

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659451

研究課題名(和文) 褐色脂肪機能制御における内分泌系とサーチュインのクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between sirtuins and endocrine system in regulation of brown adipose tissue function.

研究代表者

林 良敬 (Hayashi, Yoshitaka)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：80420363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織は体温維持に重要な役割を果たし、その機能は交感神経系や甲状腺ホルモンにより制御されることが知られていた。一方、我々は、血糖値上昇作用を主な生理作用とするグルカゴンが、アミノ酸代謝やニコチンアミド代謝制御においても重要な役割を果たすことを明らかとしてきた。本研究ではグルカゴン遺伝子欠損動物が寒冷不耐性を示す可能性に着目して、その褐色脂肪の機能を解析した。グルカゴン欠損動物の褐色脂肪では熱産生に関わる遺伝子群の発現が低下し、グルカゴン投与により遺伝子発現・熱産生能ともに回復した。この制御にはFGF21が関与する可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) plays important roles in adaptive thermogenesis. It is well known that function of BAT is regulated by sympathetic nerve system and thyroid hormones. We have established animal models deficient in glucagon gene and have shown that glucagon plays important roles not only in glucose homeostasis but also in regulation of amino acid metabolism and nicotinamide metabolism.

In this study, BAT function in glucagon-deficient mice was analyzed, as the animal showed cold intolerance. Expression of genes involved in thermogenesis, such as uncoupling protein 1 and deiodinase 2, was lower in BAT in glucagon-deficient mice than in the controls. Administration of glucagon to glucagon-deficient mice restored gene expression patterns in BAT and ameliorated cold intolerance. Involvement of FGF21 was suggested, as its serum concentration was markedly increased by glucagon administration.

研究分野：内分泌学

キーワード：グルカゴン 褐色脂肪 熱産生 脱共役蛋白質 交感神経

1. 研究開始当初の背景

発熱する脂肪・脂肪を蓄積する筋肉という異名を持つ褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue, BAT)は、ヒトにおいては新生児期より後は縮退し、成人ではほとんど存在しないと言われてきた。しかし 2009 年に3つの独立したグループより寒冷暴露後の FDG-PET 解析により①成人に BAT が存在すること②肥満者では BAT の組織量およびブドウ糖取り込み能が低下していること、が報告された。

BATの発熱機能はミトコンドリアに由来する。BATのミトコンドリアには脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)が豊富に発現し、甲状腺ホルモンがその制御に関わっていることが知られている。BATでは、また脱ヨード反応により活性型甲状腺ホルモン、T3へ転換するII型脱ヨード酵素(Deiodinase 2, Dio2)も豊富に発現している。Dio2ノックアウトマウス(Dio2KO)は寒冷不耐性を示し、T3によるミトコンドリア機能の調節が熱産生・体温調整において重要な役割を担っている。

BATにおけるT3受容体(T3R)の発現に関する報告は少ないが、近年サーチュイン(カロリー制限下の寿命延長において重要な役割を果たす蛋白脱アセチル化酵素)を活性化するとされるSIRT1720投与下ではT3RやDio2の遺伝子発現が促進することが明らかとされた(Feige JN et al *Cell Metab* 2008)。一方、我々が作成し表現型解析を進めてきたグルカゴン遺伝子ノックアウトマウス(GCGKO:Y. Hayashi et al *Mol Endocrinol* 2009)で予備的な検討を行った結果、BATにおいてUCPのほかにT3RやDio2遺伝子の発現に異常が認められた。これらの知見は、BATの機能制御において、古典的に重要な役割を果たすことが知られてきた甲状腺ホルモンや交感神経系に加えて、グルカゴンやサーチュインといった意外なプレイヤーが関与していることを示すものと考えられるが、その詳細は明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究においてはGCGKOの寒冷不耐性を確認した上で、その原因を明らかとすることを目的とした。さらに、GCGKOにおける褐色脂肪機能の異常の原因の解明を通して、グルカゴンの特異的生理作用を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

急性寒冷暴露実験および解析:overnight絶食したマウスを4°C環境に曝露し、30分毎に直腸温度を測定、また寒冷曝露による体重減少率を解析した。曝露前後に血液および組織をサンプリングした。摘出した褐色脂肪組織より切片を作製し、HE染色を行ったほか、中性脂肪(TG)含有量を測定した。また反体側の組織よりRNAを抽出し遺伝子発現解析に供した。

熱産生評価:小動物総合モニタリングシステ

ム(CLAMS; Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System)により酸素消費および活動量を測定した。24°Cから4°Cまで約-0.1°C/minの速度で室温を下げる緩徐寒冷暴露を行った。また、β3ARアゴニストCL-316,243を投与が酸素消費および活動量、血糖値、遊離脂肪酸(FFA)およびインスリン濃度に及ぼす影響を解析した。

グルカゴン投与実験:GCGKOはグルカゴン遺伝子に由来するペプチド(グルカゴンのほか、GLP-1やGLP-2など)をすべて欠損する。そこで、GCGKOにおいて観察される表現型が主に、グルカゴンの欠損によることを確認するために、1mg/kgのグルカゴンを12時間毎に3回投与する短期間投与実験、1日1回2週間投与する長期間投与実験を行った。長期グルカゴン投与後急性寒冷暴露実験を行い深部体温変化を測定したほか、CL-316,243投与がVO₂に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

急性寒冷曝露においては図1に示すようにGCGKOは対照群より著しい体温低下を示す一方で、体重減少率は低かった。すなわちグルカゴン遺伝子に由来するペプチドが、寒冷時における熱産生・エネルギー消費の増加において必須の働きをしていることを初めて明らかとした。

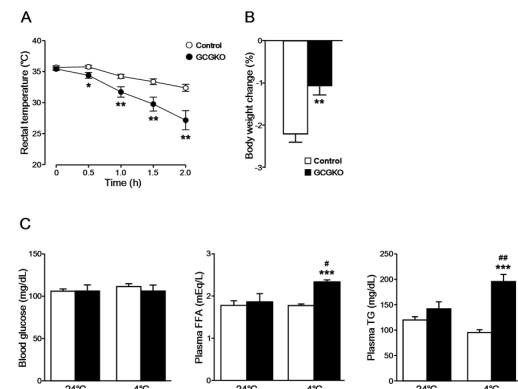


図1 寒冷曝露時の直腸温度、体重減少および血液生化学解析を行った。(A) 寒冷曝露時の直腸温度変化(○:Control, n=11; ●:GCGKO, n=10) (B) 寒冷曝露時の体重減少率(□:Control, n=10; ■:GCGKO, n=8) (C) 寒冷曝露前後における血糖値、血漿遊離脂肪酸濃度(FFA)および中性脂肪(TG)濃度(○:Control, n=7; ●:GCGKO, n=8)

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. Control; #p < 0.05, ##p < 0.01

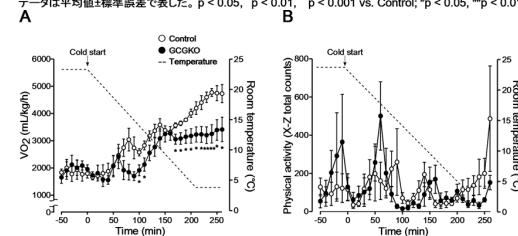


図2 寒冷曝露時の酸素消費量(VO₂)および活動量を解析した。(A) 寒冷曝露時のVO₂(○:Control, n=6; ●:GCGKO, n=5) (B) 寒冷曝露時の活動量(○:Control, n=6; ●:GCGKO, n=5)

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, vs. Control.

次に、緩徐寒冷暴露による酸素消費および活動量を測定したところ、図2に示すように、GCGKOは寒冷曝露に伴う酸素消費の増加が障害されていることが明らかとなった。

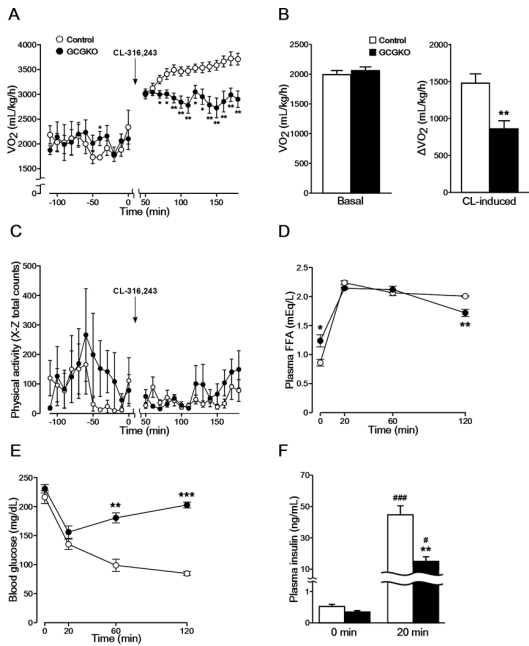


図3 83アドレナリン受容体アゴニストCL-316,243 (CL)投与時のエネルギー代謝を測定した。(A) CL投与時の酸素消費量(VO_2) (○:Control, n=6; ●:GCGKO, n=8) (B) 基礎(Basal) VO_2 およびCL誘導性(CL-induced) ΔVO_2 (○:Control, n=6; ●:GCGKO, n=8) (C) CL投与時の活動量(○:Control, n=6; ●:GCGKO, n=8) (D,E) CL投与時の遊離脂肪酸(FFA)濃度(D)および血糖値(E) (○:Control, n=4; ●:GCGKO, n=4) (F) CL投与前および投与20分後の血漿インスリン値(○:Control, n=4; ●:GCGKO, n=4) データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. 0 min.

さらに、褐色脂肪における熱産生能を評価するために、脂肪細胞特異的に発現する $\beta 3AR$ アゴニストである CL-316,243 を投与して酸素消費を測定した。図 3 に示すように、GCGKO では対照群に比べて、運動量には差を認めない一方で、酸素消費の増加が有意に減少していた。これらの結果から GCGKO においては褐色脂肪組織の交感神経刺激に対する応答性が低下していることが明らかとなった。

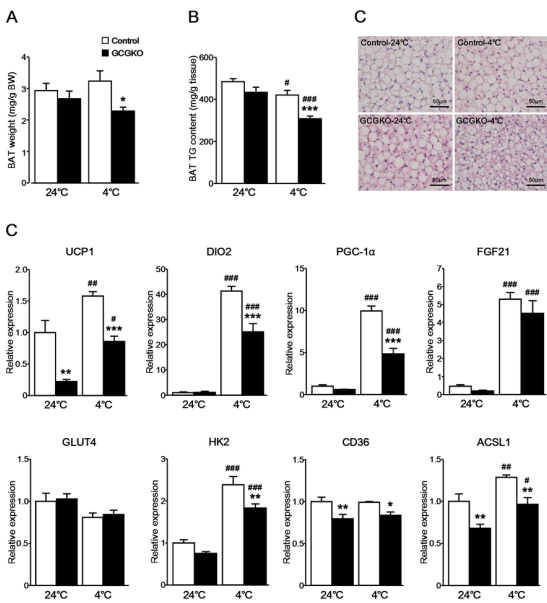


図4 BATにおいて形態学的解析および遺伝子発現解析を行った。(A,B) 通常飼育時(24°C)および寒冷曝露時(4°C)の(A)BAT重量と(B)BAT中性脂肪(TG)含有量(○:Control; ●:GCGKO, n=4-8) (C) BATのHE染色 (D) 24°Cおよび4°CのBAT遺伝子発現(○:Control; ●:GCGKO, n=5-8) データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. 24°C. DIO2, type 2 iodothyronine deiodinase; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; GLUT4, glucose transporter 4; HK2, hexokinase 2; ACSL1, acyl-CoA synthetase long-chain family member 1

GCGKO において褐色脂肪機能の低下が明らかとなったため、その原因を解明するために褐色脂肪組織の形態および遺伝子発現を解析した(図 4)。寒冷曝露による熱産生関連遺伝子の発現は GCGKO においても誘導されたが、その程度は対照群に比較して弱かった。特に、ミトコンドリアにおける熱産生に関与する脱共役タンパク質-1(Uncoupling protein-1: UCP-1)の発現は寒冷曝露前でも GCGKO で有意に低く、GCGKO の褐色脂肪機能低下への関与が示唆された。

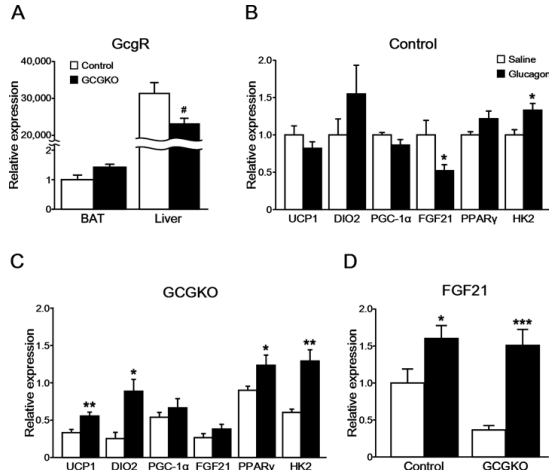


図5 グルカゴンの短期投与後にBATおよび肝臓の遺伝子発現解析を行った。(A) BATおよび肝臓におけるグルカゴン受容体(GcgR)の遺伝子発現(○:Control; ●:GCGKO, n=5-8) (B,C) 短期グルカゴン投与後のControl (B)およびGCGKO (C)におけるBAT遺伝子発現(○:Saline; ●:Glucagon, n=5-8) (D) 短期グルカゴン投与後の肝臓におけるFGF21遺伝子発現(○:Saline; ●:Glucagon, n=6-8) データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Saline; # $p < 0.05$, vs. Control. PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

GCGKO において欠損するグルカゴン遺伝子に由来する複数のペプチドのうち、主にグルカゴンの欠損が褐色脂肪機能の低下に関与している可能性を検証するために、グルカゴン投与実験を行った。図 5 に示すように短期間のグルカゴン投与により UCP1 を始めとする熱産生関連遺伝子群の発現の有意な増加を認めた。一方、寒冷曝露において褐色脂肪組織における発現が上昇する FGF21 (fibroblast growth factor 21:線維芽細胞成長因子 21)の発現は、グルカゴン投与により肝臓においては増加したが、褐色脂肪においては増加は認められなかった。

短期間グルカゴン投与実験よりグルカゴンが褐色脂肪機能を強化する可能性が示唆されたため、長期間グルカゴン投与を行った上で GCGKO の寒冷耐性を検証した。図 6 (次頁) に示すようにグルカゴン投与により寒冷曝露時の体温低下は緩和される傾向を示した。また、交感神経刺激による熱産生応答は有意な改善を示した。これらの結果から、グルカゴンの生理作用は褐色脂肪組織の機能制御において重要な役割を果たすことが明らかとなった。図 5 に示すようにグルカゴンの受容体の発現は褐色脂肪組織よりも肝臓において著しく高いことや、グルカゴン投与による FGF21 の発現増加は肝臓で認められる一方で、褐色脂肪組織ではみとめられなかったこと、さら

にマウスに FGF21 を投与すると、UCP1 遺伝子を含む熱産生関連遺伝子の発現が上昇することが近年報告されていることから、グルカゴンによる褐色脂肪組織の制御は肝臓を介した間接的な作用である可能性が高いと考えられた。これらの成果は学会発表 9 ならびに雑誌論文 3 において報告した。

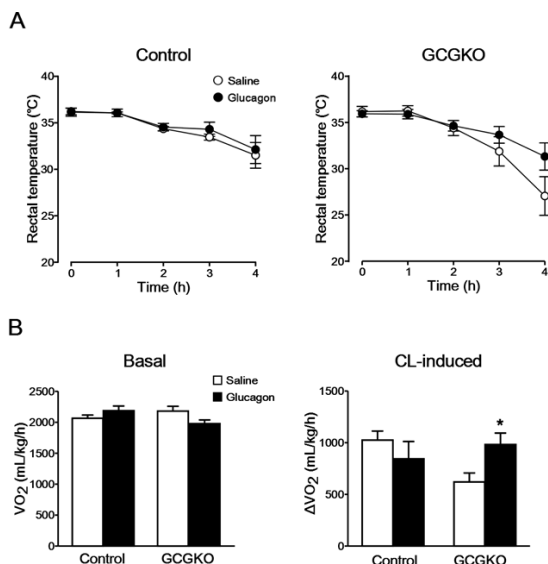


図6 長期グルカゴン投与を行った後、寒冷暴露時の直腸温度およびβ3アドレナリン受容体拮抗薬(B3AR拮抗薬)投与時の酸素消費量(VO₂)を解析した。(A) Control およびGCGKOの寒冷暴露時における直腸温度変化(○:Saline; ●:Glucagon, n=4-5) (B) 基礎(Basal)VO₂およびCL誘導性(CL-induced)ΔVO₂(□:Saline; ■:Glucagon, n=4-5) データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05 vs. Saline

最近 FGF21 の産生が、低タンパク状態において促進されることが報告された。本研究の過程をはじめとする我々の研究を含む、さまざまな報告から、グルカゴンは高いアミノ酸濃度によりその分泌が促進されて、血中のアミノ酸濃度を下げる方向に働く。一方、本研究でも示したようにグルカゴンは FGF21 の産生を促進する方向にはたらくことから、グルカゴンと FGF21 とアミノ酸濃度制御の関係は、単純ではない。

我々はまた GCGKO においてニコチンアミドの異化に関与するニコチンアミド N メチルトランスフェラーゼの肝臓における発現が著しく低下していることを過去に報告してきた。研究開始当初の背景で触れたように褐色脂肪における熱産生関連遺伝子の発現がサーチュイン(カロリー制限下の寿命延長において重要な役割を果たす蛋白脱アセチル化酵素)により制御される可能性が報告されてきた。ニコチンアミドを含むニコチンアミドアデニンジヌクレオチドがサーチュインの共質であることから、本研究ではグルカゴン-サーチュイン-ニコチンアミド制御の相互作用の解明にも挑戦し一定のデータを蓄積することができた。グルカゴン-FGF21-アミノ酸代謝制御の相互作用に関わるデータと合わせ、グルカゴンの新たな特異的生理作用の解明に向けての基盤が形成されたことも、本研究の成果と考えられる。

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 4 件)

1. Takagi Y., Kinoshita K., Ozaki N.*, Seino Y., Murata Y., Oshida Y., Hayashi Y., Mice deficient in proglucagon-derived peptides exhibit glucose intolerance on a high-fat diet but are resistant to obesity. *PLoS One* 10(9): e0138322 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0138322)
2. Takano Y., Kasai K., Takagishi Y., Kikumori T., Imai T., Murata Y., Hayashi Y.*, Pancreatic neuroendocrine tumors in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *PLoS One* 10(7): e0133812 2015 (DOI: 10.1371/journal.pone.0133812)
3. Kinoshita, K., *Ozaki, N., Takagi, Y., Murata, Y., Oshida, Y. and *Hayashi, Y., Glucagon is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *Endocrinology* 155(9): 3484-3492 2014 (DOI: 10.1210/en.2014-1741)
4. Xu S, *Hayashi Y., Takagishi Y, Itoh M and Murata Y. Aristaless-related homeobox plays a key role in hyperplasia of the pancreas islet α -like cells in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *PLoS One* 8(5): e64415 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0064415)

*:責任著者

[学会発表] (計 12 件)

1. 林 良敬: グルカゴンによるアミノ酸代謝とアルファ細胞増殖の制御、ワークショップ「アミノ酸研究の新展開：細胞シグナルとしての動的制御機構」 BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、京都、 2015.12.3.
2. 林 良敬: 代謝と細胞増殖の制御におけるグルカゴンの特異的作用 第 1 回生体調節研究所・内分泌代謝シンポジウム、前橋、2015.11.13.
3. Hayashi, Y.: Visualization of pancreatic islets using a decolorization technique. 2nd International Symposium of Neurovascular Wiring, Kyoto, 2015.1.28
4. 林 良敬: グルカゴンによる膵島内分泌細胞の分化増殖制御、シンポジウム”膵内分泌細胞の可塑性を制御するシグナルネットワーク” 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014.10.15
5. Hayashi, Y., Takano, Y., Kasai, K., Imai, T. and Murata Y. Pancreatic neuroendocrine tumors in mice deficient in glucagon gene. ICE/ENDO 2014, The 16th International Congress of Endocrinology/ The 96th

Endocrine Society Annual Meeting, Chicago, USA, 2014.6.21

6. 林 良敬: グルカゴンと代謝制御、シンポジウム”恒常性維持のためのホルモン分泌調節” 第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014.4.24
7. Hayashi, Y.: Vascular basement membrane in developing islets of Langerhans in the presence or absence of proglucagon-derived peptides. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, 2014.4.14
8. 林 良敬: グルカゴン欠損動物モデルにおける膵島内分泌細胞の増殖と神経内分泌腫瘍 第 225 回 発生研セミナー、熊本、2013.12.16
9. 木下佳大, 高木祐輔, 尾崎信暁, 押田芳治, 村田善晴, 林 良敬: 褐色脂肪組織における甲状腺ホルモンとグルカゴンのクロストーク. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 和歌山, 2013. 11.15
10. 林 良敬: グルカゴン遺伝子欠損動物モデル、相同遺伝性内分泌疾患は存在するか? 第 19 回 Kansai Diabetes Mellitus Federation 研究会、大阪、2013.7.6
11. 林 良敬: グルカゴン由来ペプチドと代謝制御異常 キックオフシンポジウム”ゲノム・エピゲノム解析による生活習慣病の病態解明とその制御を目指した分子標的の探索研究プロジェクト”、前橋、2013.6.13
12. Hayashi, Y.: Metabolism and islet “ α ”-cell hyperplasia in mice deficient in proglucagon-derived peptides. In Symposium “Glucagon Renaissance” 第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会、熊本、2013.5.18

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良敬 (HAYASHI, Yoshitaka)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 80420363

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者