175　褐色脂肪ミトコンドリアダイナミクス破綻機構の解明	清水　逸平

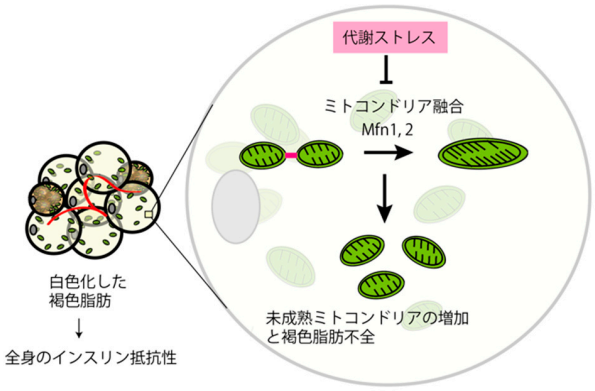
【目的】本研究課題において、肥満ストレスに伴い褐色脂肪細胞においてミトコンドリアダイナミクス異常が生じる詳細な分子機構と、その病的意義の解明に挑んだ。

褐色脂肪細胞はミトコンドリアに富み、熱産生という形で膨大なエネルギーを消費する可能性を秘めた活発な代謝臓器である。肥満ストレスに伴う低酸素シグナルにより褐色脂肪の白色化と機能不全が生じ、全身の代謝異常が惹起されることがこれまでの検討の結果明らかとなっている。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、恒常性が制御されているが、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアダイナミクスの制御機構はほとんどわかっていない。

【方法】1）肥満モデルマウスの作製：野生型マウスに高脂肪食を負荷し、肥満モデルを作製した。肥満モデルマウスの褐色脂肪における、ミトコンドリアダイナミクス関連分子の発現レベルを解析した。予備的検討の結果 Mitofusin1、Mitofusin2 の発現が低下することが明らかになっているが、再現性の確認を行った。2）遺伝子改変マウスの作製と解析：褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1; Mfn2 DKO）は、UCP1-Cre マウスと floxed Mfn1、Mfn2 マウスを交配することで作製し、表現型の解析を行った。DKO マウスの血液を用いてメタボローム解析を行い、褐色脂肪選択的機能不全モデルマウスにおいて全身の代謝的リモデリングが生じるか詳細な検討を行った。3）培養系実験による検証：分化褐色脂肪細胞を用いて、代謝ストレス下で Mitofusin1 や Mitofusin2 の発現が低下する機序を明らかにした。予備的検討の結果、低酸素ストレスによりこれらの分子の発現が低下することがわかっていたが、再現性を確認した。

【結果】肥満ストレス下にある褐色脂肪組織では Mitofusin1、Mitofusin2 というミトコンドリア融合に必須な分子の発現が低下することが明らかとなった。褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1; Mfn2 DKO）では著明な褐色脂肪の白色化が生じることもわかった。また、BAT Mfn1;Mfn2 DKO マウスの血液を用いてメタボローム解析を行った結果、DKO マウスの血液では酸化型コリンのレベルが上昇することがわかった。酸化型コリンはミトコンドリアの恒常性を負に制御することも明らかとなり、心筋組織及び骨格筋のミトコンドリア異常が生じることもわかった。褐色脂肪細胞を用いた検討の結果、脂肪酸ストレスでは Mitofusin1、Mitofusin2 の発現レベルが変わらないものの、低酸素刺激によりこれらの分子の発現が低下することがわかった。以上の結果から、肥満ストレスに伴い褐色脂肪におけるミトコンドリアダイナミクス抑制を介して褐色脂肪不全が生じ、その結果全身の代謝不全が生じることが明らかとなった。褐色脂肪のミトコンドリアダイナミクスを制御することで、心不全やサルコペニアといった加齢性疾患の病態を抑制できる可能性が強く示唆される。

ミトコンドリアダイナミクス不全を介して生じる褐色脂肪不全の病的意義



175. 褐色脂肪ミトコンドリアダイナミクス破綻機構の解明

清水　逸平

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 循環器内科学 先進老化制御学講座

Key words：褐色脂肪，ミトコンドリア

緒　言

本研究課題において、肥満ストレスに伴い褐色脂肪細胞においてミトコンドリアダイナミクス異常が生じる詳細な分子機構と、その病的意義の解明に挑んだ。また、褐色脂肪選択的機能不全モデルマウスを用いて、褐色脂肪不全が全身の代謝に及ぼす影響をメタボローム解析等により検討した。

私はこれまで、肥満や心不全時に白色脂肪不全を介して全身の代謝異常が生じ、これらの疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた［1，2］。また、低酸素シグナルを介して褐色脂肪組織の白色化と機能不全が生じ、全身の代謝異常が惹起されることを明らかにした［3］。これらの研究を通して、心不全や肥満、糖尿病には主要臓器の代謝的リモデリングを介して病態が増悪するという共通分子基盤が存在することがわかった。褐色脂肪細胞はミトコンドリアに富み、熱産生という形で膨大なエネルギーを消費する可能性を秘めた活発な代謝臓器である。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、恒常性が制御されているが、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアダイナミクスの制御機構はほとんどわかっていない。予備的検討の結果、肥満ストレスに伴い Mitofusin1、Mitofusin2というミトコンドリア融合に必須な分子の発現が低下すること、褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1; Mfn2 DKO）では著明な褐色脂肪の白色化が生じることがわかった。そこで、本研究課題において、肥満ストレスに伴いミトコンドリアダイナミクス制御異常が生じる分子機構をMitofusin1、Mitofusin2に特に着目し検討を行うこととした。

褐色脂肪は最大限活性化すると血液中の中性脂肪や糖の50～75%を処理する能力を有する活発な代謝臓器である。そのため、褐色脂肪組織は様々な中間代謝産物を豊富に含有する臓器であり、機能不全に陥ることで褐色脂肪外に未処理代謝産物が漏出し全身の恒常性に影響を与える可能性がある。そこで、BAT Mfn1; Mfn2 DKOマウスの血液を用いてメタボローム解析を行い、褐色脂肪特異的機能不全モデルにおける全身の代謝的リモデリングを検討することとした。

方　法

1. 肥満モデルマウスの作製

野生型マウスに高脂肪食を負荷し、肥満モデルを作製した。肥満モデルマウスの褐色脂肪における、ミトコンドリアダイナミクス関連分子の発現レベルを解析した。予備的検討の結果 Mitofusin1、Mitofusin2 の発現が低下することが明らかになっているが、再現性の確認を行った。

2. 遺伝子改変マウスの作製と解析

褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1;Mfn2 DKO）は、UCP1-Cre マウスと floxed Mfn1、Mfn2 マウスを交配することで作製し、表現型の解析を行った。DKO マウスの血液を用いてメタボローム解析を行い、褐色脂肪選択的機能不全モデルマウスにおいて全身の代謝的リモデリングが生じるか詳細な検討を行った。

3. 培養系実験による検討

分化褐色脂肪細胞を用いて、代謝ストレス下で Mitofusin1 や Mitofusin2 の発現が低下する機序の検討を行った。

結　果

1. 肥満モデルマウスにおけるミトコンドリアダイナミクス関連分子の検討

C57BL6/NCr野生型マウスに高脂肪食を負荷し、肥満モデルを作製した。肥満モデルマウスの褐色脂肪における、ミトコンドリアダイナミクス関連分子の発現レベルを解析した結果、ミトコンドリア融合に需要な分子であるMitofusin1、Mitofusin2の発現が低下することが明らかになった（図1A）。中枢性肥満モデルであるob/obマウスを用いた検討の結果同様に、Mitofusin1、Mitofusin2の発現が褐色脂肪において低下することが明らかとなった。以上の結果から、肥満ストレス下では、ミトコンドリア融合不全が生じる可能性が示唆された。

2. 褐色脂肪特異的Mitofusin1、Mitofusin2ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1;Mfn2 DKO）の表現型解析

褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス（BAT Mfn1;Mfn2 DKO）は、UCP1-Cre マウスと floxed Mfn1、Mfn2 マウスを交配することで作製した。BAT Mfn1;Mfn2 DKO マウスでは褐色脂肪の著明な白色化が生じることがわかった（図 1B）。Glucose tolerance test、 insulin tolerance test を行ったところ、BAT Mfn1;Mfn2 DKO マウスでは全身のインスリン抵抗性と糖利用障害が生じることがわかった。急性寒冷刺激を行ったところ DKO マウスはコントロールマウスと比較して明らかな熱産生能の違いが見られず、何らかの代償性反応が生じていることが示唆された。BAT Mfn1;Mfn2 DKO マウスでは全身の代謝不全が生じることが示唆されるため、メタボローム解析を用いて血液中の代謝物質の検討を行ったところ、DKO マウスの血液中で酸化型コリンが上昇することがわかった。酸化型コリンはミトコンドリア機能を抑制することがわかったため、野生型マウスに加え、左室圧負荷モデルマウスに酸化型コリンを投与し表現型の検討を行った。左室圧負荷モデルマウスに酸化型コリンを投与することで心機能が低下し、心臓の線維化が促進することがわかった。またバイオインフォマティクスの手法を用いて行った検討の結果、コリン→酸化型コリン、の反応に関与する酵素の存在が想定され、現在全身ノックアウトマウスに加え、Floxed マウスも開発を行っているところである。野生型マウスに酸化型コリンを投与すると骨格筋の線維化が生じ、遅筋のミトコンドリアが浮腫状となり、クリステの構造が不明瞭化することがわかった。現在プロテオミクスの手法も用いて、酸化型コリンがミトコンドリア機能不全を惹起する分子機序の検討を行っているところである。

3. 培養系実験による検討

肥満ストレスが加わった褐色脂肪組織では、低酸素シグナルを介して褐色脂肪組織の白色化と機能不全が生じ、全身の代謝異常が惹起されることがわかっている。そこで、低酸素ストレスに着目し褐色脂肪細胞株を用いた検討を行った。分化した褐色脂肪細胞株に低酸素ストレスを加えると、Mitofusin1、Mitofusin2 の発現が低下することがわかった。

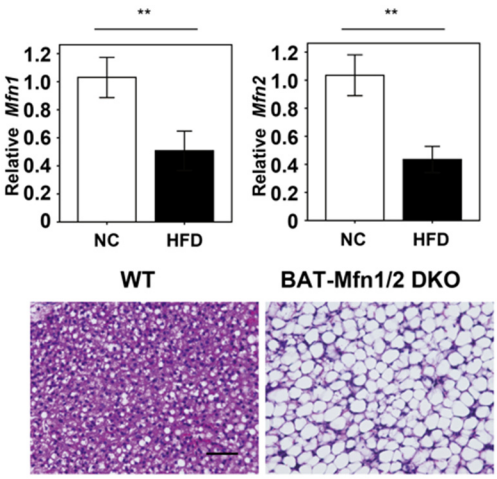


図 1. 褐色脂肪におけるミトコンドリアダイナミクス不全の意義

A：高脂肪食負荷（HFD）により褐色脂肪の Mitofusin1（Mfn1）、Mitofusin2（Mfn2）の発現レベルが低下する（qPCR）。**$p < 0.01$（two-tailed Student's *t*-test）。

B：褐色脂肪特異的 Mfn1/Mfn2 ダブルノックアウトマウス（BAT-Mfn1/2 DKO）では、著明な褐色脂肪の白色化が生じる。（Scale bar = 50 μm）。

考　察

本研究課題における検討の結果から、肥満ストレスに伴い褐色脂肪におけるミトコンドリアダイナミクス抑制を介して褐色脂肪不全が生じ、その結果全身の代謝不全が生じることが明らかとなった。褐色脂肪特異的ミトコンドリアダイナミクス抑制マウス（BAT Mfn1; Mfn2 DKO マウス）にメタボローム解析を用いて血液中の代謝物質の検討を行ったところ、DKO マウスの血液中で酸化型コリンが上昇することがわかった。酸化型コリンはミトコンドリア機能を抑制することが明らかとなり、心不全及びサルコペニアの病態を促進することがわかった。バイオインフォマティクスの手法を用いて行った検討の結果、コリン→酸化型コリンの反応に関与する酵素（EnzymeX）の存在が想定された。また、EnzymeX は血管内皮細胞に存在すると考えられ、現在全身ノックアウトマウスに加え、Floxed マウスも開発を行っているところである。EnzymeX の抑制薬を開発することで、心不全やサルコペニアに対する次世代の治療法を開発できる可能性が高いと考えられる。以上の検討の結果、褐色脂肪組織におけるミトコンドリアダイナミクス制御の重要性が明らかとなった。褐色脂肪組織は代謝的に活発な臓器であり、機能不全に陥ることで全身の臓器の恒常性が変容することも明らかとなった。褐色脂肪制御は加齢性疾患の病態抑制という面からも重要であることが強く示唆される（図 2）。

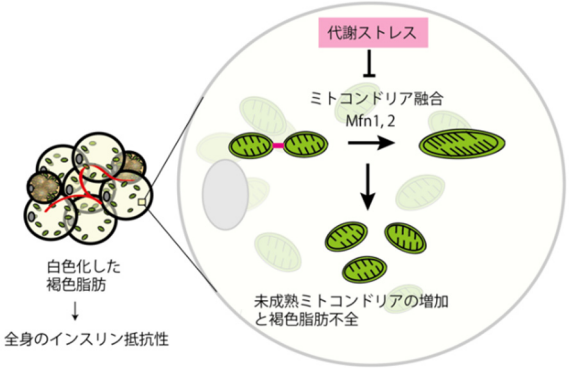


図 2.　ミトコンドリアダイナミクス不全を介して生じる褐色脂肪不全の病的意義
代謝ストレスに伴い Mfn1、Mfn2 の発現レベルが低下し、ミトコンドリア融合不全が生じる。その結果、未成熟ミトコンドリアが増加し、褐色脂肪が機能不全に陥り白色化し、全身のインスリン抵抗性が生じる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶応義塾大学先端生命科学研究所の曽我朋義先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科バイオインフォマティクス分野の奥田修二郎先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科学の南野徹先生である。この場を借りて深謝いたします。

文　献

1）　Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, et al. p53-Induced Adipose Tissue Inflammation Is Critically Involved in the Development of Insulin Resistance in Heart Failure (vol 15, pg 51, 2012). Cell metabolism. 2012;15(5):787-. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.014. PubMed PMID: WOS:000303694100025.

2）　Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, et al. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. Cell metabolism. 2013;18(4):491-504.doi: 10.1016/j.cmet. 2013.09.001. PubMed PMID: 24093674.

3）　Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. J Clin Invest. 2014;124(5):2099-112. Epub 2014/04/10. doi: 71643 [pii]10.1172/JCI71643. PubMed PMID: 24713652; PubMed Central PMCID: PMC4001539.