

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590052

研究課題名(和文) レドックス制御に基づくエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Redox regulation of metabolic processes and oxidative stress in high-fat diet-induced obese mice

研究代表者

大和 真由実 (Yamato, Mayumi)

九州大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：30380695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症は、エネルギー代謝恒常性が正方向に破綻した状態であり、糖尿病や動脈硬化性疾患発症のリスクファクターとなることが指摘されている。そのため、エネルギー代謝調節の研究は、肥満症のみならず、様々な生活習慣病の病態メカニズムを解明するためにも重要である。「NAD⁺/NADH」は、代謝過程において最も重要な酸化還元反応を担うレドックスペアであり、代謝反応における酵素の基質となるばかりでなく、重要な調節因子として機能する。そこで本研究では、ニトロキシラジカルであるTEMPOLを肥満モデル動物に適用し、酸化ストレスに対する効果とレドックス制御による代謝調節機構について明らかにすることとした。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a condition of well-developed adipose tissue, which causes functional abnormalities of energy metabolism. Continuous conversion of energy is controlled by reduction-oxidation (redox) processes. Oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺ and NADH) are an important redox couple for energy metabolism. The ratio of NAD⁺/NADH has been implicated in oxidative stress. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (tempol) is a redox-cycling nitroxyl radical that promotes the scavenging of several reactive oxygen species, and is reduced simultaneously to the hydroxylamine by NADH. Tempol is also involved in NAD⁺ production in the ascorbic acid-glutathione redox cycle. We utilized the chemical properties of tempol to clarify the effect of antioxidants and NAD⁺/NADH modulators on metabolic imbalance in obese mice. Increases in the NAD⁺/NADH ratio by tempol ameliorated metabolic imbalance in combination with dietary improvement.

研究分野：生物物理化学

キーワード：酸化ストレス 肥満 エネルギー代謝 レドックス制御

1. 研究開始当初の背景

肥満症は、エネルギー代謝恒常性が正方向に破綻した状態であり、糖尿病、虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患発症のリスクファクターとなることが指摘されている。そのため、エネルギー代謝調節の研究は、肥満症のみならず、それを基盤とした様々な生活習慣病の病態メカニズムを解明するためにも重要である。

「NAD⁺/NADH」は、代謝過程において最も重要な酸化還元反応を担うレドックスペアであり、代謝反応における酵素の基質となるばかりでなく、重要な調節因子として機能する。例えば、NAD⁺ 依存性アセチル化酵素である Sirt1 は、核・細胞質に局在し、糖新生、脂肪酸酸化、コレステロール制御など、複数の組織における代謝状態の制御に対し重要な役割を担っている。そのため、Sirt1 を過剰発現したマウスでは、瘦身、高耐糖能、コレステロール低値、インスリン低値などの表現型を示す (Bordone L et al. *Aging Cell*. 2007,6:759-67)。一方で、NAD⁺/NADH 比の低下、すなわち NADH が過剰になると、NAD(P)H オキシダーゼ由来のフリーラジカル生成や、ミトコンドリア障害を介した酸化ストレスが誘発される。

以上の事実から、「NAD⁺/NADH」は、肥満症におけるエネルギー代謝調節ならびに酸化ストレスの両方に重要な役割を担う分子であり、NAD⁺/NADH 比を自在に操ることができれば、肥満症治療に有用な情報を与えるものと予想される。しかしながら、NAD⁺/NADH 比を増加させる方法としては、カロリー制限 AMP キナーゼの活性化が知られているものの、低分子による直接的なレドックス制御については、ほとんど報告がない。そのため、代謝調節における重要性にも関わらず、NAD⁺/NADH 比の変化による生体への影響については、直接的な知見が得られていない。

近年、様々な疾患メカニズムに酸化ストレスの関与が示唆され、その評価法や治療法についての検討がなされている。その中でも、ニトロキシルラジカルは、酸化・還元の一対の反応に対し感受性が高いことから、①抗酸化剤、②生体内レドックス反応解析の為にスピンプローブ、③レドックスイメージングの造影剤など様々な生物学的研究に用いられてきた (Soule BP et al. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Review, 他多数)。その根拠となる化学的性質の一つとして、「フリーラジカルとの反応：抗酸化作用」が上げられる。米国 NIH/NCI の研究グループは、スーパーオキシドアニオンラジカルとニトロキシルラジカルの反応機構を明らかにし、SOD 類似化合物としての抗酸化作用を示している (Krishna MC et al. *PrNAS*. 1992.)。

我々も、ニトロキシルラジカルの一つである TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-

tetramethylpiperidinoxyl) と細胞傷害性を持つヒドロキシルラジカルとの反応機構を解明するとともに、HPLC を用いて反応生成物の同定を行った (論文 19)。その反応過程において、「NADH は NAD⁺ に酸化」される (図 2)。

このような背景のもと、申請者は、ニトロキシルラジカルの化学的性質、すなわちレドックス特性を肥満症における代謝研究に応用できないかと考え、本研究課題の申請に至った。本研究では、ニトロキシルラジカルである TEMPOL を肥満モデル動物に適応し、酸化ストレスに対する効果とレドックス制御による代謝調節機構について明らかにすることとした。これまでの報告や申請者が行ってきた研究から、TEMPOL による NADH 酸化機構については、フリーラジカル消去とリンクした経路、およびアスコルビン酸・グルタチオン redox cycle とリンクした 2 つの経路が考えられる。これらの反応を細胞あるいは肥満モデル動物を用いて解析することで、代謝調節機構におけるレドックス制御の有用性が明らかになると考えている。

2. 研究の目的

通常、生体内では、エネルギーの摂取臓器、貯蔵臓器、および消費臓器が密接に連携を取り合い、体重の恒常性を維持している。この中でも肝臓は、エネルギー代謝恒常性維持にきわめて重要な働きをもつ臓器である。そこで、本研究課題では、肝臓におけるレドックス変動に対する TEMPOL の影響について、主に肥満モデル動物を用い検討することとした。

1. 肥満モデル動物におけるレドックス：TEMPOL 摂取による抗肥満効果およびレドックス変動に対する影響について検討を行う。また、より詳細なコンセプト検証の為に、細胞系実験や反応性を制御したニトロキシルラジカルを用いた研究を実施する。
2. レドックス制御に基づく Sirt1 活性化機構、代謝改善効果：代謝調節に対するレドックス変動の影響について、Sirt1 タンパク質の働きを中心に解析を行う。

3. 研究の方法

エネルギー代謝の恒常性は、生体内の各組織が密接に連携し維持されている。そこで、本研究では、固体を用いた研究が重要であると考え、主に高脂肪食摂取肥満モデルマウスを用いて、TEMPOL によるレドックス制御機構を明らかにする。以下に要点を示す。

1. TEMPOL により NAD⁺/NADH 比が変化した際の抗肥満効果や Sirt1 タンパク質等の変動を解析する。

- NAD⁺/NADH による制御と栄養状態や酸化ストレスによる変化を切り分けて考察するために、餌の切り替えや他の抗酸化剤を併用した実験を行う。
- 詳細なレドックス制御機構を検証するため、培養細胞および反応性を制御したニトロキシルラジカルを用いた検討を行う。

【具体的な研究計画・方法】

- 肥満モデルマウスの作成：モデルの作成には、糖尿病・肥満研究用飼料（日本クレア株式会社製、HAD32）を用いる。肥満症治療は、食事療法の効果が認められない場合に薬物による介入が行われている。本研究では、その臨床状態を考慮し、肥満マウスを高脂肪食継続群および通常食による治療群に分け、TEMPOL 飲水の効果を検討する。この実験系により、異なる栄養状態でのレドックス制御についても解析可能であると考えている。また、抗酸化作用による抗肥満効果を明らかにするために、Tiron を用いた対照実験を行う。Tiron は、TEMPOL と同様フリーラジカルを消去するが、NAD⁺/NADH 比に影響を及ぼさないことから選択した。
- 肥満症の評価：体重変動、耐糖能、血漿中コレステロール値等により評価する。
- レドックス変動の機序解析：スーパーオキシドアニオンラジカルは dihydroethidium の蛍光測定により、脂質過酸化物は TBARS 法により評価する。NAD⁺/NADH 比は、酵素を用いた cycling 法により、アスコルビン酸やグルタチオンは、HPLC 法を用いて測定を行う。
- 代謝変動の評価：Sirt1 等タンパク質の変動については、ウエスタンブロッティングにより評価する。
- 培養細胞系での検討：ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 を用い、代謝調節機構におけるレドックス制御の役割について解析する。

4. 研究成果

(1) Tempol の反応機構

図1に、Tempol および NADH のレドックス反応を示す。ニトロキシルラジカルは、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) の活性酸素と反応し、オキソアンモニウム体となる。さらに NADH によって還元されることで、ヒドロキシルアミン体と変化する過程において、NADH 自身は、NAD⁺へと変化する。また、ニトロキシルラジカルは、アスコルビン酸により還元され、アスコルビン酸は、グルタチオンとカップルした系で再利用される。この反応でも、NADH は、NAD⁺と変化する。以上のことから、ニトロキシルラジカルは、活性酸素を消去しつつ、NADH を NAD⁺へと変換するため、NAD⁺/NADH 比向上をもたらすのではないかと

考えた。

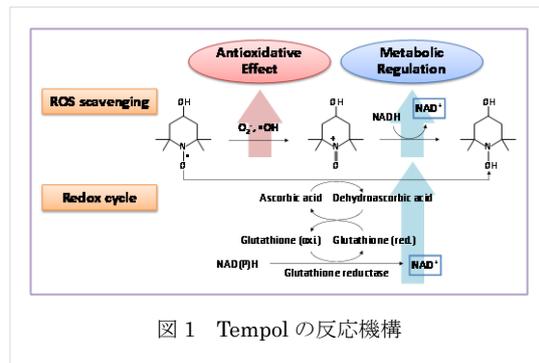


図1 Tempol の反応機構

図1に示す反応について *in vitro* にて確認を行った。キサンチン-キサンチンオキシターゼ系にて $O_2^{\cdot-}$ を発生させ、チトクローム C の還元反応及び NADH の酸化反応を吸光度法にて測定した。その結果、Tempol 濃度依存的に $O_2^{\cdot-}$ によるチトクローム C の還元反応が抑制され、同時に NADH の酸化が認められた (図 2a)。また、アスコルビン酸/グルタチオンサイクル下においては、NADH の酸化反応が認められた (図 2b)。以上のことから、*in vitro* において、Tempol が NAD⁺/NADH 比に影響を及ぼすことが示された。

(2) 細胞系における Tempol の効果

さらに、HePG2 細胞に、Tempol を添加したところ、濃度依存的に NAD⁺/NADH 比を上昇させた。一方で、BSO を用いて、細胞内に存在する GSH を枯渇させたところ、本反応は、キャンセルされたことから、アスコルビン酸/グルタチオンサイクルを介して、Tempol が NAD⁺/NADH 比を上昇させたことが示唆された (図 3)。

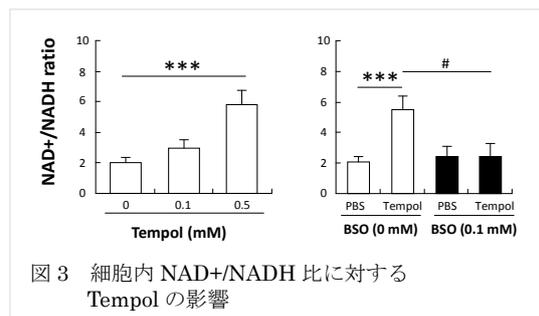


図3 細胞内 NAD⁺/NADH 比に対する Tempol の影響

(3) 肥満マウスに対する Tempol の効果

In vitro 実験及び細胞実験において認められた Tempol による NAD⁺/NADH 比に対する作用が *in vivo* においても認められるか否かについて、動物実験を行った。図4にその実験スケジュールを示す。現在、肥満症の治療としてまず食事療法が行われていることを踏まえ、本研究でも、その状況を考慮して、8週間高脂肪食を摂取させることで、肥満マウスを作成し、その後通常食に切り替えて治療を行うというスケジュールを立てた。通常食への切り替えとともに Tempol を飲水させ、

4週間飼育した。なお、Tempol 摂取による飲水料及び摂餌料への影響は認められなかった。

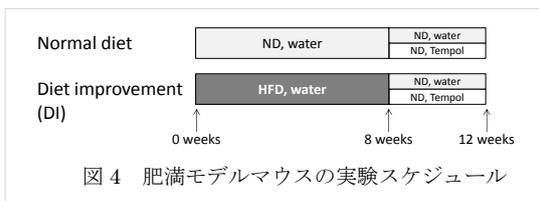
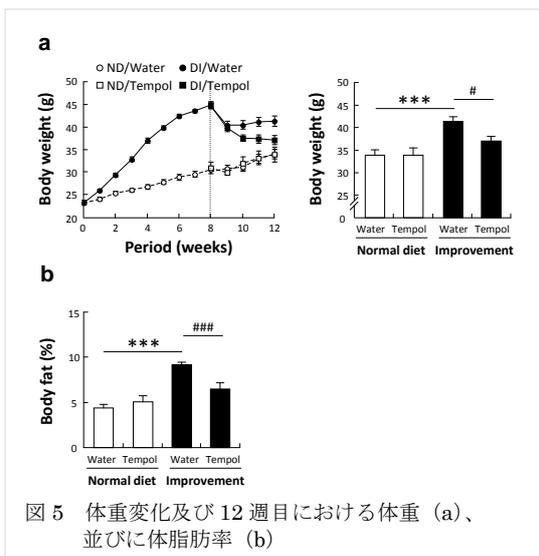
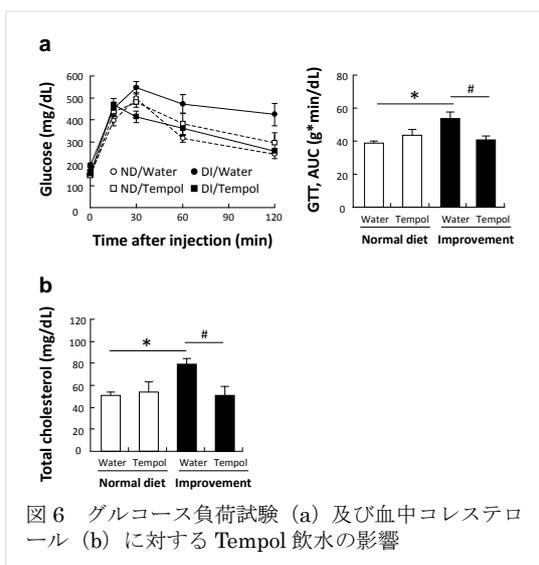


図5に体重(a)及び体脂肪率(b)について示す。通常食に切り替えた後、体重の減少が認められましたが、Tempol 飲水群では、水道水群よりも顕著に体重減少を示した。

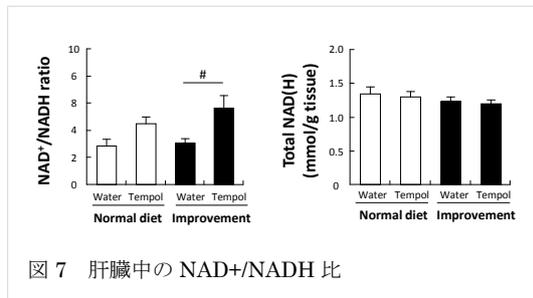


また、グルコース負荷試験、及び血中コレステロール値についても、Tempol 飲水群で明らかな改善が認められた(図6)。

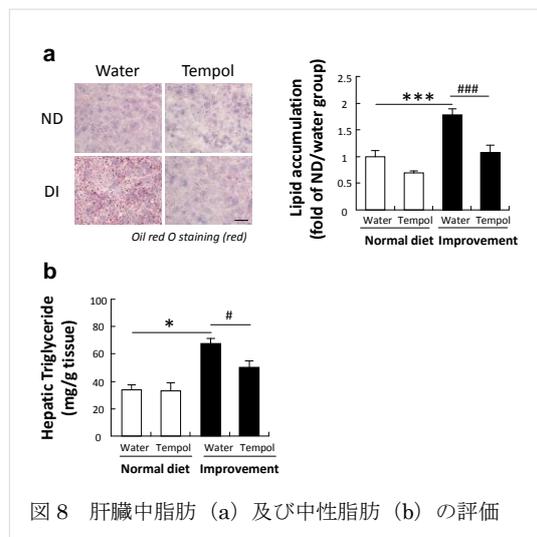


肥満マウスに対するTempolの改善効果が、

生体内のNAD⁺/NADH比変動の影響によるものか否かを明らかにするために、肝臓中のNAD⁺/NADH比の計測を行った。図7に示すように、Tempol 飲水群では、水道水群と比較して、肥満症治療群においては有意な比の上昇が認められた。一方で、NAD⁺/NADH総量は、群間で違いはなかった。



肝臓中脂肪蓄積をoil red o染色で評価したところ、通常食摂取群で有意に増加し、Tempol 飲水を併用した群で抑制が認められた。また、肝臓中の中性脂肪量も同様に、水道水飲水群と比較して、Tempol 飲水群で低下していた(図8)。NAD⁺/NADH比の上昇が肝臓中脂肪量の低下に寄与している可能性が示唆された。



肥満状態のマウスやヒトで活性酸素生成源であるNAD(P)H oxidaseが亢進している等の報告があり、Tempolに抗酸化作用があるため、酸化ストレスの評価を行った。O₂⁻と反応すると言われていたDHEを用いた蛍光染色、また脂質過酸化物の蓄積をTBARS法で行ったところ、血漿中にはモデル動物で酸化ストレスマーカーの上昇が認められ、Tempol 飲水でコントロールレベルまで抑制されたのに対し、肝臓においてはこれらの指標の変化は認められなかった(図9)。

以上のことから、本モデルにおいては肝臓では酸化ストレスが惹起されていないと考えられた。

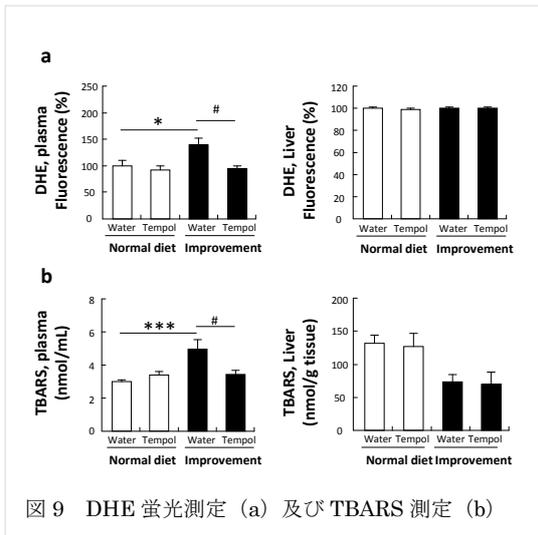


図9 DHE 蛍光測定 (a) 及び TBARS 測定 (b)

肥満マウスに対する Tempol の効果を他の抗酸化剤と比較することとした。O₂^{•-}の消去作用はあるが、NAD⁺/NADH 比には影響を及ぼさないタイロンを肥満マウスに摂取させたところ、体重や体脂肪率には影響を及ぼさないことが示された。したがって、本モデルにおいては、O₂^{•-}消去作用は、代謝改善作用とは関連しないことが明らかとなった。

近年、NAD⁺ 依存性アセチル化酵素である sirt1 や sirt3 は、糖新生、脂肪酸酸化、コレステロール制御など、複数の組織における代謝状態の制御に対し重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、Tempol 飲水によるこれらの酵素に対する影響を検討したところ、図 10 に示すように、sirt1 や sirt3 のタンパク量は Tempol 飲水の影響を受けなかった。

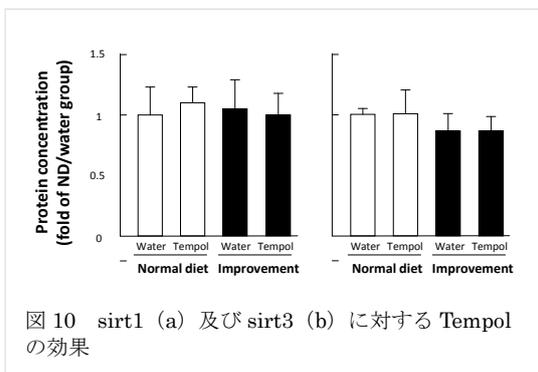


図 10 sirt1 (a) 及び sirt3 (b) に対する Tempol の効果

以上の結果から、Tempol は生体内のレドックスを化学的に調整することにより、抗肥満効果をもたらすことが明らかとなった。

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 2 件)

- ① Matsuoka Y, Yamato M, Yamasaki T, Mito F, Yamada K., Rapid and

convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch., *Free Radic Biol Med.* 2012 Dec 1;53(11):2112-8, 査読あり

- ② Yamato M, Ishimatsu A, Yamanaka Y, Mine T, Yamada K., Tempol intake improves inflammatory status in aged mice., *J Clin Biochem Nutr.* 2014 Jul;55(1):11-4. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会
- ② 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会 (奨励賞受賞)
- ③ 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会

[図書] (計 1 件)

- ① 大和真由実 (吉川敏一監修、内藤祐二・豊國伸哉編集)、(株) 診断と治療社 出版、酸化ストレスの医学、2014 年

[産業財産権] 特になし

[その他] 特になし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：大和 真由実
(YAMATO MAYUMI)

所属：九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点
研究者番号：30380695

- (2) 研究分担者：なし

- (3) 連携研究者：山田 健一
(YAMADA KENICHI)

所属：九州大学・薬学研究院
研究者番号：60346806