

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11601

研究課題名(和文) スフィンゴシン1-リン酸産生を起点とした新規熱産生機構の解明と肥満治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of thermogenic mechanism through sphingosine 1-phosphate production and its application to obesity treatment

研究代表者

盛重 純一 (Morishige, Jun-ichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50423405

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)：生理活性脂質スフィンゴシン1-リン酸(S1P)が褐色脂肪細胞の熱産生系においてどのような役割を果たしているかを検討した。その結果、S1Pの産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ1(SphK1)が褐色脂肪細胞のリソソームに局在してS1Pを産生していること、Sphk1の遺伝的欠損によりリソソーム数が減少することを見出した。また、Sphk1欠損マウスの褐色脂肪細胞ではリソソーム機能の低下が原因と考えられる脂肪蓄積も観察された。さらにSphk1欠損マウスは寒冷環境での体温維持能が野生型マウスよりも低く、これはリソソームによる脂肪分解(燃料供給)の低下が原因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、リソソーム恒常性の維持にS1P代謝が重要な一端を担っており、リソソームでのS1P代謝の異常はリソソーム恒常性の破綻につながる可能性を示したものであった。これが褐色脂肪細胞で生じれば寒冷曝露時のみならず定常時の熱産生(エネルギー消費)の低下を引き起こし、肥満や代謝性疾患の発症や悪化につながると予想される。薬理学的手法によりS1P代謝異常を是正してリソソーム恒常性の変容が改善できれば、基礎的なエネルギー消費量の増加、延いては内臓脂肪の減少や肥満解消につながり、将来的には有用な肥満の治療法・予防法として臨床応用できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of the bioactive lipid sphingosine 1-phosphate (S1P) in brown adipocytes. We found that S1P-synthesizing enzyme sphingosine kinase 1 (SphK1) largely localized in the lysosomes of brown adipocytes. In addition, genetic deletion of Sphk1 reduced the number of lysosomes in brown adipocytes. Interestingly, brown adipose tissue of Sphk1-deficient mice showed greater triglyceride accumulation with dominant larger lipid droplets in brown adipocytes, possibly due to reduced lysosome-mediated lipolysis. Furthermore, Sphk1-deficient mice resulted in mild hypothermia upon cold environments than wild-type mice. Because the process of mitochondrial thermogenesis itself in brown adipose tissue of Sphk1-deficient mice was probably comparable with wild-type mice, the decreased fuel supply by impaired lysosomal activity could, at least in part, be involved in hypothermia of Sphk1-deficient mice.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 スフィンゴシンキナーゼ リソソーム 褐色脂肪細胞 トリグリセリド

1. 研究開始当初の背景

肥満は、カロリーの過剰摂取や運動不足などでエネルギーの摂取と消費のバランスが崩れ、慢性的にエネルギー摂取が上回ると発症する病態である。現在、肥満およびその続発症である2型糖尿病や動脈硬化性疾患の患者数が増加の一途を辿っており、医療福祉や医療経済の点からも社会問題となっている。肥満治療で最も基本的な手段は、食事制限や運動によりエネルギーのバランスを消費に傾けて体重を減少させることである。しかし、肥満患者では身体活動量や褐色脂肪組織の活性の低下が認められており、このエネルギー消費が低下した中で減量を達成させることは容易ではない。そこでエネルギー消費を増やす手段として、脂肪として貯蓄したエネルギーを熱として消費（ミトコンドリアでの酸化的リン酸化を脱共役させてATPの代わりに熱を産生）し、寒冷環境下での体温維持や恒常的なエネルギー代謝に寄与する褐色脂肪細胞に注目した。活性化した褐色脂肪組織では熱産生の促進因子が増加すると仮説してまず因子の探索を行ったところ、生理活性化脂質のスフィンゴシン1-リン酸(S1P)が約2倍に増加していることを見出した。研究開始当初、このS1P産生が寒冷誘発性熱産生と関連することを示唆する結果をいくつか得ていたが、その機構については多くの部分が不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、2種類のS1P産生酵素欠損マウスを用いて褐色脂肪組織のS1P産生が熱産生とどのように関わっているかを検証し、得られた知識に基づき褐色脂肪組織の熱産生制御機構を標的とした肥満治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) *Sphk* 遺伝子欠損マウスを用いた解析

8週齢の雄性 *Sphk1* 欠損マウス、*Sphk2* 欠損マウスおよび野生型マウスを自由摂餌のもとで室温(23°C)または寒冷(4°C)で24時間飼育した。マウスの直腸温を測定した後に褐色脂肪組織を摘出し、qPCR、ウェスタンブロット、脂質量、HE染色および免疫蛍光染色を行った。

(2) 初代褐色脂肪細胞を用いた解析

3週齢の雄性野生型マウスと *Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪組織から常法に従って調製した間質血管細胞群を褐色脂肪細胞へ分化誘導した。実験には分化7日目の細胞を使用し、qPCR、ウェスタンブロット、脂質量、脂肪分解活性測定および免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

(1) 以前、寒冷刺激を受けたマウスの褐色脂肪組織ではS1Pが約2倍に増加することを明らかにした。このとき *Sphk2* は寒冷刺激の有無でタンパク質レベルの変化は認められなかったが、*Sphk1* は2.3倍に増加した。さらに寒冷刺激を受けたマウスの褐色脂肪組織では1型(S1PR₁)と3型(S1PR₃)のS1P受容体のmRNAの発現上昇も認められた。これらの結果を受け、まず寒冷刺激により産生されたS1PがS1P受容体を介して熱産生に寄与しているか否かを検討した。しかしながら、脂肪分解など褐色脂肪細胞の熱産生と関連する複数の反応系に対してS1PやS1P受容体の特異的的刺激薬は生理的濃度を超える濃度(10 μM)で処理しても生理的な交感神経刺激のノルアドレナリンと比べ非常に弱い効果しか示さなかった(図1)。そのため褐色脂肪組織において産生されたS1Pは、S1P受容体を介さずに細胞内で熱産生に寄与していると考えられた。

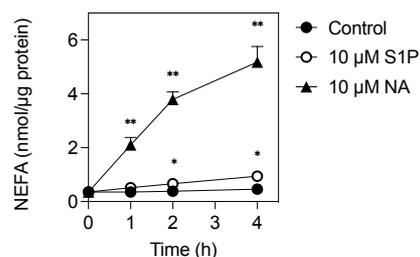


図1. S1Pが誘導する脂肪分解は弱い

(2) 次に褐色脂肪組織を抗 *Sphk1* 抗体で免疫染色して *Sphk1* の細胞内局在の同定を試みた。その結果、強い *Sphk1* 陽性のドット状シグナルが検出され、このドット状シグナルは寒冷刺激により増加した(図2A)。*Sphk1* を種々のオルガネラマーカと共染色した結果、*Sphk1* 陽性シグナルはリソソームマーカ LAMP1 と LAMP2 と局在が一致した(図2B,C)。*Sphk1* のリソソーム局在は、細胞分画法で単離したリソソーム画分から *Sphk1* が検出されたことから確認さ

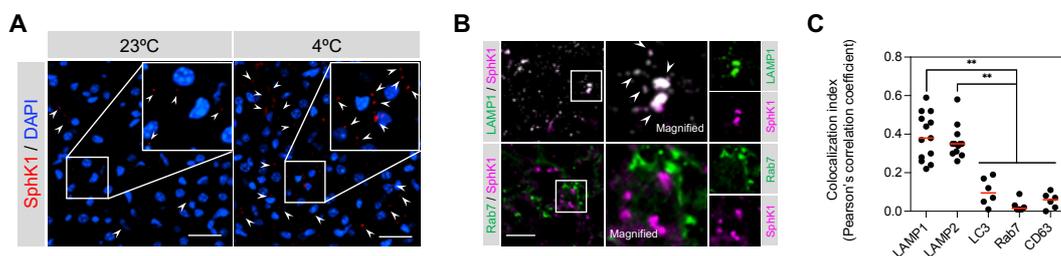


図2. 寒冷曝露したマウスの褐色脂肪組織では *Sphk1* 陽性シグナルが増加する(A)。この *Sphk1* 陽性シグナルはリソソームマーカと局在が一致する(B、C)

れた。さらに褐色脂肪細胞のリソソームで S1P が産生されるかについて蛍光標識した S1P 基質 (NBD-Sph) を用いて検証したところ、リソソーム画分から NBD-S1P が検出された。この NBD-S1P レベルは薬理的な SphK1 の阻害や S1P 分解酵素の阻害により増減したことから褐色脂肪細胞のリソソームで SphK1 により S1P 産生が生じていると考えられた。

(3) 次に褐色脂肪細胞のリソソーム機能や褐色脂肪組織の活性における SphK1 の役割について、遺伝的に *Sphk1* を欠損させたマウスを用いて検証した。まず *Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪組織を抗 LAMP1 抗体で免疫染色したところ、LAMP1 陽性のドット状シグナルが野生型マウスよりも少ない、すなわちリソソーム数が減少していることが明らかとなった (図 3)。野生型マウスでは LAMP1 陽性のドット状シグナルが寒冷曝露により増加していたが、*Sphk1* 欠損マウスではその増加も認められなかった (図 3)。このリソソームの減少は、*Sphk1* 欠損マウスより調製した初代褐色脂肪細胞でも確認された。*Sphk1* 欠損マウス由来の褐色脂肪細胞へ GFP-SphK1 を遺伝子導入するとリソソーム数の減少がレスキューされたことから、SphK1 とリソソーム生合成との繋がりが示唆された。さらにリソソーム生合成の低下の分子メカニズムについて検討した結果、*Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪組織ではリソソーム生合成の主要制御因子、TFEB の核内移行に軽微な障害が生じており、TFEB 標的遺伝子群の発現レベルも野生型マウスと比べ 15~30%程度低下していることが明らかとなった。これらの結果から、リソソームに局在する SphK1 は少なくとも部分的に TFEB を介してリソソーム恒常性の維持に寄与していると考えられた。

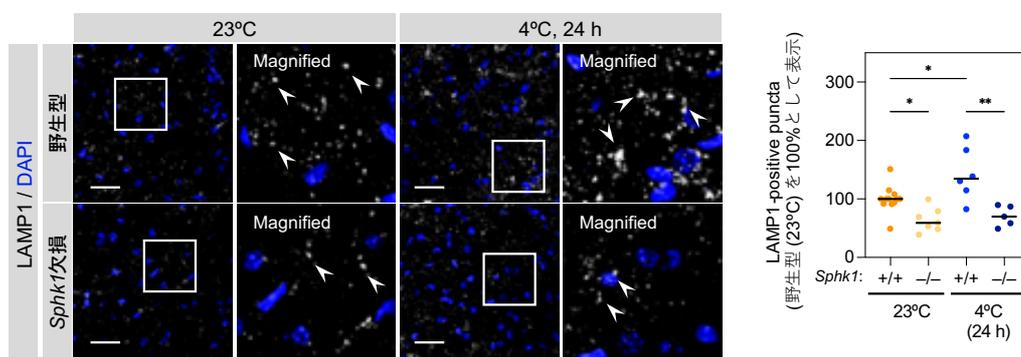


図3. *Sphk1*欠損マウスの褐色脂肪組織ではLAMP1陽性シグナルが低下する

(4) 褐色脂肪細胞においてリソソームはオートファジーによる脂肪滴の分解に関わっているため、*Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪組織では野生型マウスよりも脂肪が蓄積していると予想された。実際、*Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪組織では野生型マウスよりも大きいサイズの脂肪滴の割合が高く、野生型マウスよりも約 1.7 倍高いトリグリセリド値を示した (図 4A, B)。この脂肪蓄積がリソソーム機能の低下に起因するのかを検証したところ、*Sphk1* 欠損マウスの褐色脂肪細胞ではリソソーム酸性リパーゼ活性が野生型マウスよりも低く、オートファジー障害により脂肪滴の分解が滞ることを示す染色像が観察された。一方、細胞質での脂肪滴分解に重要な働きを担う脂肪細胞特異的トリグリセリドリパーゼやホルモン感受性リパーゼは、mRNA レベル、タンパク質レベルおよび酵素活性の何れにおいても野生型マウスと *Sphk1* 欠損マウスで差は認められなかった。さらに薬理的にリソソーム活性を阻害した場合、元々リソソーム活性が低下している *Sphk1* 欠損褐色脂肪細胞の方が野生型の褐色脂肪細胞よりも細胞内トリグリセリドの増加率が小さかった。これらの結果は、褐色脂肪細胞の脂肪滴の恒常性維持にリソソームの脂肪分解が重要であり、SphK1 による S1P 産生はその機構の一端を担っていることを示唆している。

(5) 最後に *Sphk1* 欠損マウスを寒冷曝露して熱産能力を検証したところ、野生型マウスと比べ軽微ではあるが有意な体温低下が観察された (図 4C)。このとき、*Sphk1* 欠損マウスの摂餌量や血清中のトリグリセリド、コレステロールおよび遊離脂肪酸レベルは野生型マウスと差はなか

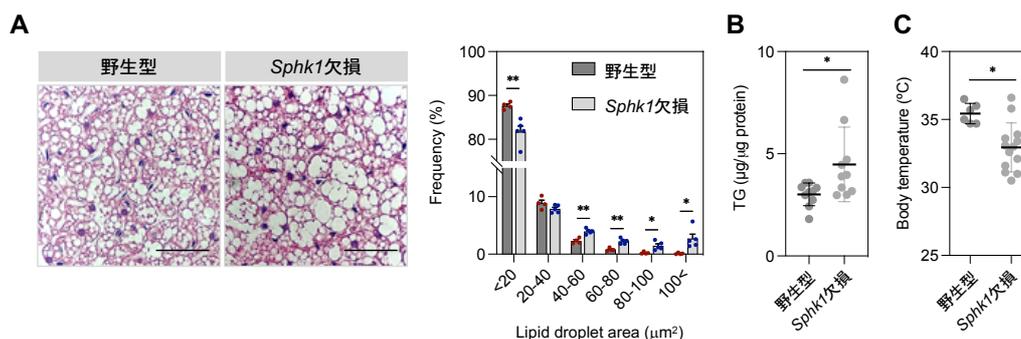


図4. *Sphk1*欠損マウスの褐色脂肪組織では大きいサイズの脂肪滴が増加しており (A)、脂肪含量も高い (B)。また、寒冷環境下での体温が低い (C) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

った。さらに褐色脂肪細胞の熱産生に関わるオルガネラであるミトコンドリアについても *Sphk1* 欠損マウスと野生型マウスとで大きな差異は認められなかった。この熱産生能の低下に関し、これまでに褐色脂肪組織のリソソーム酸性リパーゼが欠損すると重度の低体温症を示すことが他の研究グループにより報告されている (*Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1863: 467, 2018)。さらにごく最近、我々のグループも褐色脂肪組織において脂肪酸の生成と利用が障害されると熱産生能が低下することを報告した (*Mol Metab* 49: 101202, 2021)。これらの知見を考慮すると、リソソーム活性の低下による燃料供給の低下が *Sphk1* 欠損マウスの低体温に少なくとも部分的に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 盛重 純一, 吉岡 和晃, 田中 保, 多久和 陽, 安藤 仁
2. 発表標題 褐色脂肪組織におけるスフィンゴシンキナーゼ1の機能解析
3. 学会等名 第63回脂質生化学会
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
研究分担者	吉岡 和晃 (Yoshioka Kazuaki) (80333368)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	

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