

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20174

研究課題名(和文) エストロゲンによる脂肪細胞の褐色化を介した代謝恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Estrogen-mediated regulation of energy balance via adipocyte beiging

研究代表者

上田 和孝 (Ueda, Kazutaka)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60375798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、閉経後女性が肥満をきたすメカニズムについて、動物モデルを用いて検討した。エストロゲン受容体rapid, non-genomicシグナル特異的ブロックマウスは、野生型マウスに比べ体重増加をきたし、自発的活動性と熱産生が低下し、白色脂肪組織の褐色化(ベージュ化)が抑制されており、脳視床下部において脱リン酸化酵素であるPP2Aの活性が低下していた。本マウスにPP2A活性化薬を脳室内投与すると肥満が改善した。以上から、エストロゲン受容体rapid, non-genomicシグナル経路が、中枢神経系のPP2Aの活性化を介してエネルギー代謝に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A novel knock-in mouse line with the selective blockade of the membrane-initiated estrogen receptor (ER) pathway was employed, and we found that the lack of this pathway precipitated excessive weight gain and glucose intolerance independent of food intake, and that this was accompanied by impaired adaptive thermogenesis and reduced physical activity. Notably, the central activation of protein phosphatase (PP) 2A improved metabolic disorders induced by the lack of membrane-initiated ER signaling. Furthermore, the anti-obesity effect of estrogen replacement in a murine menopause model was abolished by central PP2A inactivation. These findings define a critical role for membrane-initiated ER signaling in metabolic homeostasis via the central action of PP2A.

研究分野：循環器内科学

キーワード：エストロゲン 中枢神経系 肥満

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

1. エストロゲン受容体 "rapid, non-genomic" シグナル特異的ブロッカマウスの樹立

エストロゲン受容体(estrogen receptor, ER)は核内移行により遺伝子発現を制御する"genomic"なシグナル伝達機構が従来より知られていたが、近年細胞膜に近接する ER を介するシグナル伝達機構が存在し、核内移行を伴わない ER の"rapid"あるいは"non-genomic"シグナルとして注目されている。

申請者は、エストロゲン研究で世界をリードする米国タフツ大学 Dr.Karas の研究室において、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により rapid シグナルが非常に多くの遺伝子発現制御に関与すること(Moens, Ueda et. al. Circulation 2012)、rapid シグナルが血管平滑筋細胞の増殖に関与することを報告し(Ueda et. al. ATVB 2013)、これらの成果等から rapid シグナルの役割は一層注目されてきている(Ueda and Karas. Steroids 2013)。

申請者は rapid ER α シグナルの活性化に不可欠な分子 striatin に注目し(Lu, Karas et.al. PNAS 2004)、アミノ酸配列を組み替えた mutation ER α (231K/234R/ 235R \rightarrow A)において striatin との相互作用が阻害され rapid シグナルが消失することを細胞実験で見出した(未発表)。さらに申請者は全ての ER α を mutation ER α に置換した新規の遺伝子改変マウス(KRR-KI マウス)を樹立し、rapid ER α シグナルの役割を直接的に検討することを世界で初めて可能にした(未発表)。

2. エストロゲンシグナルによるエネルギー代謝制御と「褐色化 ("browning")」の関係

女性の肥満頻度は閉経後に急速に増加する。エストロゲン受容体(ER α)ノックアウトマウスは肥満をきたすことから、エストロゲンがエネルギー代謝に深く関与することが強く示唆される。エネルギー代謝において熱産生は重要な役割を果たす。非運動時の熱産生の主体は脂肪組織であり、特に「褐色」脂肪組織が主役であると考えられてきたが、近年「白色」脂肪組織にも褐色脂肪様の形態的・機能的特徴を持つ成分が存在し、熱産生やエネルギー代謝に関与するという報告がなされ、白色脂肪細胞の「褐色化("browning")」と呼ばれ、大変注目されている。

申請者は予備検討において、KRR-KI マウスが顕著な肥満を生じることを見出すとともに、白色脂肪組織において browning した細胞に特徴的に発現する UCP-1 の発現レベルが、野生型マウスに比べ著明に低下していることを見出した。これは ER α rapid シグナルが browning を介して代謝恒常性維持に関わる可能性を示す重要な表現型と考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究はエストロゲン受容体 rapid シグナル経路と代謝恒常性制御の関係を主に熱産生メカニ

ズムに注目して明らかにし、安全で効果的な抗肥満・糖尿病薬の開発へ繋がる基盤となる研究とすることを目的とした。具体的には以下のことを明らかにする。

①.KRR-KI マウスの肥満形成の成因としての熱産生の重要性を、直腸温、摂食量、運動量、酸素消費量、脂肪・筋肉量比の測定から明らかにする。

②.KRR-KI マウスの肥満形成と browning の関係を、寒冷管理下の直腸温変化による熱産生能測定、白色脂肪(内臓・皮下)・肩甲骨下褐色脂肪の各組織の重量比率や褐色脂肪マーカーの発現量を比較して明らかにする。

③.エストロゲン刺激による browning 作用を細胞レベルで検討する。培養脂肪前駆細胞 3T3-L1 と摘出脂肪組織由来の初代脂肪細胞を用いて、エストロゲンによる browning マーカーの発現量の比較、ChIP-IP アッセイによる UCP-1 の発現増加と ER α の核内移行の関連を検討する。

④.遺伝子改変に伴う代謝異常が、生体の閉経後にも同様に生じているのかを明らかにするために、疑似閉経モデルである卵巣摘出後マウスの肥満形成における browning の関与を、同じく寒冷管理下の直腸温変化による熱産生能測定や、各脂肪組織における重量比率や褐色脂肪マーカーの発現量測定を行い明らかにする。

⑤.rapid シグナルにおける重要な標的分子を見出し、それを制御する薬剤を用いて、エストロゲンシグナル異常に伴う代謝異常を改善できるのかを、KRR-KI マウスや卵巣摘出後野生型マウスにおいて検討する。

3. 研究の方法

① 代謝恒常性維持におけるエストロゲン rapid シグナルの役割の解明

(1) KRR-KI マウスの摂取/消費エネルギーバランスの検討

申請者の行った予備検討により KRR-KI マウスは野生型マウスに比べ1日当たりの食餌摂取量に差が無く、KRR-KI マウスの体重増加はエネルギーの摂取量ではなく消費量の違いによる事が示唆された。エネルギー消費は、活動量と基礎代謝量によって規定される。本研究ではまず、赤外線センサーを用いてケージ内のマウスの動きをとらえて数値化しマウスの自発的な活動量を定量し比較した。また、当施設が所有する呼吸代謝測定装置を用いてマウスの総エネルギー代謝量を比較した。さらに、当施設が有する CT スキャンを用いて骨格筋量および体脂肪量を比較した。

KRR-KI マウスは野生型マウスと比べ活動量が優位に低下していたことから、マウスの活動性を制御する脳神経系ネットワークに rapid シグナルが関わっている可能性があると考えられるため、脳幹視床下部における rapid シグナルの役割について、プロテインカイネーゼアレイを用いて網羅的に検討した。

(2).KRR-KI マウスの肥満形成と browning の関係の検討

KRR-KI マウスと野生型マウスの間で、熱産生能(Thermogenesis)の違いを検討するために、マウスを 4°Cの冷環境に置いて直腸温の経時的変化を比較したところ、熱産生能においても KRRKI マウスで有意に低下していた。さらに白色脂肪(内臓・皮下)・肩甲骨下褐色脂肪の各脂肪組織において、熱産生を司る uncoupling protein 1 (UCP-1)の発現量を mRNA およびタンパクレベルで比較した。室温管理下の KRR-KI マウスの白色脂肪細胞内の UCP-1 の mRNA・タンパク発現量は野生型に比べ有意に少ないことが見いだされた。組織染色により脂肪細胞の肥大の程度を脂肪標本の面積を計測して比較した。browning 細胞は褐色脂肪細胞様の多胞性をきたすため、視覚的に browning 細胞の発現量の比較を行った。さらに UCP-1 の免疫染色で browning 細胞で UCP1 の発現が亢進しているのかを検討した。

② Browning を制御する生体内分子の同定

(1).エストロゲン刺激による browning 作用の細胞レベルでの検討

ER α rapid シグナルがいかんして browning を制御しているかを検討するために、培養脂肪前駆細胞 3T3-L1 と摘出脂肪組織由来の初代脂肪細胞を用いて、エストロゲン刺激による browning マーカーの発現量を比較する。

(2).browning と ER α の核内移行の関係性の検討

UCP-1 プロモーターと ER α において ChIP-IP アッセイを行い、UCP-1 発現増加に genomic シグナルが関与しているのかについて、現在検討中を進めている。

③ エストロゲンシグナルの選択的制御によるより効果的で副作用の少ない抗肥満・糖尿病薬剤の開発

(1).卵巣摘出後マウスの肥満形成における browning の関与の検討

遺伝子改変に伴う代謝異常が、生体の閉経後にも同様に生じているのかを明らかにするために、閉経モデルである卵巣摘出後マウスにおいて、同じく寒冷管理下の直腸温変化による熱産生能測定や、各脂肪組織における重量比率や褐色脂肪マーカーの発現量測定を行った。

(2).中枢神経系における PP2A 制御による肥満改善効果の検討

中枢神経系における rapid シグナルの作用は、PP2A を介していることを見出した。PP2A の活性化薬(FTY720)は Fingolimod として多発性硬化症の治療にすでに臨床応用されている。本薬剤を脳室内投与することで、KRRKI マウスの体重増加が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

KRRKI マウスの成長過程を観察すると、顕著な体重増加と耐糖能異常が認められた。CT スキャンによる検討で、本マウスにおける体重増加は、主に皮下脂肪や内臓脂肪といった、白色脂肪組織の増大に伴うものであることが明らかになった。エネルギーの体内蓄積はエネルギーの摂取量と消費量のバランスにより規定されるが、KRR-KI マウスは野生型マウスに比べ1日当たりの食餌摂取量に差が無いことが確認された。このことは KRR-KI マウスの体重増加は、エネルギー消費量の違いによって生じたものであり、エネルギー摂取量の違いによるものではないことを示唆している。一方消費エネルギーは、活動量と基礎代謝量によって規定されるが、代謝チャンバーを用いて検討を重ねたところ、本マウスにおいてはエネルギー消費と自発的活動性のいずれもが低下していることが明らかとなった。

非運動性のエネルギー消費は熱産生能によって規定される。我々は、本マウスは室温下での体温が低下しており、寒冷環境での熱産生能も大きく低下していることを見出した。本来、白色脂肪組織はエネルギー貯蓄の役割を持ち、褐色脂肪組織はエネルギーを消費し熱産生を生じる役割を持つとされるが、若年時や寒冷刺激時には白色脂肪において褐色脂肪様の性質を持つ成分が出現し、褐色脂肪と同様に熱産生を生じることが分かり、白色脂肪の褐色化(browning)として知られ、注目されている、興味深いことに、本マウスにおいては内臓白色脂肪における browning の遺伝子マーカーである UCP-1 の発現が顕著に低下していることが分かった。Browning を促進する主要な経路の一つとして中枢神経系からの交感神経シグナルの興奮が、神経伝達物質であるノルアドレナリンを介して脂肪細胞の β_3 受容体を刺激し、脂肪細胞内の CREB のリン酸化を増加させる機序が知られている。KRRKI マウスの白色脂肪組織においてはこの CREB のリン酸化が明らかに低下していることが分かった。この結果を受けて、交感神経から白色脂肪組織への褐色化刺激の入力が低下している可能性を考えさらに検討を進めた。

哺乳類の熱産生能や自発的活動性の制御には脳視床下部が深く関わっていることが知られている。今回我々は、リン酸化キナーゼアレイを用いた網羅的な検討で、本マウスの視床下部組織において複数のキナーゼのリン酸化が増加しており、中でも、エネルギー代謝異常と深く関わる AMPK や Akt といったキナーゼのリン酸化が増加していることを見出した。さらに本マウスにおいては、主要なホスファターゼである PP2A の活性が低下していることが分かった。KRRKI マウスの肥満形成メカニズムにおける視床下部での PP2A 活性化の役割について検討するために、PP2A の活性化剤(FTY720)を KRRKI マウスに脳室内投与する検討を行った。その結果、FTY720 の脳室内投与によって、視床下部における Akt や AMPK のリン酸化が抑制されるとも

に、エネルギー代謝や自発的活動性が改善し、肥満と耐糖能異常が著明に改善した。

最後に、ヒトにおける閉経後の肥満形成に中枢の PP2A がどのように関わっているのかを検討するために、マウスの卵巣摘出モデルを用いて検討した。雌マウスの卵巣を摘出し、さらに高脂肪食を負荷すると、体重は著しく増加し、耐糖能異常をきたすが、主要なエストロゲンであるエストラジオールを皮下投与すると、体重の増加と耐糖能異常は大きく抑制された。ところが、このエストラジオールを投与したマウスの脳室内に、PP2A の阻害剤であるオカダ酸(okadaic acid)を投与すると、エストロゲンの体重減少効果のほとんどが消失することが判明した。このことは、エストロゲンによる抗肥満効果には PP2A の活性化が不可欠であることを示している。

本研究から、エストロゲンによるエネルギー代謝機構として、視床下部における ER α の rapid,non genomic シグナル経路が重要な役割を果たしており、その中でも rapid シグナルによって活性化される PP2A が AMPK や Akt のリン酸化を抑制することでエネルギー代謝を制御している可能性が示された。

肥満と、肥満に引き続き起こる糖尿病等の各種代謝疾患は、虚血性心疾患や脳卒中といった動脈硬化性疾患の発症進展と密接に結びついており、人々の生活の質(QOL)や健康寿命を損なう主要な原因の一つとなっているだけでなく、昨今の医療費の急激な増大にも影響している。肥満予防は高齢者の健康長寿の実現に重要であり、安全で効果的な肥満予防・治療法の開発が期待される。しかし、肥満治療は依然として食事制限や運動療法などに限定されており、減量できない人も多い。そのため、肥満に対するこれまでにない新しいアプローチが必要である。エストロゲンと肥満の関係については以前から注目されていたが、閉経後に女性ホルモンの補充療法を行うことで心血管病が減少するか検討した試験では、補充療法群で乳がんや血栓症の増加が認められてしまうという、歓迎できる結果ではなかった。副作用を最小限にし、効果を最大に上げる為には、女性ホルモンの生体に与える影響についてより正確に把握する必要がある。

肥満は虚血性心疾患や脳卒中等の動脈硬化性疾患の発症や進展に密接に結びついており、人間の健康長寿の実現のために、安全で効果的な肥満予防・治療法の開発が期待されている。エストロゲンと肥満の関係については以前から注目されているが、エストロゲンの作用は非常に多岐にわたり、一部は人体に悪影響を及ぼす可能性も懸念されているため、まだ臨床応用は実現されていない。本研究によって明らかになった結果をもとに、閉経後女性における、より効果的で副作用の少ない肥満改善薬の開発に繋がることが期待できる。

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 3 件)

Kazutaka Ueda, Eiki Takimoto, Qing Lu, Panyen Liu, Nobuaki Fukuma, Yusuke Adachi, Ryo Suzuki, Shengpu Chou, Wendy Baur, Mark J. Aronovitz, Andrew S. Greenberg, Issei Komuro, and Richard H. Karas Membrane-initiated Estrogen Receptor Signaling Mediates Metabolic Homeostasis via Central Activation of Protein Phosphatase 2A *Diabetes*, in press 査読有

Lu Q, Schnitzler GR, Vallaster CS, Ueda K, Erdkamp S, Briggs CE, Iyer LK, Jaffe IZ, Karas RH. Unliganded estrogen receptor alpha regulates vascular cell function and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 442, 12-23, 2017 査読有

Lu Q, Schnitzler GR, Ueda K, Iyer LK, Diomedede OI, Andrade T, Karas RH. ER Alpha Rapid Signaling Is Required for Estrogen Induced Proliferation and Migration of Vascular Endothelial Cells. *PLoS One*. 11(4):e0152807, 2016 査読有

[学会発表](計 1 件)

上田和孝 第 53 回臨床分子医学会学術奨励賞(YIA) エストロゲン受容体 Rapid, non-genomic 経路による代謝恒常性の制御 (学会賞受賞講演) 2016.4.15 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田和孝(UEDA, Kazutaka)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号:60375798

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

瀧本英樹(TAKIMOTO, Eiki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20709513

(4)研究協力者

なし