

エボジアミン (Evodiamine)

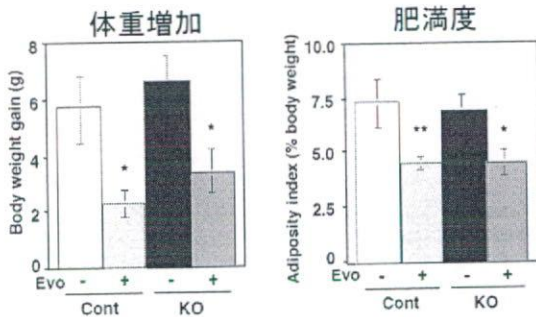
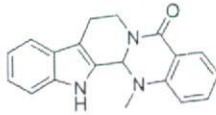


図3 エボジアミンはUCP1の有無に係わりなく高脂肪食により誘導されるマウスの肥満を抑制する。UCP1-KOマウス (KO) とコントロールマウス (Cont) に4ヶ月齢から2ヶ月間、高脂肪食又は高脂肪食にエボジアミン (Evo) を0.03%の濃度で添加した飼料を与えた時の体重増加と肥満度を示す。\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Evo-無添加群 (文献6より改変)

(脂肪組織量の体重に占める割合) などの有意な低下が観察された (図3)。また、肥満に伴うインスリン抵抗性や脂肪肝の改善なども認められ、エボジアミンがUCP1の有無に係わりなく抗肥満作用を示すことが明らかとなった。これらの結果は、エボジアミンがUCP1熱産生機能を十分に活性化できないヒトの肥満に対しても効果を発揮する可能性を強く示唆するものと考えられた。それでは、エボジアミンはどのような作用メカニズムで抗肥満作用を発揮するのであろうか?

肥満が進行する過程では、脂肪細胞は過剰なエネルギーを中性脂肪としてより多く蓄えるために肥大化するが、それと同時に、分化成熟した脂肪細胞の数の増加が肥満の進展における重要な要素となる。そこで我々は、エボジアミンの脂肪細胞に対する直接作用を3T3-L1脂肪前駆細胞 (未分化の脂肪細胞) 培養系を用いて検討した (図4A)。その結果、エボジアミンは3T3-L1脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化と中性脂肪の蓄積を濃度依存的に阻害することが明らかとなった (図4B)。また、エボジアミンは脂肪細胞の分化を制御する転写因子C/EBP $\beta$ およびPPAR $\gamma$ 蛋白質の発現を強く阻害することが判明した (図4C)。以上の結果は、エボジアミンが脂肪細胞分化の初期において作用し、分化に必須の転写因子の発現を抑

制し脂肪細胞分化を阻害することを示すものと考えられた。

肥満に伴い血中レベルが上昇するインスリンは、脂肪細胞の分化と中性脂肪の蓄積を促進する。インスリンは脂肪細胞分化の初期においては種々のシグナル伝達分子の活性を調節し、上記の転写因子の発現に影響することが知られている。そこで次に、エボジアミンのシグナル伝達分子に対する影響について検討した。その結果、エボジアミンはインスリンによって調節される種々のプロテ

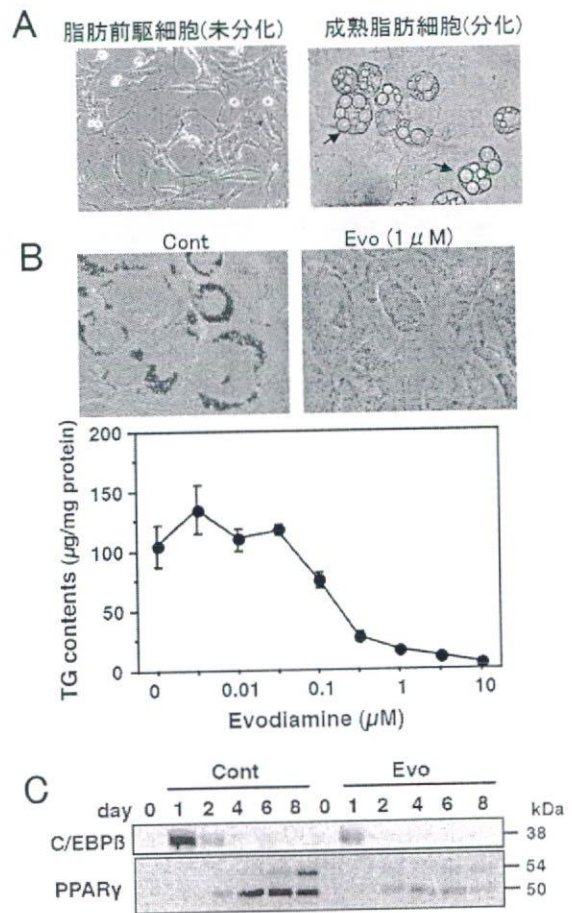


図4 脂肪細胞の分化に対するエボジアミンの効果。A) 未分化の細長い繊維状の3T3-L1脂肪前駆細胞と分化後の成熟した脂肪細胞 (矢印、脂肪滴を蓄えている)。B) エボジアミンによる脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化と中性脂肪 (TG) の蓄積の阻害。上段: コントロール培地 (Cont) と1 $\mu$ Mのエボジアミン (Evo) を添加した培地において8日間培養した後、中性脂肪をオイルレッドO染色 (赤色) した細胞の写真。下段: 細胞内の中性脂肪含量。C) エボジアミンは脂肪細胞の分化に重要な転写因子であるC/EBP $\beta$ とPPAR $\gamma$ の発現を強く阻害する。8日間培養した時の各タンパク質の発現量の経時変化をウエスタンブロット解析により調べた。(文献6より改変)

ンキナーゼの活性に影響し、脂肪細胞の分化を阻害することが明らかとなった。面白いことに、カプサイシンにはこれらの作用は検出されず、脂肪細胞分化阻害効果は認められなかった<sup>6)</sup>。

## 6. まとめ

現在までの研究から明らかとなったエボジアミンの抗肥満メカニズムを図5に示した。まず、エボジアミンはカプサイシンと類似の血管拡張作用により体表面からの熱放散を促進する<sup>7)</sup>。次に、熱放散による体温低下を抑えるために交感神経が活性化され、白色脂肪細胞の中性脂肪の分解と褐色脂肪細胞におけるUCP1熱産生を亢進しエネルギーを消費する。一方、エボジアミンは脂肪前駆細胞に直接作用し、脂肪細胞分化に重要なシグナル伝達分子の活性に影響を与えることにより分化の進行を抑制する。エボジアミンはこれらの2つの抗肥満作用を併せ持つことにより、UCP1熱産生機能を十分活性化できないヒトに対してもその効果が期待される新しい機能性化合物といえる。エボジアミンが作用する受容体は未だ不明であり、エボジアミン受容体の同定は新たな創薬につなが

るものとしてその解明が待たれる。

## 用語解説

### 1. 遺伝子多型

ヒトの遺伝情報はおよそ30億塩基対のDNAの中に書き込まれているが、その遺伝暗号には個人差がある。この遺伝暗号の違いを遺伝子多型とよぶ。一つの遺伝暗号の違いにより合成されるアミノ酸が変化してタンパク質の機能が変わることもある。

### 2. 機能性化合物

個体の生理機能や細胞応答に影響を与える生理活性をもつ化合物の総称。植物に含まれるフラボノイドやポリフェノールはその代表。エボジアミンは、ミカン科植物の呉茱萸（ゴシュユ）に含まれるアルカロイド成分。ゴシュユには、健胃、利尿、鎮痛作用などがあり、古くから漢方において生薬として利用されてきた。エボジアミンの薬理作用としては、ほかに冷え性や脳機能改善、抗炎症、抗ガン作用などが報告されている。

### 3. インスリン抵抗性

インスリンは、細胞内へのグルコースの取込み

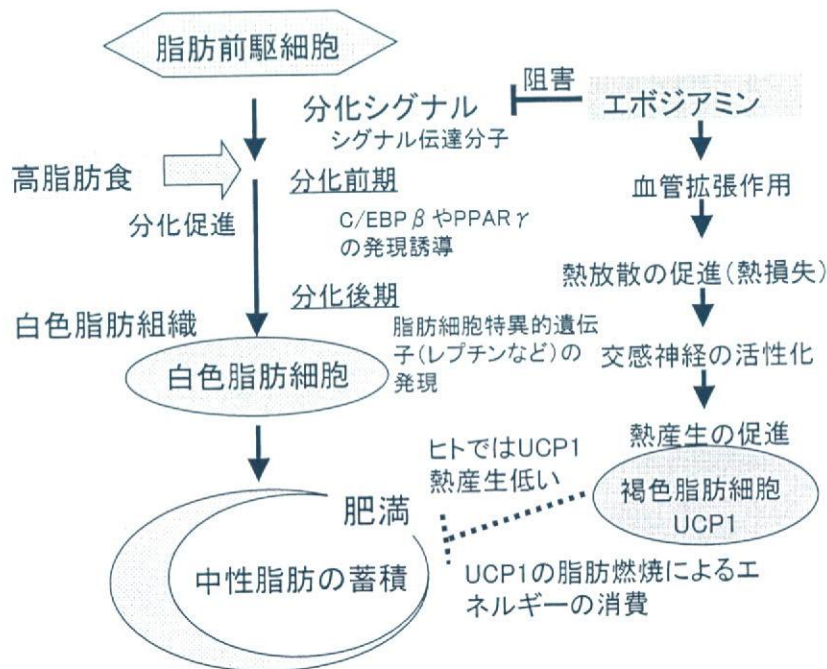


図5 エボジアミンの抗肥満メカニズム。白色脂肪細胞の増加による中性脂肪の蓄積は肥満の主要な病態である。エボジアミンは脂肪前駆細胞に直接作用し、白色脂肪細胞への分化を阻害する。また、エボジアミンはカプサイシンと類似の熱放散作用を介して間接的に褐色脂肪細胞のUCP1熱産生を活性化してエネルギー消費を高める作用も併せ持つと考えられる。



と利用を促進して血中のグルコース濃度（血糖値）を低下させるホルモンであり、糖代謝の調節に重要な役割を果たす。インスリン抵抗性とは、インスリンの糖代謝調節作用が障害を受けた状態をいい、肥満に伴い生じることが多い。

#### 4. 転写因子

主に核内に存在し、DNAに結合してmRNAの合成（遺伝子の転写）を調節するタンパク質。

#### 5. シグナル伝達分子

細胞外の情報を細胞内に伝達し、種々の細胞応答を誘導する過程で働く分子。さまざまなタイプのシグナル伝達分子がある。プロテインキナーゼは特定のタンパク質にリン酸基を付加（リン酸化）してその活性や機能を調節することにより情報の流れや量を調節する酵素であり、プロテインキナーゼ自身もシグナル伝達分子として作用する。

- 7) Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, M., and Yamashita, H. Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice. *Pfluger Arch.-Eur. J. Physiol.*, 452: 363-369, 2006.

### 参考文献

- 1) 松澤佑次監修. メタボリックシンドローム実践ハンドブック. メディカルトリビューン社. 2006.
- 2) 春日雅人他監修. 糖尿病カレントライブラリー⑦「脂肪細胞と脂肪組織」. 文光堂. 2007.
- 3) Kontani, Y., Wang, Z., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Suzuki-Miura, T., Wang, Z., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell*, 4: 147-155, 2005.
- 4) Inokuma, K., Okamatsu-Ogura, Y., Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K., Yamashita, H., Saito, M. Indispensable role of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) for anti-obesity effect of  $\beta$ 3-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol.*, 290: E1014-E1021, 2006.
- 5) Kobayashi, Y., Nakano, Y., Kizaki, M., Hoshikuma, K., Yokoo, Y., Kamiya, T. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. *Planta Med.*, 67: 628-33, 2001.
- 6) Wang, T., Wang, Y., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. Evodiamine improves diet-induced obesity in a UCP1-independent manner: Involvement of anti-adipogenic mechanism and ERK/MAPK signaling. *Endocrinol.*, 149: 358-366, 2008.

————— 著 者 —————

山下 均 (Hitoshi YAMASHITA)

中部大学生命健康科学部生命医科学科、教授。  
1980年名古屋大学農学部農芸化学科卒。旭化成工  
業医薬開発センター主査、防衛医科大学校助手、  
国立長寿医療センター室長、および名古屋大学大  
学院医学研究科助教授を経て2006年4月より現職。  
医学博士。専門は分子遺伝学、老化基礎科学。主  
な研究テーマは体熱制御の分子機構の解明と老化  
や生活習慣病発症におけるその役割。

# 老化・老年病研究 のための 動物実験ガイドブック



日本基礎老化学会 編

アドスリー



# エネルギー代謝 モデル動物

中部大学 生命健康科学部 山下 均

エネルギー代謝は生命活動を支えるためのエネルギー利用と貯蔵のしくみであり、糖質と脂質の代謝調節がその中心となる。エネルギー代謝は広範な生体応答や代謝性疾患と関連することから、モデル動物の開発も盛んに行なわれ研究に利用されている。代謝性疾患は老化とともに進行するものも多いので、その病態説明や予防法・治療法の開発においては、加齢や老化という視点を踏まえた動物実験の実施が重要である。実験内容としては、基本的なエネルギーの摂取から消費における表現型の解析から、組織や細胞内における分子動態の解析まで幅広い。なお、エネルギー代謝は環境要因により大きく影響されるので、実験条件の設定には十分な配慮が必要である。

## 1. 動物実験の準備

### 動物の選択

動物実験の実施において、使用する動物の種類や系統の選択はきわめて重要である。哺乳動物を用いる実験では、飼育管理がしやすく系統が豊富なマウスとラットが重要な実験動物となっている。とくにマウスは、発生工学技術に基づく遺伝子組み換えマウスの利用が一般化し、エネルギー代謝に関連する遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスも多数作られ利用されている。近交系マウスとしては、遺伝学研究のスタンダードでもあるC57BL/6マウスが最もよく使われている。C57BL/6マウスは繁殖力が高く長生きで、雄は肥満になりやすい形質をもつことから食餌誘導性の肥満モデルとして使われる。

エネルギー代謝の研究を行う場合、性別に加えて、実験動物の月齢には

とくに注意が必要である。標準飼料の自由摂食下で飼育された雄C57BL/6マウス（平均寿命：およそ28月）の場合、18月齢くらいまで体重は増え続ける。性成熟は2月齢くらいまでに終了するが、個体の成熟が完了する5月齢くらいまでは代謝量と体重変化が大きいのので、とくに注意が必要である。

### 飼育条件

エネルギー代謝は温度環境により大きく変化し、中立温度域(thermoneutral zone)：体温維持に必要な代謝量が最小となる環境温度。マウスの場合、30℃前後)で最も低く、環境温度が下がるに従い代謝量は上昇する。動物飼育室の温度は、一般的に21~25℃と施設により異なり、エネルギー代謝も室温に応じて変わるので注意が必要である。通常、エネルギー代謝の変化は摂食量の変化と相関し、低温環境では摂食量が上昇する。

使用する飼料の組成も実験動物のエネルギー代謝に大きく影響する。一般飼育で使用する標準飼料は、メーカーにより若干異なるが、総カロリーに占める脂肪由来のカロリー比が10%程度の低脂肪食である。研究目的に応じて、脂肪含量をカロリー比40~60%まで増やした飼料、コレステロールを3% (wt/wt) 程度まで増やした飼料、蔗糖や果糖を高濃度 (50~60% wt/wt) に含有する飼料などが利用される。添加する脂肪や炭水化物の種類も様々で総カロリー量も違うので、成分表を確認して使用する。

## 2. 生理学的解析

エネルギー代謝と関連する種々の指標について、食餌や薬物の投与前後の変化を連続的に捉える個体レベルの解析は重要であり、貴重なデータを得ることができ。体重と摂食量は最も基本的かつ簡便な指標であり、代謝量の違いや変化を予測する上の基礎データとなる。グループ間での代謝量の違いを厳密に調べたい時には、同じ量の餌を与えるペアフィーディング法を用いる。自動的に決まった量の飼料を与えるペアフィーディング装置も市販されている。



#### 間接的熱量測定：Indirect calorimetry

生体内で燃焼された食物のエネルギ一量を直接測定することはできない。しかし、食物の燃焼に利用される酸素 ( $O_2$ ) 量は、生成したエネルギ一量と比例関係にあるので、単位時間内における  $O_2$  消費量 (oxygen consumption) を測定することにより、間接的にエネルギ一消費量 (energy expenditure) を求めることができる<sup>12)</sup>。現在、小型動物の間接的熱量測定を行う装置がいくつものメーカーから市販されている。原理的には、実験動物を入れたチャンバー内への空気の流量を一定に保ちながら、チャンバーから排出される  $O_2$  と二酸化炭素 ( $CO_2$ ) の濃度変化を測定することにより  $O_2$  摂取量と  $CO_2$  排泄量を算出する。1リットルの  $O_2$  消費により 4.82 kcal が使われたとして、エネルギ一消費量を求めることができる。マウスやラットの場合は、エネルギ一消費量は摂食や活動量の上がる暗期で高く、睡眠などで活動量の下がる明期で低い。

また、 $O_2$  摂取量と  $CO_2$  排泄量から呼吸商 (respiratory quotient, RQ:  $CO_2$  モル/ $O_2$  モル) を求めることにより、おもに利用されたエネルギ一源の種類を知ることができる。たとえば、燃焼された栄養素がすべてグルコースなどの炭水化物の場合には  $RQ=1.0$ 、すべて脂肪の場合には  $RQ=0.7$  となる。実際には、その中間の値をとることが多いが、絶食時や寒冷暴露時、あるいは高脂肪食を摂取している場合などは脂肪利用の比率が高くなり  $RQ$  は 0.7 に近づく。

#### 体温、皮膚温測定

ヒトと同様にマウスやラットでは、体温 (核心温度: core temperature) はほぼ一定 (37~38°C) に保たれているが、厳密には小さな日内変動 (サーカディアンリズム) があり覚醒時に高く睡眠時に低い。体温はエネルギ一代謝の結果生じた熱により調節されているので、代謝量の上昇する活動時に体温は上がり、安静時には下がることになる。メカニズムは違っても体温の上昇する運動時や発熱の際にもエネルギ一消費が亢進するので、体温はエネルギ一代謝の変化を示す指標の1つと言える。

実験動物の場合、ワセリンを塗った温度センサーを直腸に挿入して体温を測定する簡易法が用いられてきたが、覚醒状態ではハンドリングなどのストレスにより体温は上昇してしまうので熟練を要する<sup>3)</sup>。マウスやラットでは、老化とともに体温の低下が観察される。最近では、ワイヤレスの温

度センサーを腹腔内に埋め込む方式が用いられるようになってきた。この方法では、高価な装置とセンサーの埋め込み手術が必要であるが、実験動物を固定したりすることによるストレスを与えなくなることなく体温を24時間連続して測定することができる。

生体内では基本的に必要以上の熱が生成しているため、体温を一定に保つために余剰の熱は主として皮膚表面から体外に放出されるが、この熱放射量に応じて皮膚温 (体表温度) が変化する。したがって、エネルギ一代謝の結果生じた熱量と相関して皮膚温が上昇することが観察される。マウスの産生量が増加し、それに伴って皮膚温が上昇することが重要である。マウスやラットの場合、表面積が大きく体毛のない尾部が熱放射において重要な役割を果たしており、尾部皮膚温を測定する<sup>3)</sup>。測定には、赤外線放射エネルギ一を利用した温度測定 (サーモグラフィ) が用いられる。ただし、皮膚温は環境温度の影響を大きく受けるので、測定は常に一定の室温環境下で行わない評価する必要がある。

#### 行動量測定

運動によりエネルギ一消費は上昇するので、行動量 (自発運動量) を調べることににより、エネルギ一代謝の変化を予測することができる。実際には、体温測定や間接的熱量測定と組み合わせることにより、連続的なエネルギ一代謝の変化を解析することが可能となる。

#### 糖代謝試験

全身における糖代謝能を調べる場合には、耐糖能試験 (glucose tolerance test: GTT) を行う。マウスを用いる場合、GTTでは一晩絶食させた動物に対してグルコース溶液 (1~2 g glucose/kg body weight) を経口または腹腔内投与した後、経時的 (0, 30, 60, 120分など) に血糖値を測定する。採血は尾静脈から行い市販の簡易血糖測定器を用いると、ごく少量 (1滴程度) の血液で血糖をすばやく測定できるので便利である<sup>4)</sup>。マウスでは、老化とともに耐糖能の増悪が認められる。各組織における糖利用を解析する場合には、2-デオキシグルコース (2-deoxyglucose: 2-DG) の取り込み試験を行う。麻酔下の動物に 2-[ $^3H$ ] DG を静注した後、血液と組織を採取し、血中からの 2-[ $^3H$ ] DG の消滅と各組織への 2-[ $^3H$ ] DG の取り込みを測定する<sup>3)</sup>。また、インスリン応答性の糖取り込み能を調べるインスリン負荷



試験 (insulin tolerance test : ITT) やインスリンに対する感受性や抵抗性を調べることでインスリンクランプ試験などがある。詳細は老年病態モジュール編を参照されたい。

#### 脂質代謝試験

実験動物における脂質分解能や脂質の取込みを調べる方法などがある。脂肪細胞における中性脂肪の分解は、 $\beta$ アドレナリン受容体を介してホルモン感受性リパーゼの活性化により進むので、ノルアドレナリンなどの $\beta$ アドレナリン受容体アゴニストを一晩絶食した動物に投与し、中性脂肪が分解されて生成した遊離脂肪酸の血中レベルを経時的に測定する<sup>9)</sup>。動物から摘出した脂肪組織を細切し、試験管内においてノルアドレナリンなどで刺激し生成した遊離脂肪酸を測定することにより脂質分解活性を調べることができる<sup>9)</sup>。脂質の取込み試験 (fat-loading test) では、脂質エマルジョン溶液を静注した後、血中遊離脂肪酸のクリアランスを調べる。血中サンプルなどの遊離脂肪酸レベルは、市販の測定キットを用いて簡便に測定することができる。

#### ミトコンドリア機能試験

ミトコンドリアにおける脂肪酸の酸化 ( $\beta$ 酸化) は、脂肪を利用するエネルギー代謝の重要なステップであり脂肪酸を分解してアセチルCoAを生成する。実験動物における $\beta$ 酸化活性を調べる方法としては、肝臓など各種組織の抽出液を調製し試験管内において [ $^{14}$ C]-パルミチン酸の酸化分解による [ $^{14}$ C]-アセチルCoAの生成を水溶性分画の [ $^{14}$ C] 標識量として捉え評価する方法がある<sup>9)</sup>。また、組織からミトコンドリア分画を調製し、Clark型酸素電極を用いて呼吸活性を調べることができる<sup>9)</sup>。

#### その他

肝臓や骨格筋などの組織に含まれる脂質やグリコーゲン含量が測定される。各エネルギー源の抽出法としては、脂質の場合はクロロホルム：メタノール (2:1) を用いるFolch<sup>8)</sup>の方法がよく用いられる。グリコーゲンの場合は、アルカリ分解した組織から抽出したグリコーゲンをフェノール-硫酸反応により定量する方法などが用いられる<sup>9)</sup>。詳細な手法については、生化学実験の専門書を参照されたい。

### 3. 血液生化学的解析

動物実験において得られた血液サンプルを用いて、エネルギー代謝と関連するマーカー分子の測定が行なわれる。主なものとしては、血糖、中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸、各種ホルモン (レプチン、インスリン、アディポネクチン) などが市販の測定試薬やELISAキットを用いて簡単に測定される。また、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸やサイロイドホルモン、ノルアドレナリンなども脂質分解や熱産生との関連から調べられる。測定項目により、採血時の処理が異なるので注意が必要である。これらの血液パラメータの測定は、生体における糖質や脂質の代謝状態を知り、肥満やインスリン抵抗性、動脈硬化などの病態を把握する上で重要な情報となる。

### 4. 遺伝子・タンパク質解析

実験動物を用いた研究では、生理学的解析に加えて種々の組織における遺伝子やタンパク質の発現量あるいは酵素活性が調べられる。遺伝子発現解析の場合、組織から回収した総RNA分画を材料として目的とする遺伝子のmRNAレベルを定量PCR法などで解析する。タンパク質の解析では、全組織抽出液をはじめ、対象とするタンパク質の局在部位によりミトコンドリア分画、膜分画、核抽出液などを調製し利用する。特殊な酵素活性の測定やリン酸化タンパク質の検出などにおいては失活防止用の各種インヒビターの添加が必要であり注意を要する。

#### 参考文献

- 1) Gordon CJ : Temperature Regulation in Laboratory Rodents, Cambridge University Press, 1993.
- 2) Inokuma K, et al. : Am J Physiol Endocrinol Metab, 290:E1014-21, 2006.
- 3) Wang Y, et al. : Pflugers Arch, 452: 363-9, 2006.
- 4) Kontani Y, et al. : Aging Cell, 4: 147-55, 2005.
- 5) Inokuma K, et al. : Diabetologia, 54: 1385-91, 2005.
- 6) Murase T, et al. : J Lipid Res, 43: 1312-19, 2002.
- 7) 日本生化学会編 : エネルギー代謝と生体酸化 (上), 生化学実験講座12, 東京化学同人, 1979.
- 8) Folch J, et al. : J Biol Chem, 226: 497-509, 1957.
- 9) Lo S, et al. : J Appl Physiol, 28: 234-6, 1970.