

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17338

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞の分化・増殖メカニズムに着目した新規肥満治療薬の探索

研究課題名(英文) Research and development for novel anti-obesity drugs focusing on the differentiation and proliferation mechanism of brown adipose tissue

研究代表者

森元 英周 (Hidechika, Morimoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20827539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞(BAT)が活性化すると、エネルギーの消費が増大し抗肥満効果を発揮する。我々はAngiotensin1-7(Ang1-7)という薬剤がAng1-7の特異的受容体であるMas receptorを介して褐色脂肪細胞を直接活性化する作用が存在すること、その活性化作用が褐色脂肪細胞の分化の早期の段階で重要であることを明らかにした。これまで、エネルギー消費を増やすことで効果を発揮する肥満治療薬はなく、Ang1-7は新しい肥満治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満が生活習慣病の原因として問題となる中で、従来の食事療法や運動療法は適切に行えば非常に有効な肥満治療であるが、実際にこれらを継続することは難しい。そこで、内服による治療が望まれるが、現在、日本で肥満治療薬として使用できる薬剤は非常に少ない。Ang1-7が褐色脂肪細胞を活性化し抗肥満効果を発揮する機序の一部を解明できたことは、従来とは異なり、エネルギー消費を増加させることで抗肥満効果を発揮しようとする新たな肥満治療薬につながる研究成果である。また、将来肥満を原因とする様々な疾患の予防とそれによる医療費の削減をもたらすという意味でも非常に意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：Activation of brown adipose tissue (BAT) increases energy expenditure and exerts an anti-obesity effect. We have shown that the drug Angiotensin1-7 (Ang1-7) directly activates BAT via the specific Ang1-7 receptor, the Mas receptor, and that this activation is important in the early stages of brown adipocyte differentiation. Until now, there have been no obesity drugs that exert their effects by increasing energy expenditure, and Ang1-7 may lead to the development of new therapeutic drug for obesity.

研究分野：肥満・内分泌・代謝

キーワード：Angiotensin1-7 褐色脂肪細胞 抗肥満効果

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに伴う合併症は世界中で問題となっている。それに伴い糖尿病や心疾患などの生活習慣病も増加し、死亡率の増加や医療経済の圧迫といった様々な問題を生み出している。現在、肥満治療の第一選択は運動療法と食事療法でありこれらが適切に実行された場合は有効な治療となりうる。しかし、小児においては動機付けが困難なことから、成人においては動機付けの面や時間的な制約から、その効果は限定的である。平成 29 年度学校保健統計調査報告書によると、肥満度 20%以上の肥満傾向児の割合は、男子で 10%前後、女子で 8%前後を推移しており男女ともに 5 年以上大きな変化はなく、成人へのキャリアオーバーが懸念される現状が浮かび上がる。さらには、国民健康・栄養調査によると、成人における BMI25 以上の肥満者の割合もまた、30 歳以上の男性で 30%前後、40 歳以上の女性で 20%前後と過去 10 年以上大きな変化を認めていない。これらのことは、運動療法や食事療法の限界を示しており、新たな肥満薬物療法の必要性を示している。

研究代表者はこれまで Ang1-7 というペプチドと BAT に着目し研究を進めてきた。Ang1-7 は、RAS の new family で Ang1-7 の心血管疾患や炎症性疾患、肥満合併症に対する様々なプラスの効果が報告されている。一方、BAT はミトコンドリア内膜に存在する UCP1(uncoupling protein 1) を介してエネルギーを消費し、熱を産生する機能を持ち効率的な熱産生を行う組織である。研究代表者はこれまでの検討で、MasReceptor (MasR) (Ang1-7 の特異的受容体)が、従来発現が多いとされてきた腎臓よりも BAT でより多く発現していることを確認し、肥満モデルマウスを用いた検討で、1) Ang1-7 が BAT を分化・増殖させエネルギー消費を増加させることで体重減少効果を発揮すること、2) Ang1-7 は BAT において HSL (hormone sensitive lipase) を活性化し脂肪分解を促しインスリン抵抗性を改善させること、3) Ang1-7 の熱産生 / エネルギー消費効果には白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を伴わないことを報告した (*Am J Physiol Endocrinol Metab* 314: E131, 2018)。研究代表者はその報告の中で、抗肥満効果を発揮する際に交感神経系を介した経路と BAT に存在する MasR を介した経路の存在を示唆したが、Ang1-7 が交感神経系を刺激するとした研究 (*Peptides* 69: 80, 2015)がある一方で、MasR を介して BAT に直接作用する経路については不明な点が多い。しかし、BAT における MasR の発現は多く認めており、Ang1-7 の BAT への MasR を介した影響は少なくないと考えられる。そこで、本研究では、Ang1-7 の投与による抗肥満効果に MasR を介した BAT への直接作用が強く関与しているという仮説を立て、それを立証すべく実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究においては前述の仮説の下、Ang1-7 が引き起こす BAT の分化・増殖および熱産生増加のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

肥満モデルマウスを用いた実験モデルの構築

肥満モデルマウスを作成し、Ang1-7(A9202, Sigma)および β -3-ADR blocker(SR59230A, Sigma) を用いて実験モデルを作成する。具体的には、生後 4 週齢、雄の C57BL/6J マウスを購入し、普通食(NC)と高脂肪食 (HFD) (脂肪由来カロリーの比率 60%)で 4 週間飼育する。その後、HFD 投与群をコントロール群、Ang1-7 投与群、Ang1-7 + β -3-ADR blocker 投与群に分けて更に 4 週間飼育する。薬剤の投与は、背部の皮下に浸透圧ポンプ (model 1004, Alza Corp)を植え込み持続的に行う。経過中、食事摂取量、体重などを測定して、各群間での比較検討を行う。

飼育開始 8 週目で糖負荷試験やインスリン負荷試験による耐糖能の評価、直腸温の測定、酸素消費量測定、活動量測定、CT 撮影等を行う。活動量測定では明期、暗期の各 phase で活動

量の違いを比較する。その後、各臓器の採取を行い重量のデータなどを採取したのち保存する。また、組織学的評価や、Western-blotting や real time PCR で BAT の分化・増殖に関わる PRDM16 や EHMT1 などの蛋白、熱産生に関わる UCP1 や HSL などの蛋白、mRNA の発現量を評価する。

前駆褐色脂肪細胞株を用いた実験

in vivo の実験に先立ち、不活化処理を施した前駆褐色脂肪細胞株である CB1 細胞を用いた実験を行う。CB1 細胞に対する分化誘導開始日を day0 とし、day0 から Angiotensin1-7(Ang1-7)や比較対象として CL316243(選択的 β 3 アドレナリンレセプターアゴニスト)を投与し day2、4、6、8 に mRNA を抽出し薬剤無投与をコントロールとして、褐色脂肪細胞(BAT)の分化増殖に関わる蛋白や、Ang1-7 の受容体である MasReceptor(MasR)、交感神経刺激を介した BAT 活性化の起点となる β 3 アドレナリンレセプター(β 3 ADR)の mRNA の発現を比較した。

以上の方法により、Ang1-7 が交感神経系を介さずに BAT の分化・増殖に関連するメカニズムを解明する予定とした。

4. 研究成果

(1) Ang1-7 投与群と CL(β 3-ADR アゴニスト)投与群で、脂肪滴が増加するタイミングが異なっていた要因に関して、それぞれの受容体の発現に着目して検討した。分化誘導のみ行い、MasR および β 3-ADR の mRNA 発現量の経時変化を調べたところ、MasR の mRNA の発現は、day2 でピークを迎え、day4 以降は低値となった。一方で、 β 3-ADR は、day4 までは発現が少なく、day6 から発現が増加した(図 1)。これらの結果より、Ang1-7 と CL を併用したところ、BAT に対するこれらの作用が相乗効果ととれる反応を示していた。

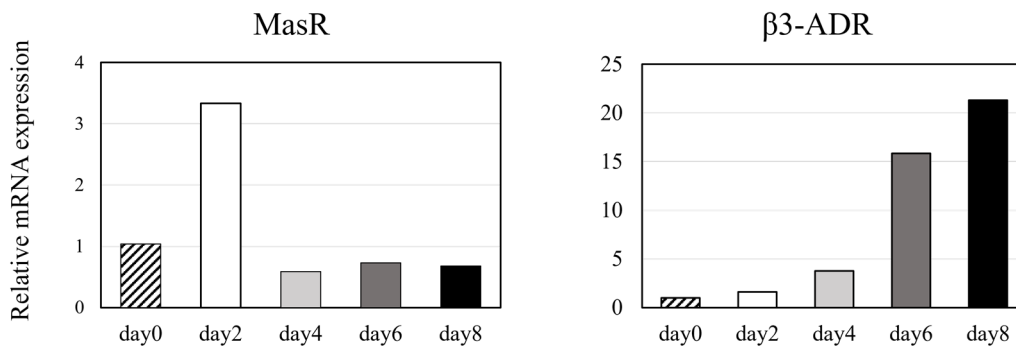


図 1. mRNA expression of Mas receptor and β 3-AD receptor

(2) 分化誘導 day4、8 における蛋白発現の変化について検証した。UCP1 は Ang1-7 投与群で発現が増加した。脂肪酸合成酵素は、day4 では明らかな差はなく、day8 では薬剤投与群で発現が増加した。脂肪滴の成熟マーカーとして用いられる perilipin は、day4 では Ang1-7 高濃度群で有意に発現が増加も、day8 では逆に Ang1-7 投与群で発現が減少しており、脂肪分解により perilipin が分解された可能性が示唆された。p38-MAPK は、PGC-1 の発現を増加させかつ活性化させることで UCP1 の発現を増加させ、褐色脂肪細胞を活性化させることが知られているが、Ang1-7 投与により p38-MAPK のリン酸化が増加した。(図 2)

活性化した褐色脂肪細胞では、ミトコンドリアにおける ATP 合成が UCP1 を介した熱エネルギー産生に傾くため、ATP 合成の需要に見合うだけの ATP が合成されない。その結果、AMP が増加し、AMPK のリン酸化が増加したと考えられた。以上より、Ang1-7 には Mas receptor を介して褐色脂肪細胞を直接活性化する作用が存在することが明らかになった。

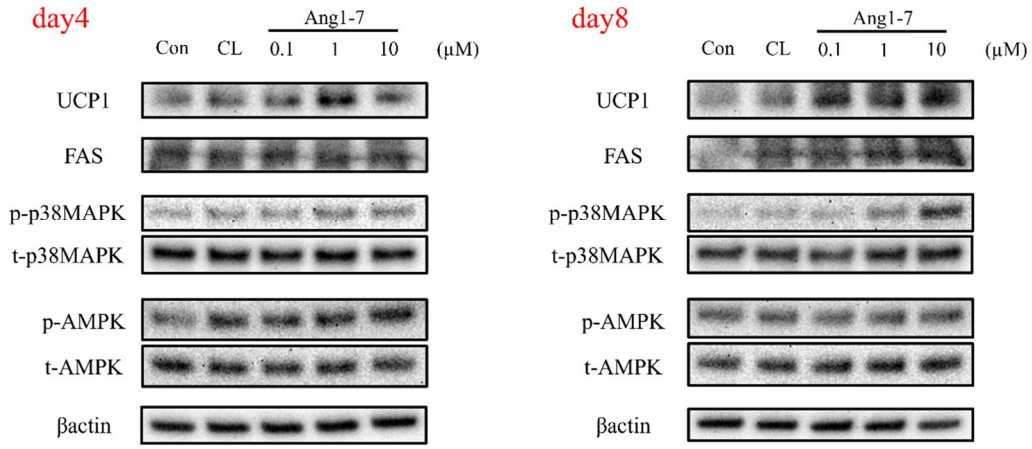


図 2. BAT および脂肪分解に関わる蛋白発現の変化

(3) 従来研究代表者が指摘してきた通り、Ang1-7 には BAT に直接作用し BAT を活性化する経路の存在が示唆された。また、それ以外にも Ang1-7 には lipolysis を活性化し遊離脂肪酸を増加させ、その遊離脂肪酸を BAT における熱産生の材料として利用する経路の存在も示唆された。さらに、Ang1-7 と 3-ADR アゴニストを併用した実験からは、相乗効果ともいえる結果が得られた。以上より、Ang1-7 は従来指摘されてきた BAT の活性化の経路以外にも BAT を直接活性化する経路を持ち、かつ、遊離脂肪酸を増加させ二次的に BAT を活性化させる経路の存在も示唆されており(図 3)、新たな肥満治療薬開発のターゲットとして非常に有望であることが分かった。その一方で、Ang1-7 が BAT を直接活性化する MasR 以降の経路は解明できておらず、今後の研究が必要である。

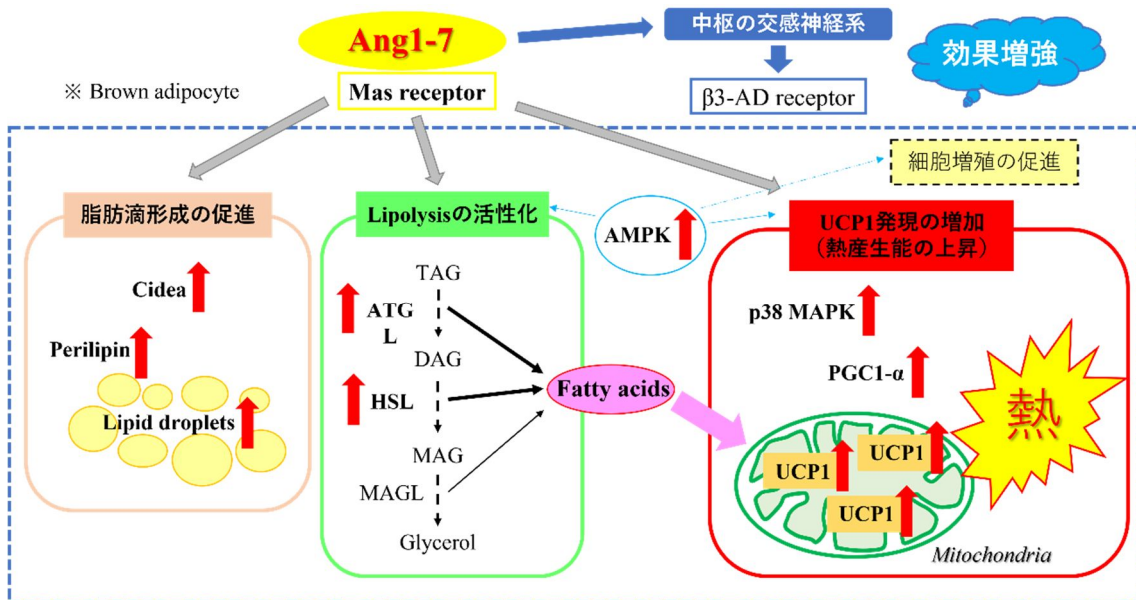


図 3. Ang1-7 の BAT 活性化の経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------