

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21755

研究課題名(和文)褐色脂肪組織による骨格筋機能制御機構の解明 新規褐色脂肪欠失マウスを用いた検討

研究課題名(英文) Study on the Regulatory Mechanisms of the Function of Skeletal Muscle by Brown Adipose Tissue

研究代表者

後藤 剛 (Goto, Tsuyoshi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10550311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織(BAT)欠失マウス(BAT lessマウス)を用いて、BATによる骨格筋機能制御機構の解明を目的として各種検討を行った。

BAT less・対照マウスの骨格筋RNAを用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、筋繊維タイプや筋収縮関連遺伝子変化が認められた。骨格筋機能として運動機能について各種検討を行ったが、差異は認められなかった。筋再生への影響を検討したところ、BAT lessマウスにおいて、筋損傷後の筋再生関連遺伝子発現誘導の遅延および筋損傷初期の間質細胞集積の減弱が観察された。

以上より、BATの有無は運動能力に大きな影響を与えず、筋再生過程に影響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

BATは高い熱産生能を有し、肥満症の有力な標的組織となることから、これまでのBAT機能研究では「如何にBAT機能調節が為されているか」という受動的組織としての研究が大半であった。本研究結果はBATによる積極的な骨格筋機能制御機構の存在を示唆するものであり、学術的に意義深く、新たなBAT機能研究の方向性として今後の展開・発展が期待できる。また、来るべき超高齢化社会に向け骨格筋機能制御機構の解明は社会的関心の高い課題であり、本研究で示唆されたBATによる骨格筋機能制御機構の存在は将来的な応用が期待されることから、本研究結果は高い社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of brown adipose tissue (BAT) in the regulation of skeletal muscle function, we conducted several experiments using BAT less mice.

Transcriptome analysis in the skeletal muscle from BAT less and control mice revealed that mRNA expression levels of genes related to muscle fiber type and muscle contraction were changed between both genotype, suggesting that BAT functions are related to the regulation of skeletal muscle functions. Although we did not observe any changes in exercise capacity, changes in muscle regeneration process induced by cardiotoxin injection were detected. Delay in expression peak of genes related to muscle regeneration induced by cardiotoxin and suppression of the accumulation of stromal cells were observed in BAT less mice.

These findings indicated that BAT functions did not affect exercise capacity, but they might be related to muscle regeneration.

研究分野：食品機能学

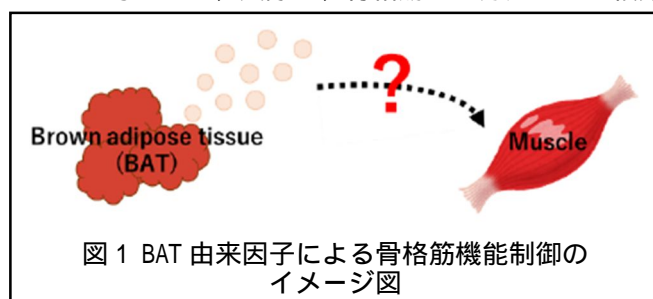
キーワード：褐色脂肪組織 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織 (BAT) は高い熱産生能を示し、肥満症の有力な標的組織として期待されている。特に成人に機能的 BAT が存在することが示された 2009 年以降、BAT の熱産生調節機構について精力的な研究が行われている。これまでの BAT に関する研究では「如何にして BAT の高い熱産生機能調節が為されているか」という研究が中心であり、BAT が積極的に他組織に働きかける、という観点からの研究は十分に行われているとは言えない。BAT と同様に脂肪蓄積機能を有する白色脂肪組織が多様な液性因子を分泌することから BAT には多くの未知の内分機能的存在する可能性が高い。

先行研究において、申請者らは脂肪細胞におけるイソプレノイド生合成経路の欠損がアポトーシスを惹起し、動物個体において脂肪組織 (白色・褐色ともに) を欠失させることを明らかにした。BAT を特異的に欠損した実験動物モデルは、BAT の新たな機能解明に極めて有用なツールになると考え、褐色脂肪細胞特異的にイソプレノイド生合成経路を欠損させたところ、BAT のみを欠失したマウス (BAT less マウス) が得られた。BAT 機能の新たな側面を明らかにするうえで BAT 機能の特異的に欠失した BAT less マウスは極めて有用なツールになると考えられ、本研究計画の提案に至った。

体温調節を目的とした積極的な熱産生は、主に褐色脂肪組織 (BAT) と骨格筋で行われる。BAT と骨格筋は協調的に熱産生を担っていると考えられ、実際に、骨格筋より分泌される複数の生理活性物質が BAT 機能調節作用を有することが報告されている。一方で、BAT による骨格筋機能の制御機構に関する知見は少なく、BAT - 骨格筋間のクロストークの解明が期待される (図 1)。そこで本研究では、独自に樹立した BAT less マウスを用いて解析することで、骨格筋機能制御における BAT の役割を検討することとした。



## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では BAT による骨格筋機能の生理的制御機構の解明を目的として、種々の検討を行う。具体的には、独自に樹立した BAT less マウスを用いて、BAT の欠失が運動機能をはじめとする骨格筋機能に与える影響について検討を行う。

新たな骨格筋機能調節機構の解明は、超高齢化社会における運動器機能低下に起因した Quality of Life の低下にとっての解決策の一助となることが期待される。さらに、本研究による BAT・骨格筋による協調的な熱産生制御機構の解明は、世界的な健康問題である肥満や肥満関連疾患の予防・改善に資することも期待できる。そのため、本研究は社会的要求性の高い研究課題であるといえる。

## 3. 研究の方法

### 3-1. BAT less マウスの作成・性状解析

BAT less マウスは、イソプレノイド生合成経路の律速酵素である HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) の floxed マウス (*Hmgcr* (floxed/floxed) マウス) と褐色脂肪細胞に特異的に発現する UCP1 (uncoupling protein 1) の遺伝子発現制御領域支配下に Cre 組換え酵素を発現する、*Ucp1*-Cre マウスを交配させることで作成した。作成した BAT less マウスの BAT 機能は、麻酔下で  $\beta_3$ -アドレナリン受容体アゴニスト (CL316,243) を 1 mg/kg 腹腔内投与し、直腸温濃度を測定することで評価した。単離骨格筋の遺伝子発現プロファイルを検討するため大腿四頭筋より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。

### 3-2. 運動機能の評価

運動機能は、12 から 19 週齢のマウス (BAT less マウスおよび対照マウス (*Hmgcr* (floxed/floxed) マウス)) に対してトレッドミル装置に馴化させた後、走行能力試験を行うことで評価した。走行能力試験時には、呼吸ガス分析装置を用いてエネルギー代謝変化についても検討した。評価対象マウスに対する適正な走行条件を検討するため、傾斜角度、走行スピード、走行時間などの諸条件を検討した。最終的には、2 時間絶食させた対象マウスを、10 度の傾斜角度にて走行スピードを経時的に変化させることで評価した。採用したプログラムは以下のとおりである。5 m/min で 5 分間走行させた後、1 分ごとに 1 m/min の割合で走行スピードを 10 m/min まで上

昇させた。走行スピード 10 m/min で 5 分間走行後、1 分ごとに 0.5 m/min の割合で走行スピードを上昇させ、走行スピード 12.5 m/min で 5 分間走行させた。その後、同様に『1 分ごとに 0.5 m/min の割合で走行スピードを 5 分間上昇させたのち上昇後の走行スピードで 5 分間走行させた』。本操作（『』内の操作）を繰り返し、最終的に走行スピードを 20 m/min まで上昇させ、20 m/min のスピードで走行させた。実験目的により、20 m/min での走行時間は変化させ、持久運動能力の測定においては、各マウスが疲労困憊に至るまで走行させた。運動後のエネルギー代謝評価においては、20 m/min で 1 時間走行させた後、運動を停止した状態での呼気ガス分析を行った。運動終了後の血液中の生化学的指標の評価においては、20 m/min で 30 分間走行させた後、血中のグルコース、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (NEFA)、コレステロール、乳酸の濃度を酵素法にて測定した。

### 3-3. 筋再生機能の評価

筋再生能は Cardiotoxin (CTX) 投与により誘発される筋損傷後の回復度合いにより評価した。麻酔下で 13 - 16 週齢の BAT less マウスおよび対照マウスの対照部位を除毛したのち（除毛クリームを使用）左前脛骨筋に 10  $\mu$ M の CTX 溶液（生理食塩水に溶解）を 50  $\mu$ L 筋肉内注射することで筋損傷を誘発した。右前脛骨筋には対照として生理食塩水を筋肉内注射した。その後一定期間（5 - 30 日）通常条件下で飼育したのち、前脛骨筋を単離して組織学的解析および遺伝子発現解析を行った。

### 3-4. 褐色脂肪細胞分泌物が筋細胞分化に与える影響の検討

培養褐色脂肪前駆細胞株 HB2 細胞を常法にて褐色脂肪細胞へと分化誘導後、無血清培地へと交換し、培養上清 (CM) として回収した。得られた CM は限外膜ろ過により、分子量 3000 以下の低分子画分と分子量 3000 以上の高分子画分に分画した。マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は 2%ウマ血清にて筋管細胞へと 4-5 日間分化誘導を行った。C2C12 細胞分化誘導時に HB2 細胞由来の CM を添加することで、筋管細胞分化に対する CM の影響を検討した。筋管細胞分化率は筋管細胞のマーカーであるミオシン重鎖を免疫染色法にて染色し、染色強度により評価した。

## 4. 研究成果

### 4-1. BAT less マウスの作成・性状解析

通常環境下で飼育した BAT less マウスでは BAT 重量の低下が認められ、 $\beta$ 3-アドレナリン受容体アゴニスト投与による直腸温上昇も全く認められなかったことから、BAT 機能を欠失していることが示唆された。BAT less マウスの体重や白色脂肪組織重量などには大きな変化は認められなかった。雄性マウスの骨格筋重量に関しては、主要な骨格筋（大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋）の重量変化は認められなかった。雌性マウスにおいてはこれらの骨格筋の相対重量が BAT less マウスにおいて高値を示す傾向が認められた。

雄性の BAT less マウスと対照マウスの単離大腿四頭筋より採取した RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行い、変化の大きい遺伝子の gene ontology 解析を行ったところ、骨格筋の筋繊維タイプや筋収縮関連遺伝子変化が認められ、BAT による骨格筋機能制御機構の存在が示唆された。

### 4-2. 運動機能の評価

代表的な骨格筋機能として運動機能に着目し、トレッドミルを用いて BAT less マウスと対照マウスの運動機能の比較検討を行った。予備検討により、評価対照マウスにとっての適切と考えられる運動条件（傾斜角度、走行スピード、走行時間など）を決定した。決定条件下でトレッドミル運動中および運動後の酸素消費量、炭水化物燃焼量、脂質燃焼量を呼気ガス分析により検討を行ったものの、BAT less マウスと対照マウス間に有意な変化は認められなかった。持久運動能力においても両マウス間に有意な変化は認められなかった。運動後の血液生化学的指標として、乳酸量、グルコース量、中性脂肪量、遊離脂肪酸量、コレステロール量について検討したが、これらの値について両マウス間で差異は認められなかった。以上より、本検討条件下では BAT 機能はマウスの運動機能にほとんど影響を及ぼさないと判断した。

### 4-3. 筋再生機能の評価

次に筋再生への影響を検討すべく、両遺伝子型のマウス前脛骨筋 (TA) に Cardiotoxin CTX 溶液を投与して筋損傷を誘導し、その回復過程について比較検討を行った。経時的な組織学的解析、遺伝子発現解析により筋再生機能の評価したところ、雌性マウスでは、BAT less マウスにおいて、CTX 投与後に誘導される初期段階の筋再生関連遺伝子（筋衛星細胞増殖、炎症関連遺伝子など）の発現が早期に回復することが明らかになった。実際に CTX 投与後の TA を組織学的解析に供したところ、雌性の BAT less マウスでは、マクロファージと考えられる細胞の集積が早期に減弱する様子が観察され、筋再生遺伝子発現の変化との関連性が示唆された。雄性マウスにおいても CTX 投与後の筋再生関連遺伝子発現に一部同様の変化が認められた。以上より、BAT の有無は CTX 誘導性の筋再生過程に影響することが示唆された。

#### 4-4. 褐色脂肪細胞分泌物が筋細胞分化に与える影響の検討

上記のとおり、BAT less マウスにおいて筋再生の遅延が認められたことから、BAT 由来の液性因子が筋管形成に与える影響について、培養筋芽細胞株 C2C12 および培養前駆褐色脂肪細胞株 HB2 を用いた検討を行った。HB2 褐色脂肪細胞由来の CM 添加により、C2C12 における筋管形成が促進された。一方で、白色脂肪細胞株由来の CM 添加時には筋管形成促進作用は認められず、褐色脂肪細胞株由来の筋管形成促進物質の存在が示唆された。HB2 褐色脂肪細胞由来 CM を限外膜により分画し、筋管形成に対する影響を評価した。分子量 3000 以上の画分では筋管形成促進作用が認められた一方で、分子量 3000 以下の画分では活性は認められなかった。以上より、褐色脂肪細胞由来の筋管形成促進物質は分子量 3000 以上の物質であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 KWON Jungin, YEH Yu-Sheng、川原崎 聡子、岩瀬 麻里、毛利 晋輔、野村 亘、高橋 春弥、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 メバロン酸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41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 剛、岩瀬 麻里、常盤 颯志、瀬尾 茂人、向井 貴子、高橋 春弥、野村 亘、Jheng Huei-Fen、松村 成暢、楠堂 達也、大里 直樹、松田 秀雄、井上 和生、河田 照雄
2. 発表標題 白色脂肪組織の glycerol kinase は細胞内脂肪酸代謝調節を介して褐色化を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 旧食品分子機能学分野 HP  <a href="http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html">http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html</a></p>
--

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	瀬尾 茂人  (Seno Shigeto)  (30432462)	大阪大学・情報科学研究科・准教授    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高橋 春弥  (Takahashi Haruya)  (30750369)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	
研究分担者	井上 和生  (Kazuo Inoue)  (80213148)	京都大学・農学研究科・教授    (14301)	

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