

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19709

研究課題名（和文）肥満形成過程における褐色脂肪機能不全メカニズムの解明

研究課題名（英文）The decreased thermogenic activity in brown fat during the development of obesity

研究代表者

黒田 雅士（KURODA, Masashi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：00803579

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）：褐色脂肪細胞は熱産生機能を有し、全身のエネルギー代謝に関与する一方、肥満状態ではその機能低下が報告されており、褐色脂肪機能不全がエネルギー恒常性破綻と肥満形成に寄与すると推察される。本研究ではDNAマイクロアレイおよび転写因子結合予測解析を組みあわせることで、褐色脂肪機能に関与しうる転写因子としてIRF7（Interferon Regulatory Factor 7）を同定した。IRF7欠損マウスでは褐色脂肪での熱産生関連遺伝子が野生型に比べて高発現であり、寒冷環境下での直腸温が高く維持されていた。また、高脂肪食給餌下における体脂肪増加が抑制され、耐糖能の改善が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満形成における褐色脂肪機能不全については、褐色脂肪組織内での炎症や過剰な酸化・小胞体ストレスの関与が指摘されてきた。炎症や種々のストレスは肥満ともに進展し、熱産生低下の増悪因子であると考えられるが、実際には炎症・ストレスマーカー遺伝子が誘導されない程度の短期間マウスへ高脂肪食を給餌した際にも、既に熱産生関連遺伝子の抑制が生じていることから根本的な原因とは考えにくい。本研究は肥満に関わる褐色脂肪機能不全について、より本質的なメカニズムを明らかにし、肥満予防・治療法の確立に向けた基礎知見の獲得を試みた。

研究成果の概要（英文）：Energy expenditure for thermogenesis in brown adipose tissue serves to maintain whole body energy homeostasis, but during the development of obesity, this thermogenic function is impaired. In this study, by combining DNA microarray analysis of brown fat, and the prediction of transcription factor binding analysis, we have identified the transcription factor, IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7) as a possible suppressor for thermogenesis in brown fat. IRF7 knockout mice showed increased expression of thermogenic genes in brown adipose and were more resistant to a cold environment than wild type control. Also, under high fat feeding condition, knockout mice showed improved adiposity and glucose tolerance. These data indicate that IRF7 is associated with the decreased thermogenic activity during the development of obesity.

研究分野：代謝栄養学

キーワード：褐色脂肪細胞 エネルギー代謝 熱産生 肥満 メタボリックシンドローム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病など生活習慣病の原因となる肥満はエネルギー恒常性維持機構の破綻が関与する。個体のエネルギー出納は“体内エネルギー状態の過不足”という情報が視床下部へ伝達され、エネルギー摂取と消費が調節されることで維持される。例えば体脂肪量に応じ脂肪細胞が血中へ放出するレプチンは視床下部に作用し、食欲抑制や交感神経を介したエネルギー消費の亢進を引き起こす。この時、エネルギー消費器官として褐色脂肪細胞が重要である。

脂肪蓄積機能を主とする白色脂肪細胞に対し、褐色脂肪細胞はエネルギー消費・熱産生作用を有する。褐色脂肪細胞に特異的に発現する脱共役タンパク質 (UCP1: Un-Coupling Protein1) はエネルギー消費・熱産生機構の鍵となる。ミトコンドリア内膜間に存在する UCP1 はプロトン濃度勾配を ATP 合成と脱共役させて熱へと変換・消費させる。交感神経終末より放出されるカテコラミンは $\beta 3$  アドレナリン受容体 アデニル酸シクラーゼ cAMP Protein Kinase A の経路により PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ ) を活性化させ、ミトコンドリア生合成や UCP1 発現を誘導することにより熱産生機構を制御する。一方、UCP1 欠損マウスでは食事誘導性熱産生やレプチンによるエネルギー消費亢進作用は減弱し、野生型マウスに比べて肥満しやすいことが知られる (Am J Physiol Endocrinol Metab. 316:E729-E740, 2019. *Obes Res Clin Pract.* 1: 223-290, 2007. )。

一方、肥満状態では褐色脂肪細胞の機能不全が観察される。肥満モデルマウスを用いた検討では褐色脂肪細胞により構成される褐色脂肪組織 (BAT: Brown Adipose Tissue) の酸素消費量の減少や UCP1 発現の低下が見出されており、また交感神経の活性化を伴う寒冷暴露などの刺激に対しても十分量の UCP1 発現が誘導されない。さらにヒトを対象とした研究でも BAT の量や活性が体格指数や体脂肪量などの肥満関連指標と負に相関することなどが報告される。

以上のように、肥満状態では褐色脂肪細胞の機能不全状態が形成されており、このエネルギー代謝破綻が肥満形成へ寄与している可能性が考えられるが、その分子機序については十分に明らかではない。

### 2. 研究の目的

NCBI データベースにてマウス BAT の DNA マイクロアレイデータ (Kim HS et al. *Gene.* 565(1): 15-21, 2015. ) を取得し、高脂肪食開始直後 (2 週間) に誘導される遺伝子群を同定した。さらに領域配列データベースによる転写因子結合予測解析を行い、同定された遺伝子群の発現に関わる転写因子の探索を試みた。その結果、Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) を同定した。本研究では転写因子 IRF7 が褐色脂肪機能抑制に関与し、肥満や代謝異常の形成に寄与すると仮説を立て、“IRF7 による熱産生機構抑制メカニズムの解明および上流または標的分子をターゲットとした医療応用への基盤確立”を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験

野生型および IRF7 欠損マウスは 4 週齢時より通常食または高脂肪食を給餌し、経時的に体重および摂餌量を測定した。28 週齢時点で各組織を採取・計量し、遺伝子発現解析および組織学的評価に用いた。

エネルギー代謝測定および寒冷暴露実験には体重・体組成に影響がない短期間 (3 週間) 高脂肪食を給餌したマウスを使用した。寒冷暴露実験は 8 週齢にて実施し、暴露開始前と開始後 3 時間および 24 時間後に直腸温を測定した。

#### (2) 細胞培養実験

レトロウイルスにより IRF7 を過剰発現させた 3T3-L1 培養細胞を insulin、triiodothyronine などを含む分化誘導培地で処理して熱産生型培養脂肪細胞を作製し、mRNA 遺伝子発現解析に使用した。

pGL4.19 にマウス UCP1 遺伝子プロモーター (-1529 ~ +549nt) を挿入したレポーターベクターを作製し、IRF7 や PGC1 $\alpha$  発現ベクターとともに HEK293 細胞に co-transfection 後、ルシフェラーゼ活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 体重・体組成およびエネルギー代謝の評価

IRF7 欠損マウスでは高脂肪給餌下における体重・体脂肪の増加が野生型に比べて劇的に抑制されていた。体重・体組成に影響がない短期間 (3 週間) 高脂肪食を給餌した野生型マウスでは BAT で UCP1 等の熱産生関連遺伝子の発現が抑制されていたが、IRF7 欠損マウスではこれら遺伝子発現は維持されており、エネルギー消費量も野生型に比べて有意に高値であった。

#### (2) 寒冷下における体温変化

短期間高脂肪食を与えた IRF7 欠損マウスでは寒冷環境下における直腸温度が野生型に比べて高く維持される傾向にあった。

( 3 ) 熱産生型 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子発現解析

作製した細胞にて、熱産生機能の鍵となる脱共役タンパク質 UCP1 やミトコンドリア関連遺伝子の発現解析を行った。IRF7 過剰発現 3T3-L1 ベージュ様脂肪細胞では UCP1 mRNA 発現が有意に低下した。また、DNA マイクロアレイ及び Gene Ontology 解析を実施したところ、IRF7 過剰発現脂肪細胞ではミトコンドリア関連遺伝子が低下していることが明らかとなった。

( 4 ) UCP1 プロモーター活性の評価

ミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターである PGC1 $\alpha$ はマウス UCP1 プロモーター活性を顕著に増加させた。一方で IRF7 を共発現させたところ、PGC1 $\alpha$ による UCP1 プロモーターの活性化が消失した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10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<br>Tsutsumi Rie, Yamasaki Yuki, Takeo Jiro, Miyahara Hiroko, Sebe Mayu, Bando Masahiro, Tanba Yousuke, Mishima Yuna, Takeji Kana, Ueshima Nanako, Kuroda Masashi, Masumoto Saeko, Harada Nagakatsu, Fukuda Daiju, Yoshimoto Ryoko, Tsutsumi Yasuo M, Aihara Ken-ichi, Sata Masataka, Sakaue Hiroshi | 4. 巻<br>237         |
| 2. 論文標題<br>Long-chain monounsaturated fatty acids improve endothelial function with altering microbial flora   | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Translational Research   | 6. 最初と最後の頁<br>16～30 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.trsl.2021.03.016  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Beppu Kana, Shono Hitoshi, Kawakami Ayuka, Takashi Tomoe, Watanabe Suzuno, Yoshida Akari, Kuroda Masashi, Fujimoto Chisa, Kanamura Ryo, Ohnishi Hiroki, Kondo Eiji, Azuma Takahito, Sato Go, Kitamura Yoshiaki, Tsutsumi Rie, Sakaue Hiroshi, Takeda Noriaki | 4. 巻<br>68            |
| 2. 論文標題<br>Dietary supplementation with monosodium glutamate with dietary balance such as protein, salt and sugar intake with increasing T1R3 taste receptor gene expression in healthy females  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Medical Investigation   | 6. 最初と最後の頁<br>315～320 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2152/jmi.68.315  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Morio Atsushi, Tsutsumi Rie, Satomi Shiho, Kondo Takashi, Miyoshi Hirotsugu, Kato Takahiro, Kuroda Masashi, Kitamura Tadahiro, Hara Kenta, Saeki Noboru, Sakaue Hiroshi, Tsutsumi Yasuo M. | 4. 巻<br>13      |
| 2. 論文標題<br>Leucine imparts cardioprotective effects by enhancing mTOR activity and mitochondrial fusion in a myocardial ischemia/reperfusion injury murine model                                     | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Diabetology & Metabolic Syndrome   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13098-021-00755-z  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Sebe Mayu, Tsutsumi Rie, Senoura Satoka, Kishi Jun, Iuchi Marina, Mishima Yuna, Tsutsumi Yasuo M., Kuroda Masashi, Harada Nagakatsu, Nakaya Yutaka, Kinoshita Seizo, Nishioka Yasuhiko, Sakaue Hiroshi | 4. 巻<br>5              |
| 2. 論文標題<br>Saturated fatty acids intake is associated with muscle atrophy in rheumatoid arthritis  | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>JCSM Rapid Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>86 ~ 101 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/rco2.53  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Morio Atsushi, Tsutsumi Rie, Kondo Takashi, Miyoshi Hirotsugu, Kato Takahiro, Narasaki Soshi, Satomi Shiho, Nakaya Erika, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Kitamura Tadahiro, Tsutsumi Yasuo M. | 4. 巻<br>31                |
| 2. 論文標題<br>Leucine induces cardioprotection in vitro by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling  | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>2979 ~ 2986 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.numecd.2021.06.025   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Okamatsu-Ogura Yuko, Kuroda Masashi, Tsutsumi Rie, Tsubota Ayumi, Saito Masayuki, Kimura Kazuhiro, Sakaue Hiroshi     | 4. 巻<br>113                   |
| 2. 論文標題<br>UCP1-dependent and UCP1-independent metabolic changes induced by acute cold exposure in brown adipose tissue of mice | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Metabolism  | 6. 最初と最後の頁<br>154396 ~ 154396 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.metabol.2020.154396   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Harada Nagakatsu, Gotoda Yuka, Hatakeyama Adzumi, Nakagawa Tadahiko, Miyatake Yumiko, Kuroda Masashi, Masumoto Saeko, Tsutsumi Rie, Nakaya Yutaka, Sakaue Hiroshi | 4. 巻<br>41              |
| 2. 論文標題<br>Differential regulation of Actn2 and Actn3 expression during unfolded protein response in C2C12 myotubes   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Muscle Research and Cell Motility  | 6. 最初と最後の頁<br>199 ~ 209 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10974-020-09582-7  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Miyatake Yumiko, Mishima Yuna, Tsutsumi Rie, Otani Tamaki, Suemasa Naoya, Masumoto Saeko, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi        | 4. 巻<br>528             |
| 2. 論文標題<br>Assessment of insulin resistance in the skeletal muscle of mice using positron emission tomography/computed tomography imaging | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>499 ~ 505 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2020.05.165  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Hosooka Tetsuya, Hosokawa Yusei, Matsugi Kaku, Shinohara Masakazu, Senga Yoko, Tamori Yoshikazu, Aoki Chikako, Matsui Sho, Sasaki Tsutomu, Kitamura Tadahiro, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Nomura Kazuhiro, Yoshino Kei, Nabatame Yuko, Itoh Yoshito, Yamaguchi Kanji, Hayashi Yoshitake, Nakae Jun, Accili Domenico et al | 4. 巻<br>117                 |
| 2. 論文標題<br>The PDK1-FoxO1 signaling in adipocytes controls systemic insulin sensitivity through the 5-lipoxygenase-leukotriene B4axis   | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>11674 ~ 11684 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.1921015117   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Kuroda Masashi, Nishiguchi Misa, Ugawa Naho, Ishikawa Etsuko, Kawabata Yasuyo, Okamoto Saya, Sasaki Waka, Miyatake Yumiko, Sebe Mayu, Masumoto Saeko, Tsutsumi Rie, Harada Nagakatsu, Sakaue Hiroshi | 4. 巻<br>15      |
| 2. 論文標題<br>Interferon regulatory factor 7 mediates obesity-associated MCP-1 transcription  | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE   | 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)<br>10.1371/journal.pone.0233390   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>黒田 雅士、阪上 浩                   | 4. 巻<br>51            |
| 2. 論文標題<br>脂肪細胞熱産生機構における転写因子による制御      | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>内分泌・糖尿病・代謝内科                 | 6. 最初と最後の頁<br>23 ~ 27 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>黒田雅士、茶本凜、富永玲奈、田村優実、松村英里佳、小川美季、堤理恵、阪上浩 |
| 2. 発表標題<br>DNAメチル化による脂肪細胞機能制御についての検討             |
| 3. 学会等名<br>第64回 日本糖尿病学会年次学術集会                    |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>黒田雅士、茶本凜、田村優実、富永玲奈、小林久呂枝、松村英里佳、和田安純、瀧下美由紀、藤田めい、堤理恵、阪上浩 |
| 2. 発表標題<br>DNA脱メチル化によるベージュ脂肪細胞様の熱産生細胞の作製                          |
| 3. 学会等名<br>第 54 回 日本栄養食糧学会 中国四国支部大会                               |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>黒田雅士、富永玲奈、田村優実、茶本凜、松村英里佳、小林久呂枝、和田安純、瀧下美由紀、藤田めい、志内哲也、堤理恵、阪上浩 |
| 2. 発表標題<br>エネルギー代謝調節機構における転写因子IRF7生理的意義の検討                             |
| 3. 学会等名<br>第25回アディポサイエンスシンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>和田安純、黒田雅士、田村優実、茶本凜、富永玲奈、小林久呂枝、松村英里佳、瀧下美由紀、藤田めい、堤理恵、阪上浩 |
| 2. 発表標題<br>脂肪組織由来MFG-E8はNASHでの肝慢性炎症・線維化を促進する                      |
| 3. 学会等名<br>第42回 日本肥満学会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松村英里佳、黒田雅士、富永玲奈、田村優実、茶本凜、小林久呂枝、和田安純、瀧下美由紀、藤田めい、志内哲也、堤理恵、阪上浩 |
| 2. 発表標題<br>転写因子IRF7によるエネルギー代謝調節機構の解明                                   |
| 3. 学会等名<br>第42回 日本肥満学会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |