

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08903

研究課題名（和文）テトラヒドロピオプテリンを用いた褐色脂肪重量の制御による肥満・糖尿病予防法の開発

研究課題名（英文）Development for the prevention of obesity and diabetes by regulation of brown adipose tissue volume using tetrahydrobiopterin

研究代表者

藤田 義人 (Fujita, Yoshihito)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50547809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、新生児期のBH4がBATを介して成長後の代謝に影響を及ぼす機序を明らかにし、糖尿病・肥満症の治療法を開発することを目的とした。出生時のBH4欠乏マウスとコントロールマウス由来のBATを採取し関与する因子の探索を行った。メタボローム解析、RNAシーケンス解析にて2群間を判別が可能であり、違いに寄与する因子を見出した。さらに、BH4欠乏マウスの出生前の胎児の時期より、母体BH4欠乏マウスにBH4を胎盤内投与すると出生時のBAT機能が回復した。この胎盤内BAT投与後に出生したマウスのBATの特徴を調べたところ、コントロールマウスのBATに近い遺伝的、代謝的特徴を有していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BATは熱産生によりエネルギー代謝を促進させる臓器であり、新たな肥満症・糖尿病の治療標的として注目されている。BH4はnitric oxideやカテコラミン合成酵素の補酵素として作用しBATを活性化させる物質である。申請者らはこのBH4を妊娠後期の母体マウスに投与したところ新生児マウスのBAT重量が増加することを見出した。さらに、成長後の糖尿病・肥満症の発症を予防できる可能性を示す所見を見出した。これらの機能に関与する因子を見出しており、新たな糖尿病・肥満症の発症予防、治療の標的の開発につながる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms by which neonatal BH4 affects postnatal metabolism via BAT and to develop treatments for diabetes and obesity. BAT from BH4-deficient mice at birth and control mice were collected to explore the factors involved. Metabolome analysis and RNA sequencing analysis enabled us to discriminate between the two groups, and we found factors that contributed to the differences. Furthermore, when BH4 was administered intraplacenta to BH4-deficient mice from the prenatal period, BH4 function at birth was restored. Characterization of the BAT of mice born after this intraplacental BAT administration showed that they had genetic and metabolic characteristics similar to the BAT of control mice.

研究分野：糖尿病、肥満症

キーワード：糖尿病 肥満症 褐色脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

肥満人口の爆発的な増加は世界的な課題となっており、糖尿病や心血管疾患のリスク要因となり社会経済に与える影響も大きい。糖尿病は発症した時点ですでにインスリンの作用不足が顕著になっている病態であり、病因を制御し発症を予防することが重要である。発達過程(胎児期や生後早期)における様々な環境および適応反応が将来の疾病リスクを規定するとの説(Developmental Origins of Health and Disease: DoHaD 仮説)は生活習慣病にもあてはまり、疾病リスクに対して早期から介入していく、いわゆる『先制医療』が注目されている。

褐色脂肪組織(Brown adipose tissue; BAT)は熱産生によりエネルギー代謝を促進させる臓器である。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されている。BATの組織重量は主に妊娠後期に規定されることが知られている。このために、出生時のBAT重量を制御することにより成長後の糖尿病・肥満症の発症を予防できるのではないかと考えた。

申請者は、これまでに endothelial nitric oxide synthase (eNOS)やカテコラミン合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH)の補酵素として作用するテトラヒドロビオプテリン(BH4)がBATを活性化させ、全身の糖・エネルギー代謝を制御することを報告してきた(JCI Insight. 2017)。

さらに、このBH4がBATの分化・増殖にも関与することを見出している。つい最近申請者は、BH4が新生児マウスのBAT重量を規定している重要な所見を得た。BH4の合成律速酵素であるGTP cyclohydrolase Iの発現が低下しているBH4欠乏マウス(hph-1マウス)を用いた。BH4欠乏マウスはBAT重量が少ない状態で出生するが、妊娠後期の母体マウスにBH4を腹腔内投与すると、BH4が胎内移行し新生児マウスのBAT重量および機能が增加した。さらに、成長後の高脂肪食負荷による耐糖能の悪化および肥満の助長が抑制された(図1)。これらの所見は、BH4が妊娠後期から出生時のBAT増殖能を制御し、さらに成長後の代謝機能に影響を及ぼすこと示している。また出生時のBAT重量の制御が肥満症・糖尿病の発症予防に有効であり、BATが先制医療における有力な標的臓器となることを強く示唆している。

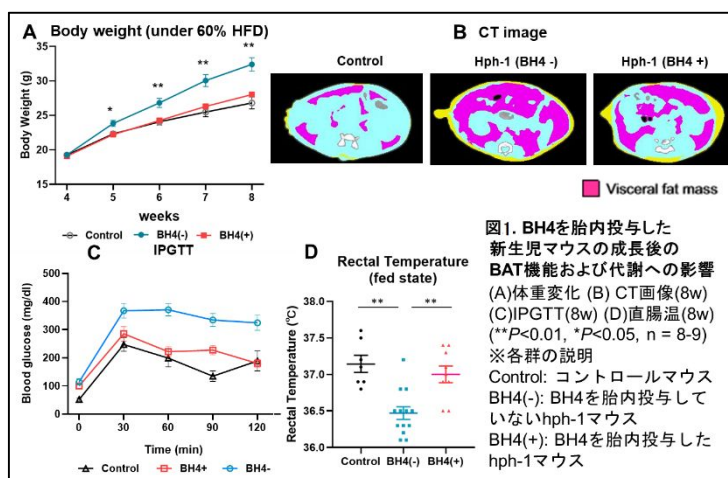


図1. BH4を胎内投与した新生児マウスの成長後のBAT機能および代謝への影響 (A)体重変化 (B) CT画像(8w) (C)IPGTT (8w) (D)直腸温(8w) (**P<0.01, *P<0.05, n = 8-9) ※各群の説明 Control: コントロールマウス BH4(-): BH4を胎内投与していないhph-1マウス BH4(+): BH4を胎内投与したhph-1マウス

2. 研究の目的

申請者はBH4が新生児期のBAT重量を制御し、成長後の肥満症・糖尿病の発症予防に有効である予備的所見を得ている。しかしBATが成長後の代謝に影響を及ぼす機序については不明である。本研究では機序の詳細を明らかにし、BAT重量の制御による糖尿病・肥満症の発症予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究の方法・内容の概要を図2に示す。

(1) 母体マウスへのBH4投与により新生児マウスのBAT重量が増加する機序の解明

BH4欠乏マウス(hph-1マウス)およびコントロールマウスより褐色脂肪細胞を単離し、SV40抗原を用いて不死化前駆細胞株を樹立している。細胞にBH4を添加し分化・増殖を調べる。BH4は

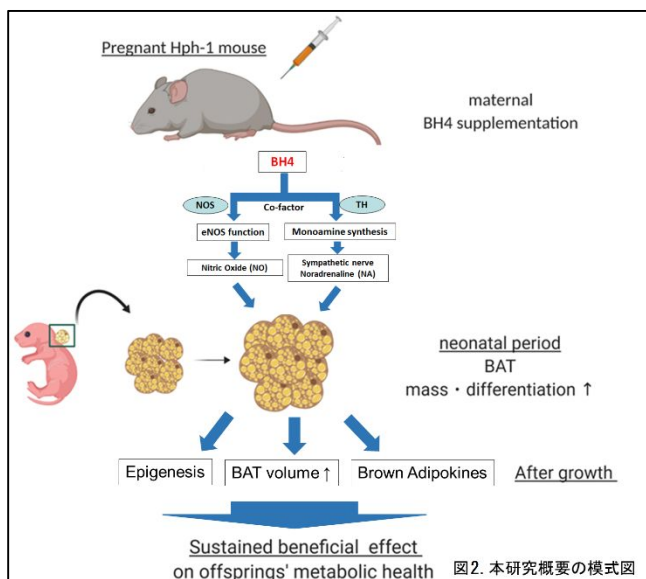


図2. 本研究概要の模式図

NO および NA 合成酵素の補酵素として作用しており、各関連酵素の阻害実験により作用機序の詳細を調べる。

- (2) (1)が成長後に BAT 機能・耐糖能・肥満耐性が保持される機序に關与する因子の探索
新生児期の BAT を増殖させることにより、成人期以降の糖尿病・肥満症の発症が抑えられるメカニズムとして、BAT 重量の維持、BAT のエピゲノム特性の変化、Brown Adipokines の關与が想定される(図 2)。各々の因子についてトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析などを用いて關与する因子を探索する。
- (3) BAT 重量および成長後の代謝機能を制御する因子を用いた肥満・糖尿病予防法の開発
(2)で探索した因子について、前駆細胞株を用いて遺伝子制御、添加実験を行い分化・増殖への影響を調べる。In vitro 実験で有意な所見が得られた因子についてはコンディショナルノックアウトマウスなどモデル動物を作成し解析する。また、BAT 重量は妊娠後期に成熟し、出生時にピークに達することがわかっているが、成人に達するまである程度増殖能を有することがわかっている。BH4 および探索した因子について妊娠期・新生児期・乳児期・思春期・成人期の各ステージに介入し、肥満・糖尿病予防に応用するための基盤研究を遂行する。
- (4) 高血糖妊婦由来の新生児、低出生体重児の BAT 重量・機能に關する臨床研究
糖尿病合併妊娠など胎内のブドウ糖濃度が高い環境から出生したマウスや出生時の体重が低いマウスは、BAT 重量が低いことが知られている。この事象が、ヒトにおいても認められるかを調べるために臨床研究を実施する。

4. 研究成果

- (1) 母体マウスへの BH4 投与により新生児マウスの BAT 重量が増加する機序の解明
- (2) (1)が成長後に BAT 機能・耐糖能・肥満耐性が保持される機序に關与する因子の探索
テトラヒドロピオプテリン (BH4) が欠乏したマウス (hph-1 マウス) は、BAT の分化・成熟障害をきたしており、出生時の体温がコントロールマウスにくらべ低下している。さらに、この 2 群を高脂肪食にて飼育したところ、BH4 欠乏マウスは肥満が助長され糖代謝障害を認めた。このように、出生時の BH4 欠乏に起因する BAT 機能障害は、成長後のメタボリックシンドローム発症にも關与する可能性が示された。
BAT は胎仔期の後半(妊娠後期)から急激に分化・成熟兆候を示し、出生時にピークに達することが知られている。本研究期間においては、BAT 重量・機能がピークに達する出生時の hph-1 マウスとコントロールマウス由来の BAT サンプルを採取し、BH4 が關与する BAT の分化・成熟に關与する因子の探索を行った。
はじめに、LC/MS を用いたメタボローム解析を行った。メタボロームデータをすでに取得し、現在關連因子の探索を行っている。次に、RNA シーケンス解析を行った。RNA シーケンスにて、2 群の主成分分析を行い、マッピングデータより、現在關連遺伝子群の抽出を行っている。RNA シーケンス解析により、2 群の主成分分析を行い 2 群間を判別することが可能であり、また、2 群間の違いに寄与する因子を見出している。
さらに、BH4 欠乏マウスの出生前の胎児の時期より、母体 BH4 欠乏マウスに BH4 を胎盤内投与すると、出生時の BAT 機能が回復していることが明らかとなっている。この胎盤内 BAT 投与後に出生したマウスの BAT の RNA シーケンス解析、メタボローム解析の特徴を調べたところ、BH4 欠乏マウスよりもコントロールマウスの BAT に近い遺伝的、代謝的特徴を有していることが示された。
- (3) BAT 重量および成長後の代謝機能を制御する因子を用いた肥満・糖尿病予防法の開発
BH4 および關連物質の分化・成熟機構の詳細を明らかにするため BAT 前駆細胞株を用いた in vitro の研究を行った。hph-1 マウスの BAT から作成した不死化褐色細胞株に BH4 を投与したところ、BH4 を投与せず分化成熟させた細胞と比較して、分化の成熟を示す脂肪滴の増加がみられた。さらに、BH4 は一酸化窒素合成酵素の補酵素であり、分化・成熟への一酸化窒素シグナルの關与を示唆するデータが得られている。褐色細胞株に BH4 を投与したところ、BH4 を投与せず分化成熟させた細胞と比較して、分化の成熟を示す脂肪滴の増加がみられた。さらに、BH4 は一酸化窒素合成酵素の補酵素であり、分化・成熟への一酸化窒素シグナルの關与を示唆するデータが得られている。今後さらに分化・増殖の作用機序を調べる。
BH4 および關連物質の分化・成熟機構の詳細を明らかにするため BAT 前駆細胞株を用いた in vitro の研究を行った。BH4 は褐色脂肪細胞への直接の分化・成熟作用を有していることを UCP1 の発現や成熟兆候を示す細胞内脂肪蓄積量の定量評価により明らかにした。探索した因子について、前駆細胞株を用いて遺伝子制御、添加実験を行い分化・増殖への影響を調べている。
- (4) 高血糖妊婦由来の新生児、低出生体重児の BAT 重量・機能に關する臨床研究

高血糖、胎児発育不全の妊婦について、出産時の胎盤サンプルを用いてBH4の測定・解析を行った。予備的検討においては、明らかなBH4の差異が認められなかったが、今後ヒトサンプルにおけるBH4測定のためにサンプル採取、処理方法及び解析手法の見直しを行い、サンプル数を増やして再評価を検討している。

(研究全体の成果)

本研究により、BH4が胎児期のBAT機能を制御するだけでなく成長後の代謝状態を規定していることが明らかとなった。さらに、この機能に関与する因子を見出しており、新たな糖尿病・肥満症の発症予防、治療の標的の開発につながる成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Minamino Hiroto, Katsushima Masao, Torii Mie, Yamamoto Wataru, Fujita Yoshihito, Ikeda Kaori, Okamura Emi, Murakami Kosaku, Watanabe Ryu, Murata Koichi, Ito Hiromu, Tanaka Masao, Arai Hidenori, Matsuda Shuichi, Morinobu Akio, Inagaki Nobuya, Hashimoto Motomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum vitamin D status inversely associates with a prevalence of severe sarcopenia among female patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 99894-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99894-6	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, Hashimoto Motomu, Fujita Yoshihito, Torii Mie, Ikeda Kaori, Isomura Nozomi, Oguri Yasuo, Yamamoto Wataru, Watanabe Ryu, Murakami Kosaku, Murata Koichi, Nishitani Kohei, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Uda Miyabi, Nin Kazuko, Arai Hidenori, Matsuda Shuichi, Morinobu Akio, Inagaki Nobuya	4. 巻 16
2. 論文標題 Influence of dietary habits on depression among patients with rheumatoid arthritis: A cross-sectional study using KURAMA cohort database	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0255526	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 Minamino Hiroto, Katsushima Masao, Torii Mie, Hashimoto Motomu, Fujita Yoshihito, Ikeda Kaori, Yamamoto Wataru, Watanabe Ryu, Murakami Kosaku, Murata Koichi, Nishitani Kohei, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Ohmura Koichiro, Arai Hidenori, Inagaki Nobuya, Matsuda Shuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Habitual fish intake negatively correlates with prevalence of frailty among patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84479-0	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 Minamino Hiroto, Katsushima Masao, Hashimoto Motomu, Fujita Yoshihito, Yoshida Tamami, Ikeda Kaori, Isomura Nozomi, Oguri Yasuo, Yamamoto Wataru, Watanabe Ryu, Murakami Kosaku, Murata Koichi, Nishitani Kohei, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Ohmura Koichiro, Matsuda Shuichi, Inagaki Nobuya, Morinobu Akio	4. 巻 23
2. 論文標題 Urinary sodium-to-potassium ratio associates with hypertension and current disease activity in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02479-x	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 Furuya Futoshi, Fujita Yoshihito, Matsuo Naomi, Minamino Hiroto, Oguri Yasuo, Isomura Nozomi, Ikeda Kaori, Takesue Kohei, Li Ying, Kondo Aki, Mano Fumika, Inagaki Nobuya	4. 巻 86
2. 論文標題 Liver autophagy-induced valine and leucine in plasma reflect the metabolic effect of sodium glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 104342 ~ 104342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2022.104342	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 Yoshiji Satoshi, Minamino Hiroto, Tanaka Daisuke, Yamane Shunsuke, Harada Norio, Inagaki Nobuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of glucagon like peptide 1 receptor agonists on cardiovascular and renal outcomes: A <sc>meta analysis</sc> and <sc>meta regression</sc> analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14666	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 Yoshiji Satoshi, Tanaka Daisuke, Minamino Hiroto, Lu Tianyuan, Butler-Laporte Guillaume, Murakami Takaaki, Fujita Yoshihito, Richards J. Brent, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Causal associations between body fat accumulation and COVID-19 severity: A Mendelian randomization study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 899625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.899625	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 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の妊娠期の補充療法による、胎仔期の褐色脂肪組織の分化や成長後のエネルギー代謝に与える影響についての検討
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kwon Jungin、Yeh Yu-Sheng、川原崎 聡子、南野 寛人、藤田 義人、岡松 優子、野村 亘、高橋 春弥、木村 和弘、斉藤 昌之、稲垣 暢也、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 イソプレノイド合成経路による褐色脂肪細胞分化調節機構の検討
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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 BH4の褐色脂肪組織への分化制御機構の解析、および胎生期における役割の検討
3. 学会等名 第34回プテリジン研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田義人
2. 発表標題 メトホルミンの多面的な作用とその機序について
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田義人
2. 発表標題 経口糖尿病治療薬の有効な使い方 - 薬剤の作用とエビデンス -
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minamino H, Fujita Y, Goto H, Ohashi A, Furuya F, Isomura N, Takesue K, Li Y, Kawarasaki S, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N.
2. 発表標題 Maternal Supplementation of Tetrahydrobiopterin Regulates Differentiation of Fetal Brown Adipose Tissue and Contributes to Offspring Metabolic Health
3. 学会等名 ADA 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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に関与し、出生後の糖・エネルギー代謝に持続的な影響を与える
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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、長谷川 宏幸、河田 照雄、稲垣 暢也。
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンは胎仔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与する
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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 妊娠期の母体環境が褐色脂肪組織の分化に与える影響についての検討：テトラヒドロピオプテリンの意義について
3. 学会等名 第37回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 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 妊娠期のテトラヒドロピオプテリン補充は、胎仔の褐色脂肪組織分化や成長後のエネルギー代謝に影響を与える
3. 学会等名 第25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 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

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