

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08485

研究課題名（和文）褐色脂肪における血管老化制御を介した新たな恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）A Novel Mechanism of Homeostasis via Regulation of Vascular Aging in Brown Adipose Tissue

研究代表者

古内 亮（Furuuchi, Ryo）

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教

研究者番号：60750073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、活発な代謝臓器である褐色脂肪組織が血管内皮細胞の長寿遺伝子として知られるSIRT-1を介して血管ネットワークの恒常性を維持し全身の代謝機能を制御している可能性が示唆された。その治療・予防法の開発を試み、血管内皮細胞のSIRT-1の活性化を介し細胞老化の進行を抑制する方法及び、選択的に老化した内皮細胞を除去する方法が、糖尿病や肥満の治療に役立つ可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、褐色脂肪組織の血管内皮細胞の細胞老化を制御し毛細血管ネットワークの恒常性を維持することで、肥満症及び糖尿病の予防や治療につながることを示し、次世代の治療法や治療概念の開発につながる研究成果となったと考える。細胞老化は加齢だけではなく肥満や生活習慣などのストレスから病気の前段階から始まっていると考えられており、老化疾患に対する先制医療の確立という意味においても重要な研究となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this research project, it was suggested that brown adipose tissue, an active metabolic organ, may maintain vascular network homeostasis and regulate systemic metabolic functions through SIRT-1, known as a longevity gene for vascular endothelial cells. We attempted to develop therapeutic and preventive methods for this, and found that methods via endothelial-SIRT-1 activation to inhibit the progression of cellular senescence and selectively remove senescent endothelial cells may be useful in the treatment of diabetes and obesity.

研究分野：循環器内科

キーワード：Sirt1 ポリフェノール 老化細胞除去 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

全身の代謝制御において、毛細血管をはじめとする血管の恒常性維持が重要な役割を担う。これまで、本研究者は血管内皮細胞の老化や、主要代謝臓器として知られる褐色脂肪組織 (BAT) における毛細血管ネットワークの破綻により全身の代謝異常が生じることを明らかにしてきた(Cell Rep2014, J Clin Invest2014)。血管の恒常性制御により、血管の「質と量」を維持することは、老化疾患に対する先制医療の開発という観点からも極めて重要と考えられる。しかし、BAT の毛細血管ネットワークの制御機構は殆どわかっていない。そこで本研究では BAT の肥満や老化による血管ネットワークの恒常性の制御のメカニズムを明らかにするとともに、細胞老化を抑制もしくは選択的に除去することで BAT の毛細血管ネットワークの破綻を抑制する次世代の肥満症・代謝不全の治療法の開発に挑むこととした。

2. 研究の目的

本研究課題において BAT の機能不全の因子である血管ネットワークの破綻の機序の明らかにする。機序として細胞が老化していくことで血管ネットワークの破綻に繋がると考えられたため、その治療法の開発としての細胞老化を抑制する方法及び、近年注目を集めている老化細胞を選択的に除去する方法により、全身の代謝不全を改善できるか検証し、新たな治療・予防法の確立を目指した。

3. 研究の方法

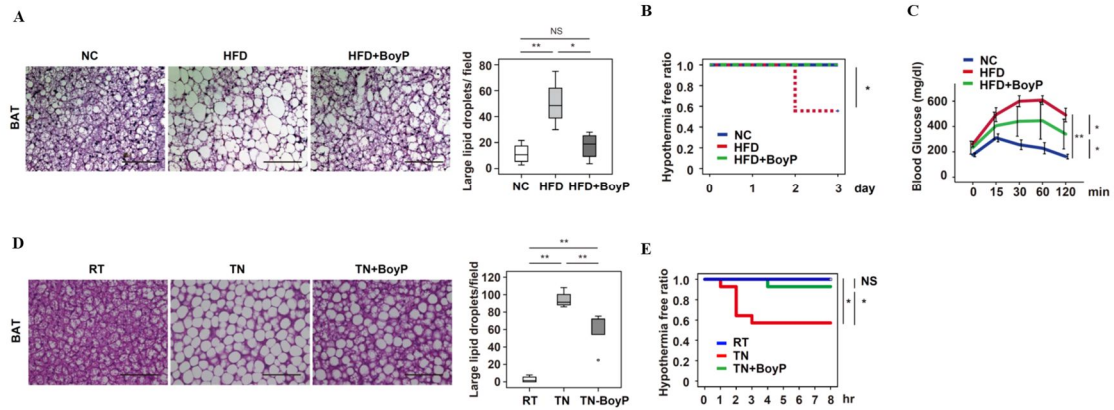
(1) 本研究の予備的なデータとして長寿遺伝子として知られる NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1 (SIRT-1) を活性化するポリフェノールが BAT の血管ネットワーク機構を維持させることを示唆するデータを得た。そのため SIRT-1 BAT 内の EC の老化抑制 血管ネットワーク維持という経路を想定し、BAT 細胞および EC 胞特異的に SIRT-1 遺伝子ノックアウト (KO) したモデルマウスおよび褐色脂肪にて SIRT-1 を過剰発現したモデルマウスを用い、BAT の毛細血管ネットワーク破綻の制御機構を解析した。

(2) (1) の検討の結果、EC の老化が BAT を含む全身の代謝機能不全にかかわる可能性が示唆されたことから、EC の老化細胞除去が実現できる素材を探索し、代謝機能不全に対する効果を評価した。

4. 研究成果

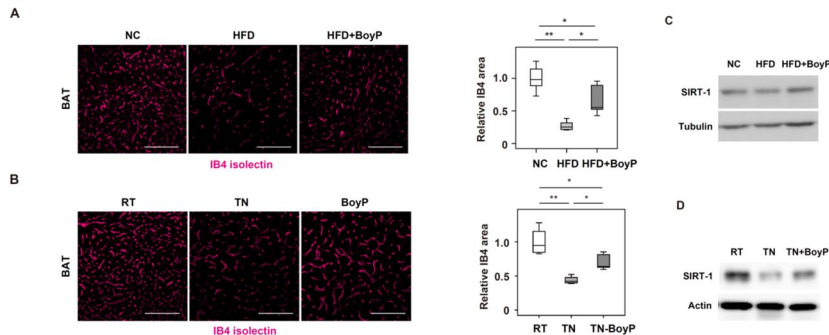
(1) ポリフェノール成分は褐色脂肪の機能不全化を防ぐ

高脂肪食 (HFD) マウスへのボイセンベリーポリフェノール (BoyP) の投与は BAT の白色脂肪の蓄積 (白色化) を抑制した (Fig1A)。BAT の熱産生機能を寒冷負荷試験により解析し、HFD では低体温症を生じたが、BoyP 投与群では低体温症の発症が有意に抑制された (Fig1B)。また、グルコース負荷試験 (GTT) では耐糖能が改善することが示された (Fig1C)。より、BAT 機能にフォーカスするため BAT 機能不全モデルである熱中性モデル (TN、30 飼育) を作成し解析。TN モデルにおいて、BoyP は BAT の白色化 (Fig1D)、CTT での低体温症の発生を有意に抑制した (Fig1E)。

Fig1

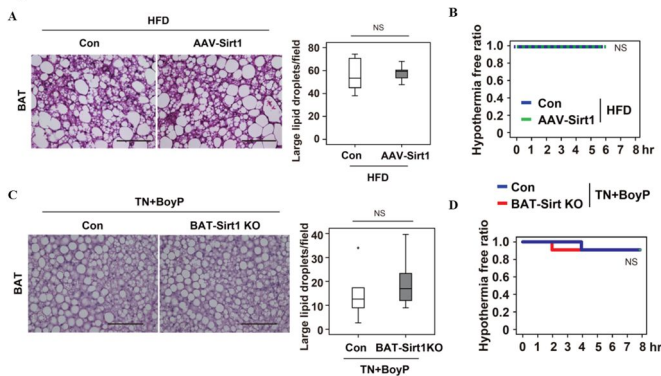
(2) ポリフェノール成分はBAT血管ネットワーク密度を高める

BATの血管ネットワークを免疫染色により解析した。HFDおよびTNマウスはBAT血管密度が低下したが、BoyP投与群では有意に血管密度が上昇した(Fig2A, B)。ポリフェノール成分はSIRT-1を活性化することが知られているが、HFD, TNによりBAT中のSIRT-1発現が低下したが、BoyP投与により発現を改善させることが示された(Fig2C, D)。

Fig2

(3) 褐色脂肪細胞SIRT-1はBAT機能不全へ影響しない

BATにおけるSIRT-1の役割を解析するため、AAV-SIRT-1によりBAT中のSIRT-1を過剰発現させ解析した。しかしながら、SIRT-1の過剰発現はBATの白色化、熱産生機能に影響を及ぼさなかった(Fig3A, B)。次に、褐色脂肪細胞特異的にSIRT-1を欠損したUCP-1 Cre⁺/Sirt1^{flox/flox} mice (BAT-Sirt1KO)を作製し解析したが、同様に白色化、熱産生機能に影響を及ぼさなかった(Fig3C, D)。

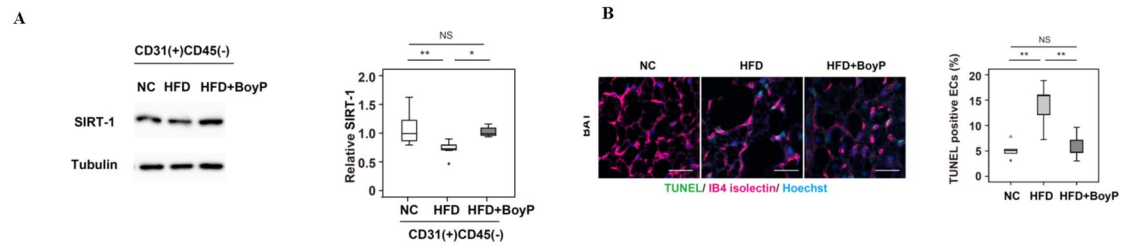
Fig3

(4) メタボリックストレス下ではSIRT-1はBAT-ECで発現低下する

BATのSIRT-1の発現を細胞レベルで観察するため細胞をMACSで分画し解析した。HFD, TN条件下ではSIRT-1発現はEC(CD31+CD45-)で低下した(Fig4A)。一方、BoyP投与でEC-SIRT-1発現が

有意に改善した。SIRT-1 はアポトーシス抑制的に働くことが知られており、BAT-EC のアポトーシスを TUNEL 染色で解析した結果、HFD, TN モデルマウスでは顕著に EC-TUNEL 陽性細胞が増加したが、BoyP では EC-TUNEL 陽性率が有意に低下していた(Fig4B)。

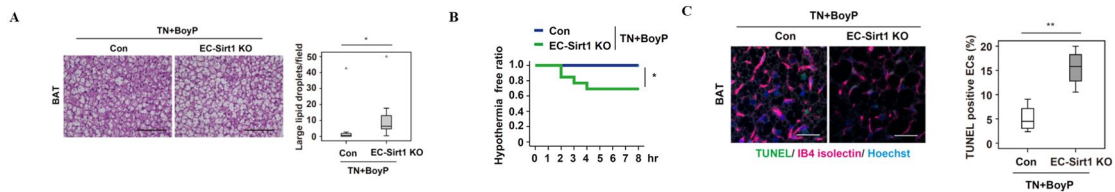
Fig4



(5) EC-SIRT-1 欠損は BoyP の効果を失わせる

EC-SIRT-1 の役割を更に解析するため、EC-SIRT-1 欠損マウス (VEcadherin-BAC-CreERT2 : Sirt1flox/flox mice、EC-SIRT1KO) を作製した。TN 条件下において EC-SIRT1KO は BoyP による BAT 白色化抑制、熱産生機能不全抑制効果を失わせた(Fig5A, B)。また、EC-SIRT1KO マウスでは BoyP による EC のアポトーシスの抑制効果も失われた(Fig5C)。

Fig5



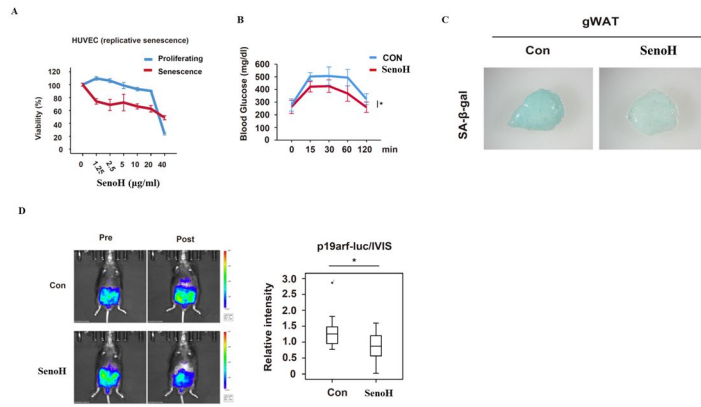
これらの結果は EC-Sirt1 はメタボリックストレスにより生じる EC の細胞死に対し保護的に働くことで BAT 血管ネットワークを維持し全身の代謝機能を制御しているということが示唆された。

(6) 選択的老化細胞除去による代謝機能不全の改善

SIRT-1 は老化抑制的に働くことで抗老化作用が期待されており、上記、ポリフェノールは SIRT-1 を介し EC に対し老化抑制的に働くことで全身の代謝不全を改善すると考えられる。

近年、老化の治療法の新しい概念として細胞老化を抑制するのではなく老化細胞を選択的に除去する (Senolysis) ことで老化を治療する方法が提唱されている。そこで本研究では血管ネットワークで生じた EC-老化細胞を選択的に除去することで、全身の代謝機能不全を治療できるのではないかと考え Senolysis を実現できる候補を探索した。血管内皮細胞 HUVEC を用い食用成分から SenoH を同定した。SenoH の肥満マウスへの投与は耐糖能を改善するとともに、精巣上体脂肪 (gWAT) における老化細胞染色 SA-β-gal の染色度合を減少させた。老化マーカー p19arf の下流にルシフェラーゼを組み込んだ p19arf-LUC マウスは、肥満に伴い内臓脂肪で強いシグナルを示すが、SenoH の投与はルシフェリン発行シグナルを低下させ、老化細胞の蓄積を減少させたことを示唆した。

Fig6



本研究課題では、活発な代謝臓器であるBATがECのSIRT-1を介して血管ネットワークの恒常性を維持し全身の代謝機能を制御している可能性が示唆された。その治療・予防法の開発を試み、細胞老化の進行を抑制するEC-SIRT-1活性化を介した方法及び、選択的に老化EC細胞を除去する方法が、糖尿病や肥満の治療に役立つ可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryo Furuuchi, Ippei Shimizu, Tohru Minamino,
2. 発表標題 Polyphenol inhibits capillary rarefaction in brown adipose tissue and contributes for maintaining systemic metabolic health in obesity.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古内 亮、清水 逸平、南野 徹
2. 発表標題 ポイセンベリーポリフェノールによる褐色脂肪組織の血管ネットワーク維持機構の解析
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古内 亮、清水 逸平、南野 徹
2. 発表標題 ポリフェノール成分による褐色脂肪の血管ネットワーク維持機構の解析
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古内 亮、清水 逸平、南野 徹
2. 発表標題 ポイセンベリーポリフェノールによる血管内皮機能不全の改善効果
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Furuuchi, Ippei Shimizu, Tohru Minamino
2. 発表標題 Boysenberry polyphenol inhibits capillary rarefaction in brown adipose tissue and maintains systemic metabolic health in obesity
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Furuuchi, Ippei Shimizu, Tohru Minamino
2. 発表標題 Activation of Endothelial Sirt1 by Polyphenol Inhibits Capillary Rarefaction in Brown Adipose Tissue and Contributes for Maintaining Systemic Metabolic Health
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古内 亮、吉田陽子、清水 逸平、南野 徹
2. 発表標題 ボイセンベリーポリフェノールによる褐色脂肪血管ネットワーク制御機構の解明
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	清水 逸平 (Shimizu Ippei) (60444056)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
研究分担者	南野 徹 (Minmino Thoru) (90328063)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

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