

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16496

研究課題名(和文) 褐色脂肪熱産生におけるTRPV/NCX機能連関の生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological roles of functional relationship of TRPV/NCX in thermogenesis of brown adipocytes

研究代表者

喜多 知 (Kita, Tomo)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：50797107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織(BAT)は哺乳類における非ふるえ熱産生の主要な場である。最近、TRPV2を介して細胞内に流入したCa<sup>2+</sup>が、褐色脂肪熱産生においてミトコンドリアのUCP1を活性化させることが報告されている。しかしながら、褐色脂肪熱産生における細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル機序の詳細は不明である。本研究では、1型Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX1)に着目し、褐色脂肪熱産生における機能的役割を解析した。興味深いことに、NCX1ヘテロ欠損マウスでは寒冷環境下における体温維持機能に異常が認められた。本研究結果から、NCX1は寒冷環境下における熱産生に寄与す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

肥満は生活習慣病の発症に大きく影響することが知られており、早急な肥満対策が社会的に求められている。脂肪細胞にはエネルギーを貯蓄する白色脂肪細胞と、脂肪を分解して熱産生する褐色脂肪細胞が存在する。寒い環境下では交感神経活動が高まり、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアのUCP1発現が上昇することで、体温が下がりにすぎないように熱産生が起こる。

本研究において、褐色脂肪熱産生におけるNCX1の新たな生理学的機能を明らかにすることができた。NCX1は肥満・メタボリックシンドロームの予防や、新たな治療標的となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) is a primary site for non-shivering thermogenesis in mammals. Previous report suggested that intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling induced by transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) activates mitochondrial uncoupler 1 (UCP1) in BAT thermogenesis. However, molecular mechanisms of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in BAT are not well characterized. In this study, our research interest focuses on elucidating functional involvement of NCX1 in BAT thermogenesis. Intriguingly, we observed that NCX1-heterozygous (NCX<sup>+/-</sup>) mice did not maintain their core body temperature in cold exposure. These results suggest that NCX1 may contribute to BAT thermogenesis against cold environment.

研究分野：イオン輸送体

キーワード：NCX 熱産生 褐色脂肪細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、生活習慣病の発症に大きく影響することが知られており、早急な対策が社会的に求められている。脂肪細胞にはエネルギーを貯蓄し、肥満の原因となる白色脂肪細胞と、エネルギーを消費して熱産生する褐色脂肪細胞が存在する。寒い環境下では交感神経活動が亢進し、褐色脂肪細胞のミトコンドリア脱共役タンパク質である UCP1 の発現増加・活性化により、体温が下がりすぎないように熱産生が起こる。近年、細胞膜に存在する非選択的陽イオン透過性チャネルである transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) チャネルが褐色脂肪細胞の熱産生を誘導し、肥満抑制を促すことが報告され (Sun et al. EMBO Rep, 2016) メタボリックシンドローム治療や肥満改善の標的として注目されている。TRPV2 を介する  $Ca^{2+}$  動員は UCP1 発現を増加して熱産生を誘導すると考えられるが、この  $Ca^{2+}$  シグナル機序の詳細はさらに解析が必要である。

細胞膜の  $Na^+/Ca^{2+}$  交換輸送体 (NCX) は、 $Na^+$  濃度勾配に従って  $Ca^{2+}$  を細胞外へ排出する forward mode と、細胞内  $Na^+$  濃度が増加する特殊な条件下で細胞外から  $Ca^{2+}$  を流入させる reverse mode の 2 種の輸送モードがある。1 型 NCX (NCX1) は種々臓器に発現しており、特に心筋・平滑筋組織において細胞内  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスや  $Ca^{2+}$  シグナル形成に寄与すると考えられているが、褐色脂肪細胞における NCX1 の機能的役割については未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

最近、申請者は 3T3-L1 誘導脂肪細胞に NCX1 が機能的に高発現しており、アゴニスト刺激時の細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルが TRPV2 阻害薬と NCX1 阻害薬で同程度に阻害されることを見出した。また、当研究室で保有している全身性 NCX1 ヘテロ欠損マウス (以下 NCX1<sup>+/-</sup>マウス) が野生型マウスよりも体重が増加傾向にあることを確認した。これらの予備的検討から、申請者は「TRPV2/NCX1 機能連関による褐色脂肪熱産生機構」と題して、「TRPV2 を介して ( $Ca^{2+}$  と共に) 流入した  $Na^+$  が NCX1 の reverse mode による  $Ca^{2+}$  流入をさらに誘導する」という作業仮説を立てた (図 1)。本研究では、TRPV2/NCX1 機能連関による褐色脂肪熱産生機構について、NCX1<sup>+/-</sup>マウスおよび脂肪細胞特異的 NCX1 欠損マウス (Adipoq-CreEsrl: NCX1<sup>lox/lox</sup>) を用いた *in vivo* 熱産生機能試験により、この作業仮説を実証することを目的とした。本研究により、褐色脂肪熱産生機構におけるイオン輸送機序の全容を解明するとともに、メタボリックシンドローム治療や肥満改善の新たな創薬標的としての NCX1 の重要性を明らかにする。

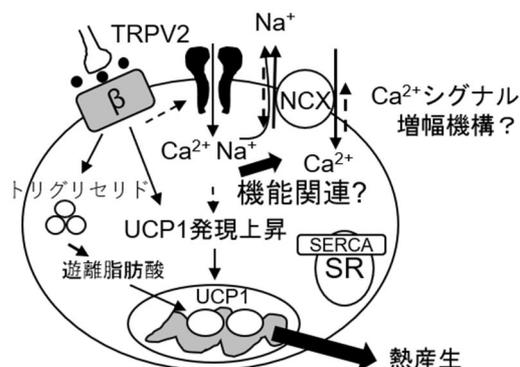


図1 褐色脂肪細胞の熱産生におけるNCXの関与 (作業仮説)

### 3. 研究の方法

#### (1) 褐色脂肪細胞における NCX 分子種および熱産生関連遺伝子の発現解析

野生型マウス、NCX1<sup>+/-</sup>マウスおよび脂肪細胞特異的 NCX1 欠損マウス (以下両 NCX1 欠損マウス) より褐色脂肪組織を採取し、NCX 遺伝子 (NCX1-3) 温度感受性 TRPV 遺伝子 (Trpv1-4) 熱産生関連遺伝子 (Ucp1, Pparg, Prdm16, Pgc1a 等) の発現量を定量リアルタイム PCR により測定した。冷刺激 (4°C) の有無による各遺伝子の発現量変化も測定した。さらに NCX 分子種および TRPV2 の局在を免疫染色により解析した。

#### (2) NCX1 欠損マウスの熱産生機能試験

野生型マウスおよび両 NCX1 欠損マウスの腹腔内にテレメトリー温度送信機を埋め込み、低温暴露時 (4°C) の体温、行動量を測定することで熱産生機能を評価した。

### (3) NCX1 欠損マウスの脂肪蓄積能の解析

熱産生機能と連動する肥満の評価を実施するため、両 NCX1 欠損マウスの各週齢における体重変化、飲水量、食餌量を測定し、野生型マウスと比較した。また、褐色脂肪組織を採取し、形態を野生型マウスと比較した。

#### 4. 研究成果

まず、当研究室で保有している NCX1<sup>+/-</sup>マウスの褐色脂肪組織を採取し、NCX1-3 遺伝子、温度感受性 TRPV 遺伝子 (*Trpv1-4*)、熱産生関連遺伝子の発現量を測定し、野生型マウスと比較した。その結果、野生型マウスと比較して NCX1<sup>+/-</sup>マウスでは、*Ucp1* 遺伝子の発現量が NCX1 遺伝子と同様に半分程度に減少していた。また、褐色脂肪細胞に発現が確認されている *Trpv2* 遺伝子発現も減少傾向にあった。次に NCX1<sup>+/-</sup>マウスの低温暴露時の体温を測定した結果、通常環境では野生型マウスと同程度の体温を示したが、低温環境では野生型マウスよりも体温が低下しており、熱産生機能に異常が認められた(行動量は同程度であり、行動性熱産生の影響はないと判断した)。

熱産生機能と脂肪蓄積能には相関関係が認められる場合があるため、NCX1<sup>+/-</sup>マウスの肥満を評価するため、体重、飲水量、食餌量を測定した。その結果、NCX1<sup>+/-</sup>マウスは野生型マウスと比較して、14-18 週齢において体重に差が認められた(飲水量、食餌量に変化は認められなかった)。また、各部位における褐色脂肪組織、白色脂肪組織および臓器重量を測定した結果、NCX1<sup>+/-</sup>マウスは野生型マウスと比較して、褐色脂肪組織重量および皮下脂肪である白色脂肪組織重量が増大していた(心臓、肝臓、骨格筋等の組織重量に差は認められなかった)。さらに、褐色脂肪組織の脂肪滴を観察した結果、NCX1<sup>+/-</sup>マウスの褐色脂肪細胞では脂肪滴の大きさ(長径、面積)が野生型マウスよりも増加しており、白色化の傾向を示した。以上の結果から、NCX1<sup>+/-</sup>マウスは熱産生機能の低下に伴い、褐色脂肪細胞内の脂肪滴増大により肥満が促進されたと推察された。

次に、脂肪細胞特異的 NCX1 欠損マウスを作成し、脂肪細胞に発現する NCX1 の役割を追求した。タモキシフェン投与により NCX1 欠損を誘導したマウス (Tam+) では、褐色脂肪組織における NCX1 発現が免疫組織化学的解析においてほぼ認められなかった。このマウスの体温維持機能を調べた結果、Tam+ マウスは、薬剤誘導のない対照マウス (Tam-) と比較して、低温暴露時の体温が著しく低下した。これらの結果は NCX1<sup>+/-</sup>マウスにおける実験結果と一致しており、脂肪細胞に発現する NCX1 が低温暴露時の熱産生機能に関与することを示唆した。

現在、脂肪細胞特異的 NCX1 欠損マウスの褐色脂肪組織を単離し、培養・分化誘導することで初代培養褐色脂肪細胞を取得し、ノルエピネフリン刺激時の細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを観察している。今後は、Tam+ マウス由来の褐色脂肪細胞と Tam- 由来の褐色脂肪細胞を比較し、ノルエピネフリン刺激時の細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルにおける NCX1 の関与を、NCX1 阻害薬 (KB-R7943, SEA0400) を用いて証明する。

以上の研究成果から、褐色脂肪細胞に発現する NCX1 は、UCP1 を介した低温環境時の古典的熱産生機能に関与することが示唆された。寒冷刺激時のノルエピネフリンによる褐色脂肪細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナル上昇には、おそらく、NCX1 の reverse mode が関与していると考えられ、褐色脂肪細胞 Ca<sup>2+</sup>シグナル機序に基づく UCP1 依存性熱産生機構における NCX1 の機能的重要性が示された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nagata Asahi, Tagashira Hideaki, Kita Satomi, Kita Tomo, Nakajima Naoko, Abe Kohtarō, Iwasaki Akinori, Iwamoto Takahiro	4. 巻 529
2. 論文標題 Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX1 attenuate hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 793 ~ 798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.045	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 該当する

〔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 喜多知、田頭秀章、根本隆行、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 褐色脂肪組織熱産生におけるNCX1の機能的役割
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多知、田頭秀章、根本隆行、柴田志保、岩本隆宏
2. 発表標題 褐色脂肪細胞の熱産生におけるNa <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換輸送体の関与について
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomo Kita, Hideaki Tagashira, Takayuki Nemoto, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Functional involvement of Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger type 1 in brown adipose tissue thermogenesis.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多知、田頭秀章、根本隆行、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 褐色脂肪細胞熱産生におけるNa <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換輸送体の役割
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021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

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