様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０８６２１

研究課題名（和文）Nrf2による腸管からの脂肪吸収抑制機構の解明と肥満治療への応用に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Basic research to clarify the mechanism by which Nrf2 inhibits fat absorption and its application to obesity treatment

研究代表者
長田　直人（NAGATA, NAOTO）

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：７０４５６４０８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は転写因子Nrf2の活性化物質であるグルコラファニン（GR）がマウスにおいて腸管からの脂肪吸収を抑制する可能性を見出した。そこで、本研究課題では薬理学的Nrf2活性化が腸管における脂肪吸収に与える影響を検討した。GRおよびNrf2活性化薬であるバルドキソロンメチル（BARD）は、共に高脂肪食によって肥満したC57BL/6Jマウスの体重を減少させ、抗肥満効果を示した。経口オイル負荷試験により脂肪吸収を評価した結果、両薬物は脂肪の吸収を抑制したことから、Nrf2の活性化が腸管からの脂肪吸収を抑制に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
肥満の是正は、高血圧、脂質異常症、脂肪性肝疾患、2型糖尿病などの生活習慣病の改善という観点から、特に重要である。しかし、本邦で承認されている抗肥満薬は、そのリスクとベネフィットの観点から、日本人の肥満症患者のほとんどを占める軽度・中度の症例すべてに適応されるわけではない。したがって、現在も、安全性と有効性を兼ね備えた抗肥満薬が求められている。アブラナ科野菜に含まれるGRはもとより、BARDも既に他の疾患の治療薬として臨床で使われている薬物であり、安全性は高い。無論、さらなる検討を加える必要があるが、抗肥満薬として臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Previously, the applicant reported that glucoraphanin (GR), an activator of the transcription factor Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), acts on brown adipose tissue to increase energy expenditure through thermogenesis and suppress obesity in mice fed a high-fat diet (Nagata N et al., Diabetes, 2017). I further investigated how pharmacological activation of Nrf2 influences intestinal fat absorption. They found that both GR and bardoxolone methyl (BARD), another Nrf2 activator, showed anti-obesity effects by reducing body weight in mice made obese by a high-fat diet. Furthermore, an oral oil loading test revealed that both drugs suppressed fat absorption. This suggests that activating Nrf2 may play a role in inhibiting the absorption of fat from the intestines.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満　転写因子　脂肪吸収　エネルギー代謝

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

肥満は、近年世界的に急増している重大な健康課題であり、特に先進国においてはその蔓延が深刻な問題となっている。世界保健機関（WHO）は、肥満を「21 世紀の最大の公衆衛生上の課題の一つ」と位置づけており、生活習慣病の発症・進展に深く関与することが広く認識されている（WHO, 2021）。日本においても例外ではなく、国民健康・栄養調査においても成人の肥満者の割合は年々増加傾向にあり、その影響はすでに社会経済的にも大きな負担となっている。肥満に起因する主な合併症としては、高血圧、脂質異常症、脂肪性肝疾患（MAFLD/MASH）、2 型糖尿病などが挙げられ、これらはいずれも心血管疾患や脳血管疾患などの重大なアウトカムのリスク因子である。特に日本人においては、BMI が欧米人に比べて低値でも内臓脂肪の蓄積が顕著であり、代謝異常をきたしやすいことが知られている（Yoshiike N et al., Obes Rev, 2002）。このような背景から、肥満の是正は生活習慣病の一次・二次予防の観点から極めて重要な課題と位置付けられている。

肥満治療の基本は、まず食事療法や運動療法などの非薬物的介入であり、これらの生活習慣改善によって体重減少と代謝改善が期待される。しかし、非薬物的介入のみで十分な効果が得られない例も多く、現実には外科療法や薬物療法の導入が検討されることも少なくない。しかし、日本国内で承認されている抗肥満薬は限定的であり、具体的には従来薬のマジンドールと、近年保険適用となった GLP-1 受容体作動薬（リラグルチド、セマグルチド）のみである。GLP-1 受容体作動薬はマジンドールと比較して優れた安全性と体重減少効果を有しているが、全ての肥満症例に適応があるわけではない。特に、日本人の肥満症患者の大多数は BMI 25〜35 の範囲にあり、適応とならない患者も多い。また、GLP-1 受容体作動薬は、過度な食欲低下、悪心、便秘などの副作用がしばしば問題となり、長期的な使用の継続が困難な例も報告されている（Astrup A et al., Lancet, 2009）。したがって、軽度・中程度肥満者に対して広く安全かつ有効な薬物療法の開発と導入が依然として求められている。

以前、申請者らは、アブラナ科野菜、特にブロッコリーに多く含まれるグルコラファニン（Glucoraphanin, GR）が、転写因子 Nrf2（Nuclear factor erythroid 2-related factor 2）の活性化を介して、褐色脂肪細胞に作用することを明らかにした（Nagata N et al., Diabetes, 2017）。この研究では、GR 投与により白色脂肪組織における脱共役タンパク質 1（UCP1）の発現が亢進し、それに伴って熱産生が促進されることで、エネルギー消費が増加し、高脂肪食負荷マウスにおける体重増加および脂肪蓄積の抑制が確認された。これにより、Nrf2 経路の活性化がエネルギー代謝の亢進を通じて抗肥満効果を発揮することが示唆された。しかしながら、その後の解析により、熱産生の増加のみでは GR による抗肥満作用の全体を十分に説明できないことが明らかとなってきた。すなわち、GR 投与によって誘導される体重抑制効果が、熱産生の変化の程度に比して著しいことが観察され、他の代謝経路や臓器における作用機序の存在が示唆された。

２．研究の目的

本研究では、Nrf2 の薬理学的活性化が腸管における脂肪吸収に及ぼす影響を詳細に検討することを主たる目的とする。具体的には、Nrf2 活性化作用を有する GR およびバルドキソロンメチル（Bardoxolone methyl, BARD）の 2 つの薬物を用いて、マウスにおける小腸脂質吸収の変化を評価する。GR は天然由来の Nrf2 活性化物質であり、比較的マイルドかつ食事レベルで摂取可能な特性を持つ。一方、BARD は Nrf2 経路の強力な活性化作用を有する薬剤であり、国内では多発性硬化症に対する治療薬として承認・使用されている。その臨床応用の実績は、Nrf2 活性化薬の薬理的安全性や効果の可能性を支持するものであり、消化管局所への応用の可能性を検討する意義は大きい。

３．研究の方法

本研究では、Nrf2 の薬理学的活性化が腸管における脂肪吸収に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、以下の方法により検討を行った。

(1) 実験動物および薬剤投与

長期投与

6 週齢雄性 C57BL/6J マウス（エスアールエル株式会社）に通常食（10%脂肪）、または 60%高脂肪食（Research diet D12492, HFD）を 8 週間与えて、肥満モデルを作製した。これらのマウスに対し、Nrf2 活性化薬であるグルコラファニン（GR）を経口投与し、薬物の抗肥満効果および脂肪吸収に及ぼす影響を検討した（図 1a）。投与量は GR 300 ㎎/kg/day とした。体重変化、糖脂質指標、脂肪吸収能への影響を包括的に評価した。

短期投与

6 週齢雄性 C57BL/6J マウスに 60% HFD を与えて肥満を誘導する際に、Nrf2 活性化薬であるバル

ドキソロンメチル（BARD）を経口投与し、薬物の抗肥満効果および脂肪吸収に及ぼす影響を検討した。薬物投与は1日1回、3日間行い、投与量はBARD 3 mg/kg/dayとした。いずれの薬剤も経口投与で実施し、体重変化や血中脂質指標、脂肪吸収能への影響を包括的に評価した。

(2) 脂肪吸収能の評価
脂肪吸収の機能的評価には経口コーンオイル負荷試験（Oral Lipid Tolerance Test, OLTT）を用いた。試験の前にはマウスを6時間絶食させた後、10 μL/g体重のコーンオイルを胃ゾンデで強制経口投与した。脂肪負荷後は、0時間から4時間まで1時間ごとに尾静脈よりヘパリン採血を行い、得られた血漿試料中の中性脂肪濃度をトリグリセリドテストワコー（富士フィルム和光純薬）により比色定量法で測定した。これにより、時間経過に伴う脂肪吸収の動態を評価した。

(3) 遺伝子発現解析
GRおよびBARD投与後の腸管上皮細胞において、脂質代謝に関与する遺伝子発現の変動を網羅的に解析するため、定量PCR（qPCR）およびトランスクリプトーム解析（Bulk RNA-seq）を実施した。解析対象には、脂肪酸輸送体（CD36、FATP4、NPC1L1 など）、キロミクロン形成関連遺伝子に加えて、脂肪合成関連遺伝子（Fasn、Srebp-1c、Acaca、DGAT など）を含めた。これにより、Nrf2 活性化による腸管における脂質代謝の制御機構を明らかにすることを目指した。これらの分子生物学的評価により、Nrf2 経路が腸管上皮細胞において脂肪酸輸送、脂肪酸合成、ならびにトリグリセリド再合成に及ぼす影響を包括的に検証した。

４．研究成果
(1)長期投与モデルの結果
HFDにGR(HFD-GR)を添加しても体重の増加には変化が見られず、HFD単独群(HFD)と比較して有意な差は認められなかった（図1b）。一方、食餌を低脂肪のNCに切り替えることで体重は有意に減少したが、この体重減少効果にGRの添加（NC-GR）がさらに寄与することはなかった。血糖値および血漿インスリン濃度も、HFD群とHFD+GR群の間に有意差はなく、GRの添加による糖代謝改善効果は確認されなかった（図 1c）。経口糖負荷試験（図 1d）およびインスリン負荷試験（図1e）においても、GRの影響は見られなかった。

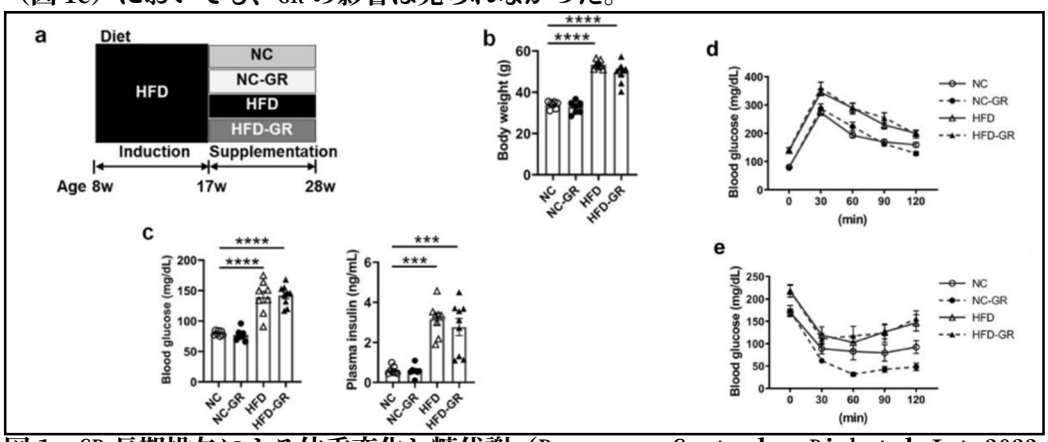

図1．GR長期投与による体重変化と糖代謝（Promsuwan S et al., Diabetol Int 2023を改変）

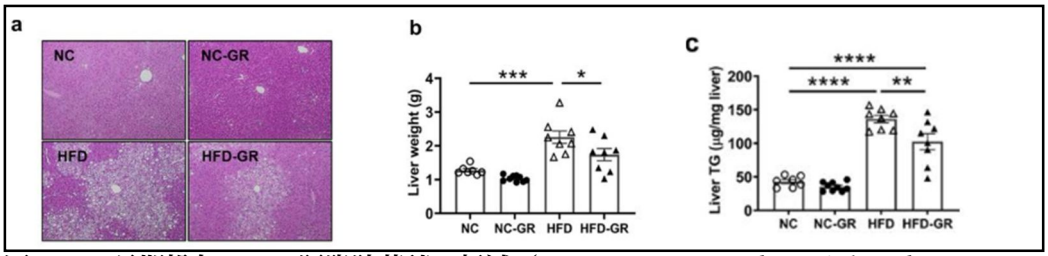

図2．GR長期投与による肝脂肪蓄積の軽減（Promsuwan S et al., Diabetol Int 2023を改変）

一方、肝臓組織像を評価したところ、HFDでは脂肪肝を呈していたが、GRの投与によって脂肪蓄積が軽減していた（図2a）。また、HFD+GR群では肝重量および肝中性脂肪量も有意に低下しており（図2b, c）、GRの投与が肝臓の脂質蓄積に抑制的に作用したことが示唆された。これらの結果から、GRによるNrf2活性化は、体重や血糖に対する影響は乏しいものの、肝臓における脂質蓄積を軽減し、脂肪肝を改善しうる効果を持つ可能性が示された。

(2)短期投与モデルの結果
しかしながら、抗肥満効果という観点からは、GRによるNrf2活性化では不十分である可能性が考えられた。そこで本研究では、より強力なNrf2活性化作用を有し、すでに臨床使用実績のあるBARDに着目した。肥満化したマウスに対し、バルドキソロンメチル（BARD）またはVehicle

を 3 日間経口投与し、体重変化および脂質吸収動態に与える影響を検討した。その結果、投与前後の体重変化を比較すると、Vehicle 投与群では体重に有意な変化が見られなかったのに対し、BARD 投与群では有意な体重減少が確認された。なお、両群間において摂食量には差が認められず、体重減少は摂取エネルギーの差によるものではないことが示された。さらに、脂肪吸収能を評価するために実施した経口オイル負荷試験（OLTT）では、オイル投与 2 時間後にピークとなる血中中性脂肪濃度が BARD 投与群において有意に低下しており、Nrf2 活性化によって腸管からの脂肪吸収が抑制されている可能性が示された。

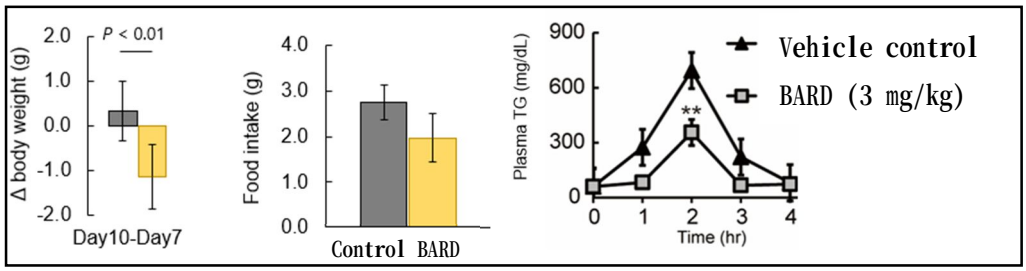

図 3.BARD 投与による体重・摂食量・OLTT への影響

(3) 遺伝子発現解析の結果

マウスの小腸全体（約 30 cm）を幽門部から盲腸にかけて摘出し、3 cm ごとに切断して 10 個のフラグメントを作製した。各フラグメントにおける遺伝子発現を解析した結果、既報と同様に、第 2～第 4 フラグメント（十二指腸に相当する胃側部）では、脂肪吸収および中性脂肪合成に関連する遺伝子の発現が他の部位に比して有意に高値であることが確認された。また、Nrf2 遺伝子（Nfe2l2）の発現は、小腸全体を通じて認められたが、特に第 2～第 4 フラグメントにおいて相対的に高く、脂肪吸収の盛んな部位において Nrf2 が局所的に活性化されている可能性が示唆された。さらに現在、これらの小腸フラグメントを用いて RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を進めており、脂肪代謝や Nrf2 関連経路の部位特異的な制御メカニズムの全体像を明らかにすることを目指している。

＜得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望＞

Nrf2 はこれまで主に酸化ストレス応答に関与する因子として研究されてきたが、近年では代謝調節にも関与することが明らかとなりつつあり（Yamamoto M et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2018）、その腸管機能における役割解明は、新たな抗肥満治療法の確立に向けた基礎的知見として期待される。今後は、Nrf2 活性化薬の腸管における直接的な作用を明らかにするため、腸管上皮細胞特異的 Nrf2 欠損マウス（Villin1-Cre::Nfe2l2$^{flox/flox}$）と対照群に対して薬剤投与および OLTT を実施し、抗肥満効果および脂質吸収抑制効果が Nrf2 依存的に減弱するかどうかを検証する予定である。転写因子 Nrf2 は、これまで主に酸化ストレス応答や解毒系遺伝子群の制御因子として広く研究されてきたが、近年ではエネルギー代謝、脂質代謝、炎症制御といった広範な生理機能に関与することが次第に明らかとなってきている（Yamamoto M et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2018）。本研究では、Nrf2 活性化が腸管において脂肪吸収抑制に寄与する可能性を in vivo および in vitro で示唆する知見が得られており、これまで十分に解明されてこなかった腸管局所における Nrf2 の機能に光を当てた。本研究で示された「Nrf2 活性化が摂食量を大きく変化させずに脂肪吸収を抑制し、体重減少をもたらす可能性」は、現在の抗肥満薬が抱える適応制限の克服につながる可能性がある。今後は、Nrf2 活性化薬の腸管における直接的な作用を明らかにするため、腸管上皮細胞特異的 Nrf2 欠損マウス（Villin1-Cre::Nfe2l2$^{flox/flox}$）を用い、と対照群に対して薬剤投与および OLTT を実施し、抗肥満効果および脂質吸収抑制効果が Nrf2 依存的に減弱するかどうかを検証する予定である。さらに、得られた成果をもとに RNA-seq など網羅的解析を発展させ、Nrf2 が制御する脂質代謝関連遺伝子群やシグナル経路の同定を進めることで、抗肥満薬の開発に向けた分子基盤の確立を目指す。

＜引用文献＞

Yoshiike N et al., Obes Rev 2002;3:183-90.
Astrup A et al., Lancet 2009;374:1606-16.
Nagata N et al., Diabetes 2017;66:1222-1236.
Yamamoto M et al., Physiol Rev 2018;98:1169-1203.
Promsuwan S et al., Diabetol Int 2023;15:86-98.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Promsuwan Suratsawadee、Sawamoto Kazuki、Xu Liang、Nagashimada Mayumi、Nagata Naoto、Takiyama Yumi	４．巻 15
２．論文標題 A natural Nrf2 activator glucoraphanin improves hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese male mice associated with AMPK activation	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Diabetology International	６．最初と最後の頁 86～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-023-00658-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Naoto NAGATA
２．発表標題 新時代の肥満症治療薬
３．学会等名 APPW2025（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2025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