

平成30年6月15日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15348

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸受容体の脂肪細胞遺伝子プログラム改変作用を応用した肥満治療法開発

研究課題名(英文) Signaling and Browning in White Adipose Tissues by the Receptors for Short-Chain Fatty Acids

研究代表者

荒木 栄一 (Araki, Eiichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：10253733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：短鎖脂肪酸受容体GPR43を活性化し内臓白色脂肪組織のブラウニングを誘導することで抗肥満効果を発揮しうるかを動物および細胞レベルにて検討、ヒト肥満への応用を目指す研究。GPR43欠損および対照マウスの内臓脂肪組織、それぞれの初代培養脂肪細胞において、酢酸あるいは酪酸がブラウニングに関連する遺伝子群を正に制御できるか、余剰エネルギー消費に働くUCP1発現を上昇できるか、白色脂肪組織にブラウニングを誘導できるか、GPR43下流のいずれのシグナル活性化と関係するかを検討している。現時点で未完了の実験もあるが、酢酸あるいは酪酸の経口投与はGPR43非依存性にブラウニングを惹起する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： The induction of beige adipogenesis within white adipose tissue (WAT), known as “browning”, has received attention as a novel anti-obesity strategy. Although acetate could exhibit anti-obesity effect and induce browning of WAT in obese diabetic KK-Ay mice, the contribution of GRP43, a receptor for acetate, on acetate-induced browning, was unknown.

In the present study, it was investigated whether orally administered acetate or butyrate could induce anti-obese effects, genes involved in browning, and browning of WAT in either high fat diet-fed GRP43-deficient or the control mice. In addition, the effects of acetate or butyrate on gene expression were investigated in primary-cultured adipocytes derived from WAT of GRP43-deficient or the control mice.

Treatment with acetate or butyrate induced anti-obesity effect and browning of WAT in both high fat diet-fed mice and upregulated genes involved in browning in either adipocytes, suggesting the GRP43-independent mechanisms.

研究分野：代謝内科学

キーワード：ブラウニング 短鎖脂肪酸 肥満 内臓脂肪 皮下脂肪 GPR43

1. 研究開始当初の背景

短鎖脂肪酸は細胞内代謝に利用される他にも、固有の受容体を介してシグナル伝達に機能することが報告されている。主要な短鎖脂肪酸である酢酸は、耐糖能改善作用や内臓脂肪の減少作用を有することが多施設から報告されている。一方、酢酸の受容体として GPR43 が知られていたが、その脂肪組織における役割は最近まで不明であった。

近年、白色脂肪細胞において寒冷被爆などの刺激が褐色化 (Browning: ブラウニング) を誘導し、ベージュ脂肪細胞へと変化させることが明らかとなった。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と同様に熱産生を介してエネルギーを消費することに長けた細胞であり、ブラウニング誘導の肥満治療への応用が期待されている (Nat Med. 2013 19(10): 1252-63.)。一方、消化管内微生物は発酵による短鎖脂肪酸の産生を介して宿主のエネルギー代謝に影響することが示されている。食酢の主成分である酢酸は、消化管内微生物により産生される主要な短鎖脂肪酸でもあり、耐糖能の改善作用や肥満個体における体重減少や内臓脂肪量の減少効果が報告されている。

酢酸による抗肥満・抗糖尿病作用の機序としては、肝臓での AMP キナーゼ (AMPK) 活性化や、摂食中枢における食欲抑制作用などが報告されているものの、その詳細は不明な点が多い。

短鎖脂肪酸は G 蛋白質共役受容体 (GPR43 および GPR41) に結合、細胞内シグナルを発生させる。GPR43 は腸管、脂肪組織、免疫細胞に多く発現し、腸管における GLP-1 分泌促進 (Diabetes. 2012;61:364-71) 脂肪組織での脂肪蓄積の抑制 (Nat Commun. 2013;4:1829) 等の作用を有することが示され、エネルギー恒常性維持に関与するセンサー分子と注目されている。

申請者は、肥満糖尿病モデル動物を用いた実験にて酢酸投与が内臓脂肪における褐色脂肪マーカー発現を上昇させることを見出し、培養脂肪細胞を用いた実験によりその作用が脂肪細胞における直接作用であることを明らかとした (J Clin Biochem Nutr. 2016;59:207-214 / 花谷聡子 . 2014 年度日本体質医学会若手研究奨励賞受賞)。その中で、酢酸摂取によって内臓脂肪組織における UCP1 の発現が有意に増加すること、この UCP1 発現増加は既報の寒冷被爆によるブラウニングと比べ緩やかな増加に留まり、作用部位についても寒冷被爆によるものと異なることに着目した。また、酢酸投与により GPR43 発現量も増加することや、別の短鎖脂肪酸である酪酸もブラウニング誘導作用を有することを示す実験データを得ていた (Motoshima H, et al; 未報告データ)。

これらの既報および当教室における研究結果より、短鎖脂肪酸は GPR43 を介した未知の機序により白色脂肪組織ブラウニングに類似したエネルギー消費亢進作用を誘導し、抗肥満効果、耐糖能改善作用、インスリン抵抗性改善作用をもたらすと推察した。

2. 研究の目的

申請者は、酢酸や酪酸など短鎖脂肪酸の

経口投与により内臓脂肪組織の褐色脂肪マーカーが増加することを見出し、「短鎖脂肪酸の幾つかが GPR43 活性化を介し白色脂肪組織のブラウニングを誘導することにより抗肥満効果を発揮する」という仮説を立てた。

本研究では、ブラウニング誘導機序の解明と GPR43 シグナルとの関係を明らかとすることを目的とした。GPR43 シグナルの関与を明らかとするために、培養細胞および GPR43 遺伝子改変マウス等の動物を用いた実験を行うこととした。さらに、解明した機序を応用して、GPR43 を介したブラウニングを制御することによる内臓脂肪蓄積の減少が肥満や糖尿病の新規治療法となり得ることを証明することを目指した。

3. 研究の方法

GPR43 ノックアウトマウスおよび対照マウスに酢酸塩および酪酸塩水溶液の経口投与、これらを含まない飲用水の投与を行い、体重および摂餌量の変化、耐糖能およびインスリン抵抗性の評価を行った。食餌として通常食餌と高脂肪食を与えた実験系を用いた。

上記 同様の飲用水投与を施した GPR43 ノックアウトマウスおよび対照マウスに、通常気温および寒冷被爆時の直腸温測定を実施した。

凍結保存したマウス内臓脂肪および皮下脂肪組織から mRNA および蛋白サンプルを抽出、内臓脂肪および皮下脂肪における褐色脂肪マーカーおよびブラウニングマーカー発現を RT-PCR 法やウエスタンブロット法にて評価した。さらに、内臓脂肪および皮下脂肪組織の形態学的評価と UCP1 免疫染色を用いたブラウニングの評価を実施した。

GPR43KO マウスおよび対照マウスの内臓脂肪由来の初代培養脂肪細胞を、酢酸塩および酪酸塩を含む培養液にて刺激、ブラウニング関連遺伝子マーカーの発現量を検討した。試料の一部をマイクロアレイにて解析中である。

4. 研究成果

高脂肪食負荷条件下で、酢酸塩および酪酸塩水溶液の経口投与を行ったマウスでは、これらを含まない飲用水を投与したマウスに比較して、体重および内臓脂肪蓄積が減少していた。摂餌量に影響は認めなかった。高脂肪食負荷条件下で、酢酸塩および酪酸塩水溶液の経口投与を行ったマウスでは、これらを含まない飲用水を投与したマウスに比較して、耐糖能およびインスリン抵抗性の改善を認めた。GPR43 ノックアウトマウスでは対照マウスに比較して、酢酸塩投与の際に体重、内臓脂肪の減少傾向を示したが、酪酸投与では両マウス間で差を認めなかった。

通常食餌投与下で、酢酸塩および酪酸塩水溶液の経口投与を行ったマウスでは、高脂肪

食条件下で認められた体重と内臓脂肪蓄積の減少を認めなかった。一方、摂餌量は酢酸塩および酪酸塩水溶液投与マウスで減少傾向を示した。耐糖能およびインスリン抵抗性については、酢酸塩および酪酸塩水溶液投与による改善は認めなかった。GPR43 ノックアウトマウスと対照マウスとの間に体重、耐糖能、インスリン抵抗性に有意な差異を認めなかった。

通常食投与下に寒冷曝露を加えた実験系では、酢酸塩および酪酸塩水溶液を投与したマウスにおいて直腸温が高い傾向を示した。GPR43 ノックアウトマウスおよび対照マウス間に差を認めなかった。

通常気温においても、酢酸塩および酪酸塩水溶液投与を施したマウスにおいて直腸温は高い傾向を示した。GPR43 ノックアウトマウスおよび対照マウス間に差を認めなかった。

高脂肪食負荷条件下に酢酸塩および酪酸塩水溶液を投与したマウスでは、これらを含まない飲用水を投与したマウスと比較して、内臓脂肪組織における褐色脂肪マーカーやブラウニングマーカー遺伝子群 (PGC1 α 、PRDM16、Cidea および UCP1) の mRNA 発現が増強していた。GPR43 ノックアウトマウスでは対照マウスと比較して、酢酸塩投与の際に、褐色脂肪マーカーおよびブラウニングマーカー遺伝子群の発現が増強していた。一方、酪酸投与では両マウス間で差を認めなかった。ウエスタンブロット法による蛋白発現解析では、高脂肪食負荷条件下に酢酸塩および酪酸塩水溶液投与を行ったマウスで、これらを含まない飲用水を投与したマウスと比較して、内臓脂肪組織における UCP1 と PRDM16 の発現上昇を認めた。酢酸塩および酪酸塩水溶液を投与した GPR43 ノックアウトマウスと対照マウスの間に、UCP1 と PRDM16 の蛋白発現に差を認めなかった。

内臓脂肪の形態学的評価では、酢酸塩および酪酸塩水溶液を投与したマウスにおいて脂肪細胞サイズの小型化を認め、UCP1 免疫染色陽性の小型脂肪細胞の出現を認めた。酢酸塩および酪酸塩水溶液を投与した GPR43 ノックアウトマウスと対照マウスの間に、脂肪細胞の大きさと UCP1 染色陽性脂肪細胞の出現に有意な差は認めなかった。なお、AMPK α サブユニットの発現は、短鎖脂肪酸の投与の有無や GPR43 ノックアウトおよび対照マウス間で差を認めなかった。

GPR43KO マウスおよび対照マウス内臓脂肪組織由来初代培養脂肪細胞を、酢酸塩および酪酸塩を含む培養液にて刺激すると、褐色

脂肪マーカーおよびブラウニングマーカー遺伝子群 (PGC1 α 、PRDM16、Cidea および UCP1) の mRNA 発現が増強した。GPR43 ノックアウトマウスと対照マウス由来初代培養脂肪細胞間では、酢酸塩および酪酸塩投与による褐色脂肪マーカーおよびブラウニングマーカー遺伝子群の発現誘導に差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Fukuda K, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Murakami S, Nakao S, Motoshima H, Kondo T, Kukidome D, Kawasaki S, Kawada T, Nishikawa T, Araki E: Statins mediate anti-atherosclerotic action in smooth muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Biochem Biophys Res Commun* 457:23-30, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.063.
2. Nishikawa T, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species in the pathogenesis of early diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest* 6:137-139, 2015. DOI: 10.1111/jdi.12258.
3. Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Matsui K, Obayashi K, Ando Y, Araki E: Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. *Diabetic Medicine* 33: 62-69, 2015. DOI: 10.1111/dme.12797.
4. Araki E, Tanizawa Y, Tanaka Y, Taniguchi A, Koiwai K, Kim G, Salsali A, Woerle H.J, Broed U.C: Long-term treatment with empagliflozin as add-on to oral anti-diabetes therapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 17: 665-674, 2015. DOI: 10.1111/dom.12464.
5. Araki E, Kondo T, Kai H: Cellular stress response pathways and diabetes mellitus. *Diabetol Int* 6: 239-242, 2015.
6. Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. *J Clin Biochem Nutr* 59:207-214, 2016.

7. Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, Senokuchi T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Hyperglycemia induces cellular hypoxia through production of mitochondrial ROS followed by suppression of aquaporin-1. *PLoS One* 11:e0158619, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0158619.
8. Araki E, Haneda M, Kasuga M, Nishikawa T, Kondo T, Ueki K, Kadowaki T: New glysemic targets for patients with diabetes from the Japan Diabetes Society. *Diabetology International* 7:327-330, 2016. DOI: 10.1111/jdi.12600.
9. Kondo T, Goto R, Ono K, Kitano S, Suico MA, Sato M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E: Activation of heat shock response to treat obese subjects with type 2 diabetes: a prospective, frequency-escalating, randomized, open-label, triple-arm trial. *Sci Rep* 6:35690, 2016. DOI: 10.1038/srep35690.
10. Kajihara N, Kukidome D, Sada K, Motoshima H, Furukawa N, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells. *J Diabetes Investig* 8: 750-761, 2017. DOI: 10.1111/jdi.12678.
11. Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Goto R, Senokuchi T, Kawashima J, Furukawa N, Motoshima H, Araki E: Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. *PLoS One* 13:e0191553, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0191553.
12. Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Morita Y, Ishii N, Fukuda K, Murakami S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Koga T, Yamagata K, Takeya M, Araki E: Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation and suppresses atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38: 994-1006, 2018. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310320.

〔学会発表〕(計9件)

1. 荒木栄一: HbA1c目標値の個別化(熊本宣言とその背景). 第57回日本老年医学会学術集会, 2015/6/12-2015/6/14, 横浜,

(シンポジウム)

2. 荒木栄一: 糖尿病病態の体質医学的解析. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-2015/7/5, 札幌 (学会賞受賞講演)
3. 佐田公範, 西川武志, 久木留大介, 梶原伸宏, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 細胞内低酸素誘導及びミトコンドリア由来活性酸素のHyperglycemic memoryへの関与. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-2015/7/5, 札幌 (若手研究奨励賞受賞講演)
4. 荒木栄一: 糖尿病の成因・病態の分子生物学的解析と新規糖尿病治療法への応用. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/5/19-2016/5/21, 京都 (学会賞: ハーゲドーン賞受賞口演)
5. 荒木栄一: 糖尿病診療の最前線と治療目標の個別化. 第315回日本内科学会九州地方会, 2016/11/20, 熊本, (生涯教育セミナー講演)
6. 荒木栄一: 分子糖尿病学から新規糖尿病治療法開発を目指して. 第55回日本糖尿病学会九州地方会. 2017/10/13-2017/10/14, 宮崎, (シンポジウム)
7. 荒木栄一: 糖尿病病態の分子生物学的解析と新規糖尿病治療法開発への応用. 日本医師会設立70周年記念式典並びに医学大会. 2017/11/1, 東京(医学賞受賞講演)
8. 荒木栄一: 分子糖尿病学から新規糖尿病治療法開発を目指して. 日本糖尿病学会中国四国地方会第55回総会. 2017/11/10, 岡山 (特別講演)
9. 荒木栄一: 2型糖尿病の成因と病態 Update. 第52回糖尿病学の進歩. 2018/3/2-2018/3/3, 福岡, (専門医更新のための指定教育講演)

〔図書〕(計21件)

1. 荒木栄一: 2型糖尿病-病態. 糖尿病学(著者:門脇孝/荒木栄一/稲垣暢也), pp204-213, 西村書店, 東京, 2015
2. 荒木栄一: インスリン治療の目的と適応. 最新インスリン療法 Visual 糖尿病臨床のすべて(改訂第2版)(専門編集:綿田裕孝, 編集主幹:荒木栄一): pp 2-13, 中山書店, 東京, 2015
3. 荒木栄一: 糖尿病. 今日の診断指針(第7版)(総編集:金澤一郎, 永井良三). pp1229-1238, 医学書院, 東京, 2015
4. 石井規夫, 荒木栄一: 特集:糖尿病治療新時代-糖尿病治療の update- 図説:糖尿病治療薬の作用機序. 日本臨床第73巻第12号, pp1974-1978, 日本臨床社, 東京, 2015

5. 川崎修二, 荒木栄一: 特集:糖尿病治療新時代-糖尿病治療の update- 次世代超特効型インスリン製剤. 日本臨床第 73 巻第 12 号, pp1974-1978, 日本臨床社, 東京, 2015
6. 荒木栄一: 糖尿病の病型分類と診断基準 コントロール目標(総論). 糖尿病 最新の治療 2016-2018, pp49-53, 南江堂, 東京, 2016
7. 荒木栄一, 西川武志, 本島寛之, 古川昇, 下田誠也: 糖尿病治療における適正な血糖管理目標(熊本宣言 2013). 新時代の臨床糖尿病学(上) 日本臨床 74 巻 増刊号 1, 日本臨床社, 東京, 2016
8. 荒木栄一: 発言 1 血糖コントロール把握の指標とその効果的活用. 糖尿病 UP-DATE 賢島セミナー 32, pp22-32, メディカルジャーナル社, 東京, 2016
9. 久木留大介, 荒木栄一: 1. 糖尿病 -糖尿病の治療選択について-. メディカルスタッフのための臨床医学, pp252-264, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2016
10. 荒木栄一: 第 4 章 管理・治療 治療の目標と指針. 糖尿病, pp86-92, 最新医学社, 大阪, 2016
11. 櫻田郁, 荒木栄一: 2. 血糖値って何?. 魔法の糖尿病患者説明シート 50+ . 糖尿病ケア 2016 春季増刊, pp16-19, メディカ出版, 大阪, 2016
12. 近藤龍也, 荒木栄一: 微弱電流と温熱刺激による新規糖尿病治療. 実験医学増刊 35:163-165, 2017
13. 門脇孝, 荒木栄一, 石原寿光, 稲垣暢也, 寺内康夫: 座談会「Islet Equality」創刊 5 年を振り返る-膵島研究の変遷- Islet Equality 6:5-18, 2017
14. 荒木栄一: 学会印象記 EASD 2016(12-16 September in Munich, Germany). Islet Equality 6:19-23, 2017
15. 荒木栄一: 熊本宣言 2013 とその後について. 糖尿病診療に役立つ情報誌 つなぐ 04 Spring: 2-3, 2017
16. 松村剛, 荒木栄一: 2. 成因と治療 3) マクロファージ. 糖尿病 60:481-484, 2017
17. 松村剛, 荒木栄一: 5. ペマフィブラートに適した病態: どのような患者が適しているのか. Progress in Medicine 37:1047-1050, 2017
18. 荒木栄一: Islet/Incretin Selected Papes 2017/4-2017/7. Islet Equality 6:24-27, 2017
19. 荒木栄一: 糖尿病病態の分子生物学的解析と新規糖尿病治療法開発への応用. 日本医師会雑誌 146:1845-1849, 2017
20. 阪口雅司, 荒木栄一: 特集/激増する糖尿病の診療最前線 糖尿病診断の進め方. 臨床と研究 96:7-14, 2018
21. 近藤龍也, 荒木栄一: 微弱電流と温熱刺激による新規糖尿病治療. 糖尿病研究の“いま”と治療の“これから” 実験医学増刊. Vol. 35, No. 2(増刊), pp163-168, 羊土社, 東京, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 栄一 (ARAKI, Eiichi)
 熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 10253733