

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17564

研究課題名(和文) 脂肪組織の光受容体Opsin3によるエネルギー代謝機構および脂肪・骨連関の解明

研究課題名(英文) The interactino of bone and adipose tissue metabolism via Opsin3

研究代表者

佐藤 真理 (Sato, Mari)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40546488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：光受容体Opsin3のノックアウトマウスは褐色脂肪の低活性による代謝異常により易肥満傾向を示す。細胞実験の結果から、Opsin3を介した光刺激はマウス褐色脂肪細胞の糖取り込みを上昇させることが分かった。次にOpsin3を介した骨・脂肪連関を調べるために高脂肪食にて飼育したOPN3ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、脂肪組織と骨組織の表現系を調べた。Dual Energy X-ray Absorptiometryの結果ではOPN3ノックアウトマウスの白色脂肪が有意に増加していたが、骨密度に変化は見られなかった。現在、マウス脂肪組織への光照射による脂肪および骨の変化を検索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、光刺激による褐色脂肪の活性化という新たな代謝機構が明らかとなった。メタボリックシンドロームの予防や治療の観点から、褐色脂肪の新たな活性化方法を同定したことは学術的にも社会的にも意義が大きい。さらに、ほとんどメカニズムが明らかとなっていない、骨・脂肪連関の解明に向けて光受容体Opsin3に着目したことは新たな突破口を提示するものであり学術的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Opsin3(Opn3) is one of photoreceptors and Opn3-knockout (Opn3-KO) mice showed obese phenotype due to metabolic disorder. In vitro experiments utilized murine brown adipose cells demonstrated that light stimulation through Opn3 upregulated glucose uptake. Next, bone and adipose phenotype were measured in Wylld-type (WT) and Opn3-KO mice fed with high fat diet. Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) showed that white adipose tissue volume was increased but bone volume was not changed in Opn3-KO mice compared with WT mice. Light exposure experiments of adipose tissue in WT and Opn3-KO mice are ongoing and then will analyzed the change of adipose and bone tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：Opsin3 脂肪組織 骨組織

1. 研究開始当初の背景

メカノセンサーである骨細胞を大量に埋め込んだ骨はまるで感覚臓器である。骨が感知した重力や運動刺激が神経シグナルに変換されることで、骨が遠く離れた臓器を神経を介して制御している可能性を明らかにすべく、申請者は以前、骨細胞を特異的に除去し得る遺伝子改変マウス=骨細胞除去マウス(Tatsumi et al. *Cell Metabolism* 5; 464-475; 2007)を用いて研究を行った。結果として、骨細胞が 1. 骨髄および胸腺でのリンパ球分化を制御すること 2. 全身の白色脂肪を維持しエネルギー代謝を制御すること 3. 脳中枢を一部介して肝臓の脂質代謝を制御すること を明らかにしたが、それらが神経系を介した制御であることは証明できなかった(Sato et al. *Cell Metabolism* 18: 749-758; 2013)。その後の研究により、骨髄 B リンパ球造血における Noncanonical Wnt シグナルの新たな役割を明らかにし (Sato et al. *Biochemistry and Biophysics Reports* 6: 179-184; 2016) 加えて骨細胞が血中に放出する exosome に含まれる miRNA を介して遠隔臓器を制御しうる可能性を示した (Sato et al. *Biomedical Reports*; in press: 2016)ものの、神経系を介した骨による遠隔臓器制御機構の解明には未だ迫れていない。特に、骨と脂肪が神経を介した協調により全身のエネルギー代謝を制御するかもしれないという仮説はこれまでにない斬新なものであり、挑戦的な研究テーマである。この仮説を明らかにすべく、申請者はまず、神経系による制御機構がよく理解されている脂肪組織を足がかりにして神経を介した骨と脂肪の連携による全身のエネルギー代謝制御機構の解明を目指そうとした。すなわち、脂肪を出発点として、脳を介して(または介さずに)骨へと伝わる神経伝達機構をたどりながら、骨と脂肪の連携機構を明らかにしようというものである。申請者は 2015 年から脂質代謝研究のメッカである米国ハーバード大学ジョスリン糖尿病研究所の客員研究員として Yu-Hua Tseng 博士と共に共同研究を開始している。本研究では脂肪から脳への求心性神経シグナルの候補である光刺激に着目した研究を行う。なぜなら、末梢組織から脳中枢への求心性神経は主に感覚神経であり、興味深いことに、白色、褐色脂肪が光受容体のひとつである Opsin3 を高発現しているからである(未発表データ)。哺乳類で最も有名な光受容体は網膜細胞に存在する Opsin2 とレチナルで構成されるロドプシンである。光刺激はロドプシンの構造変化をおこし G タンパクの活性化を経て細胞の膜電位を変化させ、この膜電位の変化が感覚神経である視神経を介して脳中枢に伝わる。Opsin は 5 つのファミリーを持ち、興味深いことに、Opsin3 やメラノプシンである Opsin4、ニューロプシンである Opsin5 は目以外の様々な臓器での発現が確認されている。申請者は白色および褐色脂肪組織に Opsin3 が高発現していることを既に同定しており(未発表データ) また Opsin3 ホモログを発現させたヒト腎臓細胞はレチナル非存在下で光感受性を示すとの報告 (Koyanagi et al. *PNAS* 110(13):4998-5003; 2013) があることから、脂肪組織そのものが光感受性を持つ可能性がある。本研究では、白色、褐色脂肪組織に発現する光受容体 Opsin3 による脂肪組織および全身のエネルギー代謝調節機構を明らかにし、また脂肪組織への光刺激が神経系を介して骨代謝に影響するか否かを確かめることが目的である。

2. 研究の目的

申請者は骨に埋め込まれた骨細胞が全身の白色脂肪を制御していることをこれまで明らかにし、骨と脂肪が神経を介して連携していることを示唆してきたがまだ証明には至っていない。本研究では脂肪組織に高発現する光受容体 Opsin3(OPN3)に着目し、骨と脂肪の神経を介した連携機構を解明するための足がかりとして、以下の3つを目的とした研究を行う。

脂肪組織の光受容体 Opsin3 を介した光応答メカニズムを明らかにする。

脂肪組織への光刺激が脂肪組織および全身のエネルギー代謝に与える機能的な役割を明らかにする。

脂肪組織への光刺激が求心性神経を介して骨代謝を制御するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

In vivo 実験: 1. OPN3 ノックアウトマウスの脂肪組織、骨組織、全身のエネルギー代謝の変化を調べる。2.野生型マウスおよび Opsin3 ノックアウトマウスの脂肪組織を持続的に光照射し、脂肪組織、骨組織、全身のエネルギー代謝の変化を調べる。3. 求心性神経を破壊したマウスの脂肪組織を持続的に光照射し、光照射による骨組織への影響が解除されるか否かを調べる。

In vitro 実験: 1. マウスおよびヒト白色、褐色脂肪細胞を光暴露下で培養し、ミトコンドリア活性ならびに糖取り込みの変化を調べる。2. OPN3 ノックアウトマウスの白色、褐色脂肪細胞株を樹立し、光暴露による機能変化が解除されるか否かを調べる。3. 細胞への光刺激が神経刺激となりうるかどうかを調べるために、光暴露した細胞の細胞内カルシウム濃度を測定する。

4. 研究成果

In vivo 実験：図1参照

OPN3 KO マウスは高脂肪食飼育下で、野生型 (WT) マウスにくらべて体重増加を呈し(図 1 A)、さらにインスリン抵抗性を示した(図 1 D)。摂食量には変化がなく(図 1 B)、白色脂肪の量が増加していることから(図 1 C)、糖・脂質代謝およびエネルギー代謝に異常があると考えられた。Dual Energy X-ray Absorptiometry(DEXA)測定の結果、白色脂肪は増加しているものの、骨量には変化が見られなかった。また、Comprehensive laboratory animal monitoring system (CLAMS)測定の結果、呼吸代謝および熱量には有意な差が認められなかった。このことから、OPN3 ノックアウトマウスは、代謝異常を示すものの他臓器でなんらかの補償機構が働いている可能性が示唆された。さらに、野生型マウスに光刺激を行い脂肪組織を取り出して遺伝子発現変化を調べたが、変化は見られなかった。これは光刺激の方法、条件が適切ではない可能性が高く、より効果的な方法での光刺激が必要である。現在、optogenetics 研究に用いられる光刺激装置を用いた実験を検討している。OPN3 ノックアウトマウスでは骨に関する表現系が見られないことから、脂肪組織が OPN3 を介して骨に影響を与える可能性は少ないと考えられた。さらに、前述のように光照射実験は改良が必要なため、求心性神経を破壊したマウスの実験は保留中である。

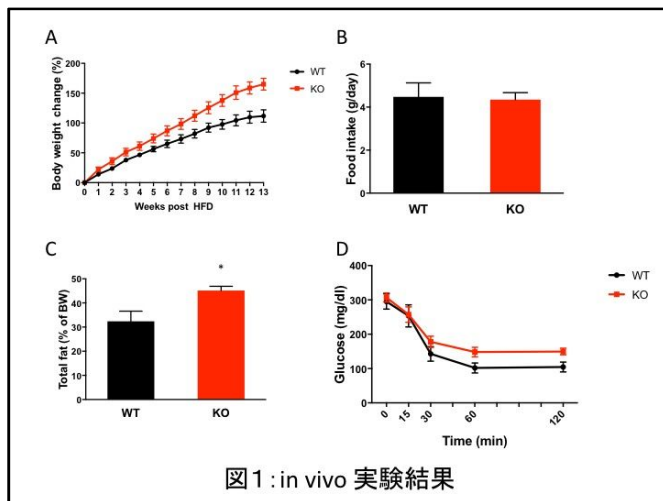


図1: in vivo 実験結果

In vitro 実験：図2、3、4参照

マウス白色・褐色脂肪細胞を光照射しながら8日間分化させて糖取り込みを測定した。するとマウス褐色脂肪細胞では、光刺激により定常状態下の糖取り込みが促進された(図 2 A)。この光刺激による糖取り込みの上昇が OPN3 を介したものであるか否かを調べるために、OPN3 KO マウス褐色脂肪細胞を用いて同様な実験を行った。その結果、光刺激による糖取り込みの上昇効果は OPN3 ノックアウトマウスでは見られなかった(図 2 B)。つまり、マウス褐色脂肪細胞では OPN3 を介した光刺激で糖取り込みが増強されることが分かった。一方、ヒト褐色脂肪細胞では光刺激による糖取り込み増強効果は見られなかった(図 2 C)。

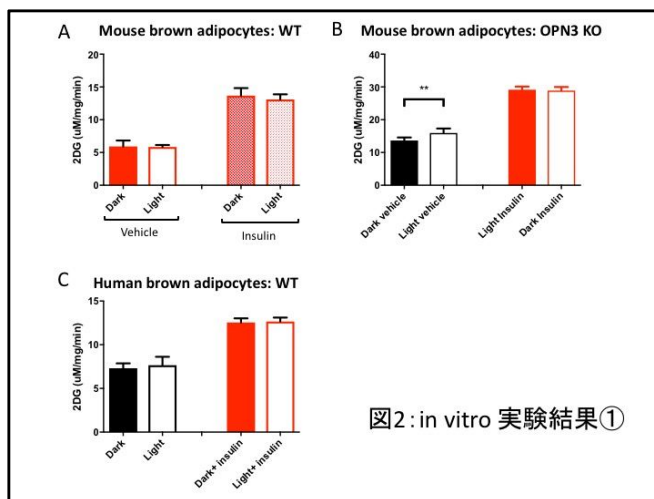


図2: in vitro 実験結果①

また、マウス褐色脂肪細胞からミトコンドリアを抽出し、ミトコンドリアの Cytochrome c のオキシダーゼ活性を測定した。すると、光刺激による活性の増強は観察されなかったが OPN3 ノックアウト褐色脂肪細胞の活性は野生型にくらべて減少していた(図 3)。このことから、OPN3 は光刺激非依存性にミトコンドリアの Cytochrome c のオキシダーゼ活性を制御していることが示唆された。これは、OPN3 が光刺激以外でも活性化されうることを示し、OPN3 の光受容体以外の機能的役割を示唆する重要な知見である。ヒト褐色脂肪細胞でも同様な表現系が見られるかを確認するため、現在 OPN3 ノックアウトヒト褐色脂肪細胞の作成中である。

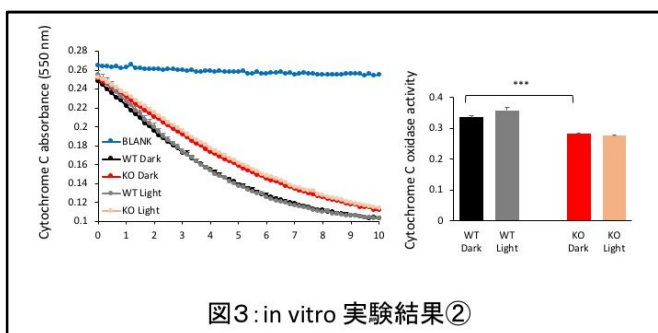


図3: in vitro 実験結果②

次に、マウス褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの酸素消費量を細胞外フラックスアナライザーを用いて測定した。これによりミトコンドリアの酸素呼吸によるエネルギー産生能力を明らかにすることができる。マウス褐色脂肪細胞は光照射にてグルコースおよび脂肪酸(パルミテート)を利用したミトコンドリアの酸素消費量が上昇した(図4A、B)。一方、OPN3ノックアウト褐色脂肪細胞では光刺激による増強効果がキャンセルされた(図4A、B)。このことから、OPN3を介した光刺激は褐色脂肪細胞においてミトコンドリアの酸化リン酸化反応を増強しエネルギー産生を活性化することが明らかとなった。

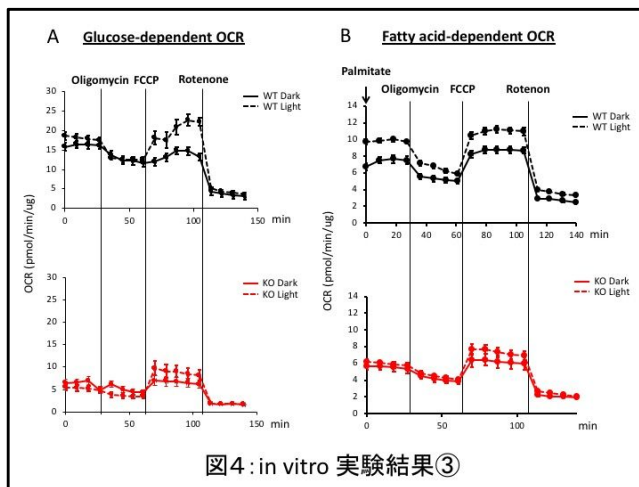


図4: in vitro 実験結果③

これらの結果から、OPN3を介した光刺激は褐色脂肪のミトコンドリア呼吸を活性化させることで全身のエネルギー代謝に関与することが明らかとなった。一方、OPN3には光刺激非依存的にミトコンドリアのCytochrome c オキシダーゼ活性を増強する経路があることが分かり、光受容体として以外のOPN3の新規役割および未知のOPN3活性化物質の存在が示唆される。OPN3ノックアウトマウスでは骨組織に関する表現系が見られなかったことから、骨と脂肪の神経を介した連携機構の解明には至っていないが、現在セットアップ中であるin vivoでの光照射実験が可能になった際には、光照射したマウスでの骨組織の表現系を再度解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

佐藤 真理、光受容体 Opsin3 による褐色脂肪の機能制御、北海道歯学雑誌、第39巻、第2号、156-157、2019年、査読無

〔学会発表〕(計2件)

佐藤 真理、Light Sensitivity of Brown Adipose Tissue、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018年9月5-7日、福岡

Mari Sato, Xiaozhi Ren, Luiz O Leiria, Chih-Hao Wang, Matthew Lynes, King-Wai Yau, Yu-Hua Tseng, Cell-autonomous light sensitivity via Opsin 3 regulates fuel utilization in adipose tissue, American Diabetes Association's 77th Scientific Sessions June 9 - 13, 2017, San Diego, California

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.den.hokudai.ac.jp/lab/seika/index/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Yu-Hua Tseng

ローマ字氏名：(Yu-Hua Tseng)

研究協力者氏名：King-Wai Yau

ローマ字氏名：(King-Wai Yau)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。