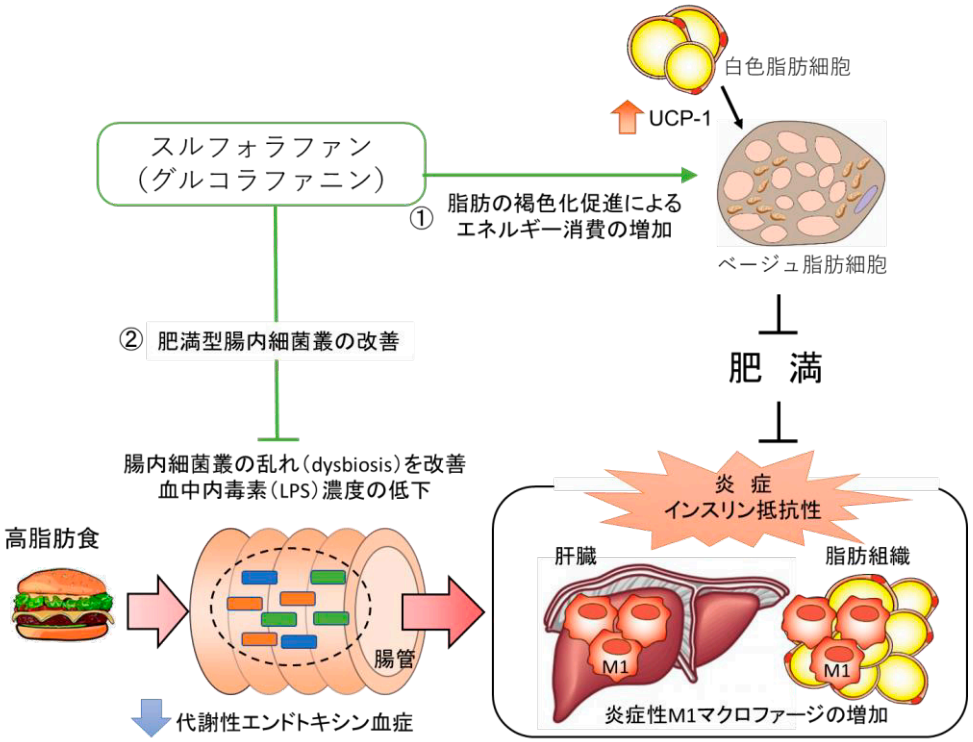
100　エネルギー代謝制御による肥満症の新規治療薬の開発	太田　嗣人

【目的】世界的に肥満人口は増加し、過体重や肥満の是正は、2 型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）等の予防・抑止の観点から重要視される。しかし、既存の抗肥満薬は、食欲抑制や脂肪吸収阻害等、エネルギー摂取を減少させる作用が主であり、抑うつや下痢等の副作用を伴う等、問題点は少なくない。現在、エネルギー消費を増大させ、肥満や NAFLD を抑制する安全性の高い薬剤や生理活性物質が求められている。我々は最近、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 を活性化するスルフォラファンの安定前駆体であるグルコラファニン（GR）が、高脂肪食肥満モデルの食餌摂取量を変化させずに、体重増加を減少させ、2 型糖尿病と脂肪肝の発症を予防することを報告した。一方、*Nrf2* 遺伝子を欠損したマウスでは、GR による抗肥満・抗糖尿病効果、エネルギー消費の増大、および熱産生を担う脱共役タンパク質 Ucp1 発現の誘導がほぼ完全に消失していることを見出した。本研究では、1. Nrf2 活性化を介した GR の肥満症に対する治療効果とその分子メカニズム、2. GR の腸内環境への作用を介した NASH の改善効果を明らかにすることを目的とする。

【方法】雄性 7 週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食（HF）または通常食（NC）を 11 週間投与して、HF 群において肥満を誘導した。HF を継続する群と HF+GR に変更する群とし、肥満に対する GR の治療効果を 4 週間検討した。また、脂肪肝の進行型である NASH に対する GR の効果を明らかにするために、食餌性 NASH モデルである高コレステロール高脂肪食に GR を配合し検討を行った。

【結果】肥満モデルにおける検討では、GR が 2 型糖尿病と脂肪肝を合併した進行した肥満モデルにおいて、体重を軽度に減少させ、インスリン抵抗性、耐糖能を改善し、脂肪肝を減弱させる治療効果がみられた。また、肝臓のマクロファージを抗炎症性の M2 優位に増加させ、肝臓への抗炎症作用が認められた。一方、NASH モデルにおいて肝臓の脂肪化、炎症、また、軽度の肝線維化が認められ、早期の NASH 病理像を呈していた。しかしながら、GR 投与群では、脂肪化、炎症、線維化に対する有意な影響は見られず、NASH に対する組織学的改善は乏しかった。

スルフォラファンの肥満、脂肪肝に対する作用



100. エネルギー代謝制御による肥満症の新規治療薬の開発

太田　嗣人

旭川医科大学 内科学講座 病態代謝内科学分野

Key words：スルフォラファン，グルコラファニン，肥満症，NASH/NAFLD，エネルギー代謝

緒　言

1．研究の背景

肥満人口は世界的に増加の一途を辿り、過体重や肥満の是正は2型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）等の予防・抑制の観点から重要視される。しかし、既存の抗肥満薬は、食欲抑制や消化管での脂肪吸収阻害等、エネルギー摂取を減少させる作用が主であり、抑うつや下痢等の副作用を伴う等、問題点は少なくない。現在、エネルギー消費を増大させ、肥満やNAFLDを抑制する安全性の高い薬剤や生理活性物質が求められている。

我々はこれまで、独自に開発した非アルコール性脂肪肝炎（NASH）モデルを用いて、抗酸化色素のカロテノイドは異所性脂肪毒性（リポトキシシティ）による過剰なストレス応答や炎症を減弱し、糖尿病やNASH/NAFLDの発症・進展を抑止することを報告してきた［1〜3］。しかし、カロテノイドの肥満抑制作用は乏しく、肥満症、NAFLDに対する効果は限定的であった。本研究では、ブロッコリーの新芽（スプラウト）に多く含まれるスルフォラファン配糖体のグルコラファニン（GR）に着目した。

2. スルフォラファンとその標的：Nrf2-Keap1系

スルフォラファンは、元来、がん予防効果が期待される成分として解毒酵素誘導能を指標に見出された天然の化学物質（フィトケミカル）である［4］。スルフォラファンはアブラナ科の植物（ブロッコリー、大根、キャベツ等）に特徴的に存在するイソチオシアネートの一種であり、特に、ブロッコリースプラウトに多く含まれる。ブロッコリーには、安定な前駆体であるGRとして存在し、ブロッコリー自体や腸内細菌叢がもつ酵素（ミロシナーゼ）によって活性体であるスルフォラファンに変換された後、腸管から吸収される［5］。これまでに、スルフォラファンが持つ抗酸化作用、解毒作用、および抗炎症作用によって発がん性物質、アルコール、および活性酸素種等のストレスから細胞・組織を保護することが実験動物やヒトにおいて多数報告されている［5］。

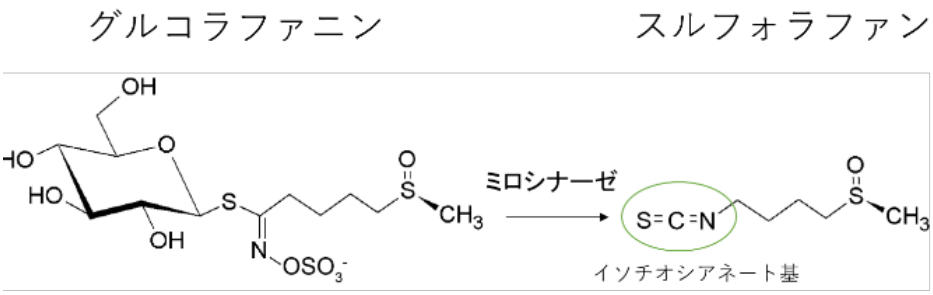


図1. スルフォラファンとグルコラファニンの構造
安定前駆体のグルコラファニンは、ブロッコリー自体や腸内細菌叢がもつ酵素であるミロシナーゼによって活性体であるスルフォラファンに変換される。

スルフォラファンの多彩な生理作用の発現には酸化ストレス応答転写因子Nrf2（NF-E2 related factor 2）が深く関与している。ストレス非存在下において、Nrf2にはCullin3（Cul3）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、種々のストレスや

スルフォラファンの存在下ではNrf2がKeap1から遊離して核内に移行し、生体防御に関わる多数の抗酸化・解毒酵素遺伝子の発現を誘導する［6］。さらに、糖・脂質代謝、ならびに炎症性サイトカイン等、肥満の病態と密接に関係する遺伝子群の発現制御においてもNrf2が重要な役割を果たしていることが明らかにされている［7］。しかし、肥満関連疾患に対するスルフォラファンの効果は十分に明らかにされていなかった。

3. GRによる肥満の発症抑制

我々はこれまで、野生型マウスに高脂肪食、またはスルフォラファンの前駆体であるGRを混ぜた高脂肪食を与え、体重と体脂肪組成を比較した。GRを混ぜた高脂肪食を与えたマウスでは、混ぜていない高脂肪食を与えたマウスと比較して、摂餌量に変化はないものの、体重増加率が約15%抑えられ、内臓脂肪量が約20%減少し、単純性脂肪肝と高血糖が改善された［8］。さらに、GRを摂取したマウスは体温が約0.5℃上昇しており、熱産生の亢進によるエネルギー消費量の増大を示唆していた。その作用機序の一つとして、我々はGRがミトコンドリア膜に存在し、熱産生を担う脱共役タンパク質（Ucp1：Uncoupling protein 1）を白色脂肪組織において増加させることを見出した。また、スルフォラファンの作用標的である*Nrf2*遺伝子を欠損したマウス（*Nrf2*ノックアウトマウス）では、GRによる抗肥満・抗糖尿病効果、エネルギー消費の増大、およびUcp1発現の誘導がほぼ完全に消失していた［8］。

これらの知見は、スルフォラファンによるNrf2活性化がUcp1による熱産生を亢進させ、エネルギー消費の増大を介して肥満の発症を抑止する可能性を示している。GRはエネルギー摂取と消費のバランスを消費優位へ大きく変化させ、エネルギー代謝を活性化し、肥満の発症を抑制することから、肥満およびNASH/NAFLD等の肥満関連疾患の新規治療薬として期待される。

4. 本研究の目的

本研究では、1. Nrf2活性化を介したGRの肥満症に対する治療効果とその分子メカニズム、2. GRの腸内環境への作用を介したNASHの改善効果を明らかにすることを目的とする。

方法および結果

1. 肥満モデルにおける治療効果の検討：飼料と実験方法

高脂肪食（D12492 飼料：60 kcal%脂肪含有、Research Diets、NJ、HF と省略）に、カゴメ株式会社製のブロッコリースプラウト抽出物由来のGRまたは、抽出物の賦形剤として用いられるデンプン加水分解物（デキストリン）を対照物として配合し飼料を調製し、各々HF＋GR群、HF群とした。また、通常食（D12450B飼料：10 kcal%脂肪含有）を与えたNC群を対照群とした。

雄性7週齢C57BL/6Jマウス（日本SLC）を1週間馴化させた後、HFまたはNCを11週間投与して、HF群において肥満を誘導した。HF群間の平均体重が同程度となるように9～10匹ずつ2群に分け、HFを継続する群（HF→HF群）とHF＋GRに変更する群（HF→HF＋GR群）とし、肥満に対するGRの治療効果を4週間検討した（図2a）。

試験期間中は、体重を毎週測定した。試験3週目に糖負荷試験（GTT）を行い、静脈血を採取し、各種生化学パラメーターを測定した。その後、試験4週目にマウスを安楽死させた。採取した肝臓は、重量測定後に分割し、一部は−80℃で保存し、肝臓の一部はフローサイトメトリー解析により、肝臓内のマクロファージ数、M1/M2極性を定量化した。

全ての結果は、平均値±標準誤差で示した。3群間の検定には一元配置分散分析及びBonferroni多重解析を用いた。2群間の検定にはt-testを用いた。有意水準は5%未満とした。

2. 肥満モデルにおけるグルコラファニンの治療効果

図2aに試験期間中の体重推移を示す。治療効果を検討する試験開始時において（week 0）、通常飼料（NC）を摂取させた群と比べて、高脂肪食（HF）を摂取させた群では、顕著な体重増加が認められた。4週間のGRの治療介入により、体重は減少傾向にあった。

糖負荷試験の結果を図2bに示す。通常食継続群（NC→NC）群に比し、HF継続群（HF→HF群）では、血糖値の上昇が認められた。HF＋GR変更群（HF→HF＋GR群）の血糖値は、HF継続群に比し低値を推移した。曲線下面積

（AUC）においても、HF＋GR 変更群は HF 継続群に比し減少した。以上から、GR による高血糖の改善効果、すなわち、耐糖能異常に対する治療効果が認められた。また、空腹時血糖値、随時血糖値いずれも通常食継続群に比し、HF 継続群で高血糖が認められた。HF＋GR 変更群の空腹時および随時血糖値は、HF 継続群に比し減少した（図 2c）。さらに、空腹時インスリン値、随時のインスリン値いずれも通常食継続群に比し、HF 継続群では増加し、高インスリン血症が認められた。HF＋GR 変更群の空腹時および随時のインスリン値は、HF 継続群に比し減少しており、GR の治療介入により高インスリン血症の改善が認められた（図 2c）。

肝機能 ALT 値は、通常食継続群に比し、HF 継続群では増加した。HF＋GR 変更群の ALT 値は、HF 継続群に比し減少した（図 2c）。AST 値は、群間で有意な変化は認められなかった。組織学的には HF 継続群で単純性脂肪肝の所見が顕著であり、HF＋GR 変更群では、単純性脂肪肝は HF 継続群に比し減弱した。

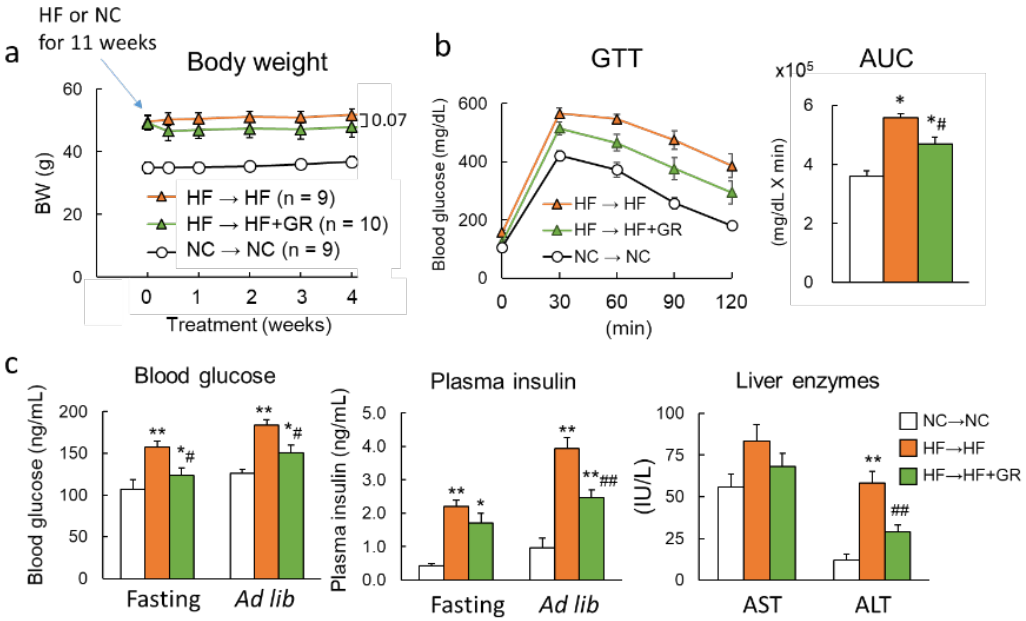


図 2. 肥満モデルにおけるグルコラファニンの治療効果

a）体重の推移、b）糖負荷試験、c）空腹時および随時血糖値、空腹時および随時血清インスリン値、肝機能 AST、ALT 値。*P＜0.05、**p＜0.01 vs NC→NC ; #p＜0.05、##p＜0.01 vs HF→HF。

次にフローサイトメトリーを用いて、肝臓内のマクロファージの動態を検討したところ、HF 継続群に比べて、HF＋GR 変更群の総マクロファージ数、炎症惹起性 M1 マクロファージ数に有意差は認められなかった。一方、HF＋GR 変更群において、HF 継続群に比べて炎症抑制性 M2 マクロファージ数は増加傾向が認められ、その結果 M1/M2 比の減少傾向が認められ、GR の治療介入により肝臓マクロファージの極性が M2 有意にシフトしていた（図 3）。

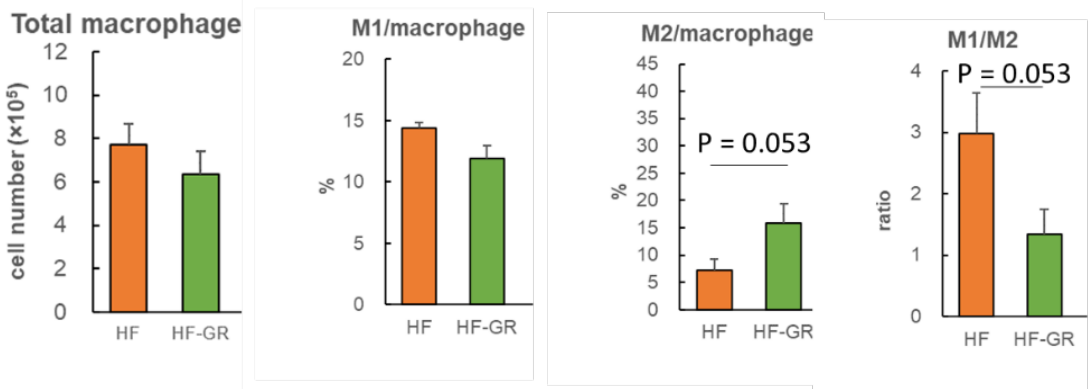


図 3. 肥満モデルの肝臓マクロファージに与えるグルコラファニンの影響

左から順に、総マクロファージ数、M1 マクロファージの割合、M2 マクロファージの割合、M1/M2 比。

3. NASH モデルにおけるグルコラファニンの効果の検討：飼料と実験方法

高コレステロール高脂肪食（60 kcal%脂肪含有、1.25%コレステロール含有 Research Diets、NJ、CL と省略）[1]に、GR または、抽出物の賦形剤として用いられるデンプン加水分解物（デキストリン、Veh と省略）を対照物として各々0.73%、2.2%配合し飼料を調製し、CL+0.73%Veh 群、CL+2.2%Veh 群、CL+0.73%GR 群、CL+0.22%GR 群とした。また、通常食を与えた NC 群を対照群とし、5 群に分類した。

雄性 7 週齢 C57BL/6J マウス（日本 SLC）を 1 週間馴化させた後、各飼料を 18 週間投与し、各種生化学パラメーターの測定を行った。採取した肝臓は、重量測定後に分割し、一部は−80℃で保存し、肝臓の一部はフローサイトメトリー解析により、肝臓内のマクロファージ数、M1/M2 極性を定量化した。

4. NASH モデルにおけるグルコラファニンの効果

NC 群、CL+0.73%Veh 群、CL+2.2%Veh 群、CL+0.73%GR 群、CL+0.22%GR 群間における体重の有意な変化はなく、CL 食により、体重増加は認められなかった。GTT により評価した耐糖能では、4 つの CL 群において、NC 群に比し、軽度の耐糖能の増悪が認められたが、GR による耐糖能への影響は認められなかった。図 4a には肝臓の病理組織像を示す。NC 群の正常肝に比し、CL+Veh 群では肝臓の脂肪化、炎症（HE 染色）。また、軽度の肝線維化（Sirius Red 染色）が認められ、早期の NASH の病理像を呈していた。CL+GR 群では、脂肪化、炎症、線維化に対する影響は見られず、NASH に対する組織学的改善は乏しかった。

また、肝臓内の脂質含量を定量化したところ、CL+Veh 群では NC 群に比し、中性脂肪（TG）、コレステロール、脂肪酸いずれも増加していたが、CL+GR 群では脂肪蓄積に対する影響はみられなかった（図 4b）。

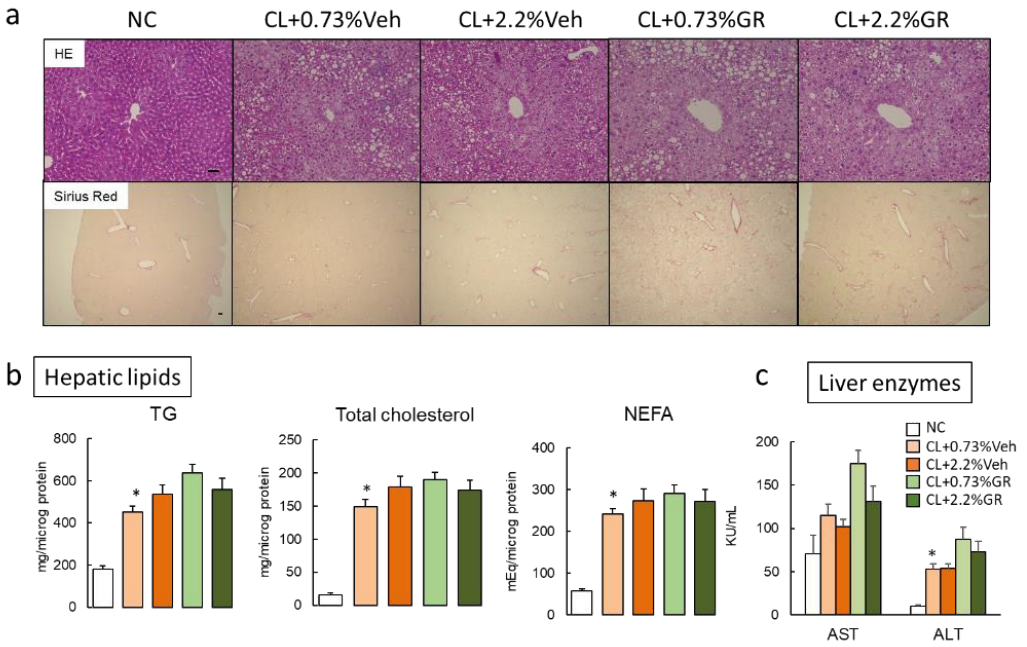


図 4. NASH モデルにおけるグルコラファニンの影響

a) 肝組織図（上段 HE 染色、下段 Sirius Red 染色、スケールバー：100 μm）。

b) 肝臓の脂質含量（TG：中性脂肪、総コレステロール、脂肪酸）。

c) 空肝機能 AST、ALT 値。*P＜0.05 vs NC。

また、CL+Veh 群では NC 群に比し、肝機能 ALT 値が増加したが、CL+GR 群では ALT 値に対する影響はみられなかった。AST 値は、各群間で有意な変化はなかった（図 4c）。

フローサイトメトリーを用いて、肝臓内のマクロファージの動態を検討したところ、NC 群（正常肝）に比し、CL+Veh 群では総マクロファージ数、炎症惹起性 M1 マクロファージ数は有意に増加していた。CL+Veh 群に比し、CL+GR 群では、総マクロファージ数、M1 マクロファージ数の減少傾向が認められたが、M2 マクロファージおよび M1/M2 比に影響は認められなかった。

考　察

我々は最近、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 を活性化するスルフォラファンの安定前駆体である GR が、高脂肪食肥満モデルの体重増加を減少させ、2 型糖尿病と単純性脂肪肝の発症を予防することを報告した［8］。今回、肥満モデルにおける治療効果の検討においても GR が、2 型糖尿病と脂肪肝を合併した進行した肥満に対して、インスリン抵抗性、耐糖能を改善し、脂肪肝を減弱させる治療効果があることを見出している（図 2）。元来、GR の活性体であるスルフォラファンは肝臓における解毒作用や種々のストレスに対する保護作用が知られており、本研究においても、GR は肝臓のマクロファージの極性を抗炎症性の M2 優位にシフトしていた（図 3）。一方、脂肪組織のマクロファージに対する影響は乏しく、肝臓における抗炎症作用が、全身のインスリン抵抗性や糖代謝の改善に寄与していることが示唆された。現在、GR の標的分子である Nrf2 の機能欠損および亢進したマウスを用いて GR の褐色脂肪化や熱産生に対する作用に着目し、そのエネルギー代謝調節メカニズムの検証を進めている。

また、NASH モデルに対する GR の明確な効果が認められなかった原因として、NASH を誘導する食餌の投与期間が短期間であり NASH の表現型が弱かったこと、また、今回用いた NASH モデルは肥満を呈さないため、肥満におけるエネルギー代謝亢進作用を有する GR の非肥満 NASH モデルへの作用が不十分であったことが挙げられる。今後、長期間 CL 食を投与した肝臓への強いリポトキシシティにより炎症、線維化を伴う NASH モデルを用いて、腸管透過性、腸内環境の変化に着目し、検証を行う。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学大学院細胞分子機能学の長田直人である。

文　献

1) Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. Hepatology. 2007;46(5):1392-403. Epub 2007/10/12. doi: 10.1002/hep.21874. PubMed PMID: 17929294.

2) Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, Nagata N, Kobori M, Sugiura M, et al. Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, beta-cryptoxanthin. Endocrinology. 2015;156(3):987-99. Epub 2015/01/07. doi: 10.1210/en.2014-1776. PubMed PMID: 25562616.

3) Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. Sci Rep. 2015;5:17192. Epub 2015/11/26. doi: 10.1038/srep17192. PubMed PMID: 26603489; PubMed Central PMCID: PMCPMC4658633.

4) Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(6):2399-403. Epub 1992/03/15. doi: 10.1073/pnas.89.6.2399. PubMed PMID: 1549603; PubMed Central PMCID: PMCPMC48665.

5) Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(19):10367-72. Epub 1997/09/18. PubMed PMID: 9294217; PubMed Central PMCID: PMC23369.

6) Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem Biophys Res Commun. 1997;236(2):313-22. Epub 1997/07/18. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943. PubMed PMID: 9240432.

7) Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. Nat Commun. 2016;7:11624. Epub 2016/05/24. doi: 10.1038/ncomms11624. PubMed PMID: 27211851; PubMed Central PMCID: PMCPMC4879264.

8) Nagata N, Xu L, Kohno S, Ushida Y, Aoki Y, Umeda R, et al. Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. Diabetes. 2017;66(5):1222-36. Epub 2017/02/18. doi: 10.2337/db16-0662. PubMed PMID: 28209760.