

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19514

研究課題名(和文)テトラヒドロピオプテリンによる褐色脂肪分化および糖・エネルギー代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of tetrahydrobiopterin-induced BAT differentiation and regulation of glucose as well as energy metabolism

研究代表者

藤田 義人(Fujita, Yoshihito)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50547809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織(BAT)は、エネルギー消費を促進する臓器であり、肥満・糖尿病の治療標的として注目されている。研究代表者らは、nitric oxide (NO)およびノルアドレナリン(NA)の合成の補酵素として作用するテトラヒドロピオプテリン(BH4)がBATを介して糖・エネルギー代謝を制御する所見をBH4欠乏マウスを用いた検討により明らかにした。また、BH4欠乏マウスに対するバックグラウンドマウスのBATの移植実験により、高脂肪食による体重増加、内臓脂肪蓄積の抑制、血糖値の低下を認め、BH4が制御するBATが糖・エネルギー代謝に中心的な役割を果たしている重要な所見を得た。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) is a central organ that acts to increase energy expenditure; its regulatory factors could be clinically useful in the treatment of obesity. Tetrahydrobiopterin (BH4) is an essential co-factor of tyrosine hydroxylase and nitric oxide synthase (NOS). Although BH4 regulates the known regulatory factors of BAT such as noradrenaline (NA) and nitric oxide (NO), participation of BH4 in BAT function remains unclear. We investigate the role of BH4 in the regulation of BAT. Hph-1 mice, a mouse model of BH4 deficiency, exhibit obesity, adiposity, glucose intolerance, insulin resistance, and impaired BAT function. By BAT transplantation from BH4-sufficient mice (control mice) into BH4-deficient mice, impaired BAT function was ameliorated together with systemic metabolic disturbances, strongly suggesting that BH4-induced BAT has a critical role in the regulation of systemic energy metabolism. Taken together, BH4 activates BAT and regulates systemic energy metabolism.

研究分野：糖尿病

キーワード：褐色脂肪 糖尿病 肥満 eNOS

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病患者人口は世界的に増加の一途をたどっており、食生活の変化や運動不足といった環境要因による肥満の助長やインスリン抵抗性の増悪が要因として挙げられる。日本においても2型糖尿病患者に占める肥満の合併頻度は飛躍的に増加している。肥満およびインスリン抵抗性は慢性炎症や酸化ストレスの原因となり、血管内皮機能障害をもたらす。この血管内皮機能障害には endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の機能障害が関与することが知られている。その一方で、eNOS 機能障害自体がインスリン抵抗性や糖代謝異常を引き起こすことが注目されている。

(2) 研究代表者らは eNOS と糖代謝の関係について研究を継続して行っており、これまでにメトホルミンの血糖低下作用には eNOS が関与すること (Diabetologia, 2010)、eNOS の補酵素として機能し、eNOS 活性化作用を有するテトラヒドロピオプテリン (BH4) が肝臓糖新生の抑制作用、血糖低下作用、およびインスリン抵抗性改善作用をもたらすこと (Diabetes, 2013) を明らかにしてきた。肥満やインスリン抵抗性など酸化ストレス環境下では、BH4 の作用不足 (BH4 の合成障害、BH4 の酸化による BH2 への転換) が起こり eNOS 機能障害の原因となり得る。この病態を模倣するために、申請者は BH4 の合成律速酵素である GTP cyclohydrolase 1 (GTPCH 1) の発現が低下している BH4 欠乏マウスモデルを用いて表現型を解析した。

予備的検討において、BH4 欠乏マウス (hph-1 マウス) は耐糖能障害・インスリン抵抗性を有し、高脂肪食により肥満が誘発されるといった特徴を有していた。申請者は、これらの表現型には褐色脂肪組織が大きく関与していることを見出している。このマウスは基礎代謝量・直腸温が低下し、褐色脂肪細胞の脂肪滴の肥大、ミトコンドリアの減少および形態異常 (クリスタ構造の破壊、融合異常) を認めた。

褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue; BAT) は熱産生能力を有しており、エネルギー消費を促進することにより糖・脂質代謝を制御する臓器として注目されている。褐色脂肪細胞は豊富なミトコンドリア量の存在が特徴的である。しかしながら、この分化を刺激する機序の詳細については不明な点が多い。

2. 研究の目的

BH4 の合成律速酵素である GTP cyclohydrolase 1 (GTPCH 1) の発現が低下している BH4 欠乏マウスモデルを用いて BAT 機能への関与を検討した。

3. 研究の方法

hph-1 マウス、およびそのバックグラウンドマウスに通常食または高脂肪食負荷を行

い、表現型を評価した。hph-1 マウスについて、BH4 を 10 日間投与し、BH4 投与による影響を評価した。加えて、BH4 による BAT を介した全身の糖・エネルギー代謝への影響を評価するために、BH4 の欠乏した hph-1 マウスに対して、hph-1 マウス (BH4 欠乏) またはバックグラウンドマウス (BH4 正常) 由来の BAT を移植することにより、全身の表現型を評価した。次に、単離褐色脂肪細胞を用いて、BH4 による BAT への直接的な制御機構を評価した。

4. 研究成果

(1) hph-1 mutant マウスでは BH4 レベルおよび GTPCH 1 の発現量が低下しており、eNOS の機能不全 (eNOS アンカッピング) が観察された。通常食において hph-1 マウスはバックグラウンドマウスに比べ空腹時血糖および随時血糖値が有意に高く、高インスリン血症を認めた。また、hph-1 マウスの肝臓ではリン酸化 AMPK および AKT の比率が低下していた。hph-1 mutant マウスは IPGTT では耐糖能障害、ITT ではインスリン抵抗性の病態を呈しており、ピルビン酸負荷試験では肝臓糖新生の亢進が認められた。hph-1 mutant マウスの肝臓では多数の脂肪滴が観察され、肝臓への脂肪蓄積の増加を認めた。

(2) 次に、BH4 欠乏による肥満、脂肪蓄積およびエネルギー代謝への影響について解析した。4 週間の高脂肪食負荷により hph-1 マウスではバックグラウンドマウスと比較して有意な体重および脂肪量の増加を認め、白色脂肪組織での脂肪滴の肥大が観察された。また、高脂肪食を摂取した hph-1 マウスでは、呼気ガス分析による呼吸商の値が低下しており、全身における糖質の利用効率の顕著な低下が確認された。

これらの表現型について、我々は褐色脂肪組織が大きく関与していることを発見した。hph-1 mutant マウスでは褐色脂肪組織における脂肪滴の増大を認め、電子顕微鏡により、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリア量の減少及び形態異常 (クリスタ構造の破壊、融合異常) が観察された。また cold tolerance test では深部体温の低下を認め、エネルギー代謝機構の破綻ならびに肥満の進展への関与が示唆された (図 1)

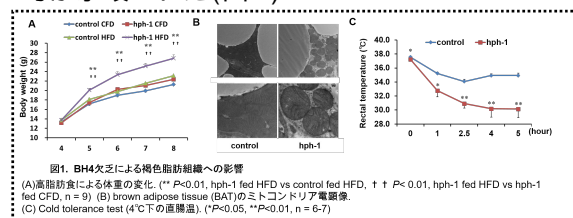


図1. BH4欠乏による褐色脂肪組織への影響
(A)高脂肪食による体重の変化。 (** P<0.01, hph-1 fed HFD vs control fed HFD, † P<0.01, hph-1 fed HFD vs hph-1 fed CFD, n = 9) (B) brown adipose tissue (BAT)のミトコンドリア電顕像。
(C) Cold tolerance test (4°C下の室温過渡)。 (*P<0.05, **P<0.01, n = 6-7)

(3) BH4 投与による糖・脂質およびエネルギー代謝への影響を評価した。hph-1 マウスに BH4 を 10 日間連続して腹腔内投与したところ血糖値の低下作用が認められ、AMPK ならびに

AKT の活性化作用を認め、深部体温の上昇を観察した。BH4 量の低下が糖・脂質およびエネルギー代謝異常に関連していることが考えられた。

(4) BH4 による糖・エネルギー代謝制御機構に関して、BAT が大きな役割を果たしている根拠となる重要な所見を得た。バックグラウンドマウス由来の褐色脂肪組織をマウスの内臓脂肪組織に移植したところ、高脂肪食による体重増加および内臓脂肪の蓄積の抑制、血糖値の低下を認めた(図 2)。一方、hph-1 マウス由来の褐色脂肪組織を hph-1 マウスの内臓脂肪組織に移植しても、これらの表現型に影響はなかった。これらの所見は、BH4 が BAT 機能を介した肥満・糖尿病の治療標的となる可能性を強く示唆している。

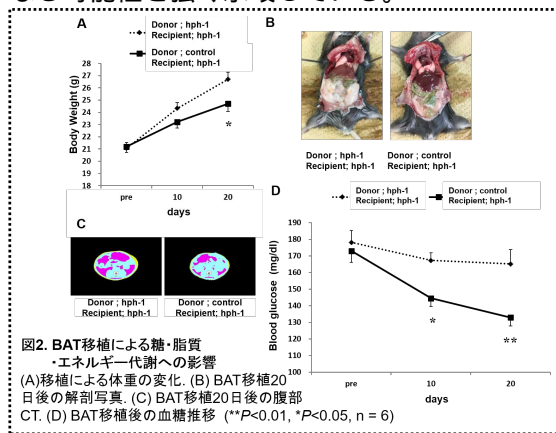


図2. BAT移植による糖・脂質・エネルギー代謝への影響 (A)移植による体重の変化、(B) BAT移植20日後の解剖写真、(C) BAT移植20日後の腹部CT、(D) BAT移植後の血糖推移 (**P<0.01, *P<0.05, n = 6)

(5) hph-1 マウスではNA、NO量の低下を認めた。単離褐色脂肪細胞にBH4を曝露すると、UCP1等の遺伝子発現が増加し、酸素消費速度(OCR)の増大が観察された。BH4によるUCP1発現の増大はNOS阻害剤により消失したことから、BH4の褐色脂肪細胞への直接作用はNO依存性であることが示された。これらの結果から、BH4はNOおよびNA作用を介しBAT機能を活性化し、全身のエネルギー・糖代謝を制御すると考えられた。BH4は肥満症および糖尿病の治療標的となる可能性が示された。

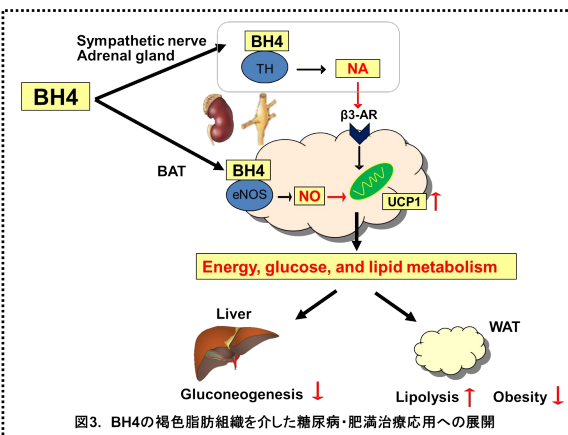


図3. BH4の褐色脂肪組織を介した糖尿病・肥満治療応用への展開

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Y. Fujita, N. Inagaki. Metformin: New Preparations and Non-Glycemic Benefits. *Curr Diab Rep. Review*; 17:5. 2017 DOI: 10.1007/s11892-017-0829-8

Y. Fujita, N. Inagaki. Metformin: clinical topics and new mechanisms of action. *Diabetol Int. Review*; 2017. DOI: 10.1007/s13340-016-0300-0

A. Nishimura, SI. Harashima, Y. Fujita, D. Tanaka, Y. Wang, Y. Liu, N. Inagaki. Effects of structured testing versus routine testing of blood glucose in diabetes self-management: A randomized controlled trial. *J Diabetes Complications*. In press DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.08.019

Y. Kondo, N. Harada, A. Hamasaki, S. Kaneko, K. Yasuda, E. Ogawa, S. Harashima, H. Yoneda, Y. Fujita, N. Kitano, Y. Nakamura, F. Matsuo, M. Shinji, S. Hinotsu, T. Nakayama, N. Inagaki; MAIKO Study group. Sitagliptin monotherapy has better effect on insulinogenic index than glimepiride monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a 52-week, multicenter, parallel-group randomized controlled trial. *Diabetol Metab Syndr*. 27: 8, 15. 2016

A. Obara, Y. Fujita, A. Abudukadier, T. Fukushima, Y. Oguri, M. Ogura, S. Harashima, M. Hosokawa, N. Inagaki. DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin's anti-cancer action in human liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 460: 1047-1052. 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.148

S. Ayano-Takahara, K. Ikeda, S. Fujimoto, A. Hamasaki, SI. Harashima, K. Toyoda, Y. Fujita, K. Nagashima, D. Tanaka, N. Inagaki. Glycemic Variability Is Associated With Quality of Life and Treatment Satisfaction in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care. Letter*; 38: e1-2. 2015. DOI: 10.2337/dc14-1801

[学会発表](計 15 件)

[国内発表]

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abudukadier、小原章央、大橋晶子、古谷太志、福島徹、長谷川宏幸、細川雅也、稲垣暢也。「テトラヒドロピオブテリンによる糖・脂質およびエネルギー代謝制御機構の解明」。『第58回日本糖尿病学会年次学術集会』。山口, 2015年

5月.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、小原章央、大橋晶子、古谷太志、福島徹、長谷川宏幸、細川雅也、稲垣暢也。「eNOS 補酵素テトラヒドロピオプテリンによる糖・脂質およびエネルギー代謝制御機構の解明」. 『第 37 回 日本臨床栄養学会総会』. 東京, 2015 年 10 月.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、小原章央、大橋晶子、古谷太志、福島徹、長谷川宏幸、細川雅也、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンによる褐色脂肪組織を介した糖・脂質およびエネルギー代謝制御機構の解明」. 『第 29 回 日本プテリジン研究会』. 東京, 2015 年 11 月.

小栗靖生、藤田義人、古谷太志、松尾奈緒美、屋山勝俊、小原章央、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、長谷川宏幸、鶴山竜昭、細川雅也、稲垣暢也。「eNOS 補酵素テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明」. 『第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会』. 京都, 2016 年 5 月 19 日. 口演.

藤田義人、小栗靖生、Abulizi Abdulkadier、小原章央、大橋晶子、古谷太志、松尾奈緒美、福島徹、長谷川宏幸、細川雅也、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンによる糖・脂質およびエネルギー代謝制御機構の解明」. 『第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会』. 京都, 2016 年 5 月 19 日. 口演.

古谷太志、藤田義人、松尾奈緒美、小栗靖生、池田香織、原島伸一、王宇、劉彦言、稲垣暢也。「糖尿病肥満モデル動物に対する Pair feeding 条件下での SGLT2 阻害薬投与による代謝への影響」. 『第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会』. 京都, 2016 年 5 月 21 日. 口演.

古谷太志、藤田義人、松尾奈緒美、小栗靖生、池田香織、劉彦言、王宇、原島伸一、稲垣暢也。「SGLT2 阻害薬投与による糖尿病肥満モデル動物の肝臓糖・脂質・エネルギー代謝への影響および関与因子の検討」. 『第 3 回 肝臓と糖尿病・代謝研究会』. 石川, 2016 年 7 月 16 日. ポスター.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ、全身の糖・エネルギー代謝を制御する」. 『第 21 回 アディポサイエンス・シンポジウム』. 大阪, 2016 年 8 月 20 日. 口演、ポスター.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ、全身のエネルギー・糖代謝を制御する」. 『第 37 回 日本肥満学会年次学術集会』. 東京, 2016 年 10 月 7 日. 口演.

小栗靖生、藤田義人、古谷太志、松尾奈緒美、屋山勝俊、小原章央、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、長谷川宏幸、鶴山竜昭、細川雅也、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明」. 『第 30 回 日本プテリジン研究会』. 愛知, 2016 年 11 月 11 日. 口演.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪組織を活性化し糖・エネルギー代謝を制御する」. 『第 28 回 分子糖尿病学シンポジウム』. 富山, 2016 年 12 月 3 日. 口演.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ全身の糖・エネルギー代謝を制御する」. 『第 20 回 日本病態栄養学会年次学術集会』. 京都, 2017 年 1 月 13 日. 口演.

小栗靖生、藤田義人、Abulizi Abdulkadier、大橋晶子、後藤剛、古谷太志、小原章央、福島徹、松尾奈緒美、Kim Minji、細川雅也、河田照雄、長谷川宏幸、稲垣暢也。「テトラヒドロピオプテリンによる褐色脂肪制御機構の解明」. 『第 31 回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会』. 神奈川, 2017 年 2 月 10 日. 口演.

[海外発表]

Yasuo Oguri, Yoshihito Fujita, A. Abdulkadier, Akiko Obara, Akio Ohashi, Futoshi Furuya, Toru Fukushima, Hiroyuki Hasegawa, Masaya Hosokawa, Nobuya Inagaki. 「Novel Role of eNOS Co-factor Tetrahydrobiopterin for Mitochondrial Regulation in Adiposity and Energy Homeostasis」. 『American Diabetes Association 75th Scientific Sessions』, Boston, U.S.A. 5-9 June, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 義人 (FUJITA, Yoshihito)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50547809

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()