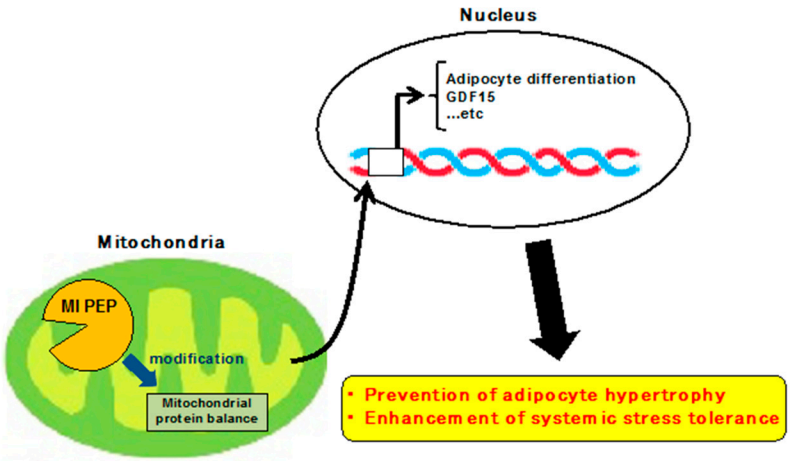
113　肥満予防を志向した新規ミトコンドリア制御機構の解明	小林　正樹

【目的】肥満は様々な生活習慣病の発症原因となる病態であり、その予防法、治療薬に関する研究が国内外において活発に行われている。白色脂肪組織（White Adipose Tissue：WAT）の性質変化は肥満病態と密接に関連していることから、WAT の質の制御を理解することは肥満予防戦略となり得る。摂取カロリー制限（Caloric Restriction：CR）は健康寿命延伸や代謝改善効果を有することから、肥満の予防および改善に有効な介入法である。我々は、WAT におけるミトコンドリア機能改善が CR 効果に重要であることを明らかとした。同時に、WAT において CR により発現誘導される新規ミトコンドリア関連因子として、MIPEP（mitochondrial intermediate peptidase）を同定した。MIPEP はミトコンドリアマトリクスに存在するミトコンドリアペプチダーゼであり、ミトコンドリアタンパク質の成熟活性化を担う。これより我々は「MIPEP が CR によるミトコンドリア機能改善において重要である」との仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説を細胞および動物レベルで検証することで、MIPEP を介したミトコンドリア制御機構を CR 効果模倣に基づく効果的な肥満予防戦略の開発への端緒とすることである。

【方法】レトロウイルスベクターを用いて、*Mipep* 過剰発現マウス白色前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を作製した。この細胞を成熟脂肪細胞に分化させた後、脂肪滴量、ミトコンドリア DNA 量、フラックスアナライザーによる酸素消費量、蛍光試薬 mitoSOX による活性酸素種（ROS）量の測定を行った。動物レベルでの検討については、*Mipep*-flox マウスと Adipoq-Cre を掛け合わせることにより脂肪組織特異的 *Mipep* 欠損マウスを作製し、呼吸商や自発運動量、WAT 量や WAT における脂肪細胞分化マーカーや MIPEP 基質タンパク質発現量を中心に解析した。

【結果】*Mipep* OE 細胞では脂肪滴量の減少に加え、脂肪細胞分化マーカー遺伝子 *Perilipin A* の発現量も低下していた。一方で、ミトコンドリア DNA 量、酸素消費量、ROS 量などのミトコンドリア機能に関連する指標はいずれも *Mipep* OE 細胞において変化しなかった。*Mipep* KO マウスは野生型に比べ、自発運動量や呼吸商に大きな差はなかったのに対し、WAT 量は減少した。これと相関して、成熟脂肪細胞マーカー遺伝子である *Adiponectin* と *Leptin* の発現量も低下していた。*Mipep* KO マウスの WAT において、MIPEP の基質である SIRT3 と COXIV は減少していたのに対し、MDH2 は増加していた。加えて、ミトコンドリアストレス反応により誘導されるマイトカインである *Gdf15* の遺伝子発現が顕著に増加した。以上より、MIPEP のミトコンドリア機能への直接的な寄与は確認されなかったが、MIPEP が脂肪細胞の分化やマイトカインの転写レベルでの誘導に関与することが示された。

脂肪細胞機能に対する MIPEP の寄与とそのメカニズム



113. 肥満予防を志向した新規ミトコンドリア制御機構の解明

小林　正樹

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 分子病理・代謝学

Key words：肥満，白色脂肪組織，カロリー制限，ミトコンドリア

緒　言

肥満は様々な生活習慣病の発症原因となる病態である。世界の肥満者数が指数関数的に増加していることから、肥満の予防改善は公衆衛生上、緊急の課題といえる。それゆえ、肥満の予防法、治療薬に関する研究が、国内外において非常に多岐にわたり行われている。その中で特に標的となる組織が、白色脂肪組織（White Adipose Tissue：WAT）である。WAT の性質変化は肥満病態と密接に関連していることはよく知られており、例えば、肥満症患者の肥大した WAT 中の脂肪細胞は、炎症や動脈硬化を誘発する悪性のサイトカインを分泌する。このことから、WAT の質の改善は有効な肥満予防戦略となる。また、WAT 局所の慢性炎症や脂肪細胞の老化が、WAT の質の制御に大きく寄与することも報告されている。これらの報告は、WAT の質的変化のメカニズムを示す非常に興味深い知見ではあるものの、肥満予防につながる直接的なエビデンスとなるかは、現状では議論の余地がある。それゆえ、WAT の質の改善をもたらすメカニズムについて、さらなる研究が必要とされている。

肥満の予防および改善に有効な方法の一つとして、摂取カロリー制限（Caloric Restriction：CR）があげられる。CR は健康寿命延伸や加齢性疾患の予防、代謝改善効果を有する、簡便かつ再現性の高い方法である。加えて、CR は脂肪細胞を小型化し、その性質を改善させることも知られている。これまでの研究により、我々は、WAT におけるミトコンドリア機能改善が、CR 効果に大きく寄与することを明らかにした［1］。同時に、WAT において CR により発現誘導される新規ミトコンドリア関連因子として、MIPEP（mitochondrial intermediate peptidase）を同定した［2］。

MIPEP はミトコンドリアマトリクスに存在するミトコンドリアペプチダーゼであり、ミトコンドリアタンパク質の成熟活性化を担う［3］。実際、我々は MIPEP がミトコンドリアの質の維持に重要な脱アセチル化酵素 Sirtuin-3（SIRT3）の成熟活性化に関わることを見出している［2］。以上を踏まえ、我々は「MIPEP が CR によるミトコンドリア機能改善において重要である」との仮説を立てた。すなわち、MIPEP に関連したミトコンドリア制御機構は、CR の効果を模倣した効果的な肥満予防戦略の開発につながるといえる。本研究では、この「MIPEP に関連したミトコンドリア制御機構」を検証するため、WAT および脂肪細胞における MIPEP の機能について、細胞および動物レベルで解析した。その結果、MIPEP のミトコンドリア機能への直接的な関与は立証されなかったが、MIPEP が脂肪細胞分化やミトコンドリア由来のストレス応答遺伝子の発現制御に寄与することが示唆された。

方法および結果

1. *Mipep* 過剰発現脂肪細胞の解析

Mipep 過剰発現（*Mipep*OE）細胞は、マウス白色前駆脂肪細胞株 3T3-L1 にレトロウイルスベクターを感染させた後、薬剤セレクションを行うことで樹立した。レトロウイルスベクターは plat-E 細胞（東京大学医科学研究所の北村俊雄教授より分与）にマウス *Mipep* の翻訳領域を有するパッケージングプラスミドを遺伝子導入することで作製した。なお、上記実験は東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を経て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた。3T3-L1 は、細胞密度がコンフルエントに達した時点で 500 μM IBMX と 1 μM dexamethasone を 2 日間処理し、その後 2 日おきに 10 μg/mL insulin および 50 nM tri-iode thyronine を含む培地で

培養することで成熟脂肪細胞へと誘導した。解析には分化誘導開始から 8～12 日後の細胞を用いた。

はじめに、中性脂肪を可視化する Oil red O 染色により両細胞の脂肪滴量を評価したところ、*Mipep* OE 細胞では脂肪滴量が減少していた（図 1a）。また、脂肪細胞分化マーカー遺伝子である *Perilipin A（PeriA）* の発現量も *Mipep* OE 細胞において低下していた（図 1b）。次に、ミトコンドリア生合成およびミトコンドリア機能を評価した。前者については、ミトコンドリア DNA にコードされている *cytochrome c oxidase subunit Ⅱ*（*Cox Ⅱ*）と核 DNA にコードされている *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*（*Hprt*）の各々のコピー数を real-time PCR にて測定し、そこから算出される *Cox Ⅱ／Hprt* 比（ミトコンドリア DNA 量）を指標とした。後者に関しては、ミトコンドリア由来の活性酸素種（Reactive Oxygen Species：ROS）と反応する蛍光試薬 mitoSOX を用いて測定される ROS 量と、フラックスアナライザーを用いて測定される酸素消費量（Oxygen Consumption Rate：OCR）を指標とした。結果的に、両者ともに *Mipep* OE 細胞において変化しなかった（図 1c～e）。

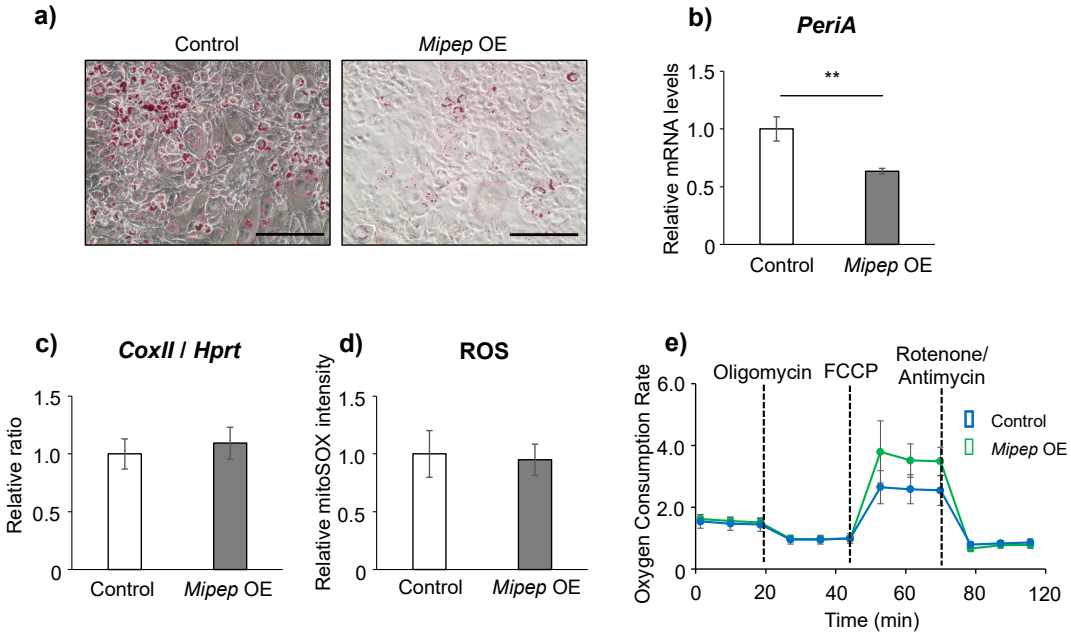


図 1. *Mipep* 過剰発現（*Mipep* OE）脂肪細胞の解析

a) *Mipep* OE 細胞において、脂肪滴量が減少した（スケールバー：200 μm）。

b) *Mipep* OE 細胞において、脂肪細胞分化マーカー遺伝子 *PeriA* 発現が減少した。housekeeping gene として、*Ribosomal protein S 18（Rps18）* を用いた。

c) ミトコンドリアバイオジェネシス指標である *CoxII／Hprt* 比は、Control 細胞と *Mipep* OE 細胞間で変化しなかった。

d) ROS 量を反映する蛍光試薬 mitoSOX の強度は、Control 細胞と *Mipep* OE 細胞間で変化しなかった。

e) OCR はいずれの段階においても、Control 細胞と *Mipep* OE 細胞間で変化しなかった。実験結果は平均値±標準偏差で示しており、統計処理には Student`s t-test を用いた。

p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした（**p<0.01）（b～e）。

2. 脂肪組織特異的 *Mipep* 欠損マウスの解析

以下に示す全ての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会による審査、学長による承認を経て、東京理科大学動物実験指針に従い行った。脂肪組織特異的 *Mipep* 欠損（*Mipep* KO）マウスは、当研究室で作製した *Mipep*-flox マウスと、脂肪組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Adipoq-Cre マウスとを掛け合わせることで得た。全マウスは、東京理科大学薬学部動物実験施設内 specific-pathogen-free（SPF）環境下、明暗サイクルは 12 時間で飼育した。上記

の雌性マウスを 21～27 週齢の時点において、腹囲 CT スキャン撮影、暗期の自発運動量や呼吸商等の生理機能の評価をした上で安楽死させ、子宮周囲 WAT 等を採取した。採取した臓器から RNA とタンパク質を抽出し各々RT-PCR、ウエスタンブロット法で解析した。

Mipep KO マウスは野生型に比べ、自発運動量や呼吸商に大きな差はなかったのに対し、WAT 量は減少した（図 2a～c）。これと相関して、成熟脂肪細胞マーカー遺伝子である *Adiponectin* と *Leptin* の発現量は *Mipep* KO マウスの WAT において低下していた（図 2d）。次に、MIPEP の基質として報告されている sirtuin-3（SIRT3）、cytochrome c oxidase subunit Ⅳ（COXIV）、malate dehydrogenase 2（MDH2）の WAT におけるタンパク質発現量を解析したところ、SIRT3 と COXIV は減少していたのに対し、MDH2 は増加していた（図 2e）。一般に、このようなミトコンドリアタンパク質バランスの変化はミトコンドリアストレス反応を惹起するとされる［4］。そこで、ミトコンドリアストレス反応により誘導されるマイトカインである growth differentiation factor 15（*Gdf15*）の遺伝子発現を解析したところ、*Mipep* KO マウスの WAT において顕著に増加した（図 2f）。

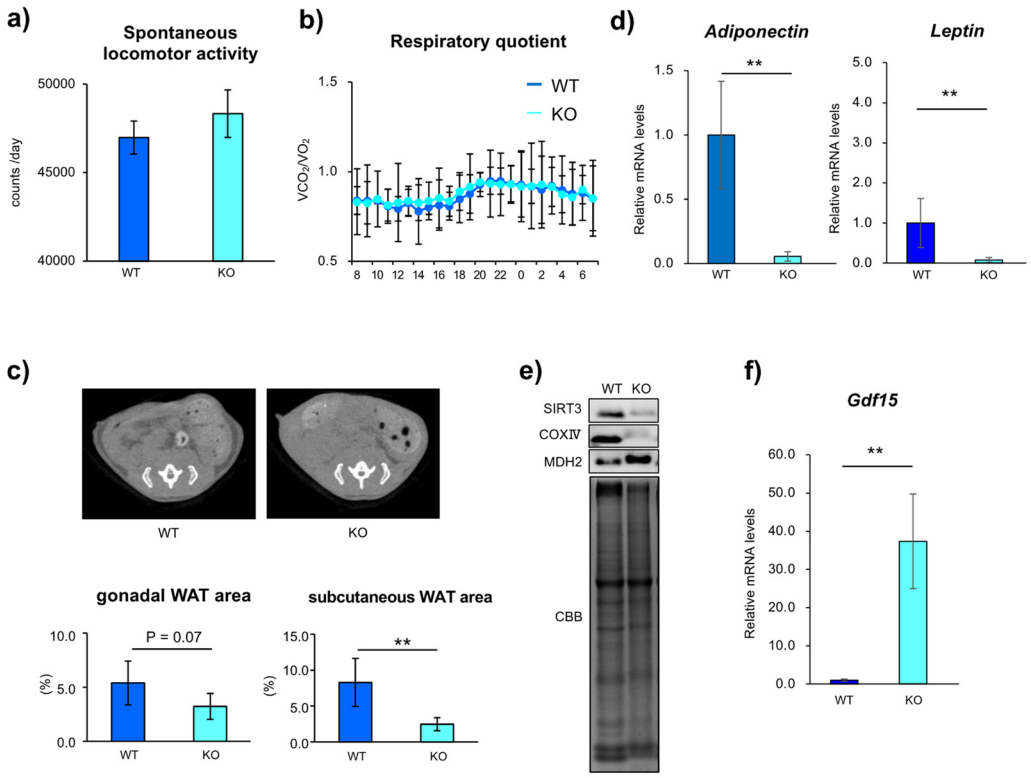


図 2. 脂肪組織特異的 *Mipep* KO マウスの解析

a、b）*Mipep* KO マウスの自発運動量 a)と呼吸商 b)は変化しなかった。

c） *Mipep* KO マウスの腹囲断面における WAT の占める面積は減少した。

d） *Mipep* KO マウスの WAT において、成熟脂肪細胞マーカー遺伝子である *Adiponectin* と *Leptin* の発現量が低下した。

e） *Mipep* KO マウスの WAT において、SIRT3 と COXIV は減少したのに対し、MDH2 は増加した。Loading control として、Coomassie Brilliant Blue（CBB）染色を用いた。

f） *Mipep* KO マウスの WAT において、*Gdf15* が増加した。

housekeeping gene として、*Rps18* を用いた。実験結果は平均値±標準偏差で示しており、統計処理には Student`s t-test を用いた。p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした（**p<0.01）。

考　察

過去の研究により、MIPEP は SIRT3 の成熟化を介したミトコンドリアの機能維持に重要であると想定された [2]。しかしながら、今回の解析では、*Mipep* 過剰発現細胞におけるミトコンドリア生合成や酸素消費速度、ROS 量などのミトコンドリア機能に関係する指標は変化しなかった。ミトコンドリア生合成の重要な因子として Peroxisome proliferator-activated receptor gamma（PPARγ）coactivator-1 alpha（PGC-1α）がある [5]。PGC-1α は転写補助因子であり、ミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターとして働く。これまで、我々は CR が WAT においてこの *Pgc-1α* 発現を誘導し、ミトコンドリア生合成を増強することを明らかとしている [1]。MIPEP によるトコンドリアタンパク質の成熟活性化はミトコンドリアの質的な制御であるのに対し、PGC-1α を介したミトコンドリア生合成はミトコンドリアの量的な制御であると見なせる。今回の *Mipep* 単独の過剰発現細胞の結果を踏まえると、CR によるミトコンドリア機能改善では、この両者がともに活性化することが重要であると考えられる。

当初、脂肪組織特異的 *Mipep* KO マウスではミトコンドリア機能の低下により脂質代謝が滞り、WAT の肥大等の肥満様の特徴を示すのではないかと予想した。ところが、それに反して *Mipep* KO マウスでの WAT 量は減少していた。また、*Mipep* KO マウスの WAT では脂肪細胞分化マーカーの減少が確認されたことから、上記は WAT 中の脂肪細胞の分化成熟が抑制された結果であるといえる。加えて、*Mipep* KO マウスの WAT は *Gdf15* の発現増加を示した。前述の通り、GDF15 はミトコンドリアストレスに応じて誘導される液性因子であり、近年では *Gdf15* transgenic マウスが体重減少や全身的な代謝改善および寿命延伸を示すことが報告されている [6]。以上より、直接的なエビデンスは示されていないが、MIPEP 欠損に伴い惹起されるミトコンドリアストレス反応により GDF15 が誘導され、それが WAT 量の低下をもたらした可能性がある。

今回の *Mipep* 過剰発現細胞および脂肪組織特異的 *Mipep* KO マウスの解析により得られた知見では、MIPEP の脂肪細胞のミトコンドリア機能改善への直接的な寄与を証明することはできなかったものの、MIPEP が脂肪細胞の分化や GDF15 の誘導に転写レベルで関与することが示された。転写因子ではない MIPEP がこのような転写制御にどのように関わるのか、そのメカニズムは興味深い。これは、肥満 WAT における脂肪細胞の肥大化の新たな予防戦略になり得ると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京理科大学薬学部分子病理・代謝学研究室の樋上賀一教授である。

文　献

1） Fujii N, Narita T, Okita N, Kobayashi M, Furuta Y, Chujo Y, Sakai M, Yamada A, Takeda K, Konishi T, Sudo Y, Shimokawa I, Higami Y. Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction. Aging Cell. 2017 Jun;16(3):508-517. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28256090 DOI: 10.1111/acel.12576

2） Kobayashi M, Takeda K, Narita T, Nagai K, Okita N, Sudo Y, Miura Y, Tsumoto H, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y. Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction. FEBS Lett. 2017 Dec;591(24):4067-4073. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29151261 DOI: 10.1002/1873-3468.12914

3） Isaya G, Kalousek F, Fenton WA and Rosenberg LE. Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. J Cell Biol. 1991 Apr;113(1):65-76. PMID: 1672532 DOI: 10.1083/jcb.113.1.65

4) Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Feb;19(2):109-120. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29165426 DOI: 10.1038/nrm.2017.110

5) Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev. 2003 Feb;24(1):78-90. PMID: 12588810 DOI: 10.1210/er.2002-0012

6) Wang X, Chrysovergis K, Kosak J, Kissling G, Streicker M, Moser G, Li R, Eling TE. hNAG-1 increases lifespan by regulating energy metabolism and insulin/IGF-1/mTOR signaling. Aging (Albany NY). 2014 Aug;6(8):690-704. PMID: 25239873 DOI: 10.18632/aging.100687