

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	北尾 直也
<p>学位論文題目</p> <p>Increased thermogenic capacity under low temperature in hibernating hamster brown adipose tissue and its contribution of arousal from hibernation (冬眠中のハムスター褐色脂肪組織における 低温下熱産生容量の増加と、冬眠覚醒に対する寄与)</p> <p>共著者名 橋本 眞明</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>冬眠時、内温動物 (endotherm) は体温調節を停止し、体温が外温依存性を示す。低環境温下では、多くの生理機能とエネルギー消費の著しい低下による低体温を特徴とし、冬眠からの覚醒には短時間で莫大な熱産生を必要とする。骨格筋によるふるえは熱源として重要であるが、それが機能する体温範囲は限られている。体温が極端に低い状態ではふるえが観察されないことから、別の機構、すなわち、褐色脂肪組織 (BAT) での非ふるえ熱産生が不可欠であるとされている。しかしながら、極低体温下でそれを可能にする細胞レベルでの生理学的メカニズムは不明である。また、近年 BAT 熱産生の必須分子である脱共役タンパク質 UCP1 を欠損した動物が、低体温状態から正常に復温出来ることが示され、BAT の関与が小さいことも考えられる。</p> <p>本研究では、冬眠状態からの速やかな覚醒に BAT 熱産生が必要との仮説を立て、低温下での BAT 熱産生能力が冬眠前または冬眠中に変化するか否かを明らかにし、そのメカニズムを検討した。さらに、冬眠からの覚醒における BAT の関与を明らかにすべく、BAT 熱産生の主要な経路である <math>\beta 3</math> アドレナリン受容体のアゴニスト (CL) およびアンタゴニスト (SR) を用いて、生体レベルでの検討も行った。</p> <p>材料・方法</p>			

### 1. ゴールデンハムスターの冬眠誘導

室温 25℃、明暗周期 (12 時間明期 12 時間暗期) で飼育中のゴールデンハムスター (12 週齢雄雌) を、室温 5℃、恒常暗条件の飼育部屋に移動させ、約 2 ヶ月後、冬眠行動を誘導した。行動を赤外線センサーにより記録し、実験には規則的に冬眠覚醒周期を繰り返すものを用いた。組織実験においては、室温 25℃で飼育した温暖群と室温 5℃、恒常暗条件で 2 週間飼育した寒冷群を、冬眠群に対するコントロール群とした。

### 2. 組織採取と酸素消費量 (熱産生量) の測定・タンパク定量

肩甲間 BAT (IBAT) と肩甲下 BAT (SBAT) を採取し、それぞれの重量を測定後、IBAT は 1mm 角に細切、37℃でインキュベート後、クラーク型酸素電極を用いて、2 種類の異なる温度下で刺激剤に対する応答を測定した。SBAT に関しては BCA 法により総タンパク量を定量し、Western blot 法により UCP1 のタンパク量を判定した。

### 3. 覚醒誘導における薬物効果

冬眠中の動物に触覚刺激を加え、人為的に覚醒を誘導し、覚醒時間に対する薬物効果を検討した。覚醒過程は、BAT 温・直腸温・心拍数の変化により判断し、覚醒完了は BAT 温が 27℃に達した時点とした。CL は覚醒誘導開始から覚醒完了まで静脈内に持続投与 (50ng/min) し、SR は BAT 温が 10℃に達した時点で皮下投与 (1mg/animal) した。

### 4. 深い冬眠状態における CL の効果

深い冬眠中の動物に、刺激を与えないように 10 分かけてゆっくりと Vehicle および CL (50ng/min) を静脈内に投与し、覚醒が誘導されるか否かを検討した。覚醒誘導の有無は、心拍数の変化から判断した。

## 成 績

### 1. 組織実験

- ・ 冬眠群の BAT は温暖群や寒冷群のものに比べ、有意に重量が大きく、また UCP1 量も多かった。
- ・ 通常温 (36℃) 下で測定時の CL による酸素消費速度の亢進は、群間に差がなかったが、低温下 (12℃) では温暖群や寒冷群に比べ、冬眠群で有意に高い値を示した。
- ・ Forskolin により  $\beta 3$  受容体を介さずに細胞を刺激した場合の酸素消費速度の亢進は、いずれの温度下でも温暖群と冬眠群の間に有意な差はなかった。

### 2. 生体実験

- ・ CL は Vehicle の投与に比べ、覚醒誘導時の覚醒時間を有意に短縮し、その効果は覚醒初期に顕著

であった。

- ・ 深い冬眠状態において、Vehicle は冬眠からの覚醒を誘導しなかったが、CL は誘導した。
- ・ SR は Vehicle に比べ、覚醒誘導時の覚醒時間を有意に延長し、50%の動物の覚醒を完全に妨げた。

## 考 案

冬眠動物は、組織過形成や豊富な UCP1 量とその高活性に代表される、熱産生能力の高い BAT を持つことは知られていたが、冬眠中の体温に近似した低温下での高い反応性を明らかにしたのは、本研究が初めてである。低温下で高機能を示す BAT の細胞内メカニズムについては、さらに解明すべき点が残されているものの、ひとつの可能性として受容体レベルの変化が示唆された。一般に、寒冷順化動物の BAT では、 $\beta 3$  受容体を介した反応の脱感作が知られており<sup>2)</sup>、通常温での CL による酸素消費速度の亢進に群間差が見られなかった本実験結果は、それを支持する。過去の研究から、脱感作のメカニズムとして受容体での  $G_s$  タンパク質結合能の低下、あるいは、より最近の報告ではカベオラタンパクの関与が示唆されている。冬眠中には何らかの機序によりこれらの脱感作機構が抑制された結果、高い熱産生反応を示したと推測される。

生体において、冬眠覚醒にはアドレナリン受容体を介した刺激が重要であることは知られていたが<sup>3)</sup>、低温下での主要な熱産生経路が不明であった点、BAT 熱産生には $\alpha 1$  アドレナリン受容体を介した経路も存在する点、また、冬眠動物の BAT の細胞膜では $\alpha 1$  受容体が増加している点などから、その主要な受容体サブタイプについては議論の余地を残していた。アンタゴニストを用いた本研究により、 $\beta 3$  受容体が必須であることが示されたが、全ての動物で覚醒が阻害されたわけではなかった。これについては更なる検討が必要であるが、濃度の不足、あるいは標的器官に達しなかった、など薬理的作用の違いや、個体の覚醒状態の違いによると思われる。すなわち、ある時点（本研究では BAT 温が  $10^{\circ}\text{C}$  に達した時点）で薬物を投与しているが、その時および薬物が作用すると思われる時の BAT への交感神経活動の状態は不明であり、阻害効果が一定ではなかった可能性がある。これは、覚醒速度が遅い個体において、より強い阻害効果が確認されたことによっても支持される。さらに興味深いことに、覚醒が完全に阻害された個体では BAT 温が  $15^{\circ}\text{C}$ （直腸温が  $14^{\circ}\text{C}$ ）を超えていることはなく、このことは体温  $15^{\circ}\text{C}$  付近から観察されるふるえが始まればそれだけで覚醒し得る可能性を示唆する。

## 結 論

冬眠中のゴールデンハムスターでは、冬眠からの覚醒に $\beta 3$  アドレナリン受容体を介した BAT 熱産生が不可欠であることが明らかとなった。この BAT は、極低温下でも刺激反応性を維持し、通常体温

動物のものより大きな熱産生能力を持ち、そこには受容体レベルでの機能変化が関与していることが示唆された。この分子レベルの変化が極低体温からの覚醒に寄与していると考えられる。

寒冷環境下では非ふるえ熱産生が耐寒性の獲得に重要である。非ふるえ熱産生の主要臓器とされるBATは、新生児のみならず成人でも機能的に存在することが確認され、より近年、成人の非ふるえ熱産生・エネルギー代謝においてBATが強く関与していることが示された。BAT熱産生は冬眠動物において生死を決める重要な位置を占め、この分子機構解明は上述のヒトへの応用に有用な知識を提供できるであろう。




#### 引用文献

1. Oelkrug R, Heldmaier G, and Meyer CW. Torpor patterns, arousal rates, and temporal organization of torpor entry in wildtype and UCP1-ablated mice. *J Comp Physiol B* 2010.
2. Zhao J, Cannon B, and Nedergaard J. Thermogenesis is beta(3)- but not beta(1)-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 275: R2002-R2011, 1998.
3. Feist DD. BROCKADE OF AROUSAL FROM HIBERNATION BY INHIBITION OF NOREPINEPHRINE SYNTHESIS IN THE GOLDEN HAMSTER. *Life Sciences* 9: 1117-1125, 1970.

#### 参考論文

1. Kitao N, Yahata T, Matsumoto T, Okamatsu-Ogura Y, Omachi A, Kimura K, Saito M. Molecular cloning and tissue distribution of uncoupling protein 1 (UCP1) in plateau pika (*Ochotona dauurica*). *J Vet Med Sci* 69: 1065-1068, 2007
2. Kitao N, Fukui D, Hashimoto M, Osborne PG. Overwintering strategy of wild free-ranging and zoo enclosure-housed Japanese raccoon dogs (*Nyctereutes Procyonoides albus*). *Int J Biometeorol* 53: 159-165, 2009
3. Kitao N, Fukui D, Shibata H, Saito M, Osborne PG, Hashimoto M. Seasonality and fasting effect in raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* serum leptin levels determined by canine leptin-specific enzyme-linked immunosorbent assay. *J Exp Zool A* (in press, DOI: 10.102/jez.649)

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	北尾 直也
<p>審査委員長 奥村 利勝 </p> <p>審査委員 高草木 薫 </p> <p>審査委員 高井 章 </p>			
学位論文題目			
<p>Increased thermogenic capacity under low temperature in hibernating hamster brown adipose tissue and its contribution of arousal from hibernation (冬眠中のハムスター褐色脂肪組織における低温下熱産生容量の増加と、冬眠覚醒に対する寄与)</p>			
<p>本研究は、冬眠状態からの速やかな覚醒に褐色脂肪組織 (BAT) での熱産生が必要との仮説の検証と、そのメカニズムの解明を試みたものである。実験にはゴールデンハムスターの冬眠モデルを使用している。室温 25℃、明暗周期 (12 時間明期 12 時間暗期) で飼育中のゴールデンハムスター (12 週齢雄雌) を、室温 5℃、恒常暗条件の飼育部屋に移動させ、約 2 ヶ月後、冬眠行動を誘導した。行動を赤外線センサーにより記録し、実験には規則的に冬眠覚醒周期を繰り返すものを用いた。室温 25℃ で飼育した温暖群と室温 5℃、恒常暗条件で 2 週間飼育した寒冷群を、冬眠群に対するコントロール群とした。</p> <p>In vitro の組織実験では以下の 3 点が明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 冬眠群の BAT は有意に重量が大きかった。</li><li>2) 通常温 (36℃) 下では <math>\beta 3</math> agonist による酸素消費速度の亢進は、冬眠群は他群と差がなかったが、低温下 (12℃) では冬眠群で有意に高かった。</li></ol>			

3) Forskolin により  $\beta 3$  受容体を介さずに細胞を刺激した場合の酸素消費速度の亢進は、いずれの温度下でも差はなかった。

In vivo の生体実験では下記の3点が明らかになった。

4)  $\beta 3$  agonist は覚醒誘導時の覚醒時間を有意に短縮した。

5)  $\beta 3$  agonist は冬眠からの覚醒を誘導した。

6)  $\beta 3$  antagonist は覚醒誘導時の覚醒時間を有意に延長し、50%の動物の覚醒を完全に妨げた。

以上の成績より、冬眠動物は冬眠時特異的な機構により、低温下でも交感神経刺激に対して高い応答性を持つBATを備えていること、冬眠からの覚醒に $\beta 3$  アドレナリン受容体を介したBAT熱産生が不可欠であることが初めて明らかとなった。以上の成績は、冬眠からの覚醒メカニズムを解明したのみならず、生体の体温調節やエネルギー代謝調節を理解する上で参考になる。本研究は、オリジナリティーに富む研究課題である。用いた方法も適切で、得られた結果にも信憑性がある。申請者は、関連領域の知識にも精通し、学位論文にふさわしいと判断した。