

学位論文(博士)

Single bolus injection of nicotinamide mono
nucleotide increases systemic insulin sensitivity in
association with activation of NAD salvage pathway in
the liver and adipose tissue in mice

(ニコチンアミドモノヌクレオチドの単回投与は、マウスの
肝臓および脂肪組織において NAD サルベージ経路の活性化を
介して全身のインスリン感受性を向上させる)

氏名 廣重俊典

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 病態制御内科学講座

令和 8 年 1 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	6
5. 結果	10
6. 考察	17
7. 結語	20
8. 謝辞	20
9. 参考文献	20

1. 要旨

背景と目的：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)レベルの上昇は、代謝性疾患を含む加齢関連疾患の発症と進行を軽減する。NAD⁺レベルはニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)摂取を介して効率的に上昇させることが可能であり、それによって代謝性疾患を予防できることが報告されているが、NMN 投与の代謝に対する急性効果は不明のままである。そこで本研究では NMN 単回投与後の代謝動態を観察した。

対象と方法：12-13 週齢の C57BL6 マウスに NMN(500mg/kg)を腹腔内へ単回投与を行い、3 時間後の Sirt、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(Nampt)の mRNA の定量を行い、NAD⁺レベルの上昇を間接的にではあるが確認した。それを確認した上で、NMN 投与 6 時間後での OGTT、インスリン負荷試験(ITT)、NMN 投与後の呼吸商の測定、NMN 投与前後での血中遊離脂肪酸(NEFA)の変化を検討した。また 2-deoxy glucose(2-DG)を用いた肝臓、腓腹筋でのインスリン依存性の糖取り込み、肝臓、腓腹筋、精巣上体脂肪での Akt のリン酸化の解析によってインスリン感受性を検討した。

結果：肝臓における Sirt1 および Nampt mRNA レベルが増加し、NMN 単回投与後に肝細胞内 NAD⁺が増加したことが示された。OGTT では血糖値とインスリン分泌に有意な変化は認められなかったが、ITT では NMN 投与によるインスリン感受性の増大が認められ、この効果は高脂肪食誘発肥満マウスでも同様であった。NMN 投与によってインスリン投与 90 分後の腓腹筋での 2-DG 取り込みは 2.7 倍に増加したが、肝臓や脂肪組織では有意な変化は認められなかった。NMN 投与群では、インスリン投与 15 分後の AKT のリン酸化が、筋肉

と脂肪組織では増加したが、肝臓ではむしろ低下した。NEFA は、対照群では増加したのに対し、NMN 投与群で顕著に低下し、呼吸商も有意に低下した。また脂肪組織においても Sirt1、Nampt の mRNA 発現は増加し、AKT リン酸化も増加したが、血清 LDL/VLDL 濃度も NMN 投与群で有意に低下していた。これらの結果より、NMN の単回投与は、肝臓と脂肪組織からの両方での脂質の放出を低下させていると考えられた。

結論：NMN の単回投与により、肝臓と脂肪組織からの脂質の放出が抑制され、その結果筋肉でのインスリン感受性が増加するという急性効果が認められた。

2. 研究の背景

NAD⁺は、エネルギー代謝において重要な役割を果たすことが知られている重要な補酵素である。実際、多くの研究により、肥満などの代謝性疾患では肝臓と筋肉で NAD⁺レベルが低下することが実証されている[1-4]。NMN は、げっ歯類モデルにおいて様々な組織の NAD⁺濃度を効果的に増加させ、肥満や加齢関連合併症などに対する有益な効果を発揮することが報告されている[5-8]。今井らは、サーチュイン(Sirt)1 が NAD⁺依存性タンパク質脱アセチル化酵素を活性させることを報告し、NAD バイオロジーのさらなる研究促進の大きなきっかけとなった[9]。

NMN が様々な疾患モデルにおいて有益で治療的な作用を発揮することを示すエビデンスが増えており、特に NMN の代謝への効果が注目されている[6,10]。しかしながら、そのほとんどの研究は NMN の複数回または長期投与での効果を分析したものであり、遺伝子改

変マウス、糖尿病マウスモデル、および老齢マウスを用いているが、若い野生型マウスに対する単回投与の代謝効果を詳細に検討したものはない[1,11-14]。

NMN 単回投与は、糖尿病マウスにおいては、グルコース刺激インスリン分泌を増加させ、耐糖能を改善することが報告されている[1,15]。また、マウスへの NMN 長期投与は、肝臓を含む代謝に関与する臓器のミトコンドリア機能を改善することが報告されている[14]。一方臨床試験では主に NMN の安全性と薬物動態に焦点を当てられたものが多い[16,17]。

NAD⁺の効果を評価するために実施されたメタ解析では、NAD⁺前駆体の補充によって、脂質異常症は改善したが、高血糖が誘発されたことが示されている[18]。一方、吉野らは、高インスリン正常血糖クランプ法と骨格筋インスリンシグナル伝達を用いて示したように、10週間の NMN 補充が前糖尿病女性の筋肉インスリン感受性を向上させることを報告している[19]。以上のように、NMN は血中脂質レベルを改善することはほぼ明らかなようであるが、グルコース代謝への効果に関しては、投与期間と投与方法に影響されることもあり、まだ一定の解釈が困難な状況にある。

そこで、本研究では、マウスに NMN を 1 回のみ投与した後に、代謝がどのように変化するのかを詳細に解析することとした。

3. 目的

野生型マウスに NMN の単回投与し、その後の代謝変化を詳細に検討する事により、NMN の糖・脂質代謝への急性効果を検討する事を本研究の目的とした。

4. 方法

4.1. マウス

温度調節された室内($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)で 12 時間の明/暗サイクル下で飼育した C57BL/6J マウスを使用した。点灯時刻を Zeitgeber time(ZT)0、消灯時刻を ZT12 とした。高脂肪食(脂肪から 60%のエネルギーを得るげっ歯類用飼料; D12492)は Research Diet 社から購入し、自由摂取とした。実験のプロトコールは山口大学医学部動物実験倫理委員会の承認(承認番号 J22008)を受けている。

4.2. NMN 投与

NMN は MIRAI LAB より提供を受けた。0.9%生理食塩水に溶解した NMN(500mg/kg)を腹腔内投与した。対照マウスには同量の 0.9%生理食塩水を腹腔内投与した。

4.3. 経口糖負荷試験(OGTT)

糖負荷試験は 16 時間絶食させた 12 週齢の雄マウスで実施した。NMN 含有または非含有の生理食塩水を糖負荷試験開始 6 時間前の ZT23 または 11 に腹腔内投与した。グルコース(2g/kg)は ZT5 または 17 に経口にて投与した。尾の血液を経口投与直前(0 分)、投与後 15、30、60、90、および 120 分に採取し、血糖濃度を ANTSENCE II (Horiba Industry) を用いて測定した。血漿インスリン濃度は酵素結合免疫吸着法(森永)を用いて測定した。

4.4. インスリン負荷試験(IP-ITT)

インスリン負荷試験は自由摂食下の 13 週齢の雄マウスで実施した。NMN 含有または非含有の生理食塩水を試験開始 6 時間前である ZT23 または 11 に腹腔内投与した。インスリン (0.75 単位/kg)は 0.9%生理食塩水に溶解して腹腔内投与し、投与直前(0 分)、投与後 30、60、90、および 120 分に尾静脈から採血を行った。

4.5. 血清非エステル化脂肪酸 (NEFA) および血中乳酸測定

NMN 含有または非含有の生理食塩水を ZT23 に腹腔内投与した。13 週齢自由摂食雄マウスから ZT5 に尾血を採取し、1,200g で 20 分間遠心分離して血清を分離した。血清 NEFA および血中乳酸レベルは酵素アッセイキット (NEFA;FUJIFILM Wako、乳酸;Abcam) を用いて測定した。

4.6. 間接熱量測定

呼吸商(RQ)は、既報[20]に従い間接熱量測定(MK-5000RQ、室町機械)を用いて測定した。

4.7. ウェスタンブロット

自由摂食下の 13 週齢の雄マウスに NMN 含有または非含有の生理食塩水を ZT23 に腹腔内投与し、続いてインスリン含有生理食塩水(0.75 単位/kg)を ZT1 に腹腔内投与した。肝臓、腓腹筋(GM)、または精巣上体脂肪をインスリン投与前(0 分)または投与後 15 分に摘出し

た。GentleMACS Dissociator(Miltenyi Biotec) を用い、メーカーが推奨するプロトコールに従ってホモジナイズした後、Cell Lysis Buffer(CST) を用いて総タンパク質を抽出した。全細胞タンパク質サンプル 30 μ g を SDS-PAGE で分離した。メンブレンにトランスファー後、Amersham Imager 680(Cytiva)で可視化および定量化した。抗体は、anti-Akt(CST #9272、1:1,500)、anti-Phospho-AKT(Ser473)(CST #9277、1:1,500)、および HRP 標識 anti-Rabbit(Jackson ImmunoResearch Laboratories #711-035-152、1:10,000)を使用した。

4.8. RNA 単離およびリアルタイム RT-PCR

肝臓または精巢上体脂肪からの総 RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) で行い、cDNA は Superscript II Reverse Transcriptase(Life Technologies)で合成した。Power SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies)を用いてリアルタイム PCR を実施し、Applied Biosystems StepOnePlus Real Time PCR System(Life Technologies)を用いて定量化した。各 cDNA の定量は Δ Ct 法を用いて算出し、ハウスキーピング遺伝子である Gapdh の値で補正した。プライマーの配列は以下の通りである。

m*Sirt1* forward: 5'- TTGACCTCCTCATTGTTATTGG -3'

m*Sirt1* reverse: 5'- TGTAGATGAGGCAAAGGTTCC -3'

m*Sirt2* forward: 5'- ATCAGCAAGGCACCACTAGC-3'

m*Sirt2* reverse: 5'- CGTCCCTGTAAGCCTTCTTG-3'

m*Sirt3* forward: 5'- GGTGGACACAAGAACTGCTG -3'

m*Sirt3* reverse: 5'- CCCAGGTGAAGAAGCCATAG -3'

m*Nampt* forward: 5'- AGCGGGGAAC TTTGTTACAC -3'

m*Nampt* reverse: 5'- TTTGTCACCTTCCCATTCTTG -3'

m*Gapdh* forward: 5'-AGTATGACTCCACTCACGGCAA-3'

m*Gapdh* reverse: 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

4.9. インスリン刺激による糖取り込みの解析

ZT23 で NMN を腹腔内投与し、その 6 時間後に自由摂食下の 13 週齢の雄マウスに 2-デオキシ-D-グルコース(2-DG)(200mmol/kg)とインスリン(0.75 単位/kg)を同時に腹腔内投与した。インスリン投与 90 分後に肝臓、腓腹筋組織、および精巣上体脂肪を摘出し、メーカー推奨のプロトコールに従い、GentleMACS Dissociator を用いて 10mM の Tris-HCl(pH 8.0)でホモジナイズした。遠心分離後の上清中の 2-DG を 2-DG Uptake Measurement Kit(COSMO BIO #OKPPMG-K01H)を用いて測定した。

4.10. 血清 LDL+VLDL レベル測定

蛍光ベースアッセイキット(Abcam)を製造者の指示に従って血清 LDL+VLDL レベル測定に使用した。

4.11. 統計学的解析

2 群の比較には対応のある両側 t 検定を用いた。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。p < 0.05 の場合に有意差ありと判定した。

5. 結果

5.1. NMN の単回投与は Sirt1 と Nampt の mRNA レベルを増加させる

ニコチンアミドは、サルベージ経路において Nampt によって NMN に変換される。メタボロミクススペースの分析法を用いても、細胞内 NAD⁺を測定することは困難である。そのため、NMN 投与によって細胞内 NAD⁺レベルが増加しているのかを間接的に評価するために、NMN の単回注射後 3 時間または 6 時間における肝臓の *Sirts* と *Nampt* の mRNA を解析した。NMN 投与によって *Sirt1* と *Nampt* の mRNA の発現は、コントロール(生理食塩水)に比べ、それぞれ 39%、38%増加したが、*Sirt2* と *Sirt3* の mRNA 発現は増加しなかった。これらの結果は NMN の単回投与でも細胞内 NAD⁺を増加することを示唆している(図 1)。注射後 6 時間では、*Nampt* の mRNA 発現は依然として有意に上昇していたが、*Sirt1* の mRNA 発現の増加は有意ではなかった(図 1)。

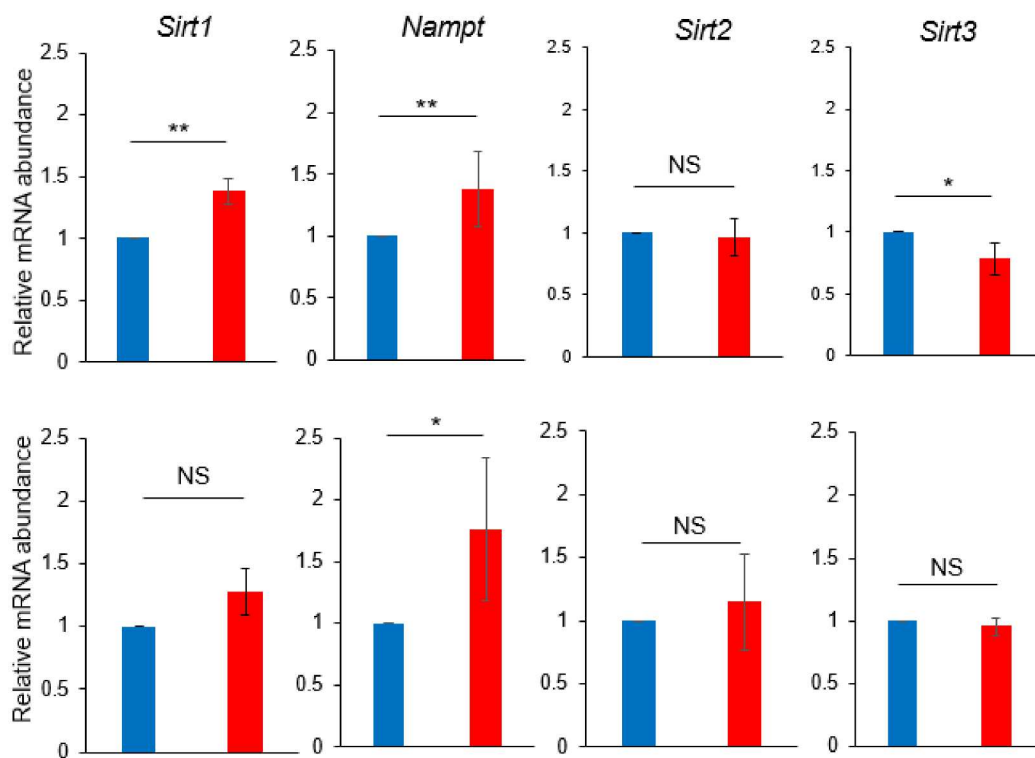


図1. NMN単回投与後の肝臓での *Sirts* と *Nampt* の発現.

0.9%生理食塩水のみ(対照群)またはNMNを0.9%生理食塩水に溶解したもの(NMN群)を、ZT23にマウスに腹腔内投与した。肝臓は投与後3時間(上段)および6時間(下段)に採取した。n=4-6。NSは有意差なしを意味する。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

■ control
■ NMN

5.2. NMN の単回注射によって全身のインスリン感受性が増加する

OGTT において、試験の 6 時間前に行った NMN の単回注射は、耐糖能およびインスリン分泌のいずれも有意に変化させなかった(図 2A、B)。ZT5 で実施した IP-ITT では、インスリン注射後 60 分および 90 分において、NMN 群の血糖値は対照群と比較して有意に低値を示した(図 2C)。ZT17 で実施した IP-ITT では、NMN 群の血糖値は注射後 30 分においてのみ有意に低かった(図 2D)。高脂肪食誘発肥満マウスで ZT5 に実施した IP-ITT でも、NMN 群では注射後 30 分および 60 分において血糖値が有意に低かった(図 2E)。肥満マウ

スの体重は対照群と NMN 群で有意差はなかった（対照群 vs NMN 群 = 37.2 vs 37.5 g, n=6, p=0.95）。

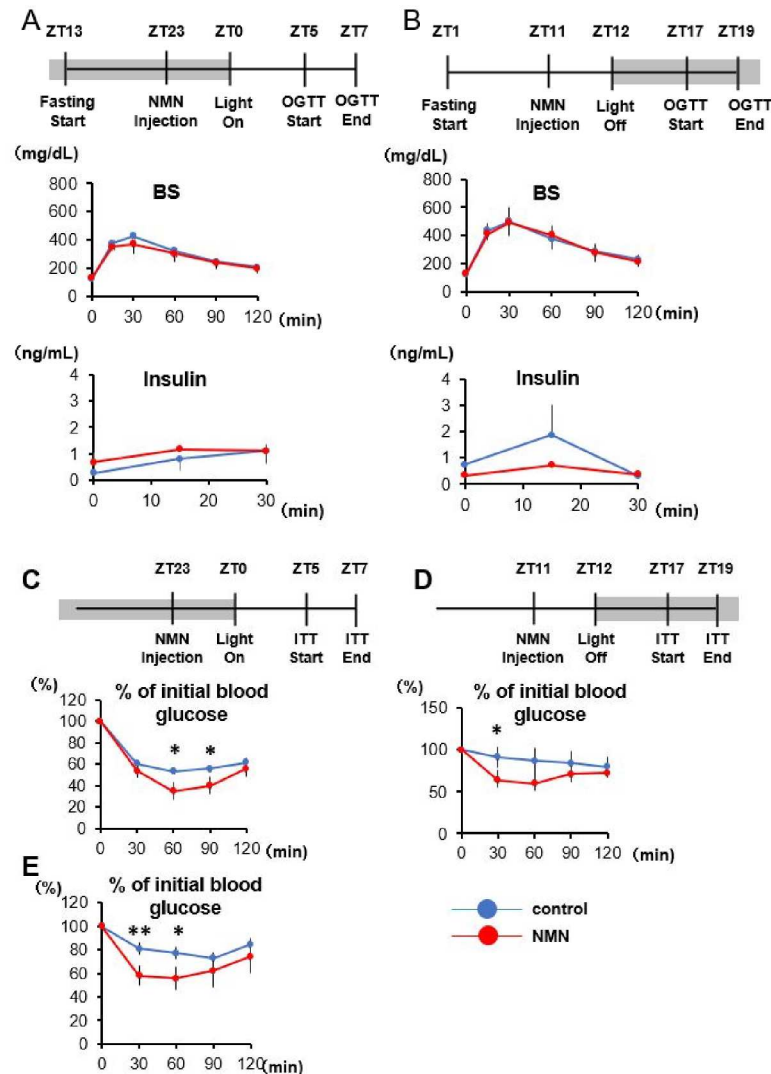


図2. NMN単回投与が糖代謝に与える影響
(A) ZT5におけるOGTT。ZT13から絶食させ、ZT23に対照群およびNMN群へ、それぞれ生理食塩水またはNMNを投与した。ZT5にグルコースを経口投与した。n=7。(B) ZT17におけるOGTT。ZT1から絶食させ、ZT11に生理食塩水またはNMNを投与した。ZT17にグルコースを投与した。n=6。(C) ZT5におけるITT。自由摂食下のマウスに生理食塩水またはNMNをZT23に投与し、ZT5にインスリンを投与した。n=7。(D) ZT17におけるITT。自由摂食下のマウスに生理食塩水またはNMNをZT11に投与し、ZT17にインスリンを投与した。(E) 高脂肪食誘発肥満マウスにおけるZT5でのITT。プロトコルは非肥満マウスと同様とした。値はインスリン投与前の血糖値に対する割合として表した。n=6-7。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

IP-ITT により、NMN の単回注射は一貫してインスリン感受性を有意に向上させることが明らかになったが、その効果は ZT5 で最も顕著であった。そのため、以降の解析は ZT5 の時点で実施した。

5.3. NMN の単回注射によって、筋肉でのインスリン感受性は増加するが、肝臓では増加しない

インスリン注射後のリン酸化 AKT(p-AKT)レベルは、肝臓および筋肉のインスリン感受性のマーカーとして用いられている。ZT23 で NMN または生理食塩水を注射した後、ZT5 でインスリンを注射し、インスリン注射前または注射後 15 分で肝臓および腓腹筋(GM)を採取した(図 3A)。NMN 投与は、インスリン投与前の AKT リン酸化を変化させなかった。インスリン注射後では、NMN 投与によって肝臓での AKT リン酸化は減少し、GM での AKT リン酸化は増加した(図 3A)。肝臓、筋肉および脂肪組織におけるインスリン刺激後のグルコース取り込みを測定するため、ZT5 で 2-DG を含むインスリンを腹腔内注射した。NMN は対照群と比べて、GM での 2-DG の含有量つまり糖取り込みを 2.7 倍増加させたが、肝臓および精巣上体脂肪では有意差は認められなかった(図 3B)。

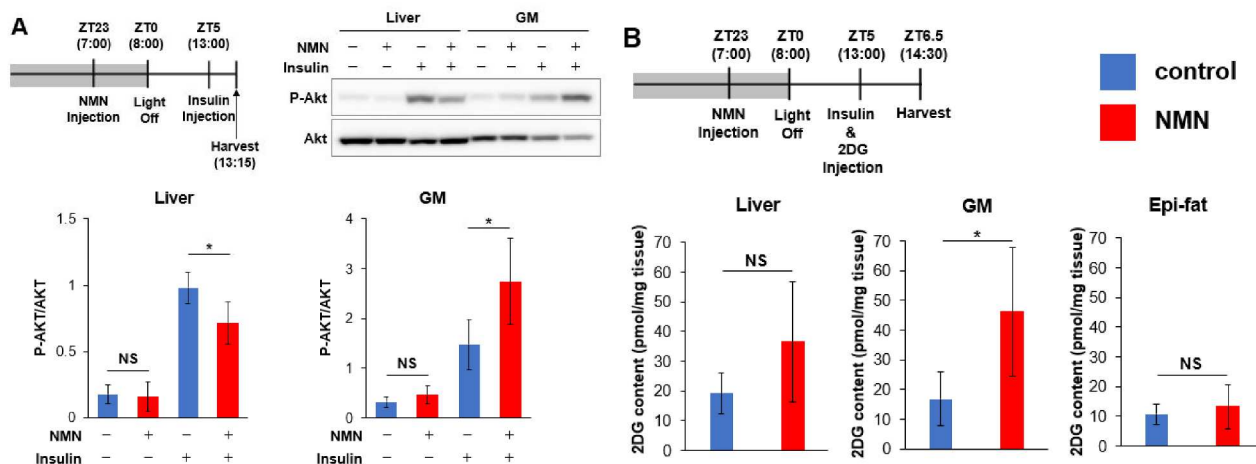


図3. 肝臓および腓腹筋(GM)におけるインスリンシグナル伝達およびグルコース取り込みに対するNMNの効果 (A) ZT23に、マウスに生理食塩水またはNMNを投与した。ZT5にインスリン(0.75 U/kg)投与後15分で単離した肝臓およびGMにおけるp-AKTおよびAKTのウェスタンブロット。代表的なウェスタンブロット画像を右上に示す。n=5。 (B) ZT5にインスリンおよび2-DG(200 mmol/kg)投与後90分で単離した肝臓、GM、および精巣上体脂肪(epi-fat)におけるグルコース取り込み。n=4。NSは有意差なし。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5.4. NMN の単回注射によってエネルギー源としての脂質利用割合が増加する

NMN の単回注射がエネルギー基質比率に与える影響を検討した。ZT23 での NMN 投与は ZT5 の自由摂食下の血糖値に影響しなかった(図 4A)。対照群でも血中乳酸値は ZT23 から ZT5 にかけて低下する傾向があり、NMN 投与群ではこの変化をさらに増大したため、対照マウスと比較してその変化量に有意差が認められた(図 4B)。

血清 NEFA 濃度は対照群では ZT23 から ZT5 にかけて増加する傾向があったが、NMN 投与群は血清 NEFA 濃度を低下させ、その変化量は対照マウスで見られたものと著しく異なった(図 4C)。

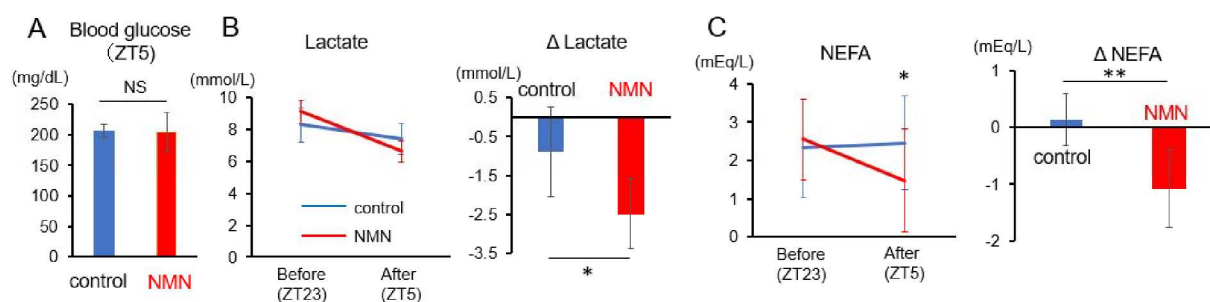


図4. エネルギー基質利用に対するNMNの効果

(A, B) ZT23に、マウスに生理食塩水またはNMNを腹腔内投与した。ZT5における血糖値(A)(n=6)、投与前(ZT23)および投与後(ZT5)の血中乳酸値(B左)、ならびに血中乳酸値の変化量(Δ)(B右)(n=7)。(C) 投与前(ZT23)および投与後(ZT5)の血清NEFA濃度(左)、ならびに血清NEFA濃度の変化量(Δ)(右)(n=7)。NSは有意差なし、 $p < 0.05$ 、* $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

RQは通常、暗期により高く、明期により低くなり、ZT0からZT6にかけて低下する。ZT23でのNMN投与は、運動量(対照群 vs NMN群 = 62.9 vs 52.0 回/分、 $n=4$ 、 $p=0.74$)および摂食量(対照群 vs NMN群 = 0.49 vs 0.62 g/7時間、 $n=4$ 、 $p=0.71$)に影響しなかった。NMN投与マウスでは、ZT0からZT6において、対照マウスと比較してRQが低下した。この結果より、NMNの単回投与でも脂質のエネルギー利用が促進することがわかった(図 5A)。

一方、NMN を投与した翌日(2 日目)の同じ時間帯(ZT0 から ZT6) において、NMN 群の RQ は対照群よりも有意に高値を示していた(図 5B)。

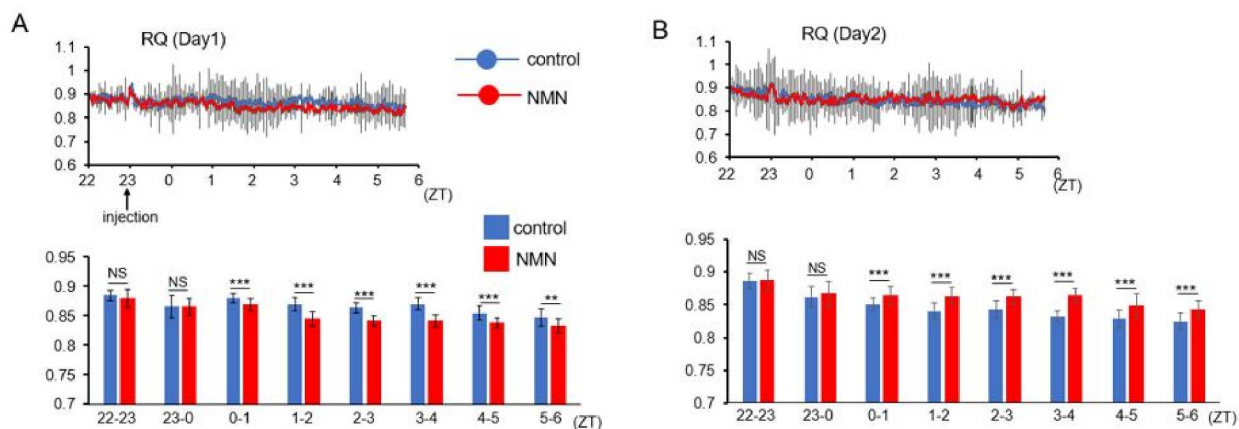


図5. ZT22~ZT6の間のRQ

(A)1日目(注射日)のRQとRQの平均値 (B)2日目(注射日の翌日)のRQとRQの平均値。
(n=5)。NSは有意差なし、 $p < 0.05$ 、* $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

5.5. NMN の単回注射は脂肪組織でのインスリン感受性増加に伴い、脂肪組織からの NEFA 放出を減少させる

図 4C に示したように、NMN 投与によって血清 NEFA 濃度を低下したことから、脂肪組織からの NEFA 放出に対する NMN の効果を検討した。脂肪組織における細胞内 NAD⁺レベルを評価するため、NMN の単回注射後 3 時間で精巣上体脂肪における *Sirts* と *Nampt* の mRNA レベルを測定した。NMN は注射後 3 時間で *Sirt1* と *Nampt* の mRNA 発現を増加させたが、*Sirt2* と *Sirt3* の mRNA 発現は増加させなかった。この結果から NMN は単回投与でも脂肪組織における細胞内 NAD⁺を増加させることを示唆された(図 6A)。

NMN 投与による脂肪組織でのインスリン感受性の変化を AKT のリン酸化で検討したところ、NMN 投与によって AKT のリン酸化は有意に増加した。つまり、NMN の単回投与は、

脂肪組織においても NAD⁺レベルを増加させ、インスリン感受性を増大させることによって、脂肪組織からの NEFA 放出を減少させる可能性が示された (図 6B)。

さらに、肝臓から放出される LDL、VLDL に対する NMN 投与の効果を検討するため、ZT23 と 5 における血清 LDL、VLDL レベルの変化を解析した。血清 LDL、VLDL レベルは、対照マウス群では ZT23 から ZT5 にかけてわずかに増加したが、NMN 投与マウスでは血清 LDL、VLDL レベルが低下し、その変化量には有意差が認められた(図 6C)。これらの知見から、単回注射が脂肪組織からの NEFA 放出と肝臓からのリポタンパク質(LDL と VLDL)放出の両方を減少させることが示唆された。

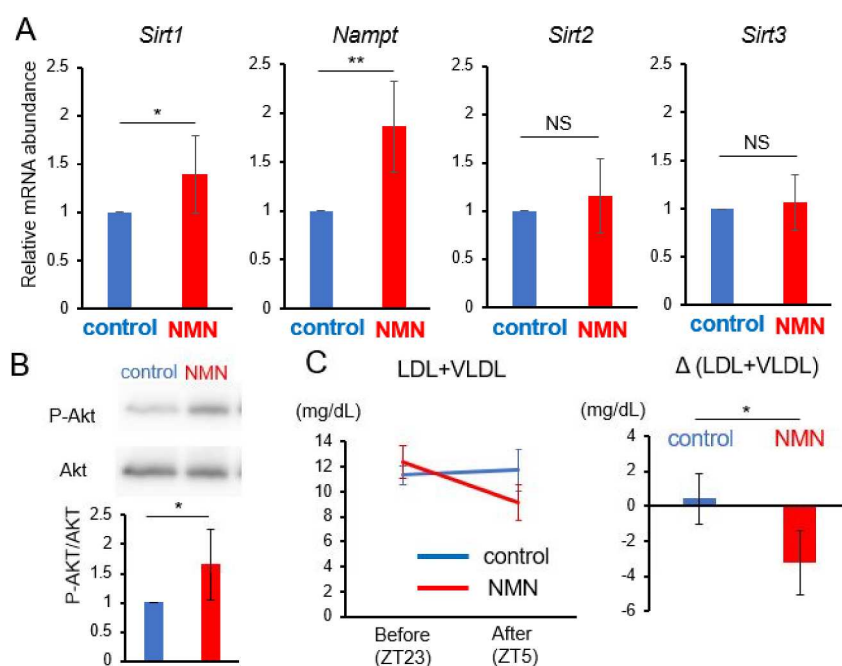


図6. 脂肪組織および肝臓における脂質代謝に対するNMNの影響

(A)脂肪組織における、NMNの単回投与後のSirtsおよびNamptの発現。ZT23に腹腔内投与し、精巣上体脂肪は投与3時間後に採取した。(n=6)。(B) ZT23に投与後、ZT5に単離した精巣上体脂肪におけるp-AKTおよびAKTのウェスタンブロット。(C)投与前(ZT23)および投与後(ZT5)の血清LDL+VLDL濃度(左)、ならびに血清LDL+VLDL濃度の変化量(Δ)(右)。(n=4)。NSは有意差なし。p<0.05、* p<0.01。

6. 考察

我々は本研究で、NMN の単回投与が若い野生型マウスにおいてインスリン感受性を増加させるが、インスリン分泌には影響しないことを示した。既報では、NMN の単回投与が、*Nampt* ヘテロ接合性ノックアウトマウスおよび β 細胞特異的 *Sirt1* 過剰発現マウスにおいて、インスリン分泌を促進することで耐糖能を改善することが報告されている[11,12]。この結果は本研究のデータとは相反するものではあるが、既報では NAD 合成経路が遺伝子改変によって障害されたマウスが用いられており、そのような障害のない野生型マウスを用いた本研究とは、背景がかなり異なると考えられる。また Yoshino らは、NMN を 1 週間以上投与することによって、肥満または糖尿病マウスにおけるインスリン感受性が増大することを報告している[1]。本研究のデータとも合致するものではあるが、本研究では若い野生型マウスへの NMN の単回投与であり、対象とするマウスや投与期間の違いがあっても、インスリン感受性を増大させるという代謝変化が認められることは意義があると考えている。

マウスを用いたほとんどの研究では、NMN がインスリン分泌障害の病態を軽減することが示されており、インスリン抵抗性の増大効果を示した研究は少数である[6,21]。一方、ヒトの研究では、NMN の長期投与が健康な中年男性において筋インスリン感受性を増加させ、前糖尿病女性において食後高インスリン血症を軽減することが明らかにされている[17,19]。本研究の結果は、ヒトで観察された NMN の効果がマウスでも再現されることを示している。

インスリン感受性の増大さらにはそのメカニズムを解析していく上で認められた最も顕

著な効果は、血清 NEFA の低下作用であり、筋肉でのグルコース取り込みを増加させるメカニズムの一つであり、インスリン感受性増大のメカニズムの一端を説明しうるものであると考えている[22-25]。NMN 投与群では血中乳酸値のより大きな低下と NMN 投与後の RQ の著しい低下が見られた。これらの結果は、NMN の単回投与が、一部はミトコンドリア活性を促進することで、エネルギー基質を炭水化物から脂質へとシフトさせることで、特に肝臓における脂質異化を促進し、肝臓からの脂質の放出が抑制されたと考えられる。野生型 C57BL/N6 マウスへの NMN の長期投与により、RQ の低下とミトコンドリア代謝が活性化し、血清 NEFA レベルも低下することが示されており、本研究のデータとも一致する。本研究では実施できていないが、ミトコンドリア代謝の活性化が本研究のデータにも関連することが示唆される[21]。

血清 NEFA の低下が、脂肪組織からの NEFA 放出の減少によるものなのか、肝臓からの LDL、VLDL 放出の減少のどちらによるものなのかを本研究ではさらに検討している。NMN 単回投与は脂肪組織のインスリン感受性を増加させており、これが脂肪組織からの NEFA 放出を減少させる要因になっている可能性がある[26,27]。一方、NMN 投与はインスリン注射前の血清 LDL、VLDL レベルを低下させていることから、NMN の単回注射は、脂肪組織と肝臓の両者の代謝変化を介して血清 NEFA を低下させている可能性が高いと考えられた。

Ramsey らは、野生型マウスの肝臓における *Nampt* RNA レベルが暗期開始時にピークを持つ強固な日内リズムパターンを示す一方で、*Clock* $\Delta 19$ 変異マウスの肝臓では明暗サイクル全体を通じて低下していることを示している[28]。NMN 注射 6 時間後、肝臓でのインス

リン感受性は筋肉とは対照的に低下し、NMN が肝臓から筋肉へのグルコース流入を増加させることを示唆しており、これはヒトおよびマウスで一般的に見られる活動期初期の代謝状態と非常に類似している[24]。

本研究で NMN が *Nampt*mRNA 発現を増加させたこと、また *Nampt*mRNA の発現が活動開始時間にピークになるという生理学的条件を考慮すると、活動期開始時付近に NMN を投与することがより効果的である可能性が高い。また、本研究における NMN の単回注射の最も顕著な効果は脂質利用の促進であった。通常脂質利用は非活動時間に増加し、続いて活動期初期に肝臓から筋肉への糖の流入が増加する[23,24]。したがって脂質利用や糖の流れ

を考慮しても、やはり NMN は活動期開始前または開始直後の投与がより効果的であると推測される。

結論として、以下のようなことを想定している。NMN の単回投与は肝臓および脂肪組織で NAD⁺サルベージ経路を活性化し、それにより細胞内 NAD⁺レベルが増加

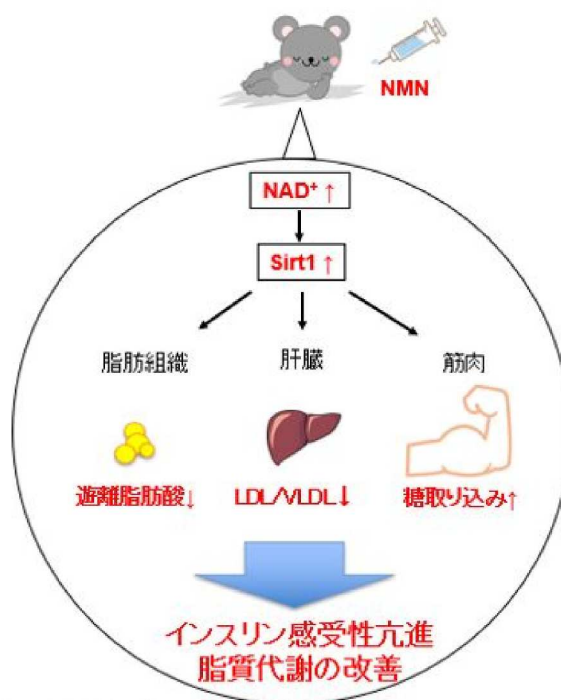


図7. Graphical Abstract

NMNの単回投与はNAD⁺サルベージ経路を活性化させ、脂肪組織と肝臓からの脂質の放出を抑制し、全身での脂質のエネルギー利用の促進とそれに伴う血清NEFAの低下を介して、インスリン感受性を向上させる。

する。これにより、肝臓での脂質のエネルギー利用の増加と脂肪組織でのインスリン感受性

が増加し、脂肪組織ならびに肝臓由来の血清 NEFA がともに抑制され、そして最終的には筋肉でのインスリン感受性が増加する(図 7)。

7. 結語

NMN 単回投与により、Sirt の活性化を介した脂質異化亢進とそれに伴う筋インスリン感受性の亢進が認められ、代謝性疾患に対する NMN の有用性が、急性効果としても示唆された。NMN と NAD⁺の薬物動態についてはさらなる研究が必要であるが、本研究によって、ヒト代謝疾患の治療薬として NMN の活用への期待が少なからず高まったのではないかと考えられる。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導くださいました太田康晴教授に深く感謝申し上げます。また田口昭彦講師をはじめ病態制御内科学講座の諸先生方、研究室スタッフの皆様に感謝いたします。

9. 参考文献

1. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD (+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. Cell Metab 14: 528-536.

2. Gariani K, Menzies KJ, Ryu D, Wegner CJ, Wang X, et al. (2016) Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice, *Hepatology* 63 :1190-1204.
3. Frederick DW, Davis JG, Dávila A Jr, Agarwal B, Michan S, et al. (2015) Increasing NAD synthesis in muscle via nicotinamide phosphoribosyltransferase is not sufficient to promote oxidative metabolism, *J Biol Chem* 290: 1546-1558.
4. Gulshan M, Yaku K, Okabe K, Mahmood A, Sasaki T, et al. (2018) Overexpression of *Nmnat3* efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance. *Aging Cell* 17: e12798.
5. Rajman L, Chwalek K, Sinclair DA (2018) Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab* 27: 529-547.
6. Yoshino J, Baur JA, Imai SI (2018) NAD (+) Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab* 27: 513-528.
7. McReynolds MR, Chellappa K, Baur JA (2020) Age-related NAD(+) decline. *Exp Gerontol* 134: 110888.
8. Johnson S, Imai SI (2018) NAD (+) biosynthesis, aging, and disease. *F1000Res* 7: 132.
9. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795-800.
10. Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T (2019) Implications of altered NAD metabolism

in metabolic disorders, *J Biomed Sci* 26: 34.

11. Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, et al. (2007) Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 6: 363-375.

12. Ramsey KM, Mills KF, Satoh A, Imai S (2008) Age-associated loss of Sirt1-mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in beta cell-specific Sirt1-overexpressing (BESTO) mice. *Aging Cell* 7: 78-88.

13. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, et al. (2013) Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 155: 1624-1638.

14. Peek CB, Affinati AH, Ramsey KM, Kuo HY, Yu W, et al. (2013) Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 342: 1243-1247.

15. Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, Holness MJ, Sugden MC (2011) Nicotinamide mononucleotide protects against pro-inflammatory cytokine-mediated impairment of mouse islet function. *Diabetologia* 54: 3083-3092.

16. Tsubota K (2016) The first human clinical study for NMN has started in Japan. *NPJ Aging Mech Dis* 2: 16021.

17. Yamaguchi S, Irie J, Mitsuishi M, Uchino Y, Nakaya H, et al. (2024) Safety and efficacy of long-term nicotinamide mononucleotide supplementation on metabolism, sleep, and

nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis in healthy, middle-aged Japanese men. *Endocr J* 71: 153-169.

18. Zhong O, Wang J, Tan Y, et al., Effects of NAD⁺ precursor supplementation on glucose and lipid metabolism in humans: a meta-analysis, *Nutr Metab (Lond)*. 19 (2022) 20. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00653-9>.

19. Yoshino M, Yoshino J, Kayser BD, Patti GJ, Franczyk MP, et al. (2021) Nicotinamide mononucleotide increases muscle insulin sensitivity in prediabetic women, *Science* 372: 1224-1229.

20. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, et al. (2006) Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312: 1656-1659.

21. Mills KF, Yoshida S, Stein LR, Grozio A, Kubota S, et al. (2016) Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. *Cell Metab* 24: 795-806.

22. Kraegen EW, Cooney GJ (2008) Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 19: 235-241.

23. Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, et al. (2021) Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 534: 415-421.

24. Fujimoto R, Ohta Y, Masuda K, Taguchi A, Akiyama M, et al. (2022) Metabolic state switches between morning and evening in association with circadian clock in people without diabetes. *J Diabetes Investig* 13: 1496-1505.
25. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, et al. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274.
26. Sugimoto D, Tamura Y, Takeno K, Kaga H, Someya Y, et al. (2019) Clinical Features of Nonobese, Apparently Healthy, Japanese Men with Reduced Adipose Tissue Insulin Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 104: 2325-2333.
27. Carpentier AC. (2021) 100(th) anniversary of the discovery of insulin perspective: insulin and adipose tissue fatty acid metabolism.
Carpentier AC. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320: E653-E670.
28. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, et al. (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis, *Science* 324: 651-654.