

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08905

研究課題名（和文）脂肪細胞由来代謝物による恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism maintaining metabolic homeostasis by nutrition signaling in adipocytes

研究代表者

福原 淳範（Fukuhara, Atsunori）

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：00437328

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）：脂肪細胞の生理的な機能は、摂食/絶食の生理的な栄養状態の変化に応じて余剰なエネルギーを蓄積し放出することである。全身の栄養状態変化に応じて脂肪細胞の栄養因子自体による脂肪細胞機能制御を解明した。脂肪細胞はグルタミンを産生しており、絶食時にはグルタミンが枯渇することでATGLが誘導され、中性脂肪分解による脂肪酸供給が誘導されることが示唆された。脂肪細胞は乳酸を産生しており、乳酸産生酵素はGlut1を介した糖取り込みを制御することが示された。脂肪細胞はケトン体を産生しており、ケトン体は飢餓状態後のインスリン存在下での脂肪細胞機能を亢進させることで疲弊した脂肪細胞機能の回復に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪細胞は飢餓状態において脂肪酸を供給する臓器であるが、今回の研究によって細胞細胞はグルタミンや乳酸、ケトン体を産生することが明らかになった。さらに、これらは栄養状態に応じて産生され、局所的に作用することで脂肪細胞機能を制御することが明らかになった。脂肪組織はエネルギー貯蔵臓器であることから、栄養状態を鋭敏に感知することで、脂肪細胞局所で脂肪酸分解や糖取り込み、中性脂肪蓄積が制御されることは合理的なホメオスタシス制御機構だと考えられる。これらの栄養因子によるシグナル経路を解明することで、飢餓状態を模倣する新たな肥満病態改善薬の開発に寄与することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Adipocyte is essential in regulating metabolic homeostasis during feeding/fasting cycle. We revealed that adipocyte produces glutamine, lactate, and ketone body (3HBA). Glutamine deficiency induces ATGL expression and enhances basal lipolysis. Deletion of lactate dehydrogenase in adipocyte results in reduced Glut1 expression and glucose uptake in adipose tissues. 3HBA plays significant roles in enhancing the physiological function of adipocytes.

研究分野：内分泌学、代謝学

キーワード：脂肪細胞 グルタミン 乳酸 ケトン体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞の生理的な機能とは、摂食/絶食のような生理的な栄養状態の変化に応じて余剰なエネルギーを蓄積し、必要に応じて放出することである。摂食/絶食サイクルによって、インスリンやグルカゴンなどの内分泌因子や脂肪細胞局所のアディポサイトカイン、細胞内の生理的な酸化ストレスが増減し、その結果として脂肪細胞の糖取り込みが変化し、解糖系や TCA サイクルの中間代謝産物の量が変化する。このような生理的狀態および肥満病態における脂肪細胞の代謝性変化を明らかにするために、申請者は肥満モデルマウスの脂肪組織を用いた代謝物解析を行った。その結果、肥満モデルマウスの脂肪組織では乳酸が増加していることを見出した (Hosogai N. et al. *Diabetes*. 2007 56:901)。さらに、糖尿病治療薬である SGLT2 阻害薬投与マウスのメタボローム解析では脂肪組織のケトン体やグルタミンが増加することを見出した (Nishitani S. et al. *Sci Rep*. 2018 8:8805)。ケトン体 (3HBA:3hydroxy-butyrate) の作用を培養脂肪細胞で解析したところ、3HBA 自体が、脂肪細胞のヒストンにヒドロキシブチル修飾を生じることで、脂肪細胞機能に重要なアディポネクチンの発現をエピジェネティックに制御することを見出した (Nishitani S. et al. *Sci Rep*. 2018 8:8805)。また、抗炎症作用を示す EPA (eicosapentaenoic acid) によって脂肪組織で増加する代謝物の解析から、培養マクロファージに対して抗炎症作用を示す 2 つの代謝物を見出した (Nishitani S. et al. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018 Dec 10)。3HBA は絶食時に産生される代謝物であり、飢餓状態すなわち全身性のエネルギー枯渇を示す代謝物である。本研究結果を敷衍して、全身の栄養状態変化を反映した脂肪細胞の代謝物が、脂肪細胞機能を制御する可能性を想定した。

2. 研究の目的

脂肪細胞において、栄養因子であるケトン体や乳酸、グルタミンの産生制御機構、脂肪細胞に対する作用とシグナル伝達機構、全身の代謝に対する作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) グルタミン、2) 乳酸、3) ケトン体について以下の解析を行う

脂肪細胞において、栄養状態に関連したグルコースや脂肪酸、インスリン、グルココルチコイド、カテコラミンによって、これらの栄養因子の産生酵素の遺伝子発現量の変化を解析する。培養脂肪細胞の上清への分泌量の変化についても解析する。

培養脂肪細胞に対してこれらの栄養因子を添加し、アディポサイトカイン発現量やインスリンシグナル、インスリン依存性糖取り込み、脂肪酸生産酵素の発現量、細胞内中性脂肪含量を測定し、これらの代謝物が脂肪細胞機能に及ぼす作用を解析する。

培養脂肪細胞に対してこれらの栄養因子産生酵素の siRNA や酵素阻害剤を添加し、上記の脂肪細胞機能指標を解析する。

アディポネクチン Cre マウスを用いて脂肪細胞特異的乳酸産生酵素 (LDHA) 欠損マウスを作成した。グルコース負荷試験やインスリン感受性試験、脂質負荷試験、脂肪組織や肝臓の RNAseq による遺伝子発現量の解析を行い、脂肪細胞由来代謝物が脂肪組織および全身に及ぼす作用を解析する。

4. 研究成果

1) グルタミンの脂肪細胞における作用

3T3-L1 脂肪細胞の分化後にグルタミン合成酵素である Glu1 の遺伝子発現量が著明に増加した。既報の通り、アディポネクチンの発現量は著明に増加したが、グルタミン代謝酵素である Gl1s は有意な変化なかった。

マウス脂肪組織の分画を行ったところ、Glu1 は成熟脂肪細胞分画 (MAF) に多く、Gl1s は SVF 分画に多く、脂肪細胞がグルタミンを産生することが示唆された。

実際に成熟脂肪細胞において、培養上清中のグルタミンは 5 時間、24 時間で時間依存性に増加したが、未分化脂肪細胞ではグルタミン濃度は低値であった。さらに、グルタミン合成酵素阻害薬である MSO (L-methionine sulfoximine) を添加すると、成熟脂肪細胞のグルタミン濃度上昇は消失した。したがって、成熟脂肪細胞はグルタミン合成酵素依存的にグルタミンを産生し、培養上清中に放出することが明らかになった。

野生型マウスに対して 24 時間絶食負荷後の 24 時間摂食 (feed) と、48 時間絶食 (fast) を比較したところ、脂肪組織のグルタミンは有意に低下し、この時、脂肪組織では中性脂肪分解酵素である ATGL の発現量が有意に増加した。アディポネクチンは変化なく、グルタミン合成酵素 Glu1 の発現は変化なく、グルタミン代謝酵素である Gl1s の発現は増加した。

マウス脂肪組織における ATGL の発現誘導は Fasting における様々な因子の影響を受けた結果と考えられることから、培養脂肪細胞におけるグルタミン量の低下による ATGL 発現量の変化を解析した。培養脂肪細胞でグルタミン添加有無と MSO 添加有無で解析したところ、グルタミン添加なし、MSO を添加すると、脂肪細胞内のグルタミンが枯渇することを見出した。この 4 つの条件で脂肪細胞の ATGL 発現を解析すると、グルタミンが最も枯渇する条件で ATGL の遺伝子発現が増加した。ATGL の蛋白発現は、培養上清のグルタミン除去で増加した。

ATGL の mRNA 誘導について、グルタミン合成酵素阻害剤である L-2aminoadipic acid の添加でも同様の結果を確認した。

グルタミン枯渇による ATGL 誘導が、実際に中性脂肪分解に寄与することを確認するために、脂肪細胞に対してカテコラミン投与と MSO 投与を行った。カテコラミンによる中性脂肪分解によって、培養上清のグリセロール濃度は上昇するが、MSO によって、カテコラミン添加なしの条件でグリセロール濃度が上昇することを発見した (図 1)。以上より、実際にグルタミン枯渇状態では中性脂肪分解が亢進することが明らかになった。

グルタミン枯渇による ATGL 誘導のメカニズムを解析した。ATGL は FOXO1 の活性化で誘導されることが報告されている。実際に培養脂肪細胞において FOXO1 阻害剤である AS1842856 を投与すると、ATGL の mRNA 発現は低下し、ATGL 蛋白も低下した。また、グルタミン枯渇状態の培養脂肪細胞では FOXO1 のリン酸化が低下しており、FOXO1 が活性化していることが示された。以上より、グルタミン枯渇は FOXO1 の活性化を介して ATGL を誘導する可能性が示された。

2) 乳酸の脂肪細胞における作用

脂肪細胞特異的アディポネクチン Cre マウスと、乳酸産生酵素 LDHA の flox マウスを交配することで、脂肪細胞特異的 LDHA 欠損マウス (AdLDHAKO) を作出した。予想どおり、本マウスの LDHA 発現量は精巣周囲脂肪 (epi)、皮下脂肪 (sub)、褐色脂肪 (BAT) では低下しており、肝臓や骨格筋では変化なかった。本マウスの RNAseq や蛋白発現の網羅的解析の結果、本マウスではグルコーストランスポーターである Glut1 の発現量が半分程度に低下することを発見した。

この現象を培養脂肪細胞で確認したことを確認した。

図 2 LDHA の siRNA によって Glut1 の蛋白量が低下することを確認した。

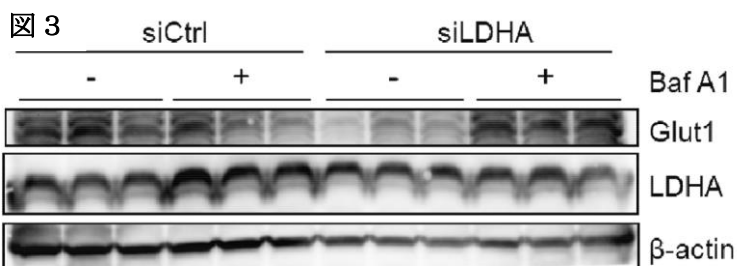
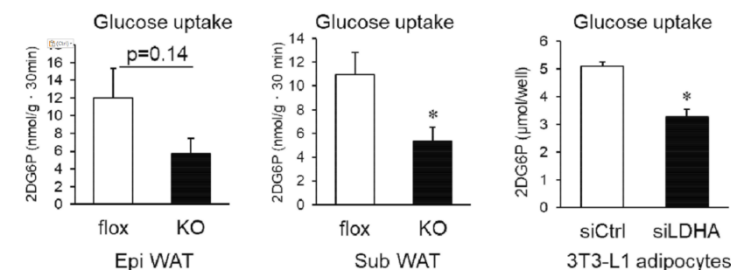
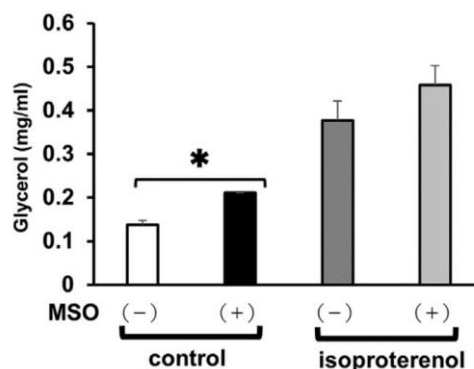
マウス脂肪組織における糖取り込みを測定したところ、KO マウスの精巣周囲脂肪 (epi)、皮下脂肪組織 (sub) では糖取り込みが有意に低下した (図 2)。

培養脂肪細胞における LDHA の siRNA でも同様に糖取り込みが低下した。

したがって、LDHA は Glut1 を介した糖取り込みに関与することが明らかになった。

今回の検討では Glut1 の制御メカニズムは解明できなかったが、BafilomycinA1 投与で低下した Glut1 蛋白の発現量が回復することから、LDHA 欠損によってリソソームにおける Glut1 分解が亢進する可能性が示された (図 3)

図 1 Glycerol



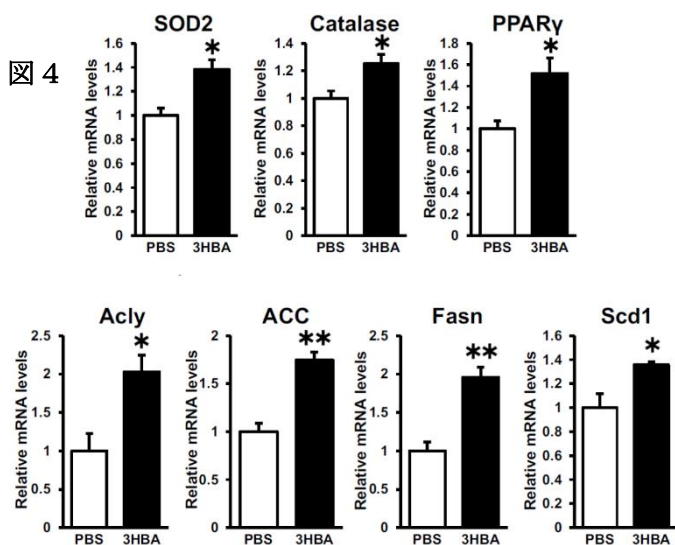
3) ケトン体の脂肪細胞における作用

ケトン体(3HBA)の脂肪組織における作用を解明するために、ケトン体合成酵素である HMGCS2 を全身性に欠損したマウス (KO) と野生型マウス (WT) に対して絶食 1 2 時間、摂食 1 2 時間の負荷後の脂肪組織の解析を行った。脂肪組織では SOD1 や Catalase(cata)などの抗酸化酵素の発現低下、アディポネクチンの発現低下、脂肪酸合成酵素である Scd1 の発現が低下することを発見した。

ケトン体(3HBA)の脂肪組織における作用を解明するために、野生型マウス (WT) に対して絶食 1 2 時間後に PBS または 3HBA を腹腔内投与し、摂食 1 2 時間の負荷後の脂肪組織の解析を行った。

脂肪組織では SOD2 や Catalase などの抗酸化酵素の発現増加、PPAR γ の発現増加、脂肪酸合成酵素である Acly, ACC, Fasn, Scd1 の発現が増加することを発見した (図 4)。

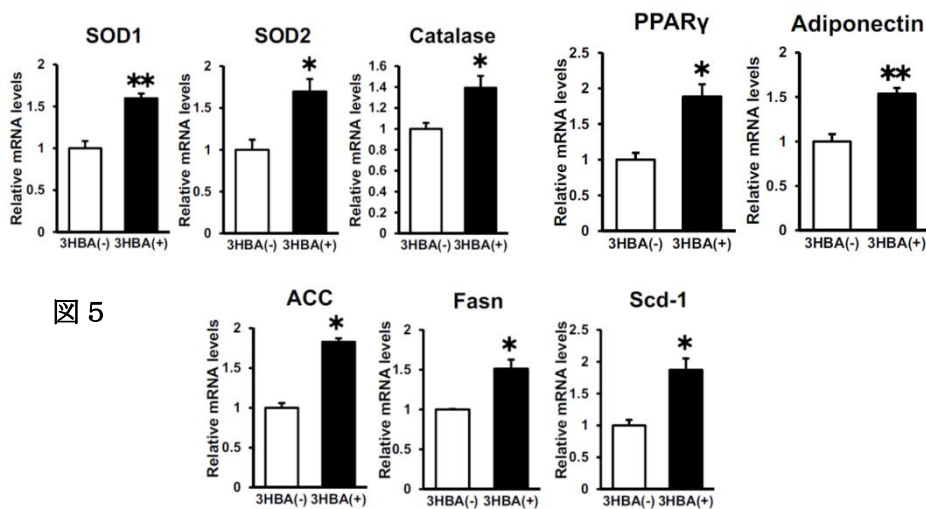
これらはケトン体合成が欠損した HMGCS2 欠損マウスとは反対の変化であった。



ケトン体(3HBA)の脂肪組織における作用を解明するために、培養脂肪細胞に対して PBS または 3HBA を投与し、インスリン刺激 2 4 時間後の解析を行った (図 5)。

脂肪細胞では SOD1、SOD2、Catalase などの抗酸化酵素の発現増加、PPAR γ とアディポネクチンの発現増加、脂肪酸合成酵素である ACC, Fasn, Scd1 の発現が増加することを発見した。

これらはケトン体を投与したマウスと同様の変化であった。これらの結果から、飢餓状態で HMGCS2 によって産生されるケトン体(3HBA)は、摂食状態における脂肪細胞の機能を亢進させることが明らかになった。飢餓状態における疲弊した脂肪細胞機能を効率的に回復させる保護機構であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okuro Kenta, Fukuhara Atsunori, Minemura Tomomi, Hayakawa Tomoaki, Nishitani Shigeki, Okuno Yosuke, Otsuki Michio, Shimomura Iichiro	4. 巻 585
2. 論文標題 Glutamine deficiency induces lipolysis in adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.043	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 Minemura Tomomi, Fukuhara Atsunori, Otsuki Michio, Shimomura Iichiro	4. 巻 607
2. 論文標題 Lactate dehydrogenase regulates basal glucose uptake in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 20 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.113	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 Nishitani Shigeki, Fukuhara Atsunori, Tomita Issei, Kume Shinji, Shin Jihoon, Okuno Yosuke, Otsuki Michio, Maegawa Hiroshi, Shimomura Iichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Ketone body 3-hydroxybutyrate enhances adipocyte function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14268-w	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峰村 友美, 福原 淳範, 大月 道夫, 下村 伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞乳酸産生は脂肪細胞への糖取り込みを制御する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷重紀, 福原淳範, 大月道夫, 下村伊一郎
2. 発表標題 ケトン体による脂肪細胞機能制御
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大畔健太, 福原淳範, 大月道夫, 下村伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞分化におけるglutamine生合成の意義
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰村友美, 福原淳範, 大月道夫, 下村伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞乳酸産生は脂肪細胞への糖取り込みを制御する
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西谷重紀, 福原淳範, 大月道夫, 下村伊一郎
2. 発表標題 ケトン体による脂肪細胞機能制御
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福原淳範
2. 発表標題 新たな脂肪細胞機能制御と肥満症治療
3. 学会等名 第42回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西谷 重紀, 福原 淳範, 申 智勲, 奥野 陽亮, 大月 道夫, 下村 伊一郎
2. 発表標題 ケトン体による脂肪細胞機能制御
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峰村 友美, 福原 淳範, 大月 道夫, 下村 伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞乳酸産生酵素LDHAによる脂質代謝制御
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大畔 健太, 福原 淳範, 西谷 重紀, 林 令子, 大月 道夫, 下村 伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞におけるグルタミン生合成制御の解析
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 峰村友美、福原淳範、大月道夫、下村伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞乳酸産生は脂肪細胞への糖取り込みを制御する
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰村 友美, 福原 淳範, 大月 道夫, 下村 伊一郎
2. 発表標題 脂肪細胞乳酸産生は脂肪細胞への糖取り込みを制御する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西谷重紀, 福原淳範, 下村伊一郎
2. 発表標題 ケトン体による脂肪細胞機能制御
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大畔健太, 福原淳範, 峰村友美, 西谷重紀, 奥野陽亮, 大月道夫, 下村伊一郎
2. 発表標題 Glutamine欠乏は脂肪細胞における中性脂肪分解を促進する
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
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	大月 道夫 (Otsuki Michio) (00403056)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	奥野 陽亮 (Okuno Yosuke) (10534513)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------