

## 論文の内容の要旨

### 冬眠に先駆けて誘導される白色脂肪組織リモデリングの分子基盤の解明

氏名 茶山 由一

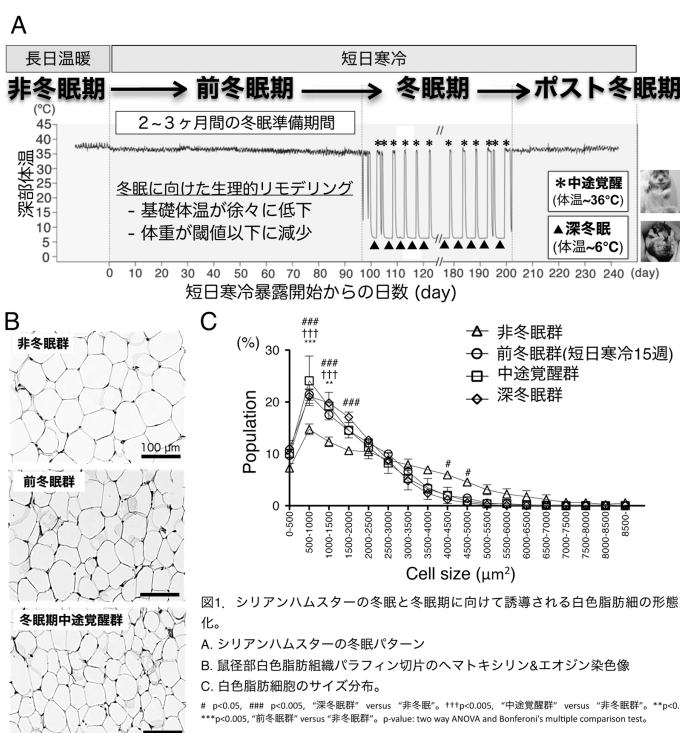
#### 《序論》

冬眠は、食糧不足と著しい気温低下を伴う過酷な冬季を乗り越えるための生存戦略である。小型哺乳類冬眠動物は、全身のエネルギー代謝を著しく抑制して深冬眠と呼ばれる低体温状態に至る。深冬眠状態は数日間維持され、体温・代謝率が一時的に回復する中途覚醒により中断される。小型冬眠動物は、深冬眠-中途覚醒サイクルを繰り返し、数ヶ月におよぶ冬眠期間、寒冷環境下で体温を維持するのに必要なエネルギー消費を削減して生存する。このような冬眠期の低代謝・低栄養状態に順応するために、冬眠動物は晩夏から秋季にかけて生体を冬眠可能な状態へとリモデリングする。例えば、冬眠期に脂質代謝が活性化することが、個体呼吸商を測定した生理学的研究により示されている。しかし、冬眠に向けた生体リモデリングが遺伝子発現・組織形態などの分子・細胞レベルでどのように制御されているのか、未だほとんど不明である。本研究では、通年冬眠誘導可能な条件的冬眠動物シリアンハムスターを用いた実験系により、全身性の代謝制御に重要な器官である白色脂肪組織が冬眠に向けてどのようにリモデリングするのか、その機構の解明を目指した。

#### 《方法と結果》

##### 1. 白色脂肪細胞の形態は非冬眠期から冬眠期への移行期間に変化する

シリアンハムスターは、本研究室で確立された冬眠誘導系において、長日-温暖条件から短日-寒冷条件へと移行後2~3か月の前冬眠期を経て冬眠を開始する(図1A)。私は、本学修士課程において、動物の体重と深部体温が前冬眠期に減少し、その後に冬眠が誘導されることを見出した<sup>1)</sup>。また、鼠径部白色脂肪組織の質量は体重に相関して減少した。そこで、白色脂肪組織が冬眠に向けてどのようにリモデリングされるのかを明らかにするために、まず、その形態学的特徴を非冬眠群(長日-温暖飼育)、前冬眠群(15週間の短日-寒冷飼育)、深冬眠群(冬眠期-低体温状態)、および中途覚醒群(冬眠期-定常体温状態)の4群間で比較検討した。鼠径部白色脂肪組織パラフィン切片について、白色脂肪細胞の大きさを定量し、その度数分布を算出したところ、深冬眠-中途覚醒群(冬眠群)及び前冬眠群において、小型白色



脂肪細胞の割合が非冬眠群に比べて有意に増加した(図 1B-C)。

白色脂肪細胞の大きさは、脂質分解-脂質合成のバランスにより規定される細胞内貯蓄脂質量を反映すると考えられる。以上の結果は、鼠径部白色脂肪組織に貯蓄された脂質の利用が冬眠に先駆けて亢進することを示唆する。

## 2. 冬眠期の鼠径部白色脂肪組織では、脂質代謝関連遺伝子群が高発現する

次に、白色脂肪組織が冬眠期にどのようにリモデリングしているのかを遺伝子発現レベルで規定するために、非冬眠-冬眠状態間の遺伝子発現変化を次世代シーケンサーHiSeq1500によるRNA-seq解析によって網羅的に解析した。非冬眠群、前冬眠群、深冬眠群、および中途覚醒群の4群を比較した。結果、有意水準  $q$  値=0.01 において、3804 個の発現変動遺伝子を見出した。発現変動幅が大きい遺伝子に対するKEGGパスウェイ解析により、脂質代謝関連遺伝子などペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体(PPAR)のターゲット遺伝子が多く含まれることが明らかになった。特に、冬眠期の白色脂肪組織は、脂質分解・脂肪酸 $\beta$ 酸化などの脂質異化経路遺伝子(*Lipe*, *Pnpla2*, *Acox1*, *Acadvl* など)を高発現していた(図 2)。この変化は、白色脂肪組織から他組織への脂肪酸供給能の向上を反映していると考えられる。さらに、これと同時に、脂質合成・脂肪酸不飽和化などの脂質同化経路遺伝子(*Gpam*, *Dgat*, *Scd* など)も冬眠期に高い発現を示した(図 2)。脂質同化経路の増強は、一時的に摂食可能な中途覚醒時に脂質合成を促進し、その後の深冬眠や復温過程で大量に消費される脂質を補給するのに必要であると考えられる。以上の結果は、冬眠期の白色脂肪組織では、脂質の異化経路のみならず、同化経路が同時に転写レベルで増強されていることを示唆する。

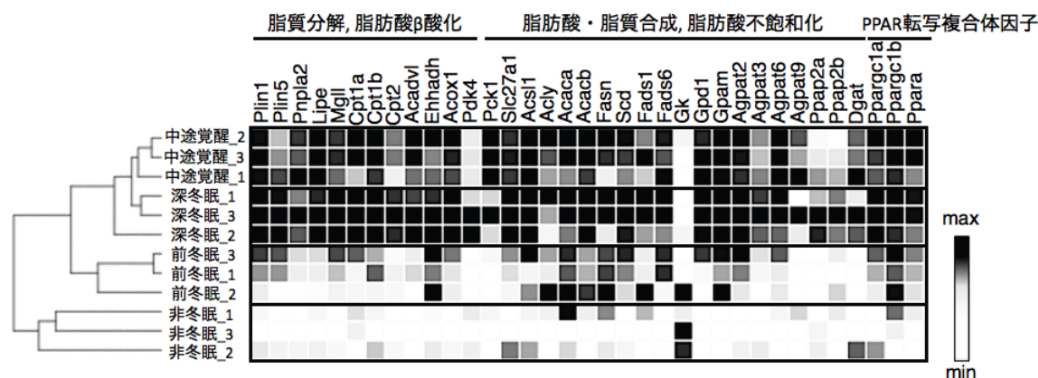


図2. 冬眠期に誘導される脂質代謝関連遺伝子の発現変化

## 3. 脂質代謝関連遺伝子群は冬眠開始に先駆けて発現上昇する

冬眠期に誘導される脂質代謝関連遺伝子群に対する階層的クラスタリング解析では、前冬眠群は非冬眠群よりも冬眠群(深冬眠-中途覚醒)に近いクラスターを形成した(図 2)。これは、前冬眠期において、白色脂肪組織の脂質代謝経路リモデリングが進行する可能性を示唆する。そこで、これらの脂質代謝関連遺伝子が発現誘導されるタイミングを明らかにするために、短日-寒冷条件移行後 2 週/4 週/8 週/12-15 週の異なる時点での遺伝子発現量を定量 PCR 法により解析した(図 3)。脂質代謝関連遺伝子(*Lipe*, *Acox1*, *Scd*, *Gpam*)の発現は、前冬眠期初期-中期(短日-寒冷 2 - 8 週)では上昇しなかったが、長期間(12-15 週)の短日-寒冷刺激により前

冬眠期後期に有意な上昇を示した。その後、冬眠期の個体で発現量は最大になり、自発的に冬眠を終了したポスト冬眠群の個体では減少した。以上の結果は、シリアンハムスターが、冬眠開始に先駆けて白色脂肪組織の脂質代謝経路をリモデリングし、低代謝-低栄養状態を伴う冬眠への準備を前もって行っていることを示唆する。

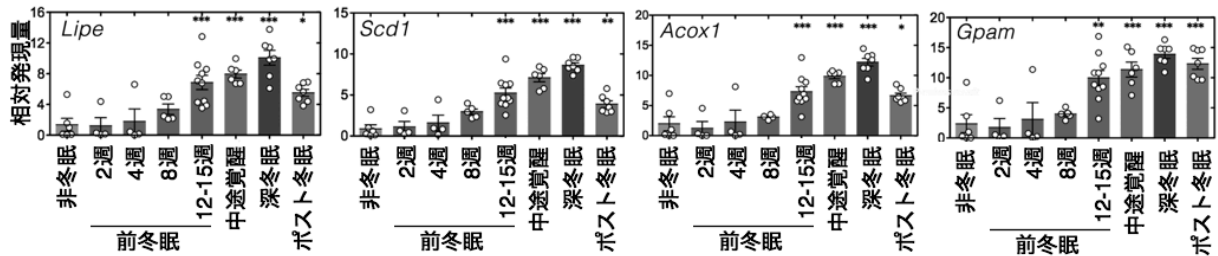


図3. 脂質代謝関連遺伝子の経時的発現解析

p-value: One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$  versus “非冬眠”

#### 4. PPAR- $\delta$ / $\gamma$ の活性化により冬眠に向けた脂質代謝関連遺伝子の発現が誘導される

核内受容体 PPAR ファミリー分子は、エネルギー代謝関連遺伝子群の発現を制御する転写因子である。PPAR ファミリーの3つのサブタイプ(PPAR- $\alpha$ , - $\delta$ , - $\gamma$ )のうち、PPAR- $\delta$  と PPAR- $\gamma$  は非冬眠群-前冬眠群-冬眠群のいずれにおいても高い発現量を示したが、有意な発現変化はなかった。一方で、PPAR- $\alpha$  は低発現であるが冬眠期に向けて発現が上昇した。そこで、いずれの PPAR サブタイプが冬眠に向けた脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を制御するのかを明らかにするために、シリアンハムスター鼠径部白色脂肪組織の組織培養系に対する各 PPAR アゴニストの作用を検討した(図 4)。非冬眠群の個体より得た培養白色脂肪組織では、PPAR- $\delta$  アゴニスト(L-165041)および PPAR- $\gamma$  アゴニスト(Rosiglitazone)の各作用群で脂質代謝関連遺伝子(*Lipe*, *Scd*, *Gpam*)が有意に発現上昇したが、PPAR- $\alpha$  アゴニスト(Fenofibrate)では変化しなかった。さらに、深冬眠群の個体より得た培養白色脂肪組織でも、PPAR- $\delta$  および PPAR- $\gamma$  アゴニストによって、脂質代謝関連遺伝子(*Lipe*, *Acox1*, *Gpam*)の有意な発現上昇が見出された。これらの結果は、長期間の短日-寒冷暴露による PPAR- $\delta$ / $\gamma$  の活性化が、冬眠に向けて脂質代謝関連遺伝子群の発現を誘導する可能を示唆する。

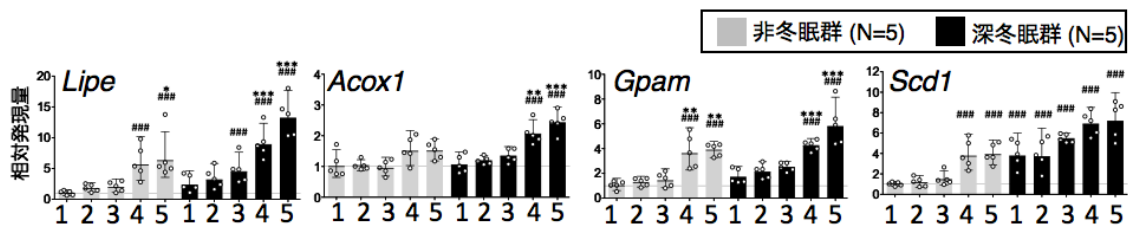


図4. PPARアゴニストを用いた薬理学的実験

鼠径部白色脂肪組織を各PPARアゴニストの下で48時間培養した際の遺伝子発現変化。

1: 非処理群, 2: 0.1% DMSO処理群, 3: 100 $\mu$ M Fenofibrate処理群, 4: 100 $\mu$ M L-165041処理群, 5: 100 $\mu$ M Rosiglitazone処理群。

### $p < 0.005$ , versus “非冬眠群-非処理群”。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , versus “冬眠群-非処理群”。p-value: one way ANOVA and Tukey's post-test.

## 《まとめと考察》

本研究では、シリアンハムスターが冬眠に先駆けて鼠径部白色脂肪組織をリモデリングすることを組織学的解析および遺伝子発現解析により見出した。これは、通年冬眠誘導可能な条件的冬眠動物シリアンハムスターでも、内因性の概年リズムに従って冬にのみ冬眠する義務的冬眠動物(ジリス、クマなど)と同様に、前冬眠期間における冬眠可能な状態への生体リモデリングが必須の過程であることを示唆する。さらに、本研究は、PPAR- $\delta/\gamma$  が冬眠に向けた白色脂肪組織リモデリングを制御しうることを実験的に示した。これらの結果は、数ヶ月に及ぶ長期間の季節性環境刺激により冬眠に先駆けて誘導される脂質代謝経路の遺伝子発現変化は、PPAR- $\delta/\gamma$  転写活性化の上昇による可能性を示唆する。核内受容体転写因子の転写活性を制御する機構には、転写調節領域のクロマチンリモデリングや内因性リガンド・ホルモンによる作用などがある。ゲノム DNA のメチル化やヒストン修飾は、プロモーター領域やエンハンサー領域のクロマチン構造の再構成を促し、遺伝子発現を制御する。長期間の季節性刺激によって、PPAR- $\delta/\gamma$  が結合する転写調節領域近傍のクロマチン構造が変化し、冬眠に向けた脂質代謝関連遺伝子群の発現が誘導される可能性がある。一方で、肝臓や脂肪組織などで産生される、ある種の脂質分子や脂肪酸は、PPAR 分子群に直接結合して活性化を促すことがマウスやラットで示されている。前冬眠期に産生される特定の脂質・脂肪酸が、PPAR を活性化して生体のリモデリングを誘導する可能性がある。

季節性環境刺激が PPAR の転写活性を制御する機構は未だ多くが不明であり、今後さらなる研究が必要である。以上の成果は、冬眠動物が備えた、季節性環境変化に応答したエネルギー代謝制御機構の理解に貢献するものであり、肥満・脂質異常症などの疾患治療への応用可能性を秘めると期待される。

《参考文献》 [1] [Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y., Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator, Royal Society Open Science, 2016, DOI: 10.1098/rsos.160002](#)