

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07100

研究課題名(和文) 亜硝酸塩による白色脂肪細胞からベージュ細胞への転換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the conversion mechanism from white adipocytes to beige cells by nitrite anion

研究代表者

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA, Koichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：70301314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：「亜硝酸塩による白色脂肪細胞からベージュ細胞への転換機構の解明」について、マウス脂肪前駆細胞である3T3-L1を用いて検討した。亜硝酸塩は、3T3-L1が白色脂肪細胞へと分化する過程には影響しなかったが、白色脂肪細胞のベージュ化を促進すること、さらに、脂肪細胞の脂肪蓄積には影響せずに脂肪分解を促進することを見いだした。そしてこれらの作用は、細胞内のエネルギー代謝を司る分子であるAMPK活性化が亜硝酸塩によって促進していることに関係していることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野菜には多量の硝酸塩が含まれており、ヒト体内では嫌気性細菌の働きによりその一部は亜硝酸イオンへと変化している。ところで亜硝酸塩は食品添加物(発色剤)として広く用いられているが、亜硝酸塩が2級アミンと特に酸性条件下で反応すると発がん性のあるニトロソアミンが生成することが報告されて以来、亜硝酸塩は人体に有害であるという考えが浸透し、その他の生理作用に関する研究はほとんど進んでこなかった。我々は亜硝酸塩の生理作用を研究する過程で、亜硝酸塩は白色脂肪細胞をベージュ細胞に変化させることを見いだした。この結果は、野菜による抗肥満効果・生活習慣病改善効果の解明につながるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Nitrite, along with nitrate, is always present in trace amounts in the body. Its origin is endogenous as a metabolite of nitric oxide (NO) produced by NO synthase and exogenous as nitrate from food (mainly vegetables). We have studied the physiological activities of nitrate and nitrite. In this study, we focused on the fact that nitrite has anti-obesity activity. We investigated the "mechanism of conversion of white adipocytes to beige cells by nitrite" using 3T3-L1, which is a mouse adipose progenitor cell. Through our study, nitrite does not affect the process of 3T3-L1 differentiation into white adipocytes, but promotes the conversion of white adipocytes to beige cells, and nitrite promotes lipolysis of adipocytes without affecting lipogenesis. These effects were accompanied by activation of AMPK, a molecule that regulates energy metabolism.

研究分野：薬理学

キーワード：亜硝酸塩 硝酸塩 抗肥満 AMPK

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の血液中には一定濃度の硝酸イオン(数 100  $\mu\text{M}$ )、亜硝酸イオン(数 100 nM)が存在し、その大部分は尿中に排泄されるために、最近まで血中の無機硝酸イオンや亜硝酸イオンは、生体内で生成する血管拡張物質・NO が代謝された際に生じる不活性な最終代謝物および中間代謝物と考えられてきた。

しかし我々は、静脈内投与(Am. J. Physiol. 288, F182, 2005)や飲水で投与した亜硝酸塩は体内で NO に還元されることを亜硝酸塩の安定同位体を用い、電子スピン共鳴法(Electron Paramagnetic Resonance: EPR 法を組み合わせることで世界に先駆けて報告した(Tsuchiya K. et al., J. Pharmacol. Sci., 96, 395, 2004.; Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 288, H2163, 2005.; Kanematsu Y., Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 295, F1457, 2008)。また我々は、腎臓が虚血に至ったときには腎臓中の亜硝酸塩が NO 合成酵素に代わり NO を生成することを報告した(Okamoto M, Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 288, F182, 2005)。これらの知見から、最近では血中及び組織中の硝酸塩および亜硝酸塩は、NO 合成酵素(NOS) に代わる NO 生成のためのリザーバーだと認識されるに至っている(Lundberg JO, Tsuchiya K. et al., Nat. Chem. Biol. 5, 865, 2009.)。

次に我々は亜硝酸塩の持つ生理作用について、セリン/スレオニンキナーゼに属する AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性化の点から検討を行い(基盤研究(C) 22590241 (H22-H24)、基盤研究(C) 25460332 (H25-H27)、基盤研究(C) 16K08550(H28-H30))、その結果、亜硝酸塩は体内で NO に還元されて生理作用を発揮するだけで無く、『亜硝酸塩そのものが細胞内シグナル分子として AMPK を活性化する』新しいメカニズムを見出し発表した(Biol. Pharm. Bull. 40, 1866, 2017)。

これらの検討を通じて、高脂肪食を摂取させた動物に亜硝酸塩を投与すると OGTT 改善ならびに空腹時血糖値低下作用、血中中性脂肪値低下作用を観察し、空腹時血糖値を亜硝酸塩が低下させたことから『亜硝酸塩がグルカゴン分泌を抑制する』という仮説を立てて研究を行い、亜硝酸塩は AMPK 活性化を介して膵臓においてはグルカゴン分泌の抑制、肝臓においては糖新生の抑制をすることで血糖降下作用を発揮することを見出した。

さらに興味深いことに、亜硝酸塩による血糖低下作用は亜硝酸塩投与直後に起きるのに対し、血中中性脂肪値低下作用が顕著になるには亜硝酸塩を 2 週間以上投与したときに限られることに気付いたが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、亜硝酸塩による白色脂肪細胞の褐色化(ベージュ化)への転換機構を明らかにすることを目的とし、その検討を通じて亜硝酸塩の抗肥満効果・生活習慣病改善効果を証明することである。

これまで亜硝酸塩は胃内で 2 級アミンと反応して発がん物質の一つであるニトロソアミンを生成すること、また乳児に亜硝酸イオンを含む飲水を投与するとメトヘモグロビン血症を発症する事があるため、亜硝酸塩については『生体にとっては不要かつ有害な物質』と信じられてきた。そのため、食物中の硝酸塩の低減策が施策として実施されてきたが、硝酸塩摂取と胃がん発症率の間に相関が見られないこと、乳児のメトヘモグロビン血症は乳児期のシトクローム b5 還元酵素活性の未発達が原因であることが明らかとなり、硝酸塩・亜硝酸塩に対する考え方が近年変化してきている。

メタボリックシンドロームは、内臓肥満に高血圧、高血糖、脂質異常症(高脂血症)が組み合わさり心疾患や脳卒中等の動脈硬化性疾患を招きやすい病態であり、循環器イベントの最大の原因となっているため、内臓肥満を改善することは先進国共通の喫緊の課題となっている。従来、肥満の解消にはカロリー制限、運動のほか、『野菜の摂取』が推奨されている(農林水産省 HP より)。しかし、『野菜の摂取』がどのように肥満の解消につながるのか明確な説明は無い。野菜には高濃度の硝酸塩が含まれていること(白菜では NO<sub>x</sub> が約 12 mmol/100 g)、また、ヒトは摂取した硝酸塩の最大 20%を口腔内微生物の働きで亜硝酸塩に変換することが知られている。

本提案により、亜硝酸塩による白色脂肪細胞のベージュ化について新たな知見が得られれば、生体内および野菜に多く含まれる硝酸塩・亜硝酸塩の生理的意義が一層解明されることになり、独創性・新規性の点から、その社会に与える影響はきわめて大きいと考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物を用いた検討

5 週齢の ddy 系雄性マウスに 0.01%、0.1%NaNO<sub>2</sub> を含む飲水を 5 週にわたり投与し、白色脂肪組織(WAT)重量、および WAT における BAT 関連遺伝子(PGC-1、UCP1、PRDM16)および炎症関連遺伝子(PPAR、F4/80)について検討した。

#### (2) マウス脂肪前駆細胞(3T3-L1)を用いたメカニズムの検討

3T3-L1 細胞は、分化誘導培地(0.5 mM IBMX, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 1  $\mu\text{M}$  dexamethazone, 2  $\mu\text{M}$  rosiglitazone を含む DMEM 培地)で 2 日間、その後は分化培地(10  $\mu\text{M}$  insulin を含む DMEM 培地)に変更し 8 日間培養し実験に供した。亜硝酸塩の刺激は、分化誘導培地および分化培地に溶解して実施した。検討項目は、細胞内トリグリセリド濃度、MTT、脂肪分化関連遺伝子(PPAR、SREBP1c、ACC1)、褐色化関連遺伝子(PGC1、UCP1)、脂肪分解関連遺伝子(ATGL、HSL、

CPT1 )、AMPK (5' AMP-activated protein kinase) 発現について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験動物に亜硝酸塩を経口摂取させたときの变化

0.01%および0.1%亜硝酸塩( $\text{NaNO}_2$ )を5週間投与した場合、コントロール群との間に体重増加、摂餌量、飲水量に有意な違いは見られなかった。血中亜硝酸イオンは0.1% $\text{NaNO}_2$ 含有飲水群で有意な増加が、硝酸イオンは0.01%と0.1% $\text{NaNO}_2$ 含有飲水群で有意な増加を観察した。

5週目に解剖し肝臓、WAT、心臓の臓器重量体重比を比べたところ、WATの0.1% $\text{NaNO}_2$ 群で有意な減少が観察された。そこでWATにおけるBAT関連遺伝子であるPGC-1、UCP1を調べたところ、0.1% $\text{NaNO}_2$ 群でも有意に増加していたが、分化関連遺伝子であるPPARの変化は見られなかった。

同様に、褐色脂肪細胞を分離しUCP1、PGC-1、PRDM16を検討したところ、0.1% $\text{NaNO}_2$ 投与によりUCP1、PGC-1は増加傾向、PRDM16は有意な増加を示したが、PPARに影響はみられなかった。

亜硝酸塩投与によるWATの細胞断面積変化を調べたところ、亜硝酸塩の濃度依存的な面積減少が見られ、0.1% $\text{NaNO}_2$ 群で有意に低下した。

##### (2) マウス脂肪前駆細胞(3T3-L1)を用いたメカニズムの検討

細胞実験に先立ち、培地中に添加した亜硝酸イオンが培養実験中に酸化を受けて硝酸イオンに変化する可能性を排除するため亜硝酸イオンの培地中での安定性について検討した。その結果、添加した亜硝酸は48時間後でも80-90%は硝酸イオンとして存在していることを確認した。また、亜硝酸イオンによる細胞毒性は0.3 $\mu\text{M}$ ~100 $\mu\text{M}$ の $\text{NaNO}_2$ を含有する培地で2日間培養し細胞生存率をMTTアッセイで評価し、 $\text{NaNO}_2$ による細胞障害は見られないことを確認した。これらの結果を踏まえ、培養実験では2日毎の培地交換時に亜硝酸塩を加えることで、亜硝酸イオンの細胞実験を実施した。

##### 亜硝酸塩刺激による細胞内トリグリセライド(TG)濃度に与える影響の検討

3T3-L1細胞に分化誘導以降1 $\mu\text{M}$ ~100 $\mu\text{M}$ の $\text{NaNO}_2$ を共存させて、分化8日後に細胞を回収して細胞内TGを酵素法で測定したところ、亜硝酸塩共存により細胞内TGは有意に減少し、この作用は実験で用いた最小の亜硝酸塩濃度(1 $\mu\text{M}$ )でも観察された。また、細胞内の中性脂肪をオイルレッドOで評価したところ、亜硝酸塩の濃度依存的に染色度が低下したことを見いだした。

##### 亜硝酸塩刺激による脂肪細胞の分化に与える影響の検討

3T3-L1細胞に分化誘導以降1 $\mu\text{M}$ ~100 $\mu\text{M}$ の $\text{NaNO}_2$ を共存させて、分化8日後に細胞を回収してPPAR(脂肪細胞の分化に関連)、SREBP1c・ACC1(脂肪酸合成に関連)のmRNAをRT-PCRで評価したところ、亜硝酸塩刺激によってこれらの遺伝子の発現に変化は見られなかったことから、亜硝酸塩は脂肪細胞の分化に影響を与えないことが示唆された。

##### 亜硝酸塩刺激による脂肪細胞の褐色化に与える影響の検討

3T3-L1細胞に分化誘導以降1 $\mu\text{M}$ ~100 $\mu\text{M}$ の $\text{NaNO}_2$ を共存させて、分化8日後に細胞を回収して脂肪細胞の褐色化に関連するPGC1、UCP1についてRT-PCRで評価したところ、共存させた亜硝酸塩の濃度依存的なこれらの遺伝子の増加が確認できたことから、亜硝酸塩は褐色化の誘導を起こすことが示された。

##### 亜硝酸塩刺激による脂肪細胞の脂肪分解に与える影響の検討

脂肪分解に関与する酵素(ATGL・HSL: TGの分解に関与、CPT1: 脂肪酸の酸化に関与)のmRNA発現をRT-PCRで評価したところ、いずれも亜硝酸塩刺激により増加することが明らかとなり、亜硝酸塩は脂肪分解を促進することが示された。

以上の結果から、亜硝酸塩は脂肪細胞の分化には影響せず、褐色化の誘導を促進することが示唆されたことから、亜硝酸塩による褐色化誘導のメカニズムについて検討した。

##### 亜硝酸塩による褐色化の誘導とAMPK(5' AMP-activated protein kinase)の関連の検討

2019年にWangらがショウガの機能性ポリフェノールである6-gingerolがAMPK活性化を介してWATの褐色化を促進することを報告した(Wang J et al. J Agric Food Chem. 67, 14056, 2019)。我々は腎血管内皮細胞やTC細胞で亜硝酸塩が直接AMPKを活性化することを見だし報告しているが、3T3-L1細胞でも同様に亜硝酸塩によるAMPK活性化が起きるかを検討したところ、1 $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ の刺激でAMPK活性化のポジティブコントロールとして汎用されているAICAR(Acadesine/AICA riboside)と同程度のAMPK活性化を見だし、AMPK阻害剤であるBML275の共存下では亜硝酸塩による褐色化関連遺伝子の発現が抑制された。

これらの結果より、野菜などの硝酸塩を含む食物を摂取した場合、体内で亜硝酸塩の一部還元された後、亜硝酸塩は白色脂肪細胞においてAMPKを活性化することで褐色化(ベージュ化)を促進し、またAMPKの活性化はこれまでの報告によりPGC1、CPT1、ATGLおよびHSLの活性化を行うことが知られていることから、これらの経路を通じて中性脂肪からの遊離脂肪酸の産生、ミトコンドリアにおける脂肪分解を通じて抗肥満効果・生活習慣病改善効果を発揮していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本 理人, 土屋 浩一郎
2. 発表標題 グルカゴン分泌調節におけるSGLT2とAMPKの役割 -糖尿病に対する薬物治療の観点から-
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 シンポジウム
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
研究分担者	池田 康将  (IKEDA Yasumasa)  (60432754)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授   (16101)	
研究分担者	宮本 理人  (MIYAMOTO Licht)  (60456887)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・助教   (16101)	

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