

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670017

研究課題名(和文)レドックス制御による肥満症改善効果

研究課題名(英文)Improvement of obesity by redox regulation

研究代表者

山田 健一 (Yamada, Ken-ichi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60346806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内でのエネルギー代謝は、酸化還元(レドックス)反応により制御されている。ここで、NAD⁺、NADHはこのエネルギー代謝を制御する重要なレドックス因子である。一方、Tempolは、活性酸素を消去しNADHをヒドロキシルアミン体に還元できる。さらにTempolは、アスコルビン酸-グルタチオン系によってもNAD⁺を生成できる。そこで我々は、このTempolの化学特性に着目し、肥満症マウスにおける代謝異常症の改善に関して検討を行った。その結果、Tempol投与によりNAD⁺/NADHは上昇し、代謝異常は改善された。以上の結果は、肥満症におけるレドックス制御という新しい概念を提案できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Continuous energy conversion is controlled by reduction and oxidation (redox) processes. NAD⁺ and NADH represent an important redox couple in energy metabolism. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) is a redox-cycling nitroxide that promotes the scavenging of several reactive oxygen species (ROS) and is reduced to hydroxylamine by NADH. TEMPOL is also involved in NAD⁺ production in the ascorbic acid and glutathione redox cycle. We utilized the chemical properties of TEMPOL to investigate the effects of antioxidants and NAD⁺/NADH modulators on the metabolic imbalance in obese mice. Increases in the NAD⁺/NADH ratio by TEMPOL ameliorated the metabolic imbalance. These findings provide novel insights into redox regulation in obesity.

研究分野：生物物理化学

キーワード：薬学 ストレス

1. 研究開始当初の背景

生体内の恒常性維持機構を理解し、変動を是正することは、生活習慣病の予防・治療法を提示するうえで重要な課題である。その中で、電子運搬体である NAD は、 NAD^+/NADH の比が厳密に制御され、数百種類にもおよぶ酵素活性を調節している。例えば、サーチュイン活性を調節し、糖新生や解糖系に関わる遺伝子発現を制御している。しかし肥満症モデルマウスでは、 NAD^+/NADH の比が還元側に傾き、多くの代謝酵素の発現が低下している。

一方で肥満マウスは、血管や脂肪組織で酸化ストレスが増大している。さらに、動脈硬化層は、酸化 LDL の蓄積が原因である。

以上の結果は、矛盾している。肥満症の肝臓では還元側に傾いており、一方血管系では酸化が亢進している。すなわち、肥満症が疾患を誘発しやすい原因は、生体内で“レドックス不均衡”が生じているからではないだろうか。換言すれば、肥満症の改善には、肝臓内 NAD^+/NADH 比を亢進（酸化反応）させ、血管内酸化ストレスを抑制（還元反応）しなければならない。そのためには、物理学的指標である酸化還元電位を導入し、うまく反応電位を合わせた化合物を用いることが必要である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これら不均衡の是正を目指し、「酸化・還元反応を制御できるツール化合物を用い、レドックス制御の観点から肥満症の原因メカニズム解析とその予防・治療法の提案」を目的とした。

3. 研究の方法

8週齢の C57BL 雄性マウスに食餌として高脂肪食を 8週間与え、肥満症モデルを作成した。その後、食餌介入群には 5週間にわたって通常食を与え、高脂肪食群は継続して高脂肪食を与えた。9週目以降ツール化合物として

Tempol を自由飲水させ、その効果を検討した。具体的には Oil Red O 染色による内臓脂肪蓄積、 NAD^+/NADH 比とその下流シグナルについて評価した。さらに、Tempol の薬理的コントロールとして、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 捕捉剤であり NADH を酸化しない Tiron を用いて検討を行った。また、 NADP^+ を NADPH へ還元する際に重要な酵素 NNT の影響も検討した。

4. 研究成果

今回、酸化還元反応を共に制御できる化合物として Tempol を用いて検討した。Tempol は、安定なフリーラジカルであり、スピンプローブ剤・スピントラップ剤として、また抗酸化剤として広く用いられている。その抗酸化効果は、ニトロキシド体が $\text{O}_2^{\cdot-}$ などの活性酸素と反応し、オキシアンモニウム体に酸化される。さらに、一電子酸化されたオキシアンモニウム体は NADH 存在下、ヒドロキシルアミン体に還元される。同時に、NADH は酸化され NAD^+ に変換される。また一方で、Tempol は、アスコルビン酸により還元される。その際に生じたデヒドロアスコルビン酸は、GSH、NADH などのレドックス経路により、アスコルビン酸に還元される。その際に、NADH は NAD^+ に酸化される。すなわち、Tempol は、酸化と還元の両反応を制御できると考えた。そこで、実際に、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 発生系に NADH と Tempol を添加したところ、Tempol の ESR シグナル強度が減少すると共に、NADH が酸化された。またアスコルビン酸を添加した場合も同様に NADH が酸化されることが分かった。そこで次に、高脂肪食摂取により肥満症モデルマウスを作成後食餌介入とともに Tempol を自由飲水させたところ、増加した体重は有意に減少した。さらに Tempol 投与群では、肝臓内での NAD^+/NADH 比、SIRT1 活性を亢進し、コレステロール量が減少した。

また血管内では、食餌介入のみでは酸化ストレス、グルコース負荷試験が依然亢進して

いたが、Tempol 投与により有意に減少した。一方、通常食+Tempol では、何ら影響を与えなかった。

次に、Tempol に対する薬理的コントロールとして $O_2^{\cdot -}$ 捕捉剤 Tiron を用いて評価した。食餌介入群のマウスに Tiron を自由飲水させたところ、Tempol とは異なり体重・体脂肪は変化しなかった。また、耐糖能異常や血中コレステロールも改善しなかった。しかし、血中酸化ストレスは抑制していた。以上より、Tempol は ROS の捕捉とそれに続く NADH 酸化によって代謝を促進したと考えられる。

一方、Tempol による NADH から NAD^+ への酸化反応を用いた代謝活性化は、Tempol と $O_2^{\cdot -}$ が反応し、生成したオキシアンモニウムカチオンが NADH を NAD^+ に酸化することがベースである。あるいは、Tempol がアスコルビン酸を酸化し、生成したデヒドロアスコルビン酸がさらに還元型グルタチオンを酸化し、酸化型グルタチオンを生成する。こうして生成した酸化型グルタチオンは、glutathione reductase (GR) によって還元型へと再生される。このとき、 $NAD(P)H$ が消費され $NAD(P)^+$ が生じる。GR による酸化型グルタチオンの還元反応は、補酵素として生体内において通常 $NADPH$ を必要とし、これらを電子供給源とすることで、還元型グルタチオンと $NADP^+$ を生成する。一方で、 $NADP^+$ を $NADPH$ へと再還元する酵素として nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) が存在する。NNT は、ROS を消去する還元型グルタチオンの再生の際に消費される $NADPH$ の再生を行う酸化還元酵素である。そこで、モデル動物に Tempol を投与することで、酸化型グルタチオンから GR と $NADPH$ によって還元型グルタチオンが再生し、NNT によって $NADH$ の水素が $NADP^+$ に転移し、 NAD^+ が増加しているのではないかと考えた。ここで C57BL/6 系統、C57BL/6J マウスに着目した。C57BL/6J (以下 6J) マウスは Nnt

遺伝子のエクソン 7-11 が欠失しており、これにより NNT が欠損している。一方、C57BL/6N (以下 6N) マウスにはこのような欠損は無く、正常な NNT が発現している。そこで、これまで用いた 6N マウスの代わりに 6J マウスを用いて、体重変化、 NAD^+ / $NADH$ 、エネルギー摂取・消費量を評価した。

その結果、NNT を遺伝的に欠損している 6J マウスでは、Tempol の抗肥満効果はなかった。またこのとき、 NAD^+ / $NADH$ は変化せず、コントロール群と同程度の脂肪組織量、肝臓中脂肪量であった。

加えて、本研究では、Tempol に代わる新たな化合物の開発を行い、新規物質として 5 種類合成した。さらにこれら化合物をもとに、酸化還元電位を指標としたスクリーニング系の構築も行った。

以上より、本研究から肥満症で生じている生体内レドックス不均衡を Tempol が是正すること、またその際には、2 通りの経路が存在し、 NAD^+ / $NADH$ 上昇作用には NNT が触媒する $NADPH$ によるグルタチオンの再還元が必要であることなどを新たに見出した。今後、さらに 6N、6J マウスを用いた比較検討を行うことで、肥満症時のレドックス不均衡の発症メカニズム解析を進める予定である。

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)

- Yamato M, Kawano K, Yamanaka Y, Saiga M, Yamada KI. TEMPOL increases NAD^+ and improves redox imbalance in obese mice. *Redox Biol.* 8:316-322, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.redox.2016.02.007

[学会発表] (計 4 件)

1. 山田健一、酸化ストレスと還元ストレス、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26～29 日、横浜
2. 進藤早紀、雑賀美紗子、河野君佳、山中佑記、大和真由実、山田健一、Tempol による細胞内 NAD⁺/NADH 比制御と下流因子の解析、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、2015 年 6 月 11～12 日、鹿児島
3. 石田悠馬、松岡悠太、山田健一、生体内レドックス不均衡の是正を目指した新規酸化還元物質の開発、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、2015 年 6 月 11～12 日、鹿児島
4. 雑賀美佐子、大和真由実、山中佑記、河野君佳、進藤早紀、山田健一、細胞内 NAD⁺/NADH 比制御を介した代謝活性化法の構築、大 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 6～7 日、福岡

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 健一 (YAMADA, Kenichi)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：60346806

研究者番号：

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：