

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17254

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分子メカニズム解明研究

研究課題名（英文）Studies on molecular mechanisms of brown adipocyte for controlling obesity.

研究代表者

大植 香菜 (OUE, KANA)

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：60760329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) 遺伝子欠損マウス (Prip-KOマウス) は耐肥満性を示す。本研究では、PRIPが関与するエネルギー代謝調節の分子メカニズムについて解析した。Prip-KOマウスは、褐色脂肪細胞における脱共益タンパク質 (UCP1) を介したエネルギー産生亢進を示した。また、寒冷環境下において、皮下白色脂肪組織の褐色化においても影響を与えていることが示唆された。

本研究から、PRIPを介した新たなエネルギー代謝調節メカニズムの一部が明らかとなり、肥満に対する新たな予防法や治療法につながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRIPは、白色脂肪細胞だけでなく褐色脂肪細胞においても脂肪分解を制御しており、UCP1の活性化や遺伝子発現の調節に関与していた。本研究により、褐色脂肪細胞におけるPRIPが仲介するエネルギー代謝の分子基盤の一部が明らかとなり、エネルギー代謝調節機構の解明に繋がった。

今後、本研究をさらに深め、PRIPが仲介する褐色脂肪細胞の脂肪分解やエネルギー代謝機構を制御できれば、白色脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制しその余剰脂肪酸を褐色脂肪細胞でエネルギーとして放出させるような新薬の開発にも繋がると期待できる。そして、PRIPを介した新たな肥満の予防策や治療戦略に通じると考える。

研究成果の概要（英文）： PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) gene-knockout (Prip-KO) mice exhibit obesity resistance. In this study, we analyzed the molecular mechanism of PRIP-related regulation of energy metabolism. Prip-KO mice showed increased energy production mediated by uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipocytes. Moreover, it was suggested that PRIP also affects the browning of subcutaneous white adipose tissue under cold environment.

This study demonstrated that PRIP regulates energy metabolism in white adipocyte and brown adipocyte, and propose PRIP as a new therapeutic target for controlling obesity or developing novel anti-obesity drugs.

研究分野：外科系歯学

キーワード：褐色脂肪細胞 エネルギー代謝 UCP1 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の肥満人口は急速に増えており、有効な対策を施さないと世界的に医療体制の崩壊を招くと世界保健機関 (WHO) の研究チームが指摘している。肥満は、糖尿病などの糖・脂質代謝異常や高血圧、心臓病などの心血管系疾患、睡眠時無呼吸症候群のような呼吸器合併症などを引き起こす。全身麻酔下や鎮静処置下で実施される歯科治療は今後益々増えるが、肥満患者はこのような全身疾患に加え、気道閉塞や気道確保困難に陥りやすいなどのリスクを伴う。そのため、肥満のメカニズムを明らかにしコントロールすることで、麻酔リスク軽減に努める事は重要である。

生体のエネルギー産生制御において、褐色脂肪細胞が重要な役割を持つ事が明らかになって来た。褐色脂肪細胞は、ミトコンドリアを多く含み、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て、熱を産生しエネルギーを消費する器官である。近年、肥満治療として、UCP1 を活性化してエネルギー代謝を亢進させる治療法の開発が注目されている。そこで、褐色脂肪細胞でのエネルギー代謝調節の分子基盤を解明し、そのシグナル分子を標的にした新しい肥満予防策や治療法の確立が期待されている。

我々はこれまでに、PRIP 遺伝子欠損 (*Prip*-KO) マウスが、高脂肪食摂取によるエネルギー過多の状態においても、耐肥満性を示すことを明らかにした。このマウスは、白色脂肪細胞における脂肪分解亢進に加え、褐色脂肪細胞における UCP1 を介したエネルギー産生亢進により、耐肥満性を示した。

そこで、脂肪細胞における PRIP が仲介する脂質代謝とエネルギー消費の分子機構を解析し、そのメカニズムを解明する目的で本研究を提案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞における PRIP が仲介するエネルギー消費亢進の分子メカニズムを解明する事である。本研究を通して生体のエネルギー調節機構の一端を明らかにし、本動物モデルによる肥満研究を、将来的に国民の健康増進に寄与する臨床応用研究に繋げる事を旨とする。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、広島大学における動物実験に関する指針に従った。

(1) 脂質代謝解析

15 週齢の野生型と *Prip*-KO マウスを 8 時間絶食させたのち採血を行った。回収したサンプルを遠心分離後、血清中のリポ蛋白を HPLC システムを用いて測定した。

(2) 糖代謝解析

20 週齢の野生型と *Prip*-KO マウスに対して、糖負荷試験 (GTT) とインスリン負荷試験 (ITT) を行った。糖負荷試験を行う 14 時間前より、または、インスリン負荷試験を行う 4 時間前より絶食させ、グルコース (2g/kg) 腹腔内投与し、その後の血糖値変化を測定した。

(3) 寒冷刺激実験

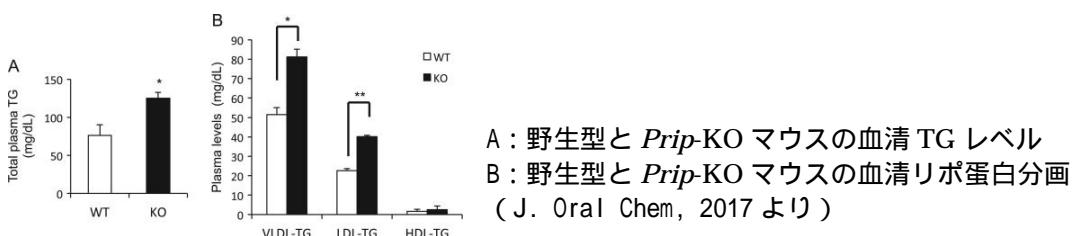
12 週齢の野生型と *Prip*-KO マウスを 4 (またはコントロール群として 24) の環境下で 1 週間単体飼育し、体温と摂餌量を測定した。1 週間飼育したのち、鼠径部の皮下白色脂肪組織と肩甲骨間の褐色脂肪組織を採取し、Western Blot 解析を行った。

(4) 初代培養褐色脂肪細胞を用いた解析

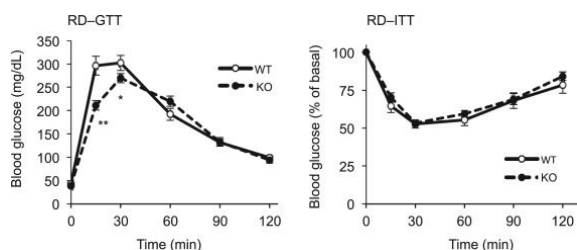
4 週齢の野生型と *Prip*-KO マウスより、肩甲骨間の褐色脂肪組織を摘出し、脂肪前駆細胞を分離、培養する。細胞がコンフルエントになった状態で、褐色脂肪細胞へと分化誘導をかける。細胞内に多房性の脂肪滴が形成された時点で実験に用いる。初代培養褐色細胞の作製法は [Sugihara et al. J Lipid Res. 1987] の変法を用いる。成熟した褐色脂肪細胞へアドレナリン刺激を行い、PRIP が褐色脂肪細胞内の脂質代謝や UCP1 産生に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) *Prip*-KO マウスは野生型と比較して摂餌量が多いにもかかわらず、白色脂肪組織の蓄積量は少なく、痩せた表現型を示している。*Prip*-KO マウスのトリアシルグリセロール (TG) の血清値は野生型と比較して 1.6 倍高かった。これは、超低密度リポタンパク質 (VLDL) および低密度リポタンパク質 (LDL) の蓄積によるのであった。

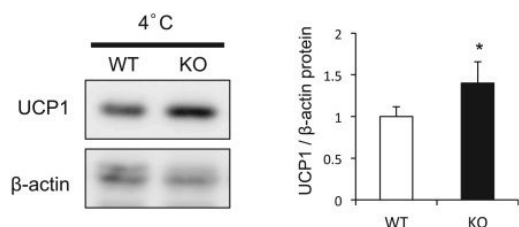


(2) 高TG血症は肥満に多く、2型糖尿病患者の脂質代謝異常の特徴でもある。そこで、野生型と *Prip*-KO マウスにたいして糖負荷試験 (GTT) とインスリン負荷試験 (ITT) を行った。*Prip*-KO マウスは高TGであるにも関わらず、耐糖能異常やインスリン抵抗性を認めなかった。



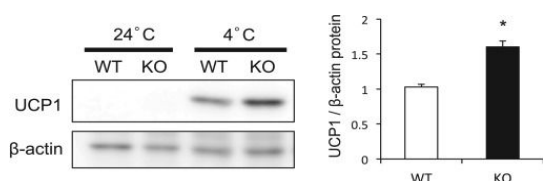
野生型と *Prip*-KO マウスの糖負荷試験 (TGG) とインスリン負荷試験 (ITT)
(J. Oral Chem, 2017 より)

(3) *Prip*-KO マウスは耐肥満の表現型を示しており、それは高いエネルギー消費と関連している。そこで、*Prip*-KO マウスに寒冷ストレスを与え、褐色脂肪組織における熱産能を解析した。野生型と *Prip*-KO マウスをそれぞれ4の環境下で1週間飼育し、直腸温を測定したところ、明期 (Day) と暗期 (Night) とともに *Prip*-KO マウスの体温が野生型と比較して有意に高かった。また、1週間飼育したのちにマウスより採取した褐色脂肪組織において、野生型と比較して *Prip*-KO マウスで UCP1 蛋白質発現量が1.4倍と有意に高く、*Prip*-KO マウスにおいて、褐色脂肪組織での熱産生・エネルギー消費機構が増強されていることが明らかとなった。



寒冷環境下1週間飼育後の野生型と *Prip*-KO マウスの褐色脂肪組織における UCP1 蛋白質発現
(J. Oral Chem, 2017 より)

さらに、鼠径部の皮下白色脂肪組織において、24飼育下では野生型と *Prip*-KO マウスともに UCP1 蛋白質発現は確認できなかったが、4で1週間飼育後には双方とも UCP1 蛋白質発現が認められ、野生型と比較して *Prip*-KO マウスで UCP1 蛋白質発現量が1.6倍と有意に高かった。本結果により、PRIPは寒冷化での白色脂肪細胞の褐色化における分化誘導にも関与していることが考えられた。



寒冷環境下1週間飼育後の野生型と *Prip*-KO マウスの皮下白色脂肪組織における UCP1 蛋白質発現
(J. Oral Chem, 2017 より)

(4) 褐色脂肪細胞の UCP1 の発現調節には、PKA による CREB や p38-MAPK のリン酸化が関与する事が知られる。PRIP と protein phosphatase 複合体は、HSL や perilipin の脱リン酸化を制御したが、CREB や p38-MAPK の脱リン酸化を調節しているかは不明である。そこで、PRIP とこれら分子との関係を明らかにするために、野生型と *Prip*-KO マウスより作製した初代培養褐色脂肪細胞を用いて、アドレナリン 受容体刺激による CREB や p38-MAPK のリン酸化の違いをリン酸化認識抗体を用いて野生型と比較した。アドレナリン 受容体刺激後の初代培養褐色脂肪細胞における CREB や p38-MAPK のリン酸化は野生型と *Prip*-KO マウス間で有意な差は認めず、CREB や p38-MAPK による UCP1 発現調節において PRIP は関与していないことが考えられた。

本研究を通して、生体の脂質代謝における PRIP 分子の役割の一端が明らかとなった。PRIP は、白色脂肪細胞だけでなく褐色脂肪細胞においても脂肪分解を制御しており、UCP1 の活性化や遺伝子発現の調節に関与していた。本研究により、褐色脂肪細胞における PRIP が仲介するエネルギー代謝の分子基盤の一部が明らかとなり、エネルギー代謝調節機構の解明に繋がった。

今後、本研究をさらに深め、PRIP が仲介する褐色脂肪細胞の脂肪分解やエネルギー代謝機構を制御できれば、白色脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制しその余剰脂肪酸を褐色脂肪細胞でエネルギーとして放出させるような新薬の開発にも繋がると期待できる。そして、PRIP を介した新たな肥満の予防策や治療戦略に通じると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kana Oue, Yosuke Yamawaki, Satoshi Asano, Mizokami Akiko, Masato Hirata, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu	4. 巻 59
2. 論文標題 Chronic cold exposure enhances the induction of uncoupling protein 1 in adipose tissues of phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 108-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hayashiuchi Masaki, Kitayama Tomoya, Morita Katsuya, Yamawaki Yosuke, Oue Kana, Yoshinaka Taiga, Asano Satoshi, Harada Kae, Kang Youngnam, Hirata Masato, Irifune Masahiro, Okada Mitsugi, Kanematsu Takashi	4. 巻 31
2. 論文標題 General anesthetic actions on GABAA receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 531 ~ 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-017-2350-2	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 Yamawaki Yosuke, Oue Kana, Shirawachi Satomi, Asano Satoshi, Harada Kae, Kanematsu Takashi	4. 巻 53
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 18 ~ 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2016.06.001	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 Kanematsu Takashi, Oue Kana, Okumura Toshiya, Harada Kae, Yamawaki Yosuke, Asano Satoshi, Mizokami Akiko, Irifune Masahiro, Hirata Masato	4. 巻 61
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein: A novel signaling molecule for modulating fat metabolism and energy expenditure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2019.04.002	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yamawaki Yosuke, Shirawachi Satomi, Mizokami Akiko, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Asano Satoshi, Oue Kana, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563 ~ 104563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104563	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大植香菜, 入船正浩, 兼松 隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Oue, Yosuke Yamawaki, Satoshi Asano, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 The mechanism of phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)-mediated energy metabolism by α -adrenergic stimulation in brown adipocytes
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大植香菜, 佐々木詩佳, 本池芹佳, 河内貴弘, 吉田啓太, 清水慶隆, 吉田充広, 入船正浩
2. 発表標題 口底部巨大甲状舌管嚢胞により気管挿管に難渋した小児の麻酔経験 .
3. 学会等名 第45回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 兼松 隆, 大植香菜, 山脇洋輔, 浅野智志
2. 発表標題 肥満制御研究の新潮流 白色・褐色脂肪細胞の機能を制御しエネルギー代謝を調節する新しい分子基盤
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾田友紀, 吉田啓太, 小田 綾, 向井友宏, 好中大雅, 高橋珠世, 大植香菜, 向井明里, 入舩正浩, 岡田芳幸
2. 発表標題 高度肥満および知的障害を伴う自閉スペクトラム症患者に対し意識下静脈内鎮静法下で歯科治療を行ない得た1症例.
3. 学会等名 第46回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究協力者	兼松 隆 (Kanematsu Takashi) (10264053)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究協力者	山脇 洋輔 (Yamawaki Yosuke) (90584061)	第一薬科大学・薬学部・講師 (37107)	