

京都大学	博士（農学）	氏名	坂本 智弥
論文題目	Studies on the suppressive effects of chronic inflammation on uncoupling protein 1 (UCP1) expression in obese adipose tissues （肥満に伴う慢性的炎症状態が引き起こす、脱共役タンパク質UCP1発現抑制に関する研究）		
(論文内容の要旨)			
褐色脂肪細胞は脂肪酸を酸化・分解し、ミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質 (uncoupling protein 1, UCP1) によって、熱としてエネルギーを放散する。すなわち、UCP1はエネルギー消費の自律的調節に寄与する非常に重要な因子であると考えられている。UCP1が発現する脂肪細胞は、褐色脂肪組織として肩甲骨周辺などに存在するだけではなく、adrenalineなどの刺激により、褐色様脂肪細胞として白色脂肪組織内にも発生し、体重の減少に寄与しうることが明らかとなった。一方、肥満状態の脂肪組織では、エネルギー消費量が減少することが知られている。また、脂肪組織へ浸潤したマクロファージ(MΦ)が分泌する炎症性サイトカインにより、肥満状態の脂肪組織は、慢性的炎症状態を惹起し、白色脂肪細胞における糖・脂質代謝を劇的に変化させる。本研究では、このマクロファージが分泌する炎症性サイトカインが、褐色様脂肪細胞の発生を抑制する一因子である可能性を検討し、肥満状態の脂肪組織におけるエネルギー消費抑制機構の解明を行うこととした。本研究の内容は以下のように要約される。			
1. 肥満状態の脂肪組織の炎症状態を詳細に検討することを目的とし、炎症性サイトカインの発現変化を簡便にモニターできる、in vitro実験系の構築を行った。肥満状態の脂肪組織には、MΦが浸潤し、tumor necrosis factor-α□□□□α□□やmonocyte chemo-attractant protein-1(MCP-1)をはじめとする種々の炎症性サイトカインを分泌することが知られている。そこで、□□□α□□やMCP-1 領域の下流レポーター遺伝子であるgreen fluorescent protein (GFP) を結合させた組換えDNAをRAW MΦに安定的に発現させた。グラム陰性菌の細胞壁構成糖である、lipopolysaccharide (LPS) や3T3-L1脂肪細胞の培養上清を用いて、このレポーター細胞を刺激すると有意にGFP由来の蛍光強度が増加した。また、十分に分化させた3T3-L1脂肪細胞との共培養によってもGFP蛍光強度は増加した。これらの蛍光強度の増加はRAW MΦにおける、□□□α□□やMCP-1遺伝子またはタンパク質発現量の増加と一致していた。以上の結果より、培養細胞を用いて肥満状態の脂肪組織を模倣し、さらにMΦの炎症性サイトカインの発現変化を簡便に定量できる実験系を構築した。 2. 肥満状態の脂肪組織における、UCP1発現誘導を検討するために、高脂肪食を□□週間摂食させたC57BL6/Jマウスを寒冷暴露し、UCP1の発現誘導を行った。その結果、高脂肪食摂食群では、普通食摂食群と比較して、有意にその誘導が抑制された。また、高脂肪食摂食群の脂肪組織では、F4/80 (MΦのマーカー遺伝子) やTNFα□□のmRNA発現量が増加した。次にTNFαがUCP1発現誘導を抑制しうるか検討を行っ			

た。TNF α タンパク質をC57BL6/Jマウスに投与して、寒冷暴露によるUCP1の発現誘導を行った。その結果、TNF- α タンパク質を投与したマウスでは、生理食塩水投与マウスと比較して、有意にUCP1の発現誘導が抑制された。以上の結果から、肥満状態の脂肪組織において、TNF α がUCP1の発現誘導を抑制する炎症性サイトカインの一つであることが示唆された。

3. 培養脂肪細胞を用いて、炎症によるUCP1発現誘導抑制メカニズムを詳細に検討した。10T1/2脂肪細胞を β -adrenaline receptor agonistであるisoproterenol (ISO) で刺激するとUCP1 mRNA発現が増加するが、RAW M Φ との共培養により、この発現誘導は有意に抑制された。このとき、本研究で確立した*in vitro*実験系を利用し、M Φ 由来のTNF α 発現をモニターしたところ、TNF α □□□□□□□□由来の蛍光強度が増加することを確認した。また、活性化RAW M Φ の培養上清やTNF α タンパク質を用いても、UCP1 mRNA発現誘導の抑制がみられた。次に詳細な細胞内シグナル伝達経路について検討した。その結果、extracellular signal-related kinase (ERK) の活性化を阻害すると、UCP1 mRNA発現抑制やUCP1 promoter活性の抑制が一部解除されることが明らかとなった。以上の結果より、TNF α は□RKの活性化を介して、UCP1の発現誘導を抑制することが明らかとなった。また、UCP1 mRNAの発現誘導に重要である、cAMP response element binding protein (CREB) の活性も同様のシグナル伝達により抑制されることが明らかとなった。以上より、M Φ 由来のTNF α がERKの活性化を介して、脂肪細胞におけるUCP1発現誘導を抑制する可能性が示された。

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。

(論文審査の結果の要旨)

経済的先進諸国をはじめとして、世界的規模の死因は動脈硬化性疾患が第1位となっている。肥満に伴う、糖・脂質代謝異常症は、動脈硬化性疾患の主要なリスクファクターである。本研究は、肥満状態の脂肪組織における、エネルギー消費抑制機構を脱共役タンパク質の発現制御を中心に検討したものである。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. 培養細胞を用いて、MΦ由来の炎症性サイトカインの発現変化を蛍光タンパク質の蛍光強度変化により評価する実験系を確立した。脂肪細胞とMΦの相互作用は、糖尿病などの病態悪化の原因となる「炎症」を引き起こす。本実験系はその相互作用を培養細胞で簡便に検討することが可能である。また、この実験系は抗炎症作用を有する食品成分や薬剤のスクリーニングに応用できると考えられる。
2. 肥満状態の脂肪組織における、UCP1発現誘導を検討した。高脂肪食摂食群では、普通食摂食群と比較して、有意にその誘導が抑制されることを見出した。次に、高脂肪食摂食群の脂肪組織ではMΦの浸潤や炎症性サイトカインの発現が増加することに着目し、TNF α とUCP1発現抑制について検討した。TNF α タンパク質をC57BL6/Jマウスに投与して、寒冷暴露によるUCP1の発現誘導を行った。その結果、TNF α タンパク質を投与したマウスでは、生理食塩水投与マウスと比較して、有意にUCP1の発現誘導が抑制された。以上の結果から、肥満状態の脂肪組織において、TNF α がUCP1の発現誘導を抑制する炎症性サイトカインの一つであることが示唆された。
3. 培養脂肪細胞を用いて、炎症によるUCP1発現誘導抑制メカニズムを詳細に検討した。RAW MΦとの共培養や活性化RAW MΦの培養上清は、10T1/2脂肪細胞における、UCP1 mRNA発現誘導を有意に抑制することを見出した。また、その抑制効果の一部はTNF α を介したものであることを、中和抗体を用いた実験により明らかにした。さらに、阻害剤を用いて、TNF α により活性化されるMAPKの一つ、ERKが関与することを見出した。このERKを介したシグナル伝達経路は、UCP1 promoter活性化に重要であると考えられている、cAMP response element (CRE) に結合する転写調節因子群の活性を抑制することをluciferase assayにより明らかにした。

以上のように、本論文は、肥満状態のエネルギー消費の低下機構について詳細に検討し、白色脂肪組織で生じる炎症反応により熱産生細胞である褐色様脂肪細胞の機能低下が原因であることを明らかにしたものであり、食品機能学、栄養化学、健康科学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、平成25年2月12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。

注)Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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