

令和元年5月27日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16144

研究課題名(和文) スフィンゴシン1-リン酸の2型受容体を介する新規肥満・NASH治療の基礎的検討

研究課題名(英文) Fundamental research for novel obesity and NASH treatment through sphingosine 1-phosphate receptor 2

研究代表者

盛重 純一 (Jun-ichi, Morishige)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50423405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多様な機能をもつリゾリン脂質メディエーターのスフィンゴシン1-リン酸(S1P)がその2型受容体(S1P2)を介して肥満に及ぼす影響を調べた。食事誘導性肥満モデルにおいて、S1P2欠損マウスでは精巢上体白色脂肪組織重量が増加し、肝脂肪が減少する傾向を示した。さらにS1P2欠損マウスでは、低温環境下での体温維持能力が低下しており、基礎的なエネルギー消費能力が低下していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでS1Pと肥満およびメタボリックシンドロームについては、脂肪組織や肝臓を標的として脂肪の蓄積や組織の炎症とS1Pとを関連付けした研究が主であった。本研究で得られた研究成果はS1Pがエネルギー消費に直接的、あるいは間接的に関わっていることを示唆しており、この発見はS1P研究に新たな展開をもたらすものである。また、エネルギー消費機構に關与するS1Pシグナル伝達系を標的とした薬物は、新規な肥満症治療薬(エネルギー消費促進薬)として利用でき、加えて既存の肥満症治療薬(エネルギー摂取抑制薬)と併用して使用することでより効果の高い肥満治療法の開発にも繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is bioactive lysophospholipid mediator interacting with five receptors. Here, we investigated the roles of S1P receptor 2 (S1P2) in obesity. S1P2-deficient mice (S1P2 KO) fed high-fat diet showed increased epididymal white adipose tissue weight and decreased liver fat. Moreover, acute cold exposure evoked hypothermia in S1P2 KO mice than in WT mice, showing thermogenic activity is decreased in S1P2 KO mice.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 肥満 脂肪肝 スフィンゴシンキナーゼ 熱産生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、国民の健康、医療の観点から、メタボリックシンドロームに代表される脂質代謝異常の重要性の認識が増大している。カロリーの過剰摂取や運動不足が原因となり、摂取された脂肪や糖質から生成した脂肪は、脂肪細胞に貯蔵され、特に内臓脂肪の蓄積が心血管疾患の発症の基盤となる。また、肥満患者でよく観察される肝細胞への脂肪の過剰な蓄積は、肝臓での炎症や線維化が惹起されやすくなり、最終的には死につながる肝硬変や肝がんに行進する。そのためメタボリックシンドロームの治療では肥満の段階で治療や予防することが重要となる。

研究代表者は、これまで脂肪細胞の過剰な脂肪蓄積を抑制する医薬品の開発を目的として様々な内因性生理活性物質、植物抽出物や薬物の効果を検討しており、その過程で様々な細胞の機能発現に寄与するリゾリン脂質メディエーター、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) の産生酵素 (スフィンゴシンキナーゼ, SphK) および 2 型受容体 (S1P₂) を特異的阻害剤で処理すると脂肪細胞内のトリグリセリド (TG) 量が顕著に増加することを明らかにした。この結果から S1P は S1P₂ を介して脂肪細胞の分化や TG 合成を抑制する調節因子であると考えられたが、その機序は不明であった。また、肥満に伴い発症する肝疾患についても、研究開始当初、S1P は S1P₂ とは別のタイプの S1P 受容体を介して肝脂肪の蓄積や炎症に関連することや S1P₂ を介して薬物で誘導した肝障害後の線維化に関連することが報告されていたが、S1P₂ が肝臓の炎症や線維化に関連するか否かは不明であった。

2. 研究の目的

S1P が S1P₂ を介して脂肪細胞内の TG 蓄積を抑制することを示したこれまでの研究成果は、S1P₂ が肥満の治療標的となる可能性を示唆している。本研究では、S1P₂ を介した肥満制御機構の解析を S1P₂ 欠損マウスを用いて個体レベルで行い、得られた知見に基づき S1P₂ を標的とした治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食負荷による肥満誘導

8 週齢の雄性野生型マウスと S1P₂ 欠損マウスに高脂肪食 (60 kcal% 脂肪含有量, リサーチダイエット) を与えて 12 週間飼育した。この期間中 1 週毎に体重を測定した。高脂肪食負荷 8 週間以降にグルコース負荷試験とインスリン負荷試験を実施した。飼育期間終了後、マウスから白脂肪組織と肝臓を摘出し、qPCR および組織染色を行った。

(2) qPCR

肝臓からの RNA の抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてプロトコールに従って行った。また、脂肪組織からの RNA の抽出は、脂肪組織を Tri Reagent (Molecular Research Center) 中でホモジナイズした後にクロロホルムを加えて相分離させ、上層の水層を RNeasy mini kit に供して RNA を抽出した。RNA を定量後、cDNA を合成 (ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を使用) し、サイバークリーンを用いた qPCR 法により標的遺伝子の mRNA を定量した。データは、 $\Delta\Delta Ct$ 法により内因性コントロール (36B4 または Ppia) に対する mRNA 量を算出し、コントロールに対する % で表示した。

(3) 間質血管細胞群 (SVF) の培養と TG 測定

3 週齢の雄性野生型マウス (C57BL/6) の鼠径部周囲白色脂肪組織から常法に従って SVF を調製し、脂肪細胞への分化誘導用の MDI 培地 (10% ウシ胎児血清 (FBS), 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリンおよび 1 μM デキサメサゾン含有 DMEM) に交換して 2 日間培養した。2 日後、インスリン培地 (10% FBS/10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン含有 DMEM) に交換し、その後は 2 日毎に同培地に交換しながら分化誘導後 8 日目まで培養した。細胞からイソプロパノールを用いて総脂質を抽出し、2.5% AdipoRed 溶液 (Lonza) と混和して溶液の蛍光強度を Fluoroskan Ascent™ FL (Thermo) で測定した (励起波長: 544 nm, 発光波長: 590 nm)。TG 量は、トリオレインを用いて作製した検量線に基づき算出し、タンパク質量で補正した。

(4) 初代培養肝細胞の培養と TG 測定

野生型マウスから調製したマウス初代培養肝細胞に 0.5 mM パルミチン酸/オレイン酸 (1:1) 混合物を添加して培養した。24 時間後、細胞からイソプロパノールを用いて総脂質を抽出し、脂肪細胞と同じ方法で TG 量を測定し、タンパク質量で補正した。

(5) 寒冷刺激と体温測定

10 週齢の雄性の野生型マウスと S1P₂ 欠損マウスを 4°C で 6 時間飼育し、飼育前後の体重および直腸温を測定した。寒冷刺激終了後、直ちにマウスをペントバルビタールで麻酔して心採血し、血漿を調製した。さらに白色脂肪組織 (鼠径部と精巣上体) と褐色脂肪組織を摘出した。

(6) S1P 定量

マウス血漿および褐色脂肪組織のホモジネートに内部標準物質 (C17 S1P) を添加し、Bligh-Dyer 法により脂質を抽出して LC-MS/MS により S1P 量を定量した。C18 S1P 量は、C17 S1P のピークエリア比から算出し、血漿量もしくはタンパク質量で補正した。

(7) 脂肪分解活性測定

マウスの脂肪組織（褐色脂肪組織，鼠径部周囲白色脂肪組織，精巣上体白色脂肪組織）を摘出し，2% BSA/DMEM で2時間培養して培養液中に放出される遊離脂肪酸をラボアッセイ NEFA (WAKO) で定量した。

(8) SphK 活性測定

酵素源には野生型マウスの脂肪組織（褐色脂肪組織，鼠径部周囲白色脂肪組織，精巣上体白色脂肪組織）のライセートを，基質には 1-NBD-スフィンゴシン (Avanti Polar Lipids) を用いた。反応混合液（1 nmol 1-NBD-スフィンゴシン，1 mM ATP，50 mM HEPES (pH 7.4)，15 mM MgCl₂，10 mM KCl，0.005% Triton X-100，ライセート 40 μg protein）を 37 °C で2時間インキュベートした。インキュベート終了後，クロロホルム/メタノール（2:1，v/v）混合液 0.25 mL と 20% アンモニア水 4 μl 加えて相分離し，上層の蛍光強度を Fluoroskan Ascent™ FL (Thermo) で測定した（励起波長：485 nm，発光波長：538 nm）。データは，コントロールの SphK 活性に対する%で表示した。

4. 研究成果

(1) S1P₂ 欠損が肥満に及ぼす影響

以前，マウス由来線維芽細胞株 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導する際に S1P₂ 阻害剤 (JTE-013) を添加すると細胞内 TG が有意に増加すること，JTE-013 に加えてスフィンゴシンキナーゼ阻害剤 (SKI-II) も添加すると更に TG 含量が増加することを見出した。これらの結果から脂肪細胞の脂肪蓄積に対して S1P₂ は抑制的に作用していると考えられたため，次に肥満における S1P₂ の作用を S1P₂ 欠損マウスを用いて個体レベルで解析した。S1P₂ 欠損マウスを高脂肪食負荷で肥満誘導した結果，摂餌量，体重増加量，血糖値，インスリン抵抗性および耐糖能については野生型マウスと S1P₂ 欠損マウスとで有意な差は認められなかったが，精巣上体白色脂肪組織については S1P₂ 欠損マウスの方が重い傾向を示した (WT: 1.88 ± 0.42 g, S1P₂ KO: 2.21 ± 0.55 g, *p*=0.091)。この白色脂肪組織重量の増加についてマウス白色脂肪細胞から調製した SVF を用いて *in vitro* 系でも確認したところ，S1P₂ を JTE-013 で阻害すると 3T3-L1 細胞と同様に細胞内 TG 量が約 4 倍に増加した (図 1A)。一方，SVF を S1P₂ 刺激薬 (CYM5520) と共培養して分化誘導したところ，CYM5520 の用量依存的に細胞内 TG 量が低下した (図 1B)。これらの結果より，予想通り白色脂肪細胞の脂肪蓄積に対して S1P₂ は抑制的に作用していることが示唆された。

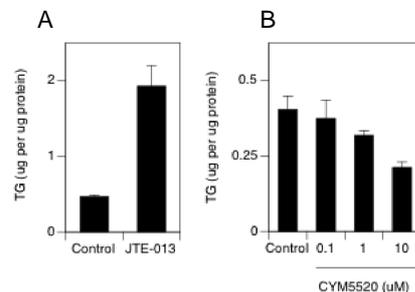


図1. S1P₂ は分化させたSVFのTG量を調節する

また，組織学的に S1P₂ 欠損マウスでは脂肪肝の程度が低い傾向にあり (図 2A)，肝臓 TG 量も S1P₂ 欠損マウスの方が低値を示した (WT: 92.1 μg TG/mg liver, S1P₂ KO 54.2 μg TG/mg liver)。肝脂肪の蓄積について，マウス肝臓の初代培養肝細胞に外因的に遊離脂肪酸（パルミチン酸とオレイン酸混合物）を添加して TG の増加量を比較したところ，JTE-013 処理細胞の方が低値であった (図 2B)。以上より，S1P₂ は食事誘導性肥満において体重増加等に与える影響は小さいものの，白色脂肪組織では脂肪蓄積を抑制，肝臓では促進させる作用をもつことが示唆された。

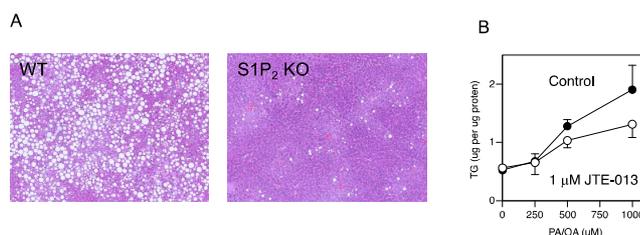


図2. 肥満誘導した S1P₂ 欠損マウスでは肝臓の脂肪蓄積が弱い (A)。また，*in vitro* 系でも S1P₂ 阻害により TG 量が低下する (B)。

(2) S1P₂ を介する熱産生機構の解析

食事誘発性肥満モデル実験において，S1P₂ 欠損マウスと野生型マウスとでは体重増加量や摂餌量など多くの試験項目で有意な差はなかったが，S1P₂ 欠損マウスの中には体重が著しく増加する個体が何匹か確認された。この結果を受け，S1P₂ 欠損マウスでは基礎的なエネルギー消費量が低下しているのではと考え，エネルギー消費機構についても検討した。その結果，脂肪エネルギーを熱として消費する特殊な脂肪組織である褐色脂肪組織を寒冷刺激により活性化させると SphK1 の mRNA が約 5 倍増加することを見出した (図 3A)。興味深いことに，SphK1 の mRNA の増加は鼠径部周囲や精巣上体の白色脂肪組織では観察されず褐色脂肪組織に特異的であった。さらに寒冷暴露したマウスの褐色脂肪組織の SphK 活性は，室温 (23°C) で飼育したマウスのものよりも約 1.7 倍高値を示した (図 3B)。また，寒冷刺激後の褐色脂肪組織の S1P 量は，刺激前よりも約 2 倍に増加しており (図 3C)，寒冷環境下において S1P が何らかの生理機能を発揮していることが予想された。

次に，寒冷刺激で活性化した褐色脂肪組織で増加する S1P が S1P₂ を介して熱産生を引き起こしているか検証した。野生型および S1P₂ 欠損マウスを 4°C で 6 時間飼育して直腸温を測定した

結果, S1P₂ 欠損マウスの体温低下が野生型マウスよりも大きく, 体温維持能力が低下していることが明らかとなった (図 3D と E) .

最後に S1P₂ を介した熱産生の作用機序に関する解析を行った. S1P/S1P₂ シグナル伝達系は熱産生の燃料供給経路であると仮説し, 褐色脂肪組織の脂肪分解活性を測定した. その結果, S1P₂ 刺激により脂肪分解活性は約 1.3 倍増加することが分かった. この活性増加は, S1P₂ 欠損マウスの褐色脂肪組織では観察されなかった. 今後, S1P₂ を介した脂肪分解が実際に熱産生に関わっているか, 更に解析を進めて行く予定である.

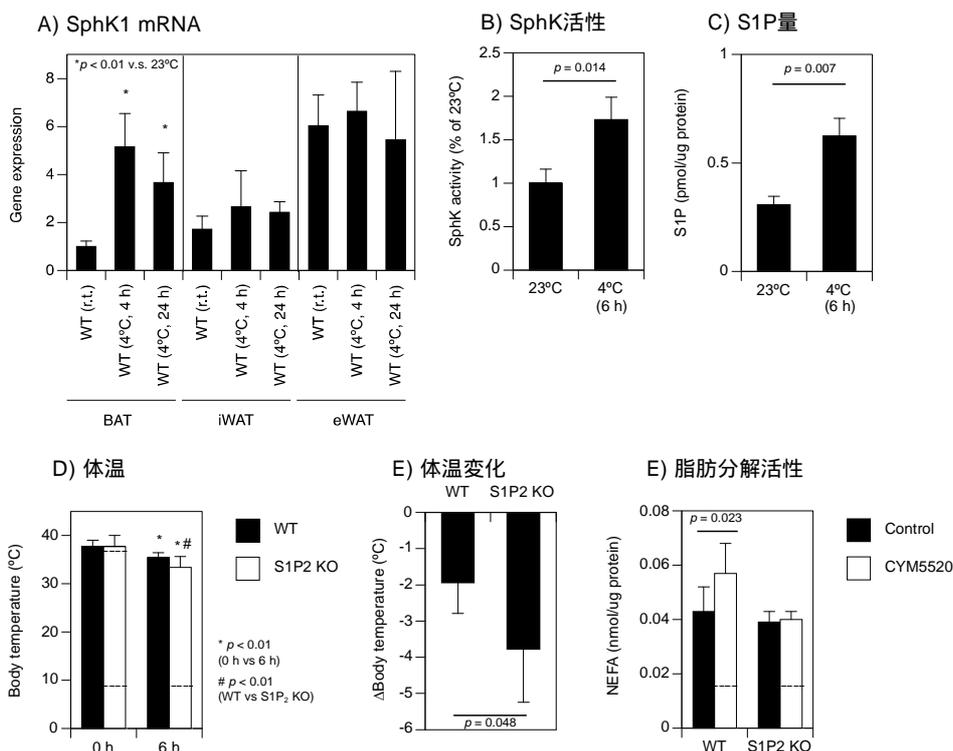


図3. 寒冷環境 (4°C) で飼育したマウスの褐色脂肪組織では, SphK1のmRNAがBATで上昇し (A), SphK活性 (B)とS1P量 (C) も増加する. S1P₂欠損マウスを寒冷環境 (4°C) で6時間飼育すると野生型マウスよりも体温が低下する (DとE). さらにS1P₂特異的のアゴニストにより褐色脂肪組織での脂肪分解が起こる (E).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

A cleanup method for mass spectrometric analysis of sphingosine- and ceramide-1-phosphate in blood and solid tissue using a phosphate capture molecule (revised version), Jun-ichi Morishige, Ryouhei Yamashita, Tamotsu Tanaka, Kiyoshi Satouchi, in Methods in Molecular Biology. Edited by A. Pébay and K. Turksen, Springer, 2018年, 1697巻, p57-71

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://saiboubunshikinoh.wixsite.com/home>
6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。