

氏 名（本籍）	成 <sup>なり</sup> 田 <sup>た</sup> 匠 <sup>たくみ</sup> （東京都）
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	甲第 18 号
学位授与の日付	2018 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモ デリングとその新規制御メカニズム

論文審査委員	（主査）教授 樋上 賀一
	教授 内海 文彰      教授 磯濱洋一郎
	嘱託教授 深井 文雄      准教授 秋本 和憲

## 論文内容の要旨

平成 28 年現在、日本の総人口に対する高齢者の割合は 27.3%であり、すでに超高齢社会を迎えている。また、平成 27 年現在で世界の総人口に対する高齢者の割合は 8.3%であるが、平成 72 年には 18.1%になると予測され、今後半世紀で高齢化が急速に進展する。日本の平均寿命と健康寿命の差は、平成 22 年で、男性 9.13 年、女性 12.68 年であるが、急速に進む高齢化に対して平均寿命と健康寿命の差は縮まらず、これを改善することは喫緊の課題となっている。これらの問題を解決するために、「老化・寿命」を制御するメカニズムを解明する必要がある、そこから老化プロセスを薬理的・栄養学的にコントロールする必要がある。このメカニズムを解明するべく注目されているのが、老化研究における中心的な科学モデルであるカロリー制限（CR; caloric restriction）に関する研究である。

CR とは生存に必要な栄養素を与えたうえで、継続的に総摂取カロリーを適度に制限する方法である。齧歯類などの実験動物においては、摂取カロリーを自由摂食（AL; *ad libitum*）群の 60～70%程度に制限することが多い。CR による寿命延伸効果は酵母や線虫から齧歯類を中心とした哺乳類に至るまでの幅広い生物種において観察されるので、CR によって活性化される種を超えた普遍的な寿命シグナルが存在することが示唆される。

CR は、成長ホルモン（GH; growth hormone）の分泌や血漿中 GH 濃度、また、GH 刺激により肝臓などから分泌されるインスリン様成長因子 1（IGF-1; insulin-like growth factor-1）の血漿中濃度を減少させる。しかし、GH/IGF-1 シグナルが抑制されて長寿であ

る Ames 矮小マウスやアンチセンス GH トランスジェニックラットでは、CR によりさらに寿命が延伸する。これらの知見は、CR の寿命延伸効果が GH/IGF-1 依存的なメカニズムによってのみ制御されているわけではなく、GH/IGF-1 非依存的メカニズムによっても制御されている可能性を示唆するものである。また、白色脂肪細胞選択的遺伝子やアディポカイン遺伝子の発現修飾による寿命延伸が報告されている。それゆえ、白色脂肪組織 (WAT; white adipose tissue) が寿命制御に重要であることが示唆される。そこで、CR による WAT での遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、GH 非依存的にかつ CR 依存的に、脂質代謝関連遺伝子、特に sterol regulatory element binding protein-1 (Srebp-1) に転写制御されていると考えられる脂肪酸合成関連遺伝子の発現上昇を見出した。

第一章では Srebp-1c knockout (KO) マウスを使用して、CR のメカニズムを解析した。その結果、以下の点を明らかにした。1) CR は Srebp-1c 依存的に寿命を延伸する。2) CR は Srebp-1c 依存的に脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連タンパク質発現を亢進する。3) CR は Srebp-1c 依存的にミトコンドリア生合成制御因子である peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$  (Pgc-1 $\alpha$ ) 発現を亢進する。4) Srebp-1c が直接的に Pgc-1 $\alpha$  発現を亢進する。5) CR は Srebp-1c 依存的に酸化ストレスを抑制する。6) CR による 2)~5) の変化は WAT 選択的に観察される。以上より、Srebp-1c は、WAT において、CR により酸化ストレスを抑制し、ミトコンドリア生合成を活性化することでグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させ、効率的なエネルギー代謝を促進することで、低栄養状態に対して適応し、さらに寿命を延伸する遺伝子であることが示唆された。これらの知見をもとに第二章以降は WAT を中心に研究を進めた。

第二章では、CR の効果における経時的な代謝リモデリングを解明するために、ラットの WAT および肝臓において脂肪酸合成に関連する mRNA およびタンパク質発現における経時的な変化を調べた。その結果、WAT において、*de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA およびタンパク質発現は 3.5 ヶ月齢で顕著に発現が増加した後に 5 ヶ月齢まで減少し、その後 9 ヶ月齢まで増加した。一方で、この変動は肝臓では見られなかったため、CR の脂肪酸合成に関する効果は WAT 特異的であることが強調された。今回のモデルにおいては、CR 期間 2 ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答 (短期 CR)、後半は CR による有益な代謝リモデリング (長期 CR) という転換を示していると考えられる。特に、*de novo* 脂肪酸合成の活性化は前者がインスリンシグナルの活性化により、後者はレプチンシグナルの抑制によって支配される可能性が示唆された。

昨今、脂肪の貯蔵部位による違いもメタボリックシンドロームのリスクと関係があると考えられている。ヒトにおいて、内臓脂肪が増加する中心性肥満はインスリン抵抗性、2 型糖尿病、脂質異常症やアテローム性動脈硬化症と関連しているが、皮下脂肪の増加による末梢性肥満はインスリン感受性の改善、2 型糖尿病、脂質異常症およびアテローム性動

脈硬化のリスク低減に寄与している。そこで第三章では、WAT における CR の代謝モデリング応答をより正確に理解するために、ラットにおいて後腹膜 WAT (rWAT; retroperitoneal WAT)、精巣周囲 WAT (eWAT; epididymal WAT) および皮下 WAT (sWAT; subcutaneous WAT) での CR に対する応答性の違いを比較した。その結果 WAT の体積・重量・脂肪細胞サイズは CR により rWAT、eWAT、sWAT の順で小さくなった。次に、脂質代謝への CR の効果に焦点を当てて解析したところ、全ての WAT で脂肪酸合成関連因子が CR により同程度発現が増加した。一方、脂質分解関連因子であるホルモン感受性リパーゼのリン酸化が rWAT と eWAT では CR 群の fed 時に、sWAT では CR 群の fasted 時に亢進した。また、インスリンシグナルの指標となる AKT のリン酸化は CR により sWAT でのみ亢進した。CR による脂質代謝の影響は、sWAT ではインスリンシグナルの寄与が強く、rWAT、eWAT ではレプチンシグナルなどそれ以外のシグナルの寄与が強いことが示唆された。

第四章では、Srebp-1c の作用を介したミトコンドリア活性化の制御機構に着目した。酵母におけるカロリー制限の主要因子として発見された silence information regulator 2 (Sir2) の哺乳類におけるミトコンドリアオオソログの 1 つである Sirt3 は、ミトコンドリア局在酵素の活性化やミトコンドリアの機能維持に必要な抗酸化因子の活性化、さらに reactive oxygen species (ROS) によって生ずる傷害タンパク質の分解などミトコンドリアの機能維持や品質管理に重要な脱アセチル化酵素である。多くのミトコンドリアタンパク質は mitochondrial signal peptidase (MtSPase) によって切断されることで活性型になることが知られている。WAT において、CR により Srebp-1c 依存的に Sirt3 のタンパク質発現は亢進するが、mRNA 発現は亢進しなかった。我々は WAT 選択的に CR により 37kDa の前駆型 Sirt3 タンパク質から 28kDa の活性型タンパク質へのプロセッシングが亢進している可能性を発見した。そこで DNA マイクロアレイを用いて CR により発現が増加する MtSPase を網羅的に解析したところ、mitochondrial intermediate peptidase (Mipep) が CR により増加することを見出した。そこで、CR による Mipep mRNA の発現変動を解析したところ、Srebp-1c 依存的に上昇していた。Mipep は mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) により切断されたタンパク質を N 末よりオクタペプチドを切断する酵素である。そこで、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 に Sirt3 を過剰発現させて Sirt3 タンパク質のプロセッシングを確認したところ、二段階のプロセッシングにより活性型タンパク質となり、活性化することが明らかとなった。さらに、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 において shRNA を用いて Mipep をノックダウンしたところ、Mipep の他の基質タンパク質と同様に活性型 Sirt3 タンパク質は減少し、Sirt3 の標的タンパク質の一つである manganese superoxide dismutase (MnSOD) のアセチル化は増加した。また、同時にクエン酸回路の律速酵素である citrate synthase 活性も減少した。それゆえ、Mipep が Sirt3 の成熟化および活性化

のみならずミトコンドリア活性も制御している可能性が示唆された。そこで、個体および組織レベルでの Mipep の役割を明らかにするために、Mipep KO mice を作製した。しかし、全身で Mipep を KO すると胎生致死になった。そこで、Mipep ヘテロマウスを用いて個体および組織への影響を解析することとした。また、現在、脂肪組織特異的 Mipep KO mice を作製中である。

本研究では、CR のメカニズムは WAT 特異的に Srebp-1c が脂質代謝を活性化し、Pgc-1 $\alpha$  を介してミトコンドリアを活性化すること、これらの代謝リモデリングは CR 期間が少なくとも 3 ヶ月以上を有するということが示唆された。また、WAT の部位によっても応答が異なることが示された。さらに、CR は Srebp-1c 依存的に MIPEP の発現量を増加させることで SIRT3 のプロセッシングを亢進し、ミトコンドリア機能向上、代謝改善に寄与していることが示された。以上より、健康長寿を実現する新規 CR 模倣薬の創薬ターゲットとして、WAT において Pgc-1 $\alpha$  や Mipep を活性化させて WAT のミトコンドリアを活性化し、かつ品質を向上させるような化合物が、健康長寿を実現する新規 CR 模倣薬になりうるのではないかと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、抗老化・寿命延伸作用のカロリー制限 (CR) のメカニズムをマウスやラットの脂肪組織や脂肪細胞を中心に解析し、以下の新規性の高い知見を明らかにした。

第一章では、脂肪酸合成関連転写因子 sterol regulatory element binding protein 1c 欠損マウスを用いて、CR の成長ホルモン非依存性のメカニズムとして、以下の点を明らかにした。1) CR は Srebp-1c 依存的に寿命を延伸する。2) CR は Srebp-1c 依存的に脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連タンパク質発現を亢進する。3) CR は Srebp-1c 依存的にミトコンドリア生合成制御因子である peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$  (Pgc-1 $\alpha$ ) 発現を亢進する。4) Srebp-1c が直接的に Pgc-1 $\alpha$  発現を亢進する。5) CR は Srebp-1c 依存的に酸化ストレスを抑制する。6) CR による 2) ~ 5) の変化はおおよそ WAT 選択的に観察される。以上より、Srebp-1c は、WAT において、CR によりミトコンドリア生合成を活性化することでグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させ、効率的なエネルギー代謝を促進することで、低栄養状態に対して適応し、また酸化ストレスを抑制し、さらに寿命を延伸する遺伝子であることが示唆された (Aging Cell. 16(3):508-517, 2017)。

第二章では、CR に対する反応性を異なる 3 つの脂肪組織 (脂肪組織精巣周囲脂肪組織、後腹膜脂肪組織、皮下脂肪組織) で比較した。その結果、第一章で明らかになった CR による Srebp-1c 依存的な脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連タンパク質発現の亢



進は、3つの脂肪組織で共通に生ずる反応であることを示した (Exp Gerontol., in press)。

第三章では、CRによる脂肪組織における代謝リモデリングを刑事的に解析し、CR期間2ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答 (短期CR)で、インスリンシグナルの活性化により、また後半はCRによる有益な代謝リモデリング (長期CR)で、レプチンシグナルの抑制によって支配される可能性を示した (Exp Gerontol. 63:59-66, 2015)。

第四章では、CRによるミトコンドリア活性化の制御機構に着目し、CRの主要因子として発見された silence information regulator 2 (Sir2) の哺乳類におけるミトコンドリアオーソログの1つである Sirt3 が、mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) に加え、mitochondrial intermediate peptidase (Mipep) により切断されて活性化されること、すなわち CRによるミトコンドリアの活性化・質の維持に、Mipep が極めて重要であることを示した (FEBS Lett. 591(24):4067-4073, 2017)。

以上のように、本博士論文では CR の新規メディエーターとして Srebp-1c と Mipep の2種類のタンパク質を明らかにしており、本研究内容は老化研究領域では最も権威のある Aging Cell 誌を含め計4報の論文に発表されている。本研究は CR の分子メカニズムの解明のみならず、肥満症や代謝改善薬の標的タンパク質候補を明らかにしたことで、極めて重要な研究成果であり、博士の学位に十分に値すると評価できる。