

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	川原崎 聡子
論文題目	Studies on the establishment of <i>Ucp1</i> -reporter system for screening and evaluation of UCP1 expression-modulating compounds (UCP1発現調節化合物のスクリーニングと評価のための <i>Ucp1</i> レポーターシステムの樹立に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>肥満は先進国、発展途上国を問わず、世界的に蔓延している状態であり、WHOによれば、2016年には全世界で19億人がBody Mass Index (BMI) 25以上の過体重であり、その内の6億5千万人がBMI 30以上の肥満である。肥満は身体に過剰に脂肪を蓄積した状態であり、様々な疾病の原因となり、人々の生活の質の毀損、あるいは医療費の圧迫による経済的な負担からも、その解消が重大な課題となっている。</p> <p>肥満は生体においてエネルギー供給量がエネルギー消費量を上回ることで誘発されるため、エネルギーの供給と消費のバランスを改善することが肥満解消の鍵となる。エネルギー消費に寄与する分子の1つとして、脱共役タンパク質1 (uncoupling protein 1; UCP1) が挙げられる。UCP1は主に褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) を構成する褐色脂肪細胞のミトコンドリアに存在し、脂肪酸や糖をエネルギー源として熱産生を行うことで全身のエネルギー消費に寄与することが知られている。従来、BATは成人では存在しないと考えられてきたが、近年、成人においても高い熱産生能を有し、UCP1発現を示す褐色脂肪細胞が存在することが報告された。また、<math>\beta</math>-アドレナリン刺激あるいは寒冷刺激のような交感神経刺激を継続的に与えることにより一部の白色脂肪組織においても褐色脂肪細胞様の高いUCP1発現を示す細胞 (ベージュ脂肪細胞) が発現することも報告されている。さらに、<i>UCP1</i>転写調節領域に結合する核内受容体の活性化はUCP1発現誘導能を有する。このように、褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞におけるUCP1発現誘導は肥満解消への新たなアプローチとして注目され、UCP1発現誘導能を有する新規化合物の探索が期待されているが、このような化合物の探索には膨大な化合物を対象とするスクリーニングおよび動物個体でのUCP1発現に対する効果の評価が必須である。本論文では、<i>Ucp1</i>転写活性を簡便に評価可能な動物および細胞実験系を作製することが報告されている。</p> <p>第1章では、蛍光レポータータンパク質を用いた非侵襲的なUCP1発現評価マウスモデルの作製が報告されている。<i>Ucp1</i>プロモーター下流に赤色蛍光タンパク質 (mRFP1) を組み込んだバクテリア人工染色体 (BAC) を用いて、UCP1発現を蛍光でモニターできる<i>Ucp1</i>-mRFP1 BAC Tgマウスを作製した。このマウスでは成獣および生後3日の幼獣においてBATが存在する肩甲骨付近に蛍光が検出された。UCP1の発現を誘導する寒冷環境でこのマウスを飼育すると、肩甲骨付近の蛍光強度が増大し、蛍光強度がUCP1発現量を反映することを明らかにした。<i>Ucp1</i>-mRFP1 BAC Tgマウスを用いた経時的評価の結果、低温条件での飼育により肩甲骨付近の蛍光強度が増加し、常温飼育に戻すと蛍光強度が基底値に復する様子が観察された。また、<math>\beta</math>3-アドレナリン受容体アゴニストCL316243の投与下では14週間にわたって高い蛍光強度が維持されてい</p>			

た。このマウスを用いて、糖尿病治療薬として知られているNa<sup>+</sup>/グルコース共役輸送体2 (SGLT2) 阻害薬 canagliflozinを投与すると、UCP1の発現は減少した。しかし、同じく糖尿病治療薬であり、UCP1発現誘導効果を示すジペプチジルペプチダーゼ4 (DDP4) 阻害薬 teneligliptin を併用すると、薬剤併用期間にわたって canagliflozin によるUCP1の発現減少が抑えられた。この結果は、SGLT2阻害薬で指摘されてきたUCP1発現抑制作用をDDP4阻害薬と併用することで緩和改善できることを示し、糖尿病治療薬の併用療法による新たな可能性を指摘した。以上の結果から、作製した *Ucp1*-mRFP1 BAC Tgマウスは動物個体におけるUCP1発現の変化を長期にわたり経時的に評価可能なマウスモデルであることを証明した。

第2章では、*Ucp1*-luciferaseレポーターベージュ脂肪細胞株の樹立とUCP1発現誘導する新規な香気成分の探索が報告されている。*Ucp1*プロモーター下流に発光酵素 luciferaseが組み込まれたBACを用いて作製されたThermoMouse (*Cell Rep.* 2014, 9:1584-1593) の鼠径部白色脂肪組織より前駆脂肪細胞を単離し、不死化処理および限界希釈法による単一細胞クローニングを経て、高分化能、高luciferase活性を示し、UCP1発現誘導刺激に対して応答を示す*Ucp1*-luciferaseレポーターベージュ脂肪細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いて654種の香気成分を対象とするスクリーニングを行った結果、5-methylquinoxaline (5MQ) が*Ucp1*発現誘導活性を有する新規化合物として見出された。5MQは、マウスおよびヒト脂肪細胞においてUCP1転写を誘導し、マウス脂肪細胞においてミトコンドリアの脱共役呼吸および最大呼吸による酸素消費量を増加させた。5MQで処理した脂肪細胞においてはUCP1の転写活性化にも寄与するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体γコアクチベータ1α (PGC1α) の発現が上昇しており、5MQはsirtuin 1 (SIRT1) やAMP-activated protein kinase (AMPK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介したPGC1αの活性化により*Ucp1*発現を誘導していた。以上の結果より、樹立した*Ucp1*-luciferaseレポーターベージュ脂肪細胞株は*Ucp1*発現誘導活性を有する新規化合物の探索に有用な評価系であることを明らかにした。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

今日、肥満や肥満に起因する糖尿病、循環器疾患などの生活習慣病患者の増加が世界的な健康問題となっており、その予防や改善策の開発が喫緊の課題となっている。肥満は生体におけるエネルギー供給量がエネルギー消費量を上回っている状態であり、エネルギー収支のバランスを改善することが肥満解消の一つの鍵と考えられる。ヒトを含む哺乳類の脂肪細胞は白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の2種類に大別される。白色脂肪細胞はエネルギー蓄積を担うのに対して、褐色脂肪細胞は内在する脱共役タンパク質 1 (uncoupling protein 1; UCP1) の機能により、脂肪酸や糖をを利用して熱産生を行うことでエネルギー消費に寄与する。また近年、寒冷刺激に代表されるような交感神経刺激によって白色脂肪組織においても褐色脂肪細胞様の高いUCP1発現量と産熱量を有する細胞が発現し、エネルギー消費に寄与することが報告されている。加えて、成人においても褐色脂肪細胞様の機能を示す脂肪細胞の存在が明らかにされている。そのため、UCP1発現調節が肥満の予防や改善への新たなアプローチとして期待されており、UCP1発現調節能の簡便かつ高感度な評価系の構築は重要な課題である。

本論文では、UCP1発現調節能を評価する有用な手法として、UCP1発現を蛍光および発光によって評価可能なUCP1発現評価系を確立し、その評価系を用いたUCP1発現の新たな調節機構の解明を目的とした。評価すべき点は以下のように要約される。

1. 非侵襲的なUCP1発現評価マウスモデルとして、*Ucp1*プロモーター下流に赤色蛍光レポータータンパク質を発現する*Ucp1*-mRFP1 BAC Tgマウスを作製し、UCP1発現刺激に応答して褐色脂肪組織中の蛍光が増大することを利用して、UCP1発現誘導能を示す物質の作用を*in vivo*で観察できることを示した。
2. *Ucp1*プロモーター下流に発光酵素luciferaseが組み込まれたThermoMouseの鼠径部白色脂肪組織から前駆脂肪細胞株を樹立し、ハイスループットで*Ucp1*発現誘導能をもつ化合物を簡便かつ高感度にスクリーニングできることを示した。

以上のように、本論文は、肥満の予防や治療に寄与し得る化合物の有効な *in vivo* および *in vitro* のスクリーニング法を開発し、これらを利用して食品香気成分からUCP1発現増大作用を示す化合物を見出したこと、糖尿病治療薬において肥満を予防し得る併剤投与方法の基礎を示したことから、食品生理機能学、食品分子機能学、食品化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和4年3月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）