

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791500

研究課題名(和文) 外科侵襲下における褐色脂肪細胞分化機構の解明と代謝亢進状態改善の試み

研究課題名(英文) The mechanism of brown adipocyte by the surgical insult and the attenuation of hypermetabolism

研究代表者

葉 季久雄 (Yo, Kikuo)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：00327644

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)：ラット肩甲骨間褐色脂肪組織の形態解析の結果、熱傷負荷により褐色脂肪組織中に含まれる褐色脂肪細胞の比率が増大し、何らかの細胞が褐色脂肪細胞へと分化誘導していることが示唆された。各々の褐色脂肪細胞においては、細胞あたりのミトコンドリア数が増大していた。網羅的遺伝子解析の結果、ラット肩甲骨間褐色脂肪組織において、TNF、NF Bの発現が増大し、Lipid metabolismが亢進していた。褐色脂肪組織の分化に関しPGC1 が関与していることが示唆され、熱傷等による代謝亢進状態改善にかかわる新規治療薬開発において、ターゲットとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We used the interscapular brown adipose tissue (iBAT) for analyses. We showed burn injury increased the ratio of brown adipocyte to brown adipose tissue in the morphological analysis. In each brown adipocyte, the number of mitochondria per cell was increased. This suggests the presence of the adipose-derived stromal cells. In the microarray analysis, we showed the increased expression of TNF and NF B in iBAT. Lipid metabolism in iBAT was activated by burn injury. PGC1 was speculated to be involved in the differentiation of brown adipose tissue, and would be a target molecule in the development of the pharmaceutical agents for the attenuation of surgical hypermetabolism.

研究分野：外科侵襲学

キーワード：Surgical metabolism Hypermetabolism 褐色脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織は動物において、エネルギー消費、熱産生の増大と密接な関係にあることが知られている。げっ歯類ならびに新生児においては、褐色脂肪組織は体温の維持・調節に中心的役割を果たしているが、ヒト成人においては生理的機能を果たしていないとされていた。しかしながら、近年 PET-CT (positron emission tomography combined with computed tomography) を用いた研究により、寒冷刺激下においてヒト成人においても褐色脂肪組織の存在が明らかとなり、褐色脂肪組織の activity はグルコースの analogue である ^{18}F FDG (^{18}F labeled 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose) の取り込み程度により示された。興味深いことに、褐色脂肪組織の activity は安静時のエネルギー消費量と正の相関を示し、body-mass index と負の相関を示した。これらの結果は褐色脂肪組織がヒト成人において生理学的機能を有していることを示し、侵襲受傷後の hypermetabolic state において褐色脂肪組織がエネルギー消費量亢進病態に対する治療ターゲットとなりうることを示唆している。

熱傷侵襲下ではラット褐色脂肪組織は activate されており、熱傷に伴うエネルギー消費量亢進の主病変であることが明らかとなった。ミトコンドリア外膜に存在する Uncoupling protein 1 (UCP1) の発現量が増大しており、褐色脂肪組織内に存在するミトコンドリアが中心的役割を担っていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 熱傷侵襲に代表される過大侵襲後のエネルギー消費量亢進状態を軽減する治療法の確立を目的とし、そのターゲットとなりうる molecule の同定を試みる。

(2) 褐色脂肪細胞の分化機構の解明をめざし、エネルギー消費量亢進状態の改善につながる新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan Inc., Yokohama, Japan; 7 週雄性、23-28g) および SD ラット (Charles River Laboratories Japan Inc., Yokohama, Japan; 10 週雄性、350-400g) を実験施設で飼育した後、実験に供した。実験施設は温度・湿度管理され、12 時間毎に明暗環境が整備されていた。これらの動物は自由に餌および水を摂取することができた。すべての実験は慶應義塾動物実験委員会の承認のもとに行われた。

(2) マウス熱傷モデル

C57BL/6J マウスを sham 群および burn 群にわけ、ペントバルビタール麻酔 (50mg/kg、腹腔内投与) 下に背部を剃毛した。Burn 群は

100 の湯に 5 秒間浸し、度 30% body surface area (BSA) 熱傷を作成した。一方で sham 群は室温の湯に 5 秒間浸した。Burn もしくは sham 作成後、直ちに 40ml/kg の生理食塩水の腹腔内投与を輸液による蘇生として行った。

(3) ラット熱傷モデル

SD ラットを sham 群および burn 群にわけ、ペントバルビタール麻酔 (50mg/kg、腹腔内投与) 下に背部を剃毛した。Burn 群は 100 の湯に 12 秒間浸し、度 30% body surface area (BSA) 熱傷を作成した。一方で sham 群は室温の湯に 12 秒間浸した。Burn もしくは sham 作成後、直ちに 40ml/kg の生理食塩水の腹腔内投与を輸液による蘇生として行った。

(4) 研究プロトコール

熱傷負荷後 3 日目に sacrifice した後、肩甲骨間褐色脂肪組織 (interscapular brown adipose tissue; iBAT) を摘出し、組織学的評価、total RNA 抽出に利用された。

(5) 組織学的評価 (H&E 染色)

iBAT を 10% フォルマリンで固定した後、パラフィン包埋した。切片は 4 μm の厚さにカットし H&E 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

(6) 組織学的評価 (電子顕微鏡; TEM)

iBAT を 1 mm 程度にカットし、室温にて 2 時間 1% グルタルアルデヒドで固定した。後固定は 1% 四酸化オスミウムにて氷上 90 分間行った。浸漬した後、樹脂に包埋した。厚さ 80nm の超薄切片とし、透過型電子顕微鏡で観察した。

(7) 核タンパク抽出

iBAT からの核タンパク抽出は CellLytic Nuclear Extraction Kit (SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan) を用いて行った。抽出した核タンパクは解析まで -80 フリーザーで保存した。

(8) total RNA 抽出

iBAT からの total RNA は RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて行った。iBAT 摘出後直ちにホモジナイゼーションを行い、マニュアルに従い DNAase 処理を行い total RNA を抽出した。Total RNA 抽出後に RNA 収量を測定し、解析まで -80 フリーザーで保存した。

(9) マイクロアレイ

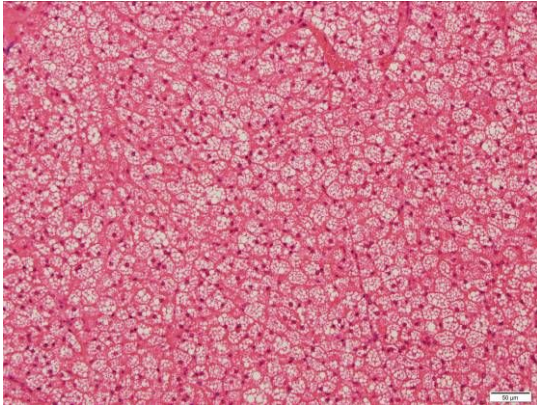
iBAT から抽出した total RNA から cDNA を合成し、Rat Genome230 2.0 Array (Affymetrix, Tokyo, Japan) を用いた。解析ソフトとして IPA (Ingenuity, Redwood City, CA) と GeneSpring (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使い、網羅的に遺伝子発現解

析を行った。

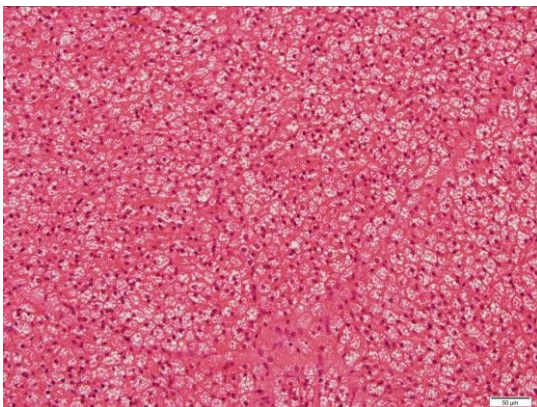
4. 研究成果

(1) マウス熱傷モデルとラット熱傷モデルの検証

当初、マウス熱傷モデルを用いて研究を開始したが、熱傷に代表されるヒト炎症病態において、マウスモデルを用いた実験が必ずしも病態を反映しないことが明らかとなった。すでに開始していたマウス熱傷モデルを用いてマウス iBAT の形態評価を行った。

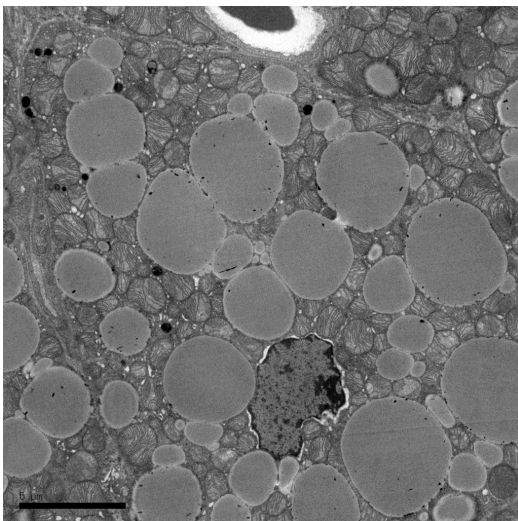


Sham iBAT (H&E 染色、x200)

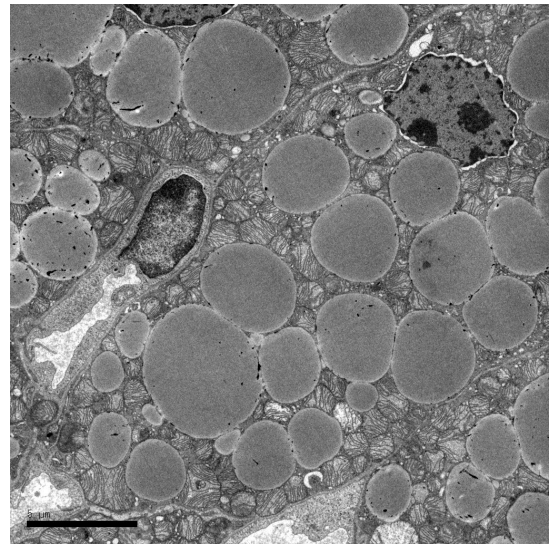


Burn iBAT (H&E 染色、x200)

熱傷負荷前からすでに褐色脂肪細胞の充実度が高いことがわかる。



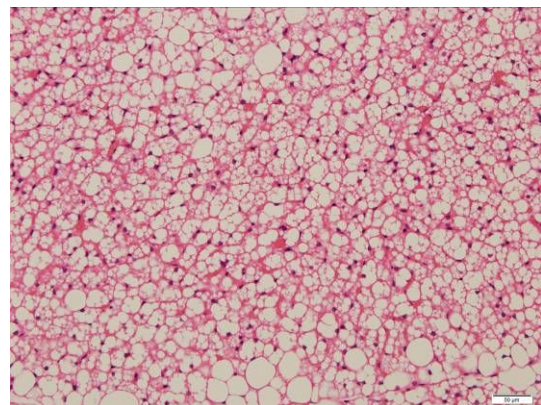
Sham iBAT



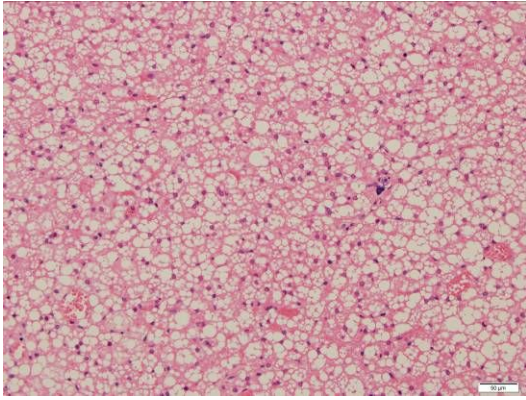
Burn iBAT

TEM による褐色脂肪細胞の超微細構造を検討した。Sham 群と Burn 群に明らかな形態学上の差は認められなかった。ラット熱傷モデルにおける評価では、各褐色脂肪細胞あたりのミトコンドリア数は熱傷負荷により著明に増大していることが明らかとなっている。形態学的には、sham 群 iBAT に認められるミトコンドリア数が増大しており、熱傷負荷によらずともマウスの基礎代謝量が高いことを示唆しているものと考えられた。このことから、マウスによる実験がヒト熱傷病態を十分に反映しないと判断した。

(2) ラット iBAT の形態学的変化 (熱傷負荷 3 日目)



Sham iBAT (H&E 染色、x200)



Burn iBAT (H&E 染色、x200)

熱傷負荷により、褐色脂肪組織中に含まれる褐色脂肪細胞の比率が増大（白色脂肪細胞の比率が低下）していることがわかる。すなわち、熱傷負荷により何らかの細胞が褐色脂肪細胞へと分化していることが示唆された。

既存の研究から、iBAT における熱傷負荷による UCP1 発現量の増加が知られており、その上流に位置する PPAR、PGC1 の核内発現量を検討するべく、核タンパクの抽出を試みた。発現を確認することはできなかった。免疫染色では発現を確認できており、油滴による干渉が原因と考えられた。引き続き、精度の高い核タンパク抽出方法を検討中である。

(3) ラット iBAT における網羅的遺伝子発現解析

熱傷負荷により、ラット iBAT において発現量が増大していた因子は、TNF、NF- κ B であった。また、Lipid Metabolism が亢進していることが判明した。Network analysis では、褐色脂肪組織の分化に PGC1 が関与していることが示唆された。PGC1 が褐色脂肪組織発現の key molecule であることが推測され、今後 real-time PCR および発現解析が求められる。また、熱傷負荷等による代謝亢進状態改善にかかわる新規治療法開発において、ターゲットとなりうる可能性を示した。

褐色脂肪組織の分化機構の解明を目指していたが、褐色脂肪組織からの褐色脂肪細胞ならびに褐色脂肪細胞前駆細胞の分離同定方法の開発にさらなる検討が必要である。

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 1 件)

Kikuo Yo, Yong-Ming Yu, Gaofeng Zhao, Ali A. Bonab, Naoki Aikawa, Ronald G. Tompkins and Alan J. Fischman, Brown adipose tissue and its modulation by a

mitochondria-targeted peptide in rat burn injury-induced hypermetabolism, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 査読有 Vol.304(4), 2013, E331-E341.
doi: 10.1152/ajpendo.00098.2012

〔学会発表〕(計 1 件)

Kikuo Yo, THE ACTIVATION OF BROWN ADIPOSE TISSUE IN BURN INJURY INDUCED HYPERMETABOLISM, International Society for Burn Injuries 2012, September 11th, 2012, Edinburgh, UK

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葉 季久雄 (YO KIKUO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 00327644

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし