HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	変温性・真社会性齧歯類ハダカデバネズミのクイーンにおける 社会的隔離による褐色脂肪組織の発熱
Author(s)	大岩, 祐基
Description	配架番号：2441
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13427号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13427
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80086
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Oiwa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

変温性・真社会性齧歯類ハダカデバネズミのクイーンにおける社会的隔離による褐色脂肪組織の発熱

(Social isolation triggers brown adipose tissue thermogenesis in the queen of the poikilothermic and eusocial rodent, the Naked mole-rat)

２０１９　年　　３　月

北　海　道　大　学

大　岩　祐　基

Yuki Oiwa

学位論文

変温性・真社会性齧歯類ハダカデバネズミのクイーンにおける社会的隔離による褐色脂肪組織の発熱

(Social isolation triggers brown adipose tissue thermogenesis in the queen of the poikilothermic and eusocial rodent, the Naked mole-rat)

２０１９　年　　３　月

北　海　道　大　学

大　岩　祐　基

Yuki Oiwa

目次

発表論文目録および学会発表目録 1

要旨 2

略語表 5

1. 緒言 6

2. 実験方法 9

3. 実験結果 16

4. 考察 51

5. 総括および結論 54

6. 謝辞 55

7. 利益相反 56

8. 引用文献 57

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿済みである.

1. Yuki Oiwa, Kaori Oka, Hironobu Yasui, Kei Higashikawa, Yuji Kuge, Hidemasa Bono, Yoshimi Kawamura, Hideyuki Okano, Kazuhiro Kimura, Yuko Okamatasu-Ogura, and Kyoko Miura. “Social isolation triggers brown adipose tissue thermogenesis in the queen of the naked mole-rat”, *Proccedings of National Science Academy of America* (投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Yuki Oiwa, Yuko Okamatsu, Hidemasa Bono, Hideyki Okano, Kazuhiro Kimura, Kyoko Miura.
“Functional Analysis of brown adipose tissues of a non-homeothermal rodent, Naked mole-rat”, SEB 2017 Gothernburg (Society of Experimental Biology annual meeting 2017), Gothernburg, Sweden, July, 2017.

2. 大岩祐基, 岡松優子, 坊農秀雅, 岡野栄之, 木村和弘, 三浦恭子, 「長寿・外温性齧歯類ハダカデバネズミの褐色脂肪組織の機能解析」, 第 2 回 北大・部局横断シンポジウム「がん, 免疫, 感染」, 札幌（北海道）, 3 月 2017 年

3. 大岩祐基, 岡松優子, 坊農秀雅, 岡野栄之, 木村和弘, 三浦恭子, 「老化・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」, 2016 年度遺伝研研究会「次世代モデル生物におけるゲノム利用情報ワークショップ」, 三島 (静岡), 12 月 2016 年

4. 大岩祐基, 岡松優子, 坊農秀雅, 岡野栄之, 木村和弘, 三浦恭子, 「長寿・外温性齧歯類ハダカデバネズミの褐色脂肪組織とベージュ脂肪組織の機能解析」, 第 39 回分子生物学会年会, 横浜 (神奈川), 11 月 2016 年

要旨

【背景と目的】

褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT) は, 非ふるえ熱産生を行う主要な組織であり, 小型の哺乳類や幼若個体の寒冷環境における体温維持のために重要である. 近年では, 寒冷環境だけでなく, 食事や, 外敵に遭遇したストレスなどによって, BAT による非ふるえ熱産生が誘導されることも知られている. 哺乳類の中には, 自発的な熱産生能が低く, 恒温機能が非常に弱い種が複数存在することが知られている。興味深いことに, そういった非恒温性哺乳類においても BAT の存在が報告されているが, その役割はこれまで全く不明であった.

ハダカデバネズミ (Naked mole-rat, NMR) は, 東アフリカの地下に生息する変温性, 真社会性の齧歯類である. NMR は地下に全長 3km にもおよぶトンネルからなる巣をを形成し、その中で数十匹～数百匹の集団でコロニーを形成し、生息する。一つのコロニーは、繁殖を行う 1 匹の雌 (クイーン) と数匹の雄 (キング), 繁殖能力を持たない個体 (ワーカー) からなり, 体温が低下した場合には, 個体が集まりあい体温の低下を防ぐ. これまでに NMR の BAT (NMR-BAT)がノルアドレナリン依存的な熱産生能力をもつことが, 個体の酸素消費量を指標に間接的に示されているものの, NMR は寒冷環境で非ふるえ熱産生を誘導できず, 環境温度の低下に伴い深部体温が低下することが報告されていた. また, BAT の非ふるえ熱産生誘導に重要な *uncoupling protein 1* (UCP1) に種特異的な遺伝子変異が存在し, UCP1 による非ふるえ熱産生能力が失われている可能性も示唆されていた. これらのことから, NMR-BAT の熱産生能力およびその生理的な役割は, 現在までのところ不明であった.

本研究では, 寒冷環境下での体温維持とは異なる役割で, NMR-BAT が何らかの役割を果たしている可能性を検討した. NMR をモデルとして, 変温性哺乳類における BAT の機能という, これまでに全く未知の知見を明らかにすることを目的とし, (1) NMR-BAT が, 非ふるえ熱産生能力を有するのか, 次いで (2) NMR-BAT による非ふるえ熱産生が, NMR においてどのような役割を果たすのか, について検討を行った.

【対象と方法】

まず NMR-BAT の熱産生能力を評価するため, NMR-BAT の形態および遺伝子発現を評価した. その後, NMR-BAT 温度を直接測定するために,熱プローブを挿入し，ノルアドレナリン投与後の BAT 温度を測定した. また, ノルアドレナリン投与後の 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG) の取り込みを, positron emission tomography/computed tomography (PET-CT) で評価した. さらに, アドレナリンβ3 受容体阻害薬 SR59230A を用いて, NMR-BAT の熱産生の阻害を検討した. また, サーマルカメラを用いて NMR-BAT の発熱を間接的に評価する系を構築し, 寒冷環境下 (20 ºC) での NMR-BAT の熱産生能力を再評価した.

次に, NMR-BAT の役割を検討するため、NMR の行動量に着目し, 寒冷環境下 (20 ºC) および非寒冷環境下 (30 ºC) で, ホイールランニング装置を用いて, NMR の行動量が体温に依存するかを評価した.

続いて, 社会的隔離と NMR の体温上昇についての検討を行った. 非寒冷環境下 (30 ºC) で社会的隔離を行い, NMR の体表温度の変化をサーマルカメラで測定した. また, 社会的隔離を行った際の酸素消費量の変化を測定した. その後, 社会的隔離による体温上昇と BAT の関係について評価するため, 社会的隔離による体温上昇が SR59230A 投与により抑制されるかをサーマルカメラで評価した. また, 社会的隔離を行った NMR の尿中コルチゾールを測定した.

【結果】

1. NMR-BAT は熱産生能力を有する

これまでに NMR は頸部に BAT を持つことが報告されていたが, 詳細な解析の結果, NMR の頸部には色調の異なる 2 種類の BAT が存在していた. また, ノルアドレナリン投与後の BAT 温度の上昇と[^{18}F]FDG の取り込みにより, NMR-BAT の熱産生能力が示された. さらに, SR59230A が NMR-BAT の熱産生を阻害したことから, NMR-BAT のアドレナリンβ3 受容体依存的な熱産生能力が明らかになった.

2. NMR-BAT の体温と行動量の関係については, 有意な結果を得ることはできなかった.

寒冷環境により低体温にした NMR と, 非寒冷環境の NMR とで, ホイールランニング試験を行った結果, 有意な行動量の低下は, 少なくとも本実験系では観察できなかった.

3. 社会的隔離は, NMR のクイーンとワーカーに体温上昇を誘導する.

NMR のコロニー内で, 他個体から離れた個体は低体温になる一方, 社会的隔離をおこなった NMR のクイーンとワーカーでは, 体温上昇が認められることが明らかになった. また,体温上昇はクイーンが最も大きく, 一方でキングでは体温上昇は認められなかった.

4. 社会的隔離は, クイーンにおいて BAT 依存的に体温上昇を誘導する.

社会的隔離による体温上昇は, SR59230A の投与によりクイーンにおいて抑制された. また, 社会的隔離を行ったクイーンの尿中コルチゾールは増加していた. 一方で, ワーカーでは SR59230A を投与しても, 体温上昇の抑制やコルチゾールの増加は認められなかった.

【考察】

本研究により, NMR-BAT が熱産生能力を有することと, NMR-BAT の熱産生が社会的隔離を受けたクイーンの体温上昇に寄与するということが示された. これまで NMR-BAT の熱産生能力については相反する報告があり, さらに機能については全く不明であった. 本研究の第一の意義は, その点を明らかにしたことである. また, 非恒温哺乳類における BAT の役割を直接的に明らかにしたのは, 本研究が初めてであり, 非恒温哺乳類の BAT は, ただの飾りではなく, 非寒冷環境における機能をもつということを示した一例として意義が大きいと考えられる. また, 社会的隔離によって直ちに BAT の熱産生が誘導されるという報告はこれまでに他の哺乳類で全く報告されておらず, BAT 研究全般としても新規の知見であると考えられる. BAT の熱産生は, 単に体温維持だけでなく, 脂質や糖の代謝にも重要な影響を与える. 今後, そうした観点からも NMR-BAT を捉え, 新たな知見の開拓に取り組みたい.

【結論】

本研究で, 社会的隔離は, 変温性・真社会性齧歯類 NMR のクイーンにおいて, BAT 依存的な体温上昇を誘導することが示された. 今後, NMR および他の非恒温性哺乳類の BAT についても研究を進めることで, これまでに知られていない BAT の新たな役割が, 更に明らかになる可能性が考えられる.

略語表

本文および図表中で用いた略語は以下の通りである.

[^{18}F]FDG　2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose
ACTB　Beta-Actin
ANOVA　one-way analysis of variance
BAT　Brown adipose tissue
CITED1　Transcriptional coactivator of the p300/CBP-mediated transcription complex
dBAT　Dark brown adipose tissue
DIO2　Iodothyronine Deiodinase 2
ELISA　Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
gWAT　Gonadal white adipose tissue
HE 染色　Hematoxylin-eosin staining
HRP　Horseradish peroxidase
iBAT　Interscapular brown adipose tissue
ingWAT　Inguinal white adipose tissue
lBAT　Light brown adipose tissue
mRNA　Messenger ribonucleic acid
NMR　Naked mole-rat
PET-CT　Positron emission tomography/computed tomography
PGC1α　Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α
quantitative RT-PCR　Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RNA　Ribonucleic acid
rpWAT　Retroperitoneal white adipose tissue
TBX1　T-box transcription factor
UCP1　Uncoupling Protein 1
vlBAT　Ventral light brown adipose tissue
ZIC1　Zic family member 1

1. 緒言

1-1 非ふるえ熱産生と褐色脂肪組織

恒温動物は, 寒冷環境において体温を維持するための様々な機構を発達させている. 非ふるえ熱産生は, 骨格筋のふるえを伴わず, 代謝亢進により熱を産生する仕組みであり, ふるえ熱産生, 立毛筋の収縮, 末梢血管の収縮に加えて, 特にマウスなど小型の齧歯類や, ヒトでも小児において, 非常に重要な体温維持機構である (Cannon and Nedergaard, 2004). マウスの場合にも, ヒトの小児の場合にも, 肩甲骨間を中心に存在する褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT) が, 非ふるえ熱産生を行う主要な組織として知られている. BAT は, 細胞内に多数の脂肪滴を有した, 特徴的な形態の褐色脂肪細胞を含んでおり, 褐色脂肪細胞特異的に発現する Uncoupling Protein 1 (UCP1) という脱共役タンパク質によって, 非ふるえ熱産生を誘導する (Aquila et al., 1985). UCP1 は, ミトコンドリアの電子伝達系によってつくられるプロトン濃度勾配を, アデノシン三リン酸合成に利用する代わりに, 熱エネルギーとして放散させる役割を持つ. UCP1 による熱産生を行うため, BAT では, ミトコンドリアがよく発達し, 脂肪酸や糖の代謝が活発である (Cannon and Nedergaard, 2004). 近年, BAT による熱産生は, 寒冷環境下だけでおこるのではなく, 非寒冷環境下においても, 食事や, 外敵によるストレスなどによって誘導されることが報告されている (Kataoka et al., 2014; Mohammed et al., 2014; Rothwell, 1997; Zhang et al., 2010). また, BAT の熱産生は, 脂質や糖の代謝を亢進させるため, 糖尿病など, 代謝性疾患の治療標的としても活発に研究されている (Bartelt et al., 2011; Rosen and Spiegelman, 2006; Stanford et al., 2013; Thomou et al., 2017).

BAT の熱産生は, 哺乳類が寒冷環境に適応するために発達させた体温制御機構の一つであると考えられているが, 興味深いことに, BAT は恒温性の哺乳類だけに存在するのではない. 近年, 恒温機能が非常に弱い非恒温性哺乳類も BAT をもつことが明らかになっている (Daly et al., 1997; Oelkrug et al., 2013). しかしながら, それらの哺乳類で, BAT がどのような役割を果たしているのかは, 全く明らかになっていない.

1-2 変温性・真社会性齧歯類ハダカデバネズミ

ハダカデバネズミ (*Heterocephalus glaber*, Naked Mole-Rats, NMR) は, ケニア, エチオピア, ソマリアなど, 東アフリカの地下環境に生息する齧歯類である (Jarvis and Bennett, 1991). NMR は, 最大で 3 km から 5 km に達する、複数のスペースが長いトンネルでつながれた形態の巣を地下に作り, その中で, 数十匹から数百匹の集団でコロニーを形成し, 生活する. 地下のスペースは用途ごとに分けられており, 食料置き場, ごみ捨て場, 休息スペース (ネストと呼ばれる) などに用いられる. NMR は, 哺乳類では非常に珍しい, 真社会性の動物であり, 一匹のメスの繁殖個体 (クイーン; Queen), 一匹から三匹のオスの繁殖個体 (キング; King) , 繁殖に参加しない個体 (ワーカー; Subordinate) で, コロニーを構成する (Jarvis, 1981).

NMR は, 温度湿度がかなり安定している地下に生息しており, 外気温の低下時に深部体温を維持できない, 変温性齧歯類である. そのため, 体温維持・上昇が必要な場合には, ネストで密集して重なり合い, 熱放散を抑える行動をとることが知られている (Withers and Jarvis, 1980; Yahav and Buffenstein, 1991). NMR が変温性である原因として, 体毛を持たないこと, 皮膚が薄いことに加えて, 寒冷環境下で非ふるえ熱産生を誘導する能力を欠くことが, これまでに指摘されていた (Buffenstein and Yahav, 1991).

1-3 ハダカデバネズミと褐色脂肪組織

変温性哺乳類である NMR において BAT はどのような役割を果たしているのであろうか。過去に Buffenstein らは, NMR が頭頚部周囲に広く, 交感神経終末を伴った BAT を有していることを報告している (Daly et al., 1997). また, BAT による非ふるえ熱産生の間接的な指標として, 個体の酸素消費量を測定し, 麻酔下の NMR にノルアドレナリンを投与した際に, 酸素消費量の増加が起こることを報告している (Hislop and Buffenstein, 1994). このことは NMR-BAT が, アドレナリン依存的な非ふるえ熱産生能力を有する可能性を示している. 一方で, Buffensiten らは, 29 度以下の環境で, NMR の酸素消費量が亢進しないことも報告している (Buffenstein and Yahav, 1991). また近年, NMR のゲノムが解読され, NMR の UCP1 遺伝子に種特異的な遺伝子変異が存在するために, UCP1 による非ふるえ熱産生能力を失っている可能性も示唆されている (Kim et al., 2011).

しかしこれまで, 直接的な計測方法で NMR-BAT の非ふるえ熱産生能力を評価した報告はなく, NMR-BAT の熱産生能力とその役割は, 未解明なままであった.

1-4 仮説および本研究の目的

上述の背景から, 寒冷環境下での体温維持とは異なる状況において, NMR-BAT が非ふるえ熱産生を誘導し, 何らかの役割を果たしている可能性を考えた. そこで本研究では, NMR をモデルとして, 変温性哺乳類における BAT の役割という, これまでに全く未知の知見を明らかにすることを目的とし, (1) NMR-BAT が, 非ふるえ熱産生能力を有するのか, 次いで (2) NMR-BAT による非ふるえ熱産生が, NMR において果たす役割について検討を行った.

2. 実験方法

2-1 本研究に用いた実験動物と倫理申請

NMR は, 北海道大学および熊本大学において, 12 時間ごとの明暗周期下, 室温を 30 ± 0.5 ℃, 湿度 55 ± 5 % で維持された飼育室環境において, 4-10 個のアクリルケージをトンネルで連結した巣の中で飼育した. マウスは, CLEA Japan, Inc から購入した 6 週齢の JcI:ICR マウスを使用した. コロニー内の NMR の体表温度測定には, 1 歳齢から 12 歳齢までの NMR を使用した. ヘマトキシリン・エオジン染色 (Hematoxylin-eosin staining, HE 染色) 及び RNA 抽出に用いたサンプルの採取および褐色脂肪細胞の分離には, 1 歳齢から 2 歳齢までの NMR を使用した. 社会的隔離の実験は, 1 歳齢から 12 歳齢のワーカーと, 5 歳齢から 13 歳齢のクイーンを使用した. 行った動物実験は, 「北海道大学動物実験に関する規定」 (承認番号, A30-043) および「熊本大学動物実験等に関する規則」 (承認番号, 14-0065) に則り行った.

2-2 HE 染色および脂肪滴の大きさの測定

NMR およびマウスの脂肪組織は, 4% パラホルムアルデヒドで固定した. 固定した脂肪組織は, 札幌総合病理に提出し, HE 標本を作製した. HE 標本は, BZ-X 710 (Keyence) で観察を行い, BZ-X image analyzer (Keyence) によって, 脂肪滴のサイズ測定を行った.

2-3 mRNA シーケンス

脂肪組織からの RNA 抽出は, Trizol (Life Technologies) を用いて, 標準プロトコールで行った. 抽出した RNA は, Qiagen RNeasy column を用いて精製後, turbo DNA-free™ kit (Invitrogen) を用いて, ゲノム DNA を除去した. RNA の定量およびクオリティーチェックは, Qubit (Invitrogen) および, RNA 6000 Nano Kit (Invitrogen) を用いて行った. ライブラリーの調製は, TrueSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina) を用いた. 作製したライブラリーの定量には, High Sensitivity DNA kit (Agilent technologies) および Kapa Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) を用いた. TruSeq Rapid SR Cluster Kit (Illumina) によって, ライブラ

リーからクラスターを作製し, Illumina Hiseq 2500 を用いて, 100 bp シングルエンドリードでシークエンスした.

得られたデータの解析のため, Ensembl 92 (https://www.ensembl.org/index.html) からダウンロードした NMR のリファレンスゲノムデータ (HetGla_female_1.0) およびアノテーションファイルを利用した. Fastq ファイルのクオリティーチェックには, Trim-galore ver. 0.4.4. (Krueger, 2016) を用い, 遺伝子発現量の定量には, RSEM ver 1.2.31 (Li and Dewey, 2011)を使用した.

NMR dBAT において高発現している遺伝子を抽出するため, NMR WAT との発現差 TOP 200 の遺伝子を抽出し, Metascape (Tripathi et al., 2015) において, マウスの Gene ontology アノテーションデータを元に, Gene ontology enrichment 解析を行った.

2-4 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Quantitative RT-PCR)

脂肪組織からの RNA は, RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen) を用いて, 標準プロトコールで抽出した. 抽出した RNA からのゲノム DNA の除去のため, turbo DNA-free™ kit (Invitrogen) を標準プロトコールで使用した. 逆転写反応は, 300 ng の RNA を用い, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を標準プロトコールで行った. cDNA における各遺伝子の発現は, Thunderbird® qPCR Mix (TOYOBO) を標準プロトコールで使用し, CFX384 TouchTM Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) により定量した. Quantitative RT-PCR のために使用したプライマーは, 表 1 にまとめた.

表１　本研究で使用したプライマーのリスト

NMR-UCP1-F	CCTCTCCAGTGGATGTGGTG
NMR-UCP1-R	TGCTCAAAGCACACAAACAT
NMR-ZIC1-F	AGCCCTTCAAGTGCGAGTTCGAG
NMR-ZIC1-R	CTTGCAGAGATAGGGCTTGTCAC
NMR-PGC1 alpha-F	CACAGGATCAGAACAAACCC
NMR-PGC1 alpha-R	CAGATACTTGAGAAGCTCCGA
NMR-DIO2-F	AGCTTTCTGCTCGATGCC
NMR-DIO2-R	TCCTGGACACCGTTTCCGCTA
NMR-TBX1-F	ACGGCCACATTATTCTCAACTCCA
NMR-TBX1-R	AAGCGCGTCTCCTCGAACACA
NMR-CITED1-F	CCGGCCCTTCGCTTTCACAC
NMR-CITED1-R	TCAGCTCAGTGGTGCCCCTT
NMR-ACTB-F	AGACCTTCAACACCCCAGCCATGT
NMR-ACTB-R	GGCCAGCCAGGTCCAGACGCAG

2-5　熱プローブを用いた BAT 熱産生の *in vivo* 定量

生体における熱プローブを用いた BAT 熱産生の測定は、0.1 μg/g メデトミジン (Dorbene® Vet, Kyoritsu Seiyaku Co.), 4 μg/ml ミダゾラム (Dormicum®, Asteras Pharma Inc.), 5 μg/g ブトルファノール (Vetorphale, Meiji Seika Pharma Co.) の腹腔内投与による麻酔下で行った. 麻酔下の NMR において, 肩甲骨間の皮膚を切開し, lBAT の一部を剥離した後, lBAT と頚部の筋肉の間に, 熱プローブを挿入した. また, 直腸にも同時に熱プローブを挿入した. BAT 温度と, 直腸温度が平衡に達した後, 1 mg/kg のアドレナリンを腹腔内投与し, BAT と直腸温度の変化を 30 分間記録した. 実験は, 30 ± 0.5 ℃の非寒冷環境で行い, NMR を 32 ℃のホットプレート (NHP-M30N, NISSIN RIKA) で加温しながら実施した.

2-6　褐色脂肪細胞の *in vitro* における酸素消費量の測定

脂肪組織からの脂肪細胞の分離は, 先行文献を元に行った (Omachi et al., 2008). KRBH バッファー (130 mM Na+, 4 mM K+, 0.75 mM Ca2+, 1 mM Mg2+, 121.5 mM Cl-, 10 mM HCO3-, (1mM Mg2+, 4 mM HPO42-, 30 mM HEPES, pH 7.4) に 1 % fatty acid-free bovine serum albumin (Wako), 6 mM glucose, 1 mg/ml collagenase (Sigma) を加えた溶液に, 単離した褐色脂肪組織を加え, 37 ℃, 90 rpm/min で 1 時間インキュベートした。200 μm ナイロンフィルターでろ過後, 200 g で 1 分間遠心し, 浮遊している細胞を回収した. 回収した細胞は, さらに, KRBH バッファーに, 3.5 % BSA, 6 mM グルコースを加えた溶液へ懸濁し, 再度 200 g で 1 分間遠心した. 同様の操作をさらに 2 回行い, コラゲナーゼを除去した. 得られた脂肪細胞は, 酸素消費量の測定に使用するまで 37 ℃で保存した. 酸素消費量の測定は, クラーク型酸素電極を用いて酸素消費量を測定する, Strathkelivin 782 2-channel oxygen system (Strathkelvin Instruments) を用いた. 基底状態での酸素消費量が安定した後, 最終濃度が 1 μM になるように, アドレナリンをチャンバー内に添加し, 酸素消費量の変化を記録した. また, アドレナリンベータ 3 受容体阻害が, 酸素消費量の増加に与える影響を評価するため, SR59230A (アドレナリンベータ 3 受容体阻害剤, 10 μM, Sigma) を用いた. SR59230A をチャンバー内に入れて 10 分後に, 1 μM のアドレナリンを加え、酸素消費量の変動を記録した. 得られたデータの解析には, 782 Oxygen System (Strathkelvin Instruments) を用いた.

2-7　Positron emission tomography/computed tomography (PET-CT) imaging

NMR は 30 ± 0.5 ℃, 湿度 55 ± 5 %の環境で一晩絶食した後に, PET-CT 実験に利用した. 覚醒下で 1 mg/kg のアドレナリンを腹腔投与した後, 11 MBq の 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG) をさらに腹腔投与した. PET-CT imaging は, [^{18}F]FDG の投与から 1 時間後に開始し, Inveon small-animal multimodality PET/CT system (Siemens Medical Solutions) を用いて, 撮影を行った. PET-CT 撮影は, イソフルランによる麻酔下で, 32 ℃に加温しながら行った. 得られた PET データは, Filtered back projection algorithm で再構成し, ramp フィルタを再構成フィルタに用いた. CT データは, Feldkamp 法で再構成し, Shepp-Logan フィルタを再構成フィルタに用いた.

2-8　NMR 体表温度の測定およびテレメトリーによる深部体温の測定

NMR の体表温度測定には, サーマルカメラ (CPA-E6A, FLIR) を利用した. 取得したサーマルカメラのデータは, FLIR tools software ver. 2.1 (FLIR) を用いて, 解析を行った. 深部体温の測定には, テレメトリープローブ (G2 E-mitter, STARR Life Sciences Cooperation) および ER4000 receiver (STARR Life Sciences Cooperation)を利用した. 腹腔へのテレメトリープローブの挿入は麻酔下で行い, 処置から 7 日以上経過した NMR を実験に使用した. 得られたデータは, VitalView software ver. 4.1 (STARR Life Sciences Cooperation) を用いて, 解析した.

2-9　ホイールランニングテスト

ホイールランニングテストを行うため, 市販の小型齧歯類用の回し車 (サイレントホイール 15, SANKO) に, モーターおよび可変抵抗, ダイヤル式スイッチを接続し, ダイヤルにより回転数を制御可能なホイールランニング装置を作製した. 寒冷環境および非寒冷環境で, NMR をホイールランニング装置に入れ, 10.8 cm/s の一定速度でどれくらいの時間一度に走ることができるか, また 10 秒ごとに速さを変更した場合に, どれくらいの速さまで走ることが可能かを評価した. 速さを変更する実験では, velocity score を (走った速さのスコア × 走った時間 (秒) × 0.1) と定義して, velocity score を算出した. また走った速さのスコアは, 走ることが可能だった最大の速さが 10.8 cm/s だった場合を 1, 13.45

cm/s だった場合を 2, 23.55 cm/s だった場合を 3 とした. 寒冷環境の実験は, NMR を寒冷環境にうつしてから 30 分経過後, 実験を開始した.

2-10　NMR の社会的隔離

コロニーで集団飼育している NMR から一匹を取り出し, コロニーを飼育しているアクリルとは別のアクリルケージ, もしくは代謝ケージに移動させた. 社会的隔離を行った個体の入ったアクリルケージおよび代謝ケージは, 室温を 30 ± 0.5 ℃, 湿度 60% で維持された飼育室環境においた. 社会的隔離は最長で 1 日 8 時間まで行い, 実験終了後, 隔離を行った個体はコロニーに戻した.

2-11　NMR の *in vivo* における酸素消費量の測定

個別飼育ならびに集団飼育時の NMR の酸素消費量の測定のため, 代謝ケージ MK-5000RQ (Muromachi Kikai) および MMS-ML/2 software (Muromachi Kikai) を使用した. 30 ± 0.5 ℃の飼育室内に安置した密閉ケージ内で NMR を飼育し, 1 回/3 分毎の換気で, 酸素消費量を測定した. 測定開始から 2 時間分のデータは, NMR の順化時間として破棄し, さらに 4 時間分のデータを取得し, 解析を行った.

2-12　尿中コルチゾールの測定

コロニー内あるいは社会的隔離時の NMR の尿を, NMR が排尿してから直ちに回収した.コロニー内での尿回収の際は, 他個体の尿のコンタミネーションを避けるために, 尿の回収前に, トイレとして使用されているチャンバーをペーパータオルで拭き取り、その後に尿を回収した. 回収した尿は後の実験まで-20 C で保存した。

尿中コルチゾールの測定は, 先行文献 (Watarai et al., 2018) を参考に, 競合 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で行った. まず 96 well plastic plate (Corning® 96-well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate, Corning International, Inc.) に, 100 µl の希釈した二次抗体 (AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) を加え, 室温で一晩インキュベートした. 未結合の二次抗体を取り除くため, プレートを 3 回 wash した後, 15 µl のサンプル, 100 µl の希釈した一次抗体 (Anti Cortisol-3, FKA- 404-E, Cosmo Bio), および 100 µl の Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗原 (Cortisol

(Compd. F)-3-HRP, FKA-403, Cosmo Bio) を順番に加えた．また，コントロールとして段階希釈したコルチゾールを加えたウェルも作製した．抗体の希釈には，pH 7.2 のリン酸ナトリウムバッファーに, BSA を 1 g/L で加えた溶液を使用した. 4 ℃で一晩インキュベートを行い，プレートを 3 回 wash した後, 150 µl の HRP 基質を添加した．プレートを室温で 15 分間インキュベートした後, 50 ul の 4N H_2SO_4 を加えて反応を停止させ，マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した (iMark, BIO-RAD).

尿中クレアチニンの測定は，ヤッフェ法を元に測定した (Narayanan and Appleton, 1980). 1M NaOH と 1 g/dl Picric acid を，それぞれ 50 µl ずつ 96 well plastic plate へ加え, 100 倍希釈したサンプル, 10 µg/ml コントロールクレアチニン溶液を，それぞれ加えた.室温で 20 分間インキュベート後，マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定した (iMark, BIO-RAD).

尿中コルチゾールの値は，クレアチニンの値で補正し，データの解析に使用した.

2-13　水銀温度計を用いたアクリルケージおよび内の温度測定

コロニーを飼育しているケージおよび社会的隔離を行ったケージ内の温度測定のため，それぞれのケージの底から 10cm 上のところに水銀温度計の先端が止まるように，水銀温度計を固定し, NMR をいれた状態で測定を行った.

2-14　統計処理

得られたデータの統計処理には, Graphpad Prism (Graphpad) を用いた．多群間のデータの解析には, one-way analysis of variance (ANOVA) とテューキーの範囲検定，あるいは一元配置分散分析とダネットの検定を用いた．また 2 群間の検定には, unpaired *t*-test もしくは, paired *t*-test を用いた.

3. 実験結果

3-1　NMR-BAT は，非ふるえ熱産生能力を有する

3-1-1　NMR は，頭頸部に色調の異なる二種類の BAT を持つ.

これまで, NMR-BAT の非ふるえ熱産生能力に関しては, 個体にノルアドレナリンを投与した際の酸素消費量の評価によって, 間接的に調べられているだけであった (Hislop and Buffenstein, 1994). そこで, まず NMR-BAT の基礎的な特徴を明らかにし, NMR-BAT が熱産生能力を有するかを評価することとした. 先行研究では NMR の頭頸部周囲の BAT が報告されていたが, 肉眼解剖において, NMR は色調の異なる 2 種類の BAT を有することがわかった (図 1, 2). 肩甲骨間から頸部の周囲にかけて, 皮下にある BAT を, light BAT (lBAT), 腹側の BAT を ventral light BAT (vlBAT), lBAT の内側に存在し，より褐色の強い BAT を dark BAT (dBAT) として, 以後の解析を行った. HE 染色および, 組織からの脂肪細胞の単離を行ったところ, いずれの BAT も, 多胞性の脂肪滴を有する褐色脂肪細胞を有していた (図 2). これらの BAT は合計で, 体重あたり平均 1.8%程度であり, マウスにおいて褐色脂肪組織が占める割合の約 1%と比べて (Yoo et al., 2014; Zhou et al., 2016), 少なくはなかった (図 3). また, BAT 中の褐色脂肪細胞の脂肪滴の大きさは, BAT の熱産生の指標のひとつである(Cinti, 2006). dBAT の脂肪滴の大きさを, JcI:ICR マウスの肩甲骨間褐色脂肪組織 (interscapular BAT, iBAT) の脂肪滴の大きさと比較した結果, dBAT の脂肪滴はマウスの iBAT と比べて有意に小さく， 活発に熱産生を行っていることが示唆された (図 4).

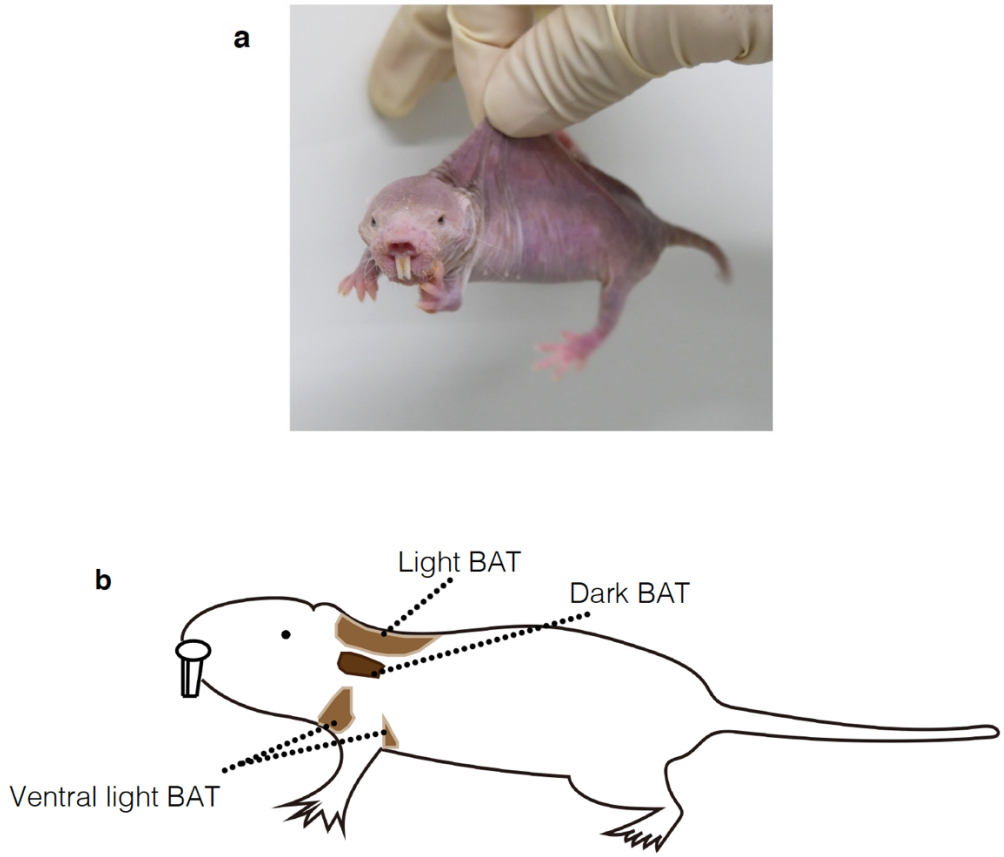


図 1　NMR および本研究で評価した NMR-BAT の局在の模式図

(a) NMR. 皮膚が薄く, 体毛を持たない. (b) NMR-BAT 局在の模式図. 本研究では, NMR の頸部を取り巻く BAT のうち, 皮下にあるものを Light BAT, より内側のものを Dark BAT として, 解析を行った.

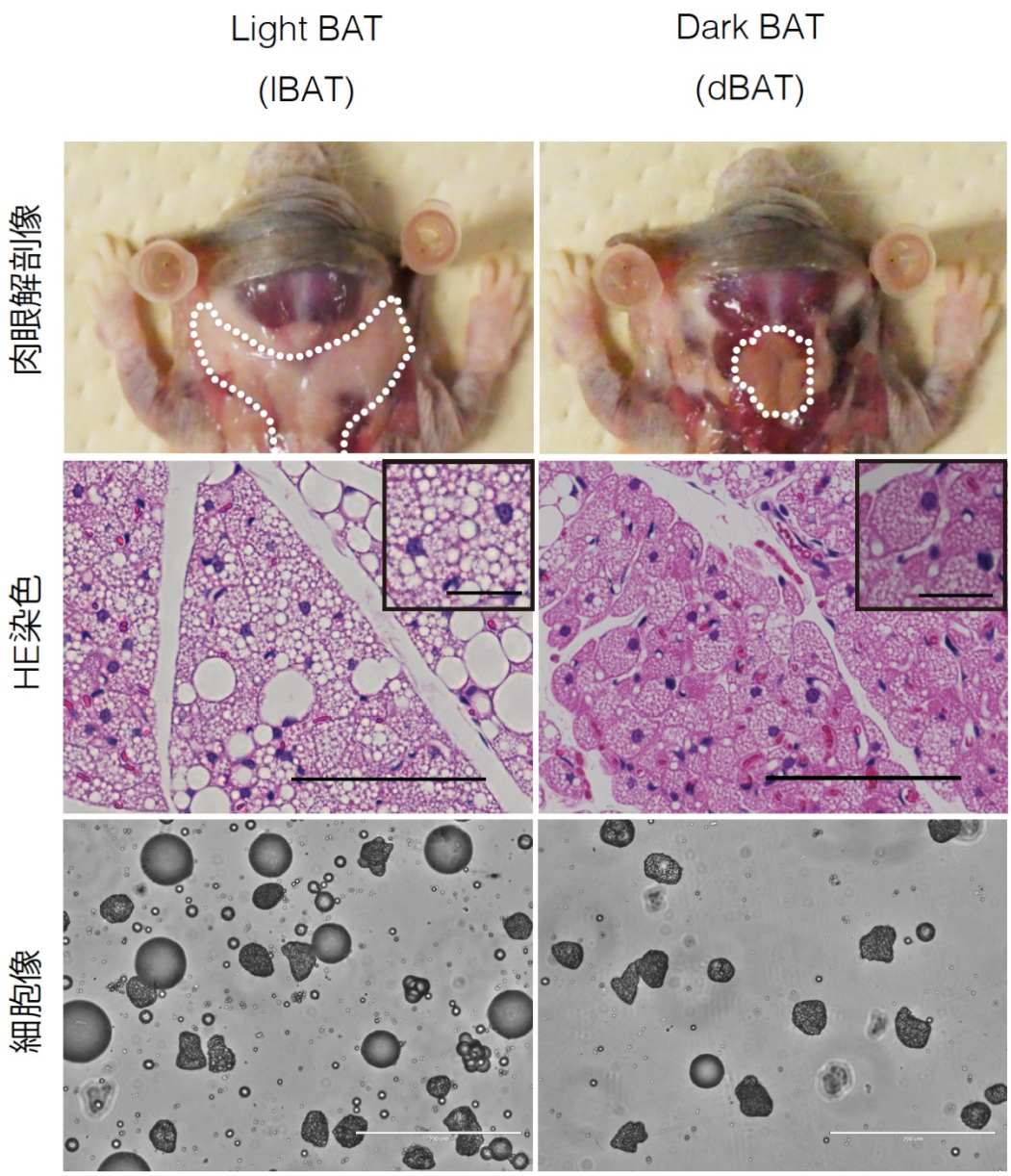


図 2　lBAT および dBAT の肉眼解剖像, HE 染色像, 細胞像

NMR のワーカーから, lBAT および dBAT を採材し, HE 染色, および組織から分離した細胞の形態を観察した. 肉眼解剖像における白色の点線はそれぞれの BAT の領域を表す. HE 染色では, 拡大像を右上に示す. HE 染色のスケールバーは 100 μm, 拡大像は 25 μm. 細胞像のスケールバーは 200 μm を示す.

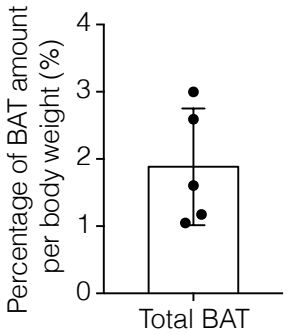


図 3　NMR-BAT の体重に対する割合

NMR のワーカーから採材した dBAT, lBAT, vlBAT の総量を，それぞれの個体の体重あたりのパーセンテージで示した ($n = 5$ 個体). エラーバーは，平均 ± 標準偏差を示す.

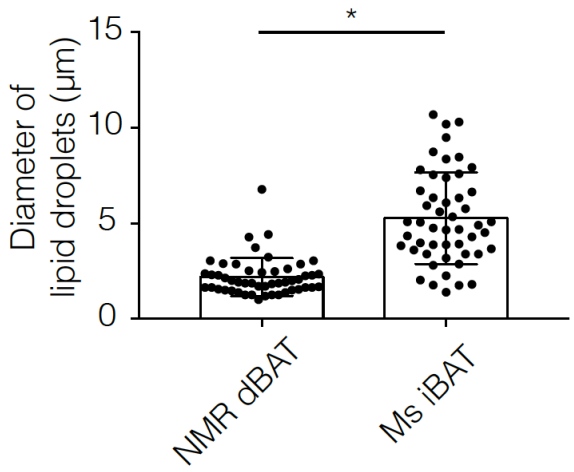


図 4　dBAT の脂肪滴の大きさと, JcI:ICR マウスの iBAT の脂肪滴の大きさの比較

NMR dBAT および Ms lBAT の HE 染色像から, 脂肪滴の大きさを測定した. 異なる 3 視野から, 一つの細胞あたり一つの脂肪滴の大きさを測定し, 合計で 50 個の細胞の脂肪滴を測定した. エラーバーは, 平均 ± 標準偏差を示す. 検定は, unpaired *t*-test で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-1-2　NMR-BAT は，熱産生能力を示唆する遺伝子発現を呈する．

次に, NMR-BAT の遺伝子発現が, 既知の BAT の特徴を有しているかどうかを評価した．ヒトやマウスの BAT を用いた先行研究 (Jespersen et al., 2013; de Jong et al., 2015) で, BAT マーカーとして報告されている遺伝子である UCP1, *Zic family member 1* (ZIC1), *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α* (PGC1α), *Iodothyronine Deiodinase 2* (DIO2) について, quantitative RT-PCR を行ったところ, 鼠蹊部白色脂肪組織 (Inguinal white adipose tissues, ingWAT) に比べて, lBAT, dBAT, vlBAT はより強くこれらの遺伝子を発現している傾向がみられた（図 5）．特に dBAT では, 有意にその傾向がみられた. BAT に熱産生を誘導する刺激は, 白色脂肪組織 (White adipose tissue, WAT) に褐色脂肪細胞様のベージュ脂肪細胞を誘導することが知られており, ベージュ脂肪組織は, 褐色脂肪様の細胞と白色脂肪細胞が混在した組織像を示す (Harms and Seale, 2013; Wu et al., 2012). lBAT は組織像および細胞像で, 白色脂肪細胞を含んでいたため, 次に lBAT がベージュ脂肪組織様であるかどうかを検討した. その結果, ベージュ脂肪細胞マーカーとして報告されている遺伝子である *T-box transcription factor* (TBX1) and *Transcriptional coactivator of the p300/CBP-mediated transcription complex* (CITED1) については, 鼠蹊部白色脂肪組織と比べて有意な発現量の増加は認められなかった (図 5). 続いて, dBAT および鼠蹊部白色脂肪組織 (Inguinal white adipose tissues , ingWAT) の mRNA シーケンスを行い, dBAT で高発現している遺伝子について, Metascape で Gene ontology enrichment 解析を実施した（図 6）．その結果, dBAT では, the activation of processes related to generation of precursor metabolites and energy, monocarboxylic acid metabolic process, acyl-CoA metabolic process, mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c to oxygen, triglyceride metabolic process, response to fatty acid, glucose 6-phosphate metabolic process, mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen など, 脂質や糖の代謝に関わる遺伝子が高発現していることが明らかになり, dBAT は活発な代謝を行っていることが示唆された.

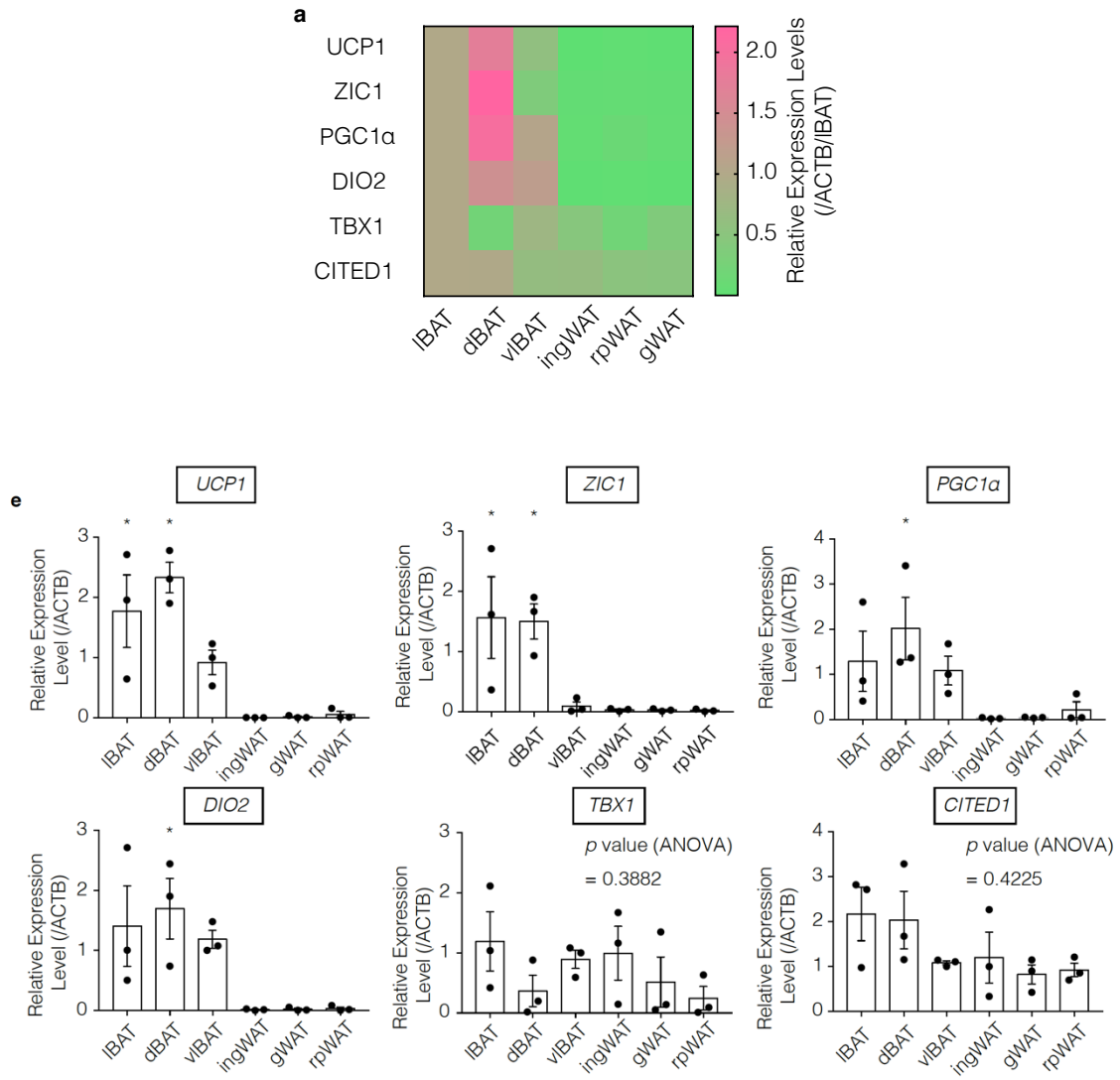


図 5 NMR の各脂肪組織における BAT マーカーおよびベージュ脂肪マーカーについての quantitative RT-PCR

(a, b) NMR の各脂肪組織について, ヒトもしくはマウスで BAT マーカーとして用いられている遺伝子 (UCP1, ZIC1. PGC1α, DIO2) とベージュ脂肪マーカーとして用いられる遺伝子 (TBX1, CITED1) の発現量を quantitative RT-PCR で定量した ($n = 3$ 個体). (a) 各遺伝子のインターナルコントロール (beta-Actin, ACTB)に対する相対発現量を, lBAT における相対発現量を 1 として補正した. (b) 各遺伝子のインターナルコントロールに対する相対発現量を, 遺伝子ごとに示した. gonadal white adipose tissue, gWAT. retroperitoneal white adipose tissue,

rpWAT.エラーバーは, 平均 ± 標準誤差を示す. 検定は, ANOVA の後, ingWAT を基準として, ダネットの t 検定で行った. アスタリスクは $p < 0.05$ を示す.

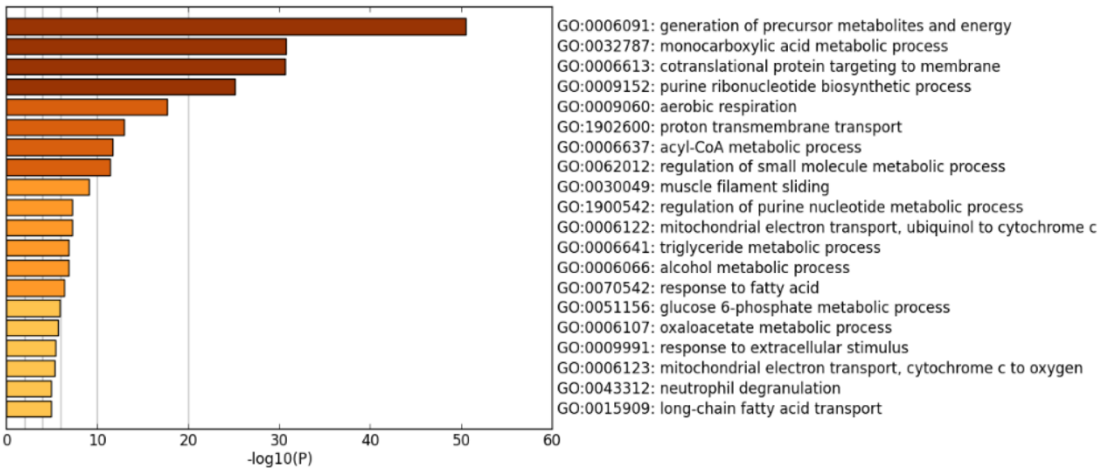


図 6 NMR-BAT において高発現する遺伝子の Gene ontology enrichment 解析

dBAT および ingWAT の mRNA シークエンスを行い, ingWAT に対して, dBAT で発現上昇している遺伝子上位 200 個を抽出後, metascape を用いて, Gene ontology enrichment 解析を行った (n = 1 個体).

3-1-3　NMR-BAT は, *in vivo* においてアドレナリン依存的な熱産生能力を有する.

組織学的解析, 遺伝子発現解析から NMR-BAT は典型的な BAT の特徴を有していると考えられた. そこで NMR-BAT が *in vivo* で熱産生能力を有するのかを評価するため, 麻酔下の NMR の BAT 温度及び直腸温度を, 局所に挿入した熱プローブにより同時に測定した. 1 mg /kg のノルアドレナリンを腹腔投与したところ, BAT の温度は約 1.2 ℃, 直腸温度は約 0.6 ℃上昇した (図 7).

また BAT は, 熱産生を行う際に, 糖を活発に取り込み消費することが知られている. この性質を利用して, 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG) を用いた positron emission tomography/computed tomography (PET-CT) により, BAT の局在がより詳細に検討されている (Cypess et al., 2009). NMR において, [^{18}F]FDG の投与および PET-CT を実施したところ, ノルアドレナリンの投与後, [^{18}F]FDG の取り込みが肩甲骨間だけでなく, 頸部を囲むように認められた (図 8). 以上の結果から, NMR-BAT は *in vivo* においてノルアドレナリン依存的に熱産生する能力があると結論付けた.

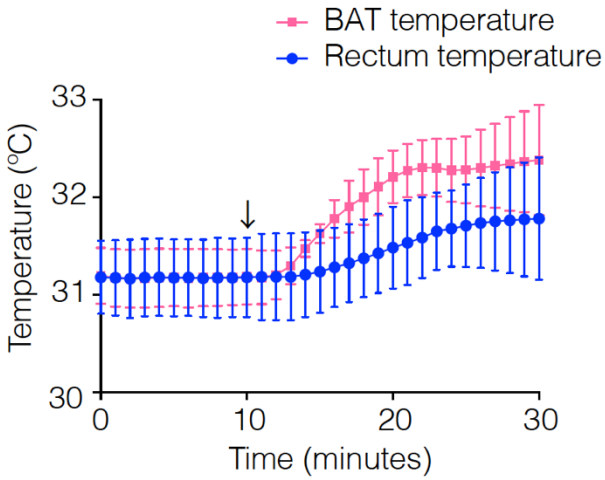


図 7 ノルアドレナリン投与後の NMR-BAT および直腸温度

メデトミジン, ミダゾラム, ブトルファノールで麻酔をかけた NMR において, lBAT と筋肉の間に挿入した熱プローブと, 直腸に挿入した熱プローブで, それぞれの部位の温度変化を記録した. 矢印の時刻にノルアドレナリン 1 mg/kg の腹腔投与を行った ($n = 3$ 個体). エラーバーは, 平均 ± 標準偏差を示す.

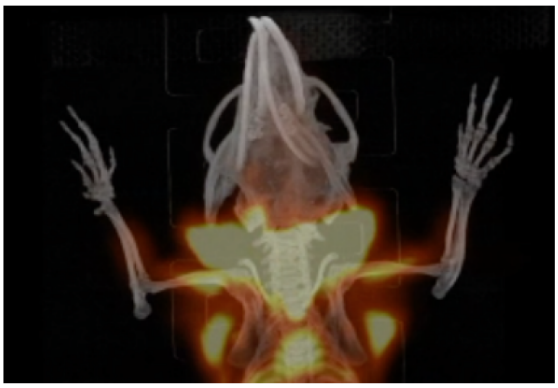


図 8 NMR-BAT におけるノルアドレナリン投与後の[^{18}F]FDG の取り込み

室温 30 ± 0.5 ℃, 湿度 60%の環境で, 一晩絶食させた NMR に, 1mg/kg のノルアドレナリンと 11 MBq の[^{18}F]FDG を投与した. 投与 1 時間後に, [^{18}F]FDG の取り込みを評価した. 背側からの撮影像を示す (n = 1 個体).

3-1-4　NMR の褐色脂肪細胞は, アドレナリンβ3 受容体依存的な熱産生能力を示す.

ノルアドレナリン受容体のうち, 特にアドレナリンβ3 受容体が, BAT での熱産生に重要な働きを示すことが知られている. ノルアドレナリン投与後の NMR-BAT の熱産生が, アドレナリンβ3 受容体に依存するものかどうかを評価するため, lBAT および dBAT から褐色脂肪細胞および白色脂肪細胞を分離し, *in vitro* においてノルアドレナリン添加後の活性化が認められるかどうか, また, アドレナリンβ3 受容体阻害剤 (SR59230A) によって阻害されるかどうかを検討した. 単離した褐色脂肪細胞における酸素消費量の測定の結果, ノルアドレナリンの添加は酸素消費の亢進を誘導したが, その効果は SR59230A によって阻害された（図 9）. この結果から, NMR-BAT の熱産生は, アドレナリンβ3 受容体に強く依存することが明らかになった.

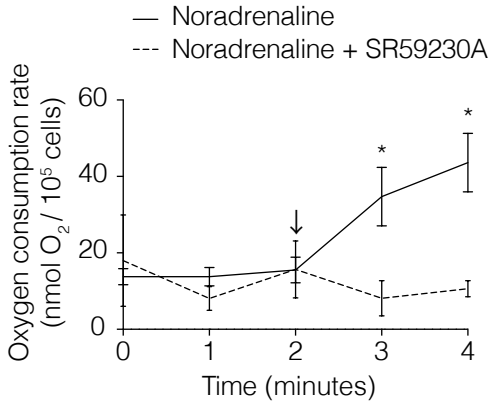


図 9 褐色脂肪細胞へのノルアドレナリン投与後の酸素消費量の変化

NMR ワーカーの lBAT および dBAT から, 脂肪細胞を分離し, 酸素消費量を測定した. 矢印は, 1 μM ノルアドレナリンを添加した時点を示す. SR59230A は, ノルアドレナリン投与の 10 分前に 10 μM を投与した ($n = 3$ 個体). エラーバーは, 平均 ± 標準誤差を示す. 検定は, paired *t*-test で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-1-5　NMR-BAT の非ふるえ熱産生は，寒冷刺激後に，初期の体温低下を抑制する．

これまでの結果から, NMR-BAT は熱産生能を有することが明らかとなった．そこで, “寒冷環境において, NMR が非ふるえ熱産生を誘導出来ない”という過去の報告を再検討した．覚醒下における NMR-BAT の発熱を評価するため, 体毛を持たず, 皮膚が薄いという NMR の特徴を利用して, サーマルカメラを用いた間接的な評価法を立ち上げた．まず, BAT 温度とサーマルカメラで撮影した頸部の体表温度が相関するのかを評価するため, 麻酔下の NMR の BAT 温度を熱プローブで測定しながら, 体表温度の変化を記録した．その結果, BAT 温度とサーマルカメラで測定した頸部の最大体表温度は, 強く相関することが確かめられた (図 10). 次に寒冷環境における NMR-BAT の評価のため, 無麻酔の NMR を, 通常飼育している 30℃の環境から, 20℃の寒冷環境に移動させた．体表温度およびテレメトリープローブによる深部体温を記録した結果, NMR は 20℃の環境で速やかに体表温度および深部体温が低下していくが, この低下は SR59230A の投与によって促進された (図 11). すなわち, BAT による熱産生は寒冷環境における NMR の体温維持に不十分ではあるが寄与することが明らかになった.

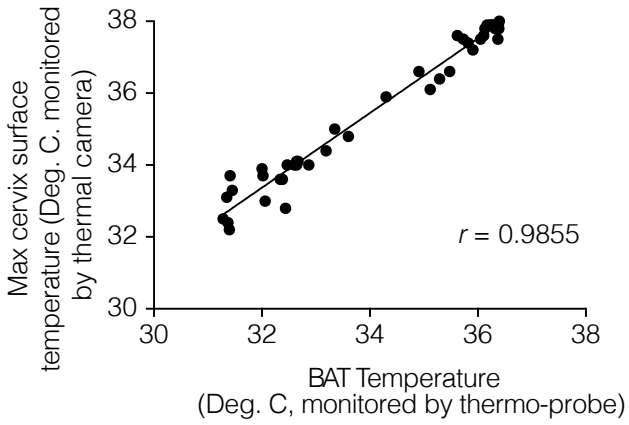


図 10 ノルアドレナリン投与後の BAT 温度と頸部の最大体表温度の変化

メデトミジン, ミダゾラム, ブトルファノールで麻酔をかけた NMR において, 1 mg/kg のノルアドレナリンを腹腔投与し, lBAT と筋肉の間に挿入した熱プローブで, 温度変化を記録した. 同時に体表温度の変化を記録し, 同時刻のそれぞれの温度をプロットした（$n = 3$ 個体）. r は相関係数を示す.

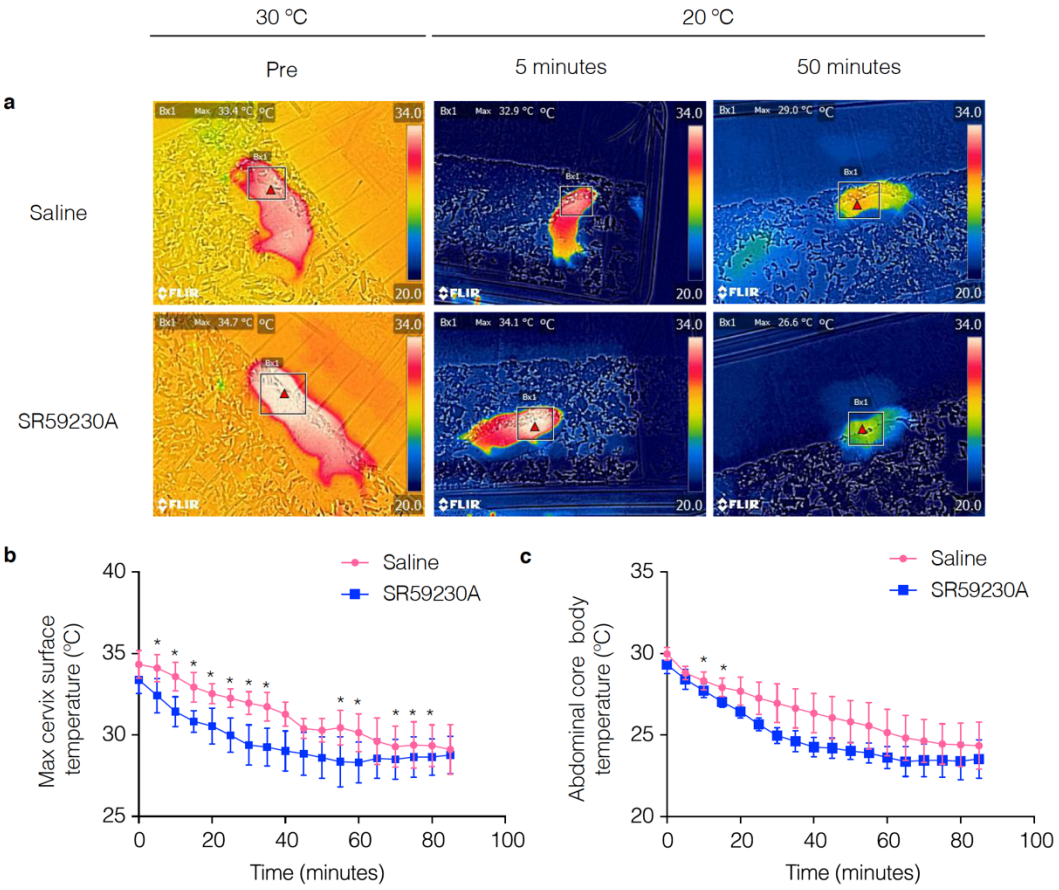


図 11　寒冷暴露後の NMR の頸部最大体表温度と腹腔内温度の変化

(a-c) NMR に, 20 mg/kg の SR59230A もしくは同容量の生理食塩水を腹腔投与し, 室温 30 ± 0.5 ℃ から, 室温 20 ± 0.5 ℃ の環境に移動させた. その後 5 分おきに, データを記録した. (a) サーマルカメラ画像. (b) 頸部最大体表温度の時系列データ （$n = 4$ 個体). (c) 腹腔内テレメトリープローブで計測した腹腔内温度の時系列データ（$n = 3$ 個体). エラーバーは, 平均 ± 標準誤差を示す. 検定は, paired *t*-test で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-2　NMR-BAT の発熱と行動量の評価

3-2-1　NMR の体温と行動量の関係についての評価

4-1 までの結果から, NMR-BAT は熱産生能力を持ち, 寒冷環境における NMR の体温維持にわずかながら影響することが明らかとなった. 一方で, これまで機能解析に用いた NMR-BAT は, 30 度 ± 0.5 ℃の環境で飼育している NMR 由来であるにも関わらず, 活発に熱産生をしていることを示す組織像や遺伝子発現を持っていた. これらのことから, 非寒冷環境においても NMR-BAT の熱産生が何らかの役割を持っているのではないかと考え, 実験を進めた.

動物の体温は, 行動量に影響を与えることが知られている (Bennett and Ruben, 1979; Morgan, 1985). NMR は, 変温性にも関わらず, 野生では地中に数キロメートルにおよぶトンネルでできた巣をつくりその中を高速で移動することが知られている。また, 実験室環境でも非常に活発に活動している. そこで, NMR-BAT の発熱が, NMR の活発な行動能力に影響を与えている可能性を考えた. まず, 体温の変動が NMR の行動にどのような影響を与えるのかを評価するために, 寒冷環境で体温が低下させた場合と非寒冷環境下の場合とで, 行動能力を評価した. その結果, 少なくとも今回の実験では行動量に差は認められなかった (図 12).

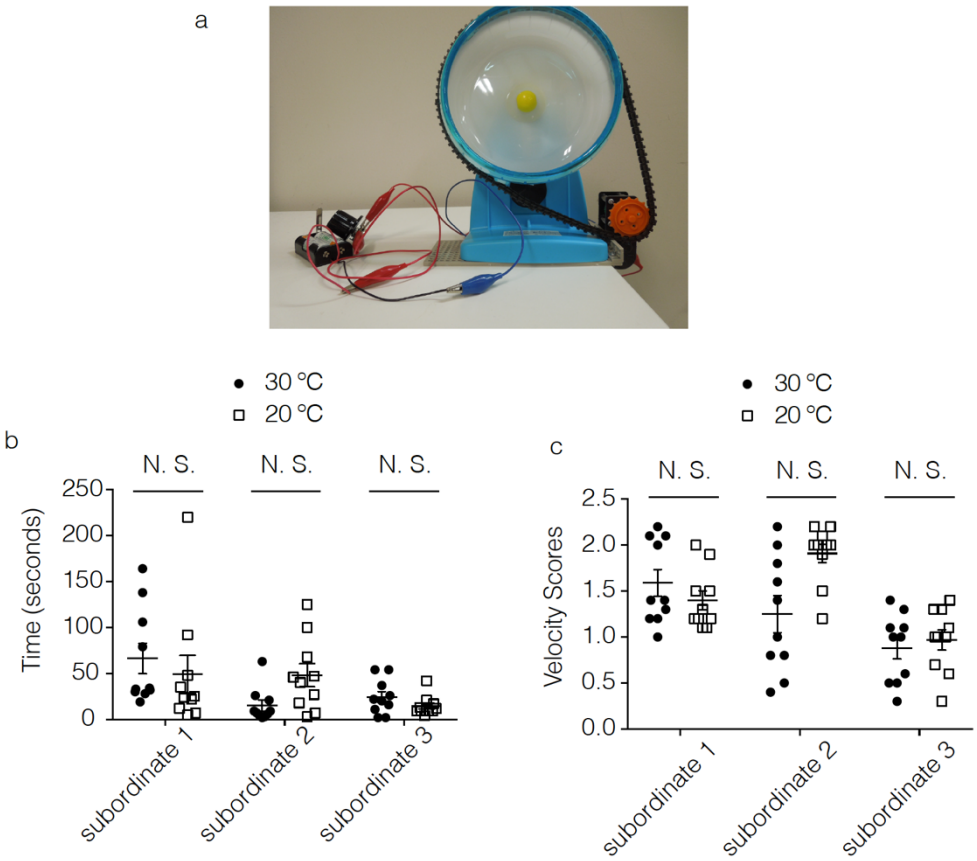


図 12 寒冷環境と非寒冷環境でのホイールランニングテスト

(a-d) 30 ℃ と 20 ℃ の環境で, ホイールランニングテストを実施した. (a) ホイールランニング装置. (b) 10.8 cm/s の一定速度で連続して走った時間. (c) ホイールの回転数を 10 秒ごとに 10.8 cm/s, 13.45 cm/s, 23.55 cm/s へ変更し, velocity score を算出した. (d) 実験前の NMR の体表温度. N.S.は, $p \geqq 0.05$ を示す.

3-3　社会的隔離と, NMR の体温上昇についての評価

3-3-1　社会的隔離は, NMR のクイーンとワーカー特異的に体温上昇を誘導する.

つぎに, NMR の社会性に注目し, 非寒冷環境下での NMR-BAT の役割を検討した. NMR は集団生活を行い, 必要な時には各個体が集まり, 互いに温めあうことで, 体温を維持することが知られている. また, NMR の飼育頭数を減少させると, 個体の酸素消費量が亢進するということも報告されている (Withers and Jarvis, 1980; Yahav and Buffenstein, 1991). そこで, NMR がネストから離れて巣の中で単独行動をする際に, BAT の発熱が起こり体温維持するメカニズムがあるのではないかと仮説を立てた.この検証のため, コロニー内の NMR について, ネストにいる個体と, ネストから離れて単独行動をしている個体の体表温度を測定した. NMR は階級に応じて異なる行動をすることが知られており, ネストから離れる頻度にも差があると考えられている. そこで, 階級ごとの比較も行った (図 13). 結果予想に反して, クイーンとワーカーでは, ネストの外にいる個体の体表温度はネスト内にいる個体と比べて低下していた. 一方で, キングではネスト内外での体表温度に差はみられなかった.

この結果から, コロニー内では体温が低下しても, ネストに戻って体温維持出来るため, NMR はコロニー内で体温が低下しても自発的な熱産生をしないのではないかと考えられた. そこで次に, ネストに戻れない状態になると自発的な熱産生が行われる可能性を検証することにした. コロニーから社会的隔離して強制的に単独にした NMR の体表温度を測定したところ, 興味深いことに, 社会的隔離を行ったクイーンとワーカーでは, コロニー内で単独行動をしている場合と比べて, 有意に体表温度が上昇していた (図 13). 一方で、キングでは社会的隔離による体温上昇は認められなかった。

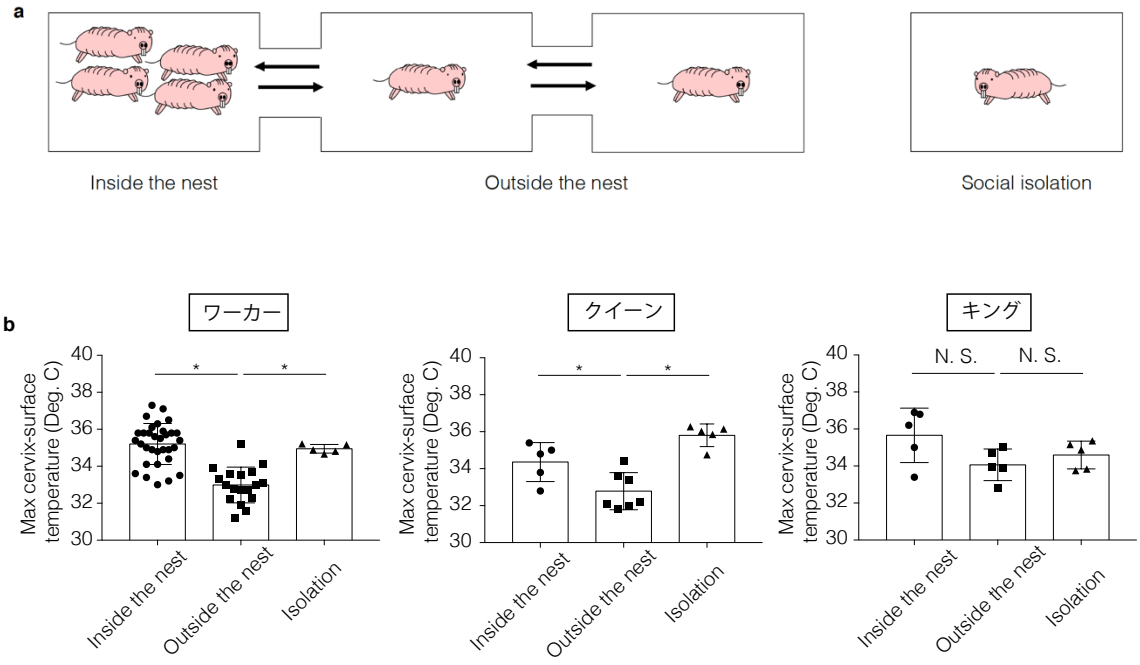


図 13　コロニー内および社会的隔離を行った場合の NMR の体表温度
(a) ネスト内の NMR, ネストの外の NMR, 社会的隔離 (Isolation) を行った NMR の模式図. (b) 各条件で測定した頸部の最大体表温度.　Inside the nest および outside the nest は, 最低 5 個体以上を記録した. 社会的隔離は, 8 時間の隔離を行い, その間 30 分ごとに体表温度を記録し, 平均値をプロットした. 社会的隔離は, 5 個体で行った. エラーバーは, 平均 ± 標準偏差を示す. 検定は, ANOVA とテューキーの範囲検定で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す. N.S.は, $p \geqq 0.05$ を示す.

3-3-2　社会的隔離を行った場合の NMR の体温上昇は，体重，年齢，性別には相関しない

社会的隔離を行った場合の体温について，階級間で比較を行ったところ，NMR のクイーンでワーカーと比べて有意に体温が高かった (図 14). コロニー内では，クイーンは他の個体に比べて，年齢が高く体サイズも大きい場合が多い. そこで，体重，年齢，性別といった階級以外の要因によって，社会的隔離時の体温上昇が影響を受けるかを評価した. 様々な体重，年齢のワーカーを用いて社会的隔離実験を行ったが，社会的隔離時の体温上昇と，体重や年齢には，むしろ弱い負の相関がみられた. また，性別に関しては体温上昇に有意な差はみられなかった (図 15).

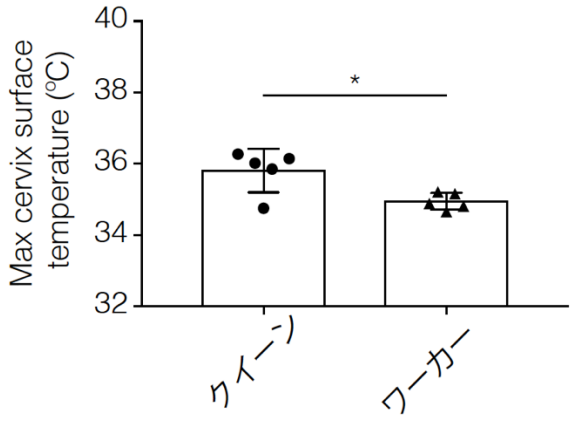


図 14　社会的隔離時のクイーンとワーカーの頸部最大体表温度の比較
図 13 のデータを利用し, 階級間の比較を行った. エラーバーは, 平均 ± 標準偏差を示す. 検定は, unpaired *t*-test で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

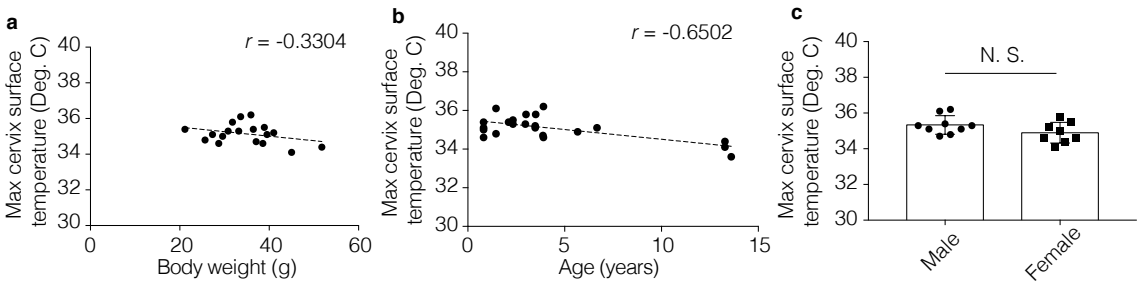


図 15 社会的隔離時の体温と体重, 年齢, 性別の関係

ワーカーに社会的隔離を行った後の体表温度をサーマルカメラで撮影し、その個体の 体重（a）, 年齢（b）, 性別（c）と関連付けてプロットを行った. *r* は相関係数を表す. 性別のデータは, unpaired *t*-test で検定した. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-3-3　社会的隔離は, NMR のワーカーの酸素消費量を亢進させる.

次に, 社会的隔離による体表温度の上昇が, 酸素消費量の亢進を伴うものであるのかを評価した. そのために NMR のワーカーを単独もしくは集団で代謝ケージに入れ, 隔離後の酸素消費量を測定した. その結果, 社会的隔離を行った場合には, 非寒冷環境下で個体の酸素消費量が亢進することが分かった (図 16).

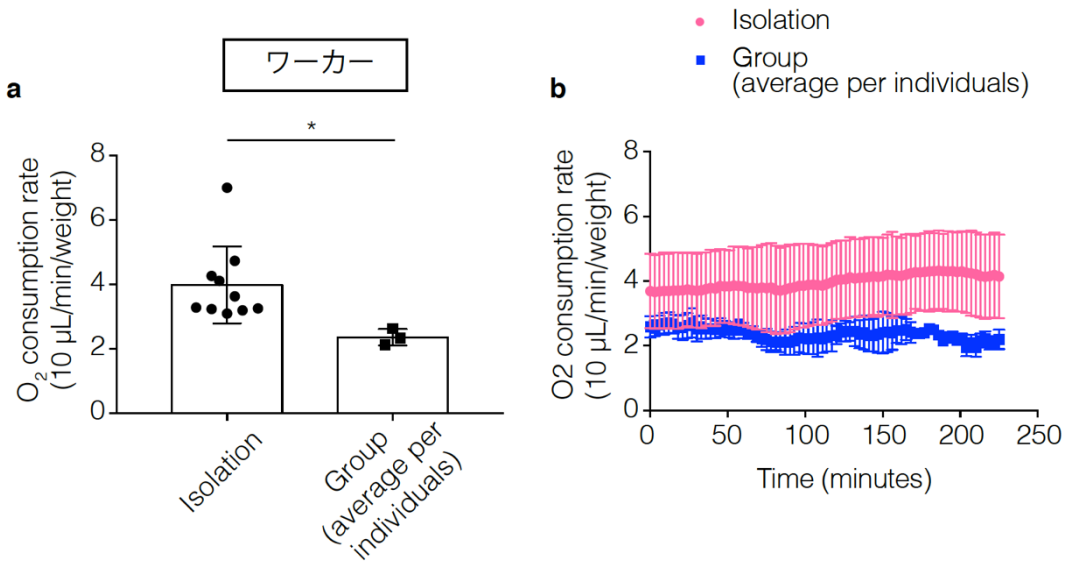


図 16　社会的隔離条件と，集団条件でのワーカーの酸素消費量の測定

(a, b) ワーカーを単独あるいは集団で，代謝ケージに NMR を入れて，酸素消費量を測定した．単独 (Isolation) は，$n = 10$ 個体，集団 (roup) は，$n = 3$ groups を測定した．集団は，4 から 5 匹の NMR を同じケージに入れて測定し，一個体あたりの平均の酸素消費量を算出した．代謝ケージに NMR を入れてから，2 時間経過したのちにデータの取得を開始し，そこから 4 時間データを記録した．(a) 4 時間の平均酸素消費量の比較．(b) タイムコースの比較．エラーバーは，平均 ± 標準偏差を示す．検定は，paired *t*-test で行った．アスタリスクは，$p < 0.05$ を示す．

3-4　社会的隔離による体温上昇と，褐色脂肪組織の発熱についての評価

3-4-1　社会的隔離は, NMR のクイーンにおいて，褐色脂肪組織の発熱を誘導する.

社会的隔離による体温上昇が褐色脂肪組織の熱産生によるものかを明らかにするために, 隔離した時の体温上昇が, SR59230A 投与によって抑制されるかを検討した. 社会的隔離による体温上昇が他の階級より強くみられるクイーンで実験を行った結果, 隔離を行った時の高体温は, SR59230A 投与によって低下することが明らかとなり, 体温上昇は BAT の発熱に依存することが示唆された (図 17).

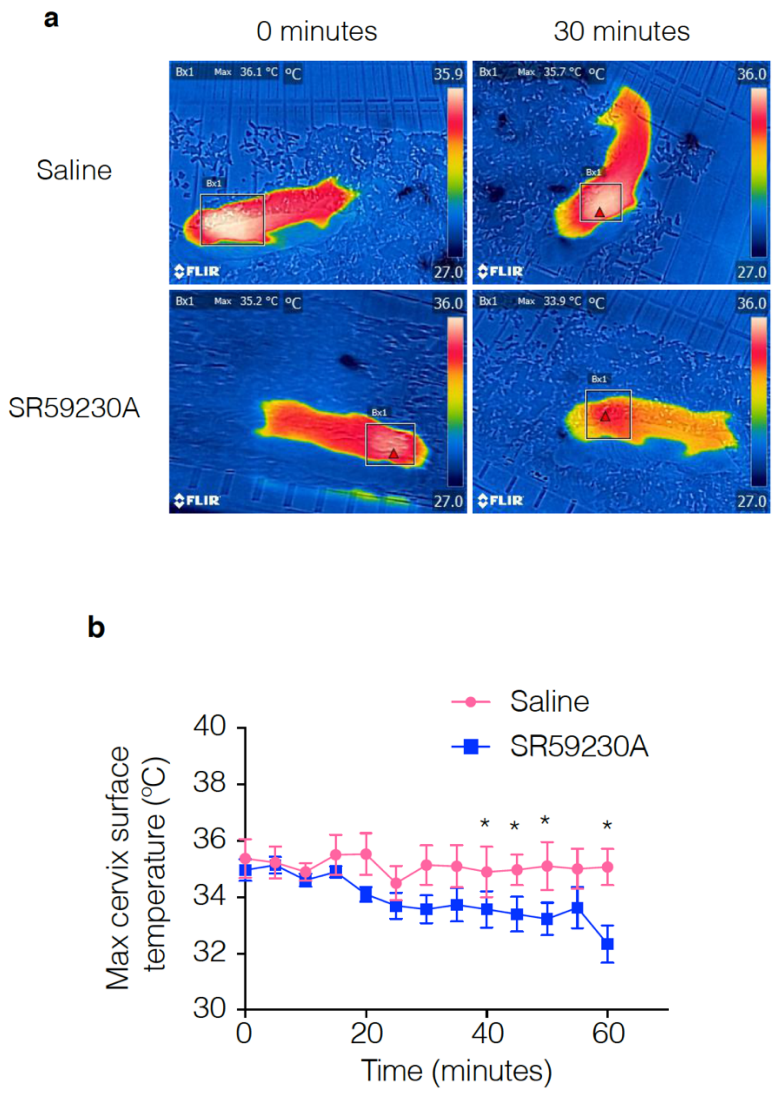


図 17　SR59230A による社会的隔離時のクイーンの体温上昇の抑制

(a, b) 社会的隔離を行い，体表温度が安定した後に, 20 mg /kg の SR59230A もしくは同容量の生理食塩水を腹腔投与し，その後の頸部の最大体表温度を測定した ($n = 3$ 個体). (a) サーマルカメラ画像. (b) 頸部最大体表温度の時系列データ. エラーバーは，平均 ± 標準誤差を示す．検定は, paired t-test で行った．アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-4-2　社会的隔離は, NMR のクイーンにおいて, 尿中コルチゾールを増加させる.

次に, 社会的隔離がどのようなメカニズムで, クイーンの BAT を活性化させるのかを検討した. これまでに外敵への遭遇や社会的敗北など心理的なストレスが, BAT の活性化を誘導することが知られている (Kataoka et al., 2014; Mohammed et al., 2014; Zhang et al., 2010). クイーンがストレスを受けているかを?明らかにするため, 社会的隔離によるストレスの有無を評価した. 指標として, ストレスホルモンであるコルチゾールの尿中量を比較した (Sheriff et al., 2011). コロニー内にいる場合と, 社会的隔離を行った場合のクイーンの尿を回収し, ELISA により, 尿中コルチゾールの量を測定したところ, 社会的隔離によってコルチゾールの量が増加していた (図 18). この結果から, 社会的隔離はクイーンにとってストレス刺激となっている可能性が考えられた.

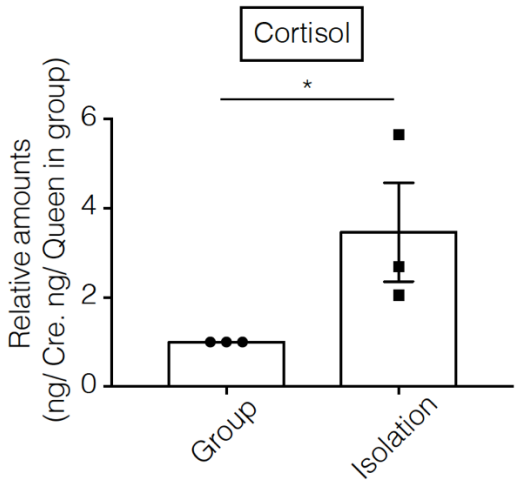


図 18　コロニー内および社会的隔離を行った場合のクイーンの尿中コルチゾールの量

コロニー内にいるクイーンから回収した尿と，社会的隔離を行ったクイーンの尿とを回収し，それぞれのコルチゾール濃度及びクレアチニン濃度（内部標準として用いた）を ELISA によって定量した．得られた値は，コロニー内にいるときのコルチゾール量で補正した．（$n = 3$ 個体）平均 ± 標準誤差を示す．検定は，paired *t*-test で行った．アスタリスクは，$p < 0.05$ を示す．

3-4-3　ネスト内，ネスト外，社会的隔離時のケージの各温度

社会的隔離に用いたケージの温度が，コロニー内と比較して低温になっている可能性を検討した．コロニー内のネストおよびネストから離れた各地点と，社会的隔離に用いたケージの底面から 30 cm 程度上部に水銀温度計を設置し，温度を記録した (図 19)．その結果，コロニー内ではネストから離れるほど温度が低下する傾向が見られたが，これらの地点と社会的隔離に用いたチャンバーで温度に有意な差は認められなかった．すなわち，社会的隔離の環境がコロニー内に比べて寒冷であるため BAT の発熱が生じたという可能性は否定された．

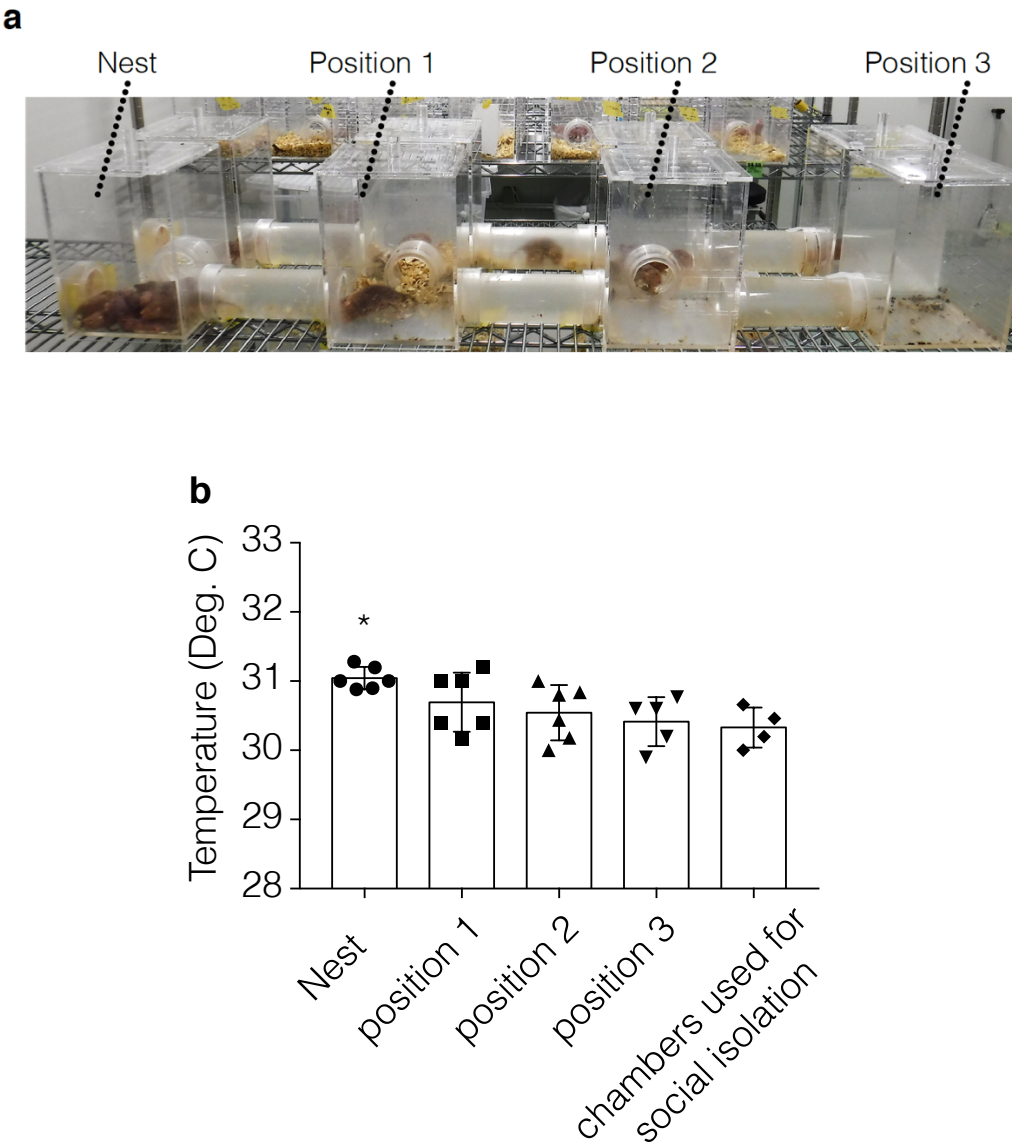


図 19　ネスト内, ネスト外, 社会的隔離時のケージの各温度

(a, b) コロニーの各地点と社会的隔離を行う際に使用したケージ内の温度を水銀温度計で測定. (a) 温度を計測したネストおよびネスト外の各地点の位置関係. (b) 各所での温度. 5 個のコロニーおよび 4 個の社会滴隔離を行う際に使用したケージで測定した. 平均 ± 標準偏差を示す. 検定は, ANOVA と, chambers used for social isolation を基準として, ダネットの *t* 検定で行った. アスタリスクは, $p < 0.05$ を示す.

3-4-4　社会的隔離は NMR のワーカーにおいて，褐色脂肪組織の発熱を誘導せず，尿中コルチゾールの量も増加させない.

社会的隔離を行った場合，クイーンの方がワーカーより体表温度が高いが，ワーカーでも体温上昇は認められる．そこでワーカーにおいても，社会的隔離と BAT の関係についての評価を行った．結果として，ワーカーにおいては，社会的隔離時の体温上昇は SR59230A によって，抑制されなかった (図 20)．また，尿中コルチゾールの上昇も認められなかった (図 21)．これらのことから、ワーカーの社会的隔離時の発熱は BAT 非依存的であると考えられた.

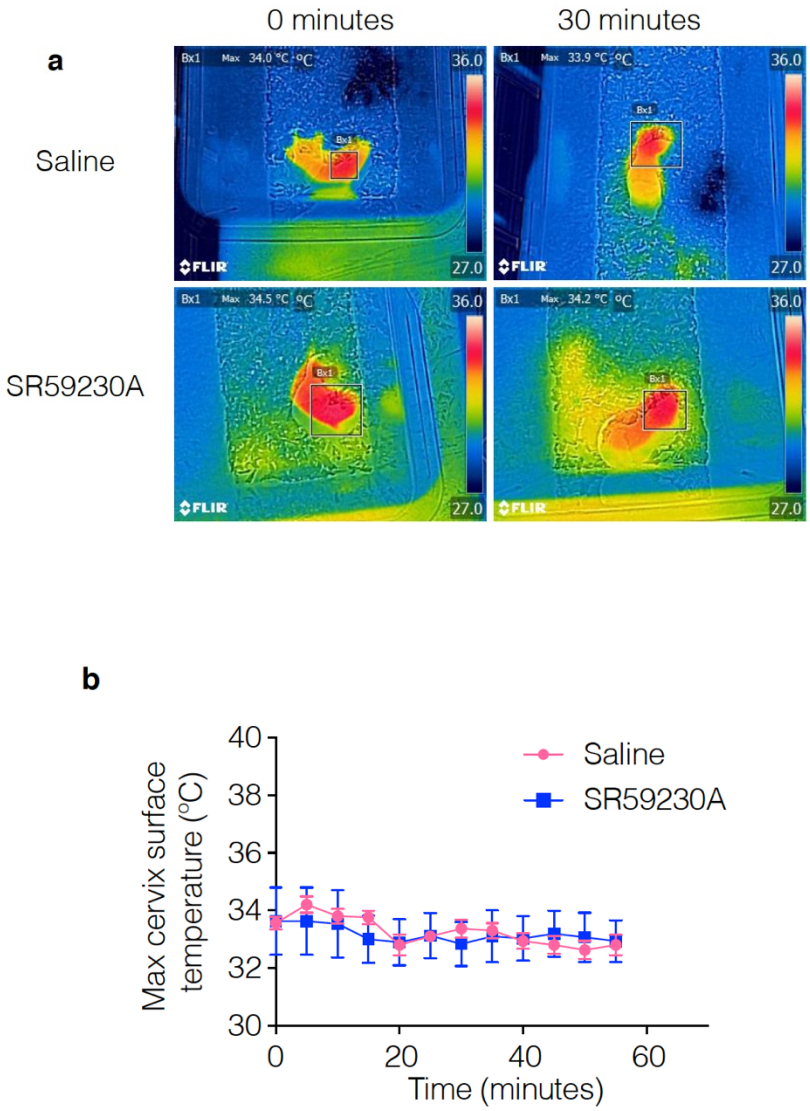


図 20　SR59230A による社会的隔離時のワーカーの体温上昇への影響

(a, b) 社会的隔離を行い，体表温度が安定した後に，20mg /kg の SR59230A もしくは同容量の生理食塩水を腹腔投与し，その後の頸部の最大体表温度を測定した ($n = 3$ 個体). (a) サーマルカメラ画像. (b) 時系列データ．エラーバーは，平均 ± 標準誤差を示す．検定は，paired t-test で行った．アスタリスクは，$p < 0.05$ を示す.

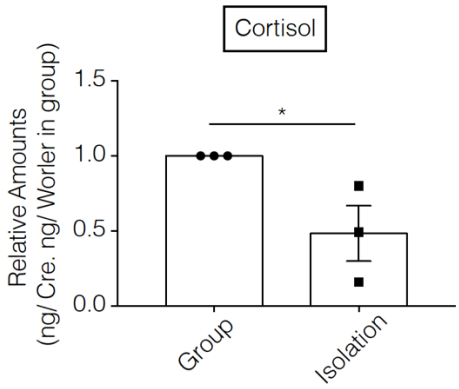


図 21　コロニー内および社会的隔離を行った場合のワーカーの尿中コルチゾールの量

コロニー内にいるワーカーから回収した尿と，社会的隔離を行ったワーカーの尿とを回収して，それぞれのコルチゾール濃度を及びクレアチニン濃度（内部標準として用いた）を ELISA によって定量した.得られた値は，コロニー内にいるときのコルチゾール量で補正した．（$n = 3$ 個体）平均 ± 標準誤差を示す．検定は，paired t-test で行った．アスタリスクは，$p < 0.05$ を示す．

4. 考察

本研究で, NMR-BAT は非ふるえ熱産生能力を有しており, 寒冷環境における初期の体温低下の抑制に寄与していることが明らかになった. さらに, NMR のクイーンとワーカーが社会的隔離時に代謝を亢進させる性質を有すること, 特にクイーンにおいて, 代謝亢進に BAT の活性化が寄与することを明らかにした. これまでに数週間にわたる長期の社会的隔離が, BAT の量や代謝を変化させるという報告はあるものの, 本研究の様な短期間の社会的隔離によって, BAT の非ふるえ熱産生が誘導されるという例は, 私が知る限りではこれまでに報告がない.

NMR は, 哺乳類では珍しい変温性であり, ネストに集まることにより体温調節を行う習性を持つ. NMR の変温性は, 暖かく比較的安定した地下の環境に集団で生活するにあたり, 密集することで高体温になりすぎるのを防ぐことに寄与していると考えられている (Sedláček, 2007). 本研究では, クイーンやワーカーが社会的隔離を受けると体温を上昇させる一方で, コロニー内で単独でいる場合には体温上昇が起きないことを示した. このことは, NMR が社会的隔離によって, 行動による体温調節に依存する低代謝状態から, 自発的に活発な熱産生を行う高代謝状態へと変化していることを表していると考えられる. また本研究では, クイーンやワーカーと異なり, キングにおいて社会的隔離に伴う体温上昇は認められなかった. コロニー内で, キングはネストやネストの周囲にいる頻度が高い一方, ワーカーはネスト外にでて, 巣を拡張するための穴掘り行動や, 食料の運搬を行う. また, クイーンはコロニー内を見回り, 怠けているワーカーを小突くなど, 階級間で行動に差異があることが知られている (Reeve, 1992). 本研究でみられた社会的隔離に対する応答性の違いは, コロニー内における各階級の役割, 行動性の違いが寄与している可能性が考えられる.

NMR には, これまで記述した階級のほかディスパーサーと呼ばれる特殊な個体の存在も知られている (O'Riain et al., 1996). ディスパーサーは新たなコロニーを作ろうとする階級であり, コロニーの外に出ていく頻度が高く, また他の個体よりも移動する距離が多いことが知られている. 興味深いことに, ディスパーサーは頸部周囲を含めた全身の脂肪が増加することが知られており, ディスパーサーにおける BAT の役割についても, 今後の解析が待たれる.

本研究での社会的隔離では，クイーンにおいてのみストレスホルモンであるコルチゾールが増加した．このことは，クイーンがワーカーと比較して心理的ストレスに対する感受性が高い可能性を示している．とくに，他の個体の働きによってコロニーを維持しているクイーンにとって，社会的隔離はより重大なストレス刺激であることが推測される. NMR の階級と心理的ストレスの関係性については，さらなる解析が必要である．また，社会的隔離による体温上昇はクイーンでより強く見られた．この理由としては，ストレス応答の相違のほか，BAT の量や発熱能力が異なる可能性も考えられる．しかし，クイーンの個体数が限られているため，本研究ではクイーンを殺す必要のある実験は行えなかった．クイーンの BAT の性状がワーカーと異なるかどうかについては，今後の研究の課題である．

クイーンのみで認められた社会的隔離による BAT を介した体温上昇は，生理学的にどのような意味を持つのであろうか．哺乳類の体温維持は妊娠，繁殖とも深く関わることが知られ，多くの哺乳類では，過度な高体温や低体温は，性周期や妊娠の維持に悪影響を及ぼす (Fernandez-Cano, 1958). NMR においても，妊娠期や授乳期において，クイーンが高体温になることが報告されている (Urison and Buffenstein, 1995)．そのため，本研究から明らかとなった，社会的隔離による BAT の発熱は，コロニーから離れた環境下でも，クイーンが繁殖能力を維持するために必要な機構である可能性が考えられる．興味深いことに，恒温機能があまり発達していない動物であるヒメハリテンレック (the lesser hedgehog tenrec , *Echinops telfairi*) では，妊娠期特異的に持続的な恒温状態になることが知られている (Oelkrug et al., 2013)．さらにヒメハリテンレックは，腹腔内にも BAT を持つことから，直接的な証拠は得られていないが, BAT の発熱が妊娠期のメスの恒温性に寄与している可能性が示唆されている (Oelkrug et al., 2013). また, BAT による非ふるえ熱産生とは独立の機構であると考えられているものの，ヒメハリテンレックや NMR のように恒温機能があまり発達していないノドチャナマケモノ (the brown-throated sloth, *Bradypus variegatus*) でも，妊娠期に恒温機能が高まることが報告されている (Gaudry et al., 2017; Morrison, 1945)．これらの先行研究や本研究の結果から，メスの繁殖個体における体温維持機構の重要性が推測され，哺乳類における変温性の獲得との共進化メカニズムに関して，今後の研究の課題となることが考えられる．

体温と行動量には重要な関わりがあることから (Bennett and Ruben, 1979; Morgan, 1985), BAT の熱産生が NMR の行動量に影響を与えるという可能性を想定し, 本研究ではまず, 異なる体温での NMR の行動量をホイールランニング試験によって評価した. 結果としては,本研究で行った実験において, 寒冷環境下と比べて、非寒冷環境下での運動能力の有意な上昇は認められなかった。一方, 先行研究では, 寒冷環境下での NMR の行動量は低下することが指摘されており (Buffenstein and Yahav, 1991), そのことを考慮すると, 今回の実験系がうまく立てられていなかった可能性も考えられる. 通常このような行動実験では, データの取得前に動物に対して十分な教育を行う必要があるが, 本研究ではそのような教育を十分に行っていなかった. そのため, 非寒冷環境下で運動能力の有意な上昇が認められなかった可能性が考えられる. 今後, 本実験系の改善および異なる行動解析手法により, NMR の体温と行動量の関わり, ひいては NMR の BAT と行動の関係が明らかになる可能性は十分にあると考える.

BAT の非ふるえ熱産生は, 体温維持だけでなく, 脂質や糖の代謝にも重要な役割を果たしている (Bartelt et al., 2011; Rosen and Spiegelman, 2006; Thomou et al., 2017). NMR は際立った長寿命や, 悪性腫瘍の発生が極めて少ない動物としても知られているが (Buffenstein, 2008), NMR のこれらのフェノタイプと BAT の関わりについての解明も今後の課題として研究を続けていきたい.

5. 総括および結論

- NMR-BAT は, アドレナリンβ3 受容体依存的な熱産生能力を有する.
- NMR-BAT は, 寒冷環境下で初期の体温低下の抑制に寄与する.
- 社会的隔離は, NMR のワーカーとクイーンの体温を上昇させる.
- 社会的隔離は, NMR クイーンにおいて, BAT の熱産生依存的に体温を上昇させる.

本研究では, 変温性齧歯類 NMR をモデルに, 非恒温性哺乳類における BAT の機能や役割を解析した. その結果, NMR-BAT は非ふるえ熱産生能力を有しており, 寒冷環境において NMR-BAT の熱産生は, 初期の体温低下の抑制に寄与していることが明らかになった. さらに寒冷環境以外での役割として, NMR は, 社会的隔離時に代謝を亢進させ, 特にクイーンにおいて, BAT の熱産生が代謝亢進に寄与することを明らかにした. 非恒温哺乳類における BAT の役割を直接的に明らかにしたのは, 本研究が初めてである. また, 社会的隔離によって直ちに BAT の熱産生が誘導されるという報告はこれまでに他の哺乳類で全く報告されておらず, BAT 研究全般としても新規性が高い知見であると考えられる. 今後, NMR および他の非恒温性哺乳類の BAT についても研究を進めることで, 恒温性哺乳類だけをみていたのでは分からなかった, これまでに知られていない BAT の新たな役割が更に明らかになる可能性が考えられる.

6. 謝辞

本研究の実施にあたり, 北海道大学で博士課程の大学院生として, 研究に取り組む機会を与えてくださいました, 遺伝子病制御研究所免疫生物分野・清野研一郎教授に心より御礼を申し上げます.

褐色脂肪組織の解析方法や, 解析機器の利用, またご助言を快くしてくださいました, 北海道大学大学院獣医学研究科獣医生化学教室の岡松優子准教授ならびに木村和弘教授に, 心より感謝を致します.

褐色脂肪組織の遺伝子発現解析のため, 実験の相談や実施, ならびに解析機器を快くお貸してくださいました慶應大学医学部生理学教室, 岡野栄之教授, 神山淳准教授, 古家育子氏に心より御礼を申し上げます. また, 遺伝子発現データの解析に際して, 丁寧なご指導を賜りました, ライフサイエンス統合データベースセンター, 坊農秀政特任准教授に心より感謝を申し上げます.

PET-CT の実施に際して, 快くご指導とご協力を頂きました, 北海道大学アイソトープ総合センター, 久下裕司教授, 東川桂助教, 北海道大学大学院獣医学研究院応用獣医科学分野放射線学教室安井博信准教授, 熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学分野の岡香織博士に, 厚く御礼を申し上げます.

尿中の ELISA の実験に関しまして, ご助言をいただきました麻布大学獣医学部伴侶動物学研究室の度会晃行氏に, 心より御礼を申し上げます.

研究結果のディスカッションや, 研究の進め方などに助言を頂きました岩手医科大学いわて東北メディカル・メガバンク機構生体情報解析部門・清水篤志特命教授に, 慶應大学医学部医化学教室, 杉浦悠毅講師に心より感謝致します.

最後に, 本研究全般にわたり助言をしてくださいました, 熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学分野の三浦恭子准教授, 河村佳見助教に感謝致します. また, 研究に対する助言や, 励ましの言葉によって研究生活を後押ししてくださいました, 熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学分野のメンバー全員, そして家族に, 心より感謝を致します.

7. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない.

8. 引用文献

Aquila, H., Link, T.A., and Klingenberg, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. EMBO J. *4*, 2369–2376.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Nat. Med. *17*, 200–205.

Bennett, A.F., and Ruben, J.A. (1979). Endothermy and activity in vertebrates. Science. *206*, 649–654.

Buffenstein, R. (2008). Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: Insights from a successfully aging species. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. *178*, 439–445.

Buffenstein, R., and Yahav, S. (1991). Is the naked mole-rat Hererocephalus glaber an endothermic yet poikilothermic mammal? J. Therm. Biol. *16*, 227–232.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. *84*, 277–359.

Cinti, S. (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. *16*, 569–574.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N. Engl. J. Med. *360*, 1509–1517.

Daly, T.J., Williams, L.A., and Buffenstein, R. (1997). Catecholaminergic innervation of interscapular brown adipose tissue in the naked mole-rat (Heterocephalus glaber). J Anat *190 (Pt 3)*, 321–326.

Fernandez-Cano, L. (1958). Effect of Increase or Decrease of Body Temperature and Hypoxia on Pregnancy in the Rat. Fertil. Steril. *9*, 455–459.

Gaudry, M.J., Jastroch, M., Treberg, J.R., Hofreiter, M., Paijmans, J.L.A., Starrett, J., Wales, N., Signore, A. V., Springer, M.S., and Campbell, K.L. (2017). Inactivation of thermogenic UCP1 as a historical contingency in multiple placental mammal clades. Sci. Adv. *3*, e1602878.

Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat. Med. *19*, 1252–1263.
Hislop, M.S., and Buffenstein, R. (1994). Noradrenaline induces nonshivering thermogenesis in both the naked mole-rat (Heterocephalus glaber) and the Damara mole-rat (Cryptomys damarensis) despite very different modes of thermoregulation. J. Therm. Biol. *19*, 25–32.
Jarvis, J. (1981). Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. Science. *212*, 571–573.
Jarvis, J.U.M., and Bennett, N.C. (1991). Ecology and Behavior of the Family Bathyergidae. In The Biology of the Naked Mole-Rat, pp. 66–96.
Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Daugaard, S., Homøe, P., Loft, A., De Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., et al. (2013). A classical brown adipose tissue mrna signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. Cell Metab. *17*, 798–805.
de Jong, J.M.A., Larsson, O., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *308*, E1085-105.
Kataoka, N., Hioki, H., Kaneko, T., and Nakamura, K. (2014). Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. Cell Metab. *20*, 346–358.
Kim, E.B., Fang, X., Fushan, A.A., Huang, Z., Lobanov, A. V., Han, L., Marino, S.M., Sun, X., Turanov, A.A., Yang, P., et al. (2011). Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. Nature *479*, 223–227.
Krueger, F. (2016). Trim Galore.
Li, B., and Dewey, C.N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics *12*, 323.
Mohammed, M., Ootsuka, Y., and Blessing, W. (2014). Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat. Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. *306*, R394-400.
Morgan, K.R. (1985). Body temperature regulation and terrestrial activity in the ectothermic beetle Cicindela tranquebarica. Physiol. Zool.
Morrison, P.R. (1945). Acquired Homiothermism in the Pregnant Sloth. J. Mammal. *26*, 272–275.

Narayanan, S., and Appleton, H.D. (1980). Creatinine: A Review. CLINICALCHEMISTRY *26*, 1119–1126.

O'Riain, M.J., Jarvis, J.U.M., and Faulkes, C.G. (1996). A dispersive morph in the naked mole-rat. Nature *380*, 619–621.

Oelkrug, R., Goetze, N., Exner, C., Lee, Y., Ganjam, G.K., Kutschke, M., Müller, S., Stöhr, S., Tschöp, M.H., Crichton, P.G., et al. (2013). Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution. Nat. Commun. *4*, 2140.

Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K., and Saito, M. (2008). Role of uncoupling protein 1 in the anti-obesity effect of β3-adrenergic agonist in the dog. Res. Vet. Sci. *85*, 214–219.

Reeve, H.K. (1992). Queen activation of lazy workers in colonies of the eusocial naked mole-rat. Nature *358*, 147–149.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. Nature *444*, 847–853.

Rothwell, N.J. (1997). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. Obes. Res. *5*, 650–656.

Sedláček, F. (2007). New Data on Metabolic Parameters in Subterranean Rodents. In Subterranean Rodents, pp. 35–47.

Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., and Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. Oecologia *166*, 869–887.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.H., et al. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. J. Clin. Invest. *123*, 215–223.

Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K., et al. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. Nature *542*, 450–455.

Tripathi, S., Pohl, M.O., Zhou, Y., Rodriguez-Frandsen, A., Wang, G., Stein, D.A., Moulton, H.M., Dejesus, P., Che, J., Mulder, L.C.F., et al. (2015). Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "oMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. Cell Host Microbe *18*, 723–735.

Urison, N., and Buffenstein, R. (1995). Metabolic and body temperature changes during pregnancy and lactation in the naked mole rat (Heterocephalus glaber). Physiol. Zool. *68*, 402–420.

Watarai, A., Arai, N., Miyawaki, S., Okano, H., Miura, K., Mogi, K., and Kikusui, T. (2018). Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen's feces. Proc. Natl. Acad. Sci. *115*, 9264–9269.

Withers, P.C., and Jarvis, J.U.M. (1980). The effect of huddling on thermoregulation and oxygen consumption for the naked mole-rat. Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol. *66*, 215–219.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell *150*, 366–376.

Yahav, S., and Buffenstein, R. (1991). Huddling Behavior Facilitates Homeothermy in the Naked Mole Rat Heterocephalus-Glaber. Physiol. Zool. *64*, 871–884.

Yoo, H.S., Qiao, L., Bosco, C., Leong, L.H., Lytle, N., Feng, G.S., Chi, N.W., and Shao, J. (2014). Intermittent cold exposure enhances fat accumulation in mice. PLoS One *9*, e96432.

Zhang, W., Sunanaga, J., Takahashi, Y., Mori, T., Sakurai, T., Kanmura, Y., and Kuwaki, T. (2010). Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. J. Physiol. *588*, 4117–4129.

Zhou, P., Robles-Murguia, M., Mathew, D., and Duffield, G.E. (2016). Impaired thermogenesis and a molecular signature for brown adipose tissue in Id2 null mice. J. Diabetes Res. *2016*, 6785948.