

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19517

研究課題名(和文) 脂肪代謝でのNPYの抗老化関連分子メカニズム確立

研究課題名(英文) Establishment of Anti-aging mechanism by NPY in the fat metabolism

研究代表者

朴 盛浚 (PARK, Seongjoon)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60635853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： NPYの投与は脂肪分解を促進し体脂肪量を減少させ、中年期の脂肪代謝の不均衡を緩和させると報告した。また、NPYを欠損させた(KO)マウスに30%のCRを行うと、12ヵ月齢までに約50%が死亡し、NPY+/+(WT)-CRマウスと比較して体脂肪の量が大幅に減少していた。このことから、体脂肪の過度な減少がKO-CRマウスの死亡率増加の原因である可能性を考え、脂肪分解阻害剤のAcipimox(ACM)をKO-CRマウスに投与した結果、体脂肪の過度な減少が抑制され死亡率が減少した。この結果より、NPYが脂肪代謝のバランスを維持する重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We report that NPY-deficiency in male mice during CR increases mortality in association with lipodystrophy. NPY-/- mice displayed a rapid decrease in body weight and fat mass, as well as increased lipolysis during CR. These alterations in fat regulation were inhibited by the lipolysis inhibitor, acipimox (ACM), a treatment associated with reduced mortality. The lipolytic/thermogenic signaling, β -3-adrenergic receptor/hormone sensitive lipase was markedly activated in white adipose tissue of NPY-/- mice compared with that of NPY+/+ mice, and thermogenesis was controlled by NPY under negative energy balance. These results demonstrate the critical role of NPY in the regulation of lipid metabolic homeostasis and survival via control of lipolysis and thermogenesis in a state of negative energy balance.

研究分野：老化学

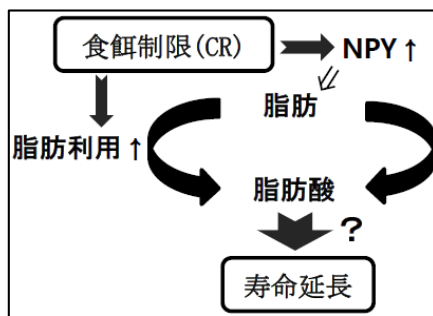
キーワード：NPY 食餌制限 脂肪代謝 老化

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化と代謝性疾患を調節する上での脂肪の重要性

脂肪は細胞膜の欠かせない要素として、また、皮膚の下で体温を維持するだけでなく、エネルギーを保存する役割を担う。体脂肪は中年末期まで増加を続けて老年期で減少する (Mott et al., Am. J. Clin. Nutr., 1999)。脂肪量の不均衡は、肥満や脂肪異常栄養症等を介して代謝恒常性の不均衡を誘導し、代謝性疾患を誘導する (Lewington et al., Lancet, 2009; Mao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2009)。

(2) 脂肪代謝における neuropeptide Y (NPY) の機能



NPY は飢餓状態で増加し、食欲を促進させる。実際に NPY をマウスに投与すると、体重と脂肪量が増加する (Stanley et al., Peptides, 1986)。申請者のグループで NPY の投与は脂肪細胞で PPAR 2 の経路を活性化して脂肪分化および脂肪の形成を促進させることを確認した。また、メスマウスで NPY の欠損が脂肪分解を促進し体脂肪量を減少させ、中年期の脂肪代謝の不均衡 (炎症反応の増加、脂肪新生の減少、熱の発生の減少) を緩和させると報告した (Park et al., FASEB J., 2014)。

(3) 食餌制限 (CR) マウスでの NPY の役割

NPY の欠損は、自由摂食させたメスマウスでは中年期に増加する脂肪量を減少させる肯定的な影響を与えるが、CR マウスにとって NPY は必須な要素である (Chiba, Park et al., Sci. Rep., 2014; Park et al., FASEB J., 2014)。CR マウスは脂肪を主なエネルギー源として利用するために、代謝パターンを、糖代謝から脂肪代謝に変化させ、脂肪の合成と分解が同時に促進される (Bruss et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2010; Park et al., Exp. Gerontol., 2009)。我々はこれまでの研究で NPY を欠損させた (NPY^{-/-}) オスマウスに 30%CR をさせた結果、12 ヶ月齢までに約 50% が死亡し、CR の寿命延長効果が阻害されることを観察した (Chiba, Park et al., Sci. Rep., 2014)。Micro-CT を用い体脂肪量を観察した結果、NPY^{-/-}-CR マウスを NPY^{+/+}-CR マウスと比較したとき、体脂肪量が大幅に減少していること

を確認した。そして、体脂肪の過度な減少が NPY^{-/-}-CR マウスの死亡率を増加させるのかわかめるため、脂肪分解阻害剤、Acipimox (ACM) を食餌制限と同時に投与した結果、死亡率の増加と体脂肪の減少が抑制された (Fig. 1)。

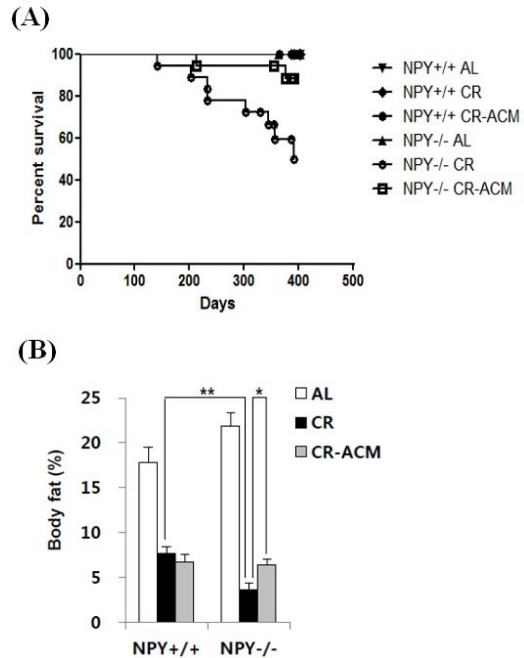


Fig. 1. 生存曲線と体脂肪量 (%)。

2. 研究の目的

本研究の目標は、CR での脂肪代謝の重要性を明らかに、NPY を中心に CR の寿命延長に必要な遺伝子ネットワークを確立することである。

(1) NPY と ACM の関連メカニズムの解明：脂肪分解阻害剤、ACM、は cAMP-PKA 経路を介して hormone sensitive lipase (HSL) の活性を抑制する。これは G_{ai} カップル受容体である NPY 受容体の経路と繋がるため ACM が NPY の経路を活性化させる可能性が示唆される。これを明確にするために、マウスの脂肪細胞と脂肪組織で、ACM による NPY シグナル活性化を解明する。

(2) NPY を中心とした、脂肪代謝で CR の寿命延長に必要な遺伝子ネットワークの構築：脂肪組織は、CR マウスに必要なエネルギー源であって、老化や寿命にも密接な関連性がある。CR マウスにおける NPY の欠損は体脂肪減少を起こし、死亡率を増加させ CR による寿命延長効果を抑制する点で、NPY は CR マウスに重要な遺伝子であることには間違いない。したがって、DNA マイクロアレイを介して、NPY の脂肪代謝メカニズムを中心とした遺伝子ネットワークの構築が必要である。

3. 研究の方法

本グループでは、CRさせたマウスでの NPY の欠損が体脂肪を減少させ、死亡率を高めると報告した。しかしこうした現象は脂肪分解阻害剤、ACM 投与によって抑制された。今回の研究では、CR マウスで NPY の欠損がどのようなメカニズムを介して体脂肪および寿命を調節するかを調べる。

1. NPY と ACM がどのような経路を介して脂肪代謝を制御しているのかを観察する。
2. 次世代シーケンスの分析で脂肪代謝経路で寿命調節に重要な遺伝子ネットワークを構築する。
3. 肥満モデルマウスでの NPY の役割を検討する。
4. 新しい寿命調節に関連する遺伝子の発掘を通じた今後の研究計画を確立する

4. 研究成果

ACM は cAMP-PKA 経路を介して HSL の活性を抑制する。これは Gai カップル受容体である NPY 受容体の経路と繋がるため ACM が NPY の経路を活性化させる可能性が示唆される。これを明確にするために、マウスの脂肪組織で、脂肪の形成と脂肪分解に関連する遺伝子およびタンパク質の発現レベルを確認した。まず、脂肪の形成関連遺伝子 (C/EBP β , PPAR α , FAS, ACC1) の発現レベルは CR によって増加したが、NPY 欠損及び、ACM 投与による変化は見られなかった。しかし、脂肪分解に重要なタンパク質、HSL の活性化がコントロールの CR マウスと比較して、NPY 欠損された CR マウスでは増加し、ACM 投与によって減少した。この結果から CR マウスでの NPY 欠損における体脂肪の減少原因は過度な脂肪分解にあることを明らかにした。

エネルギーを供給する白色脂肪組織は低温刺激やベターアドレナリン性刺激を与えると褐色脂肪化すると報告され肥満や糖尿病を抑制するターゲットとして国内及び外国で活発に研究されている。特に、白色脂肪の褐色脂肪化は白色脂肪の解剖学的な位置によってその能力が異なる。

白色脂肪の褐色脂肪化に関連する遺伝子の発現レベルを白色脂肪組織で調べた結果、食餌制限によって増加され、Neuropeptide Y の欠損によってさらに増加されていることが分かった。この現象は脂肪分解抑制剤、Acipimox によって抑制された。

食餌制限マウスにおける Neuropeptide Y の欠損マウスの初期脂肪は異常な白色脂肪の褐色脂肪化による脂肪代謝の不均衡だと考えられる。肥満での NPY の役割を調べるために、高脂肪食餌を 4 ヶ月間与えた後、脂肪代謝の変化・脂肪細胞の肥大化・炎症に与える影響検討した。NPY-WT マウスでは、高脂肪食餌により内臓脂肪組織での脂肪細胞のサイズが大きくなっているのに対して、NPY-KO マウスでは高脂肪食により脂肪細胞の大きさに有意な変化が見られなかった。ま

た、WT マウスでは、高脂肪食による De novo lipogenesis 関連遺伝子 ACC1, ACC2, FAS の発現変化は見られなかったが、KO マウスでは高脂肪食による発現増加が見られた。炎症関連遺伝子 TNF- α , CCL2 は高脂肪食餌において上昇していることがみられたが、KO マウスにおいてはその上昇が見られなく、WT の高脂肪食郡と比較し、減少傾向が見られた。このことから、NPY-WT マウスでは高脂肪食による脂肪細胞の肥大化と脂肪蓄積の増加のため、炎症が引き起こるが、NPY の欠損マウスでは高脂肪食による脂肪細胞の肥大化と脂肪蓄積が抑制され、炎症が引き起こらないことが分かった。

NPY を中心とした脂肪代謝経路で食餌制限の寿命延長に重要な遺伝子ネットワークの構築及び新しいアンチエイジングと寿命調節に関連する遺伝子の発掘のためにマウスの皮下脂肪を使って次世代シーケンスを行ってその結果を分析した。具体的に WT-CR サンプルと KO-CR サンプル結果を比較した時に変化する遺伝子と WT-CR サンプルと KO-CR-ACM サンプル結果を比較した時に変化する遺伝子 (増加・減少: 103 個, 減少・増加: 155 個) を長寿データベース及び文献で分析し、まだ報告されてない新長寿遺伝子の候補を選別した。実際、老化 (2, 23 ヶ月齢) 及び長寿 (CR) モデルマウスの皮下脂肪組織を使って一次選別した遺伝子を検証した。WT-CR 群と KO-CR 群の結果を比較して発現が減少する遺伝子と、KO-CR 群と KO-CR-ACM 投与群の結果を比較して発現が増加する遺伝子の共通遺伝子の中から、コントロール群 (6 ヶ月齢) と比較し中年期 (23 ヶ月齢) マウスの白色脂肪組織で発現が増加し CR で減少する遺伝子 ZFP90 を選別した。その後 CRISPR-CAS9 を用いて ZFP90 欠損マウスを作製した。

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 2 件)

Park S*, Mori R, Shimokawa I. The fat regulator neuropeptide Y and caloric restriction. *Aging (Albany NY)*. 9: 2243-2244, 2017, doi: 10.18632/aging.101338. (*, Corresponding author) (査読あり)

Park, S*, Komatsu, T., Kim, S.E., Tanaka, K., Hayashi, H., Mori, R., Shimokawa, I. Neuropeptide Y resists excess loss of fat by lipolysis in calorie-restricted mice: A trait potential for the life-extending effect of calorie restriction. *Aging Cell*. 16: 339-348, 2017, doi: 10.1111/ace1.12558. (*, Corresponding author) (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

Park, S., Komatsu, T., Kim, S.E., Hayashi, H., Mori, R., Shimokawa, I. Regulation of lipolytic control by neuropeptide Y promotes survival in calorie-restricted mice. The 21st IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2017

Park, S., Komatsu, T., Kim, S.E., Mori, R., Shimokawa, I. Critical role of NPY in the lipid metabolic homeostasis under negative energy balance. The 39th Annual Congress of the Japan Society for Biomedical Gerontology, 2016.

Park, S., Komatsu, T., Shimokawa, I. NPY-mediated prevention of excessive lipolysis is essential for survival in calorie restricted mice. International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 2015.

Park, S., Shimokawa, I. The contradictory role of neuropeptide Y in positive and negative energy balance. The 88th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 盛浚 (PARK, Seongjoon)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教
研究者番号：60635853

(2) 研究協力者

小松 利光 (KOMATSU, Toshimitsu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
技術職員

。