

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05522

研究課題名(和文)肥満由来の脳酸化亢進に伴うStg1発現上昇とトコトリエノールによる防御

研究課題名(英文) Obesity-related brain oxidation increases Stg1 expression, and prevention of it by tocotrienols

研究代表者

福井 浩二 (Fukui, Koji)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：80399807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンEの一種であるトコトリエノール(T3)の添加は、マウスの体重増加を有意に抑制した。投与後にモーリス水迷路・ロータロッド試験を行ったが、有意差はなかった。抗酸化酵素であるSOD、CAT、GPxは差がなく、過酸化脂質：4-HNEでは高脂肪食投与で有意ではないが脳内で増加傾向に、またT3の同時投与で減少傾向にあった。血清中のセクレトグラニン1(Stg1)の発現変動を、ELISA法とRT-qPCR法にて検討した。その結果、いずれにも高脂肪食添加で高くなった。本研究より、Stg1が肥満に伴う脳酸化のマーカーとなりえること、T3が抗肥満作用を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は社会問題化しており、二次的疾患も大きな問題となっている。医療費が増大する昨今、予防医学的側面からのアプローチは重要である。また、本研究で用いたトコトリエノール(T3s)は天然に存在する栄養素であることから、食事由来の摂取も容易である。それ故、抗肥満効果はT3sの新規機能であり、その学術的意義は大きい。また、血清中のStg1量が脳酸化のマーカーとなり得ることがわかった。脳酸化はアルツハイマー病などの脳神経変性疾患と深く関わることから、従来比で安価で簡便に早期に脳酸化の状態を把握できる可能性を秘めており、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Treatment with tocotrienols inhibited mouse body weight gain. After treatment, we performed the Morris water and the Rota Rod tests. However, there were no significant difference of all mice. There were no significant differences of SOD, CAT and GPx protein expressions. 4-HNE tended to increase in the obese mice and decreased in the T3-treated obese mice. Serum Stg1 expressions were measured by ELISA and rt-qPCR methods. The expressions tended to increase in the obese mice. These results indicate that Stg1 may be a marker of obese-related brain oxidation and T3s has anti-obesity effect.

研究分野：脳老化の酸化ストレス説に基づいた脳老化、関連疾患の機構解明とその予防に関する研究

キーワード：肥満 トコトリエノール 酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめ、肥満は先進国では大きな社会問題となっている。また、肥満は心疾患や糖尿病、高血圧など様々な二次的疾患を引き起こすリスクファクターとしても知られている。しかしその研究は、肥満モデルマウスの脂肪細胞や肝細胞、血液成分を材料としたものが多い。

近年、肥満とアルツハイマー病 (AD) に関する報告が散在する。しかし、肥満が脳神経細胞に及ぼす直接的な影響は不明点が多い。通常、AD 時には脳神経細胞が集団的に死滅し、肥満時には生体内で酸素代謝が亢進している。この両者には生体内(脳)酸化が強く関与している。逆に、カロリー制限食下で飼育したマウスやアカゲザルは、酸素代謝が低下、長寿遺伝子が活性化して寿命が延長することが知られている。

AD の病理的变化の一つは認識機能障害である。そこで、肥満が脳酸化を亢進して認識機能不全を誘引、つまり、AD 発症のリスクファクターとなるのではないかと、という点が本研究の問いである。

我々はこれまでの検討において、酸化ストレスと認識機能障害に関連して、過酸化水素を添加した培養神経細胞の MALDI-LC-TOF/TOF 解析より、セクレトグラニン 1 (Stg1) の発現増加を見出している。Stg1 は、酸性可溶性蛋白で海馬領内の神経細胞で強く発現しており、多発性硬化症の初期や AD マウスのアミロイド斑部で高濃度に発現との報告もあるが、疾病との関係や詳細な機能は不明である。

今後、肥満者数や肥満に由来する二次的疾患患者数は激増することは間違いない。その一方で、食事由来での摂取が可能な脂溶性ビタミンの 1 種であるトコトリエノール (T3) には強力な抗酸化・神経保護作用がある。そこで、肥満由来の脳酸化予防として食事由来の T3 摂取が、Stg1 の発現低下を介して、酸化障害に起因して起きるとされる認識機能の低下や AD 発症のリスク軽減にも寄与できれば、予防医学的見地からの学術的な意義は大きいと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、高脂肪食投与 (HFD) による肥満が、認識機能不全のリスクファクターとなること、またそのメカニズムとして肥満による脳酸化亢進を介した Stg1 量の増加が関与すること、その一方で、T3 添加は自身の持つ強力な抗酸化作用により脳酸化を防ぐことで、Stg1 の発現増加を抑制し最終的に認識機能が保持されること、これがつまり T3 による脳神経細胞への保護効果のメカニズムの一因であることを、を証明することである。

### 3. 研究の方法

動物実験は所属大学の実験動物委員会より承認を得たのちに実施した。9 月齢の C57BL/6 マウスに HFD (60kcal%, #D12492, EPS 益新株式会社, 東京) を 5 か月間投与し肥満モデル (HFD 群) とした。HFD に T3 を添加した群 (HFD + T3 群) (50mg/100g diet), 対照食群 (Control 群) (対照食: 7kcal%, #D12450J, EPS 益新株式会社) と対照食に T3 を添加した群 (Control + T3 群) の計 4 群で 15 匹ずつ 60 匹を実験に用いた。9 月齢マウスは入手不可ため、若齢マウスを飼育し 9 月齢に達した時点で研究に用いた。各群の摂餌量、体重、摂取カロリー、を週に 1 回測定した。実験動物数が多いため、時期をずらし数グループに分けて飼育を行った。

飼育期間終了後に行動試験として、ロータロッド試験により運動機能、オープンフィールド試験により不安行動、モーリス水迷路試験により認識機能を測定した。行動試験の解析は専用の解析ソフトウェア Any-maze (version 4.98; Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) にて行った。

行動実験終了後、直ちに解剖を行い、脳を摘出して大脳・小脳・海馬領に分け、-80 で一時保存した。この際、同時に血液も保存した。生化学的解析として Stg1 のタンパク質と遺伝子発現の変動を Western blot 法と RT-qPCR 法にて測定し、行動実験の結果との相関を解析した。脳内の過酸化脂質量 (チオバルビツール酸反応物質; TBARS, 4-ヒドロキシノネナール; 4-HNE), 抗酸化酵素 (Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), 神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Nerve growth factor (NGF)) 及びそれらの受容体 (Trk A, Trk B) を Western blot 法にて測定した。また、T3 量を High Performance Liquid chromatography Electro Chemical Detection (HPLC-ECD) 法にて測定した。

### 4. 研究成果

5 か月間の T3 の同時投与は、HFD 群で体重増加を有意に抑制した。しかし、この体重増加抑制作用は投与期間の前半のみで確認され、後半にその有意差は消滅した。一方、Ctrl + T3 群では、

投与期間の後半で有意な体重増加の抑制効果を確認した。この際、4群間に一日当たりの摂取カロリーに差は無かった。これらの結果から、日常の食事摂取でも T3 を日常的に摂取すれば、体重増加を抑制する効果のあることが分かった。

HFD の投与期間終了後に、行動試験を実施した。モーリス水迷路試験では、プラットホームまでの到達時間において 4群間で有意差は無かった。その一方で、ロータロッド試験においては、HFD + T3 群において滞在時間が HFD 群と比べ上昇する傾向にあった。

行動試験終了後に、肥満により脳内酸化が亢進しているかを検討する目的で、大脳皮質・小脳・海馬領における TBARS 量を測定した。その結果、いずれの群においても各部位で有意差は得られなかった。そのため、4-HNE を Western blot 法にて検討したところ、HFD 群で発現が増加し、T3 の添加で減少する傾向にあった。このことから、有意差は得られなかったが、肥満により脳酸化が亢進する可能性があることが分かった。次に脳内の各 T3 量を HPLC にて測定した。その結果、いずれの部位においても T3 添加の両群で、非添加群と比較し有意に -T3 と +T3 量が増加することが分かった。この結果は、これまでの T3 が血液脳関門を通過することが難しく、脳神経細胞に直接的に抗酸化作用を発揮しないという説を覆すこととなった。更に、T3 が抗酸化的に脳機能を保護するかを検討する目的で SOD・CAT・GPx の発現量を Western blot 法で検討したが、いずれも有意差は無かった。BDNF や NGF は脳神経細胞の活性化の指標となっており、T3 には脳神経保護作用が報告されているため、本研究においても両因子とそれぞれの受容体である Trk A、Trk B の発現を Western blot 法にて検討した。その結果、BDNF の発現は T3 を投与した両群で増加する傾向にあったが、有意差は無かった。次に解剖時に採取・分離しておいた血清を用いて、Stg1 の発現変動について、タンパク質発現量は本申請で購入した蛍光マイクロプレートリーダーを用いた ELISA 法にて、mRNA 量の発現量は RT-qPCR 法にて検討を行った。これまで Stg1 の ELISA 法は実施した経験がなかったため、標準品を購入して検量線を作成し、測定方法の立ち上げから行った。その結果、タンパク質・mRNA 量のいずれにも HFD で高くなる傾向にあったが、有意差を得るまでには至らなかった。特に RT-qPCR による Stg1 の遺伝子発現は個体差が大きく、群間での傾向を確実に捉えることができなかった。これ以外に、呼吸商測定装置を用いた検討からは、T3 添加によって呼吸商が上昇する傾向がみられたことから、T3 による抗肥満効果の一つには脂質代謝能の更新が関与している可能性が考えられた。

以上の結果より、HFD により脳酸化は上昇する傾向にあったが、血中 Stg1 量との正確な相乗関係を得るまでには至らなかった。その一方で、T3 が抗肥満効果を有することと、確実に脳まで到達していることが証明できた。今後も継続して検討を行い、Stg1 の機能解析と脳酸化のマーカーとしての可能性を追求する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yugo Kato, Koji Fukui
2. 発表標題 Anti-obesity and antioxidant effect of tocotrienols on long-term high-fat diet-treated mice
3. 学会等名 The 15th South East Asian Technical University Consortium Symposium (SEATUC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Fukui, Yugo Kato
2. 発表標題 Tocotrienols exert anti-obesity effect in high-fat diet-treated mice
3. 学会等名 The 15th South East Asian Technical University Consortium Symposium (SEATUC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yugo Kato, Koji Fukui
2. 発表標題 The research about antioxidant and anti-obesity effects of tocotrienols in high-fat diet-treated mice
3. 学会等名 20th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優吾, 福井浩二
2. 発表標題 トコトリエノールの肥満および脳酸化に対する効果について
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優吾, 白井将志, 宇佐美涼, 内海速水, 江口柚香子, 山川璃紗, 福井浩二
2. 発表標題 トコトリエノールの抗肥満作用及び脳への到達について
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優吾, 福井浩二
2. 発表標題 高脂肪食投与マウスにおけるトコトリエノールの体重増加抑制作用について
3. 学会等名 第74回 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優吾, 白井将志, 宇佐美涼, 内海速水, 福井浩二
2. 発表標題 体重の増減に着目したトコトリエノールの抗肥満作用についての検討
3. 学会等名 第31回 ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KATO Yugo, USAMI Ryo, UCHIUMI Hayami, BYEON Junhyeok, FUKUI Koji
2. 発表標題 Tocotrienols inhibit body weight gain in high-fat diet-treated mice
3. 学会等名 第44回 日本基礎老化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Fukui, Masashi Shirai, Takeyuki Ninuma, Yugo Kato
2. 発表標題 Anti-obesity effects of tocotrienols and rice bran in high-fat diet-treated mice: Does obesity accelerate brain oxidation?
3. 学会等名 The 49th Annual Meeting of the Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yugo Kato, Masashi Shirai, Koji Fukui
2. 発表標題 Tocotrienols prevents weight gain and brain oxidation in high-fat diet-treated mice
3. 学会等名 SFRBM 26th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優吾、白井将志、青木由典、小池泰介、福井浩二
2. 発表標題 異なるトコトリエノール摂取量における高脂肪食摂取マウスの脳内抗酸化防御機構の変動
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優吾、白井将志、福井浩二
2. 発表標題 トコトリエノールの体重増加抑制作用についての検討
3. 学会等名 第27回 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井浩二
2. 発表標題 マウスを使ったトコトリエノールによる抗肥満効果の検討
3. 学会等名 第364回 脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優吾、白井将志、福井浩二
2. 発表標題 高脂肪食摂取による血清鉄の減少とトコトリエノールによるその予防について
3. 学会等名 第43回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優吾、青木由典、小池泰介、福井浩二
2. 発表標題 トコトリエノールが長期高脂肪食摂取マウスの脳内抗酸化防御機構に与える影響について
3. 学会等名 第30回 ビタミンE研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本実奈枝、新沼健幸、沖廣俊介、上野山瑞波、渡邊洸史郎、加藤優吾、望月夏帆、津元裕樹、三浦ゆり、福井浩二
2. 発表標題 ビタミンE欠乏マウス脳内におけるSecretogranin-1の発現変動について
3. 学会等名 第30回 ビタミンE研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yugo Kato, Yoshinori Aoki, Taisuke Koike, Koji Fukui
2. 発表標題 The effects of tocotrienols on high-fat diet-treated mice brain oxidation and cognitive function
3. 学会等名 The 13th South East Acean Technical University Consortium Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yugo Kato, Masashi Shirai, Yoshinori Aoki, Taisuke Koike, Koji Fukui
2. 発表標題 The effects of tocotrienols on antioxidant defense system in high-fat diet-treated mice brains
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関