

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00843

研究課題名(和文) 栄養制限(カロリー制限)における内因性ケトン体のドライアイ制御機構の解明

研究課題名(英文) Caroline restriction prevents lacrimal hypofunction in rat visual display terminal user model: a pivotal role of endogenous D-3-hydroxybutyrate

研究代表者

中村 滋(Nakamura, Shigeru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：00599269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：科学的に栄養制限(カロリー制限、CR)が、身体に数々のBenefitをもたらすことが明らかになりつつある。しかし、その作用機序は不明確である。CR時には、肝臓において脂肪酸からケトン体(3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、3HB)が大量に合成され代替エネルギー源として血流により全身に運搬される。ドライアイに対するCRの効果、3HBに着目し、ラットドライアイモデルを用いて検討した。その結果、CR群、3HB投与群ともに、ドライアイ状態における涙液分泌機能を維持し、CRのドライアイに対する有用性と、その作用に対し3HBが重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Despite calorie restriction (CR) being the oldest and most robust dietary intervention that provides various health benefits, the mechanism underlying this process is still under intensive investigation. D-3-hydroxybutyrate (3HB), a major circulating ketone body, has been proposed to associated with the benefits of CR. In the present study, we explored the possible role of 3HB on the tear secretion by rat dry eye model. Rats were assigned to three groups: AL, ad libitum-fed animals, and CR, intermittent fasting rats, AL+3-HB, 3HB diluted with saline was injected into rat dorsal skin at a dose of 2000 mg/kg/day. Change in tear secretion was significantly suppressed in the CR and AL+3HB compare to the AL. Significant suppression of ROS generation was observed in the CR and AL+3HB compared to that in the AL group. Our findings suggest that increased 3-HB play an important role of tear secretion which can be improved by CR in VDT associated dry eye.

研究分野：眼科学

キーワード：栄養制限 ドライアイ 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

日本では古来より、「腹八分目に医者いらず」といわれるようにお腹に少し余裕をもたせて食べることは身体のためによいという言い伝えがある。また、断食による detox 作用や、免疫賦活効果 (Wing EJ et al. Am J Med. 1983) があることは、知られている。科学的にも栄養制限が、身体に数々の Benefit をもたらすことが明らかになりつつある。

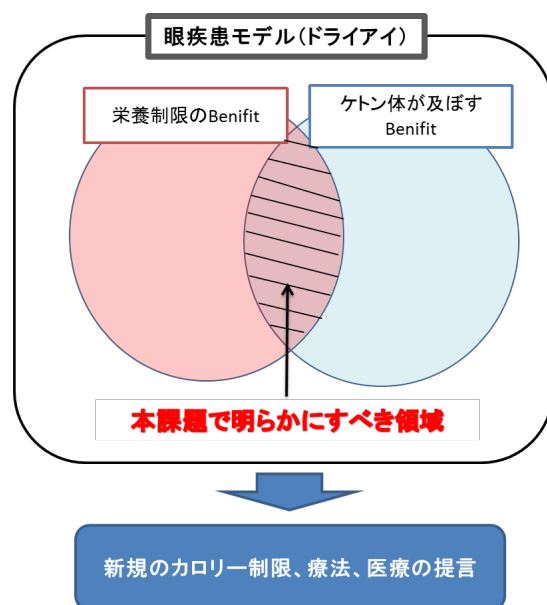
グルコース枯渇、絶食時には、肝臓において脂肪酸からケトン体 (3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、アセトン) が合成され代替エネルギー源として血流により全身に運搬される。近年、栄養制限時のケトン体の生成制御には、代謝と老化・寿命制御を司るファクターである Sirtuin、mTOR の活性変動が深く関与していることが明らかとなった (Matthew D. et al. Nature 2010, Shomit S et al. Nature 2011、Shimazu T et al. Cell Metabolism 2011)。さらに、3-ヒドロキシ酪酸は内因性の HDAC 阻害物質であり、絶食やカロリー制限による劇的な濃度増加で組織にエピジェネティックな変化 (ヒストンアセチル化の増加) を起こして、酸化ストレス耐性遺伝子 (Foxo3a など) の発現を増加させることにより、生体の酸化ストレス耐性をもたらすことが明らかになった (Shimazu T et al. Science 2013)。

一方、ケトン体、とりわけ 3-ヒドロキシ酪酸の薬理作用は多面的であり、グルコース枯渇時の代替エネルギー源に止まらず、出血性ショック、虚血などの外的ストレスにともなう組織障害の緩和 (Suzuki M et al. Jpn J Pharmacol. 2002)、パーキンソン病、アルツハイマー病等の加齢性の慢性神経変性疾患の進行予防に対する有効性も示唆されている (Kashiwaya et al. PNAS 2000, Kim et al. JCI 2003)。さらに、内因性のケトン生成を促進する、糖質制限食 (ケトン食) の摂取においても、神経変性疾患に対し、ケトン体の摂取と同様の効果が報告されている。

我々は、眼科領域の疾患において、ケトン体の眼局所投与がドライアイに伴う角膜上皮障害 (Nakamura et al. IOVS 2004, 2006) 既に報告している。

これら知見から鑑みて、ケトン体が栄養制限時における、数々の人体に対する有益な効果に深く関与している可能性は極めて高いと考えられる。そこで、栄養制限とケトン体の薬理作用を横断的に検討することにより、両者の直接的な結びつきを科学的に実証することにより、栄養制限-ケトン体の疾患制御機構が明らかになると考えた。

また、研究領域をケトン体、栄養制限に関する学術的知見が乏しく、近年の視覚情報化社会において QOL を著しく低下させうる眼疾患の一つであるドライアイ [涙の減少・変化によって、目の表面、角膜や結膜の障害が惹起される前眼部疾患] とした。眼表面の乾燥による眼不快感、痛みなどの症状だけでなく視力障害も惹起し (Kaido M et al. Cornea. 2007, Koh S et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006) 患者数は国内で推定 2400 万人] に特化して行うことにより、得られた知見が、直接的に医療に結びつくと考えた (下図)。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、栄養制限(CR)が、近年の視

覚情報化社会においてQOLを著しく低下させうる眼疾患の一つであるドライアイの発症予防、治療に対する栄養学的介入法として、有用であるか否かを、実験的に検討することである。

さらに、その作用機序の解明のため、ケトン体、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)に着目し行う。

### 3. 研究の方法

現代のオフィスワーカーの労働環境を模したストレス処置により、慢性的な涙液減少を惹起させる、ラットドライアイモデル(Nakamura et al. IOVS 2006, PLoS one 2010)を用い、CR 個体と正常状態において血中3HB濃度のみ上昇せしめた個体(3HBによるCR模倣)において、まず、両個体に相同した涙液分泌維持作用が得られることを確認した。

(1)ラットドライアイモデル：Sprague、Dawley系ラット(、8週齢)を低湿度(25±5%)、送風(2-4 m/s)下にて1日7.5時間プラスチックパイプ製ブランコに乗せるドライアイ処置を10日間連続で繰り返し行った(ドライアイ処置)。このドライアイ処置期間中、下記CR及び3HB投与によるCRの模倣を行った。

(2)3HB投与によるCRの模倣：ラット7W(雄性)を用いた。CR群は24時間おきに自由餌と絶食を繰り返す隔日絶食とし、正常状態において血中3HB濃度のみ上昇せしめた個体群(3HB投与によるCR模倣)としては餌の自由摂取下、3HB投与(2,000mg/kg/day, s.c.)を反復行った(3HB群)。期間は10日間とした。

### (3)評価項目

体重、摂取カロリー

血中、涙腺中3HB濃度測定

涙液量測定：涙液分泌量は綿糸を上眼瞼に挿入することにより行う。ドライアイ処置前に測定。

角膜上皮障害評価：角膜フルオレセイン

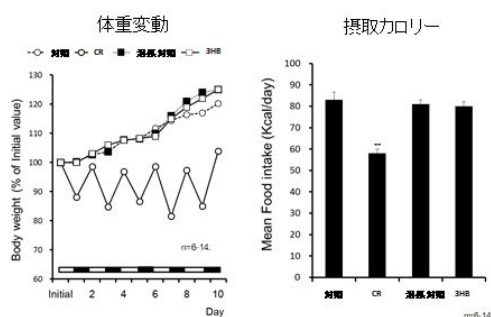
染色性を6段階で評価。

涙腺抗酸化ストレス：DCFDAによるROS産生量、Nrf2の核移行量

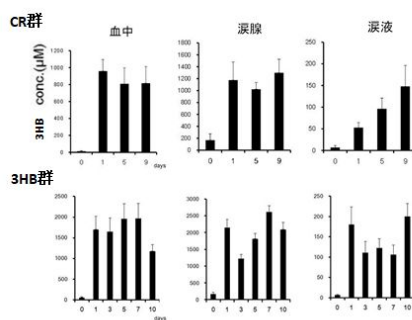
### 4. 研究成果

体重変動は、対照(自由摂餌、摂水)群では、直線的な体重増加は認められた。CR群では、体重の増減を繰り返した。3HB群では対照群と同等であった。

一日の平均カロリー摂取量は、3HB群において、有意に少なく、対照群の約60%であった(下図)。

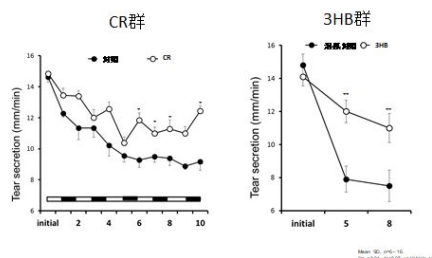


血中、涙腺中3HB濃度は、ドライアイ処置期間中、CR、3HB群ともに、同レベルの上昇を認めた(下図)。

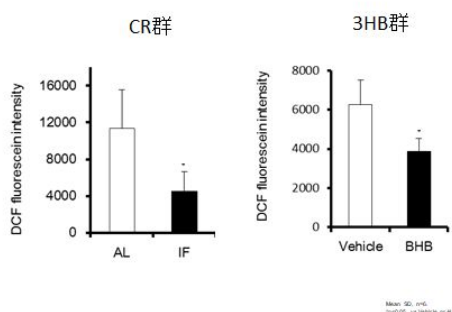


涙液分泌量は、対照群ではドライアイ処置1日より減少し、5日目以降、処置前の約50%で推移した。CR群では、ドライアイ処置による減少は抑制され、処置6日目以降、対照群に比較し、有意に維持された(下図)。

涙液分泌能の変化



3HB 群では、ドライアイ処置による溶媒対照群の減少に対し、有意に維持された。角膜上皮障害は、対照-溶媒対照群においては、処置前に対し、有意な障害スコアの上昇が認められたが、CR、3HB 群では変化はなかった。涙腺組織からの ROS 漏出量では、対照-溶媒対照群に比較し、CR、3HB 群は有意に抑制された(下図)。



涙腺組織において、Nrf2 の核移行量が、対照-溶媒対照群に比較し、CR、3HB 群は有意に増加した。

以上の結果より、CR はドライアイの進行予防への介入法として有用である可能性が示唆された。また、その作用機序としては、CR による、個体のエネルギーソースが糖質から脂質へ転換することに起因する、ケトン体、3HB の血中、及び涙液産生器官である涙腺組織中濃度上昇による抗酸化脳誘導が、涙液分泌機能の維持に寄与したものと推察する。

ラット虚血性網膜障害モデルにおいて、同様に CR 個体と正常状態において血中 3HB 濃度のみ上昇せしめた個体(3HB による CR 模倣)において比較したところ、両群とも諸障

害の進行が抑制された。さらにメタボローム解析により、網膜組織では、Nrf2 が関与する抗酸化誘導に寄与するペントースリン酸経路が維持されていた。さらに、両群にケトン利用に関わる酵素群の発現量上昇を確認し 3HB 代謝産物の 1 つである、Nrf2 誘導因であるフマル酸が有意に上昇した。よって、ドライアイモデルにおいても網膜と同様に、CR は、3HB の持続的な濃度上昇によるその利用亢進が Nrf2 誘導の促進、抗酸化能獲得を促し、分泌量の維持に寄与したものと推察する。

今回、モデル動物によって、3HB 投与が、CR と相同する作用(効果、メカニズム)を示したことから、CR に代わる、眼疾患制御を目的とした新規栄養学的介入法として、3HB 摂取が期待できる。その実用化には今後、ヒト介入試験も視野にいた、安全性検討はもとより、詳細な検討が引き続き必要であろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Yusuke Izuta, Toshihiro Imada, Ryuji Hisamura, Erina Oonishi, Shigeru Nakamura, Emi Inagaki, Masataka Ito, Tomoyoshi Soga, and Kazuo Tsubota. 「Ketone body 3-hydroxybutyrate mimics calorie restriction via Nrf2 activator fumarate in retina.」『Aging Cell』17(1), e126992018. 15 頁、査読あり

[学会発表](計 3 件)

1. Yusuke Izuta, Toshihiro Imada, Ryuji Hisamura, Shigeru Nakamura, and Kazuo Tsubota. 「Ketone body 3-hydroxybutyrate mimics calorie restriction via Nrf2 activator fumarate in retina.」『Keystone Symposia』, Yokohama, Japan, 2017
2. 泉田祐輔、今田敏博、久村隆二、中村滋、坪田一男「3-ヒドロキシ酪酸はカロリー制限を模倣し網膜保護作用を示す」『第 17 回 日本抗加齢医学会総会』東京 2017
3. 泉田祐輔、今田敏博、久村隆二、中村滋、

坪田一男「カロリー制限のラット急性緑  
内障モデルにおける網膜神経保護作用」  
『第16回 日本抗加齢医学会総会』神奈  
川 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕(計0件)  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

研究代表者

中村滋 (NAKAMURA, Shigeru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究  
員

研究者番号：00599269

### (2) 研究分担者

該当せず

### (3) 連携研究者

該当せず

### (4) 研究協力者

泉田祐輔 (IZUTA, Yusuke)