

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06519

研究課題名(和文) 食事中の亜硝酸/硝酸の不足にて生じる代謝症候群の分子機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the metabolic syndrome induced by long-term dietary nitrite and nitrate deficiency and development of the new treatment

研究代表者

喜名 美香 (Kina, Mika)

琉球大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80578914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食餌中の亜硝酸塩/硝酸塩(NOx)の長期の不足が代謝症候群を引き起こすという仮説をマウスにおいて検証した。この目的のために、通常食とL-アルギニン、脂質、炭水化物、蛋白質、カロリー含有量が同一の低NOx食を作製し、野生型マウスに長期投与した。その結果、低NOx食3ヶ月投与は、内臓脂肪蓄積、高脂血症、耐糖能異常を引き起こし、18ヶ月投与は、高血圧、インスリン抵抗性、内皮機能不全を招き、22ヶ月投与は急性心筋梗塞死を含めた心血管死を誘発した。このことから、本研究は、食餌中NOxの長期不足はマウスに代謝症候群を惹起することを見出し、外因性NO産生系の病因的役割を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested our hypothesis that long-term dietary nitrite/nitrate deficiency would induce the metabolic syndrome in mice. To this end, we prepared a low-nitrite/nitrate diet (LND), in which the contents of L-arginine, fat, carbohydrates, protein and energy were identical with a regular diet (RD). Three months of the LND significantly elicited visceral adiposity, dyslipidaemia and glucose intolerance in comparison with the RD. Eighteen months of the LND significantly provoked hypertension, insulin resistance and impaired endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, while 22 months of the LND significantly led to death mainly due to cardiovascular disease, including acute myocardial infarction. These results provide the first evidence that long-term dietary nitrite/nitrate deficiency gives rise to the metabolic syndrome in mice, indicating a novel pathogenetic role of the exogenous NO production system in the metabolic syndrome and its vascular complications.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：メタボリックシンドローム nitrate

1. 研究開始当初の背景

(1) 一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) は生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている¹⁻⁶。NO は L-アルギニンから NO 合成酵素 (NOS) を介して合成されるのみならず、その代謝産物である亜硝酸塩 (NO₂⁻, nitrite) および硝酸塩 (NO₃⁻, nitrate) から合成される⁷。

(2) 硝酸塩はレタスやほうれん草などの緑葉野菜に多く含有されている⁸。しかし、食事の亜硝酸塩 / 硝酸塩 (NOx) の不足が病気を引き起こすか否かは知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、食餌性 NOx の長期の不足が代謝症候群を引き起こすという仮説を野生型マウスにおいて検証した。

3. 研究の方法

(1) この目的のために、通常飼料と蛋白質、脂質、および炭水化物からの摂取カロリーが等しく、NOS の基質である L-アルギニンの含有量が同一の低 NOx 飼料を作製した (表 1)。

表 1. 通常食および低 NOx 食の組成

	通常食	低NOx食
	通常飼料	低NOx飼料
Protein (%kJ)	28.5	28.5
Fat (%kJ)	13.5	13.5
Carbohydrate (%kJ)	58.0	58.0
L-arginine (g/kg)	14.1	14.1
Nitrite (NO ₂ ⁻ , mmol/kg)	不検出(6.5未満)	不検出(6.5未満)
Nitrate (NO ₃ ⁻ , mmol/kg)	548.3	不検出(4.8未満)
	水道水	超純水
Nitrite (NO ₂ ⁻ , mmol/L)	3.30	不検出(0.01未満)
Nitrate (NO ₃ ⁻ , mmol/L)	6.07	不検出(0.01未満)

(2) 低 NOx 食 (Low NOx diet) (低 NOx 飼料 + 超純水) あるいは通常食 (Regular diet) (通常飼料 + 水道水) を 6 週齢の雄の野生型 C57BL/6J マウスに 3~22 ヶ月間投与した。一部の実験では sodium nitrate (2 mmol/L) の同時投与を行った。

(3) 血漿 NOx は高速液体クロマトグラフィーおよびグリース法で、血漿脂質は比色法で測定した。内臓脂肪量はマウスの精巢上体白色脂肪組織を体重で割った値で評価した。血圧はテイルカフ法で、糖代謝は糖負荷試験で、インスリン感受性はインスリン負荷試験で評価した。蛋白発現レベルはウェスタンブロット法で、腸内細菌叢は次世代シーケンサーを用いて評価した。さらに、血管機能は等尺性張力実験で、死因は病理学的解析で検討した。

4. 研究成果

(1) 過去の研究で、3 種類の NOS が完全に欠損したマウス (n/i/eNOS^{-/-}) を作成し、この

マウスの血漿 NOx レベルは野生型マウス (WT) に比して著明に低下していることを報告した^{9,10} (図 1、右上)。この結果から、生体の NO 産生は主に内因性 NO 産生系によって調節されていること、外因性 NO 産生系の寄与は小さいことが示唆されたが、低 NOx 食を野生型マウスに投与すると、意外なことに、血漿 NOx レベルは通常食群に比して 30%以下に著明に低下した (図 1、左)。

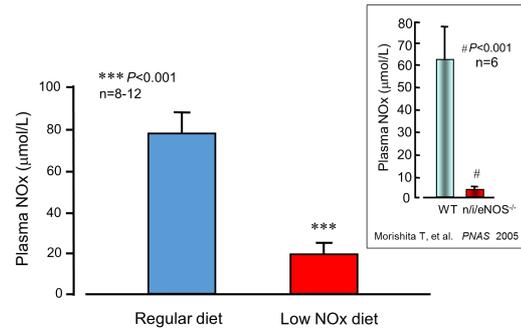


図 1. 血漿 NOx レベルにおける低 NOx 食 3 ヶ月投与の効果

(2) この機序を検討するために、NOS の発現レベルを検討したところ、低 NOx 食を投与したマウスでは通常食群と比して、内臓脂肪組織に特異的な内皮型 NOS (eNOS) 発現レベルの低下が認められた (図 2)。

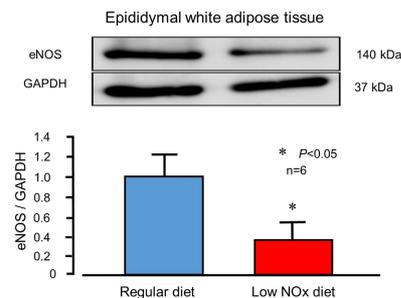


図 2. 内臓脂肪組織の eNOS 蛋白発現における低 NOx 食 3 ヶ月投与の効果

(3) 重要なことに、低 NOx 食の 3 ヶ月投与は、通常食群と比して、有意な内臓脂肪蓄積、高脂血症、耐糖能異常を引き起こした (図 3)。

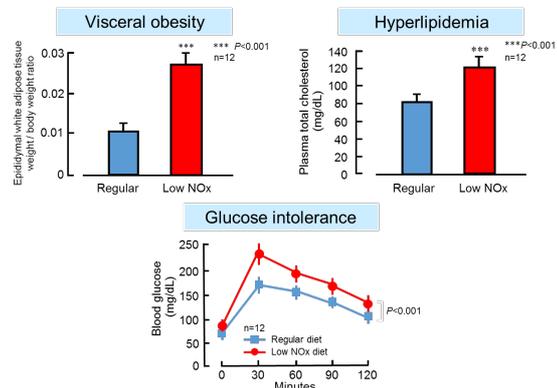


図 3. 低 NOx 食 3 ヶ月投与により生じたメタボリックシンドローム様の病態

(4) 低 NOx 食 3 ヶ月投与により生じた病態は sodium nitrate の同時投与により改善された (図 4)。

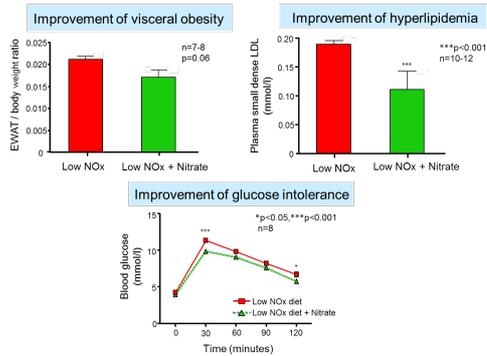


図 4 .低 NOx 食 3 ヶ月投与により生じたメタボリックシンドローム様病態の sodium nitrate 同時投与による改善

(5) 低 NOx 食の 18 ヶ月投与は、有意な体重増加、高血圧、インスリン抵抗性、内皮機能不全を招き (図 5) 低 NOx 食の 22 ヶ月投与は、急性心筋梗塞死を含めた心血管死を誘発した (図 6)。これらの異常はすべて sodium nitrate の同時投与により抑制された (図 5、6)。

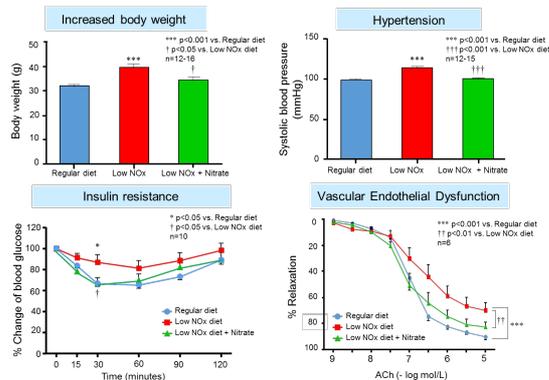


図 5 .低 NOx 食 18 ヶ月投与により生じた体重増加、高血圧、インスリン抵抗性および血管内皮機能不全

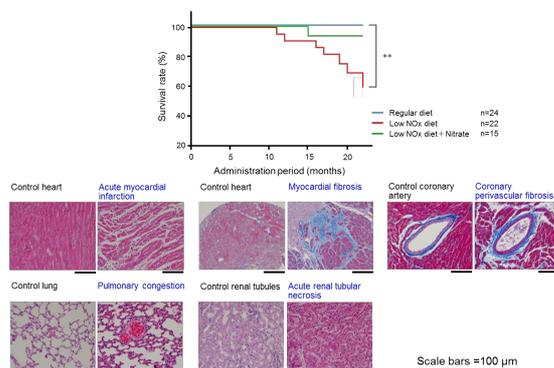


図 6 . 低 NOx 食 22 ヶ月投与により生じた生存率の低下と心血管死

(6) 低 NOx 食を 3 ヶ月投与したマウスでは、

内臓脂肪組織におけるアディポネクチンレベルの低下、および腸内細菌叢の異常が認められた (図 7、8)。

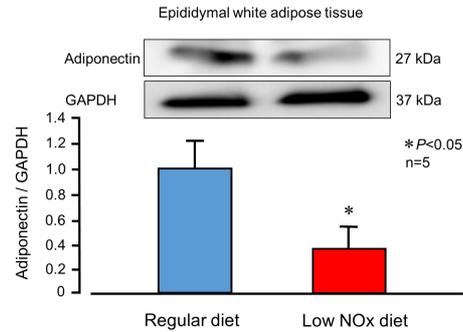


図 7 . 内臓脂肪組織のアディポネクチンレベルにおける低 NOx 食 3 ヶ月投与の効果

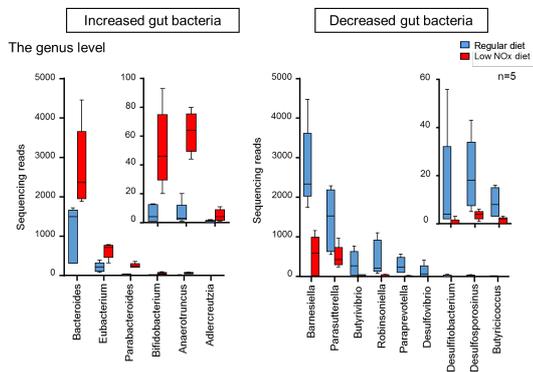


図 8 . 低 NOx 食 3 ヶ月投与による内細菌叢の変化

(7) 投与 18 ヶ月までの食餌摂取量は低 NOx 食群と通常食群の間で差がなかったことから、摂取カロリーは両群間で同じであることが示唆された (図 9)。

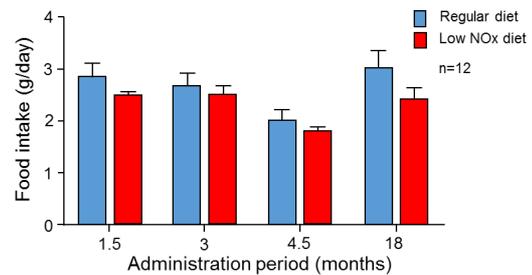


図 9 . 食餌摂取量の経時変化

本研究では、食餌中の亜硝酸塩 / 硝酸塩が長期に不足するとマウスに代謝症候群、内皮機能不全、および心血管死が引き起こされることを見出し、外因性 NO 産生系の病因的役割が初めて明らかにされた。この機序には、内臓脂肪組織におけるアディポネクチンの低下、eNOS 発現低下、並びに腸内細菌叢の異常が関与していることが示唆された。さらに本研究では、カロリー過多がなくても代謝症候群を引き起こす食事成分を初めて同定したと考えられた。

<引用文献>

- 1) Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:535-560
- 2) Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012
- 3) Murad F (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355:2003-2011
- 4) Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N (2009) Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* 73:986-993
- 5) Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N (2010) Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacol Ther* 128:499-508
- 6) Tsutsui M, Tanimoto A, Tamura M et al (2015) Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J Pharmacol Sci* 127:42-52
- 7) Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7:156-167
- 8) Weitzberg E, Lundberg JO (2013) Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr* 33:129-159
- 9) Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H et al (2005) Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10616-10621
- 10) Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H et al (2008) Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation* 117:2211-2223

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mika Kina-Tanada, Mayuko Sakanashi,

Akihide Tanimoto, Tadashi Kaname, Toshihiro Matsuzaki, Katsuhiko Noguchi, Taro Uchida, Junko Nakasone, Chisayo Kozuka, Masayoshi Ishida, Haruaki Kubota, Yuji Taira, Yuichi Totsuka, Shin-ichiro Kina, Hajime Sunakawa, Junichi Omura, Kimio Satoh, Hiroaki Shimokawa, Nobuyuki Yanagihara, Shiro Maeda, Yusuke Ohya, Masayuki Matsushita, Hiroaki Masuzaki, Akira Arasaki, Masato Tsutsui. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. *Diabetologia* 査読有(2017) 60:1138-1151 DOI 10.1007/s00125-017-4259-6

〔学会発表〕(計6件)

低 NO₂-/NO₃-食の長期的な摂取はメタボリックシンドロームを惹起する.
坂梨 まゆ子, 喜名 美香, 野口 克彦, 松崎 俊博, 仲宗根 淳子, 平良 雄司, 久保田 陽秋, 戸塚 裕一, 筒井 正人.
日本薬学会第 137 年会. 仙台国際センター. 宮城県仙台市. 2017 年 3 月 24 日~27 日

食事の中の nitrite および nitrate の不足は代謝症候群、内皮機能不全、および心血管死を惹起する.
喜名美香, 坂梨まゆ子, 谷本昭英, 松崎俊博, 野口克彦, 仲宗根淳子, 下川宏明, 喜名振一郎, 砂川元, 大屋祐輔, 新崎章, 筒井正人.
第 46 回日本心脈管作動物質学会. 琉球大学医学部. 沖縄県西原町. 2017 年 2 月 10 日~11 日

Long-Term Dietary Nitrite and Nitrate Deficiency Causes Metabolic Syndrome in Mice.
Tsutsui M, Kina-Tanada M, Sakanashi M, Ishida M, Uchida T, Kubota H, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Shimokawa H, Ohya Y, Arasaki A.
American Heart Association, Scientific Sessions 2016. Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, USA. 2016 年 11 月 13 日

Pathogenetic Role of the Exogenous NO Production System in Metabolic Syndrome.
Tsutsui M, Kina-Tanada M, Sakanashi M, Otsuji Y, Shimokawa H, Arasaki A.
The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Symposium 8: NO and Metabolic Disorders, Sendai International Center, Sendai, Japan. 2016 年 5 月 21 日

Long-term dietary nitrite and nitrate

deficiency causes metabolic syndrome in mice.

Tsutsui M, Kina-Tanada M, Sakanashi M, Ishida M, Ohya Y, Shimokawa H, Arasaki A. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Sendai International Center, Sendai, Japan. 2016年5月20日

食事中の nitrite/nitrate の不足は代謝症候群を惹起する。

筒井正人、喜名美香、坂梨まゆ子、松崎俊博、野口克彦、要匡、新崎章。

第45回日本心脈管作動物質学会。阿波観光ホテル。徳島県徳島市。2016年2月6日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/safe-area/9526.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜名 美香 (KINA Mika)

琉球大学. 医学部附属病院. 医員

研究者番号: 80578914

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI Mayuko)

要 匡 (KANAME Tadashi)

松崎 俊博 (MATSUZAKI Toshihiro)

野口 克彦 (NOGUCHI Katsuhiko)

仲宗根 淳子 (NAKASONE Junko)

平良 雄司 (TAIRA Yuji)

新崎 章 (ARASAKI Akira)

筒井 正人 (TSUTSUI Masato)