

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月21日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790039

研究課題名（和文） 肥満症を基盤とする脳傷害の機序解明に向けた多面的アプローチ

研究課題名（英文） Analysis of brain dysfunction in HFD-induced obese mice

研究代表者

大和 真由実（YAMATO MAYUMI）

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：30380695

研究成果の概要（和文）：

体重の恒常性を維持するため、脳は、エネルギー情報の伝達を担っている。一方、糖尿病や肥満症が、アルツハイマー病などの脳疾患発症のリスクファクターとなることが指摘されつつある。しかし、肥満症を基礎疾患とした脳傷害機序解明についての研究はスタートしたばかりであり、未解決の点が多い。そこで、本研究では、高脂肪食摂取マウスの脳機能障害について、レドックス変動の観点から研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

Obesity is a condition of well-developed adipose tissue, and cause functional abnormality of energy metabolism. In order to maintain the homeostasis of body weight, the brain takes the central role in transfer of energy information. Although diabetes or obesity serves as a risk-factor of the brain disease onset of Alzheimer's disease etc, it remains unknown the mechanisms of brain injury in obesity. Therefore, we estimated brain function in high fat diet-induced obese mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の基礎疾患である肥満症患者の増加が、社会的な重要課題となって久しい。通常、体重の恒常性を維持するためには、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情報を共有し

ている。この中で、脳は、エネルギー情報の伝達を担う臓器として重要である。

一方、糖尿病や肥満症が、虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患発症のみならず、アルツハイマー病などの脳疾患発症のリスクファクターとなることが指摘されつつある。実際に、糖尿病患者においては、認知

機能に変化が認められている (Brands et al. *Diabetes Care* 28; 2005)。また、アルツハイマー病患者のうち 80%が、グルコース代謝異常であるとの結果が報告されている (Janson et al. *Diabetes* 53; 2004)。これらの事実は、肥満症における脳機能を考える上で、エネルギー情報の担い手としての生理機能だけでなく、傷害メカニズムを解明することが重要であることを示唆している。しかし、肥満症を基礎疾患とした脳傷害機序解明についての研究はスタートしたばかりであり、未解決の点が多い。

様々な疾患の発症・進展に関わる因子として、フリーラジカル生成や酸化・還元 (レドックス) 状態不均衡による酸化ストレスが知られており、肥満症においても、末梢臓器について興味深い知見が報告されている。具体的には、血液中は酸化状態に傾き、動脈硬化性疾患の原因となることが指摘されている。一方で、肝臓では、NAD⁺/NADH のレドックス状態により、SIRT1 を介し、代謝調節が行われることが報告されている (Koo et al. *Cell* 127; 2006)。

これらの事実から、肥満と脳傷害が密接に関連し、その傷害にレドックス不均衡が関与していると考えられる。このような背景のもと、申請者は、生活習慣病の基礎疾患である肥満症において脳内レドックス変動を明らかにし、制御法を見いだすことが出来れば、脳疾患への発症を予防できるのではないかと考え、機序解明を本研究の目的とした。血液と臓器間、または臓器内でのレドックス不均衡を考えると、肥満症における病態生理解明には、個体状態を維持したまま非侵襲的に解析することが重要である。

これまで、申請者らは、非侵襲的な生体内レドックス反応の解析法として、酸化・還元両反応を受けるニトロキシラジカルを“探索針”として用いてきた。例えば、ニトロキシラジカルを、核・電子間の 2 重共鳴法 (Overhauser-enhanced MRI : OMRI) の造影剤として用い、脳虚血再灌流ラット脳におけるミトコンドリア機能傷害の画像化に成功した (*J Cereb Blood Flow Metab* 29; 2009)。また、ミトコンドリアを介した酸化ストレスが認知機能に影響を及ぼすことを明らかにしている (*J Neurosci* 28; 2008)。これらの技術を応用することで、多臓器間のクロストークにより進行する肥満症の病態機序を時間軸にそって解明出来ると考えている。

2. 研究の目的

脳は、そのエネルギー代謝のほとんどすべてをグルコースの好氣的代謝に依存してい

るため、肥満によって生じるグルコース代謝異常の影響を受けると予想される。本研究課題では、この点に着目し、以下の 2 点について検討することとした。

(1) ミトコンドリア機能不全：脳内 ATP 産生亢進によるミトコンドリアの過活動が自己酸化を誘発し、結果的には機能の低下をもたらすか否かについて検証する。

(2) レドックス制御に基づく治療法の検討：脳内レドックス不均衡について薬理的に検証する。

3. 研究の方法

本研究課題では、グルコース代謝異常から生じる脳機能傷害のメカニズムとして、脳内レドックス変動の関与を明らかにする。レドックス変動解析と併行して、病態変化を生化学的、組織学的にとらえ、さらに脳機能変化を行動学的に評価する。これらの実験を通して、肥満症から脳機能傷害へと発展していく過程を、時空間軸に沿って解析する。具体的には、以下の検討項目について実施する。

肥満症モデルマウスの作成：C57BL/6J マウス (雄性) に、糖尿病・肥満研究用飼料 (日本クレア株式会社製、High Fat Diet 32) を摂取させることで肥満症モデルマウスの作成を行った。その後、肥満症に対するレドックス変動を薬理的に明らかにすること、また治療効果を目的として、酸化・還元両反応に関わる Tempol を自由飲水させ、継続して 4 週間飼育した。

脳内レドックス状態の評価：OMRI 画像化による非侵襲的評価、脂質過酸化物質や抗酸化酵素活性測定、および HPLC を用いた還元物質測定を行う。

レドックス変動の機序解析：ミトコンドリア機能は、電子伝達系やクエン酸回路を担う酵素活性にて評価する。

脳認知機能の評価：放射状水迷路テストを実施し、行動学的に評価する。

治療法探索：Tempol を用い、レドックス反応の観点から抗肥満作用を検討する。

4. 研究成果

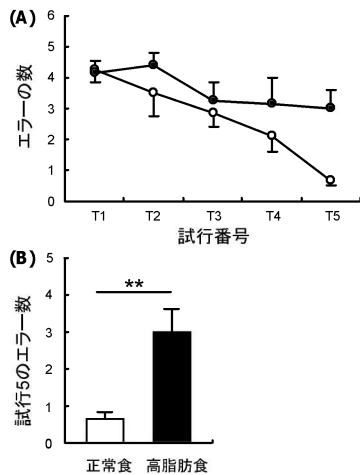
(1) 肥満症モデルマウスの作成

C57/BL6 マウスに高脂肪食を 8 週間摂取させたところ、通常食摂取群と比較して、明らかな体重増加が認められた。

また、グルコーストレランステストを実施したところ、高脂肪食摂取群では耐糖能異常が認められた。

(2) 脳機能の評価

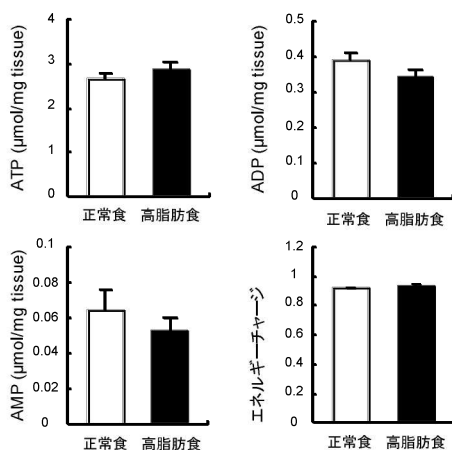
脳機能について、放射状水迷路を用いて評価したところ、肥満群のみ学習障害が確認された (図 1)。



(図 1) 5回の試行のエラー数 (A)、短期記憶の評価 (B)

(3) 肥満マウスにおけるミトコンドリア機能・レドックス変動の解析

肥満モデルマウスにおいて、認知機能の低下が認められたことから、そのメカニズムとしてミトコンドリア機能の解析を行った。ミトコンドリアは、神経活動時に必要となる ATP 合成を担うオルガネラである一方、その反応の過程で電子の漏れがあり、活性酸素種の生成が起こる。まず、ATP 量の変動について検討したところ、通常食、高脂肪食摂取群ともにそのレベルに変動は認められなかった (図 2)。また、ATP 合成系の酵素活性についても変動は認められなかった。



(図 2) 脳内 ATP 量の測定

脳内のレドックス変動として、OMRI を用いた画像解析等を実施したが、正常食、高脂

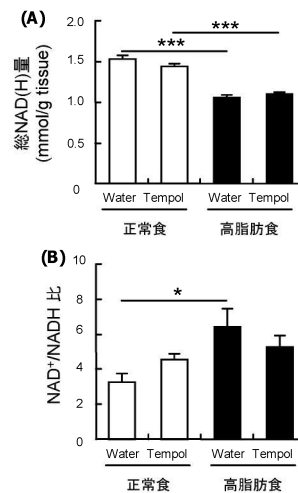
肪食摂取群の両群において差はなかった。また、酸化ストレスの指標である脂質過酸化物の脳内蓄積は、正常群、高脂肪食摂取群で差は認められなかったが、血漿中においては、高脂肪食摂取群において有意に上昇した。

本研究で用いたモデルマウスにおいては、放射状水迷路を用いた脳機能評価においては学習障害が認められたが、脳内のレドックス変動は認められなかった。一方、血漿中の脂質過酸化物蓄積など全身的な酸化ストレスマーカーは上昇したことから、他の臓器の障害の結果、脳機能にも影響がおよんでいるのではないかと考え、肝臓の代謝機能ならびに骨格筋運動機能について検討を行った。

(4) 肥満モデルマウスに対する Tempol 飲水の効果

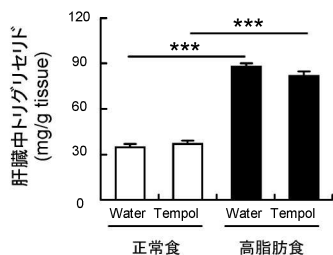
合計 12 週間の高脂肪食摂取により、著しい体重・体脂肪率の増加、および耐糖能が認められた。Tempol 飲水によって改善効果は認められなかった。血漿中脂質過酸化物の蓄積については、Tempol 飲水群で改善する傾向が認められた ($p=0.059$)。

NAD⁺/NADH 比は、代謝調節を担う重要なレドックスペアとして知られている。そこで、肝臓中の NAD および NADH を測定したところ、肥満マウスにおいて各濃度の低下が認められた (図 3A)。比については、上昇していた (図 3B)。



(図 3) 肝臓中 NAD(H)総量 (A) その比 (B)

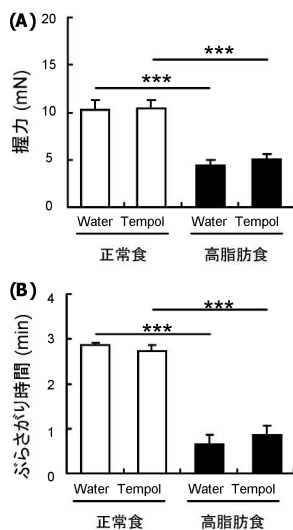
肝臓中のトリグリセリドなどの変化は認められなかった (図 4)。その原因の一つとして、Tempol の NAD⁺/NADH 比上昇しつつも β酸化などの酵素反応に必要な NAD⁺量が不足しているのではないかと考えられた。



(図4) 肝臓中トリグリセリド量

(2) 肥満マウスにおける運動機能の解析

インシュリン抵抗性によって、運動機能抵抗性が形成されるという報告がある。そこで、運動機能について、前肢の握力測定および前後肢を使ったぶらさがり時間を測定することで評価した。肥満症においては、著しくこれらの運動機能が低下し、Tempol 飲水群においても改善は認められなかった (図5)。



(図5) 握力 (A)、ぶらさがり時間 (B)

今回の研究により、肥満症における脳機能の低下の原因として、脳内のレドックス変化は関与しないことが示唆された。

一方で、代謝制御に重要な役割を担う NAD⁺/NADH 比の上昇が肥満症群で認められた。これまで、カロリー制限により、NAD⁺/NADH 比が亢進し、代謝改善をもたらすことが知られている。肥満症では、NAD(H)量そのものが減少しており、その結果代謝低下を誘発している可能性が本研究によって初めて明らかになった。

今回用いた Tempol は、ラジカル捕捉作用を有するとともに、アスコルビン酸・グルタチオンレドックスシステムを介して、NADH を NAD⁺に変換することが知られている。そ

こで、今後も引き続き、Tempol を用いレドックス調節を介した代謝への影響について検討を行う予定である。特に臨床状況を踏まえ、食事改善との組み合わせ等も重要であると考えている。

生活習慣病の基礎疾患である肥満症患者の増加は、社会的な重要課題である。今後もレドックスの観点から検証を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 特になし

〔学会発表〕 (計1件)

発表者名：大和真由実

発表タイトル：6-CHDA投与ラットにおける酸化ストレスの解析 (今回の研究の基盤技術である OMI を用いた画像化法について発表を行った)

学会等名：第50回 電子スピンスイエンズ学会年会

発表年月日：2011年11月16日

発表場所：仙台国際センター

〔図書〕 特になし

〔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・准教授

研究者番号：30380695