

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09826

研究課題名（和文）テトラヒドロピオプテリンの褐色脂肪分化・増殖への関与因子の解明と移植医療への応用

研究課題名（英文）Role of tetrahydrobiopterin in differentiation and proliferation of brown adipose tissue and application of transplantation therapy

研究代表者

藤田 義人 (Fujita, Yoshihito)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50547809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：テトラヒドロピオプテリン（BH4）は、褐色脂肪組織（BAT）の分化制御因子として知られる一酸化窒素やノルアドレナリンの合成に必須の共因子である。本研究ではBH4のBATの分化に与える影響について検討した。BH4の産生能が低下したhph-1マウス及び対照マウスを用い、新生児期のBATを比較した所、hph-1マウスのBAT重量は小さく、熱産生が低下していた。hph-1由来前駆脂肪細胞では、BH4投与により分化能が回復した。さらに、妊娠hph-1マウスへのBH4を投与した検討では、BH4非補充群に比べ、新生児のBAT機能が改善し、成長後の高脂肪食下での耐糖能の悪化や体重増加が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BH4は胎児期のBATの分化に関与し、母体への補充療法は、子の糖・エネルギー代謝に有益な持続的効果をもたらす可能性が示された。本研究の結果は、BH4が、BATの成熟・分化のピークを迎える妊娠後期から出生時におけるBATの分化を制御するだけでなく、成獣期の過栄養環境におけるエネルギー代謝の適応機構にも影響を及ぼすことを示している。胎児期の種々の子宮内の環境要因は将来の生活習慣病の発症と関連するとされるが、現在までに、有効な介入手法は見出されていない。BH4投与によるBATの制御は肥満症及び糖尿病の発症を予防する、先制医療の標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Tetrahydrobiopterin (BH4) is an essential co-factor of tyrosine hydroxylase, a rate-limiting enzyme of catecholamine biosynthesis including norepinephrine, and nitric oxide synthase. We investigated the role of BH4 in the differentiation of BAT using a mouse model of BH4 deficiency. Hph-1 neonatal mice exhibited dysplasia of BAT as well as attenuated thermogenesis-related gene expressions. We next evaluated the direct effect of BH4 in brown adipocyte differentiation using brown pre-adipocytes isolated from control and Hph-1 mice. Brown pre-adipocytes from Hph-1 mice reduced differentiation capacity, and BH4 supplementation in brown pre-adipocytes from Hph-1 mice ameliorated differentiation capacity. Maternal BH4 supplementation ameliorated dysplasia of neonatal BAT and thermogenesis-related genes. Intriguingly, offsprings of maternal BH4 supplementation groups had less weight gain, improved glucose intolerance, and sustained cold tolerance after growth under high fat chow diet.

研究分野：糖尿病学

キーワード：褐色脂肪組織 一酸化窒素 先制医療 肥満症 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満人口は世界的に増加の一途をたどっており、この肥満の助長はインスリン抵抗性の増悪をもたらし、2型糖尿病発症の大きな要因となる。日本においても2型糖尿病患者に占める肥満の合併頻度は飛躍的に増加している。褐色脂肪組織(Brown adipose tissue; BAT)はエネルギー代謝を促進する臓器であり、ミトコンドリアを豊富に含んでおり uncoupling protein 1 (UCP1) を介した呼吸により熱産生を促す。BAT はヒト成人においても存在意義が明らかとなり、BAT の組織量が多い人ほど BMI や血糖値が低いなどの相関が示されたことから、新たな肥満症・糖尿病の治療標的として注目が集まっている。しかし、現時点においては BAT を糖尿病・肥満症治療に臨床応用する方法は開発されていない。

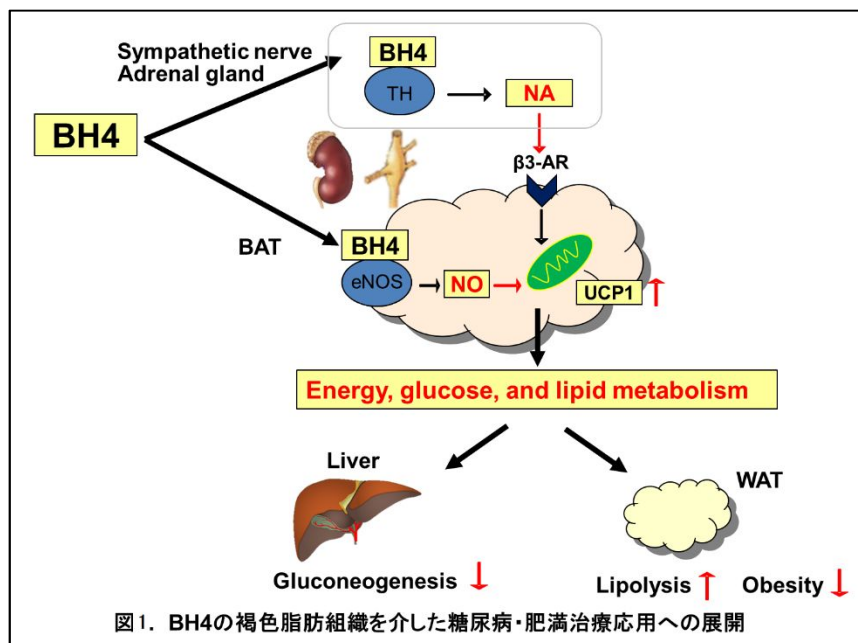
テトラヒドロビオプテリン(BH4)は、endothelial nitric oxide synthase (eNOS)やカテコラミン合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH)などの補酵素として作用する。eNOS 活性について、BH4 は eNOS 作用が安定して発揮するために必須である 2 量体構造の維持に関与している。肥満やインスリン抵抗性など酸化ストレス環境下では、BH4 の作用不足(BH4 の合成障害、BH4 の酸化による BH2 への転換)が起こり eNOS 機能障害を引き起こす。これまでに、申請者らは糖尿病状態では BH4 の作用不足による eNOS 機能障害が起こっており、BH4 が eNOS を介して肝臓糖新生の抑制作用をもたらすこと(Diabetes, 2013)を明らかにしてきた。BAT 機能の制御因子として、eNOS 由来の NO によるミトコンドリア生合成への関与や、ノルアドレナリン(NA)刺激による β -adrenergic receptor を介した活性化作用が知られている。BH4 は NO および NA の合成に深く関与しているにもかかわらず、BH4 の BAT 機能への関与については報告されていなかった。

本研究者らは BH4 の合成律速酵素である GTP cyclohydrolase I (GTPCH I)の発現が低下している BH4 欠乏マウスモデルを用いて BAT 機能への関与を検討した。BH4 欠乏マウス(hph-1 マウス)は耐糖能障害・インスリン抵抗性を有し、高脂肪食により肥満が誘発されるといった特徴を有していた。BAT に関して、このマウスは基礎代謝量・直腸温が低下し、褐色脂肪細胞の脂肪滴の肥大、ミトコンドリアの数の減少および形態異常(クリスタ構造の破壊、融合異常)を認めた。

BH4 による糖・エネルギー代謝制御機構に関して、つい最近申請者らは BAT が大きな役割を果たしている根拠となる重要な所見を得た。バックグラウンドマウス由来の褐色脂肪組織をマウスの内臓脂肪組織に移植したところ、高脂肪食による体重増加および内臓脂肪の蓄積の抑制、血糖値の低下を認めた。一方、hph-1 マウス由来の褐色脂肪組織を hph-1 マウスの内臓脂肪組織に移植しても、これらの表現型に影響はなかった。これらの所見は、BH4 が BAT 機能を介した肥満症・糖尿病の治療標的となる可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、この BH4 が BAT を介し糖・エネルギー代謝調節機構を制御している予備的検討の所見を踏まえ、BH4 による BAT の分化・増殖制御機序を解明する。さらに、BH4 を用いて BAT を標的とした肥満・糖尿病治療に対する移植・再生医療への応用を目指す(図 1)。



3. 研究の方法

(1) BH4 は、GTP cyclohydrolase I (GTPCH I)を合成律速酵素として生体内で合成される。BH4 欠乏マウス (hph-1 マウス)を用いて BAT 機能を解析した。

(2) BH4 欠乏マウスは、BAT の機能障害のみならず、褐色脂肪細胞の形態学的異常も観察されている。褐色脂肪細胞の分化誘導に BH4 が関与する可能性があり、マウス不死化前駆褐色脂肪細胞を用いて、BH4 曝露による褐色脂肪への分化・誘導への影響について調べた。

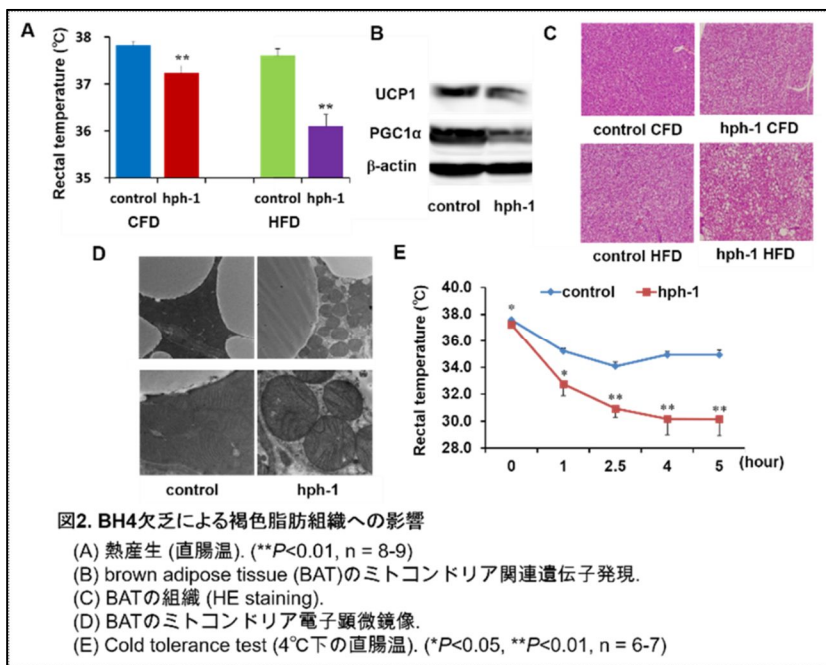
(3)hph-1 マウス及びバックグラウンドマウスを用い、新生児期の BAT 重量や機能について、熱産生遺伝子の発現やサーモグラフィ を用いた体表温の測定を行い比較した。

(4) 妊娠 hph-1 マウスへの妊娠後期の BH4 投与による、仔の出生後の BAT 機能や直腸温、糖・エ

エネルギー代謝への影響（グルコース負荷試験やインスリン負荷試験、基礎代謝及び体重測定）を評価した。

4. 研究成果

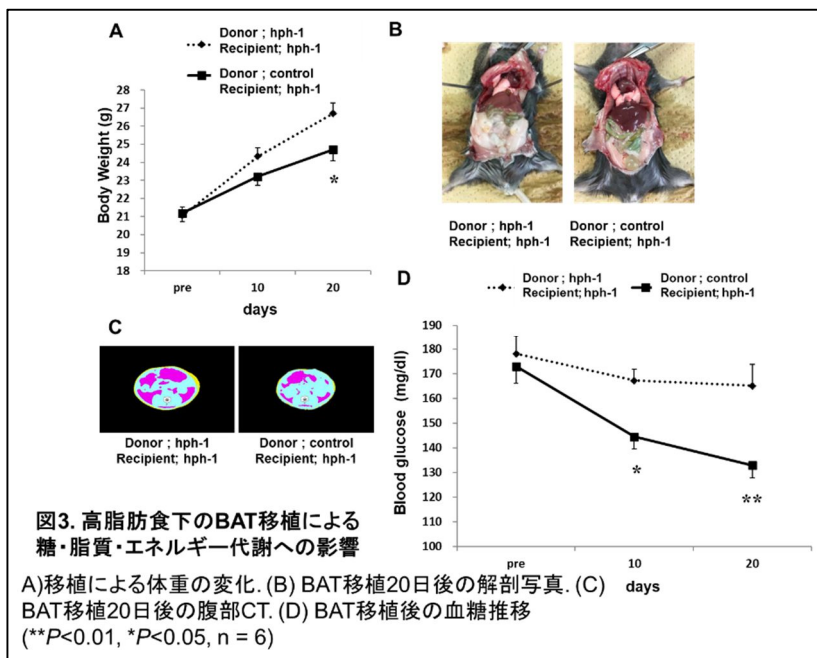
(1) hph-1 マウスおよびバックグラウンドマウスに対し通常食または高脂肪食負荷を行ったところ、高脂肪食負荷により hph-1 マウスでは体重ならびに脂肪蓄積の顕著な増加が観察された。また、hph-1 マウスは耐糖能異常ならびにインスリン抵抗性を呈していた。hph-1 マウスは深部体温およびエネルギー消費量の低下を認め、BAT における脂肪蓄積、ミトコンドリア密度の低下に加え、脱共役タンパク質である UCP1 等の熱産生関連遺伝子発現の低下が観察された(図2)。hph-1 マウスに対し BH4 を 10 日



間連続で腹腔内投与することにより、深部体温の上昇ならびに耐糖能異常の改善が確認された。これらの結果により、BH4 の欠乏は BAT 機能障害および全身の代謝障害の病因となることが示された。

BH4 による全身の代謝制御機構に対し、BAT がどの程度役割を果たしているかどうかを明らかにするために、BAT 移植術による検討を行った。BH4 欠乏マウス (hph-1 マウス) に BH4 正常マウス (バックグラウンドマウス) 由来の BAT を移植したところ、BH4 欠乏マウス由来の BAT 移植と比較して、熱産生能の回復の程度が大きく、脂肪蓄積の減弱、耐糖能異常およびインスリン抵抗性の改善が顕著に認められた。さらに、BH4 正常マウス由来の BAT 移植により、肝臓における糖新生の亢進および脂肪蓄積が抑制された。これらの結果より、BAT は BH4 による全身の代謝制御機構に中心的な役割を果たしていることが示された(図3)。

hph-1 マウスでは BAT における NA および NO 量の減弱が観察された。次に BH4 の褐色脂肪細胞に対する直接作用について検討した。単離褐色脂肪細胞に対し BH4 を曝露したところ、UCP1 等の遺伝子発現ならびに NO 産生量の増加を認めた。BH4 の曝露により酸素消費速度の上昇が観察され、脱共役作用の増大が認められた。BH4 による UCP1 等の活性化作用は、NOS 阻害剤により消失した。BH4 の投与により野生型マウスの BAT では NO



量が増加したが、血管内皮型 NOS (eNOS) 欠損マウスの BAT では NO 量の増加が認められなかった。以上の結果より、BH4 の BAT 活性化作用には NA および NO が関与し、特に褐色脂肪細胞への直接作用については eNOS 由来の NO が関与することが示唆された。

本研究により、BH4 の欠乏が BAT の機能障害を誘発し、肥満の進展、インスリン抵抗性ならびに耐糖能異常の発症に関与することを明らかにした。BH4 は BAT 機能を介して、全身の糖・エネルギー代謝を制御しており、肥満症や糖尿病の治療ならびに発症予防の標的となる可能性がある。これらの研究成果について、論文発表した(Y. Oguri, Y. Fujita, A. Abudukadier, A.

Ohashi, T. Goto, F. Furuya, A. Obara, T. Fukushima, N. Matsuo, M. Kim, M. Hosokawa, T. Kawada, H. Hasegawa, N. Inagaki. Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism. *JCI Insight*. 9: 91981. 2017.)。

(2) 褐色脂肪細胞の初代培養系において、hph-1 マウス由来の細胞はバックグラウンドマウス由来の細胞に比べ、脂肪滴の蓄積障害や熱産生関連遺伝子の発現低下を認めた。hph-1 由来の不死化褐色脂肪前駆細胞を用いた検討では、BH4 の補充により分化能が回復し、その効果は NO 依存性であった。

(3) 新生仔期の hph-1 マウスの BAT 重量は、バックグラウンドマウスの BAT に比べ小さく、UCP1 や Dio2 を代表とする熱産生関連遺伝子の発現や体表温の有意な低下を認めた。また組織像において、hph-1 マウスの BAT では低形成を起こしている可能性が示唆された。

(4) hph-1 妊娠マウスへの BH4 の母体補充により、新生仔マウスの BAT 機能及び重量が改善した。さらに、成長後も BH4 非補充群に比べ高脂肪食下での体重増加・内臓脂肪蓄積が有意に抑制され、グルコース負荷試験による血糖上昇の有意な抑制やインスリン負荷試験による血糖低下効果の改善傾向を認めるなど、糖・エネルギー代謝の表現型の改善を示した。BH4 は胎児期の BAT の分化に関与することが示された。母体への BH4 投与による BAT の制御は、肥満症・糖尿病の発症を予防する、先制医療の標的となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mano Fumika, Ikeda Kaori, Joo Erina, Fujita Yoshihito, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Inagaki Nobuya	4. 巻 10
2. 論文標題 The Effect of White Rice and White Bread as Staple Foods on Gut Microbiota and Host Metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1323 ~ 1323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu10091323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oguri Yasuo, Fujita Yoshihito, Abudukadier Abulizi, Ohashi Akiko, Goto Tsuyoshi, Furuya Futoshi, Obara Akio, Fukushima Toru, Matsuo Naomi, Kim Minji, Hosokawa Masaya, Kawada Teruo, Hasegawa Hiroyuki, Inagaki Nobuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 91981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.91981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Minamino Hiroto, Katsushima Masao, Yoshida Tamami, Hashimoto Motomu, Fujita Yoshihito, Shirakashi Mirei, Yamamoto Wataru, Murakami Kosaku, Murata Koichi, Nishitani Kohei, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Inagaki Nobuya, Matsuda Shuichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Increased circulating adiponectin is an independent disease activity marker in patients with rheumatoid arthritis: A cross-sectional study using the KURAMA database	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Hiroshi, Nishikawa Yoshikazu, Fukushima Toru, Taniguchi Ataru, Fujita Yoshihito, Tsuda Kinsuke, Inagaki Nobuya, Hosokawa Masaya	4. 巻 9
2. 論文標題 Lipopolysaccharide inhibits hepatic gluconeogenesis in rats: The role of immune cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 494 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Furuya F, Fujita Y, Matsuo N, Oguri Y, Minamino H, Ikeda K, Harashima S, Wang Y, Liu Y, Inagaki N
2. 発表標題 The Different Effects of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor on Obese Diabetic Mice Fed a Normal or Low-Carbohydrate Diet.
3. 学会等名 ADA 78rd scientific sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujita Y, Sakurai N, Ikeda K, Mano F, Furuya F, Shibata D, Ara T, Matsuo N, Oguri Y, Minamino H, Isomura N, Goto T, Matsumura Y, Kawada T, Inagaki N.
2. 発表標題 Development of biomarkers of macronutrient intake by integrated analysis of metabolome data in both human samples and food compositions.
3. 学会等名 12th IDF-WPR CONGRESS & 10th AASD Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷 太志、藤田 義人、松尾奈緒美、小栗 靖生、南野 寛人、王 宇、劉 彦言、池田 香織、原島 伸一、稲垣 暢也。
2. 発表標題 SGLT2阻害薬の肝臓における代謝動態への影響および効果 発現に寄与する因子の解明。
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 義人、櫻井 望、池田 香織、古谷 太志、柴田 大輔、荒 武、真能英美香、松尾奈緒美、小栗 靖生、南野 寛人、松村 康生、河田 照雄、稲垣 暢也。
2. 発表標題 メタボローム解析を用いたマクロ栄養素摂取量を反映する バイオマーカー開発のための基礎的検討。
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷太志、藤田義人、松尾奈緒美、小栗靖生、池田香織、原島伸一、王 宇、劉 彦言、稲垣暢也
2. 発表標題 SGLT2阻害薬投与及び低炭水化物食が与える糖尿病肥満モデル動物の肝臓の糖・脂質・エネルギー代謝への影響
3. 学会等名 第4回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪制御機構に関与し全身の糖・エネルギー代謝を調節する
3. 学会等名 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Oguri, Y. Fujita, A. Abudukadier, A. Ohashi, T. Goto, F. Furuya, A. Obara, T. Fukushima, N. Matsuo, M. Kim, M. Hosokawa, T. Kawada, H. Hasegawa, N. Inagaki
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin Activates Brown Adipose Tissue and Regulates Energy and Glucose Metabolism.
3. 学会等名 American Diabetes Association 77th Scientific Sessions. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小栗靖生、藤田義人、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、松尾奈緒美、南野寛人、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンによる褐色脂肪組織の分化・誘導制御機構への関与の解明
3. 学会等名 第22回 日本肥満学会 アディポサイエンス・シンポジウム。
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 20. 藤田 義人、南野 寛人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、古谷 太志、磯村 望、河田 照雄、長谷川宏幸、稲垣 暢也
2. 発表標題 褐色脂肪組織の分化・増殖に関する因子の解明と肥満・糖尿病に対する移植医療への応用
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 49. 藤田 義人、櫻井 望、磯村 望、池田 香織、稲垣 暢也
2. 発表標題 フードミクスによるマクロ栄養素摂取に関するバイオマーカー開発
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 71. 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、河田 照雄、長谷川宏幸、稲垣 暢也
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎児期の褐色脂肪組織の分化を制御し、出生後の糖及びエネルギー代謝に関する
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 71. 南野 寛人、藤田 義人、小栗 靖生、大橋 晶子、後藤 剛、川原崎聡子、古谷 太志、磯村 望、武居 晃平、李 瀛、河田 照雄、長谷川宏幸、稲垣 暢也
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎児期より褐色脂肪組織の分化を制御し、出生後の糖・エネルギー代謝に関する
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 3.Minamino H, Fujita Y, Oguri Y, Goto T, Akiko O, Furuya F, Isomura N, Kawarasaki, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin Is Required for Brown Adipose Tissue Development and Differentiation
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 9.Fujita Y, Sakurai N, Ikeda K, Isomura N, Mano F, Furuya F, Shibata D, Ara T, Minamino H, Goto T, Matsumura Y, Kawada T, Inagaki N
2. 発表標題 Development of biomarkers of macronutrient intake by integrated analysis of metabolome data in both human samples and food compositions
3. 学会等名 METABOLOMICS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 13.Minamino H, Fujita Y, Goto H, Ohashi A, Furuya F, Isomura N, Kawarasaki S, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin Regulates Differentiation of Brown Adipose
3. 学会等名 ADA 79th Scientific Sesssions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考