

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20572

研究課題名（和文）肥満状態の脂肪細胞における α -アドレナリンシグナル減弱機構の解明と食品科学的応用

研究課題名（英文）Studies on mechanisms of catecholamine resistance in obese adipocyte and approaches in terms of food science

研究代表者

川原崎 聡子（KAWARASAKI, Satoko）

京都大学・農学研究科・特定研究員

研究者番号：60965169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒドロキシカルボン酸受容体1（HCAR1）の合成アゴニスト3,5-dihydroxybenzoic acid（DBA）は α -アドレナリンシグナルの抑制を介してUcp1発現量を低下させた。DBAはC57BL/6マウスにおいて4週で飼育した際の体温維持能を低下させ、 α -3-アドレナリン受容体活性化による直腸温の上昇を抑制した。生体内のHCAR1アゴニストである乳酸もDBAと同様に α -アドレナリン刺激下のUcp1発現量を減少させた。さらに、脂肪細胞特異的乳酸脱水素酵素A（LDHA）ノックアウトマウスでは寒冷刺激時の褐色脂肪組織内乳酸濃度が減少し、Ucp1発現量が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の結果より、HCAR1の活性化が α -アドレナリンシグナルの抑制を介してUCP1の転写や活性を抑制することおよび乳酸が動物個体においてもUcp1発現の調節に寄与している可能性が見出された。肥満状態では脂肪細胞において乳酸産生が亢進することが知られている。本研究の成果から、肥満時の脂肪組織において産生亢進した乳酸がHCAR1を活性化し、 α -アドレナリンシグナルを減弱させる可能性が考えられた。本研究で得られた結果は α -アドレナリン受容体アゴニストとHCAR1アンタゴニストを併用することにより肥満がある程度亢進した状態でも効果的にUCP1発現誘導を介した抗肥満効果を得られる可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：3,5-dihydroxybenzoic acid（DBA），a synthetic agonist of hydroxycarboxylic acid receptor 1（HCAR1），suppressed Ucp1 expression through inhibition of α -adrenergic signaling pathway. C57BL/6 mice treated with DBA could not maintain their body temperature during housed at 4 weeks. DBA also suppressed the increase in rectal temperature in mice treated with α -3-adrenergic receptor agonist. In addition, an endogenous HCAR1 agonist, lactate, reduced α -adrenergic receptor agonist-induced Ucp1 expression as well as DBA. Moreover, adipocyte-specific lactate dehydrogenase A（LDHA）knockout mice showed decreased lactate concentration in brown adipose tissue and increased Ucp1 expression after cold exposure.

研究分野：食品科学

キーワード：HCAR1 UCP1 乳酸 α -アドレナリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

脱共役タンパク質 1 (UCP1) は褐色・ベージュ脂肪細胞に存在し、熱産生を介して全身のエネルギー消費に寄与するタンパク質である [Arch Biochem Biophys. 2018; 657: 41-55]。肥満者の増加が世界的健康問題となっている今日、UCP1 は肥満予防・治療の標的分子として注目されている。UCP1 は交感神経活性化を介した β -アドレナリン受容体の活性化により発現が誘導されることが知られており、交感神経活性化作用を持つカプサイシンや茶カテキンなどは抗肥満作用を示す食品成分として注目を集めている。その一方で、肥満時には β -アドレナリンシグナルが減弱し、UCP1 発現誘導効果が低下することが知られており、その詳細なメカニズムは不明である。そのため、食品成分の抗肥満効果を最大限に得るためには、UCP1 発現誘導のみならず β -アドレナリンシグナルの増強も重要である。研究代表者は先行研究において β -アドレナリン刺激による UCP1 発現誘導の調節に寄与する可能性がある遺伝子としてヒドロキシカルボン酸受容体 1 (HCAR1) を見出した。HCAR1 は GPR81 とも呼ばれる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、Gi 共役型の GPCR として知られ、生体内のアゴニストとして乳酸が報告されている。肥満状態では、脂肪細胞数の増加に血管新生が追い付かず脂肪細胞が低酸素状態になり、乳酸産生が亢進することが知られている [Diabetes. 2022; 71: 637-652]。そのため、乳酸の産生亢進による HCAR1 の活性化が肥満時の β -アドレナリン刺激抵抗性による UCP1 発現誘導効果の減弱の一因である可能性がある。しかし、HCAR1 が脂肪細胞において β -アドレナリン刺激誘導性の UCP1 発現誘導調節に寄与しているかを評価した例はない。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では HCAR1 の肥満時の脂肪細胞における β -アドレナリン刺激抵抗性に対する寄与の解明の一端として、HCAR1 が脂肪細胞において β -アドレナリンシグナルおよび UCP1 発現調節に寄与しているかを細胞および動物個体において明らかにすることを目的として各種検討を行う。HCAR1 の合成アゴニストを用いて HCAR1 活性化時の UCP1 発現量や β -アドレナリンシグナルに対する影響を解明する。HCAR1 活性化の β -アドレナリンシグナルや UCP1 発現量への寄与が明らかになった後は、生体内に存在する HCAR1 アゴニストである乳酸が合成アゴニストと同様の効果を示すかを、外部から添加した乳酸および細胞内で産生された乳酸について評価する。

3. 研究の方法

HCAR1 の合成アゴニストが脂肪細胞の β -アドレナリンシグナルおよび UCP1 発現に及ぼす影響の検証

HCAR1 の合成アゴニストとして、3,5-dihydroxybenzoic acid (DBA) を用いた。褐色脂肪組織 (BAT) 由来脂肪細胞株に対して β -アドレナリン受容体アゴニストである isoproterenol (iso) と DBA を共添加し、4 時間後の *Ucp1* mRNA 発現量および細胞破碎液中の cAMP 濃度を測定した。また、iso 添加 2 時間後の転写因子 CREB のリン酸化レベルに DBA が及ぼす影響をウエスタンブロッティングにより評価した。さらに iso と DBA を共添加し 4 時間後の CREB の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。加えて、HCAR1 を siRNA によりノックダウンした BAT 由来脂肪細胞株に iso および DBA を添加した際の *Ucp1* mRNA 発現量を測定した。

HCAR1 の合成アゴニストが動物個体の熱産生能に及ぼす影響の検証

6 週齢の C57BL/6 マウスに対し、食塩水または 1 g/kg body weight (BW) の DBA を腹腔内投与した後、4 日で寒冷刺激を行い、寒冷刺激前および刺激後 0.5 時間および 2 時間後の直腸温を温度プローブを用いて測定するとともに、体表温度をサーモグラフィーを用いて測定した。また、5~7 週齢の C57BL/6 マウスに対して食塩水または 1 g/kg BW の DBA を腹腔内投与した後、脂肪組織に多く発現する β -アドレナリン受容体のアゴニストである CL316,243 を麻酔下で 1 mg/kg BW で皮下投与し、投与後 60 分までの直腸温を 1 分毎に記録した。

HCAR1 アゴニスト乳酸が脂肪細胞の UCP1 発現におよぼす影響の検証

BAT 由来脂肪細胞株に対して iso および乳酸を添加し、添加 4 時間後の *Ucp1* 発現量を測定した。HCAR1 をノックダウンした BAT 由来脂肪細胞株に対しても同様に iso および乳酸添加時の *Ucp1* mRNA 発現量を評価した。また、脂肪細胞の乳酸産生を亢進させる条件として 1%未満の低酸素条件下で 4 時間培養した BAT 由来脂肪細胞株の培養上清中の乳酸濃度および iso 添加時の *Ucp1* 発現量を通常酸素下で培養した細胞と比較した。HCAR1 をノックダウンした BAT 由来脂肪細胞株に対しても同様に低酸素条件下で培養した際の培養上清の乳酸濃度および *Ucp1* mRNA 発現量を評価した。

HCAR1 アゴニスト乳酸が動物個体の UCP1 発現量に及ぼす影響

脂肪細胞特異的な発現を示す Adiponectin のプロモーター支配下に Cre リコンビナーゼを発現する Adiponectin-Cre マウスと解糖系反応の結果生じたピルビン酸を乳酸に変換する乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) の floxed マウス ($Ldha^{flox/flox}$ マウス, Control マウス) を交配し、脂肪細胞特異的 LDHA ノックアウトマウス ($Ldha$ KO マウス) を作製した。6 週齢の Control マウスおよび $Ldha$ KO マウスを室温 (25) または 4 で 48 時間飼育した後褐色脂肪組織を採取し、組織内乳酸濃度および *Ucp1* の mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

HCAR1 の合成アゴニストが脂肪細胞のβ-アドレナリンシグナルおよび UCP1 発現に及ぼす影響の検証

BAT 由来脂肪細胞株において、DBA により iso 添加時の *Ucp1* mRNA 発現量が有意に減少した。この時、iso 添加時の細胞破砕液中の cAMP 濃度も DBA により有意に低下していた。さらに、DBA は iso 添加時の CREB のリン酸化を有意に抑制した。ルシフェラーゼ活性測定の結果、DBA は iso 添加時の CREB の転写活性も有意に抑制した。HCAR1 をノックダウンした BAT 由来脂肪細胞株においては、iso 添加時の *Ucp1* mRNA 発現量がノックダウンを行っていない細胞と比較して有意に増加し、DBA の効果は消失した。以上の結果より、HCAR1 の活性化はβ-アドレナリンシグナルの抑制を介して *Ucp1* 発現量を低下させることが示唆された。

HCAR1 の合成アゴニストが動物個体の熱産生能に及ぼす影響の検証

DBA を投与したマウスでは、対照マウスと比較して寒冷開始 2 時間後の直腸温が有意に減少し、体表温度も対照マウスよりも低下している様子が観察された。また、DBA を投与したマウスではβ3-アドレナリン受容体アゴニスト CL316,243 投与時の直腸温の上昇が顕著に抑制された。以上の結果から、HCAR1 の活性化は動物個体においてβ-アドレナリン刺激下での熱産生を抑制することが示唆された。

HCAR1 アゴニスト乳酸が脂肪細胞の UCP1 発現におよぼす影響の検証

BAT 由来脂肪細胞株において、乳酸は DBA と同様に iso 添加時の *Ucp1* 発現量を有意に減少させた。HCAR1 をノックダウンした細胞では、乳酸による iso 添加時の *Ucp1* 発現量の低下が一部回復した。低酸素条件で 4 時間培養した BAT 由来脂肪細胞株においては、培養上清中の乳酸濃度が有意に増加し、*Ldha* の mRNA 発現量も低酸素条件下で有意に増加していた。この条件において、iso 添加時の *Ucp1* 発現量が低酸素条件下で有意に減少した。低酸素による iso 添加時の *Ucp1* 発現量の抑制効果は、HCAR1 のノックダウンにより減弱した。この結果から、低酸素条件下での iso による *Ucp1* 発現誘導効果の減弱の一部は低酸素により産生が亢進した乳酸が HCAR1 を活性化させたことによるものと考えられた。以上の結果より、脂肪細胞により産生された乳酸は HCAR1 アゴニストとしてβ-アドレナリン刺激による *Ucp1* 発現誘導を阻害することが示唆された。

HCAR1 アゴニスト乳酸が動物個体の UCP1 発現量に及ぼす影響

作製した $Ldha$ KO マウスでは、BAT の *Ldha* 発現量が有意に減少していた。6 週齢の Control マウスおよび $Ldha$ KO マウスを室温 (25) または 4 で 48 時間飼育した結果、BAT の組織内乳酸濃度は Control マウスでは寒冷刺激により有意に増加したが、 $Ldha$ KO マウスでは増加しなかった。この時、BAT において寒冷刺激時の *Ucp1* 発現量が Control マウスと比較して $Ldha$ KO マウスで有意に増加していた。以上の結果から、脂肪細胞が産生した乳酸は動物個体において寒冷刺激時の *Ucp1* 発現を抑制している可能性が見出された。

上記の結果より、HCAR1 の活性化がβ-アドレナリンシグナルの抑制を介して UCP1 の転写や活性を抑制することが示唆された (図)。さらに、脂肪細胞が産生した乳酸が動物個体においても *Ucp1* 発現の調節に寄与している可能性が見出された。本研究の成果から、肥満時の脂肪組織におけるβ-アドレナリン受容体刺激抵抗性の一因として、肥満により産生亢進した乳酸が HCAR1 を活性化し、β-アドレナリンシグナルを減弱させることが考えられた。現在 HCAR1 のアンタゴニストは見出されていないが、本研究で得られた結果はβ-アドレナリン受容体アゴニストと HCAR1 アンタゴニストを併用することにより肥満がある程度亢進した状態でも効果的に UCP1 発現誘導を介した抗肥満効果を得られる可能性を示すものである。

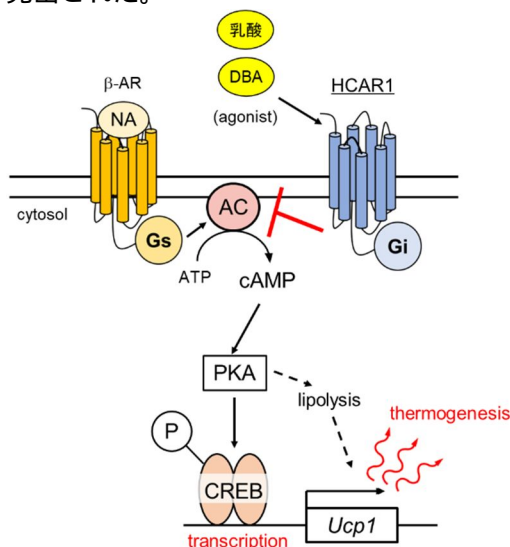


図: HCAR1 によるβ-アドレナリンシグナル阻害の概略図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川原崎 聡子, 瀬尾 茂人, 岡松 優子, 高橋 春弥, 野村 亘, 神戸 大朋, 木村 和弘, 斉藤 昌之, 松田 秀雄, 井上 和生, 後藤 剛
2. 発表標題 レポーター脂肪細胞株を用いた - アドレナリン刺激応答性UCP1発現誘導調節遺伝子の探索
3. 学会等名 第43回日本肥満学会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 川原崎 聡子, 瀬尾 茂人, 岡松 優子, 高橋 春弥, 野村 亘, 神戸 大朋, 木村 和弘, 斉藤 昌之, 松田 秀雄, 井上 和生, 後藤 剛
2. 発表標題 レポーター細胞株を用いた - アドレナリン刺激応答性UCP1転写調節遺伝子のスクリーニング
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川原崎 聡子, 瀬尾 茂人, 岡松 優子, 高橋 春弥, 野村 亘, 神戸 大朋, 木村 和弘, 斉藤 昌之, 松田 秀雄, 井上 和生, 後藤 剛
2. 発表標題 UCP1レポーター脂肪細胞株を用いた - アドレナリンシグナル調節遺伝子の探索
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------