

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02910

研究課題名(和文) 脂肪組織機能調節におけるコレステロール代謝系の生理的役割の解明

研究課題名(英文) The study on the role of cholesterol biosynthesis pathway in the regulation of adipocyte function

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂肪組織におけるコレステロール生合成経路の生理的な役割を検討し、以下のような知見を得た。

薬剤誘導型脂肪組織特異的コレステロール合成経路欠損モデル動物の作成・解析を通じて、脂肪細胞のコレステロール合成経路は成獣の脂肪細胞機能の維持において必須の役割を担っていることを明らかにした。また、脂肪組織におけるコレステロール合成経路の必要性は組織部位ごとに異なる可能性が見いだされた。本研究からは、脂肪組織機能異常状態である肥満症や、肥満やコレステロール代謝異常が危険因子とされる動脈硬化性疾患発症機構の新たな知見として、応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂肪細胞におけるコレステロール生合成経路の成獣における生理的意義が初めて明らかにされた。

脂肪組織機能破綻は肥満に伴う代謝異常症の発症の主要因として考えられており、実際に過度の内臓脂肪蓄積状態はメタボリックシンドロームの必須の診断基準となっている。また「肥満」・「コレステロール代謝異常」はそれぞれ動脈硬化性疾患の危険因子となる。本研究により脂肪細胞におけるコレステロール合成経路の役割が明らかとなったことから、本研究からは、肥満症や動脈硬化性疾患発症機構の新たな知見として、応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the physiological roles of the cholesterol biosynthesis pathway in adipocytes. The findings in this study are summarized as below.

We demonstrated that the cholesterol biosynthesis pathway in adipocytes plays an essential role to maintain normal physiological functions of adipose tissues in adult mice using drug-inducible adipose tissue specific cholesterol biosynthesis pathway knockout mice which were established in this study. Moreover, it was suggested that requirement for cholesterol biosynthesis pathway in adipocytes are different between their depots.

These findings are expected to be an important fundamental information for obesity and cardiovascular diseases which are closely related to dysfunction of adipocytes and cholesterol metabolism.

研究分野：食品科学

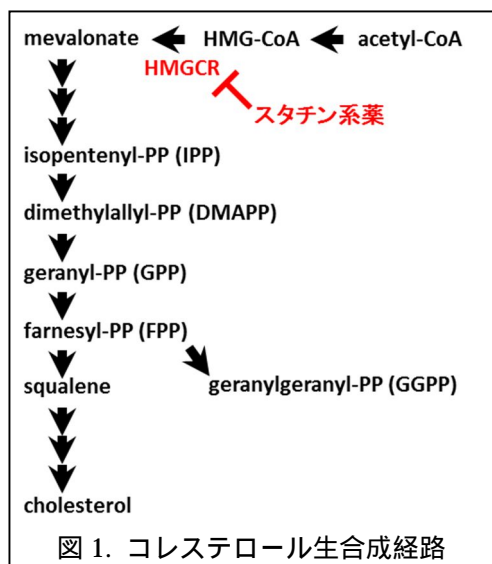
キーワード：脂肪組織 コレステロール代謝 肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満は動脈硬化性疾患をはじめとする種々の疾患リスクを高めるため、世界的な肥満者数の増加は、現在の食事に関する最大の健康問題の一つとして挙げられる。肥満は脂肪組織の過剰蓄積と定義され、脂肪組織を構成する脂肪細胞の状態は肥満に伴う生活習慣病の発症において重要な役割を担っている。そのため、脂肪組織を主に構成する脂肪細胞機能の新たな制御機構を明らかにすることは、肥満症に対する新たな予防・治療法の創出につながることで期待され、社会的要求性の高い重要な課題の一つである。

コレステロール生合成経路はコレステロールのみならず、イソプレノイド関連物質の生合成を担っており、細胞機能調節において重要な役割を果たす(図1)。また、コレステロール生合成経路の活性は体内のコレステロール量により厳密に調節されることが知られており、食事のコレステロール量により強く制御される。コレステロール恒常性の厳密な制御機構は薬理的にも応用されており、コレステロール生合成経路の律速酵素、HMG-CoA reductase (HMGCR) 阻害剤であるスタチン系薬は、動脈硬化性疾患の危険因子である血中 LDL コレステロール値を強力に低下させるため、高脂血症治療薬として世界的に広く用いられている。

脂肪組織は体内コレステロールの大部分を貯蔵する組織として知られており、生体のコレステロール代謝調節において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、脂肪細胞におけるコレステロール生合成経路の生理的役割については全くの未解明であった。我々は先行研究において、脂肪組織特異的な HMGCR 欠損 (HMGCR aKO) マウスを独自に作成・解析し、生理的な脂肪組織の発達において、脂肪細胞のコレステロール生合成経路が必須の役割を担っていることを示した。しかし、HMGCR aKO マウスは先天的に脂肪組織を欠失しており、中年期以降に増加する肥満のような機能異常を来した脂肪組織におけるコレステロール生合成経路の役割の解明は、本マウスを用いた解析では不可能であった。そこで、以下の研究目的を掲げた本研究を計画するに至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「成獣期の脂肪組織におけるコレステロール生合成経路の役割について検討可能なマウスモデルを確立し、その役割について明らかにする」ことである。「コレステロール代謝」と「脂肪組織機能」はともに食事によって強く制御され、いずれの異常も、世界的死因の上位を占める動脈硬化性疾患の危険因子となる。本研究により、「コレステロール代謝」と「脂肪組織機能」の新たな関連性を示すことが出来れば、動脈硬化性疾患発症機構の更なる理解に繋がり、本研究成果に基づく動脈硬化性疾患の新たな予防・治療法の創出が期待される。

3. 研究の方法

3-1. 薬剤誘導性脂肪組織特異的 HMGCR 欠損マウスの作成

成獣期の脂肪細胞において *Hmgcr* 遺伝子を特異的に欠損可能なマウスモデルを作成するため、脂肪細胞特異的な発現を示す *Adipoq* 遺伝子プロモーター制御下にタモキシフェン (TMX) 誘導型 Cre 組換え酵素を発現するマウス (*Adipoq-Cre/ERT2* マウス) を導入し、申請者が独自に作成した、Cre 組換え酵素存在下で HMGCR を欠損可能なマウス (*Hmgcr* (floxed/floxed) マウス) と交配させることで、脂肪組織において時期特異的に HMGCR を欠損可能なマウス (*Hmgcr* iAKO マウス) を作成した。得られたマウスについては、特異的プライマーを用いて遺伝子型を確定した。脂肪細胞における *Hmgcr* 遺伝子の欠損は組織 DNA を用いた PCR および組織 RNA を用いた定量 PCR により確認・評価した。

3-2. *Hmgcr* iAKO マウスを用いた表現型の検討

作成した *Hmgcr* iAKO マウスに対して、タモキシフェンの投与条件（投与経路・投与溶媒・投与期間）を検討した。投与条件決定後、成獣マウスに対して TMX を投与し、脂肪組織、血液、肝臓などを経時的に採取して表現型を観察・評価した。表現型は、血液生化学的指標については酵素反応を用いた比色定量法、組織遺伝子発現変化については定量 PCR 法、肝臓の中性脂肪蓄積量については抽出脂質に対する酵素反応を用いた比色定量法、組織学的解析については、パラフィン包埋・薄切後のヘマトキシリン・エオジン染色法にてそれぞれ評価した。また、*Hmgcr* iAKO マウスに対して高脂肪食（脂肪エネルギー比：60%）を負荷することにより食餌誘導性肥満を誘発させた。体重変化を観察することで肥満状態を確認し、十分に肥満状態が惹起された後、TMX を投与し、脂肪細胞における *Hmgcr* 遺伝子の欠損を誘導した。その後、上記のような種々の評価を行った。

3-3. 外因性投与化合物によるコレステロール生合成経路活性調節の検討

HMGCR 阻害剤であるスタチン系薬剤（アトルバスタチン, Atr）を肥満モデルマウスに経口投与し、その表現型を検討した。表現型の検討項目は、項目「3-2」に記載の内容と同様の項目について検討した。組織中の Atr 含量については単離組織より調製したサンプルを LC-MS 装置を用いて評価した。

4. 研究成果

4-1. 薬剤誘導性脂肪組織特異的 HMGCR 欠損マウスの作成

薬剤誘導性脂肪組織特異的 HMGCR 欠損マウス (*Hmgcr* iAKO マウス) を *Hmgcr* (flox/flox) マウスと *Adipoq*-Cre/ERT2 マウスを交配させることで作成した。作成した *Hmgcr* iAKO マウスに対して TMX を投与したのち、単離脂肪組織より抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法により組換え効率を確認することで、TMX 投与条件を決定した。TMX はコーン油に溶解させた後、100 mg/kg/day で経口投与にて5日間投与することとした。

TMX 投与後の *Hmgcr* iAKO マウス脂肪組織では、投与1日目より野生型 allele に加えて、KO allele が検出され、*Hmgcr* 遺伝子の組み換えが TMX 投与直後から開始されることが示唆された。脂肪組織以外の組織として、肝臓や骨格筋を用いて同様の検討を行ったが、これらの組織では KO allele は検出されず、*Hmgcr* 遺伝子の組み換えが脂肪組織特異的に TMX により誘導されていることが明らかになった。さらに、TMX 投与後、*Hmgcr* iAKO マウスより脂肪組織、肝臓、骨格筋を単離し、*Hmgcr* の mRNA 発現量を定量したところ、脂肪組織特異的に発現量が低下することも確認できた。

以上の結果より、検討目的に適った薬剤誘導性脂肪組織特異的 HMGCR 欠損マウスが作成できたものと判断し、以降の実験に用いることとした。

4-2. *Hmgcr* iAKO マウスを用いた表現型の検討

TMX 投与後、*Hmgcr* iAKO マウス脂肪組織由来の DNA を用いて、KO allele の検出期間を確認したところ、投与後2週間までは KO allele が検出されたが、投与後3週間以降は KO allele が検出できなかった。そこで、TMX 投与後約1か月に至るまでに脂肪組織を経時的に採取し、組織学的解析により組織像の変化を観察した。その結果、TMX 投与後、経時的に脂肪細胞数が低下していき、その後回復に転じることが明らかになった。脂肪細胞数が低下から回復に転じるタイミングは TMX 投与後2 - 3週間程度で最も顕著となり、KO allele が検出されなくなる時期とほぼ重なっていた。これまでの検討において、培養細胞系で HMGCR を欠損させた脂肪細胞ではアポトーシスが誘導されることが確認されていることから、HMGCR 欠損により一過性に脂肪細胞のアポトーシスが誘導され、その後回復することが示唆された。また、TMX 投与後に経時的に血液パラメータを解析したところ、一過性の血糖値の上昇が観察された。血糖値の上昇も TMX 投与後2 - 3週間程度で最も顕著に認められたことから、HMGCR 欠損に伴う脂肪細胞数の減少が血糖値上昇に関与しているものと考えられた。

次に、高脂肪食負荷により十分に肥満を誘導した *Hmgcr* iAKO マウスに対して、TMX を投与し HMGCR 欠損を誘導すると、KO 誘導後体重の低下が認められた。脂肪組織変化を観察したところ、普通食摂取時と同様に TMX 投与後経時的に脂肪細胞数が低下し、その後回復に転じることが明らかになった。また、経時的に血液パラメータを確認すると、脂肪細胞数の減少に応じて血糖値、血中中性脂肪値が上昇し、脂肪細胞数の回復とともに対照群と同程度まで回復した。肥満マウスに対する HMGCR 欠損の誘導により、摂餌量の低下が認められたことから、対照群に制限給餌を行い、同様に検討したところ、KO 群では対照群に比して体重の減少が認められ、これらの一部は脂肪組織重量の低下に起因することが明らかになった。また、HMGCR 欠損誘導後の脂肪組織の遺伝子発現変化を確認したところ、KO 誘導後、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現低下、マクロファージマーカー遺伝子・炎症関連遺伝子の発現上昇が一過性に認められ、その後対象群と同程度に戻ることが明らかになった。

以上より、通常状態・肥満状態を問わず、脂肪細胞においてコレステロール合成経路は正常組

織機能の維持において重要な役割を担っていることが明らかになった。また、コレステロール合成経路の欠損は一過性に脂肪細胞数を低下させ、血糖値を上昇させるなど、脂肪組織機能異常をきたすが、その後脂肪組織機能異常は回復することが明らかになった。

4-3. 外因性投与化合物によるコレステロール生合成経路活性調節の検討

薬品や機能性食品への応用の可能性について検討するため、外因性投与化合物による脂肪組織のコレステロール生合成経路の活性調節が生体の代謝調節においてどのような機能を発揮するか検討を試みた。具体的には、HMGCR 阻害剤であるスタチン系薬剤 (Atr) を肥満モデルマウスに経口投与し、その表現系について検討した。Atr 投与により、血中総コレステロール量の低下は認められたものの、*Hmgcr* iAKO マウスに対する KO 誘導により認められたその他の変化 (血糖値上昇・脂肪細胞数の低下・遺伝子発現変化など) は認められなかった。その要因について種々の検討を行ったところ、投与したスタチン系薬が脂肪組織においてほとんど検出されないことが一因として考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwase Mari, Tokiwa Soshi, Seno Shigeto, Mukai Takako, Yeh Yu-Sheng, Takahashi Haruya, Nomura Wataru, Jheng Huei-Fen, Matsumura Sigenobu, Kusudo Tatsuya, Osato Naoki, Matsuda Hideo, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 295
2. 論文標題 Glycerol kinase stimulates uncoupling protein 1 expression by regulating fatty acid metabolism in beige adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7033 ~ 7045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011658	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Iwase Mari, Sakai Shoko, Seno Shigeto, Yeh Yu-Sheng, Kuo Tony, Takahashi Haruya, Nomura Wataru, Jheng Huei-Fen, Horton Paul, Osato Naoki, Matsuda Hideo, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Long non-coding RNA 2310069B03Rik functions as a suppressor of Ucp1 expression under prolonged cold exposure in murine beige adipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 305 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1677451	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Kawarasaki Satoko, Matsuo Kazuki, Kuwata Hidetoshi, Zhou Lanxi, Kwon Jungin, Ni Zheng, Takahashi Haruya, Nomura Wataru, Kenmotsu Hisanori, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 86
2. 論文標題 Screening of flavor compounds using <i>Ucp1</i> -luciferase reporter beige adipocytes identified 5-methylquinoxaline as a novel UCP1-inducing compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 380 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab216	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 5件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Goto
2. 発表標題 Molecular Mechanisms Underlying the Fatty Acids-Regulated Thermogenic Function in Adipocytes
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾 和輝、川原崎 聡子、ZHOU Lanxi、金子 秀、桑田 秀俊、JHENG Huei-Fen、高橋 春弥、野村 亘、荒 武、劔持 久典、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 UCP1 発現を誘導する香気物質の探索およびその作用機序の検討
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 川原崎 聡子、YULIANA Ana、JHENG Huei-Fen、野村 亘、高橋 春弥、荒 武、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 ヒストンのアセチル化を介した白色脂肪細胞の UCP1 発現制御機構の解析
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 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

1. 発表者名 川原崎 聡子、JHENG Huei-Fen、高橋 春弥、野村 亘、神戸 大朋、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 分泌型ルシフェラーゼを用いた UCP1 レポーター前駆脂肪細胞株の樹立
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 造田 みな美、野村 亘、高橋 春弥、井上 和生、後藤 剛
2. 発表標題 酢酸由来アセチルCoA 産生経路が脂肪細胞の分化と機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第514回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 疋田 菜光、岩瀬 麻里、川原崎 聡子、酒井 章子、坂本 智弥、大里 直樹、瀬尾 茂人、野村 亘、高橋 春弥、松田 秀雄、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 脂肪細胞における STAT3 を介した UCP1 発現制御機構の解明
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 剛、YEH Yu-Sheng、JHENG Huei-Fen、KWON Jungin、高橋 春弥、野村 亘、井上 和生、河田 照雄
2. 発表標題 メバロン酸合成経路の脂肪細胞における生理的役割の検討
3. 学会等名 第40日本肥満学会・第37回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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、楠堂 達也、大里 直樹、松田 秀雄、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 脂肪組織における glycerol kinase の Ucp1 発現制御機構
3. 学会等名 第40日本肥満学会・第37回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 剛、YEH Yu-Sheng、KWON Jungin、JHENG Huei-Fen、高橋 春弥、野村 亘、井上 和生、河田 照雄
2. 発表標題 脂肪細胞機能調節におけるイソプレノイド合成経路の役割の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川原崎 聡子、YULIANA Ana、鄭 蕙芬、野村 亘、高橋 春弥、荒 武、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素による白色脂肪細胞の UCP1 発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 剛
2. 発表標題 肝臓・褐色脂肪組織における脂肪酸代謝による生体代謝調節機構
3. 学会等名 第1回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 剛
2. 発表標題 食餌脂肪酸および食餌脂肪酸代謝産物による褐色脂肪組織機能の活性化機構
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuyoshi GOTO
2. 発表標題 Metabolic syndrome and beneficial food factors for the management of metabolic syndrome
3. 学会等名 2019 The Korean Nutrition Society Annual Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi GOTO, Haruya TAKAHASHI, Shinsuke MOHRI, Takeshi ARA, Wataru NOMURA, Huei-Fen JHENG, Daisuke SHIBATA, Teruo KAWADA
2. 発表標題 Useful Compounds in Tomato for the Management of Obesity-Related Metabolic Disorders
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors, ICoFF2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jungin Kwon, Yu-Sheng Yeh, 川原崎 聡子、野村 亘、高橋 春弥、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 The Role of Mevalonate Biosynthetic Pathway in Brown Adipose Tissue and Systemic Metabolism
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jungin Kwon, Yu-Sheng Yeh, 川原崎 聡子、南野 寛人、藤田 義人、岡松 優子、野村 亘、高橋 春弥、木村 和弘、斉藤 昌之、稲垣 暢也、井上 和生、河田 照雄、後藤 剛
2. 発表標題 イソプレノイド合成経路の褐色脂肪細胞分化制御機構の検討
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 2022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 http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html</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	高橋 春弥 (Takahashi Haruya) (30750369)	京都大学・農学研究科・助教 (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		
韓国	Ulsan University		
Taiwan	National Cheng Kung University		