

# プラズマ液界面プロセスによる低分子化フコイダンの機能性評価

神戸女学院大学大学院 人間科学研究科  
博士前期課程 2 年 村上 菜摘

## 1. はじめに

フコイダンは、モズクやワカメなどの褐藻類に含まれる硫酸化多糖類である(田幸ら 1996)。フコイダンは、さまざまな生物活性を示すことが報告されているが、それらは抽出方法や構成糖比、分子量の違いに由来する(朴ら 2005)。

よって本研究では、新たな食品素材や化粧品素材としての利用可能性を検証するため、電極を誘導体で被覆したプラズマ処理技術により低分子化されたオキナワモズク由来フコイダンの機能性について明らかにすることを目的に実験を行った。この研究を通して、生物活性の高い多糖類の処理方法による機能性の違いや効果的な分野を探索することで、人々の健康維持や増進、またそのための技術向上の一助となることを期待したい。

## 2. 材料

### 2.1 試料調製

材料には、金秀バイオ株式会社様より分与していただいたオキナワモズク由来のフコイダンエキス末またはL-フコースを蒸留水で溶解したものを試料として用いた。

### 2.2 プラズマ処理フコイダンサンプル作製方法

共同研究先の大阪公立大学白藤研究室にてプラズマ処理し低分子化したものをサンプルとして用いた。

## 3. 実験方法

### 3.1 チロシナーゼ活性阻害率の測定

96wellマイクロプレートに0.03%L-DOPA、50mMリン酸緩衝液、1 mg/mLアスコルビン酸または試料溶液の順に各50  $\mu$ Lずつ加え、マイ

クロプレートミキサーで10秒間攪拌し、25℃に設定したクールインキュベーターで15分間プレインキュベートした。その後、酵素液50  $\mu$ Lを加えマイクロプレートミキサーで10秒間攪拌し、25℃に設定したクールインキュベーターで15分間インキュベートした。反応後、マイクロプレートリーダー(Multiskan FC/Thermo SCIENTIFIC社)で450nmの吸光度を測定した。以下の式を用いてチロシナーゼ活性阻害率を算出した。

$$\text{チロシナーゼ活性阻害率(\%)} = 100 - \left\{ \frac{(\text{sample-blank})}{(\text{control-blank})} \right\} \times 100$$

※sample：基質、酵素液、各サンプルを加えた際の吸光度

blank：基質、50mMリン酸緩衝液、各サンプルを加えた際の吸光度

control：基質、酵素液、50mMリン酸緩衝液を加えた際の吸光度

### 3.2 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する影響

正常ヒト皮膚線維芽細胞を培養し、サンプル抽出液を培地に添加して3日間培養した。培地を取り除き、培地とPremix WST-1 Cell Proliferation Assay System(タカラバイオ株式会社)を10:1の割合で混合した溶液をブランク以外のwellに100  $\mu$ L添加し、ブランクにはRPMI-1640(10%FBS、1%Antibioticsを含む)を100  $\mu$ L添加した。37℃、5% CO<sub>2</sub>下で1時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーにより波長450nmで吸光度を測定した。サンプル無添加区の細胞の吸光度を細胞生存率100%とし、各サンプル添加区の細胞生存率を算出した。

### 3.3 脂肪蓄積に対する影響

前駆脂肪細胞(3T3-L1細胞)を培養し、分化誘導時からサンプル抽出液を培地に添加して培養した。分化誘導8日目にOil Red染色を行い、染色された油滴を抽出し、マイクロプレートリーダーにより560nmにて吸光度を測定した。

以下2.4も同様に、未処理フコイダンまたはプラズマ処理低分子化フコイダン、L-フコースを添加した培地で培養した細胞を試料として用いた。

### 3.4 細胞毒性の評価

分化誘導8日目の細胞をWater Soluble Tetrazolium (WST-1) で処理し、生成された色素をマイクロプレートリーダーにより450nmで吸光度を測定し、フコイダンの細胞毒性について調べた。

### 3.5 脂肪合成および脂肪蓄積関連遺伝子の発現量の測定

分化誘導8日目の各細胞からmRNAを抽出し、逆転写反応によりDNAを合成した。脂肪合成・蓄積に関連する遺伝子29種のプライマーを用いて、Real-Time PCR解析システム (CFX96 Real-Time PCR Detections Systems/BIO-RAD) により遺伝子発現を測定した。

### 3.6 統計処理

統計処理にはExcel統計 (ver3.22/株式会社社会情報サービス) を使用した。コントロール区との比較はDunnett法による多重比較、濃度間の比較はTukey法による多重比較を行った。なお、有意水準は1% ( $p < 0.01$ ) および5% ( $p < 0.05$ ) とした。

## 4. 結果および考察

### 4.1 チロシナーゼ活性阻害率の測定

未処理フコイダン添加区およびプラズマ処理フコイダン添加区の全ての濃度でチロシナーゼ活性阻害が認められた。さらに、プラズマ処理フコイダン1 mg/mL添加区において、未処理フコイダン添加区およびL-フコース添加区よりも有意に高いチロシナーゼ活性阻害が認められたことから、プラズマ液界面プロセスを用いた処理は、チロシナーゼ活性阻害効果を向上させる可能性が示唆された。

プラズマ処理フコイダンは、未処理フコイダンより小さく、分子量164.15のL-フコースより大きい分子量を有していた。このプラズマ処理フコイダンが、最も高いチロシナーゼ活性阻害率を示したことから、プラズマ処理により生成された低分子の成分がチロシナーゼ活性阻害効果を向上させた可能性が示唆された。プラズマ処理フコイダンにはL-フコースも含まれていると考えられるが、L-フコースのチロシナーゼ活性阻害率は大変低かったことから、プラズマ処理フコイダン添加区におけるチロシナーゼ活性阻害効果は低分子化されたフコイダンによるものであると考えられる。

このことから、プラズマ処理フコイダンには、チロシナーゼ活性の阻害によるメラニン生成抑制効果、美肌効果が期待できるのではないかと推察されるが、フコイダンのチロシナーゼ活性阻害にはさまざまな条件が関与することから、さらなる解析が必要だと考える。

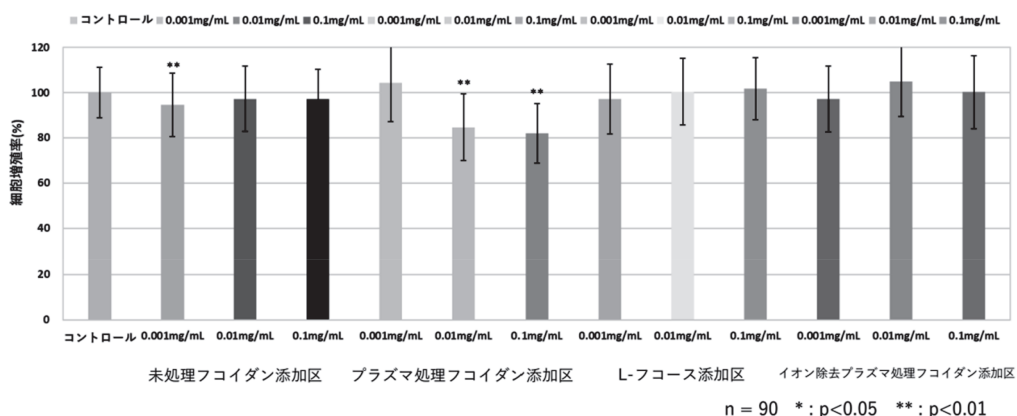


図1 未処理フコイダン、プラズマ処理フコイダンおよびL-フコース添加区におけるチロシナーゼ活性阻害率の比較

## 4.2 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する影響

コントロール区と比較し全てのサンプル添加培養細胞において、有意な細胞増殖が見られなかった。以上のことから、オキナワモズク由来

フコイダン、低分子フコイダンおよびL-フコースには、正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する細胞増殖効果は認められないことが示唆された。

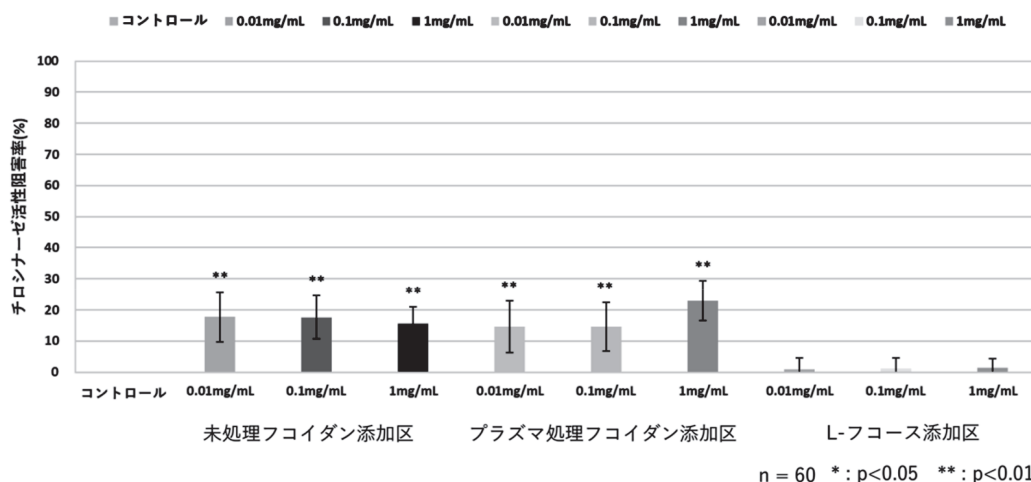


図2 未処理フコイダン、プラズマ処理フコイダン、L-フコース、イオン除去プラズマ処理フコイダン添加培養細胞における正常ヒト皮膚線維芽細胞増殖率の比較

## 4.3 脂肪蓄積に対する影響

サンプル無添加のコントロール区と比較して、未処理フコイダン0.1mg/mL添加区、プラズマ処理フコイダン0.01mg/mLおよび0.1mg/mL添加区において、脂肪蓄積が抑制された。未

処理フコイダン、プラズマ処理フコイダン、L-フコース添加培養細胞のいずれも濃度依存的に脂肪蓄積率低下が見られたことから、L-フコースも含めたフコイダンの一部が脂肪蓄積抑制効果をもたらしたことが示唆された。また、プラ

ズマ処理フコイダン0.1mg/mL添加区において、未処理フコイダン0.1mg/mL添加区との有意な差は見られなかったものの、L-フコース0.1mg/mL添加区よりも有意に高い脂肪蓄積抑制

制が認められた。このことから、プラズマ処理によって低分子化されたフコイダンは、未処理のものよりも脂肪蓄積抑制効果を向上させる可能性が示唆された。

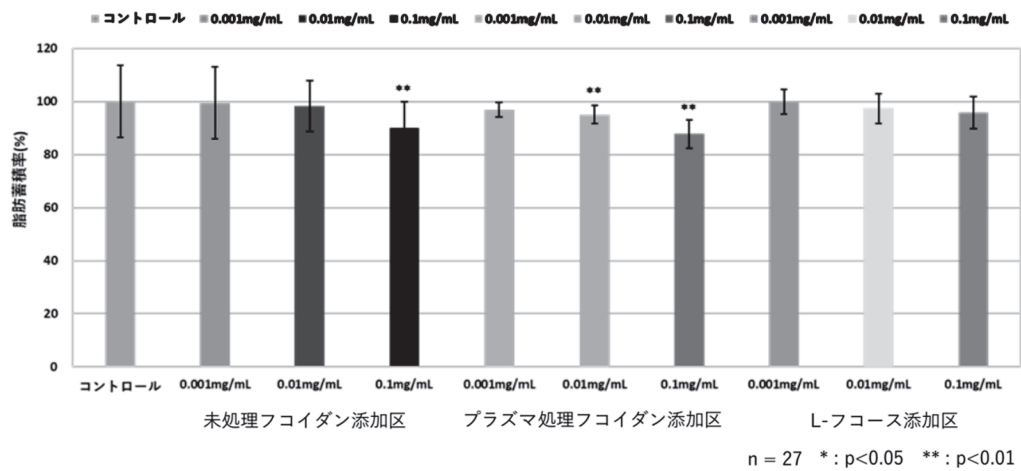


図3 未処理フコイダン、プラズマ処理フコイダンおよびL-フコース添加培養前駆脂肪細胞における脂肪蓄積率の比較

4.4 細胞毒性の評価

サンプル無添加のコントロール区と比較して、未処理フコイダン、プラズマ処理フコイダンおよびL-フコース添加区の全ての濃度において、細胞生存率が94%以上であることが認められた。細胞生存率80%以上の場合、添加した

化合物は細胞毒性を示さないという報告（水野ら 2017）から、今回用いた全てのサンプルには前駆脂肪細胞に対する毒性がないことが確認され、さらに、4.3で見られた脂肪蓄積抑制は細胞毒性によるものではないことが示唆された。

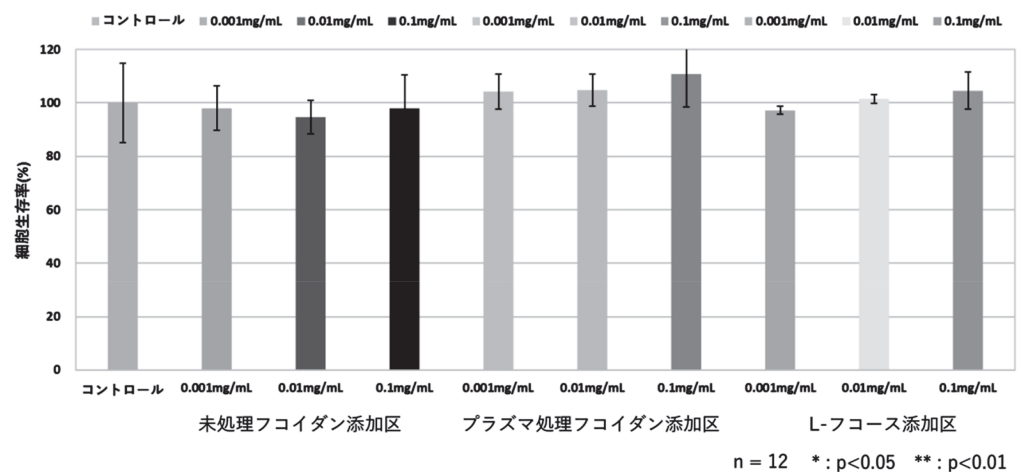


図4 未処理フコイダン、プラズマ処理フコイダンおよびL-フコース添加培養細胞における細胞生存率の比較

#### 4.5 脂肪合成および脂肪蓄積関連遺伝子の発現量の測定

分化誘導8日目の未処理フコイダン1 mg/mL添加区およびプラズマ処理フコイダン1 mg/mL添加区にいずれにおいても、レジスチン (Retn) の遺伝子発現が有意に増加していることが認められた。レジスチンは、脂肪細胞の分化過程で誘導され、インスリン抵抗性改善薬であるperoxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) リガンドによって抑制される遺伝子として同定された (C M Steppanら 2001)。マウスにおけるレジスチンの発現は、脂肪細胞特異的なものであり (M. A. Lazar 2007)、血中レジスチンは、肥満・糖尿病に伴い上昇する一方、PPAR $\gamma$ リガンド投与により低下し、レジスチン投与や肝臓特異的発現によりインスリン抵抗性が惹起される (Michael W Rajala 2003)。反対に、レジスチン欠損マウスは高脂肪食で誘導される糖尿病発症に抵抗性があり、その機序として肝臓でのAMPK活性上昇を介し糖代謝が改善されると報告されている (前田ら 2011)。それに対し、ヒトにおいては、レジスチンは脂肪細胞のみならず、単球・マクロファージからも産生されることがわかっており、その病態生理学的意義はマウスと異なる可能性があることが示されている。

Kimらによると、レジスチンを発現ベクターとしてトランスフェクトしたCOS細胞の馴化培地で処理すると、3T3-L1細胞の脂肪細胞への転換が80%抑制されたことから、レジスチンは脂肪組織形成を抑制するフィードバックシグナルとして機能する可能性が示されている (Kimら 2001)。また、さまざまなげっ歯類の肥満モデルにおけるレジスチンの発現の減少 (Wayら 2001) や、ヒトにおけるレジスチン発現とインスリン抵抗性との間に相関関係がない (Jürgenら 2002) ことなど、レジスチンがインスリン抵抗性と関連していないという報告も存在し、レジスチンのヒトにおける働きにはさら

なる研究が必要であることが示されている (Makimuraら 2002)。

以上のことより、本実験で見られたレジスチン (Retn) の発現量増加は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を経て、増殖した脂肪細胞から分泌されたものではないかと考えるが、今回の未処理フコイダンおよびプラズマ処理フコイダン1 mg/mL添加は、レジスチン (Retn) の発現量増加やそれに伴う脂肪蓄積抑制に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 引用文献

- 田幸正邦・上原めぐみ・川島由次・知念功・本郷富士弥 (1996) オキナワモズクからフコイダンの分離・同定 応用糖質化学, 43, pp.143-148
- 朴今花・池原ゆかり・佐々木努・宮城健・東みゆき (2005) 分子量および構成成分の違いによるフコイダンの生物活性 日本栄養・食糧学会誌, 58, pp.273-280
- 水野英哉・波多野智子・武富彩子・河端真実・中林利 (2017) 3T3-L1細胞におけるベルガモチンの脂肪細胞分化促進効果と炎症誘発時の炎症性サイトカイン発現の抑制について 薬学雑誌 137 pp.775-781
- C M Steppan, S T Bailey, S Bhat, E J Brown, R R Banerjee, C M Wright, H R Patel, R S Ahima, M A Lazar (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes *Nature* 409 pp.307-312
- M.A.Lazar (2007) Resistin- and Obesity-associated Metabolic Diseases *Hormone and Metabolic Research* 39 pp.710-716
- Michael W Rajala, Silvana Obici, Philipp E Scherer, Luciano Rossetti (2003) Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production *The Journal of Clinical Investigation* 111

pp.225-230

前田法一・下村伊一郎 (2011) I. 診断と関連  
検査3. 肥満症とアディポサイトカイン 日  
本内科学会雑誌 10 pp.911-916

Kee-Hong Kim,Kichoon Lee,Yang Soo  
Moon,Hei Sook Sul (2001) A Cysteine-  
rich Adipose Tissue-specific Secretory  
Factor Inhibits Adipocyte Differentiation  
*Journal of Biological Chemistry* 276  
pp.11252-11256

James M. Way,Cem Z. Corgun,Qiang  
Tong, Timothy M.Willson,Steven A.  
Kliiwer,Gokhan S. Hotamisligil (2001)  
Adipose Tissue Resistin Expression Is  
Severely Suppressed in Obesity and  
Stimulated by Peroxisome Proliferator-  
activated Receptor  $\gamma$  Agonists *Journal of*  
*Biological Chemistry* 276 pp.25651-25653

Jürgen Janke,Stefan Engeli,Kerstin  
Gorzelniaak,Friedrich C Luft,Arya M  
Sharma (2002) Resistin Gene Expression  
in Human Adipocytes Is Not Related to  
Insulin Resistance *Obesity Research* 10  
pp.1-5

Makimura Hideo,Mizuno Tooru,Hugo Bergen,  
Charles V. Mobbs (2002) Adiponectin  
is stimulated by adrenalectomy in *ob/ob*  
mice and is highly correlated with resistin  
mRNA *American Journal of Physiology-  
Endocrinology and Metabolism* 283  
pp.1266-127