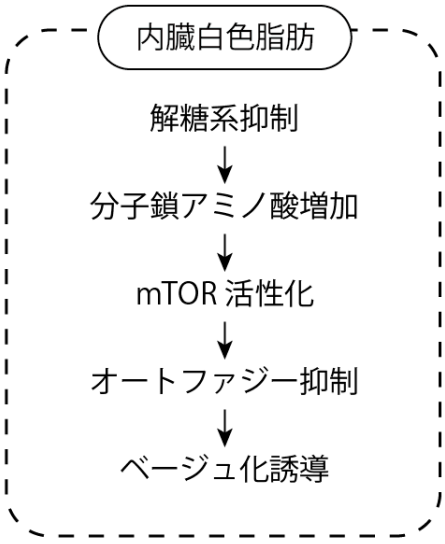
186　解糖系制御による新規ベージュ細胞誘導機構の解明	吉田　陽子

【目的】肥満や糖尿病により健康寿命の短縮や全死亡率が上昇するため、これらの病態を解明することは極めて重要である。褐色脂肪組織は全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器である。肥満や加齢に伴い褐色脂肪が機能不全に陥るが、機能不全に陥った褐色脂肪ではミトコンドリア不全が生じ、細胞代謝がミトコンドリア呼吸から解糖系にシフトしていると考えられる。ベージュ細胞は白色脂肪組織から誘導される細胞であるが、ミトコンドリアに富み高いエネルギー消費能をもつことから、肥満や糖尿病などの代謝性疾患においてベージュ細胞を効果的に誘導することで、これらの疾患に対する新たな治療法となる可能性を大いに秘めた細胞である。我々の予備的検討により、解糖系を抑制すると内臓脂肪において白色脂肪のベージュ化が誘導されることがわかった。そこで本研究では、1. 解糖系の制御により内臓脂肪組織でベージュ細胞が誘導される機序を解明すること、2. 細胞自律的なベージュ化の分子機序を明らかにし、糖尿病や心不全などの代謝リモデリングが生じる病態において、ベージュ細胞の誘導による新規治療法を確立すること、を目的とした。

【方法】解糖系酵素のひとつである Phosphoglycerate mutase 1（Pgam1）を Cre-LoxP システムを用いて脂肪組織特異的あるいは褐色脂肪特異的に欠損したマウスを作製し熱産生能やエネルギー消費能、耐糖能などの表現系を解析した。それらのマウスの主要代謝臓器を用いてオミクス解析を行い、脂肪組織での解糖系阻害が内臓脂肪組織のベージュ化を誘導する分子機序を検証した。

【結果】脂肪組織特異的解糖系阻害マウスでは褐色脂肪の白色化と機能不全が生じ、全身のエネルギー消費量が低下した。本マウスでは褐色脂肪が機能不全に陥る一方で、白色内臓脂肪組織が著しく褐色化（ベージュ化）し、全身の熱産生能が維持された。本マウスの主要代謝臓器を用いて、マイクロアレイ解析およびメタボローム解析を行ったところ、ノックアウトマウスの白色内臓脂肪において分枝鎖アミノ酸が増加しており、さらにオートファジーが抑制されていることがわかった。さらに、ノックアウトマウスの内臓脂肪では mTOR 活性化が生じており、これによってオートファジーが抑制され、白色内臓脂肪のベージュ化が誘導されていると考えられた。本研究により脂肪組織における代謝リモデリングの新たな側面が明らかになるとともに、代謝性疾患に対する新たな治療アプローチにつながるものと考えられた。

本研究の概要



186. 解糖系制御による新規ベージュ細胞誘導機構の解明

吉田　陽子

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：ベージュ細胞，解糖系，オートファジー

緒　言

肥満や糖尿病により健康寿命の短縮や全死亡率が上昇するため、これらの病態を解明することは極めて重要である。これまで我々は、肥満や糖尿病、心不全時に白色内臓脂肪が老化することで全身のインスリン抵抗性が生じ、これらの老化関連疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた［1〜4］。褐色脂肪組織はかつて主に乳幼児に存在する熱産生器官として認識されてきたが、今日では、成人にも存在し全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた。加齢や肥満により褐色脂肪の機能が低下する分子機序は不明であったが、我々は最近、肥満時には低酸素を介したシグナルによりミトコンドリア数が減少することで褐色脂肪組織の「白色化」と機能不全が進行し、全身の糖代謝異常が生じることを明らかにした［5］。肥満のみならず加齢に伴い褐色脂肪が機能不全に陥ることはヒトや動物実験で報告されているが、機能不全に陥った褐色脂肪ではミトコンドリア不全が生じ、細胞代謝がミトコンドリア呼吸から解糖系にシフトしていると考えられる。褐色脂肪研究は、主に褐色脂肪細胞のエネルギー消費に着目した研究が精力的に行われているが、褐色脂肪細胞自体のエネルギー代謝に着目した研究はほとんど存在しない。予備的検討の結果、脂肪組織特異的解糖系阻害マウスでは褐色脂肪の白色化と機能不全が生じ、全身のエネルギー消費量が低下することがわかった。驚くべきことに、このマウスでは褐色脂肪が機能不全に陥る一方で、白色内臓脂肪組織が著しく褐色化（ベージュ化）し、全身の熱産生能が維持されることがわかった。寒冷刺激や交感神経刺激により白色脂肪組織で褐色脂肪様細胞が誘導され、ベージュ細胞と呼ばれる。ベージュ細胞はミトコンドリアに富み、熱産生や高いエネルギー消費能を持つが、通常は主に皮下脂肪において誘導されると考えられている。褐色脂肪組織特異的に解糖系を抑制しても内臓脂肪がベージュ化しないことに加え、これまでの予備的検討の結果、解糖系抑制により内臓脂肪組織でベージュ細胞が細胞自律的に誘導されることが明らかとなった。ベージュ細胞は白色脂肪組織から誘導される細胞であるが、ミトコンドリアに富み高いエネルギー消費能をもつことから、肥満や糖尿病などの代謝性疾患においてベージュ細胞を効果的に誘導することで、これらの疾患に対する新たな治療法となる可能性を大いに秘めた細胞である。これまで内臓脂肪のベージュ化について詳細に検討した報告はなく、本研究により脂肪組織における代謝リモデリングの新たな側面が明らかになるとともに、代謝性疾患に対する新たな治療アプローチにつながるものと考えられた。

そこで本研究では、1．解糖系の制御により内臓脂肪組織でベージュ細胞が誘導される機序を解明すること、2. 細胞自律的なベージュ化の分子機序を明らかにし、糖尿病や心不全などの代謝リモデリングが生じる病態において、ベージュ細胞の誘導による新規治療法を確立すること、を目的とし研究を開始した。

方　法

1. 解糖系阻害マウスモデルにおける表現型の検証

Adipoq Cre あるいは Ucp1Cre マウスと floxed Pgam1 マウスをかけ合わせることで脂肪組織特異的あるいは褐色脂肪特異的 *Pgam1* ノックアウト（KO）マウスを作製する。これらの解糖系阻害マウスを用いて、熱産生能やエネルギー消費量の評価を行い、また耐糖能や CT による内臓脂肪量の変化などの表現型を解析する。高齢マウスや肥満モデルマウス、心不全モデルマウス等、褐色脂肪機能不全が生じるモデルにおいても同様の解析を行い、脂肪組織における

代謝リモデリングを検証する。

2. 解糖系阻害により内臓脂肪でベージュ細胞が誘導される分子機序の解明

1）遺伝子改変マウスを用いたベージュ細胞誘導機序の検討

上述の遺伝子改変マウスの主要代謝臓器を用いて、マイクロアレイ解析やメタボローム解析、プロテオミクス解析を行い、脂肪組織での解糖系阻害が内臓脂肪組織のベージュ化を誘導する分子機序を明らかにする。その他本仮説の検証に必要なあらゆる分子細胞生物学的手法を用いた解析を行う。

2）白色脂肪細胞株を用いたベージュ細胞誘導機序の解明

白色脂肪細胞株（3T3-L1 細胞）の *Pgam1* をノックダウンし表現型を解析する。また解糖系抑制剤である 2-deoxy-D-glucose（2-DG）によっても同様の表現型が見られるか検証する。細胞サンプルを ChIP-seq や RNA-seq を用いて解析することで、ベージュ細胞誘導の分子機序を解明する。

3）疾患病態モデルにおける代謝リモデリングの解析とベージュ細胞誘導による新規治療法の開発

高齢マウスや肥満モデルマウス、心不全モデルマウス等、褐色脂肪機能不全に加え全身の代謝不全が生じるモデルにおいて熱産生能やエネルギー消費量の評価を行い、また耐糖能や CT による内臓脂肪量の変化などの検討により、脂肪組織における代謝リモデリングを検証する。これらの解析により、病態モデルにおける脂肪組織の代謝リモデリングによる全身の代謝への影響を検討する。上述の 2．2）により明らかにしたベージュ誘導機構をアデノ随伴ウイルスによる過剰発現やノックダウン、または遺伝子改変マウスを作製することにより、高齢や肥満に伴う全身の代謝リモデリングが改善するかを検証する。

本研究により、糖尿病や心不全などの代謝リモデリングが生じる病態において、ベージュ細胞の誘導と全身の代謝制御による新規治療法の創出を目指す。

結　果

1. 解糖系阻害マウスモデルにおける表現型

解糖系酵素の一つである phosphoglycerate mutase 1（Pgam1）を AdipoqCre マウスと floxed Pgam1 マウスを用いて脂肪組織特異的に欠損させ解糖系を阻害したところ、褐色脂肪組織が著明に白色化し機能不全に陥る一方で、白色内臓脂肪組織ではベージュ細胞様の形態を示す細胞が誘導された（図 1）。本マウスを用いて代謝プロファイルを解析したところ、ノックアウトマウスにおいて耐糖能異常やエネルギー消費量低下が生じ、褐色脂肪機能不全に矛盾しない形質を示した一方で、詳細に白色脂肪細胞を解析したところ、これらのベージュ細胞は褐色脂肪細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示し、熱産生に重要な役割を果たす uncoupling protein 1（UCP-1）やミトコンドリアでの脂肪酸代謝（β酸化）に重要な carnitine palmitoyltransferase 1（CPT1）が高発現していた。本マウスにおいて急性寒冷刺激試験を行うと、むしろ熱産生能は亢進し、褐色脂肪不全に伴う熱産生能の低下を代償することが明らかとなった。寒冷刺激や交感神経刺激などの特定の刺激により皮下脂肪組織がベージュ化する事象はこれまでも報告されているが、これらの刺激では内臓脂肪組織でのベージュ化はほとんど誘導されないことから、本形質は canonical なベージュ細胞誘導とは異なる機序で誘導されるものと考えられた。また Ucp1-Cre マウスを用いて褐色脂肪特異的な *Pgam1* を欠損させたマウスでは内臓脂肪組織でのベージュ化は誘導されないことから、このベージュ化の誘導は内臓脂肪組織特有な形質である可能性が高いと考えられた。

2. 解糖系阻害により内臓脂肪でベージュ細胞が誘導される分子機序

上述の遺伝子改変マウスの主要代謝臓器を用いて、マイクロアレイ解析およびメタボローム解析を行ったところ、ノックアウトマウスの白色内臓脂肪においてバリン、ロイシン、イソロイシンといった分枝鎖アミノ酸が増加し、これらのアミノ酸の分解を制御する遺伝子の発現も低下していることがわかった。これまでの報告によりベージュ細胞の維持にオートファジーの抑制が重要な役割を果たすことが報告されているが、我々のモデルにおいても、ノックアウトマウスにおいて p62 の発現が亢進し、オートファジーが抑制されていることがわかった。さらに、ノックアウトマウスの内臓脂肪では mTOR 活性化が生じており、これによってオートファジーが抑制され、白色内臓脂肪のベージュ化が誘導されていると考えられた。

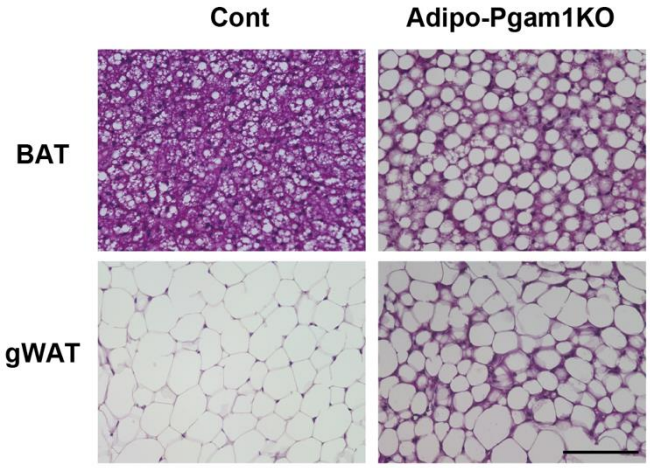


図 1. 脂肪組織特異的 *Pgam1* ノックアウトマウスの脂肪組織所見（HE 染色）
脂肪組織特異的 *Pgam1* ノックアウトマウスの褐色脂肪（BAT）（上段）では白色化が著明なのに対し、内臓白色脂肪（gWAT）（下段）ではベージュ様細胞が見られる（スケールバー：100 μm）。

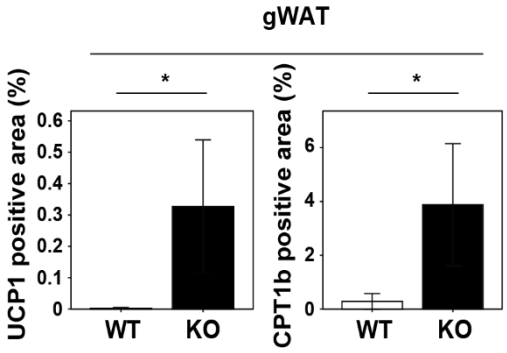


図 2. 脂肪組織特異的 *Pgam1* ノックアウトマウスの内臓脂肪組織でのタンパク発現
脂肪組織特異的 *Pgam1* ノックアウトマウスの内臓白色脂肪（gWAT）では UCP1 や CPT1b の発現が亢進している（n＝3、4、*P＜0.05、Student's t-test）。

考　察

これまで我々は、肥満や糖尿病、心不全時に白色内臓脂肪が老化することで全身のインスリン抵抗性が生じ、これらの老化関連疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた［1～4］。また我々は最近、褐色脂肪組織内の微小血管ネットワークが恒常性維持に重要であること、肥満時には低酸素を介したシグナルによりミトコンドリア数が減少することで褐色脂肪組織の「白色化」と機能不全が進行し、全身の糖代謝異常が生じることを明らかにした［5］。上述の通り褐色脂肪の機能不全時には代謝がミトコンドリア呼吸から解糖系にシフトするような代謝リモデリングが生じていることが想定されるが、これまで機能不全時の代謝リモデリングはあまり着目されてこなかった。マウスに寒冷刺激や交感神経刺激を行うと、皮下脂肪においてベージュ細胞が誘導されることが知られているが、これらの刺激では内臓脂肪でのベージュ化はほとんど誘導されない。これまでの我々の予備実験により、脂肪組織で解糖系を阻害し褐色脂肪不全が生じた状態では、内臓脂肪組織において著明なベージュ化が誘導されたが、褐色脂肪特異的に解糖系を阻害した際には、内臓脂肪組織でのベージュ化は誘導されなかったことから、この形質は脂肪組織における

代謝リモデリングに特異的なものである可能性が高い。これまで褐色脂肪の恒常性の維持や、皮下脂肪におけるベージュ化には交感神経刺激やある種の内分泌因子が重要であることが報告されているが、我々の研究結果からは、内臓脂肪におけるベージュ化は液性あるいは神経性の因子によるものではなく細胞自律的に誘導されていることが示唆される。内臓脂肪の細胞自律的なベージュ化について詳細に検討した報告はなく、本研究をさらに進めることにより脂肪組織における代謝リモデリングの新たな側面が明らかになるとともに、代謝性疾患に対する新たな治療アプローチにつながるものと確信する。本研究により得られる知見は、糖尿病や心不全などの代謝リモデリングが生じる病態において効率的にベージュ細胞を誘導し、不全に陥った褐色脂肪機能を補完することで代謝の恒常性を維持するような次世代の治療　技術に繋がる可能性があると考えられる。今後ますます本格化する高齢社会において、糖尿病や心不全などの老化関連疾患が近い将来にパンデミック化することが予想され、これらに対する治療ニーズがさらに高まると考えられる。これらの老化関連疾患において、代謝リモデリングが病態形成に重要な役割を果たしている可能性が高く、褐色脂肪機能や代謝リモデリングが新たな治療標的となる可能性が強く示唆される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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氏、清水逸平氏である。最後に、本研究に多大なご支援を賜りました、公益財団法人上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, Minamino T. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. Cell Metab. 2013 Oct 1;18(4):491-504. PMID: 24093674　DOI: 10.1016/j.cmet.2013.09.001.

2) Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Ito T, Zechner R, Komuro I, Kobayashi Y, Minamino T. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. Cell Metab. 2012 Jan 4;15(1):51-64. PMID: 22225876　DOI: 10.1016/j.cmet.2011.12.006.

3) Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. J Clin Invest. 2010 May;120(5):1506-14. PMID: 20407209　DOI: 10.1172/JCI40096.

4) Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. Nat Med. 2009 Sep;15(9):1082-7. PMID: 19718037　DOI: 10.1038/nm.2014.

5) Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. J Clin Invest. 2014 May;124(5):2099-112. PMID: 24713652　DOI: 10.1172/JCI71643.