

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08506

研究課題名（和文）酸化ストレス応答転写因子Nrf2によるエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）Nrf2 Regulates Energy Metabolism in Mice

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに得られた研究成果は、

- 1) Nrf2活性化物質であるグルコラファニンを経口摂取したマウスは非摂取対照マウスに比して、直腸温が0.5℃高く、個体レベルの酸素消費量とエネルギー消費量が増加しており、熱産生の亢進が示唆された。
- 2) Keap1野生型マウスとKeap1flox/floxマウスをサーモニュートラル（30℃）の条件下において、高脂肪食を与えると、Keap1flox/floxマウスは対照野生型マウスに比して体重の増加が有意に少なく、肥満形成が抑制された。この結果はKeap1flox/floxマウスは褐色脂肪組織における熱産生が増加していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗肥満薬は、食欲抑制や消化管の脂肪吸収阻害等、エネルギー摂取を低下させる作用が主であり、抑うつや下痢等の副作用が少なくない。ゆえに現在、エネルギー消費を増大させ、肥満を抑制する新たな薬物や機能性食品因子が求められている。本研究によって、Nrf2活性化が褐色脂肪細胞のエネルギー消費を高める可能性が示されたことから、Nrf2活性化物質が肥満の予防・治療に応用できる可能性が生まれる。特に、食物由来のグルコラファニンは安全性が高く、経口摂取によるNrf2活性化と抗酸化作用による細胞保護効果も期待できるため、特色のある創薬シードになり得る。

研究成果の概要（英文）：Main findings of this study are 1) A natural Nrf2 activator, glucoraphanin, increased core body temperature, oxygen consumption, and energy expenditure mice, suggesting increased thermogenesis. 2) In addition, compared with wild-type mice, Keap1 knockdown mice (Keap1F/F) showed less weight gain when the mice fed a high-fat diet under thermoneutral conditions, suggesting increased thermogenesis in brown adipose tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：エネルギー代謝 熱産生 褐色脂肪細胞 肥満

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

既存の抗肥満薬は、食欲抑制や消化管の脂肪吸収阻害等、エネルギー摂取を低下させる作用が主であり、抑うつや下痢等の副作用が少なくない。ゆえに現在、エネルギー消費を増大させ、肥満を抑制する新たな薬物や機能性食品因子が求められている。

最近、申請者らは、肥満症の改善を目的とした食品因子のスクリーニングから、ブロッコリーや大根等のアブラナ科野菜に含まれるグルコラファニン (GR) が摂餌量や運動量を変えることなく肥満モデルマウスの体重増加を抑制し、インスリン抵抗性と耐糖能異常を改善することを報告した (Nagata N et al., Diabetes 2017, PMID:28209760)。

その作用機序として、GR がミトコンドリアに局在し、熱産生を担う Ucp1 を誘導することを見出した。GR は生体内で転写因子 Nrf2 を活性化し、多くの抗酸化遺伝子を誘導することが知られている。我々の検討においても、Nrf2 欠損マウスでは、GR による抗肥満・抗糖尿病効果、エネルギー消費の亢進、および Ucp1 発現の誘導が消失しており、またエネルギー消費量も野生型マウスと比較して少なかった。これらの知見は、GR による Nrf2 活性化が Ucp1 による熱産生を亢進させ、エネルギー消費を増大させている可能性を示す。しかし、エネルギー代謝における Nrf2 の役割は十分に明らかにされていなかった。

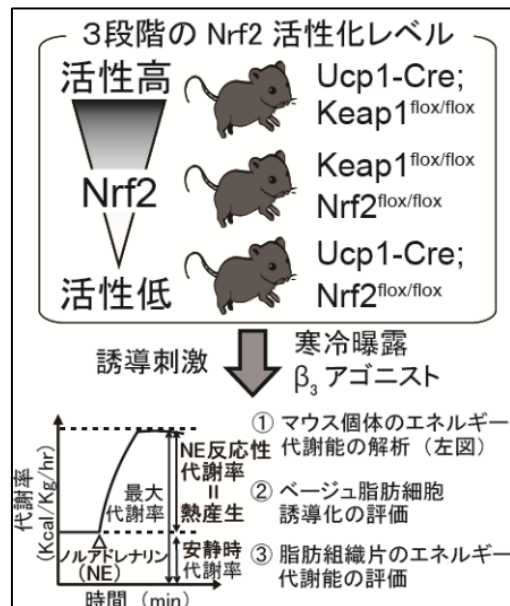
### 2. 研究の目的

本研究は、未だ明らかでないエネルギー代謝における Nrf2 の役割を UCP1 を特異的に発現する細胞である褐色脂肪細胞に着目して解明することを目的とした。近年、肥満症の改善を目的として、ベージュ脂肪細胞の数と熱産生能を高めるアドレナリン  $\beta$ 3 受容体アゴニストが試されているが、頻脈等の副作用のために実用化されていない (Cell Metabolism 2015;21:33-8 等)。本研究によって、Nrf2 活性化がベージュ脂肪細胞のエネルギー消費を高めることを明らかに出来れば、Nrf2 活性化物質が肥満の予防・治療に応用できる可能性が生まれると考えた。

### 3. 研究の方法

酸化ストレス非存在下において、Nrf2 には Cullin3 型ユビキチンリガーゼ—Keap1 複合体が結合し、常にプロテアソームで分解されるため、転写因子としての機能は抑制されている。一方、Keap1 の機能欠損状態では Nrf2 が恒常的に安定化され転写因子として機能する。本研究では、Ucp1 陽性細胞特異的 Nrf2 欠損マウス (Ucp1-Cre;Nrf2<sup>fllox/fllox</sup>; Nrf2 の機能欠損モデル)、同 Keap1 欠損マウス (Ucp1-Cre;Keap1<sup>fllox/fllox</sup>; Nrf2 の機能亢進モデル)、及びこれらの対照マウス (Nrf2<sup>fllox/fllox</sup>, Keap1<sup>fllox/fllox</sup>;通常の Nrf2 機能) がもつ3つの Nrf2 活性化レベルが、マウス個体の熱産生能とエネルギー消費量に与える影響を検討した。

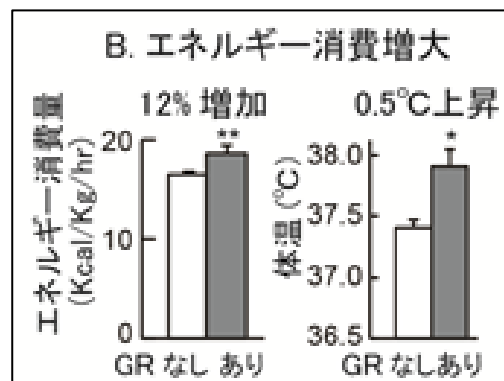
具体的には、メドトミジン・ミダゾラム・ブトルフェール麻酔下のマウスを間接熱量計 (Columbus 社 Oxymax) に入れ、ノルアドレナリン (1 mg/kg, 皮下注) 投与前後の O<sub>2</sub> 消費量と CO<sub>2</sub> 産生量をモニターし、安静時代謝率 (投与前 20 分間の平均値) と最大代謝率 (投与後 80 分間の最大値) を測定した。ノルアドレナリン反応性代謝率 (熱産生によるエネルギー消費に相当する。最大代謝率と安静時代謝率の差) を算出した (右図)。また、別のマウスをもちいて、褐色脂肪組織下に極小温度センサーを固定し、交感神経伝達物質であるノルアドレナリンを投与した後、連続的に褐色脂肪組織の温度 (熱産生) をモニタリングした。



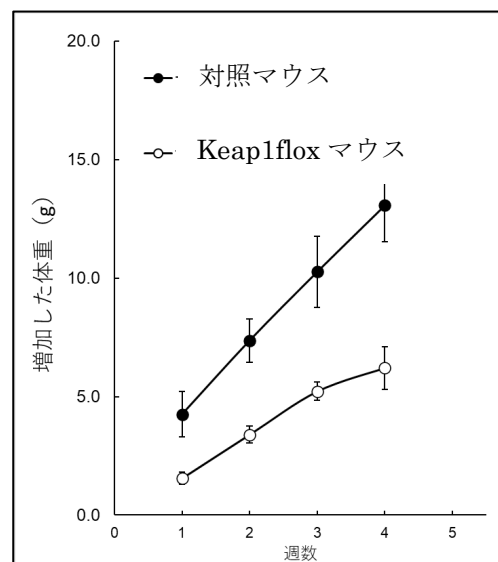
#### 4. 研究成果

これまでに得られた主な研究成果は以下の (1) ~ (3) である。

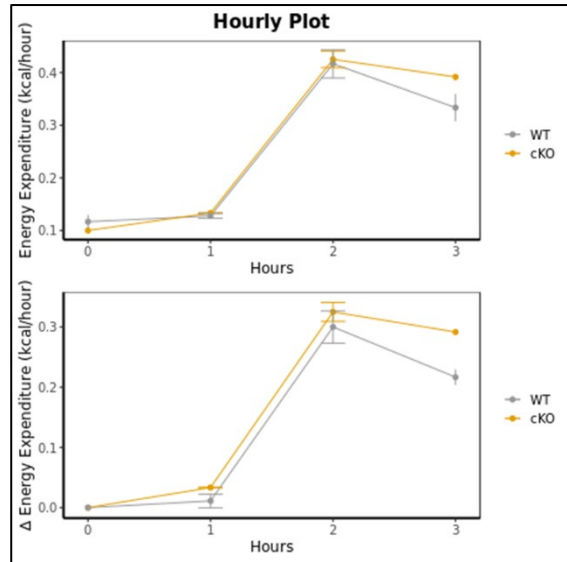
(1) Nrf2 活性化物質である GR を 4 週間摂取した C57BL/6J マウスは非摂取対照マウスに比して、直腸温が 0.5°C 高く、個体レベルの酸素消費量とエネルギー消費量が約 10% 増加していた。このことは、GR の摂取によって熱産生が亢進している可能性を示唆している。体重減少には約 5% エネルギー消費量の増加が必要とされており、GR 接種によって 10% 近いエネルギー消費量の増加を持続的に誘導することが出来るならば、有力な減量手段となり得ると考える。



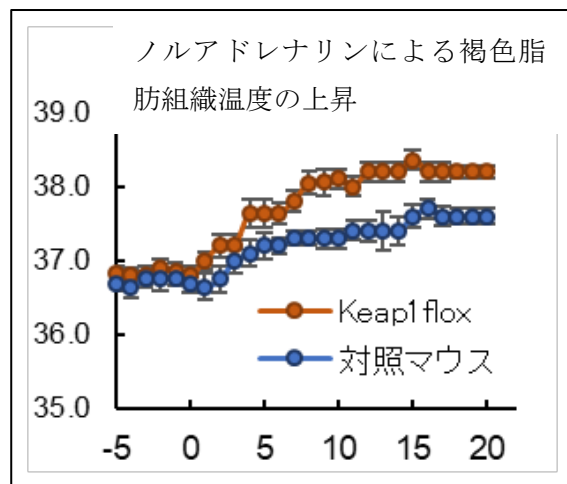
(2) Keap1 野生型マウスと Keap1<sup>flox/flox</sup> マウス (Nrf2 が恒常的に活性化しているマウス) を筋肉による、ふるえ熱産生が見られなくなるサーモニュートラル (30°C) の条件下において、高脂肪食を与えると、Keap1<sup>flox/flox</sup> マウスは対照野生型マウスに比して体重の増加が有意に少なく、肥満形成が抑制された (右図)。この結果は、Nrf2 が恒常的に活性化している Keap1<sup>flox/flox</sup> マウスでは褐色脂肪組織における熱産生が増加していることを示唆している。



次に、間接熱量計を用いて、マウス個体レベルのノルアドレナリン反応性代謝率を測定したところ、Keap1<sup>flox/flox</sup> マウス（右図、黄線）は対照野生型マウス（黒線）に比して高い代謝率を示す傾向にあった。この結果は、上記のKeap1<sup>flox/flox</sup> マウスの体重増加抑制の結果を支持するものである。今後さらに動物数を増やして検討していく必要がある。



(3) 全身麻酔下にて野生型マウスとKeap1<sup>flox/flox</sup> マウスの褐色脂肪組織下に極小温度センサーを固定し、交感神経伝達物質であるノルアドレナリンを投与して連続的に褐色脂肪組織の熱産生をモニタリングした。Keap1<sup>flox/flox</sup> マウスは野生型対照マウスに比してノルアドレナリン投与による温度上昇が増大していた。この結果は Nrf2 活性化が褐色脂肪組織におけるノルアドレナリン応答性（交感神経興奮）熱産生を増大させることを示唆



している（右図）。今後は Nrf2 ノックアウトマウスにおいても上記と同様の検討を加えると共に、Nrf2 が標的とする（発現を制御する）細胞分化、および熱産生関連遺伝子を明らかにするため、初代培養褐色脂肪細胞を用いてさらに詳細な分子機構を解析していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu L, Nagata N, Ota T	4. 巻 20
2. 論文標題 Impact of Glucoraphanin-Mediated Activation of Nrf2 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with a Focus on Mitochondrial Dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5920 ~ 5920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235920	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

1. 著者名 Fuke Nobuo, Nagata Naoto, Suganuma Hiroyuki, Ota Tsuguhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2277 ~ 2277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11102277	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 -

1. 著者名 Xu Liang, Nagata Naoto, Ota Tsuguhito	4. 巻 7
2. 論文標題 Glucoraphanin: a broccoli sprout extract that ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adipocyte	6. 最初と最後の頁 218 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21623945.2018.1474669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長田直人、太田嗣人	4. 巻 35
2. 論文標題 スルフォラファンの肥満抑制効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊BIOINDUSTRY	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoto Nagata, Guanliang Chen, Tsuguhito OTA, Hitoshi Ando
2. 発表標題 Nrf2 activation by glucoraphanin alleviates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance through adipose tissue browning.
3. 学会等名 Enviromental Response V (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suratsawadee Promsuwan, Kazuki Sawamoto, Xu Liang, Naoto Nagata, Yumi Takiyama
2. 発表標題 Glucoraphanin has the therapeutic potential of resolving hepatic steatosis in a murine model of diet-induced obesity
3. 学会等名 IDF2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
連携研究者	堀家 慎一  (Horike Shin-ichi)  (40448311)	金沢大学・疾患モデル総合研究センター・准教授    (13301)	

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
---------	---------