

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06433

研究課題名(和文)肥満コントロールのための褐色脂肪細胞研究

研究課題名(英文)Research on brown adipocyte for controlling of obesity

研究代表者

大植 香菜(Oue, Kana)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：60760329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：PRIPは、Ins(1,4,5)P3結合性タンパク質として発見された分子である。本研究において、PRIPノックアウト(Prip-KO)マウスを用いてエネルギー消費メカニズムの解明を行った。Prip-KOマウスでは野生型マウスに比べて個体レベルのエネルギー代謝の亢進が起きていることが明らかとなった。またPRIP遺伝子を欠損させることで褐色脂肪細胞の非ふるえ熱産生の亢進のみならず、白色脂肪組織から分化するベージュ細胞でのエネルギー消費が亢進することが明らかとなった。よって、本実験からPRIPが生体のエネルギー代謝に関わる新しい調節分子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) was first identified as an inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein. In this study, I examined the mechanism of PRIP-mediated energy consumption by analysing PRIP knockout (Prip-KO) mice. Prip-KO mice showed higher ability to consume fatty acids as an energy source and higher activity in non-shivering thermogenesis in brown adipocytes than wild-type mice. Energy consumption in Prip-KO beige adipocytes, which are differentiated from subcutaneous white adipocytes in response to cold exposure, was also upregulated. Collectively, these results indicate that PRIP is a new modulator for regulating the systemic energy expenditure. Hence, this increased understanding of non-shivering thermogenic mechanisms via PRIP offers important insights for the treatment and control of obesity.

研究分野：医歯薬学外科系歯学歯科麻酔学

キーワード：褐色脂肪細胞 エネルギー代謝 UCP1 肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満患者は糖尿病などの代謝障害や高血圧・心筋梗塞のような心血管疾患など様々な合併症を有しており、また麻酔時に換気困難や気道確保困難に陥りやすく、全身麻酔や鎮静下での歯科処置は困難を要する。肥満は、脂肪の蓄積と消費のバランスの崩れによって引き起こされる。よって、白色脂肪細胞における脂肪の蓄積や分解の分子メカニズム、褐色脂肪細胞における非ふるえ熱産生機構の分子基盤を明らかにすることは、複雑な生体のエネルギー代謝を理解する一助となる。ひいては、肥満の新しい予防法や治療法の確立、肥満コントロールによる臨床での麻酔リスクの軽減に寄与することとなる。

我々の研究室では、PRIP というタンパク質脱リン酸化酵素と結合する分子を見出しその生理機能解明研究を行っていた。これまでに、PRIP 遺伝子欠損 (*Prip-KO*) マウスが野生型と比較して白色脂肪組織の蓄積量が少なく痩せた表現型を示すことを見出した。そして、*Prip-KO* マウスを解析して、脂肪代謝酵素 (HSL, hormone sensitive lipase) の細胞内局在制御には、PRIP とその結合分子である protein phosphatase 2A (PP2A) が関与することを示した。

HSL は、PKA によってリン酸化されると脂肪滴膜上にリクルートされ、脂肪分解を亢進する。一方、HSL の脱リン酸化反応は脂肪分解を“負”に制御することが分かっていたが、その調節機構の分子メカニズムは明らかとなっていなかった。これまでに、*Prip-KO* マウスから調整した初代培養白色脂肪組織を用いて、HSL の脱リン酸化調節には PRIP が PP2A を脂肪滴膜上にリクルートすることが重要であることを明らかにした (Okumura et al., PLoS ONE, 2014)。

Prip-KO マウスは PRIP が欠損しているために HSL の脱リン酸化が野生型と比較して起こりづらく、そのため白色脂肪組織において脂肪分解が亢進しているために、白色脂肪組織でエネルギーを貯蔵することは恒常的に起きにくい。しかしながら、野生型と比較して自発運動量は変わらず、摂餌量は同程度かむしろ多かった。さらに、肝臓などに異所性の脂肪蓄積像は見られない。そこで、*Prip-KO* マウスではエネルギー代謝が亢進していると考えその解析研究を行った。*Prip-KO* マウスに高脂肪食負荷実験を行なったところ、*Prip-KO* マウスはエネルギー過剰な状態でも脂肪蓄積が起きにくく、カロリーメータを用いた解析からエネルギー代謝が亢進して、耐肥満性を示すことが明らかになった。

そこで、内在性の主なエネルギー消費器官である褐色脂肪に着目し解析を進めた。褐色脂肪細胞は、ミトコンドリアを多く含む細胞内の脂肪滴を分解してミトコンドリア内膜の脱共役タンパク質 (uncoupling protein 1, UCP1) を活性化し、酸化的リン酸化反応を脱共役させ ATP の代わりに熱を産生する器官

である。近年、成人したヒトにおいても褐色脂肪細胞がエネルギー代謝調節に関わることが分かり、肥満治療の標的として注目を集めている。これまでの研究で我々は *Prip-KO* マウスの褐色脂肪組織では、野生型と比較して UCP1 の発現が増加していることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究を通して、PRIP は白色脂肪細胞のみならず、褐色脂肪細胞の熱産生機構も調節して生体のエネルギー消費機構を制御する分子であることが示唆できた。

そこで、PRIP の褐色脂肪細胞における機能と UCP1 の発現と活性化の調節機構をさらに詳しく解析して、PRIP を介したエネルギー代謝制御の分子メカニズムを解明し、肥満制御の新治療戦略の作出に繋げるための基礎研究を行う。

本研究では、*Prip-KO* 脂肪細胞に交感神経刺激 (アドレナリン刺激) を行い、野生型細胞と比較しながら PRIP を介したエネルギー代謝調節機構や白色脂肪細胞の褐色化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養褐色脂肪細胞の作製

4 週齢の野生型と *Prip-KO* マウスより肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理をした後に脂肪前駆細胞を分離し培養した。細胞が 80% コンフルエントになった状態で、分化誘導をかけて褐色脂肪細胞へと成熟させて実験に用いた。

(2) 初代培養褐色脂肪細胞を用いた実験

初代培養褐色脂肪細胞へアドレナリン β 受容体刺激を行う目的で、10 μ M イソプロテノールを作用させた。その後、サンプルを回収し UCP1 などの熱産生関連遺伝子の発現量を定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。また、western blot 法を用いて UCP1 のタンパク質発現や HSL やペリリピンのリン酸化レベルを解析した。

(3) 血清リポタンパク質分画中のトリアシルグリセロール濃度の測定

8 時間絶食させたマウスの尾から採血し、血清リポタンパク質分画中のトリアシルグリセロール濃度を LipiSEARCH (Skylight Biotech, 秋田、日本) に解析を依頼してゲルろ過 HPLC システムにより測定した。

(4) 寒冷刺激実験

20 週齢の野生型、*Prip-DKO* マウスそれぞれを 4 の低温環境下または 24 の部屋で 7 日間飼育した。マウスは通常食を自由摂食させ 1 頭ずつ個別のゲージで飼育し実験に用いた。その後、マウスから肩甲骨間褐色脂肪組織と鼠径部の皮下白色脂肪組織を摘出し、タンパク質を抽出し western blot 法でタンパク

質発現を解析した。

4. 研究成果

(1) *Prip*-KO マウスから分離した初代培養褐色脂肪細胞ではアドレナリン刺激により熱産生関連遺伝子の発現は増強される。

野生型と *Prip*-KO マウスの褐色脂肪組織より分離培養した初代培養褐色脂肪細胞にアドレナリン β 受容体刺激を行ったところ、野生型と比較して *Prip*-KO マウスの初代培養褐色脂肪細胞で mRNA レベルでの UCP1 や熱産生関連遺伝子の発現が増加した。また、UCP1 タンパク質発現も *Prip*-KO マウスの初代培養褐色脂肪細胞で増強した (図 1 上)。

また、アドレナリン刺激による HSL やペリリピンなどのリン酸化レベルは野生型と比較して *Prip*-KO マウスの初代培養褐色脂肪細胞で上昇しており (図 1 下) 細胞内の脂肪滴分解の亢進が起きていた。

この結果より、アドレナリン刺激により *Prip*-KO マウスの褐色脂肪細胞では、UCP1 の発現増加と、細胞内に存在する脂肪滴の分解亢進が生じており、細胞内脂肪滴の分解亢進によって増加した遊離脂肪酸により UCP1 の活性化が起こり、UCP1 を介した非ふるえ熱産生によるエネルギー消費の亢進が起きていると考えられた。

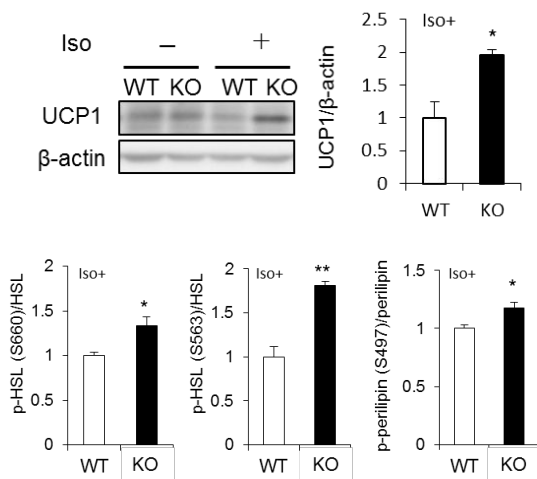


図 1 : (上図) 初代培養褐色脂肪細胞での 10 μ M イソプロテノール (Iso +) または PBS (Iso -) 刺激 6 時間後の UCP1 タンパク質発現と、(下図) HSL とペリリピンのリン酸化レベル (Oue et al, 2016 より引用)

(2) *Prip*-KO マウスでは血漿中のトリアシルグリセロール濃度が上昇している。

Prip-KO マウスは脂肪分解が亢進している。*Prip*-KO マウスの絶食時の血漿中総トリアシルグリセロール (TG) 濃度を測定したところ、野生型と比較して TG 濃度は上昇していた。またそれは、超低密度リポタンパク質 (VLDL) と低密度リポタンパク質 (LDL) 中の TG 濃度が有意に上昇していたためであった (図 2)。

しかし、*Prip*-KO マウスは血漿中の中性脂肪濃度が高いにも関わらず、糖代謝異常やインスリン抵抗性などは認めなかった。

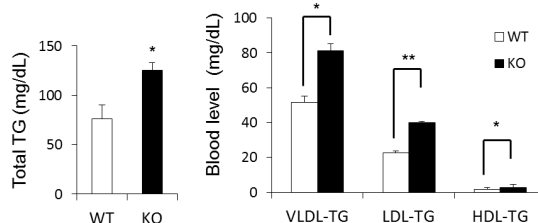


図 2 : 8 時間絶食した野生型と *Prip*-KO マウスの血漿中の総トリアシルグリセロール (TG) 濃度と超低密度リポタンパク質 (VLDL) 低密度リポタンパク質 (LDL) 高密度リポタンパク質 (HDL) 中の TG 濃度 (Oue et al, 2017 より引用)

(3) 慢性的な寒冷刺激により *Prip*-KO マウスの脂肪組織では UCP1 の発現が増加する。

慢性的な寒冷刺激の暴露により、野生型と比較して *Prip*-KO マウスの褐色脂肪組織では UCP1 の発現が増強していた。さらに、皮下の白色脂肪組織においても *Prip*-KO マウスでは UCP1 の有意な発現増加を認めた (図 3)。

通常、白色脂肪細胞は UCP1 を発現していないが、皮下の白色脂肪組織は寒冷刺激により褐色脂肪細胞様細胞 (ベージュ脂肪細胞) へと分化増殖し、UCP1 の発現が誘導され非ふるえ熱産生系が亢進する。

この結果より、*Prip*-KO マウスでは褐色脂肪組織におけるエネルギー消費の亢進だけではなく、白色脂肪組織における褐色化による非ふるえ熱産生能も増強していることが分かった。

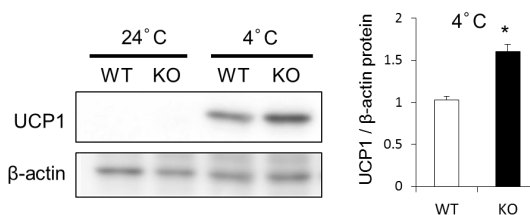


図 3 : 24 または 4 の環境下で 1 週間飼育した野生型と *Prip*-KO マウスの鼠径部皮下白色脂肪組織における UCP1 タンパク質発現 (Oue et al, 2017 より引用)

以上の結果より、PRIP は脂肪組織における脂質代謝やエネルギー消費を制御する重要な役割を担っている分子であることが明らかとなった。PRIP を介したエネルギー代謝調節機構の分子メカニズムをより詳細に明らかにすることは、肥満やそれによって生じる 2 型糖尿病や高血圧症、心血管疾患などに対して、肥満の予防や新しい治療法の確立などにつながり、周術期の安全性の向上にも寄与することとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kana Oue, Yosuke Yamawaki, Satoshi Asano, Mizokami Akiko, Masato Hirata, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu. Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice display increased induction of uncoupling protein 1 in adipose tissues following chronic cold exposure. *Journal of Oral Biosciences*. 査読有. 印刷中. 2017. DOI: 10.1016/j.job.2017.04.001

Yamawaki Y, Oue K, Shirawachi S, Asano S, Harada K, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation. *Japanese Dental Science Review*. 査読有. 53(1). 18-24. 2017. DOI: 10.1016/j.jdsr.2016.06.001

Oue K, Zhang J, Harada K, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takata T, Irifune M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related Catalytically Inactive Protein Is a New Modulator of Thermogenesis Promoted by β -Adrenergic Receptors in Brown Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有. 291(8). 4185-96. 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.705723

Oue K, Harada-Hada K, Kanematsu T. New molecular basis in the regulation of lipolysis via dephosphorylation. *日本薬理学雑誌*. 査読有. 146(2). 93-97. 2015. DOI: 10.1254/fpj.146.93

〔学会発表〕(計3件)

大植香菜、入舩正浩、兼松隆、寒冷刺激で見られる PRIP 遺伝子欠損マウスの UCP1 発現の亢進. 第131回日本薬理学会近畿部会. 6月30日. 2017. 名古屋

Kanematsu T, Oue K. PRIP regulates feeding behavior and energy metabolism. *The International Symposium on Neuroscience in Orofacial sensory-motor functions*. May 10-11. 2015. Osaka

Kana Oue, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates β -adrenergic receptor-mediated thermogenesis in brown adipocytes. 第48回広島大学歯学会総会. 6月27日. 2015. 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大植 香菜 (OUE KANA)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号: 60760329

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし