

学位授与番号：甲 1092 号

氏 名：木村 悠

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 31 年 2 月 27 日

学位論文名：

The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe

（褐色脂肪細胞におけるナトリウム利尿ペプチドの熱産生効果と作用機序：蛍光プローブを用いた細胞内温度測定による検討）

学位論文審査委員長：教授 國原孝

学位論文審査委員：教授 南沢享 教授 武田聡

論文要旨

氏名	木村 悠	指導教授名	吉村 道博
----	------	-------	-------

主論文

The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes

: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe

(褐色脂肪細胞におけるナトリウム利尿ペプチドの熱産生効果と作用機序
: 蛍光プローブを用いた細胞内温度測定による検討)

Haruka Kimura, Tomohisa Nagoshi, Akira Yoshii, Yusuke Kashiwagi,
Yoshiro Tanaka, Keiichi Ito, Takuya Yoshino, Toshikazu D. Tanaka,
Michihiro Yoshimura

Scientific Reports. 2017 Oct 11;7(1):12978. doi: 10.1038/s41598-017-13563-1.

要旨

【背景】

ナトリウム利尿ペプチドの心血管系への作用は広く検討されているが、近年、カテコラミンと同様、脂肪組織における熱産生作用の可能性が示唆されている。しかし細胞内温度を直接測定した報告はなく、その機序についても不明である。

【方法と結果】

本研究では、温度感受性蛍光プローブをラット褐色及び白色脂肪細胞へ取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いて2波長の蛍光強度比を6分間毎に測定することで、細胞内温度を解析する実験系を確立した。A型ナトリウム利尿ペプチド(ANP)やB1/2-及びB3刺激薬を60分間作用させたところ、褐色脂肪細胞の細胞内温度はcontrol群(滅菌蒸留水投与群)と比較し有意に上昇した。メカニズムとしてANPはp38のリン酸化を介してuncoupling protein-1(UCP-1)発現を上昇させていることを見出した。また、p38阻害薬はANPによるUCP-1のmRNA発現、及び細胞内温度上昇効果を有意に抑制した。興味深いことに、ANPによる熱産生効果は、37℃環境下より35℃という低温環境下でより顕著であった。また、細胞内ATP(Adenosine triphosphate)含有量については変化を認めなかった。一方、白色脂肪細胞に関しては、少なくとも60分間の刺激ではANP、B刺激薬ともに熱産生効果は認められなかった。

【結論】

本研究では、温度感受性蛍光プローブを用い、直接的な細胞内温度測定の実験系を確立した。褐色脂肪細胞においてナトリウム利尿ペプチドは低温環境下でより細胞内温度を上昇させることがわかった。組織循環不全を伴う重症心不全の病態において、不全心筋より分泌されるナトリウム利尿ペプチドが、脂肪組織を介して組織保温効果を発揮している可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

木村 悠氏の学位請求論文は主論文1編よりなり、そのタイトルは「The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe」で2017年にScientific Reports誌に発表されている。Thesisのタイトルは「褐色脂肪細胞におけるナトリウム利尿ペプチドの熱産生効果と作用機序：蛍光プローブを用いた細胞内温度測定による検討」である。ナトリウム利尿ペプチドの心血管系への作用は広く知られているが、近年脂肪組織における熱産生作用の可能性が示唆されている。しかし細胞内温度を測定してそれを実証した報告はこれまでになかった。本研究では、脂肪細胞に取り込まれた温度感受性蛍光プローベを蛍光顕微鏡を用いて測定することで細胞内温度の測定する実験系を確立したことがまず多に評価できる。要旨の詳細は省略するが、ラット褐色脂肪細胞においてナトリウム利尿ペプチドは低温環境下でより細胞内温度を上昇させたと結論している。その機序として、ANPはp38のリン酸化を介してuncoupling protein-1発現を上昇させることを見だし、その証左としてp38阻害薬はこれらの反応を抑制することを示した。

平成31年1月17日に南沢 享、武田 聡両審査委員出席のもと、公開学位審査を開催し木村氏による研究概要の発表に続いて口頭審査を実施した。口頭発表後のいくつかの主な質疑の内容について報告する。

質問：結果についてだが、今回は急性期の反応を見ていると思うが、それをUCP1のmRNA発現だけで説明することは若干過剰評価のように思う。急性期にUCP1発現の活性を変える因子として他にどのようなものが考えられるか？

回答：PGC1- α やATFといった因子が考えられる。ただ、UCP1の前の段階で制御している因子としてはp38がメインではないかと考えられる。

質問：それはmRNAレベルのregulationかと思うが、UCP1タンパクそのものを変える因子としてはどうか？

回答：Epigenomicな制御機構は近年報告されていたが、今回の実験では調べられていない。因子としては、ほかにもいろいろあるが、これらは急性期のUCP1の制御機構に関与していると報告されている。

質問：以前UCP1のスルフォニル化がROSによって制御されるという報告があった。ANPがROSを介してUCP1のスルフォニル化を起こしているかどうか？

かについては調べているか。

回答：ご指摘の通り報告はあるので検討すべきと考える。

質問：同じように、ヌクレオチドは UCP1 の活性を抑制するし、長鎖脂肪酸は UCP1 の活性を上げるともいわれているので、そういった点はみているのか？

回答：今回の *in vitro* の系ではその点については検討できていない。

質問：そのほか、コハク酸が **adrenergic** な系から UCP1 活性を上げているということも報告されているようだが。そこに ANP が関わっているかどうか面白いと思う。

回答：**Adrenergic** な系による **Thermogenic effects** のカスケードと今回私が提示させていただいた ANP によるカスケードは独立して動いているが、同時に作用させたときには相乗効果を示すことが報告されている (*J. Clin. Invest.* 122, 1022-1036, 2012)。したがって、その関連性をみることは大変興味深いと思われる。

質問：UCP1 以外のアイソフォームは調べていないか？白色脂肪細胞は UCP1 ではないのではないのか？

回答：白色脂肪細胞から **browning** を起こして基質転換が起こることで UCP1 の活性が上がるということが知られている。本研究でも、本来は白色脂肪細胞の刺激をより長期間行い、温度変化の経過をみていくことを目的に実験を行ったのだが、**methodology** の限界で難しく、今後 *in vivo* での検討を続けていきたい。

質問：ANP による熱産生効果が治療に応用できるということだが、脱共役では ATP を下げる可能性もあるのではないのか？

回答：確かに確認する必要はあり、今回の結果では下がっていなかった。実際 **systemic** に ATP が低下することはイメージとしてはないと考える。

質問：熱産生については UCP1 independent な pathway はないか？

回答：UCP1 をノックアウトしたマウスでも **Thermogenesis** が起こるという報告は確認している。

質問：今回 ANP による **Thermogenesis** をやったなかで、UCP1 とともに例えば FLA2 や SARCA2B が関わっているという報告もあったが。その点はいかがか？

回答：カルシウムについて今回の実験では確認できておらず、ご質問に直接お

答えすることはできないが、小胞体における反応で SARCA2 が関連していることは確認している。それに関連して、ASK1 や IRE1 α -XBP1 も Thermogenesis に関わっていることも報告されている。

質問：p38 の阻害剤の阻害薬を用いた検討を行っているが、siRNA を使用しなかったのはなぜか？

回答：UCP1 の siRNA を用いることは検討した。しかし、今回使用した細胞は初代培養であり、前駆細胞から分化誘導していく過程がある。最終的に分化した細胞は dish から剥がれやすく、siRNA を作用させると細胞障害からうまく細胞が残らなかった。また、UCP1 の silence 率も高くなくかつ effectiveness の再現性も高くないことが予測されたこともあり、siRNA ではなく p38 の阻害剤を使用することとなった。

質問：心筋など他の臓器での熱産生はみたのか？

回答：今回提示はしていないが、neonatal rat cardiomyocyte を初代培養し、同じ蛍光プローブを導入したのち、ANP 等を作用させ細胞内温度をみた検討も行っている。結果、少なくとも1時間の刺激では細胞内温度は上昇しなかった。原因として、元々心筋には ANP、BNP が含まれていることから温度差として表現できなかった可能性もある。また、より長期間刺激をすれば温度が上がったのか、その点についてもまだ検討の余地はあるかと思われる。

質問：Figure4 についてだが、温度と比例するデータとして Fluorescence Ratio を使用している。(蛍光強度だと) ベースの値が下がってきてしまうので、したがって Ratio を使わざるを得ないのか。2つの波長での蛍光強度のどちらかが下がってくるのか？もしくは両方が下がっていくのか？

回答：パイロット実験で退色の影響を調べるため、蛍光顕微鏡を使って試薬入りの培地を入れた dish を対象に経時的に蛍光強度比をみた検討を行ったが、退色は少なかった。したがって、Ratio が下がっていく原因は退色だけでは説明できず、周囲環境温の低下も関わっていたと考えられる。

質問：Figure6 の p38MAKP についてだが、SB203580 を作用させた際に DMSO を溶媒として使用しているが、蛍光強度の実測値に影響はなかったか？ Ratio を用いていたので、そのあたりも関係があると考えられるが。

回答：まずこのプローブ自体が Ratio と温度が比例するよう設計されたものである。DMSO は蛍光強度に影響を与える可能性は十分考えられ、コントロール群に DMSO のみ加えた群を設定したが、実測値に影響を与えていた印象はな

かった。

質問：今回の実験で用いられている ANP の濃度は、ヒトでいうとどのくらいの濃度に相当するのか？

回答：マウスなど rodent の細胞では NPR-C という NP のクリアランスレセプターがヒトより多く発現していることがすでに知られており、ヒトの細胞よりも濃い濃度の ANP を加えることではじめて effect が出てくる可能性があるということが報告されていた。ANP 10^{-9} M はヒトでいうと正常値である 35pg/ml の 100 倍程度、ANP 10^{-7} M はそのさらに 100 倍ということで、前者は生理学的濃度、後者は薬理的濃度と言えるのではないかと考えられる。本研究では serum starvation を行っている。それによって細胞が飢餓状態となり、そうすると NPR-C が down regulation されるという報告もあることから、ANP の効果が出やすい状況を作ることができたのではないかと考えている。

質問：心臓外科領域では、大血管手術の際に循環停止、低体温にして手術を行う。救急領域では低体温療法も行われる。35℃以下でどのような状態になるかという点は興味があるところである。

回答：低体温によって内因性 BNP が upregulation されるという報告があるが、動物実験であり、ヒトではまだ検討されていないと思われる。おそらく upregulate された ANP、BNP による protective な作用が起きることは予想される。当科でもすでに低体温療法における内因性 BNP の制御について研究を行っており、いずれご報告させていただければと考えている。

質問：細胞内温度の実験で再現性を持って刺激後 30 分から温度が上昇を始めているが、これは先ほど話題に出た UCP1 タンパクの修飾としては遅いシタンパク合成を促進しているとすれば早い。UCP1 の Western blot はしていないが、Reviewer から言われなかったか？

回答：褐色脂肪細胞なのでもととの UCP1 発現量が多く、Western でみると差がわかりにくい。Western blot については Reviewer から p38 の Western blot の全体像を提示するよう要求されたが、UCP1 については要求されていない。

質問：そうすると、UCP1 のタンパク合成が進んで今回の結果のように細胞内温度が上昇していると考えてよいのか？

回答：ご指摘のように急性期の反応として本当に UCP1 だけで説明できるのかどうかは検討の余地があると思われる。Epigenomic な因子の関与など、他の

要因も否定はできない。

その他、細かな測定方法に関する点、温度や波長の設定に関する点、統計手法に関する点について質問がなされ、それぞれに対し明快に回答がなされるとともに活発に議論がなされた。

口頭審査後に、南沢、武田両教授と慎重に審議し、独自に実験系まで確立してナトリウム利尿ペプチドの熱産生効果を証明したばかりか作用機序まで証明した非常にオリジナリティーのある論文で学位を授与するに十分な価値があると認めた次第である。審査後に論文要旨の一部の文言の修正を指示したが、それについて適切に修正されていた。