## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号: 14301 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2012~2014

課題番号: 24790233

研究課題名(和文) In vivo 脳刺激による褐色脂肪細胞の分化誘導

研究課題名(英文)Brown adipose differentiation by in vivo optogenetic stimulation

#### 研究代表者

片岡 直也 (Kataoka, Naoya)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号:20572423

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):褐色脂肪組織は、熱産生を通じた積極的なエネルギー消費によって肥満の防止に寄与する。 交感神経性の熱産生刺激を長期間与えると白色脂肪組織中に誘導型褐色脂肪細胞(brite cell)の分化誘導を促進できることが示唆されている。そこで本研究では、光遺伝学的手法を用いて褐色脂肪の熱産生を制御する延髄の交感神経プレモーター領域を刺激し交感神経性熱産生を亢進させることで、brite cellの分化誘導を促進させることを可能にする技術の確立を試みた。その結果、光刺激により褐色脂肪組織交感神経の活性化を惹起し、それに伴う褐色脂肪組織温度の上昇が観察できた。

研究成果の概要(英文): In the central regulation of thermogenesis in brown adipose tissue (BAT), sympathetic premotor neurons in the rostral raphe pallidus nucleus (rRPa). Brown adipose, which expresses the thermogenic protein UCP1, provides a defense against cold and obesity, not only in rodents but even in adult humans. Moreover, the appearance of brown-like adipocytes within white adipose tissue depots is associated with improved metabolic phenotypes. In this study, using an optogenetic technique, we examined whether the sympathetic outflow could cause the differentiation of brite cell into the subcutaneous fat. Adeno associated virus (AAV)-mediated delivery of ChIEF gene into rat rRPa resulted in localization of ChIEF proteins in the rRPa neurons. In vivo photostimulation of ChIEF-expressing cell bodies in the rRPa elicited increases in BAT thermogenesis, blood pressure and heart rate.

研究分野: 環境生理学 分子細胞生物学

キーワード: 褐色脂肪組織 誘導型褐色脂肪組織 光遺伝学 交感神経プレモーターニューロン 延髄縫線核

#### 1.研究開始当初の背景

ヒトにおける褐色脂肪組織は新生児期のみに存在すると考えられてきたが、最近、成人にも存在することが明らかとなったことから(1)、成人の肥満予防やその治療を目的とした、褐色脂肪熱産生の調節メカニズムに関する研究が大きく注目されている。

脂肪細胞にはエネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞と、熱産生によりエネルギーを消費する褐色脂肪細胞の2種類が存在する。寒冷環境にいる時や高脂肪食摂取時には、褐色脂肪組織を支配する交感神経の活動が亢進し、神経終末から放出されるノルアドレナリンが、褐色脂肪細胞表面の 3 アドレナリン受容体(3AR)の活性化を通じて、ミトコンドリア内膜の uncoupling protein 1 (UCP1)を活性化し、熱産生を惹起する。

寒冷環境中での褐色脂肪熱産生を調節する中枢神経メカニズムにおいて司令塔となるのは、視床下部最吻側に位置する視索前野と呼ばれる体温調節中枢であり、熱産生時には視索前野からの脱抑制機構によって、視床下部背内側部(DMH)の興奮性ニューロンが活性化される。この興奮性ニューロンは、延髄の淡蒼縫線核吻側部(rostal raphe pallidus nucleus: rRPa)に存在する交感神経プレモーターニューロンを活性化する。交感神経プレモーターニューロンを活性化する。交感神経プレモーターニューロンを活性化する。交感神経プレモーターニューロンを活性化する。交感神経別したで、褐色脂肪組織への交感神経出力を増大させ、脂肪細胞表面の 3ARを介した熱産生が亢進する(2)。

こうした交感神経性の褐色脂肪熱産生が長 期的に上昇すると、白色脂肪組織中において、 通常は検出されない褐色脂肪関連遺伝子の 発現上昇が生じ、褐色脂肪様の形態を持つ 細胞の新生が観察される。この細胞は「誘導 型」褐色脂肪細胞(brown in white cell: brite cell)と呼ばれ、通常の褐色脂肪細胞と似た遺 伝子発現プロファイルや形態的特徴を持つた め、褐色脂肪細胞と同様の交感神経性の熱 産生機能を有することが示唆されている(3)。 こうした brite cell を積極的に誘導する技術の 確立は、エネルギー代謝亢進を狙った肥満治 療の新たな手法の開発につながると期待され ている。そこで、褐色脂肪熱産生の交感神経 活動を制御する脳内のプレモーター領域を人 為的に活性化することで、白色脂肪組織中で の brite cell の分化誘導を促進できれば、将来 的な肥満治療の構築に寄与できるのではな いかと考えるに至った。

## 2.研究の目的

褐色脂肪組織は熱産生機能を通じて、寒冷 環境での体温維持だけでなく、積極的なエネ ルギー消費を行うことで肥満の防止に寄与す るなど、重要な生体調節機能を有している。このことから、褐色脂肪組織の量や活性を人為的に増加させる技術が、新たな肥満治療の戦略になるものとして注目されている。本研究では、褐色脂肪熱産生を制御する延髄の交感神経プレモーター領域を光遺伝学的手法を用いて刺激し、交感神経性熱産生を亢進させることで、白色脂肪組織中での褐色脂肪細胞の分化誘導を促進させる可能性について検討する。さらに、効率的に褐色脂肪細胞を分化誘導させる刺激条件を見出すことで、将来的な肥満治療戦略の構築に寄与する。

## 3.研究の方法

本研究では、交感神経プレモーターニューロンの光刺激によって誘導型褐色脂肪細胞 (brite cell)の分化誘導が促進される可能性について検討し、さらに、肥満治療への応用を考慮し、brite cell の分化を効率的に誘導できる中枢神経刺激の条件を検討する。

そのためにまず以下のを行う。

麻酔下のラットを用い、rRPa ニューロンの 光刺激によって褐色脂肪組織の交感神 経活動を効率的に活性化できる実験条 件の検討を行う。

覚醒下のラットを用い、rRPa へ刺入した 光ファイバーを通じた、長期間の LED 照 射によって、brite cell が分化誘導されるか を検討する。その分化誘導を検出するた めに、刺激後の白色脂肪組織内における 褐色脂肪関連遺伝子の発現量を定量す る実験や、抗 UCP1 抗体を用いた免疫組 織化学実験などを行う。

この一連の解析の中から、brite cell の効率的な分化誘導を実現する交感神経活動刺激パラダイムを見い出す。

### 4.研究成果

本研究では、褐色脂肪熱産生の制御に関わる延髄の交感神経プレモーター領域を、光遺伝学的手法を用いて長期的に刺激し、交感神経性熱産生を亢進させることで、brite cellの分化誘導を促進させることを可能にする技術の確立を試みた。

## <u>麻酔下ラットにおける交感神経プレモータ</u> ー領域の光刺激条件の検討

光遺伝学的手法を用いてrRPaを中心とした 交感神経プレモーター領域を刺激するため、 特定波長の光を受けて神経細胞を活性化す るカチオンチャネル ChIEF を発現させるアデ ノ随伴ウイルスベクターの構築を行った。当初 の研究計画では、光遺伝学において広く用い られているチャネルロドプシン-2(ChR2)を用い る計画であったが、本研究計画では brite cell の分化誘導のために脳内を長期的に光刺激する必要があることから、脳組織への傷害が少なく、比較的弱い光出力でも神経細胞を活性化できる ChIEF を発現させるウイルスベクターを作製した。本ウイルスをラットの rRPa を中心とした交感神経プレモーター領域に注入した交感神経プレモーター領域に注入ることを組織学的に確認した。こうした ChIEF 発現ニューロンに対し、麻酔下で光ファイバーを乗入し、in vivo 光照射実験を行った結果、長期的な脳内光刺激が可能な程度の弱い光(5-8 mW)で褐色脂肪組織交感神経の群放電活動の活性化を惹起し、それに伴う褐色脂肪組織できた。

本研研究計画は自由行動下のラットで長期 光照射を行うために LED ワイヤレス光照射装置を用いる計画であったが、業者と開発を進めていたワイヤレス光照射装置では活性化こと必要な強度の光を得ることが出来なかったことが出来なかったことが出来なかったの光力をである。長期間にわたり自由行動下るにはカニューレを介した脳内への光ファイバーを安定的に挿入し続けての挿入と、動物の動きによる光ファイバーのもつれや損傷を防ぐロータリージョイントの設置が不可欠である。しかしながら、光ファイバーもでおいるである。しかしながら、光ファイバーのもではも長期の光照射技術の改良を進めていきたい。

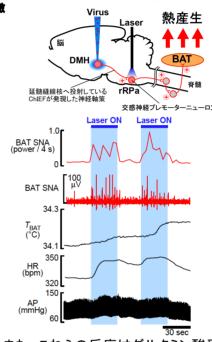
# <u> 覚醒下ラット脳内への長期光照射に伴う</u> brite cell 分化誘導の検討

上述の通り、覚醒下のラットに対して長期間の光照射実験を行うには十分な光エネルギーを確保出来ていないことから、光刺激に伴う白色脂肪組織への brite cell 分化誘導の検討には至っていない。しかしながら、光遺伝学を用いて麻酔ラットにおける褐色脂肪組織の熱産生反応や代謝の上昇を惹起させることに成功していることから UCP1 や PPAR gamma などの褐色脂肪関連遺伝子発現の定量など、今後の解析を進めていきたい。

## 本研究で確立した光遺伝学的手法の応用

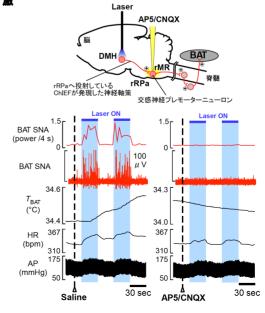
褐色脂肪組織の熱産生を制御する rRPa の 交感神経プレモーターニューロン領域は上位 の脳領域からの入力を統合する重要な役割 を担っている。また、褐色脂肪組織は寒冷環 境中の体温維持のみならず、心理ストレスに よって生じるストレス性体温上昇に寄与するこ とが明らかとなっている。我々は以前、心理ストレスが rRPa の交感神経プレモーター領域を 活性化することで褐色脂肪熱産生を惹起する ことを報告した(4)。 本研究で確立した麻酔ラットに対する光遺伝学的手法を応用し、ストレス反応に関与する DMH から rRPa への直接の神経投射が褐色脂肪熱産生出力を駆動する役割を担っているかを、光遺伝学的手法を用いて検証した。 ChIEFを、DMHのニューロンに発現させると、 ChIEFは rRPa へ伸びる軸索終末まで運ばれていた。この軸索終末へ光照射を行うと、 DMH のニューロンに由来する軸索終末のみを選択的に活性化することができ、それによって褐色脂肪組織の温度上昇、血圧・脈拍の上昇が観察された(図1)。

# <図1>DMH から rRPa への軸索終末を選択的に光刺



また、これらの反応はグルタミン酸受容体の 拮抗薬である AP5/CNQX を微量注入すること により抑制された(図2)。

# <図2>DMHからrRPaへの軸索終末を選択的に光刺



これらの結果は、DMH から rRPa の交感神経プレモーターニューロンにグルタミン酸作動性入力を提供していることを示唆しており、この信号によって褐色脂肪熱産生や脈拍の上昇などの交感神経反応が惹起されることが明らかとなった。このグルタミン酸の神経伝達はストレスシグナルによって活性化されることも見出し、DMH から rRPa への経路がストレス性体温上昇に寄与することを世界に先駆けて示した。この研究成果は Cell Metabolism 誌に掲載された(5)。

以上、本研究において確立した光遺伝学的 手法を用いて褐色脂肪組織の熱産生反応や 代謝の上昇を惹起させることに世界で初めて 成功し、さらに、この光遺伝学的手法を応用 することで、ストレス性体温上昇を駆動する神 経回路を特定することにも成功した。

今後も引き続き、長期光刺激による brite cell の分化誘導実験を継続すると共に、体温調節やエネルギー代謝調節を含めた神経システムの全貌を明らかにしていきたい。

## < 引用文献 >

Saito et al., Diabetes 2009 Nakamura., Am J Physiol, 2011 Seale et al., J Clin Invest, 2011 Lkhagvasuren et al., Euro J Neurosci, 2011 Kataoka et al., Cell Metab, 2014

## 5 . 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 1 件)

<u>Naoya Kataoka</u>, Hiroyuki Hioki, Takeshi Kaneko, and Kazuhiro Nakamura

Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia.

*Cell Metabolism*, **20**, 346-358 (2014) DOI: 10.1016/j.cmet.2014.05.018

## 〔学会発表〕(計10件)

Social defeat stress-induced hyperthermia involves non-shivering thermogenesis in brown adipose tissues.

片岡直也

Experimental Biology 2012 (San Diego)

社会的敗北ストレスによる高体温は延髄 縫線核を介した褐色脂肪熱産生が関与する 片岡直也

平成 24 年度 温熱生理研究会

Social defeat stress-induced hyperthermia involves non-shivering thermogenesis in brown

adipose tissue

片岡直也

第35回 日本神経科学大会

Direct projection from the dorsomedial hypothalamus to the rostral medullary raphe drives brown adipose tissue thermogenesis 片岡直也

Experimental Biology 2012 (Boston)

視床下部背内側部から吻側延髄縫線核への興奮性の直接入力は褐色脂肪熱産生を惹起する

片岡直也

第 18 回 アディポサイエンスシンポジウム

視床下部背内側部から吻側延髄縫線核への興奮性の直接入力は社会的敗北ストレスによる褐色脂肪熱産生を惹起する 片岡直也

平成 25 年度 温熱生理学会

視床下部背内側部から延髄縫線核への公 憤性入力は褐色脂肪熱産生を惹起する 片岡直也

第34回 日本肥満学会

A direct hypothalamo-medullary for sociopsychological stress-induced brown fat thermogenesis and hyperthermia

片岡直也

第91回 日本生理学会大会(招待講演)

Sociopsychological stress activates hypothalamo-medullary neurons that drive brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia 片岡直也

Experimental Biology 2014 (San Diego)

Search of the limbic and cortical regions involved in psychological stress-induced hyperthermia

片岡直也

第92回 日本生理学会大会

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権利者: 種類:

番号:

出願年月日: 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称: 発明者: 権類: 番号:

出願年月日: 取得年月日: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

6 . 研究組織 (1)研究代表者 片岡 直也 (KATAOKA, Naoya) 京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユ

ニット・特定研究員 研究者番号:20572423