

学位申請論文

カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモデリングと その新規制御メカニズム

平成 30 年 3 月
成田 匠

論文の要約

平成 28 年現在、日本の総人口に対する高齢者の割合は 27.3%であり、すでに超高齢社会を迎えている。また、平成 27 年現在で世界の総人口に対する高齢者の割合は 8.3%であるが、平成 72 年には 18.1%になると予測され、今後半世紀の間に世界規模で高齢化が急速に進展する。日本の平均寿命と健康寿命の差は、平成 22 年で、男性 9.13 年、女性 12.68 年であるが、急速に進む高齢化に対して平均寿命と健康寿命の差は縮まらず、これを改善することは喫緊の課題となっている。これらの問題を解決するために、「老化・寿命」を制御するメカニズムを解明して、その知見を基盤に老化プロセスを薬理的・栄養学的にコントロールする必要がある。このメカニズムを解明するべく注目されているのが、老化研究における中心的な科学モデルであるカロリー制限 (CR; caloric restriction) に関する研究である。

CR とは生存に必要な栄養素を与えたうえで、継続的に総摂取カロリーを適度に制限する方法である。齧歯類などの実験動物においては、摂取カロリーを自由摂食 (AL; *ad libitum*) 群の 60~70%程度に制限することが多い。CR による寿命延伸効果は酵母や線虫から齧歯類を中心とした哺乳類に至るまで幅広い生物種において観察されるので、CR によって活性化される種を超えた普遍的な寿命制御シグナルの存在が示唆される。

CR は、成長ホルモン (GH; growth hormone) の分泌や血漿中 GH 濃度、また、GH 刺激により肝臓などから分泌されるインスリン様成長因子 1 (IGF-1; insulin-like growth factor-1) の血漿中濃度を減少させる。しかし、GH/IGF-1 シグナルが抑制されて長寿である Ames 矮小マウスやアンチセンス GH トランスジェニックラットでは、CR によりさらに寿命が延伸する。これらの知見は、CR の寿命延伸効果が GH/IGF-1 依存的なメカニズムによってのみ制御されているわけではなく、GH/IGF-1 非依存的メカニズムによっても制御されている可能性を示唆するものである。また、白色脂肪細胞選択的に、もしくはアディポカイン遺伝子の発現を修飾することにより寿命が延伸しうることが報告されている。それゆえ、白色脂肪組織 (WAT; white adipose tissue) が寿命制御に重要であることが示唆される。そこで、CR による WAT での遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、GH 非依存的に、脂質代謝関連遺伝子、特に sterol regulatory element binding protein-1 (Srebp-1) に転写制御される脂肪酸合成関連遺伝子の発現が上昇することを見出した。

第一章では Srebp-1c knockout (KO) マウスを使用して、CR のメカニズムを解析した。その結果、以下の点を明らかにした。1) CR は Srebp-1c 依存的に寿命を延伸する。2) CR は Srebp-1c 依存的に脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連タンパク質発現を亢進する。3) CR は Srebp-1c 依存的にミトコンドリア生合成制御因子である peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α (Pgc-1 α) 発現を亢進する。4) Srebp-1c が直接的に Pgc-1 α 発現を亢進する。5) CR は Srebp-1c 依存的に酸化ストレスを抑制する。6) CR による2)～5)の変化はおおよそ WAT 選択的に観察される。以上より、Srebp-1c は、WAT において、CR によりミトコンドリア生合成を活性化することでグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させ、効率的なエネルギー代謝を促進することで、低栄養状態に対して適応し、また酸化ストレスを抑制し、さらに寿命を延伸する遺伝子であることが示唆された。

これらの知見をもとに第二章以降は WAT を中心に研究を進めた。昨今、脂肪の貯蔵部位による違いもメタボリックシンドロームのリスクと関係すると考えられている。ヒトでは内臓脂肪が増加する中心性肥満はインスリン抵抗性、2 型糖尿病、脂質異常症やアテローム性動脈硬化症と関連しているが、皮下脂肪の増加による末梢性肥満はインスリン感受性の改善、2 型糖尿病、脂質異常症およびアテローム性動脈硬化のリスク低減に寄与している。そこで第二章では、WAT における CR の代謝リモデリング応答をより正確に理解するために、ラットにおいて後腹膜脂肪組織 (rWAT; retroperitoneal WAT)、精巣周囲脂肪組織 (eWAT; epididymal WAT) および皮下脂肪組織 (sWAT; subcutaneous WAT) での CR に対する応答性を比較した。その結果 WAT の体積・重量・脂肪細胞サイズは CR により rWAT、eWAT、sWAT の順で小さくなった。次に、脂質代謝への CR の効果に焦点を当てて解析したところ、全ての WAT で脂肪酸合成関連因子およびミトコンドリア関連因子の発現が CR により同程度増加した。一方、脂質分解関連因子であるホルモン感受性リパーゼのリン酸化が rWAT と eWAT では CR 群の fed 時に、sWAT では CR 群の fasted 時に亢進した。また、インスリンシグナルの指標となる AKT のリン酸化は CR により sWAT でのみ亢進した。CR による脂質代謝への影響は、sWAT ではインスリンシグナルの寄与が強く、rWAT、eWAT ではレプチンなどインスリン以外のシグナルの寄与が強いことが示唆された。

第三章では、CR の効果における経時的な代謝リモデリングを解明するために、ラットの WAT および肝臓において脂肪酸合成に関連する mRNA およびタンパク質発現を経時的に解析した。その結果、WAT において、*de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA およびタンパク質発現は 3.5 ヶ月齢で顕著に発現が増加した後に 5 ヶ月齢まで減少し、その後 9 ヶ月齢まで増加した。一方で、この変動は肝臓では見られなかったため、CR の脂肪酸合成に関する効果は WAT 特異的であることが強調された。今回のモデルにおいては、CR 期間 2 ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答 (短期 CR)、後半は CR による有益な代謝リモデリング (長期 CR) を示しており、特に *de novo* 脂肪酸合成の活性化は前者がインスリンシグナルの活性化により、後者はレプチンシグナルの抑制

によって支配される可能性が示唆された。

第四章では、CR によるミトコンドリア活性化の制御機構に着目した。酵母におけるカロリー制限の主要因子として発見された *silence information regulator 2 (Sir2)* の哺乳類におけるミトコンドリアオーソログの 1 つである *Sirt3* は、ミトコンドリア局在代謝酵素の活性化や抗酸化因子の活性化、さらに *reactive oxygen species (ROS)* によって生ずる傷害タンパク質の分解などミトコンドリアの機能維持や品質管理に重要な脱アセチル化酵素である。多くのミトコンドリアタンパク質は *mitochondrial signal peptidase (MtSPase)* によって切断されることで活性化型になることが知られている。WAT において、CR により *Sirt3* のタンパク質発現は亢進するが、mRNA 発現は亢進しなかった。我々は WAT 選択的に CR により 37 kDa の前駆型 *Sirt3* タンパク質から 28 kDa の成熟型タンパク質へのプロセッシングが亢進している可能性を発見した。そこで DNA マイクロアレイを用いて CR により発現が増加する *MtSPase* を網羅的に解析したところ、*mitochondrial intermediate peptidase (Mipep)* が CR により発現が増加することを見出した。そこで、*Mipep* mRNA の発現変動を解析したところ、CR により上昇していた。*Mipep* は *mitochondrial matrix processing peptidase (MPP)* により切断されたタンパク質を N 末よりオクタペプチドを切断する酵素である。そこで、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 に *Sirt3* を過剰発現させて *Sirt3* タンパク質のプロセッシングを確認したところ、二段階のプロセッシングにより成熟型タンパク質となり、活性化することが明らかとなった。さらに、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 において shRNA を用いて *Mipep* をノックダウンしたところ、*Mipep* の他の基質タンパク質と同様に成熟型 *Sirt3* タンパク質は減少し、*Sirt3* の標的タンパク質の一つである *manganese superoxide dismutase (MnSOD)* のアセチル化は増加した。また、同時にクエン酸回路の律速酵素である *citrate synthase* 活性も減少した。それゆえ、*Mipep* が *Sirt3* の成熟化および活性化のみならずミトコンドリア活性も制御している可能性が示唆された。

本研究では、CR のメカニズムは WAT 特異的に *Srebp-1c* が脂質代謝を活性化し、*Pgc-1 α* を介してミトコンドリアを活性化すること、これらの代謝リモデリングは CR 期間が少なくとも 3 ヶ月以上を有するということが示唆された。また、WAT の部位によっても CR に対する応答が異なることが示された。さらに、CR は *MIPEP* の発現量を増加させることで *SIRT3* のプロセッシングを亢進し、ミトコンドリア機能向上、代謝改善に寄与していることが示された。