

芝浦工業大学

博士学位論文

肥満モデルマウスに対する

トコトリエノールの効果について

The effects of tocotrienols on obesity model mice

令和4年3月

芝浦工業大学大学院 理工学研究科 機能制御システム専攻

分子細胞生物学研究室

加藤優吾

指導教員 福井浩二

目次

序論.....	- 6 -
肥満.....	- 6 -
生体内の酸化と抗酸化.....	- 8 -
生体内での酸化還元バランスの破綻.....	- 11 -
肥満と酸化ストレス.....	- 15 -
トコトリエノール.....	- 19 -
ビタミン E(Vitamin E : VE).....	- 19 -
トコトリエノールの抗酸化作用.....	- 21 -
トコトリエノールの抗酸化作用以外の作用.....	- 23 -
神経保護作用.....	- 23 -
抗肥満作用.....	- 25 -
認識機能障害.....	- 27 -
認知症.....	- 27 -
肥満と認識機能障害.....	- 28 -
認識機能障害と酸化ストレス.....	- 30 -
研究目的.....	- 32 -
第 1 章 36 週齢の高脂肪食投与による肥満モデルマウスに対する 50mg/100g diet の T3s 投与.....	- 33 -
実験方法.....	- 33 -
実験動物.....	- 33 -
認識機能測定.....	- 35 -
モーリス水迷路試験.....	- 35 -
ロータロッド試験.....	- 36 -
過酸化脂質の測定.....	- 36 -
ウェスタンブロッティング(WB).....	- 37 -
T3s の定量.....	- 38 -
統計分析.....	- 38 -
実験結果.....	- 39 -
1.T3s は 36 週齢のマウスにおいて体重増加を抑制する.....	- 39 -
2.認識機能に対する HFD 及び T3s 摂取の影響.....	- 41 -
各マウスの認識機能.....	- 41 -
脳内 α -T3 量の変化.....	- 43 -
HFD 及び T3s 投与による脳内酸化度の変動.....	- 44 -
HFD 及び T3s 投与による脳内抗酸化酵素の発現変化.....	- 45 -
考察.....	- 46 -

1.T3s の抗肥満作用について	- 46 -
2.認識機能に対する HFD 及び T3s 投与の影響に関して	- 47 -
結論	- 48 -
第2章 4週齢の高脂肪食投与による肥満モデルマウスに対する 50mg/100g diet の T3s 投与	- 49 -
実験方法	- 49 -
実験動物	- 49 -
脂肪滴の染色	- 50 -
血清生化学検査	- 50 -
認識機能測定	- 51 -
モーリス水迷路試験	- 51 -
ロータロッド試験	- 52 -
酸化型(GSSG)および還元型(GSH)グルタチオンの測定	- 53 -
ウェスタンブロッティング(WB)	- 53 -
T3s の定量	- 54 -
統計分析	- 55 -
実験結果	- 56 -
1.T3s はマウスの体重増加を抑制する	- 56 -
2.T3s の体重増加抑制以外の抗肥満作用	- 58 -
T3s の肝臓保護効果	- 58 -
T3s による白色脂肪組織重量の変化	- 61 -
T3s による血清コレステロールの変化	- 63 -
3.認識機能に対する HFD 及び T3s 摂取の影響	- 64 -
各マウスの認識機能	- 64 -
T3s 摂取による脳内 α -T3 量の変化	- 66 -
肥満および T3s 摂取による脳内酸化度の変化	- 68 -
肥満及び T3s による脳内抗酸化酵素発現の変化	- 69 -
肥満及び T3s による脳内神経栄養因子の発現変化	- 70 -
考察	- 71 -
1.T3s の抗肥満作用について	- 71 -
T3s の体重増加抑制作用に関して	- 71 -
T3s の体重増加抑制以外の抗肥満作用に関して	- 72 -
2.肥満及び T3s 摂取による認識機能の変動について	- 73 -
特別食による認識機能変動	- 73 -
結論	- 77 -
第3章 結論	- 78 -

参考文献	- 79 -
謝 辞	- 86 -
博士課程在学中の研究業績	- 88 -
学術論文.....	- 88 -
学会発表.....	- 89 -
受賞	- 92 -

概要

肥満は Body Mass Index(BMI)の値を基準に判断されており、日本では BMI が 25 以上、世界保健機関では 30 以上と定義されている。肥満はガンや糖尿病などの根治が困難であり、患者の生活の質を低下させる二次的疾患の発症リスクを高めるため、世界中で社会問題となっている。そのため、天然に存在する物質による肥満の予防・治療を目指す抗肥満研究に世間の注目が集まっている。我々は 2019 年にビタミン E の一種であるトコトリエノール(T3s)が高脂肪食投与による体重増加を有意に抑制することを明らかとした。しかしながら、この際用いた実験動物は、まだ成長により体重が増加する 4 週齢のマウスであった為、T3s が肥満による体重増加を抑制したのか、成長による体重増加を阻害したのか判断できなかった。加えて、T3s が体重増加以外に抗肥満作用を發揮するのかに関しては不明であった。そこで本研究では、T3s の体重増加抑制作用のメカニズム及び、体重増加抑制以外の抗肥満作用の解明に取り組んだ。

近年、肥満は糖尿病などだけではなく、アルツハイマー病のような認識機能障害の発症リスクを高めるという報告が散見される。しかし、肥満による認識機能低下リスクの増加は既知であるが、肥満がどのように認識機能を低下させるのかに関しては未解決である。我々は、げっ歯類において脳内の酸化亢進が認識機能を低下させることを明らかにしている。そこで、肥満による認識機能の低下にも脳内の酸化が関与しているのではないかと着想した。また、T3s は強力な抗酸化作用に加え、神経保護作用を持つことが報告されている。そのため、T3s は肥満による認識機能低下を抑制する可能性がある。そこで本研究では、肥満による認識機能低下のメカニズム、そして、それに対する T3s の効果を検討した。

本研究では、T3s は体重増加以外に、肥満による脂肪肝に伴う肝細胞の損傷や血清コレステロール濃度の上昇、白色脂肪組織重量の蓄積を有意に抑制することを明らかとした。さらに、高脂肪食投与による肥満では認識機能に変化は無いことを明らかとした。

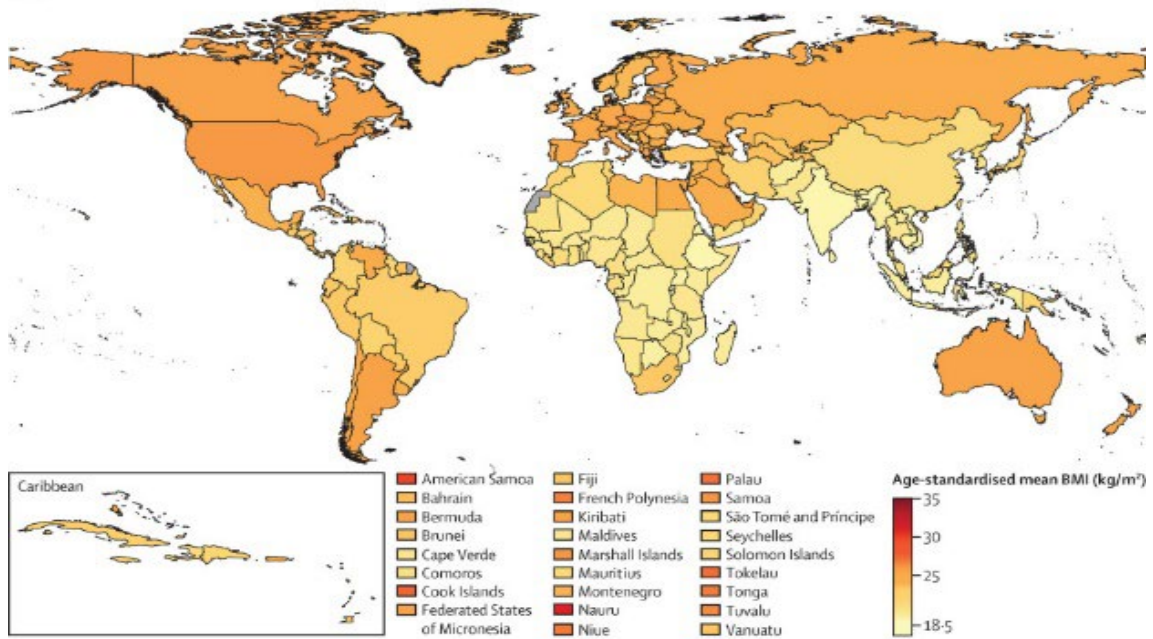
本研究結果から、T3s は体重増加抑制以外にも抗肥満作用を示し、高脂肪食投与による肥満では認識機能が低下しないことが示唆された。

序論

肥満

近年世界中で、食生活の欧米化や運動機会の減少により、肥満者が増加している。日本における肥満は、Body Mass Index (BMI, 体重[kg]÷身長[m]の二乗)の値が 25 以上の場合であると定義されている。一方で、世界保健機関(World Health Organization : WHO)が定めた基準では、BMI が 30 を超えると肥満とされている。この肥満の基準として使用されている BMI の世界の平均値は男女ともに上昇しており(図 1-1)、1975 年から 2014 年の間に肥満者数は約 3 倍に増加した⁽¹⁾。肥満は、様々な疾患の危険因子として知られている。例えば、糖尿病や心血管系疾患である^(2,3)。これらの疾患は、発症メカニズムが複雑で根治が困難であるため、肥満の予防に世界中の注目が集まっている。特に日常的に食事から摂取可能な天然に存在している物質による肥満の予防研究が活発になっている。

1975



2014

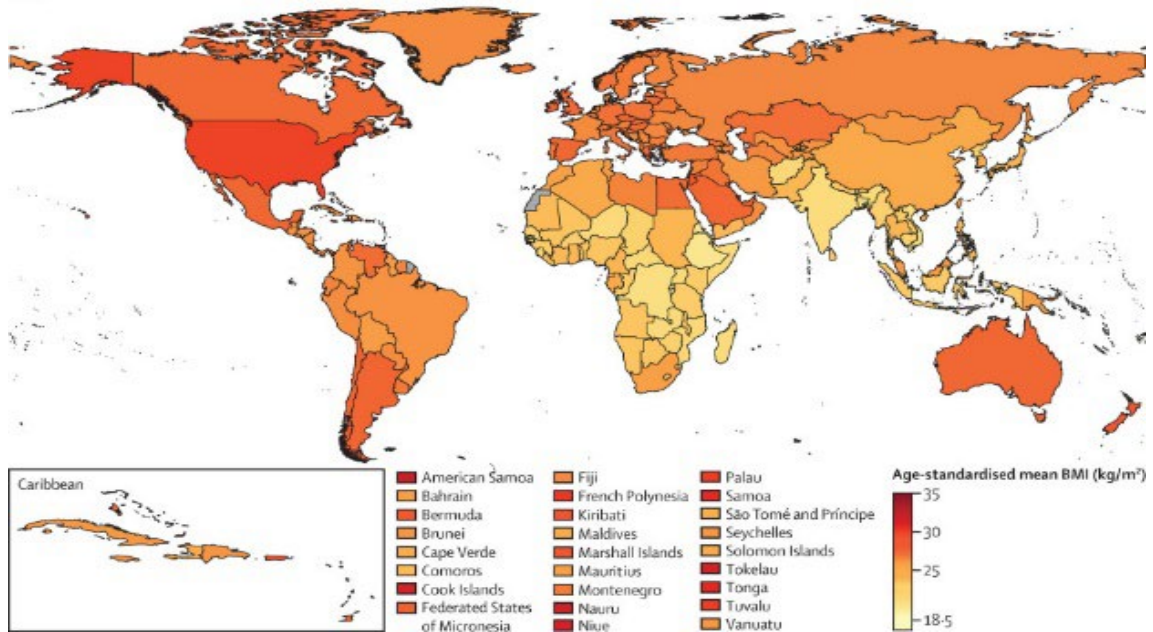


図 1-1 男性の 1975 年と 2014 年の国別平均 BMI⁽¹⁾

1975 年(上)と 2014 年(下)の世界各国の BMI 平均値。色が濃いほど平均値が高いことを示しており、2014 年の方が各国で平均値が高い。

生体内の酸化と抗酸化

鉄などが酸化し錆びるのと同様に、生体を構成する物質も常に酸化している。この生体の構成物質を酸化する物質として、活性酸素種(Reactive oxygen species : ROS)とフリーラジカルが知られている。ROS は酸素が含まれる反応性の高い物質の総称であり、狭義の意味では、過酸化水素(Hydrogen peroxide : H_2O_2)とヒドロキシラジカル(Hydroxyl radical : $OH\cdot$)、一重項酸素、スーパーオキシド(Superoxide : O_2^-)を指す⁽⁴⁾。通常原子や分子は電子を対になる形で保有しているが、フリーラジカルは電子が対になっていない不対電子を持つ原子や分子のことである。つまり ROS の中でも、 $OH\cdot$ と O_2^- は ROS であり、フリーラジカルでもある。

好気性生物の生体では、ミトコンドリアの電子伝達系を介して、生存に必要なエネルギーであるアデノシン三リン酸(Adenosine triphosphate : ATP)を産生している。この時、複合体を移動する電子が漏れ出し、マトリックスや膜間腔に存在する酸素と反応し O_2 が産生される⁽⁵⁾(図 1-2)。

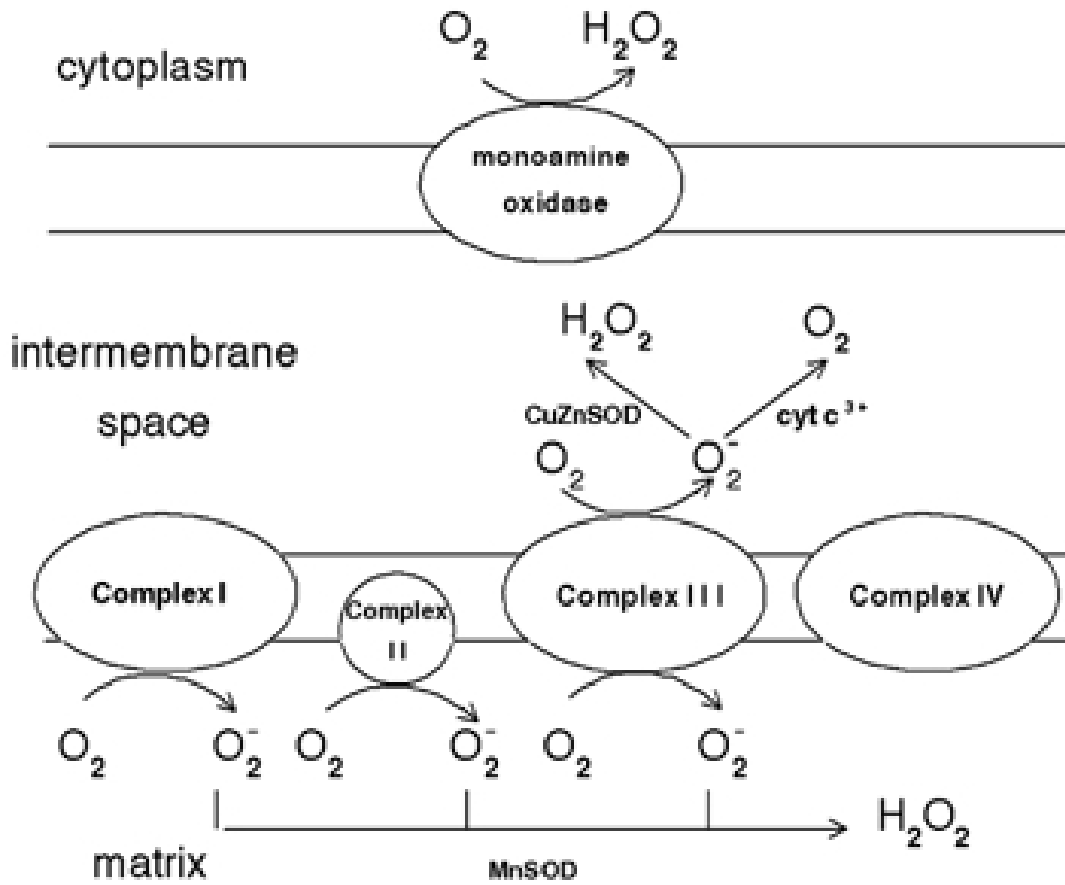


図 1-2 ミトコンドリアにおける O_2^- の生成⁽⁵⁾

ミトコンドリアにおける ROS の生成経路。モノアミンがモノアミンオキシダーゼにより代謝される際に ROS が生じる。さらに、ミトコンドリア呼吸鎖(Complex I、II、III、IV)ではプロトンや電子を順番に授受することでエネルギーを生成している。この際に、Complex から電子が漏れ出て近傍の酸素と反応し、 O_2^- が発生する。CuZnSOD=銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ、cyt c=シトクロム C、MnSOD=マンガンスーパーオキシドディスムターゼ。

この O_2^- は、抗酸化酵素の一種であるスーパーオキシドディスムターゼ(Superoxide dismutase : SOD)の働きにより、 H_2O_2 に分解される⁽⁶⁾。この反応により生成した H_2O_2 は、カタラーゼ(Catalase : CAT)やグルタチオンペルオキシダーゼ(Glutathione peroxidase : GPx)の働きで水と酸素に分解され、無毒化される⁽⁷⁾。しかし、発生した H_2O_2 の近辺に鉄や銅などの金属イオンが存在していると、容易に反応して $OH\cdot$ が発生する⁽⁸⁾(図 1-3)。このようにして生体内では常に、ROS やフリーラジカルが発生している。

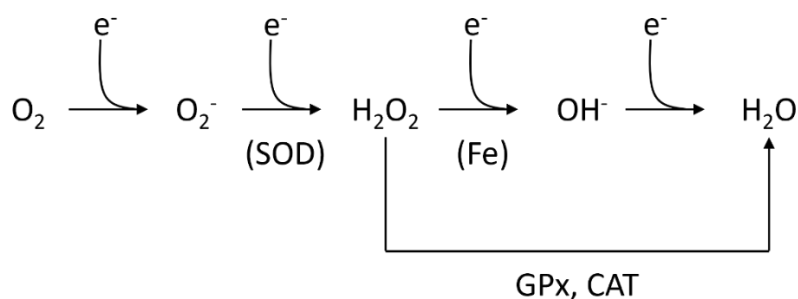


図 1-3 酸素の 4 電子還元と抗酸化酵素による消去

ヒトやマウスなどの生体には ROS やフリーラジカルによる酸化に対抗する機能が備わっている。生体内での抗酸化防御機構は大きく、抗酸化酵素群と抗酸化物質の二種類に分けられる。抗酸化酵素には主に、SOD、GPx そして CAT が存在する^(7, 9)。これらの抗酸化酵素は生体内で作られるタンパク質である。一方で抗酸化物質は、生体内で作られる物質のほかにも、食事などで体外から摂取した抗酸化作用を持っている物質も存在する。そのため抗酸化物質による生体の抗酸化作用機序は、物質の性質により異なる。例えば、脂溶性物質であるビタミン E (Vitamin E : VE) は自身が酸化されることで細胞膜の酸化を防ぎ、水溶性の抗酸化物質であるアスコルビン酸 (Vitamin C : VC) は抗酸化作用を発揮した後の酸化した VE が再び活性を発揮できるように再生を促す^(10, 11)。このようにして、生体内では酸化と抗酸化のバランスが保たれている。

生体内での酸化還元バランスの破綻

酸化ストレスという言葉は、生体内の酸化と抗酸化のバランスが、何らかの原因で酸化側に傾いた状態のことを示す。酸化と抗酸化のバランスが酸化側に傾く(酸化ストレス状態)と、ROS やフリーラジカルによりデオキシリボ核酸(Deoxyribo nucleic acid : DNA)や脂質、タンパク質などの生体を構成する成分が酸化される。そのためこれら成分が酸化したものは、酸化ストレスのバイオマーカーとして広く利用されている。例えば DNA の場合、DNA を構成する塩基の一種である 2'-デオキシグアノシンが酸化した、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : 8-OHdG)がマーカーとして用いられている⁽¹²⁾(図 1-4)。8-OHdG は尿で検出できる為、非侵襲的に生体の酸化還元バランスを把握できる。

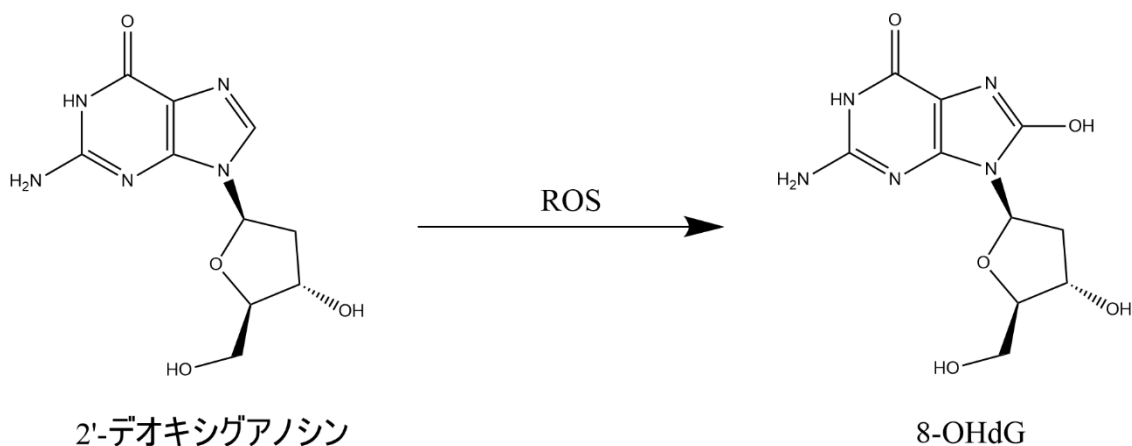


図 1-4 8-OHdG の生成

脂質の酸化マーカーとしては、過酸化脂質が広く測定されている。脂質(Lipid : LH) は一度酸化されると、脂質ラジカル(Lipid radical : L·)となり酸素と反応し、脂質ペルオキシラジカル(Lipid peroxy radical : LOO·)となる。この LOO· は他の LH を酸化させ、自身は過酸化脂質(Lipid peroxide : LOOH)となる(図 1-5)。そのため、脂質は一度酸化されてしまうと連鎖的に酸化反応が続く⁽¹³⁾。この時生成する LOOH を、脂質の酸化ストレスマーカーとして一般的に測定する。LOOH を直接測定する場合もあれば、チオバルビツール酸などと反応させ、生成した物質を測定する間接的な測定法も存在する。さらにアラキドン酸などの不飽和脂肪酸が酸化されると、4-ヒドロキシ-2-ノネナル(4-hydroxy-2-nonenal : 4-HNE)と呼ばれるアルデヒドになり、この 4-HNE はタンパク質に付加する。この為、タンパク質の発現比を測定するウェスタンブロッティング法にて抗 4-HNE 抗体を用いることでも、脂質の酸化度が測定できる。

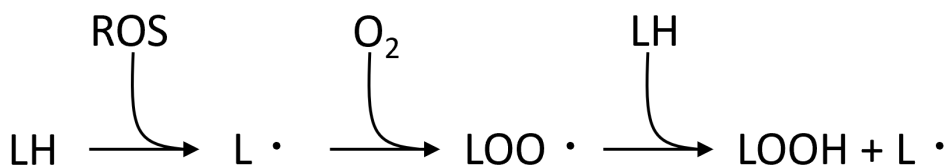


図 1-5 脂質の酸化連鎖反応

タンパク質が酸化したマーカーとしては、3-ニトロチロシン(3-Nitrotyrosine : 3-NT)が広く測定されている。生体内で O_2 は、一酸化窒素(Nitric oxide : NO)と反応しより酸化力の強い、ペルオキシナイトライト(Peroxynitrite : ONOO⁻)に変換される⁽¹⁴⁾。このONOO⁻がタンパク質のチロシン残基を攻撃して生成したものが、3-NTである⁽¹⁵⁾(図1-6)。

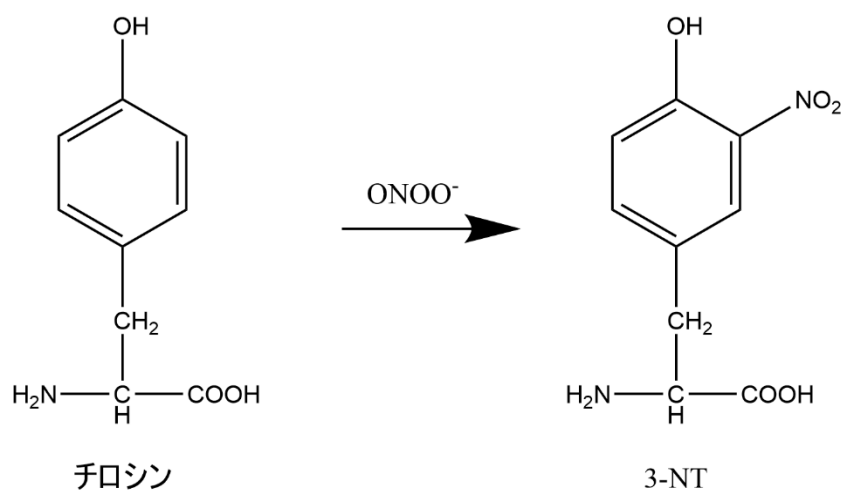


図 1-6 3-NT の生成

生体の酸化ストレスは、様々な疾患の発症や進行と深く関与している。例えば、糖尿病患者の血清、尿中では、前述の酸化の指標である 8-OHdG の濃度が有意に高く同時に、抗酸化酵素である SOD の活性が有意に低いことが報告されている⁽¹⁶⁾(図 1-7)。また近年、脳内の酸化ストレスの亢進が糖尿病の発症に関与していることも報告された⁽¹⁷⁾。さらに、血中に存在する低密度リポタンパク質(Low-density lipoprotein : LDL)が ROS などにより酸化されると、酸化型の LDL となり血管壁に付着し、動脈硬化を引き起こす。これにより心血管系疾患が惹起される^(18, 19)。

このように生体では常に酸化と抗酸化がバランスを取っており、そのバランスが崩壊することで様々な生体の異常を引き起こす。

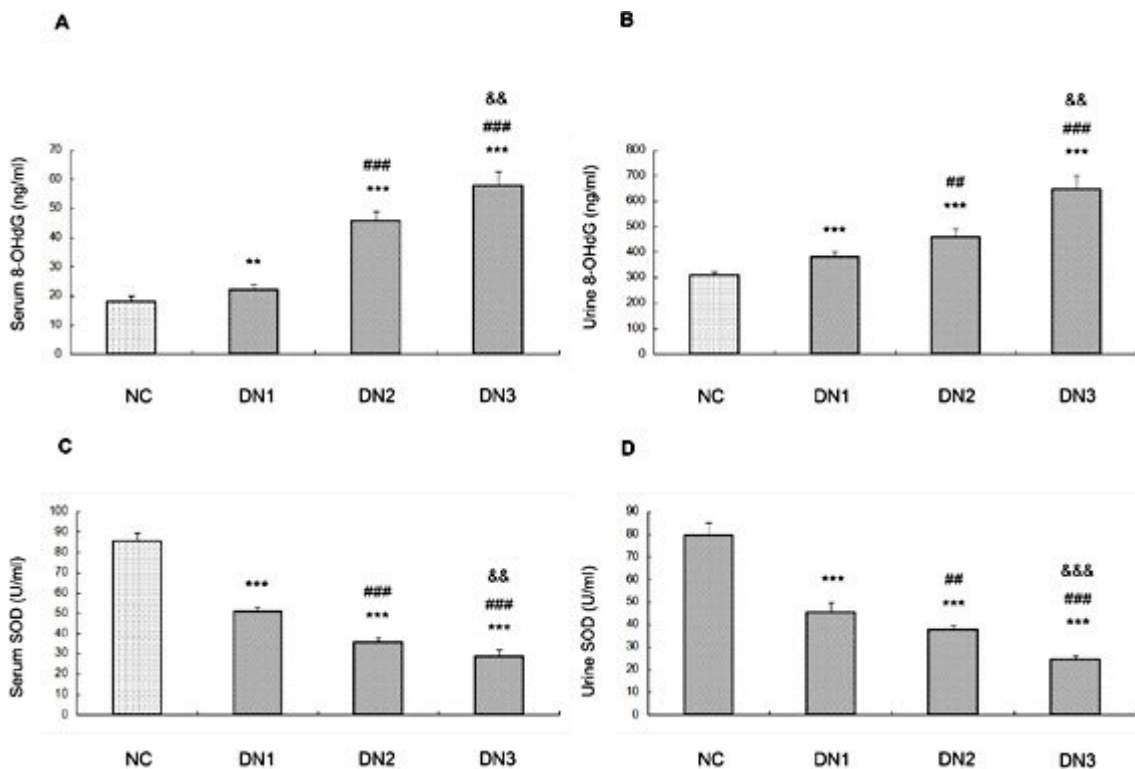


図 1-7 糖尿病患者の血清、尿における酸化ストレスの亢進⁽¹⁶⁾。

血清(A, C)と尿(B, D)中の 8-OHdG 濃度と SOD の活性。NC=対照群、DN1=糖尿病性腎症(正常アルブミン尿症)、DN2=糖尿病性腎症(微量アルブミン尿)、DN3=糖尿病性腎症(マクロアルブミン尿)。** p<0.01 vs. NC, *** p<0.001 vs. NC, ## p<0.01 vs. DN1, ### p<0.001 vs. DN1, && p<0.01 vs. DN2, &&& p<0.001 vs. DN2。

肥満と酸化ストレス

肥満と酸化ストレスの関係も報告されている。Furukawa らは、肥満モデルマウスの血漿や白色脂肪組織中で酸化ストレスが亢進していることを報告している。その報告によると肥満モデルマウスとして知られている、KKAy マウスの血漿および白色脂肪組織中では、過酸化脂質の指標であるチオバルビツール酸反応生成物(Thiobarbituric acid reactive substances : TBARS)と H_2O_2 の濃度が、対照マウスに比べ有意に高いことが認められた(図 1-8)。その原因として、白色脂肪組織での抗酸化酵素の発現低下、および ROS 産生を担っている NADPH オキシダーゼ(NADPH oxidase : NOX)のサブユニットのメッセンジャーリボ核酸(messenger ribonucleic acid : mRNA)レベルでの発現上昇を報告している⁽²⁰⁾(図 1-9)。

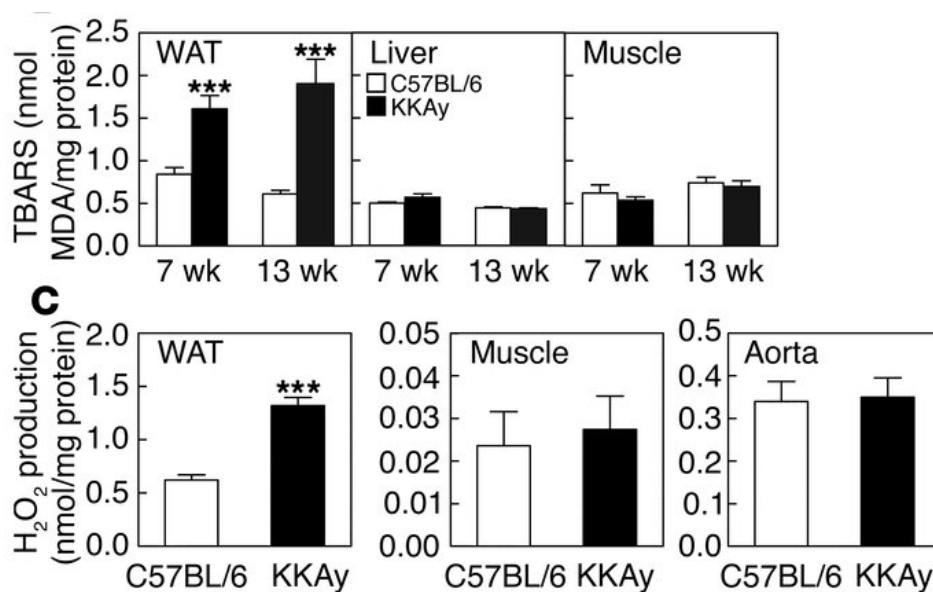


図 1-8 肥満による生体内の酸化ストレス⁽²⁰⁾

7 週齢、13 週齢における対照マウスと肥満モデルマウスの過酸化脂質(A)及び H_2O_2 (B)量。WAT=白色脂肪組織、Liver=肝臓、Muscle=骨格筋、Aorta=大動脈。*** $p < 0.001$ vs. C57BL/6。

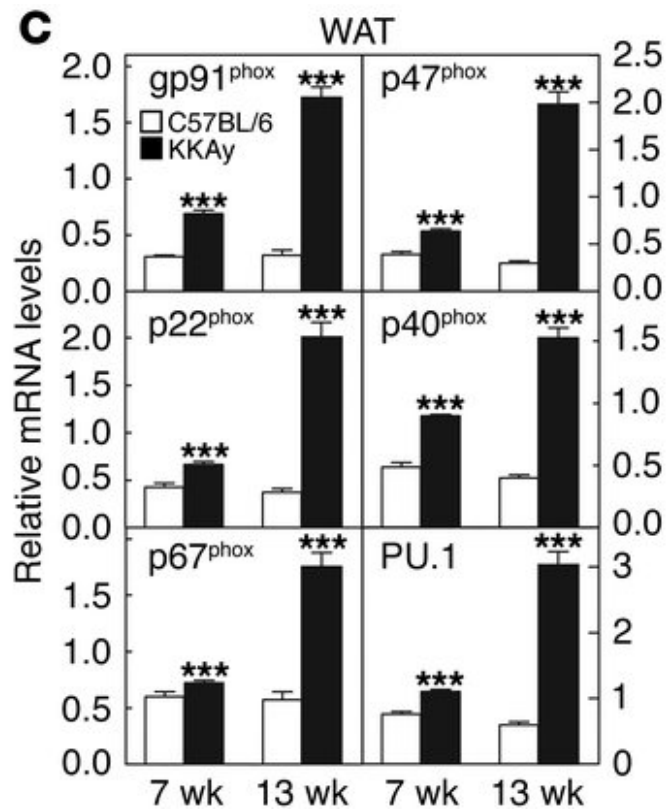


図 1-9 肥満による NOX 発現の上昇⁽²⁰⁾

WAT=白色脂肪組織。gp91^{phox}、gp47^{phox}、p22^{phox}、p40^{phox}、p67^{phox}、PU.1=NOX のサブユニット。*** p<0.001 vs. C57BL/6。

さらに Royo らの論文では、6 週齢の雄性 Wistar ラットに 7 週間、高脂肪食を給餌したところ、精巣周囲脂肪組織において、過酸化脂質のマーカである 4-HNE が、対照食給餌ラットに比べて有意に高かったことが報告されている⁽²¹⁾。上記の様に肥満時には、生体内では酸化ストレスが亢進している。

肥満により引き起こされる合併症にも酸化ストレスが関与している。肥満者の多くは、肝細胞に脂肪滴が過剰に蓄積した脂肪肝を併発している。脂肪肝の中には、肝臓での鉄の蓄積や炎症、酸化障害の蓄積を介して肝臓ガンへと進行する非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) が存在する⁽²²⁾。しかしながら逆に、酸化ストレス自体が脂肪肝の発症に関与するという報告も存在する。Jin らは、ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 細胞に H_2O_2 を添加すると、脂肪滴の形成に必要な perilipin2 の発現上昇を介して細胞内の脂肪滴が増加することを報告している⁽²³⁾(図 1-11)。

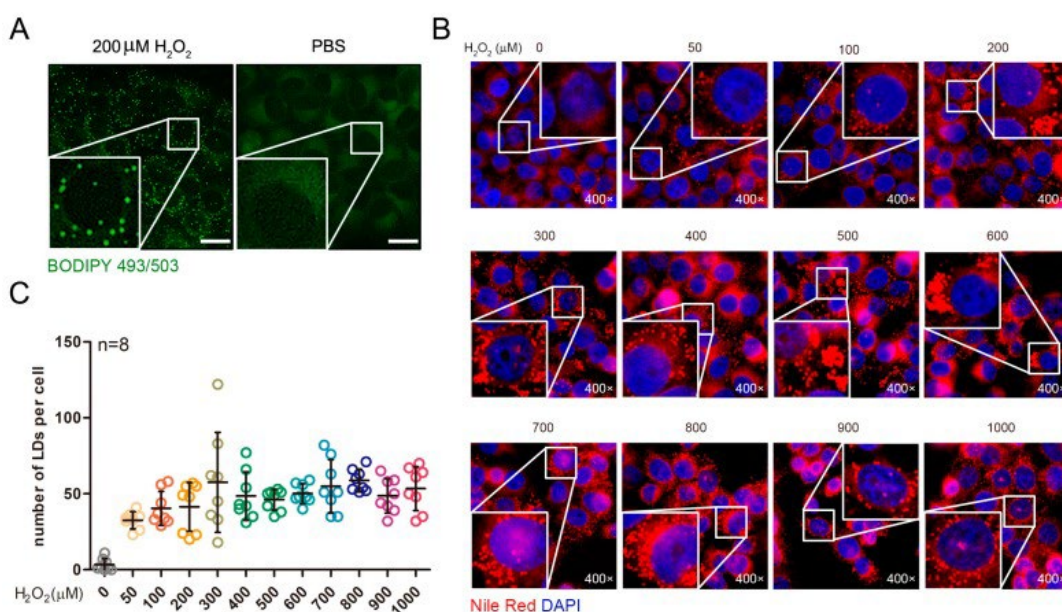


図 1-11 H_2O_2 添加による培養肝細胞での脂肪滴の増加⁽²³⁾

BODIPY & Nile Red=脂肪滴染色蛍光試薬、PBS=リン酸緩衝食塩水、LDS=脂肪滴。

さらに、Yang らは、HepG2 細胞に脂肪酸を添加すると脂肪滴の蓄積が誘導されること、およびその脂肪滴の蓄積は VC や N-アセチルシステイン(N-acetylcysteine:NAC)、アスタキサンチン(Astaxanthin : ATX)などの抗酸化物質の同時添加で抑制できることを報告している⁽²⁴⁾(図 1-12)。このように、脂肪の蓄積自体に酸化ストレスが関与している可能性がある。

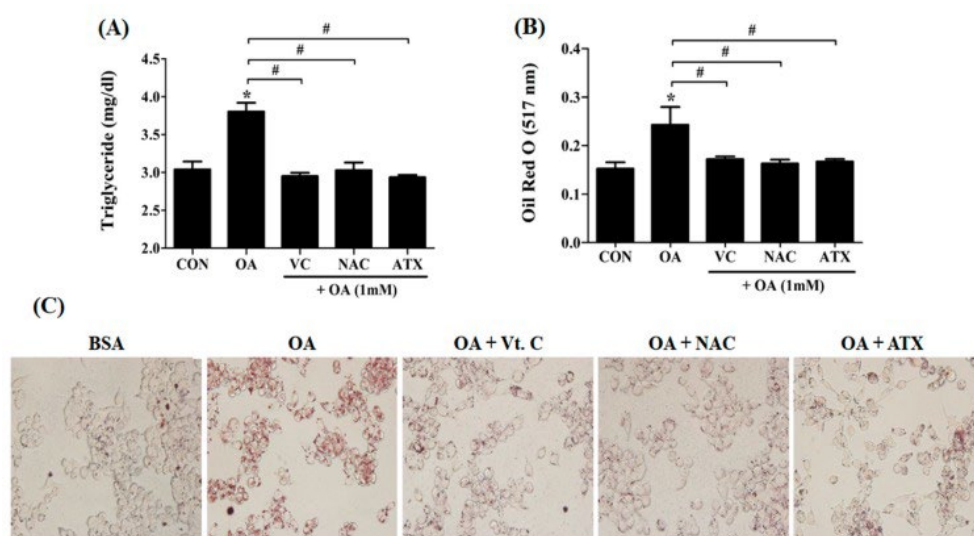


図 1-12 脂肪酸の添加による脂肪滴蓄積と抗酸化物質による予防⁽²⁴⁾

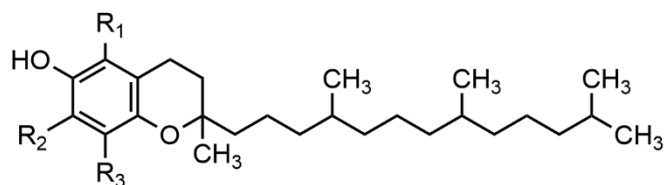
CON=対照群、OA=オレイン酸添加群。VC=ビタミン C 添加群、NAC=NAC 添加群、ATX=アスタキサンチン添加群。* p<0.05、# p<0.05。

トコトリエノール

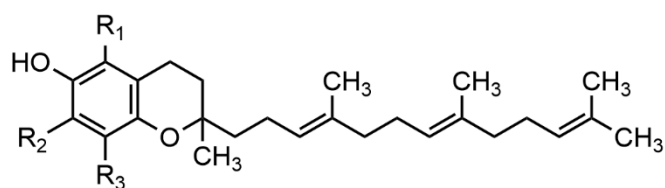
ビタミン E (Vitamin E : VE)

VE は脂溶性ビタミンの一種であり、パーム油や米ぬか、小麦、ナッツ類などに多く含まれている⁽²⁵⁾。ヒトの体内では合成されないため、食事を通して摂取する必要がある。VE は化学構造の違いにより、8 種類存在する。クロマン環に結合している側鎖の二重結合の有無で、トコトリエノール(Tocotrienols : T3s)とトコフェロール(Tocopherols : TOCs)に大きく分類される。さらにそれぞれ、クロマン環に結合するメチル基の数や位置の違いにより、 α -、 β -、 γ -、 δ -体が存在する⁽²⁶⁾(図 1-13)。同族体の種類により異なる様々な生理作用が報告されているが、VE に共通している代表的な作用は抗酸化作用である^(27, 28)。

トコフェロール



トコトリエノール



	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

図 1-13 VE の構造式

食事とともに摂取した VE は、小腸から吸収される。吸収された VE はカイロミクロンとしてリンパ管に放出され、その後血中に放出され肝臓へ向かう。肝臓へ到達した α -TOC は、 α -トコフェロール輸送タンパク質(Tocopherol transfer protein : TPP)により選択的にリポタンパク質に組み込まれる。この α -TTP は、VE 同族体の中でも α -TOC と最も親和性が高いため、生体内に存在する VE のほとんどは α -TOC である。 α -TOC 以外の VE 同族体も微量ながら α -TTP と結合し、リポタンパク質中に組み込まれる。 α -TTP と結合しなかった VE 同族体は、胆汁または尿中に排出される⁽¹⁰⁾(図 1-14)。そのため VE 過剰症を発症することは珍しく、まれに VE 過剰による血液凝固の阻害などが報告されている⁽²⁹⁾。

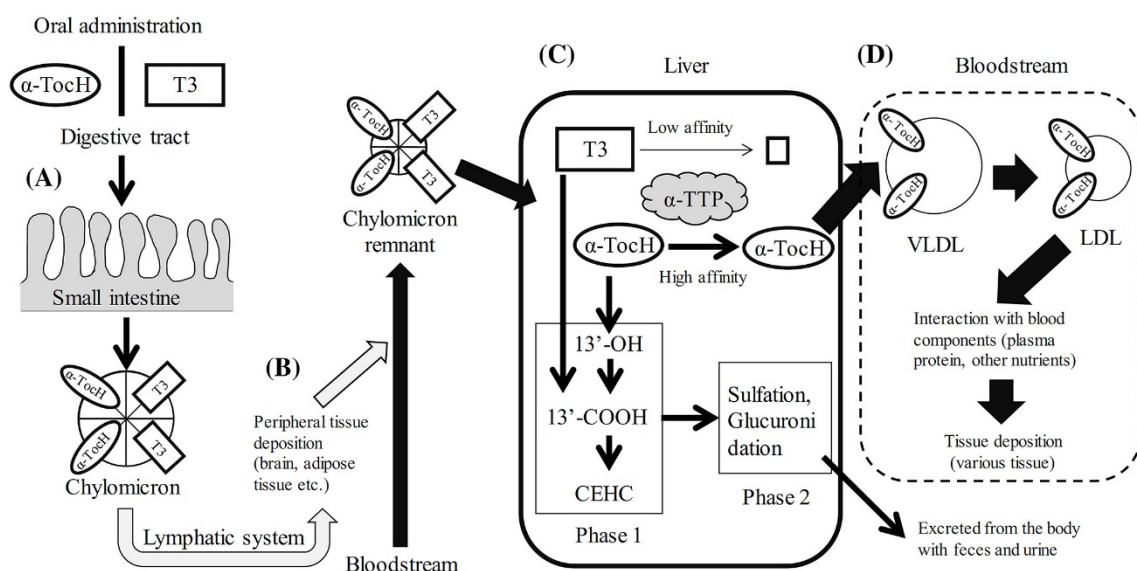


図 1-14 ビタミン E 輸送と代謝⁽¹⁰⁾

α -TocH= α -トコフェロール、T3=トコトリエノール、 α -TTP= α -トコフェロール輸送タンパク質、13'-OH=13'-hydroxychromanol、13'-COOH=13'-carboxychromanol or 13'-carboxytrieneol、CEHC=carboxyethylhydroxychromanols、VLDL=超低密度リポタンパク質、LDL=低密度リポタンパク質。

トコトリエノールの抗酸化作用

前述の通り VE 同族体は抗酸化作用を発揮する。これは、クロマン環に結合しているヒドロキシ基がラジカルを還元し(自身は酸化される)、無毒化するためである。VE は脂溶性ビタミンのため、主に生体膜に存在している⁽¹⁰⁾。このため、VE の抗酸化能は生体膜の脂質酸化を防止するために発揮される。前述の脂質の連鎖反応の際、VE が存在すると L・や LOO・と VE が反応し VE はラジカルとなり、L・と LOO・は LH または LOOH となり連鎖反応がストップする(図 1-15)。このように VE の抗酸化作用は主に脂質の酸化抑制として働く⁽³⁰⁾。また、O₂・や OH・などといったフリーラジカルを直接消去する⁽³¹⁾。

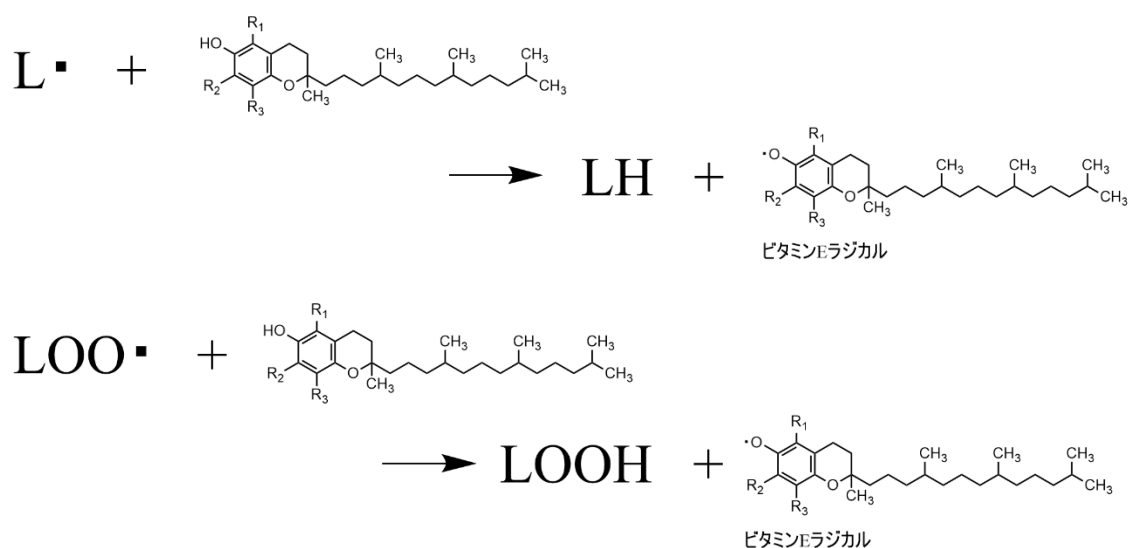


図 1-15 VE による脂質連鎖反応の停止機序

既に述べたように肝臓の α -TTP の働きにより生体内の VE 同族体組成は、 α -TOC が圧倒的に多いが、抗酸化活性は、TOCs よりも T3s のほうが強いことが報告されている^(32, 33)。その理由として、T3s の方が TOCs と比較して細胞膜に取り込まれやすいこと、膜表面に存在しやすいことがあげられ、抗酸化作用を發揮しラジカルになった後、再生されやすいことなどが知られている^(34, 35)。この VE ラジカルから各 VE 同族体への還元反応には他の抗酸化物質が関与している。例えば、VC として知られているアスコルビン酸は、VE ラジカルを VE に直接還元することが良く知られている。一方で、グルタチオンやリポ酸などは VC を介して間接的に VE ラジカルを還元することが報告されている⁽³⁶⁾(図 1-16)。

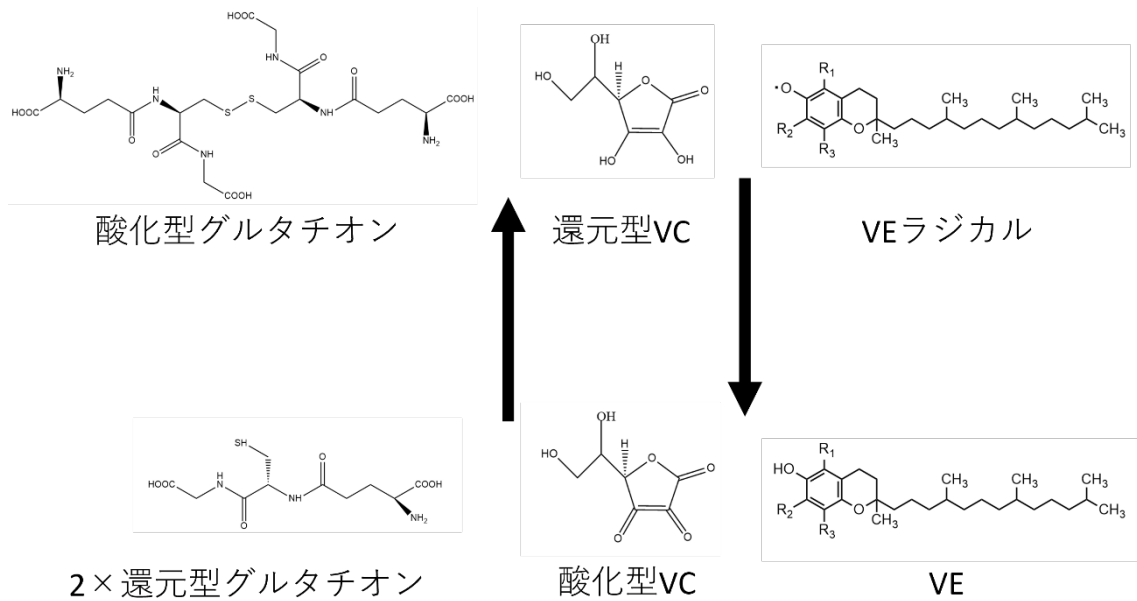


図 1-16 VE ラジカルの再生

トコトリエノールの抗酸化作用以外の作用

T3s は前述の抗酸化作用以外にも、神経保護作用や抗ガン作用、抗肥満作用などの様々な有益な作用を生体内で発揮することが報告されている。

神経保護作用

当研究室では、培養神経細胞に H_2O_2 を添加すると細胞死が発生すること、また、低濃度の H_2O_2 添加では神経突起や樹状突起上にビーズ状の凝集物が出現し変性が起こることを報告している。この時同時に T3s を添加すると、細胞死と神経変性を予防できることも報告している。さらに T3s 添加時の神経突起上の凝集物の発生数は、 α -TOC 添加時と比較して有意に低値を示した^(37, 38) (図 1-17)。

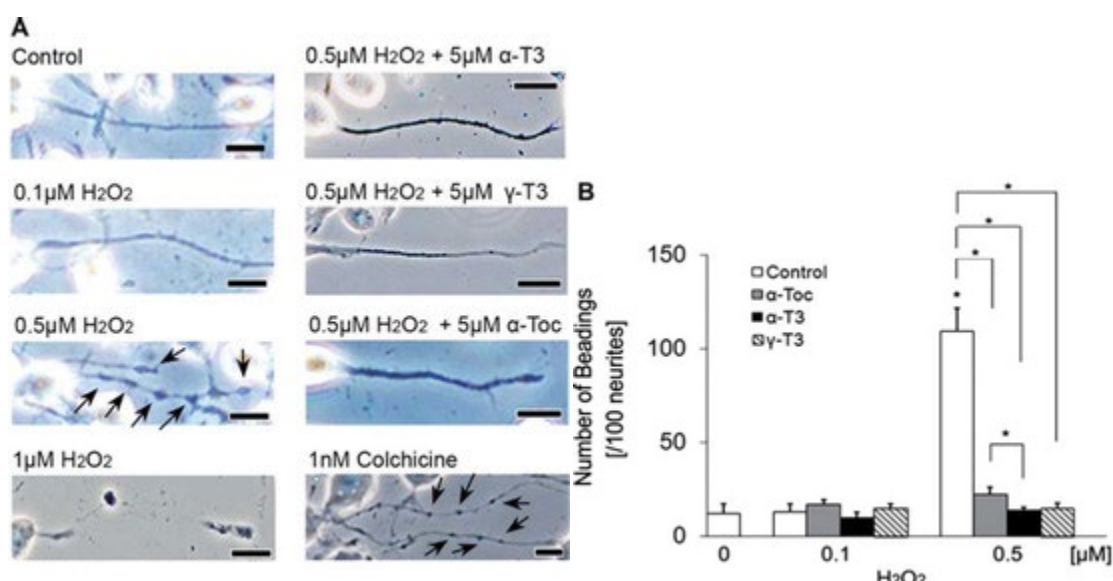


図 1-17 H_2O_2 添加による神経突起変性と T3s による予防⁽³⁷⁾

* $p < 0.05$.

このメカニズムには、コラプシン反応媒介タンパク質 2(Collapsin response mediator protein : CRMP)2 が変性することが示唆されている。CRMP2 は、チューブリンに結合し微小管の重合促進や安定化に関与するタンパク質である(CRMP2 の微小管への結合能はリン酸化により制御されている)。H₂O₂ 添加による神経変性発生時には、この CRMP2 の変性が発生し、T3s の同時添加はこの変性を抑制することを明らかにしている(図 1-18)。

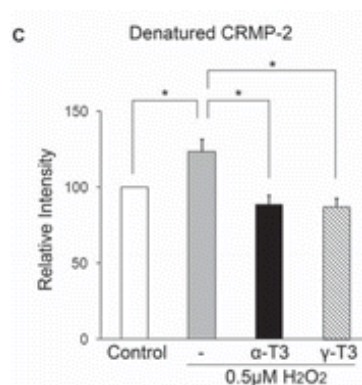


図 1-18 H₂O₂ 添加による CRMP-2 の変性と T3s による予防⁽³⁷⁾

* p < 0.05。

また *in vivo* では、酸化ストレス亢進モデルや老齢マウスの脳内で、CRMP2 のリン酸化が亢進していることも報告した⁽³⁹⁾。上記以外にも T3s はエストロゲン受容体と結合し、パーキンソン病モデル細胞において神経保護作用を発揮することが報告されている⁽⁴⁰⁾。

しかし、T3s が生体内で神経保護作用を発揮するためには、血液脳関門(Blood brain barrier : BBB)を通過し、神経細胞に到達する必要があるが、T3s は BBB を通過しないのではないかという報告がある⁽⁴¹⁾。一方、同じ VE の一種である α-TOC は高密度リポタンパク質コレステロール(High-density lipoprotein : HDL)受容体であるスカベンジャー受容体クラス B メンバー1(Scavenger receptor class B, type 1 : SRB1)により HDL と結合した状態で BBB を通過することが報告されている⁽⁴²⁾。そのため *in vivo* で T3s の神経保護作用を検証する際には、標的臓器である脳への分布に関しても検討する必要がある。

抗肥満作用

我々は2019年に、マウスに高脂肪食と同時にT3sを与えると、体重増加が有意に抑制されることを明らかとした⁽⁴³⁾(図1-19)。そしてこの際、マウスの摂食量にT3sの有無で変化は無かった。

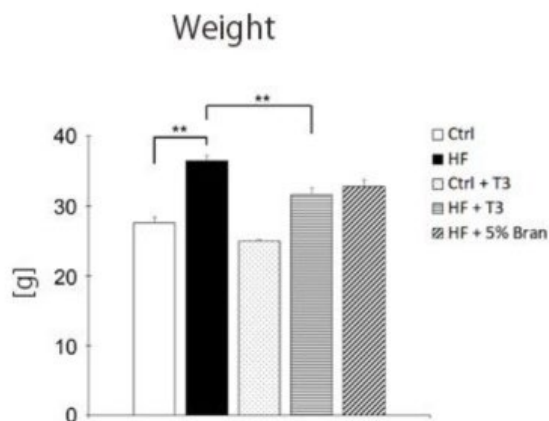


図1-19 T3sによる体重増加の抑制⁽⁴³⁾

Ctrl=対照食群、HF=高脂肪食群、Ctrl+T3=対照食+T3s群、HF+T3=高脂肪食+T3s群。

** p<0.01。

この T3s による体重増加抑制作用のメカニズムはいまだに不明である。T3s と同様に抗肥満作用を持つことで知られているカフェインやポリフェノール類はマウスの視床下部に作用し、摂食量の低下やエネルギー代謝の亢進を介して体重増加を抑制することが報告されている⁽⁴⁴⁾(図 1-20)。

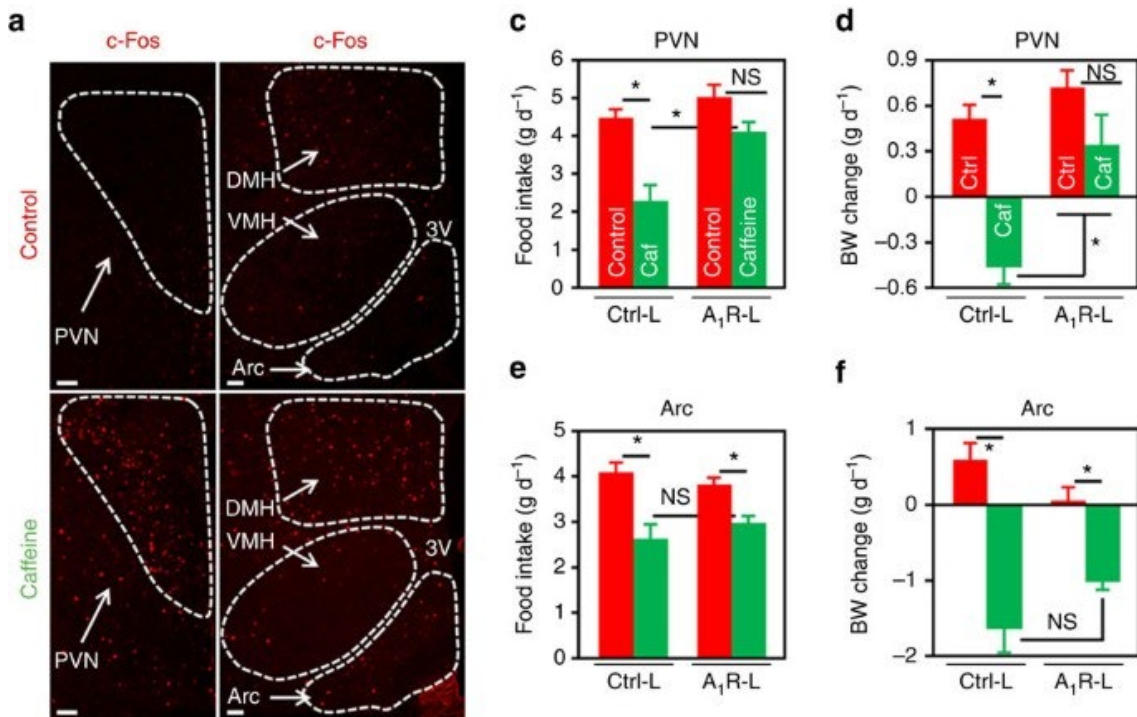


図 1-20 カフェインによる視床下部の活性化と摂餌量・体重の減少⁽⁴⁴⁾

c-Fos=神経活動のマーカー、PVN=室傍核、DMH=背内側核、VMH=腹内側核、Arc=弓状核。* p<0.05。

しかしながら我々の条件では、T3s は摂餌量を変化させず、また脳まで到達していないにもかかわらず、体重増加を抑制した。このことから T3s はカフェインとは別のメカニズムで体重増加抑制作用を発揮すると考えられるが、そのメカニズムは未だに不明である。

認識機能障害

認知症

日本では高齢化が深刻化しており、その進行に伴って認知症患者数も増加している。認知症の中でもっとも多い原因疾患はアルツハイマー病(Alzheimer's disease : AD)である。AD は脳内で、アミロイド β (Amyloid β : A β) が凝集した老人斑と、微小管結合タンパク質の一種であるタウタンパク質が過剰にリン酸化後凝集した神経原繊維変化を病理的特徴とした神経変性疾患の一種で、酸化ストレスの亢進や老人斑の形成により物理的に細胞が圧迫されるなどの様々な原因で神経がダメージを受けることで機能が低下し、認識機能の低下を引き起こす。一方で、脳梗塞や脳出血などの病因により認知症を発症する、脳血管性認知症も存在する⁽⁴⁵⁾。

認知症などの認識機能障害は、もの忘れや日付がわからなくなるなど、一人で生活することが困難であるため、介護者の負担が大きく社会的な問題となっている。

肥満と認識機能障害

近年、肥満がADのような認知症の発症リスクを高める可能性が報告されている。Yeらの研究グループは、C57BL/6 マウスに10週間高脂肪食を給餌したところ、モーリス水迷路試験における認識機能が対照食群と比較して有意に低下することを報告した⁽⁴⁶⁾。

Wangらはモーリス水迷路における、肥満モデルマウス KKAy マウスの認識機能が対照マウスと比較して有意に低いことを報告している⁽⁴⁷⁾(図1-21)。

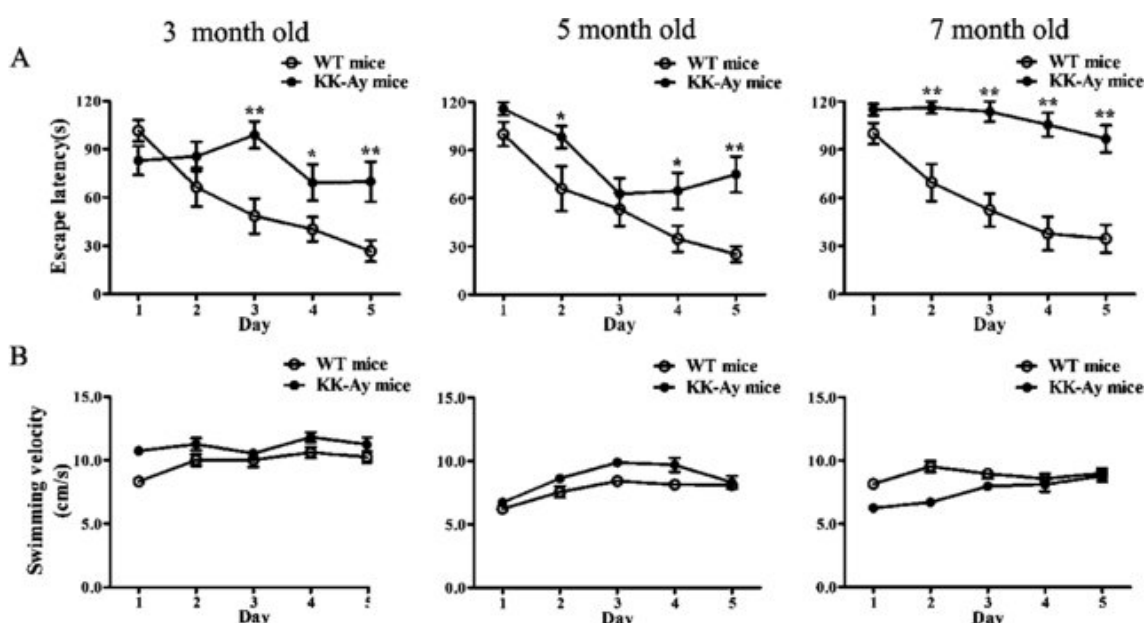


図1-21 肥満モデルマウスの認識機能⁽⁴⁷⁾

KK-Ay mice=肥満モデルマウス。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT mice。

さらに、肥満がADの症状を悪化させる可能性も報告されている。ADのモデルマウスに9か月間高脂肪食を与えると、恐怖条件付け試験における記憶力が、対照群と比較して有意に低下していることを報告した⁽⁴⁸⁾(図1-22)。

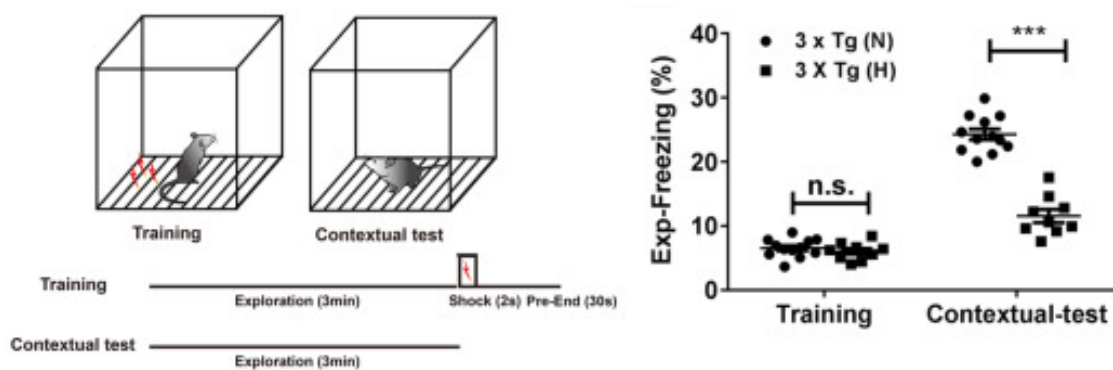


図1-22 高脂肪食給餌によるAD症状の進行⁽⁴⁸⁾

3×Tg=ADモデルマウス。N=通常食、H=高脂肪食。*** p<0.001。

以上のように、肥満が認識機能障害の発症、進行に悪影響を与えることは明らかになっているが、その詳細なメカニズムはまだ不明な点が多い。

認識機能障害と酸化ストレス

認識機能障害の発症・進行には酸化ストレスの亢進が深く関与しているのではないかと考えられており、AD モデルマウスの海馬、大脳では対照群と比較して、TBARS 値が有意に高い⁽⁴⁹⁾(図 1-23)。

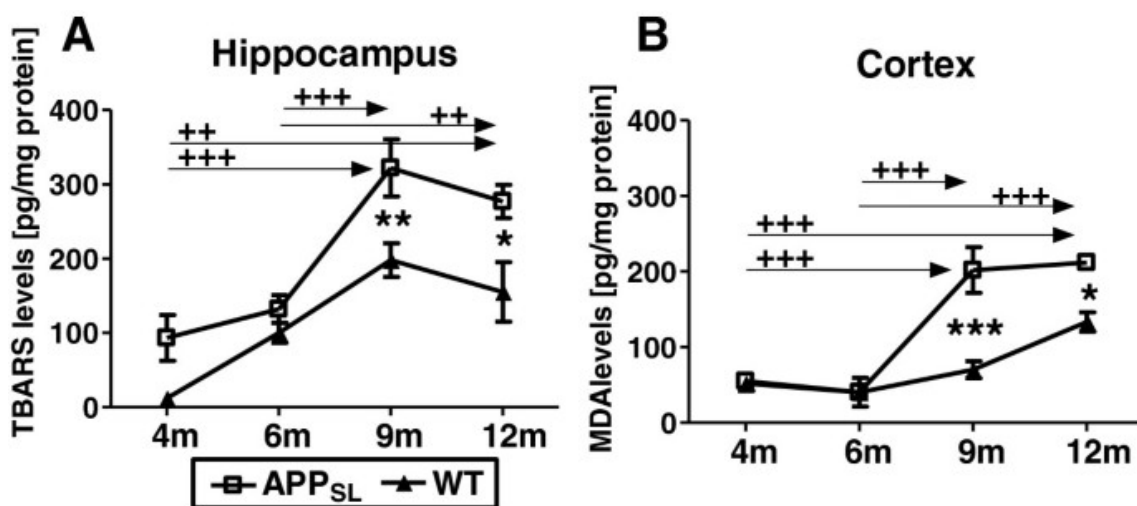


図 1-23 AD モデルマウスの脳内過酸化脂質量⁽⁴⁹⁾

APPSL=AD モデルマウス。++ p<0.01, +++ p<0.001, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001。

脳内で酸化が亢進すると、神経細胞の膜が酸化されダメージを受けると考えられている。また、酸化ストレスはミトコンドリアの機能不全を引き起こし、シトクロム C が細胞質へ漏出し、神経細胞のアポトーシスを引き起こす⁽⁵⁰⁾(図 1-24)。

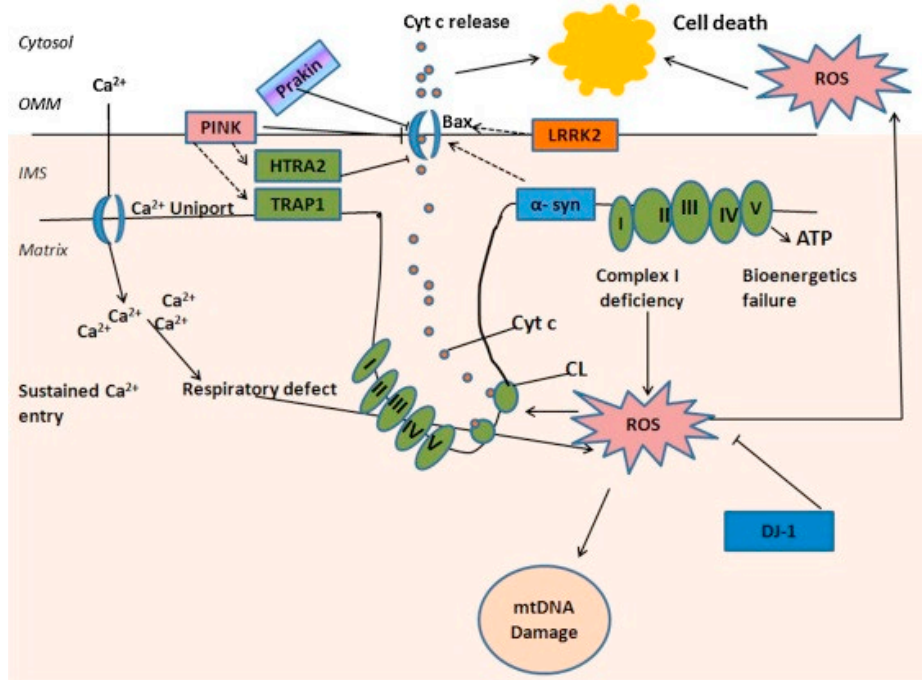


図 1-24 酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全⁽⁵⁰⁾

Cyt c=シトクロム C、ROS=活性酸素種、mtDNA=ミトコンドリア DNA。

これらの結果、神経細胞死が誘発され、認識機能障害につながる可能性が示唆されている。そのため我々は、肥満による認識機能の低下原因として、脳内の酸化亢進を考えている。しかし、肥満による脳酸化に関しては未だに報告が少なく未解決である。

研究目的

我々は肥満モデルマウスを用いて、T3s が体重増加を有意に抑制することを報告しているが⁽⁴³⁾、そのメカニズムは不明である。加えて T3s が体重増加抑制以外に抗肥満作用を持つのかに関しても明らかになっていない。

また、肥満は認識機能障害を誘引することは既知であるが、肥満がどのように認識機能を低下させるのかは未だに分かっていない。我々は、マウスの認識機能低下の一因として、脳内での酸化ストレスの亢進を報告していることから、肥満は脳の酸化亢進を介して、認識機能を低下させるのではないかと着想した。さらに、もしこの仮説が正しい場合、抗酸化作用と神経保護作用を併せ持つ T3s の同時投与は、肥満による認識機能の低下を抑制できるのではないかと考えた。

以上の研究背景を踏まえて 本研究の目的を下記の三点設定した。

1. T3s が抗肥満作用を発揮するメカニズムの解明
2. 肥満が認識機能障害を誘引するメカニズムの解明
3. T3s が肥満による認識機能障害を抑制することの証明とそのメカニズムの解明

第1章 36週齢の高脂肪食投与による肥満モデルマウスに対する 50mg/100g diet の T3s 投与

我々は過去に、C57BL/6 マウスに高脂肪食と同時に 0.01% の T3s を与えると、体重増加を有意に抑制することを報告した⁽⁴³⁾。しかしながら、この時使用したマウスは4週齢であり成長による体重増加を阻害したのか、肥満による体重増加を抑制したのか判断がつかなかった。そこで、成長による体重増加の少ない36週齢のマウスに対して長期間の T3s 投与を行った。

実験方法

実験動物

すべての動物実験は芝浦工業大学の実験動物委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後に実施した(承認番号: 18002)。36週齢の C57BL/6 雄性マウスに、高脂肪食(HFD; #D12492, Research Diets, Inc., Brunswick, NJ)及びその対照食(Ctrl; #D12450, Research Diets, Inc.)、それぞれに 0.05% の T3-mix(α - : β - : γ - : δ - = 33.2 : 4.2 : 46.1 : 15.0, Mitsubishi Chemical Corp., Tokyo, Japan)を添加した飼料を20週間与えた。各試料の組成は表 2-1 に記載した。すべてのマウスは、室温 $22 \pm 2^\circ \text{C}$ 、湿度 50-60%、明暗サイクルが12時間(hr) (8:00/20:00)の条件下で飼育した。飼料と飲料水は自由に摂取させた。飼育期間中週に一度、体重と摂餌量を測定した。飼育期間および行動試験終了後、クロロホルム麻酔下で解剖し、大脳、海馬を採取した。

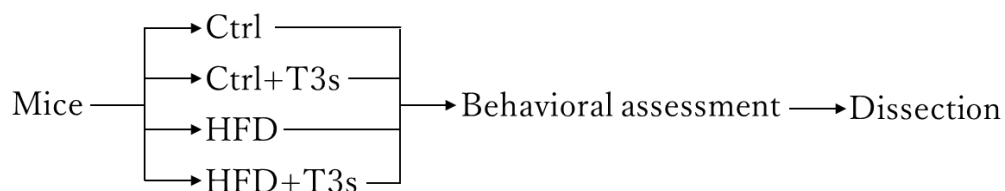


図 2-1 実験スケジュール

表 2-1 各飼料の組成

	D12492		D12450	
	g	kcal	g	kcal
Protein	26	20	19.2	20
Carbohydrate	26	20	67.3	70
Fat	35	60	4.3	10
Total		100		100
kcal/g	5.24		3.85	
	D12492		D12450J	
	g	kcal	g	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch	0	0	506.2	2024.8
Maltodextrin 10	125	500	125	500
Sucrose	68.8	275	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Coconut Oil, 101				
Lard	245	2205	20	180
Mineral Mix S10001	0	0	0	0
Mineral Mix S10026	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0		
FD&C Yellow Dye #5			0.04	0
FD&C Red Dye #40				
Total	773.85	4057	1055.05	4057

認識機能測定

モーリス水迷路試験

空間認知能力の測定にモーリス水迷路試験を用いた。試験前に三日間のプレ遊泳とハンドリングを実施した。本試験では、3hr おきに 1 日 4 回を五日間行った。プール (Muromachi kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) の水温は $21 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ち、プールの側面にはマウスに見えるように●、▲、+、■のマークを設置した(図 2-2)。解析には ANY-maze ソフトウェア (Stoelting Co., Wood dale, IL) を用いた。X 日目の学習率は $[1 - (X \text{ 日目の到達時間} / 1 \text{ 日目の到達時間}) \times 100]$ で算出した。最終日のゴールまでの平均到達時間が 45 秒(sec) 以上の検体の値は、無条件で棄却した。

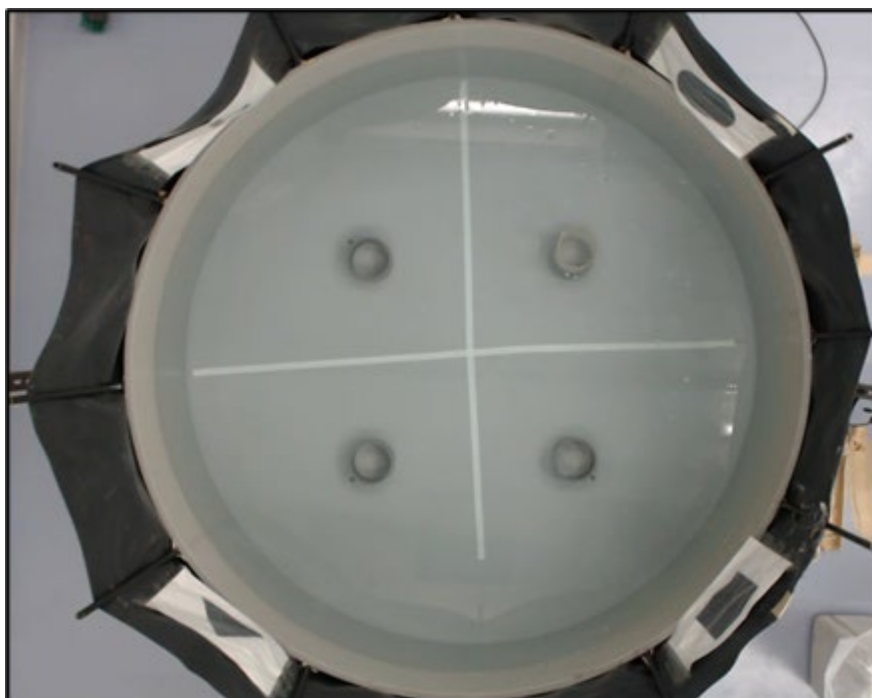


図 2-2 水迷路用プール

ロータロッド試験

認識機能の指標として協調運動能力を測定した。ロータロッド装置(Muromachi kikai Co., Ltd.)を5rpm から120secで50rpmに加速するようにセットし、落下するまでの時間を測定した(図2-3)。



図 2-3 ロータロッド装置

過酸化脂質の測定

過酸化脂質の測定には、チオバルビツール酸(Thiobarbituric acid:TBA)法を用いた。大脳と海馬頚をホモジネートし、測定に用いた。ホモジネートに0.7%TBA、0.05%ブチルヒドロキソトルエン、5mMエチレンジアミン4酢酸(EDTA)、1%リン酸水溶液を加え、100°Cで45min加熱反応した。加熱終了後、1-ブタノールでサンプル中のTBARSを抽出し、飽和食塩水で洗浄後、535nmの波長を分光光度計(#51119300、Multiskan GO; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)で測定した。測定した吸光度と、抽出に使用したブタノール量、マロンジアルデヒド(Malondialdehyde:MDA)のモル吸光係数からTBARSの濃度を算出し、ブラッドフォード法で測定したタンパク質1mgあたりのTBARSの濃度を算出した。

ウェスタンブロッティング(WB)

脳の各領域を Lysis バッファーでホモジネートし、ブラッドフォード法にてタンパク質濃度を測定後、ドデシル硫酸ナトリウム(Sodium dodecyl sulfate ; SDS)バッファーを加え WB 用サンプルを作成した。作成したサンプルをポリアクリルアミドゲルで分子量ごとに分離し、ニトロセルロースメンブレン(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan)に転写した。転写後、Ponceau S staining solution(Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO)で総タンパク質を染色し、ローディングコントロールとして使用した。2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol : Tris)-HCl-buffered saline (TBS) with Tween 20 (TBS-T)で洗浄し、2%スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体を 4°Cで反応させた。使用した一次抗体は表 2-2 に示した。一次抗体反応終了後、メンブレンを洗浄し、二次抗体を反応させた。反応後洗浄し、化学発光法にて目的タンパク質を検出した。検出には CCD カメラ LAS-3000(FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。相対輝度比の算出には Image J(National Institute of Health, Bethesda, MD)を用いた。

表 2-2 使用抗体一覧

Primary			
Target proteins	Cat.no.	Manufacturers	Dilutions
SOD1	ab13498	abcam	1/2500
CAT	ab195306	abcam	1/2000
GPx1	ab22604	abcam	1/4000

Secondary			
Targets	Cat.no.	Manufacturers	Dilutions
Rabbit	W4011	Promega	1/4000

T3s の定量

T3s の定量には、高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography: HPLC)法を用いた。内部標準物質として 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-ヒドロキシクロマン(2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol: PMC)(Sigma Aldrich Corp.)を使用した。サンプルにヘキサン:酢酸エチル=9:1の混液で抽出した。抽出後の混液を、飽和食塩水および Milli Q 水で洗浄し、窒素ガスで溶媒を留去した。留去した残渣に HPLC 用メタノールを加え溶解し、HPLC(Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)で検出した。移動相には 50mM の過塩素酸ナトリウム 1 水和物を含む、液体(MilliQ:メタノール=3:97)を使用し、8 種類の VE 同族体および PMC の分離には逆相カラム(Develosil C30-UG-3, Nomura chemical Co., Ltd., Aichi, Japan)を 5°Cで用いた。検出したクロマトグラムは S-MicroChrom software(Shiseido Co., Tokyo, Japan)で解析し、ブラッドフォード法で測定したタンパク質 1mg あたりの VE 同族体量を算出した。

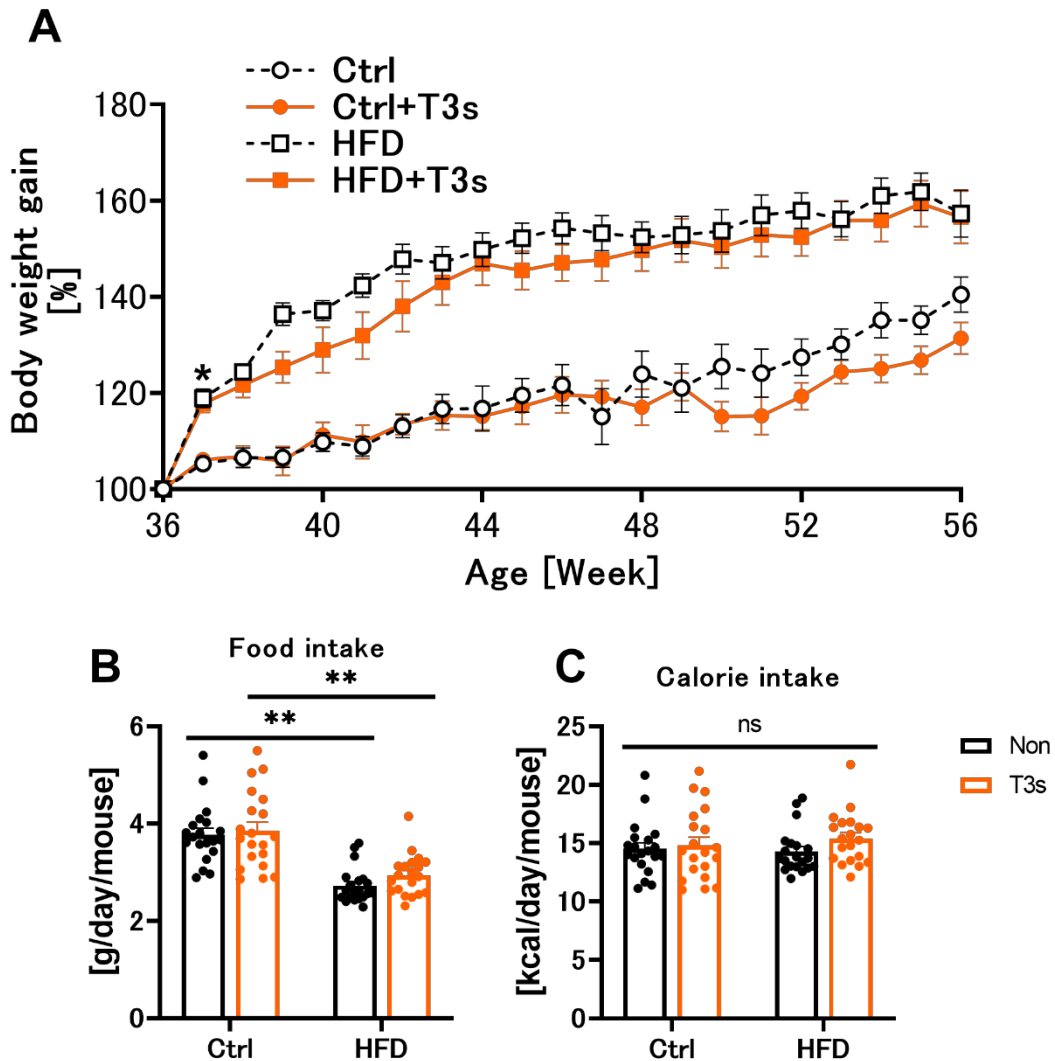
統計分析

すべてのグラフは、平均値±標準誤差(SE)で表した。統計解析には GraphPad Prism (version 9, San Francisco, CA)を用いた。

実験結果

1. T3s は 36 週齢のマウスにおいて体重増加を抑制する

成長による体重増加の少ない 36 週齢のマウスに対する T3s の抗肥満作用を検討するために、マウスに HFD と同時に T3s を与え、週に一度体重を測定し、飼育開始時の体重を 100%とした体重増加率を算出した(図 2-4 A)。その結果、T3s 投与は飼育期間の初期でのみ体重増加抑制作用を示したが、飼育終了時の体重増加率に、HFD 群と HFD+T3s 群の間で差は無かった。飼育期間中、週に一度測定した摂餌量は、HFD 及び HFD+T3s を投与した群では、Ctrl と Ctrl+T3s を投与した群と比較して有意に低値であった。しかし、摂取カロリーに群間で差は無かった(図 2-4 B-C)。



2-4 T3s 摂取による体重増加率及び摂餌量の変化

36 週齢から 20 週間の HFD および T3s 投与による体重変化 ($n=10$) (A)。* $p<0.05$ HFD vs. body weight gain of previous week (36 週齢時) of HFD, Two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer's test。週に一度測定した 24 時間当たりのマウス 1 匹の摂餌量 (B)。** $p<0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。摂餌量から算出したマウス 1 匹の 24 時間当たりの摂取カロリー (C)。すべてのグラフは Mean \pm SE。

2. 認識機能に対する HFD 及び T3s 摂取の影響

各マウスの認識機能

36週齢のマウスに対して20週間HFDの投与を行い認識機能を測定した。その結果、モーリス水迷路試験及びロータロッド試験、両試験における認識機能に各群で差は無かった(図 2-5 A-B)。

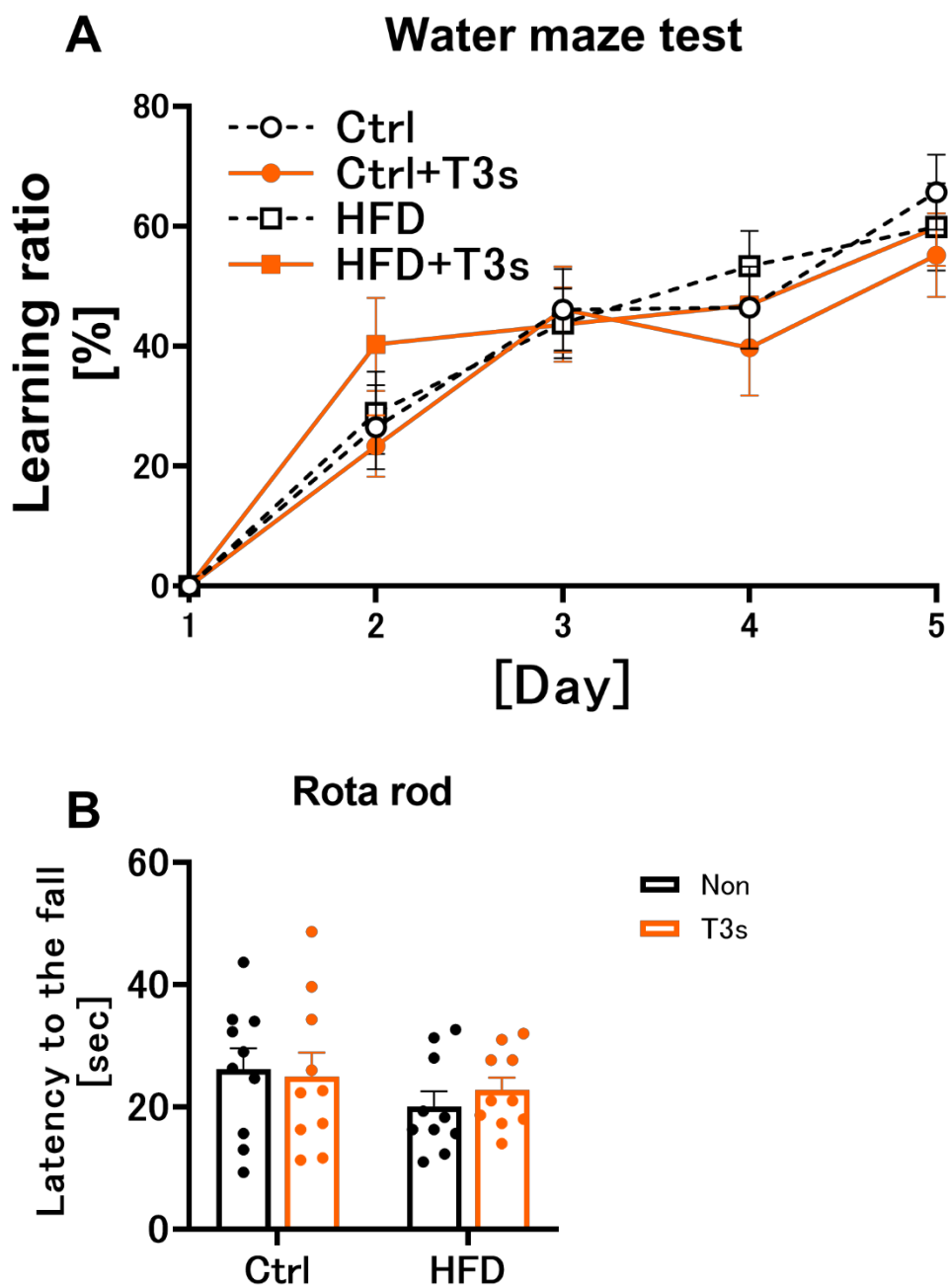


図 2-5 認識機能の測定

モーリス水迷路試験(Ctrl: $n=14$, Ctrl+T3s: $n=16$, HFD: $n=15$, HFD+T3s: $n=13$) (A)、ロータロッド試験($n=10$) (B)における認識機能。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

脳内 α -T3 量の変化

脳内の酸化度に差が無かった為、脳まで α -T3 が到達しているのか確認した。その結果、大脳では HFD+T3s 群の α -T3 量が HFD 群と比較して有意に高く、海馬においては、T3s 投与量群で非投与群と比較して有意に高かった(図 2-6 A-B)。

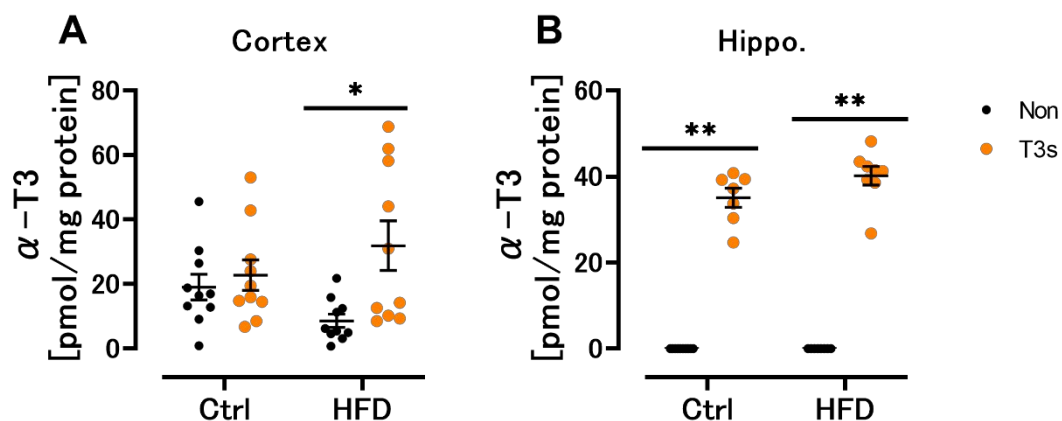


図 2-6 各マウスの TBARS 値

大脳(A)、および海馬(B)における α -T3 量($n=10$)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

HFD 及び T3s 投与による脳内酸化度の変動

認識機能に変化は無かったが、酸化の指標として TBARS 量を脳および海馬を用いて測定した。脳内酸化度に差は無かった(図 2-7 A-B)。

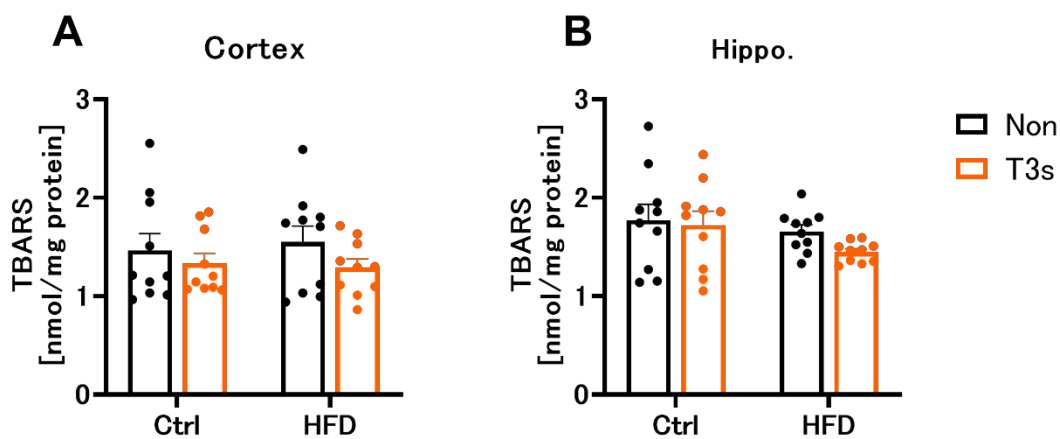


図 2-7 各マウスの TBARS 値

脳(A)、および海馬(B)における TBARS 量($n=10$)。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

HFD 及び T3s 投与による脳内抗酸化酵素の発現変化

代表的な抗酸化酵素である SOD1、CAT、GPx1 の発現変化を WB 法にて測定した。その結果、大脳において、HFD+T3s 群の CAT 発現が Ctrl+T3s 群と比較して有意に高かった(図 2-8 B)。さらに海馬領では、HFD+T3s 群の SOD1 および GPx1 発現が、Ctrl+T3s 群と比較して有意に高かった(図 2-8 D, F)。

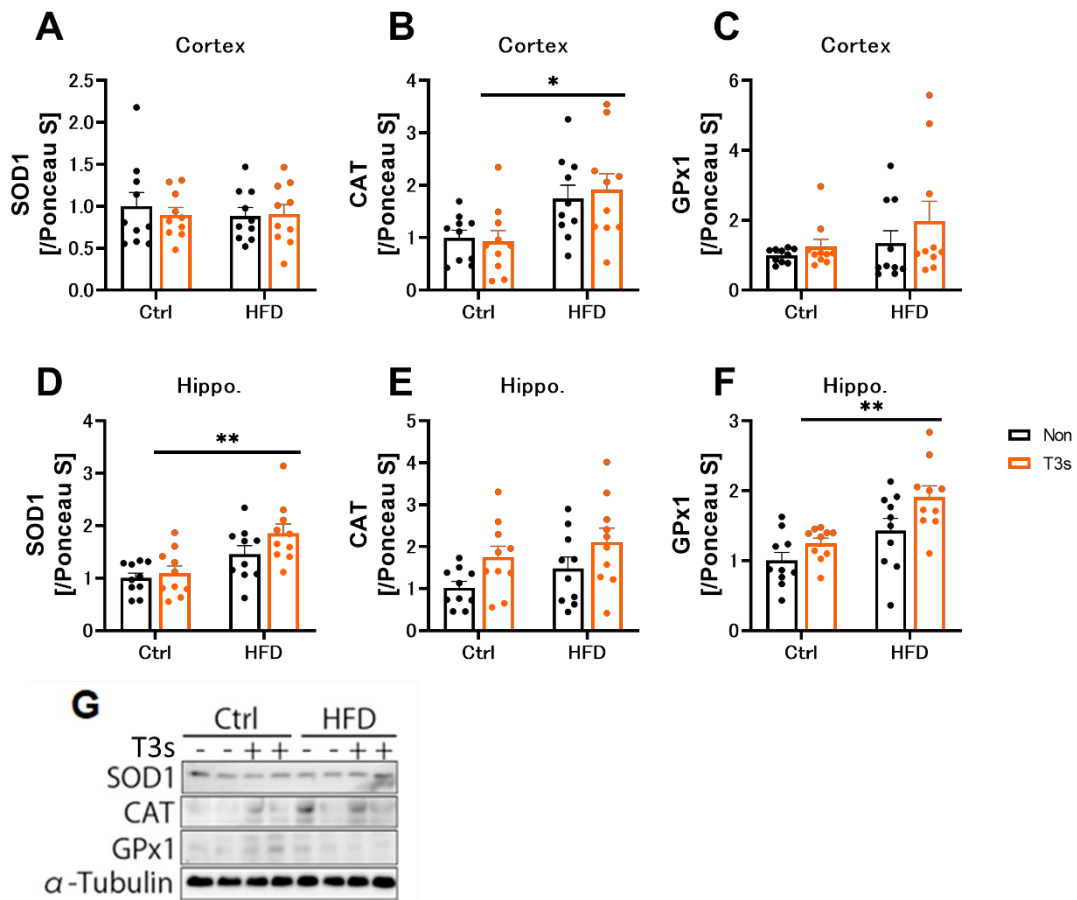


図 2-8 各マウス脳内の抗酸化酵素発現変化

大脳(A, B, C)、および海馬(D, E, F)における SOD1、CAT、GPx1 の発現変化($n=10$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。WB の代表例(G)。すべてのグラフは Mean \pm SE。

考察

1. T3s の抗肥満作用について

先行研究において、4週齢の C57BL/6 マウスに対する 0.01% の T3s の投与は、HFD 摂取による体重増加を有意に抑制した⁽⁴³⁾。しかしながら、4週齢のマウスは成長でも体重が増加する為、T3s が HFD 摂取による肥満を抑制したのか、成長による体重増加を阻害したのか判断できなかった。そこで本研究では、成長による体重増加の少ない 36 週齢のマウスに対して 20 週間 T3s を投与し、体重増加率を測定した。その結果、T3s 投与は成長による体重増加の少ない 36 週齢のマウスにおいても HFD による体重増加を有意に抑制した(図 2-4 A)。しかしながら、その作用は飼育期間の初期でのみ発揮され、飼育期間終了時、HFD 群と HFD+T3s 群の体重増加率に差は無かった。これらのことから T3s の体重増加抑制作用は、成長阻害ではなく肥満を抑制した結果であること、さらに体重増加を完全に停止させる作用ではなく、肥満による体重増加を遅延させる効果である可能性が示唆された。体重と同様に週に一度、各マウスの 24 時間当たりの摂餌量および摂取カロリーを測定した結果、HFD 投与群の摂餌量は対照群と比較して有意に減少したが、摂取カロリーに各群間で差は無かった(図 2-4 B-C)。このことから、T3s は摂餌量に影響を与えることなく、肥満による体重増加を抑制することが示唆された。体重増加抑制作用を持つことが報告されている物質の多くは、視床下部に作用し、摂餌量を低下させることで効果を発揮することが報告されている⁽⁴⁴⁾。しかしながら、先行研究における 0.01% の T3s 投与時に脳内の T3s 量に差が無かったが体重増加を抑制されていたこと、および本研究において摂餌量に差が無かったことから、T3s は視床下部に作用することなく体重増加を抑制したと考えられる。T3s がどのように肥満による体重増加を抑制するのかに関しては未解決であるため、白色脂肪組織の重量変化などを観察する必要がある。

2. 認識機能に対する HFD 及び T3s 投与の影響に関して

先行研究において、4 週齢の C57BL/6 マウスに対して 8 週間、HFD を 0.01%T3s の有無で投与したが、脳内の酸化度に変化は無かった。さらに 0.01%の T3s 投与では、脳内の T3s 量に変動が無かった為⁽⁴³⁾、本研究では T3s 量を 0.05%に変更した。各マウスの認識機能測定にはモーリス水迷路試験及びロータロッド試験を用いた。認識機能の測定結果に、有意差は無かった(図 2-5 A-B)。この結果は、我々の条件(飼育期間、マウスの週齢、60%が脂質である HFD)では認識機能に変化が無いことを示している。しかしながら、肥満は認識機能を低下させることが報告されている。例えば、20 月齢の C57BL/6 マウスに 16 週間 HFD を与えると、T 字迷路における認識機能が低下すること、さらに Wistar ラットに高脂肪高炭水化物食を与えると、放射状水迷路試験における認識機能が低下することなどが報告されている^(51,52)。これらの研究グループでは、肥満モデルマウスの認識機能測定に T 字迷路や放射状水迷路試験を用いている。もしかしたら、モーリス水迷路試験及びロータロッド試験は、肥満モデルマウスの認識機能測定には不適切なのかもしれない。動物の飼育条件などを変更し、更なる検討が必要である。

今回、認識機能に変動は無かったが、 α -T3 が脳まで到達していることを確認した(図 2-6 A-B)。そこで、脳の酸化還元バランスへの影響を精査するため、大脳および海馬領にて TBARS 量を測定した。その結果、有意差は無かったが、T3s 投与群の TBARS 値は非投与群の値と比較して減少傾向にあった(図 2-7 A-B)。さらに、大脳、海馬領において、SOD 1 や CAT、GPx1 などの抗酸化酵素の発現が T3s 投与により有意に上昇していた(図 2-8 A-F)。その為、T3s 投与による TBARS との低下傾向は、T3s の抗酸化作用だけでなく、抗酸化酵素の発現上昇を介している可能性がある。

結論

本研究では、成長による体重増加の少ない 36 週齢のマウスを用いて T3s が肥満による体重増加に与える影響、及び HFD と T3s 投与による認識機能の変動に関して検討を行った。その結果、T3s の体重増加抑制作用は成長阻害ではなく、確かに HFD 投与による肥満を阻害していること、その作用は完全に体重増加を停止させる作用ではなく、遅延させる作用である可能性が示唆された。加えて本研究条件では、HFD 投与により肥満が誘導され、T3s は脳まで到達するが、マウスの認識機能に変化が無いことが明らかとなった。T3s が体重増加を抑制するメカニズムは未だに不明である為、更なる検討が必要である。

第2章 4週齢の高脂肪食投与による肥満モデルマウスに対する 50mg/100g diet の T3s 投与

第1章で T3s が確かに肥満による体重増加を抑制することを明らかとした為、本研究ではそのメカニズム解明に取り組んだ。同時に、先行研究で行った 0.01% の T3s 投与では脳内の T3s 量に変化が無かった為、T3s 添加濃度を 0.05% に変更し脳への T3s の到達に関しても検討を行った。

実験方法

実験動物

すべての動物実験は芝浦工業大学の実験動物委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後に実施した(承認番号: 19002)。C57BL/6 雄性マウスに 4 週齢から 8 週間または 13 週間に渡って、高脂肪食 (HFD; #D12492, Research Diets, Inc.)、またはその対照食 (Ctrl; #D12450, Research Diets, Inc.) を T3s (0.05%, α - : β - : γ - : δ - = 33.4 : 4.4 : 46.7 : 15.2, Mitsubishi Chemical, Corp.) の有無で給餌した。各飼料の組成は表 2-1 に示した。すべてのマウスは一つのケージあたり 3-4 匹ずつ分け、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50-60%、明暗サイクルが 12hr (8 : 00/20 : 00) の条件下で飼育した。飼料と飲料水は自由に摂取させた。飼育期間中週に一度、体重と摂餌量を測定した。飼育期間および行動試験終了後、一晩絶食し、クロロホルム麻酔下で解剖し、肝臓、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪、血清(下大静脈より採取した全血を、4000rpm で 15min 遠心し得た)、大脳、海馬を採取した。

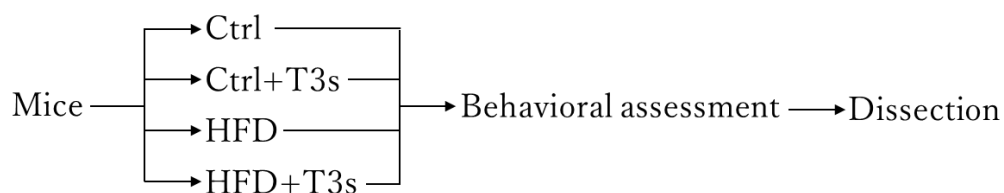


図 3-1 実験スケジュール

脂肪滴の染色

肝臓の脂肪滴の検出のため、Oil Red O 染色を行った。解剖時、マウスの左心室からリン酸緩衝食塩水(Phosphate buffered saline : PBS)で灌流し、血液を取り除いた。その後、スクロース溶液で脱水し、パラフォルムアルデヒド溶液で固定を行った後、O.C.T.コンパウンド(Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA)に包埋した。その後、-80°Cに冷やしたヘキサンで急速凍結した。その後スライスし、スライドガラス(Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan)上に乗せ風乾後、使用時まで-80°Cで保存した。

作成した凍結切片を 0.3%の Oil Red O 染色溶液に 37°Cで 15min 浸し、脂肪滴を染色後、マイヤーヘマトキシリンで核を染色した。切片染色のポジティブコントロールとして、ヘマトキシリン&エオシン(Hematoxylin and eosin : HE)染色も同時に行った。サンプルの観察には、デジタルカメラ(# DP22, Olympus, Tokyo, Japan)を設置した倒立顕微鏡(# CKX-41, Olympus)を用いた。染色後の写真の解析には Image J(National Institute of Health)を使用した。

血清生化学検査

解剖時採取した血液を遠心し、血清を採取した。-30°Cで凍結し、トリグリセリド(Tryglyceride : TG)、LDL、HDL、総コレステロール(Total cholesterol : T-CHO)、遊離コレステロール(Free cholesterol : F-CHO)、エステル型コレステロール(Esterified cholesterol : E-CHO)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(Aspartate aminotransferase : AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(Alanine aminotransferase : ALT)、ロイシンアミノペプチダーゼ(Leucine aminopeptidase : LAP)の濃度を、外部検査機関(Oriental Yeast, Corp., Ltd., Tokyo, Japan)に依頼して測定した。

認識機能測定

モーリス水迷路試験

空間認知能力の測定にモーリス水迷路試験を用いた。試験前に三日間のプレ遊泳とハンドリングを実施した。本試験では、3hr おきに 1 日 4 回を五日間行った。プール (Muromachi kikai Co., Ltd.) の水温は $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保ち、プールの側面にはマウスに見えるように●、▲、+、■のマークを設置した(図 2-2)。解析には ANY-maze ソフトウェア (Stoelting Co.) を用いた。X 日目の学習率は $[1 - (\text{X 日目の到達時間} / \text{1 日目の到達時間}) \times 100]$ で算出した。最終日のゴールまでの平均到達時間が 135 秒以上の検体の値は、無条件で棄却した。

ロータロッド試験

認識機能の指標として協調運動能力を測定した。ロータロッド装置(Muromachi kikai Co., Ltd.)を 5rpm から 120sec で 50rpm に加速するようにセットし、落下するまでの時間を測定した(図 2-3)。

過酸化脂質の測定

過酸化脂質の測定には、TBA 法を用いた。大脳と海馬領をホモジネートし、測定に用いた。ホモジネートに 0.7%TBA、0.05%ブチルヒドロキシトルエン、5mM EDTA、1%リン酸水溶液を加え、100°Cで 45min 加熱反応した。加熱終了後、1-ブタノールでサンプル中の TBARS を抽出し、飽和食塩水で洗浄後、535nm の波長を分光光度計(#51119300、Multiskan GO; Thermo Fisher Scientific Inc.)で測定した。測定した吸光度と、抽出に使用したブタノール量、MDA のモル吸光係数から TBARS の濃度を算出し、ブラッドフォード法で測定したタンパク質 1mg あたりの TBARS の濃度を算出した。

酸化型(GSSG)および還元型(GSH)グルタチオンの測定

グルタチオンの測定には、GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II (#ab205811, Abcam Plc., Cambridge, UK) を用いた。蛍光強度の測定には、FLUOROSKAN(#5200110, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いた。

ウェスタンブロッティング(WB)

脳の各領域を RIPA バッファー(#182-02451, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) でホモジネートし、ブラッドフォード法にてタンパク質濃度を測定後、試料用緩衝液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)を加え WB 用サンプルを作成した。作成したサンプルをポリアクリルアミドゲルで分子量ごとに分離し、ニトロセルロースメンブレン(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)に転写した。転写後、Ponceau S staining solution(Sigma Aldrich Corp.)で総タンパク質を染色し、ローディングコントロールとして使用した。TBS-T で洗浄し、2%スキムミルクまたは牛血清アルブミンでブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体を 4°C で反応させた。使用した一次抗体は表 3-1 に示した。一次抗体反応終了後、メンブレンを洗浄し二次抗体を反応させた。反応後洗浄し、化学発光法にて目的タンパク質を検出した。検出には CCD カメラ LAS-3000(FUJIFILM Corporation)を用いた。相対輝度比の算出には、Image Quant ソフトウェア(Cytiva, Tokyo, Japan)を用いた。

表 3-1 使用抗体一覧

Primary			
Target proteins	Cat.no.	Manufacturers	Dilutions
Occludin	ab168986	abcam	1/500
Claudin5	ab15106	abcam	1/4000
JAM1	bs-3651R	Bioss	1/650
SOD1	ab13498	abcam	1/2500
CAT	ab195306	abcam	1/2000
GPx1	ab22604	abcam	1/4000
Histone H3	4499	Cell Signaling Technology	1/4000
Histone H3 (Ace-K9)	9649	Cell Signaling Technology	1/1000
Histone H3 (Ace-K14)	7627	Cell Signaling Technology	1/1000
HDAC1	34589	Cell Signaling Technology	1/4000
BDNF	ab108319	abcam	1/2500

Secondary			
Targets	Cat.no.	Manufacturers	Dilutions
Rabbit	W4011	Promega	1/4000
Mouse	W4021	Promega	1/4000

T3s の定量

T3s の定量には、HPLC を用いた。内部標準物質として PMC(Sigma Aldrich Corp.) を使用した。サンプルにヘキサン：酢酸エチル=9：1 の混液で抽出した。抽出後の混液を、飽和食塩水および Milli Q 水で洗浄し、窒素ガスで溶媒を留去した。留去した残渣に HPLC 用メタノールを加え溶解し、HPLC(Shiseido Co., Ltd.)で検出した。移動相には 50mM の過塩素酸ナトリウム 1 水和物を含む、液体(MilliQ：メタノール=3：97)を使用し、8 種類の VE 同族体および PMC の分離には逆相カラム(Develosil C30-UG-3, Nomura chemical Co., Ltd.)を 5°C で用いた。検出したクロマトグラムは S-MicroChrom software(Shiseido Co.)で解析し、ブラッドフォード法で測定したタンパク質 1mg あたりの VE 同族体量を算出した。

統計分析

すべてのグラフは、平均値±SE で表した。統計解析には GraphPad Prism (version 9, GraphPad Software)を用いた。

実験結果

1. T3s はマウスの体重増加を抑制する

T3s の抗肥満作用を検討するために、マウスに HFD と同時に T3s を与え、週に一度体重を測定し、飼育開始時の体重を 100% とした体重増加率を算出した。その結果、HFD 及び HFD+T3s 群の体重増加率は、Ctrl および Ctrl+T3s と比較して有意に増加した。さらに、HFD+T3s 群の体重増加率は、飼育期間の最後の 2 週で HFD 群と比較して有意に低値であった(図 3-2 A)。抗肥満作用が報告されている物質の多くは、動物の摂食量を減少させることで作用を発揮することが報告されているため、飼育期間中のマウスの摂餌量を測定し、その値から各群の摂取カロリーを算出した。その結果、HFD 及び HFD+T3s 群で、Ctrl および Ctrl+T3s 群と比較して、有意に高かったが、T3s の有無で変化は無かった(図 3-2 B-C)。

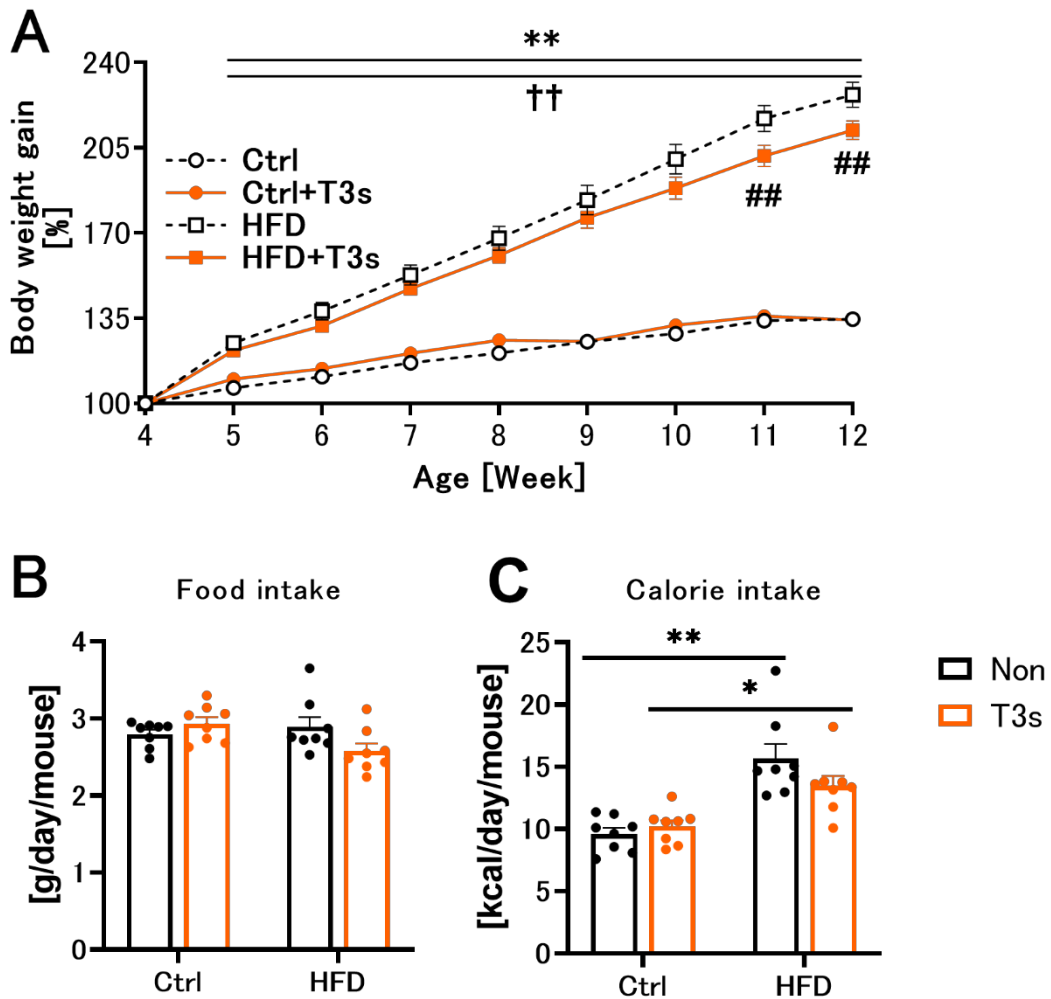


図 3-2 T3s 摂取による体重増加率及び摂餌量の変化

4 週齢から 8 週間の HFD および T3s 投与による体重変化 ($n=10$) (A)。** $p<0.01$ Ctrl vs. HFD, †† $p<0.01$ Ctrl+T3s vs. HFD+T3s, ## $p<0.01$ HFD vs. HFD+T3s。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。週に一度測定した 24 時間当たりのマウス 1 匹の摂餌量(B)。摂餌量から算出したマウス 1 匹の 24 時間当たりの摂取カロリー(C)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

2.T3s の体重増加抑制以外の抗肥満作用

T3s の肝臓保護効果

Oil Red O 染色にて肝臓の脂肪滴を染色した。その結果、HFD は肝臓での脂肪滴蓄積を誘引し、T3s はそれを有意に抑制した。興味深いことに、T3s は HFD 群のみならず、Ctrl 群の肝臓でも脂肪滴の蓄積を有意に阻害した(図 3-3 A-B)。

T3s が肝臓における脂肪滴の蓄積を阻害したので、血清中で肝細胞の損傷により細胞内から血中に漏れ出る AST、ALT、LAP の濃度を測定した。ALT、LAP 濃度は HFD 摂取による肥満時に増加しており、HFD と T3s の同時摂取は AST、ALT、LAP 濃度の増加を有意に抑制した(図 3-4 A-C)。

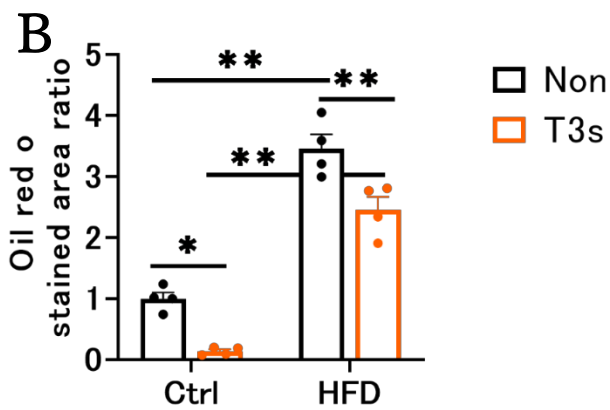
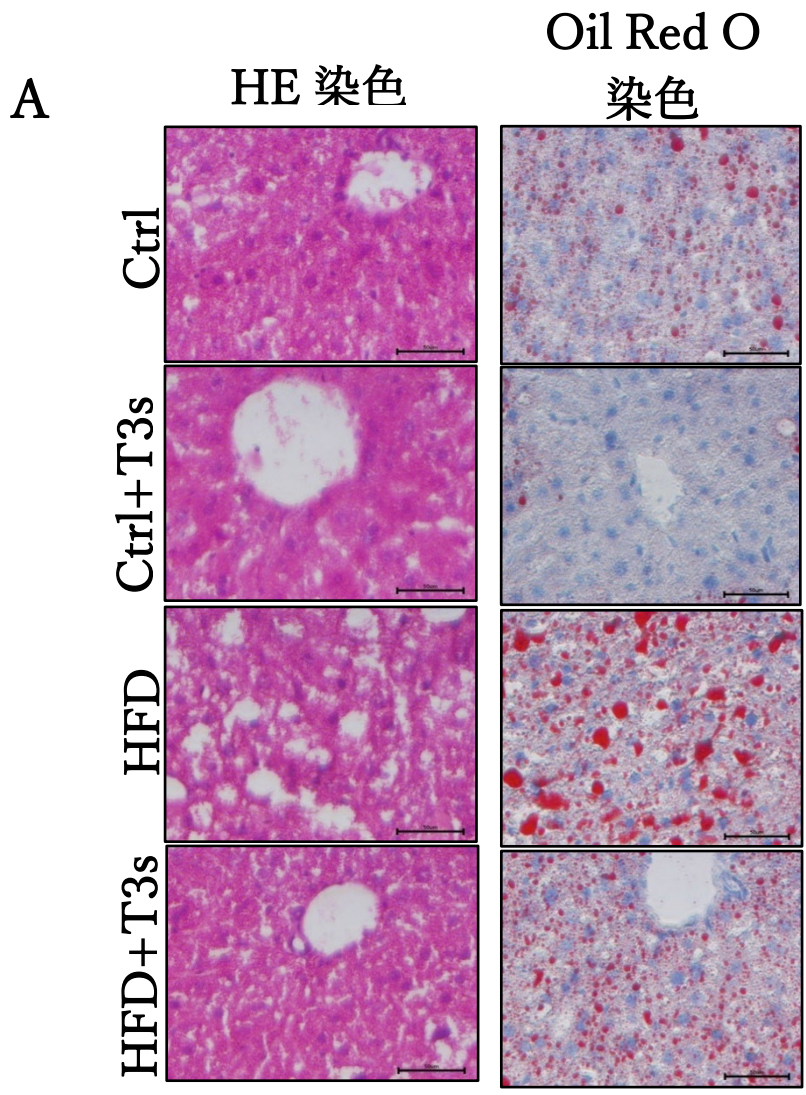


図 3-3 HFD および T3s の肝臓脂肪蓄積に対する効果

各群の肝臓における HE 染色および Oil Red O 染色の代表例(A)。スケールバー=50 μ m。Oil Red O 染色により染色された脂肪滴の面積比(B)。Ctrl を「1」として比で算出($n=4$)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。グラフは Mean \pm SE。

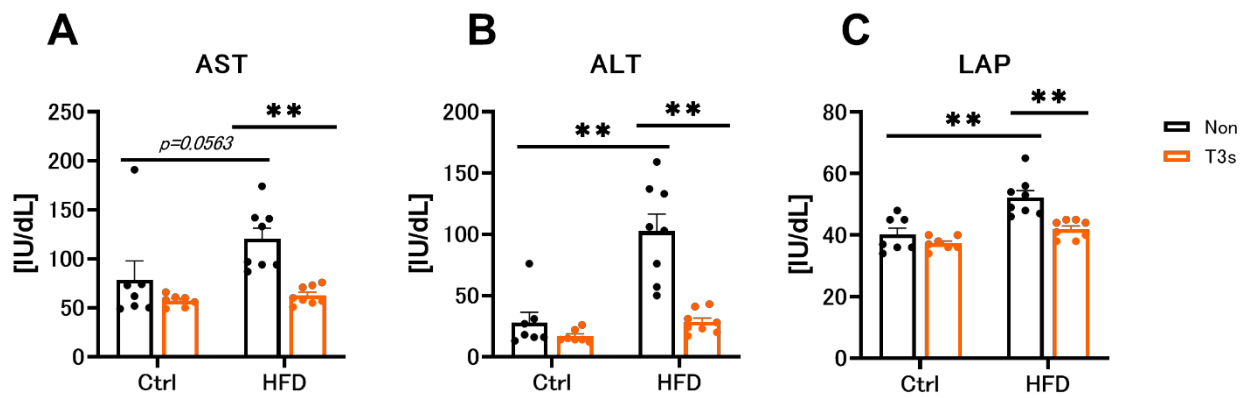


図 3-4 HFD および T3s による血清中の肝障害マーカー

血清中の AST (A)、ALT (B)、LAP (C)濃度($n=8$)。** $p<0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

T3s による白色脂肪組織重量の変化

体重が有意に変動していたため、HFD および T3s 投与による腎、精巣周囲の脂肪重量を測定した。HFD 投与で両白色脂肪重量は Ctrl と比較して有意に上昇した。そして、T3s は腎周囲脂肪でのみ HFD 摂取による上昇を有意に阻害した(図 3-5 A, F)。さらに、各白色脂肪組織に飼料から摂取した T3s が到達することを確認した(図 3-5 B-E, G-J)。

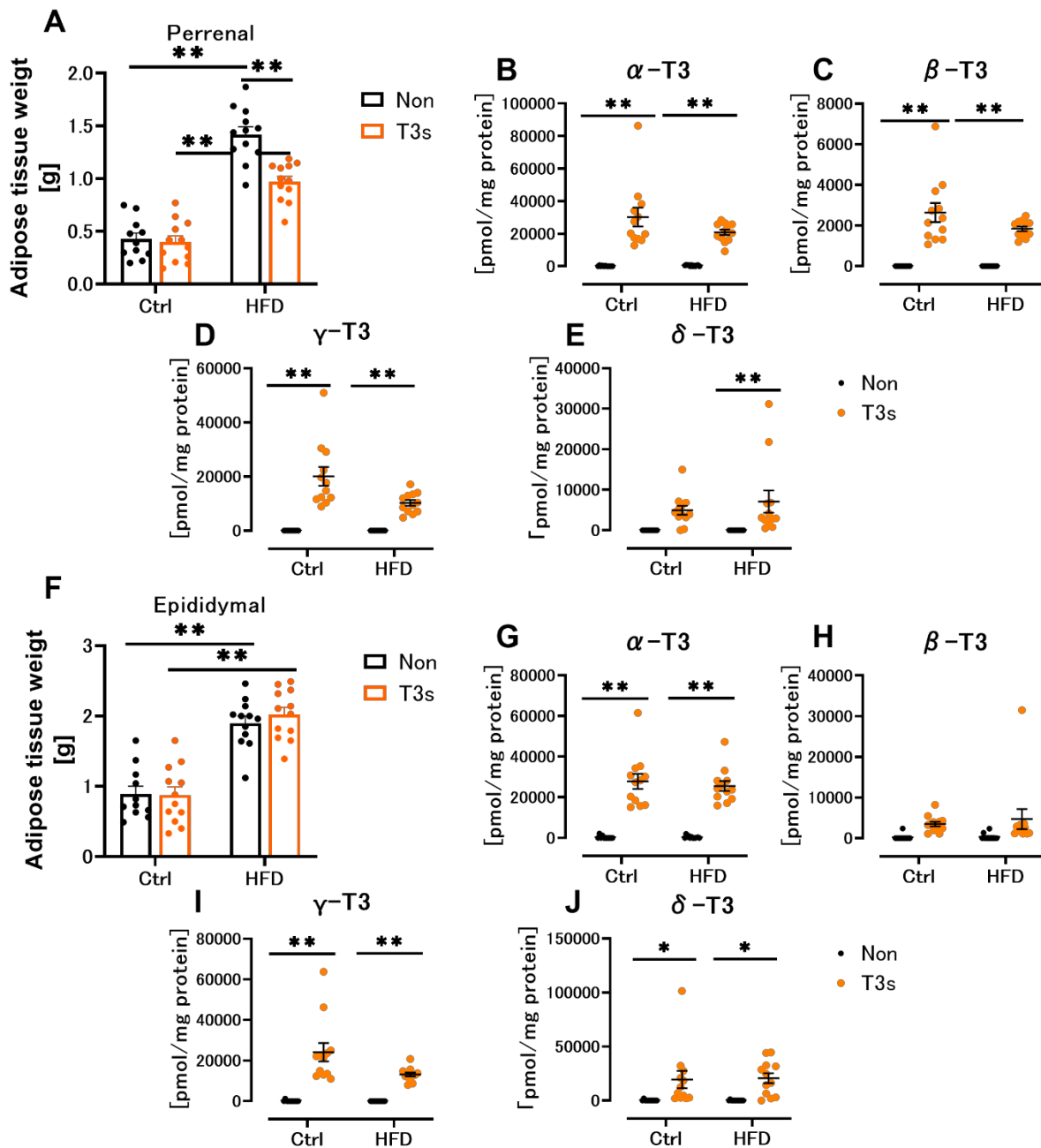


図 3-5 各マウスの白色脂肪組織重量

腎周囲脂肪組織重量 ($n=12$) (A)。腎周囲脂肪の T3s 量 ($n=12$) (B, C, D, E)。精巣周囲脂肪組織重量 ($n=12$) (F)。精巣周囲脂肪の T3s 量 ($n=12$) (G, H, I, J)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

T3sによる血清コレステロールの変化

マウス血清中の、TG、T-CHO、F-CHO、E-CHO、HDL、LDLの濃度を血清中で測定した。その結果、TG濃度に各群で変化は無かった。一方で、すべてのコレステロール濃度が、HFD摂取により上昇した。さらにT3sは、T-CHO、F-CHO、E-CHO、LDL濃度の上昇を有意に抑制した(図3-6 B-F)。

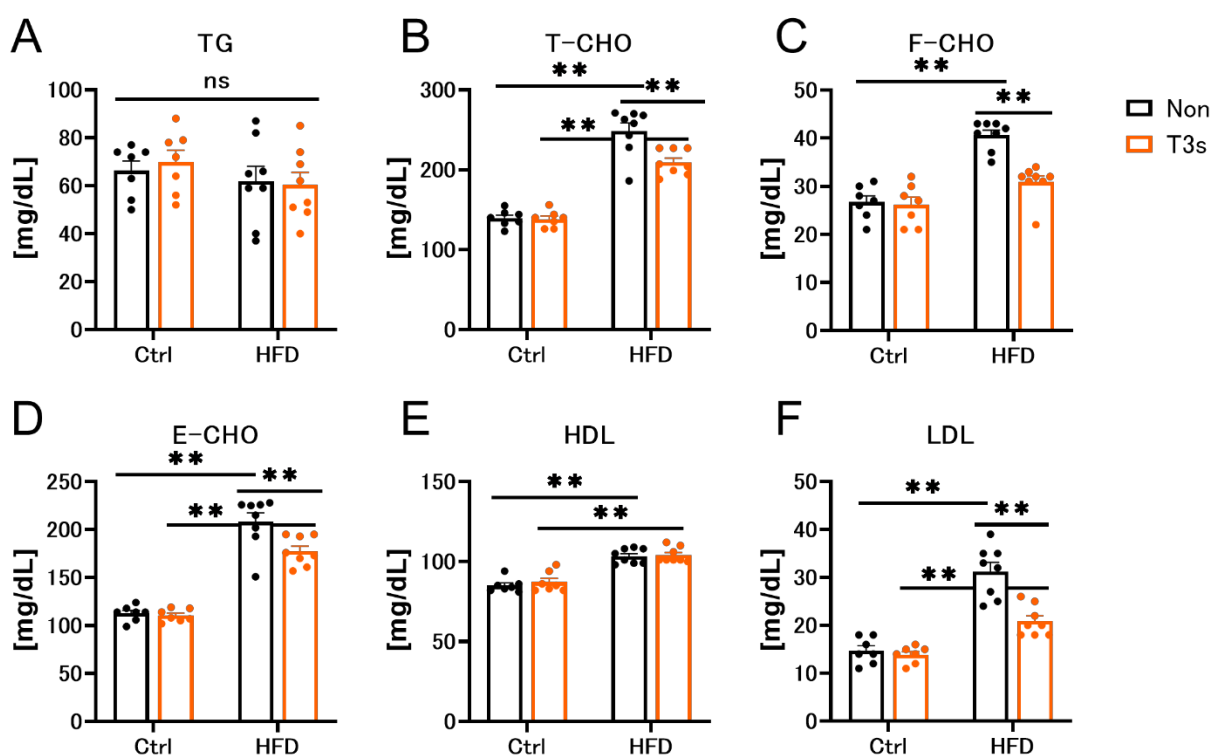


図3-6 HFDおよびT3s摂取による血清パラメーターの変化

TG (A)、T-CHO (B)、F-CHO (C)、E-CHO (D)、HDL (E)、LDL (F)の濃度($n=8$)。** $p < 0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

3. 認識機能に対する HFD 及び T3s 摂取の影響

各マウスの認識機能

肥満による認識機能低下のメカニズム解明、及び認識機能に対する T3s 摂取の影響を確かめるために、HFD 及び T3s 摂取によるマウスの認識機能の変動を測定した。モリス水迷路試験における学習率は、HFD 摂取による肥満では対照群と比較して変化はなかったが、Ctrl+T3s 群の認識機能は、Ctrl 群と比較して有意に高かった(図 3-7 A)。ロータロッド試験における認識機能の測定結果は、HFD 及び HFD+T3s が Ctrl および Ctrl+T3s 群と比較して有意に低値であった(図 3-7 B)。

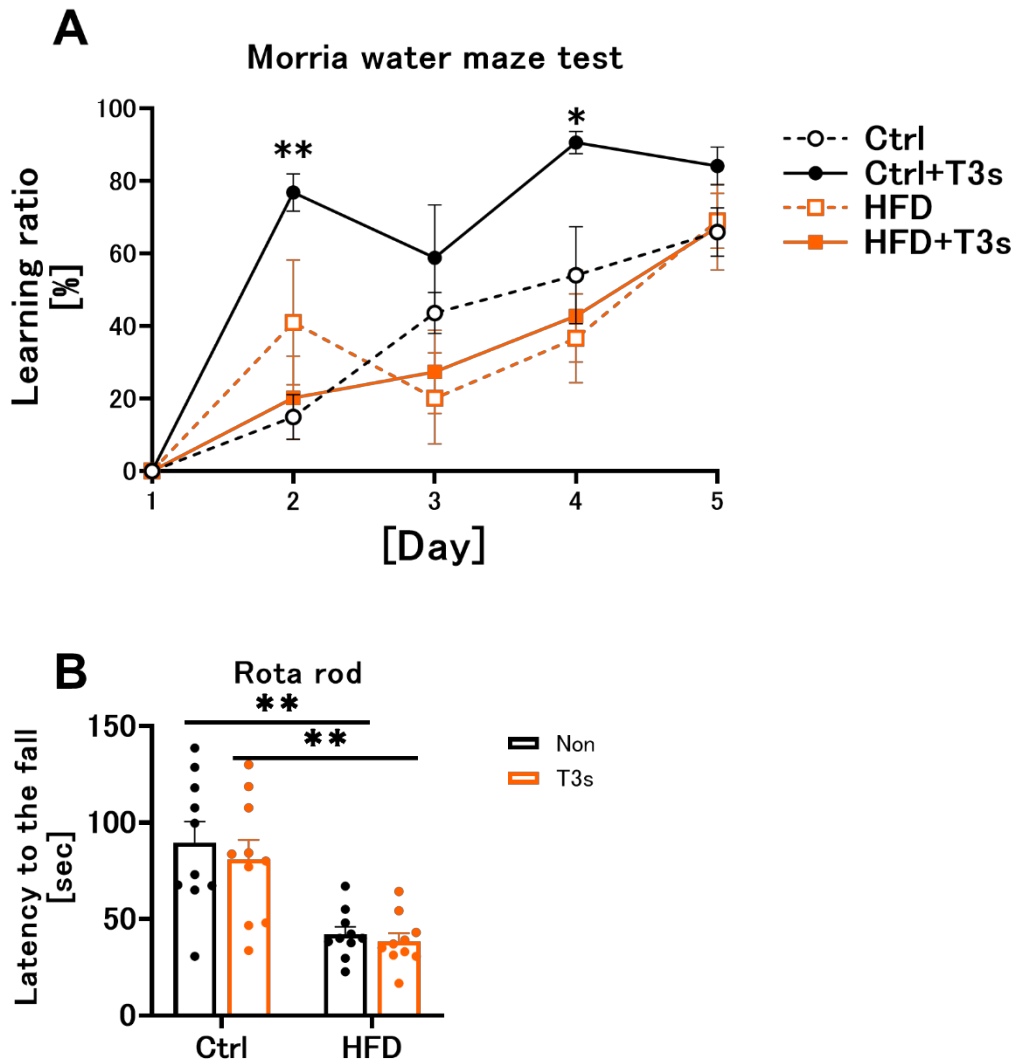


図 3-7 認識機能の測定

モーリス水迷路(Ctrl : $n=7$, Ctrl+T3s : $n=5$, HFD : $n=5$, HFD+T3s : $n=7$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Ctrl vs. Ctrl+T3s) (A)、ロータロッド($n=10$, ** $p<0.01$) (B)試験における各マウスの認識機能。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

T3s 摂取による脳内 α -T3 量の変化

T3s は血液脳関門を通過せず、脳内に到達できないとの報告が存在する⁽⁴¹⁾。そこで、本当に脳には T3s が到達しないのか HPLC を用いて調査した。解剖時、血液中に含まれる T3s を除去する為に、左心室より PBS を灌流し、脱血した脳サンプルを用いて測定した。その結果、大脳・海馬領において、すべての T3s が検出された。その中でも、 α -T3 のみが、T3s 投与により脳内での濃度が有意に上昇していた。さらに、海馬領においては、T3s 投与群の中でも、Ctrl+T3s より HFD+T3s の方が、有意に値が高かった(図 3-8 A-H)。

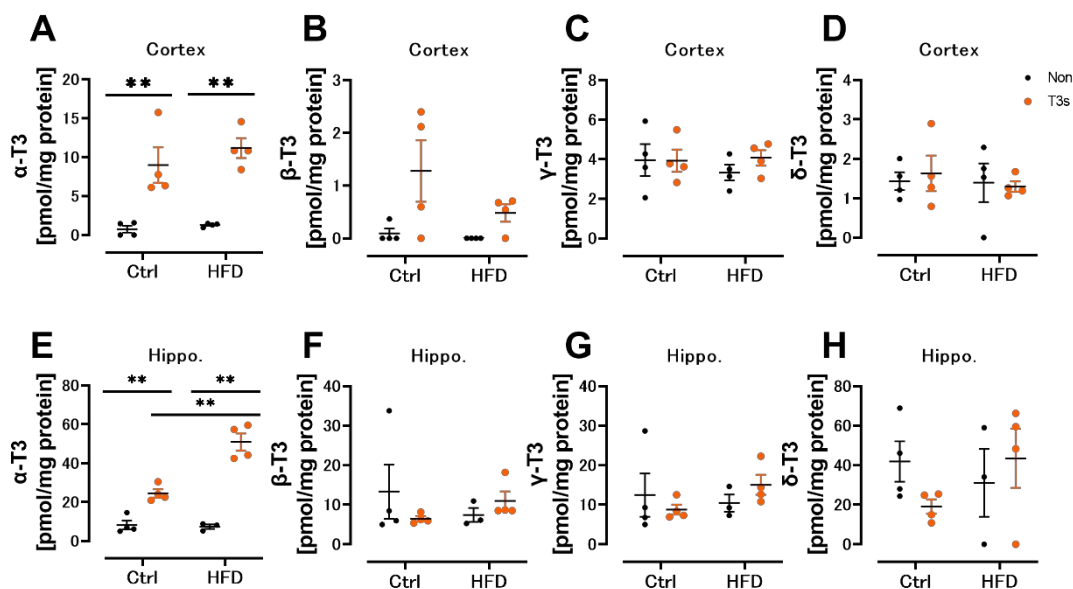


図 3-8 大脳、海馬における T3s 量

大脳における α - (A)、 β - (B)、 γ - (C)、 δ - (D)T3 の濃度 ($n=4$)。海馬における α - (E)、 β - (F)、 γ - (G)、 δ - (H)T3 の濃度 (Ctrl : $n=4$, Ctrl+T3s : $n=4$, HFD : $n=3$, HFD+T3s : $n=4$)。** $p < 0.01$, Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

さらに、T3s が脳内で検出されたため、BBB の形成に重要なタイトジャンクションの構成タンパク質である、JAM1、Claudin5、Occludin の発現変化を測定した。その結果、HFD 及び T3s の投与では、タイトジャンクション形成タンパク質の発現に変化は無かった(図 3-9A-F)。

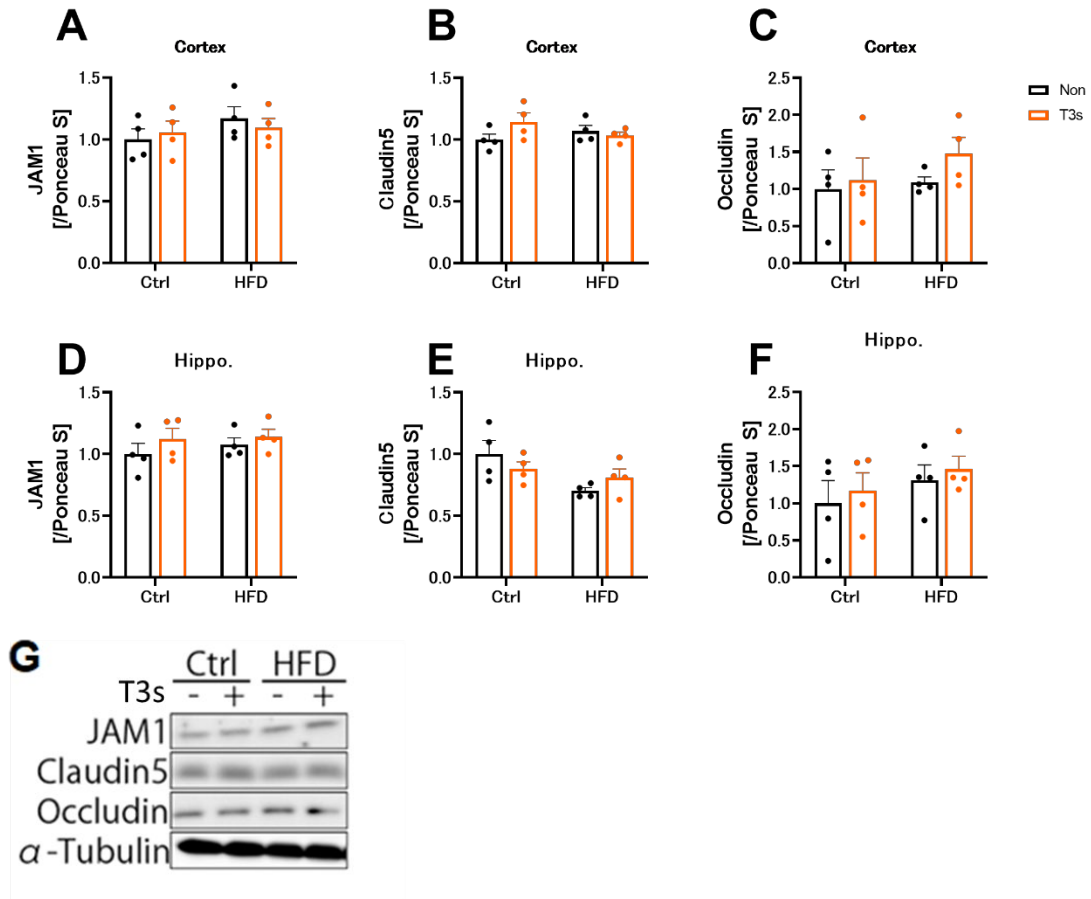


図 3-9 大脳、海馬におけるタイトジャンクション関連タンパク質の発現変化

JAM1 (A, D)、Claudin5 (B, E)、Occludin (C, F) の発現変化 ($n=4$)。WB の代表例 (G)。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

肥満および T3s 摂取による脳内酸化度の変化

T3s の有無で認識機能に差があった為、大脳、海馬領で酸化の指標である TBARS およびグルタチオンの酸化還元比を測定した。モーリス水迷路試験における認識機能に差はあったが、大脳、及び海馬領の酸化度に各群で差は無かった(図 3-10A-F)。

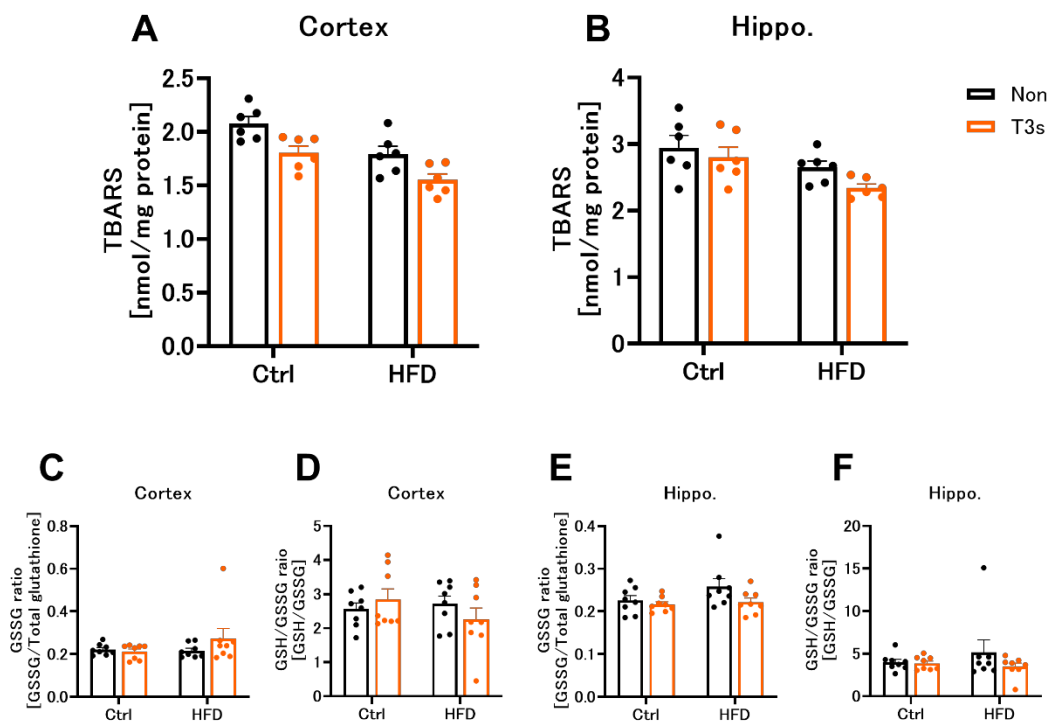


図 3-10 大脳、海馬における TBARS 量とグルタチオンの酸化還元比

TBARS 量 ($n=6$) (A, B)とグルタチオンの酸化還元比($n=8$) (C, D, E, F)。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

肥満及び T3s による脳内抗酸化酵素発現の変化

HFD および T3s 投与による抗酸化酵素のタンパク質発現変化を測定した。どの群間においても差は無かった(図 3-11 A-F)。

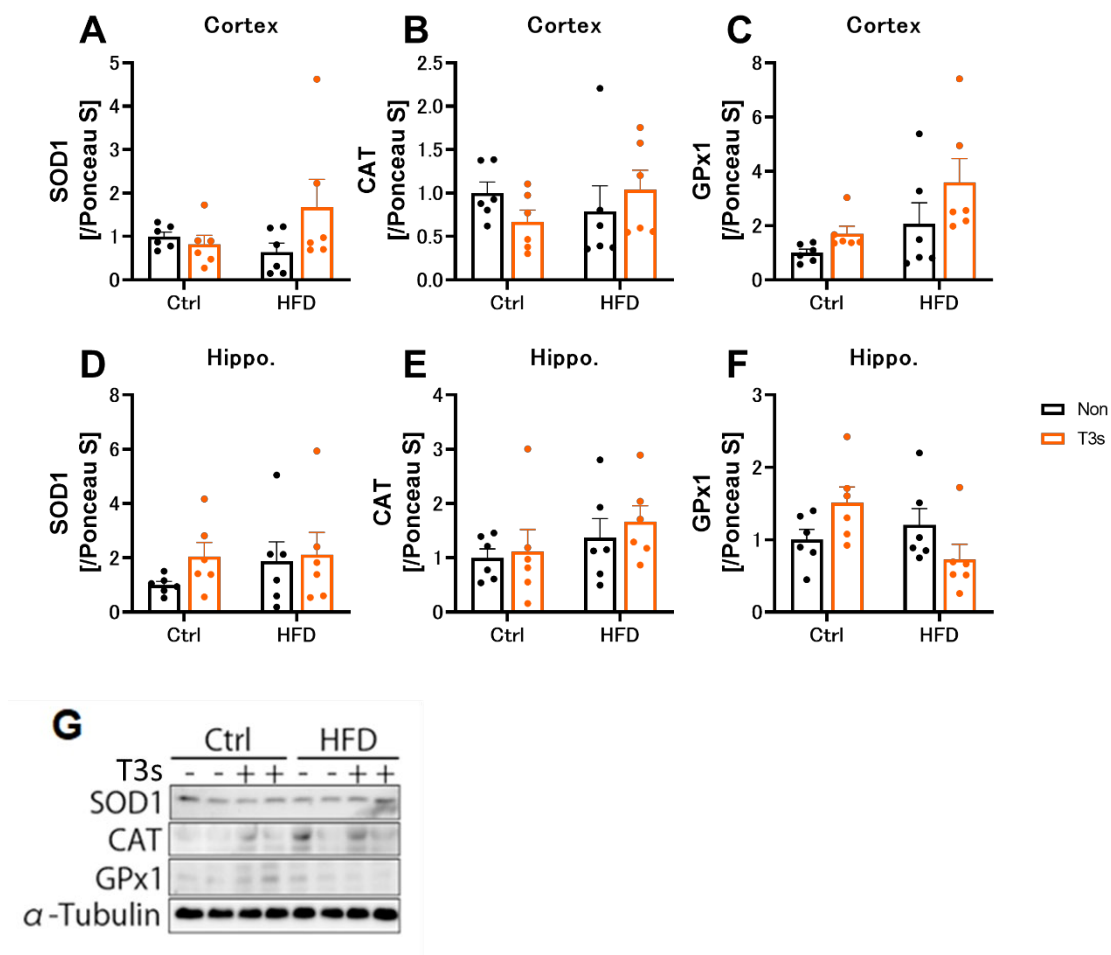


図 3-11 大脳、海馬における抗酸化酵素の発現比

SOD1 (A, D)、CAT (B, E)、GPx1 (C, F)の発現変化($n=6$)。WB の代表例(G)。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

肥満及び T3s による脳内神経栄養因子の発現変化

認識機能との関連が報告されている神経栄養因子、およびその mRNA の転写を制御している Histone H3 のアセチル化割合、さらにヒストン脱アセチル化酵素(Histone deacetylase : HDAC)1 の発現変化を WB 法にて測定した。すべてにおいて、HFD および T3s 摂取による有意な変動は無かった(図 3-12 A-H)。

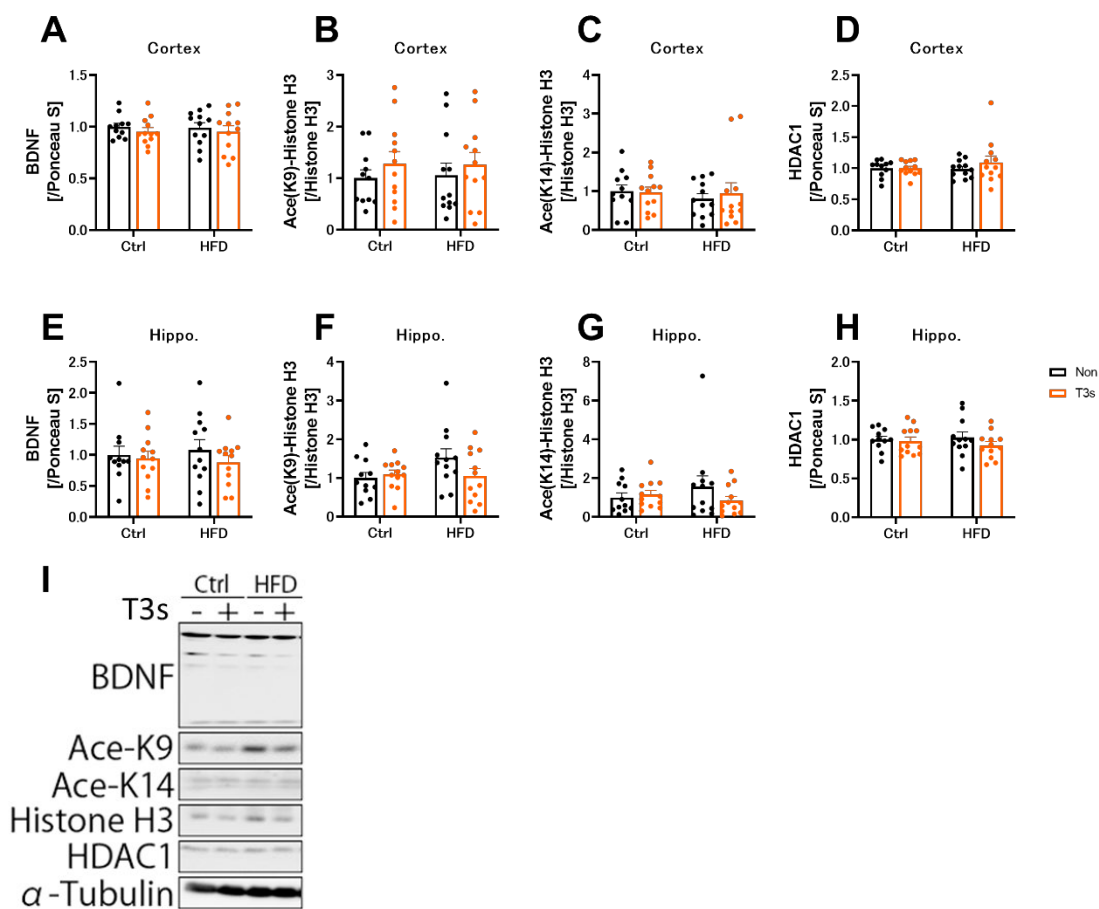


図 3-12 大脳、海馬における神経栄養因子および発現調節タンパク質の発現変化

BDNF (A, E)、アセチル化 Histone H3 (K9) (B, F)、アセチル化 Histone H3 (K14) (C, G)、HDAC1 (D, H)。(Ctrl : $n=11$, Ctrl+T3s : $n=12$, HFD : $n=12$, HFD+T3s : $n=12$)。WB の代表例(I)。Two-way ANOVA with Tukey-Kramer's test。すべてのグラフは Mean \pm SE。

考察

1. T3s の抗肥満作用について

T3s の体重増加抑制作用に関して

本研究では、以前我々が先行研究で確認した、HFD に 0.01% の T3s を添加した際の体重増加抑制作用が⁽⁴³⁾0.05% でも発揮されるのか、及びそのメカニズムの解明を試みた。C57BL/6 マウスを HFD に 0.05% の T3s を添加した飼料で飼育したところ、HFD のみで飼育したマウスと比較して、体重増加が有意に阻害されていた(図 3-2 A)。このことから、T3s は投与量に関わらず体重増加を阻害することが明らかとなった。さらにこの時、マウスの 24 時間、一匹当たり摂餌量に T3s の有無で差は無かった(図 3-2 B-C)。抗肥満作用が報告されている物質の多くは、脳の視床下部に作用し、摂餌量を減少させることで体重増加を抑制することが報告されている⁽⁴⁴⁾。しかし、T3s は摂餌量に影響を与えなかったこと、および 0.01% の T3s 投与時には脳内 T3s 量に変動が無かったことから⁽⁴³⁾、他の体重増加抑制作用を持つ物質とは別のメカニズムであることが示唆された。T3s の体重増加抑制作用のメカニズムを明らかとするために、解剖時、腎周囲および睪丸周囲の白色脂肪組織を採取し重量を測定した。その結果、HFD の投与により両白色脂肪組織の重量は、Ctrl と比較して有意に増加したが、HFD+T3s 群の腎周囲脂肪重量は HFD 群と比較して有意に低値であった(図 3-5 A, F)。このことから、T3s は肥満による白色脂肪組織重量の増加を抑制することが明らかとなった。しかしながら、この効果は、睪丸周囲の脂肪組織では発揮されていなかった。これは、睪丸は生殖に必要な組織であり、睪丸周囲脂肪はそれを保護する役割も担っている為、重量が減少しにくい可能性が考えられる。今回観察した T3s による腎周囲脂肪組織重量の減少は、ミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーであるマイトファジーの変動が関与している可能性がある。Zhang らは、脂肪組織特異的にオートファジーに必須である *atg7* をノックアウトしたマウスでは、HFD を与えても体重が増加しないこと、及びそのメ

カニズムとして、白色脂肪細胞でのミトコンドリア数の増加を報告している⁽⁵³⁾。加えて、オートファジーは VE などの栄養素により抑制されることが報告されている⁽⁵⁴⁾。これらのことから、本研究で観察した腎周囲脂肪組織重量の減少は、組織まで到達した T3s がマイトファジーを抑制し、その結果ミトコンドリア数が増加し、エネルギー代謝の変動などを介して脂肪組織重量を減少させたのではないかと考えられる。さらに T3s は、培養脂肪細胞の細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘導する作用が報告されている。Wu らは、培養脂肪細胞である 3T3-L1 細胞に γ -T3 を添加すると、細胞周期を停止させ、さらにアポトーシスを誘導すること、そのメカニズムとして Bax の調節やアデノシン 5'-リン酸活性化プロテインキナーゼ (Adenosine monophosphate-activated protein kinase : AMPK) シグナルの調節を明らかとした⁽⁵⁵⁾。このことから T3s はこれらの作用を介して白色脂肪組織の重量を減少させた可能性もある。

T3s の体重増加抑制以外の抗肥満作用に関して

本研究では、T3s の体重増加抑制作用以外の抗肥満作用についても検討した。肥満時に多く見られる、脂肪肝に対する T3s の効果を検討するために、マウスに HFD を T3s の有無で投与後、PBS で灌流を行い脱血した肝臓を採取した。その肝臓を用いて、凍結切片を作成し、Oil Red O 染色を行い肝細胞中の脂肪滴を染色した。その結果、HFD を投与したマウスの肝切片では、Ctrl 投与マウスと比較して脂肪滴の数が多く、その一つのサイズが大きかった。そして、T3s の同時投与はその HFD 投与による脂肪滴の蓄積を有意に阻害した。さらに、T3s は HFD 投与マウスだけでなく、Ctrl 投与マウスの肝臓でも脂肪滴の蓄積を有意に阻害した(図 3-3 A-B)。加えて、HFD を投与したマウスの血清中では、肝細胞の損傷マーカーである、AST、ALT、LAP の濃度が上昇しており、T3s はその上昇を有意に阻害した(図 3-4 A-C)。これらの結果から、T3s が肥満による肝臓の損傷を抑制することが明らかとなった。肥満時肝臓では酸化ストレスが亢進しており、それが肝損傷の原因となっている⁽⁵⁶⁾。その為、本研究で観察した T3s によ

る肝臓の保護効果は抗酸化作用を介している可能性が考えられる。今回 HFD 投与で上昇していた、血清中の T-CHO、F-CHO、E-CHO、LDL などのコレステロール濃度も T3s の投与により有意に減少していた(図 3-6 B-F)。生体内に吸収された脂質やタンパク質、糖質は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイム A (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A : HMG-CoA)に変換された後、HMG-CoA 還元酵素によりメバロン酸に変換され、最終的にコレステロールへと変換される⁽⁵⁷⁾。T3s はこのコレステロール合成に必要不可欠な HMG-CoA 還元酵素の活性阻害および分解の促進作用を持つことが報告されている^(58, 59)。その為、本研究で観察した T3s 摂取によるコレステロール濃度の低下は、T3s が HMG-CoA 還元酵素を阻害した結果である可能性が考えられる。本研究結果では、肝細胞中の脂肪滴も T3s 摂取により有意に減少した。これは、血清コレステロール濃度減少の結果である可能性が高い。さらに、緒言でも述べた通り、培養肝細胞に H₂O₂を添加すると脂肪滴が有意に増加することや、脂肪酸添加による脂肪滴の増加は、VC や NAC などの抗酸化物質の同時添加で予防できることが報告されている^(23, 24)。これは、肝細胞での酸化ストレスが脂肪滴の形成に関与しており、抗酸化物質がそれを予防できることを示している。そのため、今回観察した HFD+T3s 群での肝切片における脂肪滴の減少は、T3s の抗酸化作用を介している可能性がある。

2.肥満及び T3s 摂取による認識機能の変動について

特別食による認識機能変動

本研究では、T3s の抗肥満作用に関する検討だけでなく、肥満による認識機能の低下およびそのメカニズムの解明と、それに対する T3s の作用に関しても同時に検討を行った。認識機能の測定にはモーリス水迷路試験とロータロッド試験を用いた。今回、4週齢の C57BL/6 マウスに対して、8週間 HFD を給餌し肥満を誘導したが、モーリス水迷路試験における認識機能に変化は無かった。しかし、Ctrl+T3s 群の認識機能は、Ctrl 群と比較して有意に高かった(図 3-7 A)。この理由として、Ctrl 投与により既に認

識機能が低下している可能性が考えられた。本研究で使用した Ctrl(#D12450, Research Diets Inc.)は HFD の対照食として専用に設計された飼料であり、通常マウスの維持に使用している飼料(ラボ MR ストック：Nosan Corp., Kanagawa, Japan)とは組成が異なる。その為、Ctrl 群では MR ストックで飼育したマウスと比較して、過栄養状態にあり、対照食ではあるが、肥満状態になっている可能性が考えられる。実際に、成長による体重増加の少ない 36 週齢のマウスに 20 週間 Ctrl を与えマウスの体重増加率を、MR ストックで飼育した同齢のマウスの体重増加率と比較すると、有意に高かった(図 3-13)。

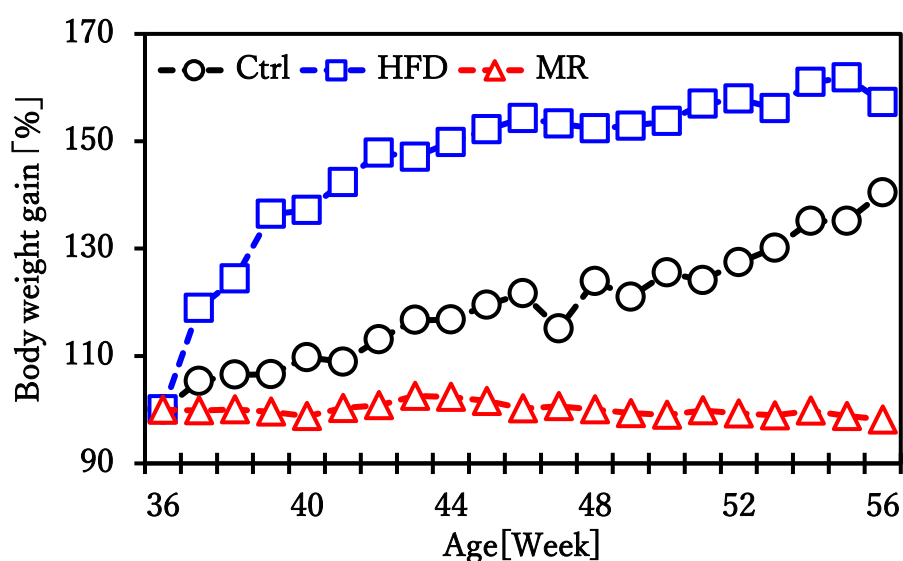


図 3-13 36 週齢のマウスにおける各飼料での体重増加率

この為、HFD ではなく Ctrl で既に肥満状態にあり、認識機能が低下している可能性が考えられる。その結果、HFD による肥満時に認識機能の低下が確認できず、Ctrl と T3s の同時投与により認識機能が上昇したと考えられる。

一方で、ロータロッド試験における測定結果では、HFD 及び HFD+T3s の投与により、Ctrl および Ctrl+T3s の投与と比較して、有意に落下までの時間が早くなった(図 3-7 B)。しかしながら、この結果はマウスの体重が大きく影響している可能性が考えられる。各マウスの体重と落下までの時間では、有意な負の相関が存在した(図 3-14)。つまり、体重が重いマウスほど早くロッドから落下していた。このことから、HFD 投与マ

ウスと対照マウスの間には有意な体重差があるため、肥満モデルマウスの認識機能判定にロータロッド試験は不向きである可能性がある。

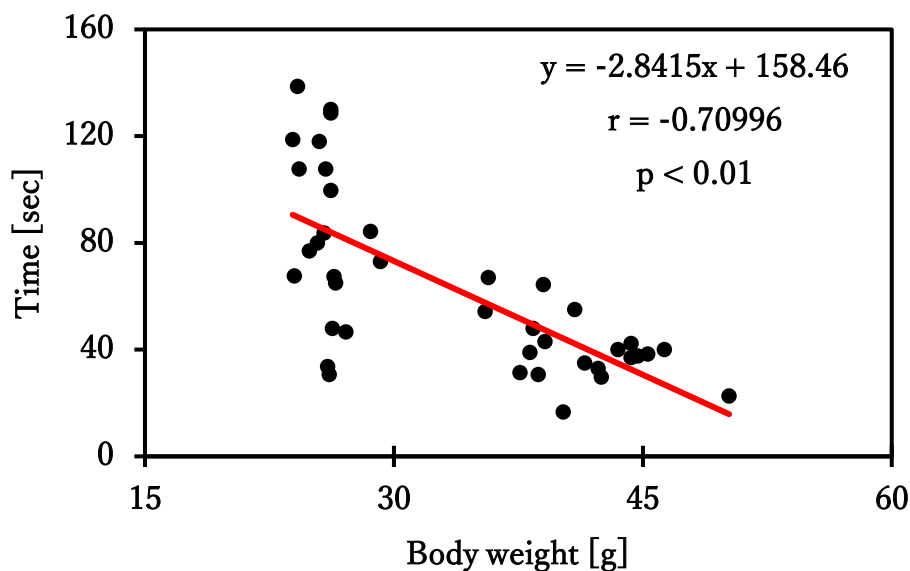


図 3-14 体重とロータロッド試験における落下までの時間の相関図

本研究では認識機能と強力に関連している、脳内の酸化還元バランスや、神経栄養因子である BDNF の発現変化を測定したが、どちらも変化は無かった(図 3-10 A-E, 12 A, E) ^(60, 61, 62)。この結果は、認識機能に変化が無かったことと一致している。

BDNF の転写に関与している、ヒストン H3 のアセチル化及びヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 の発現にも変化は無かった(図 3-12 B-D, F-H) ⁽⁶²⁾。T3s の代謝物が HDAC の作用を阻害する可能性が報告されているが⁽⁶³⁾、本研究結果よりマウスの脳において T3s は HDAC の発現に影響しないことが明らかとなった。

・脳への T3s の到達について

本研究では、脳への T3s の到達に関して検討を行った。T3s が脳で抗酸化作用や神経保護作用を発揮するためには、確実に神経細胞まで到達する必要がある。しかしながら、T3s は BBB を通過しないとの報告が存在する⁽⁴¹⁾。若齢ラットに対する T3s 投与では脳内で T3s は検出されず、老齢ラットに T3s を投与した時の脳内では T3s が検出された。

この時同時に、BBB を構成するタイトジャンクションに重要なタンパク質である Claudin5 の発現は老齢ラット脳内では減少していた⁽⁴¹⁾。第1章でも飼料に T3s を添加すると脳内での T3s 量が有意に増加することを明らかとしたが、この時の脳サンプルには脳血管内に血液が残留していた。そこで本研究では、解剖時に PBS を灌流させることで、脳サンプルから血液を取り除き T3s 量を定量した。その結果、T3s の投与により大脳および海馬領において α -T3 が有意に増加することを明らかとした(図 3-8 A, E)。さらに、これらの脳サンプルを用いて、WB 法にて BBB の形成に重要なタイトジャンクションを構成している、JAM1、Claudin5、Occludin の発現変化を測定したが、各飼料間で差は無かった(図 3-9 A-F)。このことから、T3s は BBB に影響することなく、脳内まで確実に到達することを確認した。このメカニズムとして HDL 受容体を介している可能性が考えられる。VE は小腸から吸収された後、カイロミクロンやカイロミクロンレムナントと共に、肝臓へと輸送される。その後肝臓で、LDL や HDL に組み込まれ、血中に放出されることで各組織へと向かう⁽¹⁰⁾。この LDL や HDL は、それぞれの受容体を介して BBB を通過し、脳まで到達する。HDL 受容体としてよく知られる SRB1 を、培養脳毛細血管内皮細胞(pBCECs)にアデノウイルスを用いて過剰発現させると、HDL に含まれる α -TOC が増加することが報告されてる⁽⁴²⁾。さらに、SRB1 欠損マウスの脳内では α -TOC 量が低い。一方で、LDL 受容体ノックアウトマウスの脳内 α -TOC 量には変化が無いことが報告されている⁽⁶⁴⁾。以上のことから、T3s は HDL 受容体を介して BBB を通過し、脳まで到達したと考えられる。さらに、海馬領においては Ctrl+T3s の α -T3 量と比較して、HFD+T3s の α -T3 量の方が有意に高かった。この理由として、血清中の HDL 量が考えられる。HFD+T3s 群の血清 HDL 濃度は Ctrl+T3s 群と比較して有意に高かった(図 3-6 E)。この為 HFD+T3s 群では、より多くの α -T3 が輸送された可能性がある。

結論

本研究では、T3s の体重増加抑制作用および体重増加抑制以外の抗肥満作用と、肥満による認識機能低下に関して検討を行った。その結果、T3s は腎臓周囲の白色脂肪組織重量を減少させることで、肥満による体重増加を抑制する可能性が示唆された。さらに、体重増加抑制以外の抗肥満作用として、脂肪肝および、血清コレステロール濃度上昇の抑制作用が明らかとなった。同時に、HFD 投与による肥満では認識機能が低下しないこと、さらに脳の酸化還元バランスや神経栄養因子の発現に影響しないことが明らかとなった。しかしながら、白色脂肪組織重量や血清コレステロール濃度の減少のメカニズムは不明である為、更なる検討が必要である。

第3章 結論

肥満は世界中で増加しており、糖尿病や心血管系疾患など多様な疾患の発症リスクを高めるため、深刻な社会問題となっている。そこで、抗肥満に世間の注目が集まっているが、肥満を予防するために来院し、薬を処方してもらおうと考える人は少ない。そこで、ポリフェノール類やカフェインなど天然に存在する抗肥満作用を持つ物質に注目が集まっている。そこで、本研究では天然に存在する栄養素である T3s の抗肥満作用に着目し、そのメカニズムの解明に取り組んだ。さらに、肥満は AD のような認識機能障害を誘引することが報告されている。しかし、その詳細な発症機構は不明であった。そこで、本研究では脳の酸化に着目し、肥満が認識機能障害を誘引するメカニズムの解明を試みた。同時に、T3s によるその抑制の可否についても検討した。

我々は 2019 年に T3s が体重増加抑制作用を示すことを明らかとした⁽⁴⁷⁾。本研究ではそのメカニズムを解明するために、マウスに HFD と T3s を同時に与えた。その結果、T3s は HFD による体重増加を抑制することを明らかとした。さらに、T3s の体重増加以外への抗肥満効果として、肝細胞での脂肪の異常蓄積を予防することを明らかとした。同時に白色脂肪組織の重量を測定したところ、T3s は HFD による増加を有意に阻害することを明らかとした。これらのメカニズムとして、血清中のコレステロール濃度の減少を明らかとした。

本研究では、HFD は認識機能に影響を与えないことを明らかとした。この原因として認識機能の測定法の問題および、HFD 専用の対照食で既に肥満になっている可能性が示唆された。

以上の様に本研究結果では、T3s が肥満を抑制することを明らかとした。本研究結果が、社会問題解決の一助となることを祈る。

参考文献

1. Cesare MD, Bentham J, Steven, et al., Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19-2 million participants. *Lancet*, **2016**, 387, 1377-1396.
2. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM, et al., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type-2 diabetes. *Nature*, **2006**, 444, 840-846.
3. Piche ME, Tchernof A, Despres JP, et al., Obesity phenotypes, diabetes and cardiovascular diseases. *Circ Res*, **2020**, 126, 1477-1500.
4. Capek J, Rousar T, Detection of oxidative stress induced by nanomaterials in cells- The roles of reactive oxygen species and glutathione. *Molecules*, **2021**, 4, 4710.
5. Turrens JF, Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, **2003**, 552, 335-344.
6. He L, He T, Farrar S, et al., Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*, **2017**, 44, 532-553.
7. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE, Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, **2011**, 15, 1957-1997.
8. Reyhani A, Mckenzie TG, Fu Q, et al., Fenton-chemistry-mediated radical polymerization. *Macromol Rapid Commun*, **2019**, 40, e1900220.
9. Tehrani HS, Movahedi AKM, Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol*, **2018**, 140, 5-12.
10. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, et al., Vitamin E: Regulatory redox interactions. *IUBMB Life*, **2019**, 71, 430-441.
11. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM, The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients*, **2017**, 9 866.

12. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al., Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, **2018**, 13, 757-772.
13. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al., Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*, **2019**, 2019, 5080843.
14. Pall ML, The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure, *Int J Mol Sci*, **2013**, 14, 22274-22330.
15. Teixeira D, Fernandes R, Prudencio C, et al., 3-Nitrotyrosine quantification methods: current concepts and future challenges. *Biochimie*, **2016**, 125, 1-11.
16. He FF, Li HQ, Huang QX, et al., Tumor necrosis factor-Alpha and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine are associated with elevated urinary angiotensin-2 level in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Kidney Blood Press Res*, **2015**, 40, 355-365.
17. Yagishita Y, Uruno A, Fukutomi T, et al., Nrf2 improves leptin and insulin resistance provoked by hypothalamic oxidative stress. *Cell Rep*, **2017**, 18, 2030-2044.
18. Gao S, Zhao D, Wang M, et al., Association between circulating oxidized LDL and atherosclerotic cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies. *Can J Cardiol*, **2017**, 33, 1624-1632.
19. Rhoads J, Major AS, How oxidized low-density lipoprotein activates inflammatory responses. *Crit Rev Immunol*, **2018**, 38, 333-342.
20. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **2004**, 114, 1752-1761.
21. Royo GM, Rodriguez C, Pape AL, et al., The role of mitochondrial oxidative stress in the metabolic alteration in diet-induced obesity in rats. *FASEB J*, **2019**, 33, 12060-12072.
22. Corradini E, Pietrangelo A, Iron and steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, **2012**, 2, 42-46.

23. Jin Y, Tan Y, Chen L, et al., Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in HepG2 cells by increasing perilipin 2 expression. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 3445.
24. Yang JP, Shin JH, Seo SH, et al., Effects of antioxidants in reducing accumulation of fat in hepatocyte. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 2563.
25. Dereska NH, Mclemore EC, Tessier D, et al., Short-term, moderate dosage vitamin E supplementation may have no effect on platelet aggregation, coagulation profile, and bleeding time in healthy individuals. *J Surg Res*, **2006**, 132, 121-129.
26. Neophytou CM, Constantinou AI, Drug delivery innovations for enhancing the anticancer potential of vitamin E isoforms and their derivatives. *Biomed Res Int*, **2015**, 2015, 584862.
27. Khadangi F, Azzi A, Vitamin E – The next 100 years. *IUBMB Life*, **2019**, 71, 411-415.
28. Zingg JM, Vitamin E: an overview of major research directions. *Mol Aspects Med*, **2007**, 28, 400-422.
29. Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, et al., alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation*, **1996**, 94, 2434-2440.
30. Yamauchi R, Vitamin E: Mechanism of its antioxidant activity. *Food Sci Technol Int Tokyo*, **1997**, 3, 301-309.
31. Pizzimenti S, Toalbo C, Pettazzoni P, et al., The “two-faced” effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers (Basel)*, **2010**, 1, 338-363.
32. Kamat JP, Devasagayam TP, Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria. *Neurosci Lett*, **1995**, 195, 179-182.

33. Serbinova E, Kagan V, Packer L, Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med*, **1991**, 10, 263-275.
34. Peh HY, Tan WSD, Liao W, et al., Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacol Ther*, **2015**, 162, 152-169.
35. Theriault A, Chao JT, Wang Q, et al., Tocotrienol: A Review of Its Therapeutic Potential. *Clin Biochem*, **1999**, 32, 309-319.
36. Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y, et al., Natural Antioxidants: A Novel Therapeutic Approach to Autism Spectrum Disorders? *Antioxidants*, **2020**, 9, 1186.
37. Fukui K, Takatsu H, Koike T, et al., Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: prevention by tocotrienols. *Free Radic Res*, **2011**, 45, 681-691.
38. Fukui K, Ushiki K, Takatsu H, et al., Tocotrienols prevent hydrogen peroxide-induced axon and dendrite degeneration in cerebellar granule cells. *Free Radic res*, **2012**, 46, 184-193.
39. Fukui K, Masuda A, Hosono A, et al., Changes in microtubule-related proteins and autophagy in long-term vitamin E-deficient mice. *Free Radic Res*, **2014**, 48, 649-658.
40. Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, et al., The estrogen receptor β -PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. *Biochim Biophys Acta*, **2014**, 1303-1312.
41. Kaneai N, Sumitani K, Fukui K, et al., Tocotrienol improves learning and memory deficit of aged rats. *J Clin Biochem Nutr*, **2016**, 58, 114-121.
42. Goti D, Hrzenjak A, Levak FS, et al., Scavenger receptor class B, type 1 is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J Neurochem*, **2001**, 76, 498-508.
43. Fukui K, Shirai M, Niinuma T, et al., Anti-obesity effects of tocotrienols and bran in high-fat diet-treated mice. *Nutrients*, **2019**, 11, 830.

44. Wu L, Meng J, Shen Q, et al., Caffeine inhibits hypothalamic A1R to excite oxytocin neuron and ameliorate dietary obesity in mice. *Nat Commun*, **2017**, 8, 15904.
45. RazL, Knoefel J, Bhaskar K, The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2016**, 36, 172-186.
46. Ji Y, Lang X, Wang W, et al., Lactobacillus paracasei ameliorates cognitive impairment in high-fat induced obese mice via insulin signaling and neuroinflammation pathway. *Food Funct*, **2021**, Advance article.
47. Yin H, Wang W, Yu W, et al., Changes in synaptic plasticity and glutamate receptors in type 2 diabetic KK-Ay mice. *J Alzheimers Dis*, **2017**, 57, 1207-1220.
48. Wang M, Lv J, Huang X, et al., High-fat diet-induced atherosclerosis promotes neurodegeneration in the triple transgenic (3 × Tg) mouse model of Alzheimer's disease associated with chronic platelet activation. *Alzheimers Res Ther*, **2021**, 13, 144.
49. Loffler T, Flunkert S, Havas D, et al., Neuroinflammation and related neuropathologies in APP_{SL} mice: further value of this in vivo model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, **2014**, 11, 84.
50. Bhat AH, Dar KB, Anees S, et al., Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*, **2015**, 74, 101-110.
51. Christopher DM, Paul JP, Pistell DK, et al., High fat diet hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: Implications for decreased Nrf2 signaling. *J. Neurochem*. **2010**, 114, 1581–1589.
52. Karem, H. Alzoubi, Omar, F. et al., Vitamin E prevents high-fat high- carbohydrates diet-induced memory impairment: The role of oxidative stress, *Physiol Behav* **2013**, 119, 72– 78.
53. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, et al., Adipose-specific deletion of autophagy-related

- gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2009**, 106, 19860-19865.
54. Mizushima N, Komatsu M, Autophagy: renovation of cell and tissues. *Cell*, **2011**, 147, 728-741.
55. Wu SJ, Huang GY, Ng LT, γ -Tocotrienol induced cell cycle arrest and apoptosis via activating the Bax-mediated mitochondrial and AMPK signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem Toxicol*, **2013**, 59, 501-513.
56. Ke Z, Tan S, Li H, et al., Tangeretin improves hepatic steatosis and oxidative stress through the Nrf2 pathway in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease mice. *Food Funct*, **2022**, Advance article.
57. Tobert JA, Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **2003**, 2, 517-526.
58. Parker RA, Pearce BC, Clark RW, et al., Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, **1993**, 268, 11230-11238.
59. Song BL, Boyd RAD, Insig-dependent ubiquitination and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase stimulated by delta- and gamma-tocotrienols. *J Biol Chem*, **2006**, 281, 25054-26061.
60. Fukui K, Takatsu H, Shinkai T, et al., Appearance of amyloid beta-like substances and delayed-type apoptosis in rat hippocampus CA1 region through aging and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*, **2005**, 8, 299-309.
61. Fukui K, Nakamura K, Shirai M, et al., Long-Term Vitamin E-Deficient Mice Exhibit Cognitive Dysfunction via Elevation of Brain Oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **2015**, 61, 362-368.
62. Sleiman SF, Henry J, Haddad RA, et al., Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -

hydroxybutyrate. *Elife*, **2016**, 5, e15092.

63. Dashwood RH, Myzak MC, Ho M, Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*. **2006**, 27, 344-349.
64. Lee P, Ulatowski LM, Vitamin E: mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life*, **2019**, 71, 424-429.

謝 辞

まず、6年間研究だけでなく私生活にもわたりご指導していただいた、指導教員である芝浦工業大学、生命科学科、福井浩二教授に心より感謝いたします。さらに本研究遂行のため、多くの先生方や研究者の皆様にご指導いただきました。杏林大学臨床検査技師学科、高津博勝准教授にはマウスの灌流固定法をご教授いただきました。また、高津先生も本学出身ということもあり、先輩としても研究生活など幅広くご相談に乗っていただきました。東京都健康長寿医療センター研究所、老化脳神経科学研究チームリーダーである遠藤昌吾先生、並びに柳井修一先生には凍結切片の作成法のご教授及びクライオスタットを貸していただきました。さらに、神奈川工科大学管理栄養学科、栄養生化学研究室の清瀬千佳子教授には、マウスの白色脂肪組織の採取法を、わざわざ本学まで来校いただき、ご教授していただきました。そして、三菱ケミカルの青木由典様には T3s に関する知識や情報などを随時ご提供いただきました。当たり前のことですが、本研究は私一人では到底ここまで遂行することは不可能でした。ご協力していただいたすべての先生方にお礼申し上げます。さらに本論文の審査をしていただきました先生方にも深謝いたします。

- ・ 芝浦工業大学
分子細胞生物学研究室
福井浩二 教授
- ・ 杏林大学
臨床検査技師学科
高津博勝 准教授

- ・ 東京都健康長寿医療センター研究所
老化脳神経科学研究チーム
遠藤昌吾 チームリーダー、柳井修一先生

- ・ 神奈川工科大学
栄養生化学研究室
清瀬千佳子 教授

- ・ 本論文審査委員の先生方
徳島大学 衛生薬学 分野
小暮健太郎 教授
芝浦工業大学
食品栄養学研究室 越阪部奈緒美 教授
創薬化学研究室 須原義智 教授
バイオ流体科学研究室 渡邊宣夫 准教授

博士課程在学中の研究業績

学術論文

1. 加藤優吾、福井浩二、肥満および肥満による認識機能障害に対するトコトリエノールの効果について、*ビタミン*、*in press*.
2. Naoki Yoshida, Yugo Kato, Hirokatsu Takatsu, Koji Fukui, Relationship between cognitive dysfunction and age-related variability in oxidative markers in isolated mitochondria of Alzheimer's disease transgenic mouse brains, *Biomedicines*, 10(2), 281, 2022.
3. Koji Fukui, Shunsuke Kimura, Yugo Kato, Masahiro Kohno, Effects of far infrared light on Alzheimer's disease-transgenic mice, *PLOS ONE*, 16(6): e0253320., 2021.
4. Yugo Kato, Hayami Uchiumi, Ryo Usami, Hirokatsu Takatsu, Yoshinori Aoki, Shuichi Yanai, Shogo Endo, Koji Fukui, Tocotrienols reach the brain and play roles in the attenuation of body weight gain and improvement of cognitive function in high-fat diet-treated mice, *J Clin Biochem Nutr*, 69(3), 256-264, 2021.
5. Koji Fukui, Yugo Kato, Masahiro Kohno, Effects of far infrared light on high-fat diet-treated mice, *Biomed J Sci & Tech Res.*, 33(5), 26257-26266, 2021
6. Yugo Kato, Yoshinori Aoki, Koji Fukui, Tocotrienols influence body weight gain and brain protein expression in long-term high-fat diet-treated mice, *Int. J. Mol. Sci.*, 21(12), 4533, 2020
7. 加藤優吾、福井浩二、非アルコール性脂肪性肝炎に対するビタミンEの効果について、*ビタミン*、94(2)、78-80、2019
8. Koji Fukui, Masashi Shirai, Takeyuki Ninuma, Yugo Kato, Anti-obesity effects of tocotrienols and bran in high-fat diet-treated mice, *Nutrients*, 11(4), 2019

学会発表

1. 加藤優吾、白井将志、青木由典、小池泰介、福井浩二、異なるトコトリエノール摂取量における高脂肪食摂取マウスの脳内抗酸化防御機構の変動、**第71回日本ビタミン学会**、6月7日-8日、2019、鳥取
2. 上野山瑞波、渡辺洗士郎、加藤優吾、福井浩二、アルツハイマー病モデルマウスにおける加齢に伴う脳内神経突起変性関連タンパク質の発現変動について、**第72回日本酸化ストレス学会**、6月27日-28日、2019、北海道
3. 加藤優吾、福井浩二、高脂肪食で飼育した若齢マウスに対するトコトリエノールの効果について、**Free Radical School2019**、8月10-12日、2019、新潟
4. 加藤優吾、白井将志、福井浩二、トコトリエノールの体重増加抑制作用について、**第27回日本過酸化脂質抗酸化物質学会**、8月24日、2019、宮城
5. 加藤優吾、福井浩二、高脂肪食摂取による血清鉄の減少とトコトリエノールによるその予防について、**第43回日本鉄バイオサイエンス学会**、9月20日、2019、京都
6. Yuki Udono, Yugo Kato, Koji Fukui, Nobuo Watanabe, Study on to evaluate erythrocyte's membrane oxidation during shear stress loading by centrifugal blood pump, **27th Annual Meeting of the International Society for Mechanical Circulatory Support**, Oct. 21, 2019, Bologna, Italy
7. Koji Fukui, Masashi Shirai, Takeyuki Niinuma, Yugo Kato, Anti-obesity effects of tocotrienols and rice bran in high-fat diet-treated mice: Does obesity accelerate brain oxidation?, **The 49th Annual Meeting of the Neuroscience**, Oct. 23, 2019, Chicago
8. Koji Fukui, Tsukasa Nakamura, Saki Nakamura, Yugo Kato, Development of neurite isolated methods and proteomic analysis in hydrogen peroxide-treated N1E-115 cells, **Society for Radical Biology and Medicine 26th Annual Conference**, Nov. 21, 2019, Las Vegas
9. Yugo Kato, Masashi Shirai, Koji Fukui, Tocotrienols prevent weight gain and brain oxidation in high-fat diet-treated mice, **Society for Radical Biology and Medicine 26th Annual Conference**, Nov. 21, 2019, Las Vegas
10. 加藤優吾、白井将志、宇佐美涼、内海速水、体重の増減に着目したトコトリエノールの抗肥満作用についての検討、**第31回ビタミンE研究会**、1月11日、2020、愛媛
11. Yugo Kato, Koji Fukui, Establishment of fatty liver model cell in HepG2 cells, **14th South East Asian Technical University Consortium**, Feb. 27-28, 2020, Bangkok, Thailand(誌上開催)
12. Mizuha Uenoyama, Watanabe Koshiro, Yugo Kato, Koji Fukui, Change in the axonal degeneration-related protection expressions in Alzheimer's disease model mice brain, **14th South East Asian Technical University Consortium**, Feb. 27-28, 2020, Bangkok, Thailand(誌上開催)

13. Yuhong Liu, Jose T. Valenzuela Angulo, Siqian Shi, **Yugo Kato**, Koji Fukui, Searching an appropriate model for studying tau pathology on Alzheimer's disease by using N1E-114 cells, **14th South East Asian Technical University Consortium**, Feb. 27-28, 2020, Bangkok, Thailand(誌上開催)
14. 鵜殿祐樹、**加藤優吾**、福井浩二、渡邊宣夫、せん断暴露時の加齢度別における赤血球膜酸化量評価、**第 48 回人工心臓と補助循環懇話会学術集会**、3 月 31 日、2020、北海道(誌上開催)

2020 年度

15. **加藤優吾**、白井将志、宇佐美涼、内海速水、福井浩二、高脂肪食投与マウスにおけるトコトリエノールの体重増加抑制作用について、**第 74 回日本栄養・食糧学会**、5 月 15 日、2020、宮城(Web 開催)
16. **Yugo Kato**, Shogo Endo, Shuichi Yanai, Koji Fukui, Inhibitory effect of tocotrienols on weight gain in different mouse models, **第 43 回日本基礎老化学会大会**、5 月 27 日、2020、長崎(誌上開催)
17. 福井浩二、沖廣俊介、大淵優花、**加藤優吾**、津本裕輝、三浦ゆり、過酸化水素添加 N1E-115 細胞における神経時変性タンパク質の同定、**第 43 回日本基礎老化学会大会**、5 月 27 日、2020、長崎(誌上開催)
18. **加藤優吾**、白井将志、宇佐美涼、内海速水、江口由香子、山川璃紗、福井浩二、トコトリエノールの抗肥満作用および脳への到達について、**第 72 回日本ビタミン学会**、6 月 19 日、2020、愛知(web 開催)
19. 涌澤充、中村つかさ、**加藤優吾**、福井浩二、細胞内 Ca²⁺ホメオスタシスの崩壊と神経突起変性について、**第 73 回日本酸化ストレス学会**、10 月 6.7 日、2020、鳥取(誌上開催)
20. 上野山瑞波、**加藤優吾**、福井浩二、単離ミトコンドリア内 A β 量の蓄積と酸化ストレスとの関連性について、**第 73 回日本酸化ストレス学会**、10 月 6.7 日、2020、鳥取(誌上開催)
21. **加藤優吾**、福井浩二、トコトリエノールの肥満及び脳酸化に対する効果について、**第 73 回日本酸化ストレス学会**、10 月 6.7 日、2020、鳥取(誌上開催)
22. **Yugo Kato**, Koji Fukui, Anti-obesity and antioxidant effect of tocotrienols on long-term high fat diet-treated mice, **SEATUC2021**, Feb. 15-16, 2021 (Web)
23. Koji Fukui, **Yugo Kato**, Tocotrienols exert anti-obesity effect in high-fat diet-treated mice, **SEATUC 2021**, Feb. 15-16, 2021 (Web)
24. **Yugo Kato**, Koji Fukui, The research about antioxidant and anti-obesity effects of tocotrienols in high-fat diet-treated mice, **20th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR)**, Mar. 15-18, 2021 (Web)

25. Koji Fukui, **Yugo Kato**, Hydrogen peroxide induces neurite degeneration and its phenomenon relates to neurodegenerative disorders, *20th Biennial Meeting of SFRRRI*, Mar. 15-18, 2021 (Web)

2021 年度

26. **加藤優吾**、福井浩二、高脂肪食摂取による認識機能障害の誘引とトコトリエノールによる予防に関する検討、**第 74 回日本酸化ストレス学会**、5 月 19-20 日、2021 Online
27. **Yugo Kato**, Ryo Usami, Hayami Uchiumi, Junhyeok Byeon, Koji Fukui, Tocotrienols inhibit body weight gain in high-fat diet-treated mice, **第 44 回日本基礎老化学会**、6 月 12 日、2021 Online
28. **加藤優吾**、福井浩二、肥満モデルマウスを用いたトコトリエノールの抗肥満作用および神経保護作用に関する検討、**第 73 回日本ビタミン学会**、2021 (Online)
29. 福井浩二、**加藤優吾**、投与量や投与期間の違いによるトコトリエノールの抗肥満効果について、**第 368 回脂溶性ビタミン総合研究委員会**、6 月 18 日、2021 Online
30. 加藤玲奈、**加藤優吾**、福井浩二、渡邊宣夫、止血タンパク質研究のための血漿アルブミン除去法の検討、**第 44 回日本バイオレオロジー学会年会**、7 月 3-4 日、2021、Online
31. Reina Kato, **Yugo Kato**, Koji Fukui, Nobuo Watanabe, Examination of new method to express in detailed expression of plasma vWF for elucidation of their shear stress induced diminishment, **47th Annual European Society for Artificial Organs(ESAO) Congress**, Brunel University, London,, Sep. 7, 2021 (Online)
32. **Yugo Kato**, Junhyeok Byeon, Koji Fukui, The relationship between obesity and cognitive dysfunction; Prevention by tocotrienols, **Neuroscience2021**, Nov. 9, 2021 (online)
33. Koji Fukui, Mitsuru Wakuzawa, Naoki Yoshida, **Yugo Kato**, Hydrogen peroxide-induced neurite degeneration via mitochondrial dysfunction, **Neuroscience2021**, Nov. 9, 2021 (online)
34. 加藤玲奈、**加藤優吾**、福井浩二、渡邊宣夫、せん断に起因した vWF 低分子量化における 2 つの切断機構に関する基礎的検討、**日本生体医工学会関東支部会若手研究者発表会 2021**、2021 年 12 月 11 日、
35. **加藤優吾**、福井浩二、トコトリエノールは肥満及び脳酸化を予防する、**第 34 回日本酸化ストレス学会関東支部会**、2021 年 12 月 18 日 Online
36. 涌澤充、中村つかさ、**加藤優吾**、福井浩二、突起変性メカニズム解明に向けた神経細胞内への Ca²⁺流入と酸化障害の関連、**第 34 回日本酸化ストレス学会関東支部会**、2021 年 12 月 18 日 Online

受賞

1. 若手海外優秀発表賞(アムウェイアワード)、第71回日本ビタミン学会、6月7日、2019、鳥取