

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08470

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞における熱産生リズムの形成機構解明と制御法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of rhythm formation mechanism and treatment strategies of thermogenesis in brown adipocytes

研究代表者

安藤 仁 (Ando, Hitoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50382875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞(BA)の体内時計の病態生理学的意義を明らかにするために、BA特異的に体内時計を欠損したマウスを作製した。このマウスでは、BAにおいて脂肪酸を利用した熱産生の障害が認められ、自発運動量の増加や骨格筋のふるえによる熱産生を増加させて代償的に体温を維持していた。また、エネルギー消費量が少なく、高脂肪食負荷時には肥満が増悪した。したがって、BAの体内時計は熱産生の制御に重要であり、肥満・生活習慣病の予防・治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの様々な研究により、不規則な生活が肥満をもたらすことは明らかにされていたが、その機序は十分にはわかっていなかった。本研究はBAの体内時計は熱産生の制御に重要であり、そのため、BAの体内時計障害は肥満の一因になることを明らかにした。本研究の成果は、24時間社会で不規則な生活を送らざるを得ない人々に対する新しい肥満・生活習慣病の予防・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathophysiological role of circadian clock in brown adipocytes (BA), BA-specific clock knockout mice were generated. This strain showed impairment of thermogenesis using fatty acids and maintained body temperature by increasing shivering and behavioral thermogenesis. Moreover, the conditional knockout mice exhibited reduced energy expenditure and were more prone to diet-induced obesity. These results reveal the importance of the BA clock for controlling thermogenesis and preventing/treating obesity and related diseases.

研究分野：薬理学 内分泌代謝学 時間生物学

キーワード：肥満 生活習慣病 生体リズム 体内時計 時計遺伝子 褐色脂肪細胞 熱産生

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の肥満人口は急速に増加しており、その傾向は先進国のみならず、発展途上国にも拡大している。肥満は2型糖尿病、高血圧、心血管疾患、癌などいわゆる生活習慣病の主要な原因であるため、その予防や治療は医学的かつ社会的に極めて重要である。現在のところ、肥満を予防・治療する方法としては、安全かつ有効性の高い薬物療法はなく、一般的に食事療法と運動療法が推奨されている。しかし、これらの生活習慣を改善することは容易ではなく、簡便かつ安全に実行できる肥満対策の開発が切望されている。

哺乳類は適応熱産生によりエネルギーを熱に変え、体温を維持している。適応熱産生には骨格筋のふるえ(シバリング)によるふるえ熱産生と、交感神経を介した代謝の亢進による非ふるえ熱産生があり、非ふるえ熱産生を行う器官としては褐色脂肪細胞(BA)が知られている。BAの活性は肥満度と関連することが報告されており、BAの熱産生によるエネルギー消費は肥満に対する新たな予防・治療標的として大いに注目されている。

体温には睡眠・覚醒リズムとは独立した明瞭な日内リズムが認められ、そのリズムは視床下部の細胞内体内時計(中枢時計)により制御されていることは古くから知られていた。最近になり、体内時計はBAにも存在し機能していること、BAにおける熱産生制御因子である脱共役タンパク質1(Uncoupling protein 1, UCP1)の発現には明瞭な日内リズムを認めること、体内時計を構成する時計遺伝子 *Nr1d1* を全身性に欠損したマウスではUCP1の発現リズムが消失し、体温の日内リズムも著しく減弱することが報告された。また、時計遺伝子 *Per2* は、少なくとも寒冷暴露下のBAにおいては、UCP1の発現を増加させることも判明した。したがって、BAにおける熱産生は、BAの体内時計により直接的に制御されている可能性がある。

近年、体内時計の障害は、肥満や2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の原因になることが明らかになってきた。体内時計はそれぞれの臓器で重要な生理的役割を担っており、例えば、膵臓、肝臓、白色脂肪組織では、それぞれインスリン分泌、糖産生、脂肪細胞分化を制御している。そのため、体内時計障害時にはこれらの機能が破綻し、生活習慣病の発症につながるものと考えられている。BAにおいても、もしも体内時計が熱産生を制御しているのであれば、BAの体内時計障害は肥満の一因になる可能性がある。しかしながら、現在のところ、BAの体内時計の生理学的意義は不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、BA特異的に体内時計を欠損したマウスを作製し、その表現型を解析することにより、BAの細胞内体内時計の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

時計遺伝子 *Bmal1* に loxP 配列を組み込んだ *Bmal1*-floxed マウスと、*Ucp1* のプロモーターの制御下でDNA組換え酵素 Cre を発現するマウスを交配させることにより、BA特異的に体内時計を欠損するマウス(BA-*Bmal1* KO マウス)を作製した。マウスは室温 23°C、12時間:12時間明暗周期、自由摂餌、自由飲水下で飼育した。実験は、基本的には8から9週齢の雄性マウスを用いて行い、対照には *Bmal1*-floxed マウスを用いた。すべての動物実験は、金沢大学による実験計画の確認、承認のもと実施した。

深部体温の日内リズムの測定は、7週齢時に超小型温度データロガー(DST Nano-T)を腹腔内に留置し、その2週間後に行った。また、スーパーメックス自発運動量測定システムを用いた自発運動リズムも同時測定した。体表温度の測定は刺毛48時間後にサーモグラフィカメラ(FLIR C2)を用いて行い、筋電図の測定やオキシマックスシステムによる呼吸代謝リズムの測定も実施した。mRNA量とタンパク量はリアルタイムPCR法とウエスタンブロット法で、メタボロームはHMTシースコープでそれぞれ解析した。

4. 研究成果

BA-*Bmal1* KO マウスの褐色脂肪組織(BAT)では、24時間を通して *Bmal1* や *Nr1d1* の mRNA 発現量が減少するとともに、UCP1の発現増加を認めた。しかし、深部体温の日内リズムは対照マウスと変わりなく、休息期の開始時にはむしろ体温が低い傾向を認めた(図1)。興味深いことに、

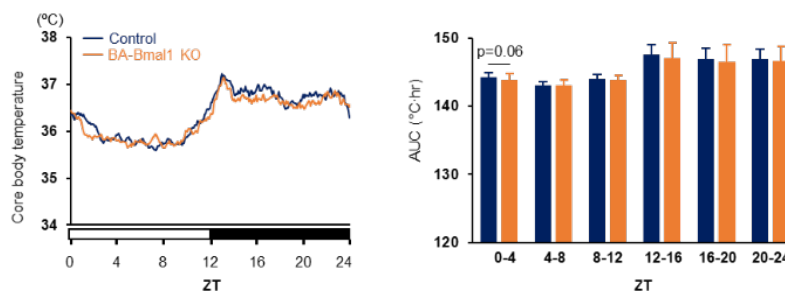


図1 深部体温の日内リズム (ZTは照明点灯後時間)

BA-Bmal1 KO マウスの自発運動量は対照マウスよりも有意に大であり、対照マウスでは深部体温と自発運動量に正の相関 ($R^2=0.369$, $p<0.001$) を認めた一方、BA-Bmal1 KO マウスでは両者に負の相関 ($R^2=0.507$, $p<0.001$) を認めた。さらに、BA-Bmal1 KO マウスではBAT 部位の体表温度が有意に低く (図 2)、筋電図ではシバリングの増加を認めた一方 (図 3)、尿中カテコラミン量は減少していた。また、BA-Bmal1 KO マウスの酸素消費量や熱産生量は、活動期の開始時には有意に低く、呼吸商は有意に高い時間帯を認めた (図 4)。呼吸商が高いことから脂肪の利用障害が示唆されたため、さらに解析を進めたところ、BA-Bmal1 KO マウスの BAT では、組織学的に脂肪の蓄積を認め (図 5)、ATGL、CPT1A、CPT2 など脂脂肪酸代謝に関連する分子の発現量低下も認めた。メタボローム解析では、BA-Bmal1 KO マウスの BAT では脂肪酸代謝の最終産物であるアセチル CoA 量が減少しており、脂肪酸と同様にアセチル CoA に変換されるケト原性アミノ酸の低下も認めた。また、ATP および ADP 含有量は著明に低下していた。BA-Bmal1 の体重は、通常食を与えた場合には対照マウスと差がなかったが、高脂肪食を負荷した場合には、摂餌量は同等であるにもかかわらず、有意に体重が増加した (図 6)。

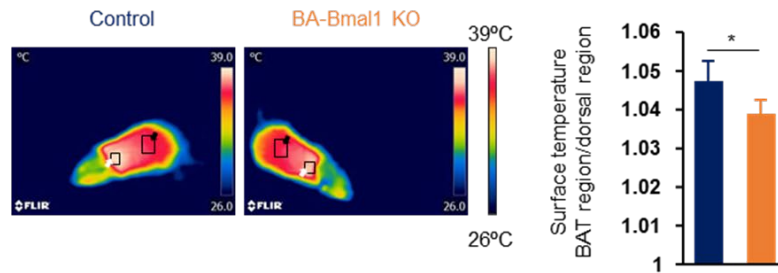


図 2 体表温度 (白矢印のBAT部分と黒矢印の背部の比で比較した)

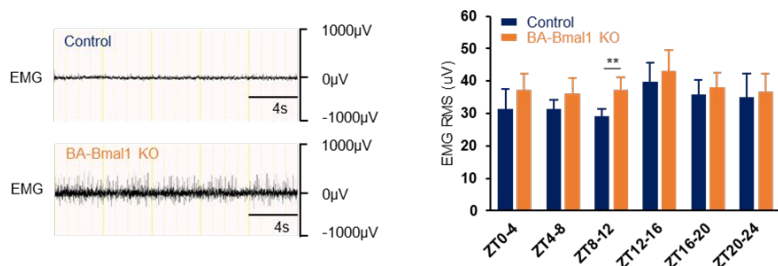


図 3 ノンレム睡眠時の筋電図 (右図はRMSの日内リズム)

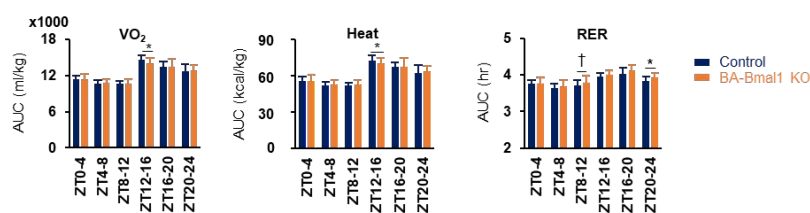


図 4 酸素消費量・消費カロリー量・呼吸商の日内リズム

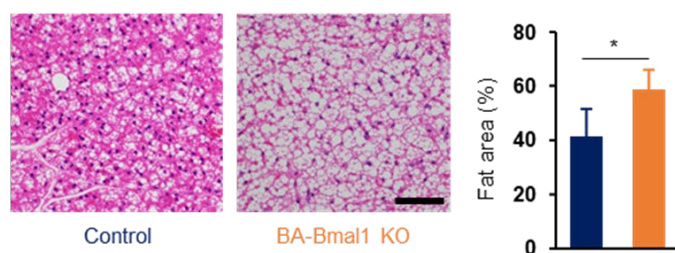


図 5 褐色脂肪組織の組織像 (右図は脂肪滴の面積の比較)

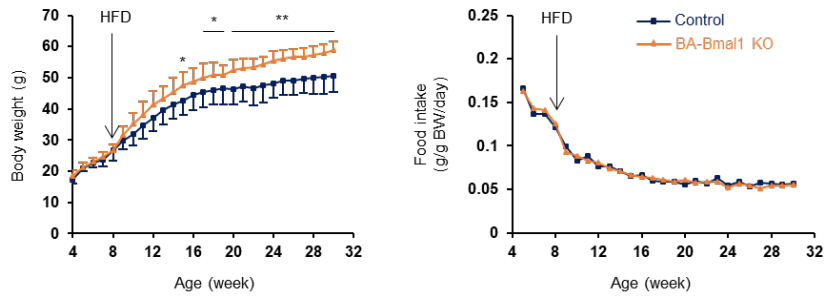


図6 体重と摂餌量の推移 (8週齢より高脂肪食を負荷した)

以上より、BA-Bmal1 KO マウスでは、BAにおいて脂肪酸の利用が障害されており、主にグルコースやアミノ酸を利用することにより熱産生を行うとともに、全身的には運動量の増加や骨格筋のシバリングにより体温を維持していることが示唆された(図7)。また、BA-Bmal1 KOの体重への影響は比較的小さいが、高脂肪食負荷時には顕性化することが判明した。

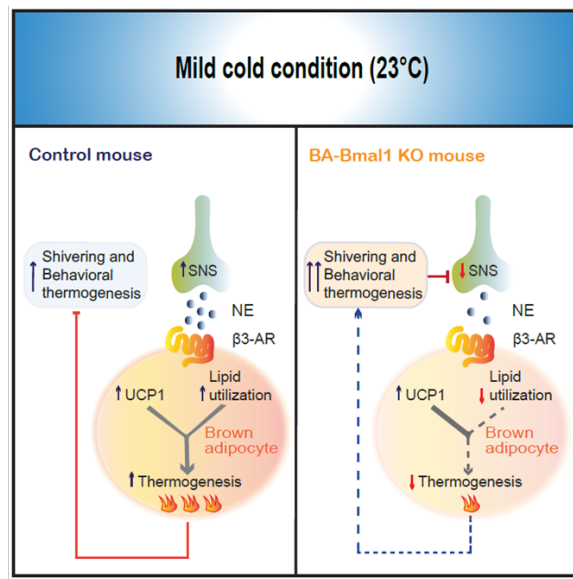


図7 褐色脂肪細胞の体内時計障害の影響

BA-Bmal1 KOマウスでのBAでは、脂肪の利用が障害されており熱産生が低下する。そのため、骨格筋のシバリングや行動量の増加により熱産生を行い、代償性に体温を維持する。その結果、BAの熱産生を制御する交感神経の活性はむしろ低下する。

これまでの様々な研究により、不規則な生活が肥満を惹起することは明らかにされていたが、その機序については十分にはわかっていなかった。本研究は、少なくともマウスにおいては、BAの体内時計は脂肪の利用や熱産生の概日リズムの形成に重要であり、そのため、BAの体内時計障害は肥満の一因になることを明らかにした。現代社会は24時間社会であり、体に悪いとわかっても不規則な生活を送らざるを得ない人々は少なくない。視床下部の中樞時計の時刻は光刺激でセットされるが、中樞時計は睡眠・覚醒のリズムも制御することから、そのような人々では中樞時計の乱れはやむを得ない。一方、BAの体内時計であれば、適切な食事習慣や薬物療法などにより整えることができる可能性がある。本研究の成果は、そのような新しい肥満、生活習慣病の予防・治療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hasan Nazmul, Nagata Naoto, Morishige Jun-ichi, Islam Md Tarikul, Jing Zheng, Harada Ken-ichi, Mieda Michihiro, Ono Masanori, Fujiwara Hiroshi, Daikoku Takiko, Fujiwara Tomoko, Maida Yoshiko, Ota Tsuguhito, Shimba Shigeki, Kaneko Shuichi, Fujimura Akio, Ando Hitoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Brown adipocyte-specific knockout of Bmal1 causes mild but significant thermogenesis impairment in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101202 ~ 101202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101202	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 安藤 仁	4. 巻 127
2. 論文標題 末梢体内時計障害の病態解明と治療法の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 金沢大学十全医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 108-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24517/00053875	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nazmul Hasan, 長田直人, 盛重純一, 太田嗣人, 榛葉繁紀, 藤村昭夫, 安藤 仁
2. 発表標題 Effect of brown adipocyte-specific Bmal1 knockout on thermogenic rhythm in mice
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nazmul Hasan, Naoto Nagata, Jun-ichi Morishige, Md Tarikul Islam, Michihiro Mieda, Tsuguhito Ota, Shigeki Shimba, Akio Fujimura, Hitoshi Ando
2. 発表標題 Brown adipocyte-specific knockout of Bmal1 has a significant effect on thermogenesis in mice
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 生活習慣病における末梢体内時計の病態生理学的意義の解明
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 仁
2. 発表標題 時間治療の現状と打開策
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学 ニュースリリース https://www.kanazawa-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/03/210315-1.pdf 金沢大学 研究トピック https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/91090</p>

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
連携研究者	長田 直人 (Nagata Naoto) (70456408)	金沢大学・医学系・講師 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	太田 嗣人 (Ota Tsuguhi to) (60397213)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関