mizukami, S. Jang, Y. Kohgo. (2012) Analysis of vanin-1 upregulation and lipid accumulation in hepatocytes in response to a high-fat diet and free fatty acids. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **51**: 163-169.
- 4) Y. Tsuchiya, N. Takahashi, T. Yoshizaki, S. Tanno, M. Ohhira, W. Motomura, S. Tanno, K. Takakusaki, Y. Kohgo, T. Okumura. (2009) A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **382**: 348-352.
- 5) L. Xu, L. Zhou, P. Li. (2012) CIDE Proteins and Lipid Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **32**: 1094-1098.

Red koji prevents the development of fatty liver induced by high-fat diet in mice

Takayuki Yoshizaki

Innovation Center, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima City, Kagoshima
890-0065, Japan

Tel/Fax: +81-99-285-8497, E-mail: k8255261@kadai.jp

For determine whether *Monascus* powder affects the developments of fatty liver, mice were fed with high-fat diet containing *Monascus* powder for 4 weeks. As for *Monascus* powder administering group, body weight and liver weight increasing rate by high-fat diet was clearly suppressed with control group. It was shown that the fat was strongly deposited in the liver of control group though it was a little deposited *Monascus* administering group by oil red O staining of the tissue section. To understand the inhibition mechanism of liver steatosis by the *Monascus* powder, we performed quantitative real-time RT-PCR analysis concerning genes involved in lipid metabolisms. As a result, the expressions of cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (CIDEA) mRNA has only indicated significant difference between control diet administering group. These results indicated that inhibition of fatty liver progression by *Monascus* powder is strongly associated with inhibition of CIDEA progression mechanism.