



Title	褐色脂肪細胞の新規増殖機構とその組織形成における役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	深野, 圭伍
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12620号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65652
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Keigo_Fukano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名： 深野 圭伍

学位論文題名

褐色脂肪細胞の新規増殖機構とその組織形成における役割

哺乳動物には白色脂肪と褐色脂肪の2種類の脂肪組織が存在する。白色脂肪はエネルギーを貯蔵し、必要に応じて脂肪酸を遊離し全身にエネルギーを供給するのに対し、褐色脂肪は脂肪酸を自身で酸化分解し熱へと転換する。褐色脂肪の熱産生はミトコンドリア内膜に特異的に発現する脱共役タンパク質UCP1が担っている。UCP1の機能は、交感神経由来のノルエピネフリンの β 作用により活性化され、酸化的リン酸化を脱共役させることでエネルギーを熱に変換する。哺乳動物が寒冷環境に暴露されると交感神経-褐色脂肪経路が活性化して体温が維持される。寒冷環境下におかれた動物の褐色脂肪組織はUCP1発現量の増加とともに細胞数の増加を伴って増生する。一般に、間質細胞に含まれる前駆脂肪細胞が増殖し、それらの分化により褐色脂肪細胞の数を増やすと考えられ、分化した細胞は増殖には寄与しない。しかし、寒冷刺激誘導性の組織増生において、どのような細胞が増えているかは不明である。そこで、本研究では分化した褐色脂肪細胞が増殖能を持つか否か、また、その生理学的意義を明らかにするために実験を行った。

第一章では寒冷刺激により褐色脂肪組織を構成するどの種類の細胞が組織の増生に寄与しているかを調べるため、6週齢のC57BL/6Jマウスを23℃(対照)もしくは10℃(寒冷刺激)で5日間飼育し、蛍光免疫染色法により細胞増殖マーカーであるKi67の褐色脂肪組織での発現を解析した。褐色脂肪細胞の細胞膜に高発現するモノカルボン酸トランスポーター1(MCT1)とUCP1を共染色するとMCT1陽性の細胞膜で覆われた広いUCP1陽性の細胞質領域を持ち、円形の核を持つ褐色脂肪細胞とUCP1陰性でMCT1陽性の細胞膜の間隙に存在する扁平な核を持つ間質細胞に区別できた。この定義に従い、対照マウスの褐色脂肪組織を調べると、Ki67を発現するUCP1陽性の褐色脂肪細胞が全褐色脂肪細胞中の $7.2\% \pm 0.4\%$ 見られ、前駆脂肪細胞を含むUCP1陰性の間質細胞にもKi67を発現するものが全間質細胞中の $19.6\% \pm 2.3\%$ 見られた。Ki67陽性の褐色脂肪細胞の割合は、寒冷刺激1日目から急激に増加し($25.6\% \pm 1.8\%$)、5日目まで対照群と比べ有意に高い値を示した($21.8\% \pm 1.7\%$)。一方で、Ki67陽性の間質細胞は寒冷刺激により徐々に増加し、5日目で一番高値を示した($42.1\% \pm 8.3\%$)。この寒冷刺激によるKi67陽性細胞数の増加は、褐色脂肪細胞においては $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤の投与により抑制され、間質細胞においては $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤の投与により抑制された。さらに、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬を5日間投与すると、Ki67陽性の褐色脂肪細胞が投与1日目から5日目まで対照群と比べ有意に増加したが、Ki67陽性の間質細胞の割合には変化がなかった。これらの結果から、分化した褐色脂肪細胞は寒冷刺激に応じて $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して増殖することがわかった。つまり、前駆脂肪細胞の増

殖と同様に、褐色脂肪細胞の増殖も寒冷刺激による交感神経依存性の褐色脂肪組織の増生に寄与すると考えられる。

第二章では分化した脂肪細胞の増殖が脂肪組織の形成や増生にどの程度寄与するかを明らかにするため、細胞周期を停止させる p27 を脂肪細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを用いて、白色と褐色脂肪細胞の増殖について検討した。Tg マウスの性状を詳しく解析すると、白色脂肪組織には変化が見られなかったのにも関わらず、褐色脂肪組織は対照の野生型 (WT) 組織に比べ強度の組織低形成を示した。Tg マウスの褐色脂肪組織には WT マウスと同程度に脂肪滴を蓄える正常な形態を持つ褐色脂肪細胞が存在しており、個々の細胞の UCP1 発現量にも変化はなかったが、組織全体の細胞数が減少したため組織当たりの UCP1 含量は WT マウスに比べて著しく減少していた。この結果に一致して、短期寒冷刺激 (4°C) を与えると WT マウスは体温を維持できたが、Tg マウスは体温を徐々に低下させ、寒冷不耐性を示した。一方で、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬に応答して組織温度を上昇させたため、Tg マウスに残存する褐色脂肪組織は熱産生能を持つことが確認できた。よって、Tg マウスでは褐色脂肪細胞数の減少が組織の低形成を導いたと考えられる。

p27 が褐色脂肪細胞の分化に影響を与えているか検討するため、WT と Tg マウスから調整したマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を褐色脂肪細胞へと分化させた。Tg の MEF では UCP1 発現量が低下したものの、分化した脂肪細胞で発現する aP2 およびミトコンドリア量の指標となる COX IV の mRNA 発現量や脂肪含量に差は見られなかった。褐色脂肪細胞株である HB2 細胞にアデノウイルスを用いて p27 もしくは蛍光マーカー (GFP) を過剰発現させ、両細胞の分化過程を比較した結果、aP2 および UCP1 の mRNA 発現量や脂肪含量に差はなかった。これらの結果から、p27 は褐色脂肪細胞の分化に影響を与えないと結論づけた。

最後に、第一章で見出された寒冷誘導性の $\beta 3$ アドレナリン受容体を介した褐色脂肪細胞の増殖が Tg マウスで抑制されるか検討した。Tg マウスが寒冷不耐性を示したため、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬 (CL, CL316, 243) を投与して、Ki67 発現細胞の変化を調べた。両マウスとも CL 投与により褐色脂肪細胞に含まれる脂肪滴のサイズが減少し、 $\beta 3$ アドレナリン受容体の刺激に応答した。基準となる非刺激時の Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は Tg マウスにおいて WT マウスに比べ有意に低下していた。さらに CL 投与による Ki67 陽性の褐色脂肪細胞数の増加は WT マウスで見られたが Tg マウスでは見られなかった。また、Ki67 陽性の間質細胞の割合は CL 投与の有無に関わらず変化はなかった。これらの結果から、分化した褐色脂肪細胞の増殖は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介していることが確認され、褐色脂肪細胞の分化後の増殖機構は組織形成にも大きく寄与することがわかった。

本研究により、褐色脂肪細胞は分化後にも分裂するという、これまで想定されていなかった独特な増殖経路を持っていることがわかった。この増殖経路は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介しており、褐色脂肪組織の寒冷刺激誘導性の組織増生や組織形成に寄与していることがわかった。