ウェブサイト公開用

（様式 10）
（海外特別研究員事業）
平成 31 年　4 月　10 日

# 海 外 特 別 研 究 員 最 終 報 告 書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長　殿

採 用 年 度　平成 29 年度
受 付 番 号　６０９
氏　　名　米代 武司
（氏名は必ず自署すること）

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：　カリフォルニア州サンフランシスコ市　（国名：　米国　）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
成人ベージュ脂肪組織の分岐鎖アミノ酸代謝における新たな役割と代謝性疾患予防効果

3. 派遣期間：平成　29　年　4　月　1　日　～　平成　31　年　3　月　31　日

4. 受入機関名及び部局名
カリフォルニア大学サンフランシスコ校、糖尿病センター

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意　**書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）
（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究では、ベージュ脂肪組織の分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝活性について、ヒト、マウス、培養細胞を用いて検討した。

## １．ベージュ脂肪組織は寒冷暴露による血中 BCAA のクリアランスに関与する

健康な被験者 33 名を対象に室温 19℃、2 時間の寒冷刺激を行ってから陽電子画像診断（FDG-PET/CT）を行い、ベージュ脂肪活性を評価した（図 1a）。同被験者を対象とし、室温 27℃の部屋で安静を維持した状態と、室温 19℃、2 時間の寒冷刺激を行った後で採血を行い、血中の各種アミノ酸濃度を測定した。ベージュ脂肪活性と寒冷暴露による血中 BCAA 濃度変化の関係を解析した。その結果、ベージュ脂肪活性が高い被験者では血中 BCAA 濃度が有意に減少したのに対し、低活性者では変化しなかった（図 1b）。BCAA 変化量は、ベージュ脂肪活性や寒冷誘導熱産生量と負に相関した（図 1c）。一方、BCAA 以外のアミノ酸では、その寒冷応答とベージュ脂肪活性の間に関連は認められなかった。ヒトベージュ脂肪は寒冷刺激によって活性化すると熱産生のために BCAA を利用することが示唆された。

寒冷刺激による BCAA 代謝の活性化を直接的に示すため、マウスを温熱中性域（30℃）または寒冷環境（12℃）に 2 週間暴露させ、BCAA の一つである Leucine の放射線性同位体 $^{18}$F-Fluciclovine を用いて PET/CT を行った。本実験では、マウスの主な熱産生性脂肪組織である褐色脂肪組織（BAT）に焦点を当てた。BAT における $^{18}$F-Fluciclovine 代謝活性は寒冷刺激により上昇し、肝臓や脳、骨格筋、心臓などの臓器では変化しなかった（図 1d）。次に、BAT の BCAA 代謝活性が全身の BCAA クリアランスに寄与するかどうかを検証するため、BAT 欠損モデルマウス（*Ucp1*$^{Cre}$;*Pparg*$^{flox/flox}$）を作製し（図 1e）、寒冷刺激による血中 BCAA 濃度の変化を調べた。対象マウスでは、寒冷刺激による血中 BCAA 濃度の減少が認められたのに対し、BAT 欠損マウスでは変化しなかった（図 1f）。

これらの結果から、BAT やベージュ脂肪組織は適応性熱産生を起こすことにより、全身の BCAA 代謝を制御していることが明らかになった。

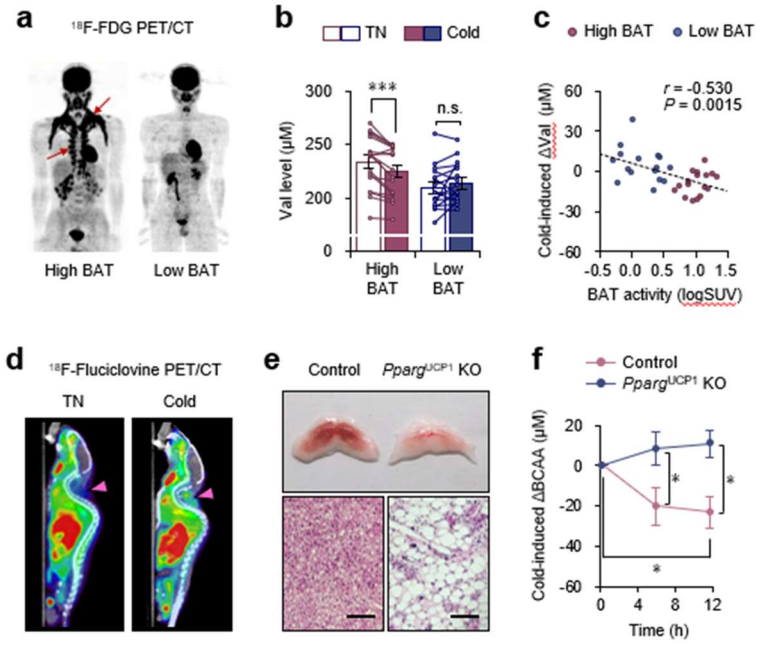


**図１．褐色脂肪とベージュ脂肪は血中 BCAA クリアランスに寄与する.**

a. ベージュ脂肪高活性者と低活性者の FDG-PET/CT 画像。鎖骨上窩部や傍脊椎部にベージュ脂肪による FDG 集積が認められる。b. 寒冷刺激前後の血中 BCAA（valine）クリアランス。c. ベージュ脂肪活性と寒冷誘導 BCAA 濃度変化の関係。d. Leucine 同位体（$^{18}$F-fluciclovine）を用いた PET/CT 画像。温熱中性域（TN, 30℃）または寒冷（Cold, 12℃）に 2 週間順化したマウス。e. 褐色脂肪組織（BAT）欠損マウス（*Ucp1*$^{Cre}$;*Pparg*$^{flox/flox}$）の BAT 組織像と HE 染色像。f. BAT 欠損マウスにおける寒冷誘導血中 BCAA クリアランス。

## 2. BCAA は BAT/ベージュ脂肪の熱産生に重要なエネルギー基質である

上記の結果から、BAT やベージュ脂肪が熱産生のために BCAA をよく消費することが明らかになった。次に、BAT とベージュ脂肪の熱産生において BCAA 代謝がどの程度、重要であるかを調べるため、BAT/ベージュ脂肪特異的に BCAA 代謝酵素（BCKDHA）を欠損するマウス（*Ucp1*$^{Cre}$;*Bckdha*$^{flox/flox}$）を作製した（図 2a）。この *Bckdha*$^{UCP1}$ KO マウスは、対照マウスに比べてノルエピネフリン（NE）誘導性 BAT 熱産生が低下しており、寒冷環境での体温維持能が低下していた（図 2b, 2c）。BCAA を経口投与し、寒冷刺激を行いながら BCAA のクリアランスを調べたところ、*Bckdha*$^{UCP1}$ KO マウスは BCAA クリアランスが有意に低下していた（図 2d）。以上の結果から、BAT やベージュ脂肪組織における熱産生には、従来から知られていた糖や脂肪酸に加え、BCAA の利用が重要であることが示された。

次に、BAT/ベージュ脂肪特異的な BCAA 代謝阻害が全身のエネルギー代謝に及ぼす影響を調べるため、*Bckdha*$^{UCP1}$ KO マウスに高脂肪食を 10 週間負荷し、体重変化および耐糖能を調べた。対照マウスに比べ、*Bckdha*$^{UCP1}$ KO マウスは高脂肪食誘導性の体重増加が大きく、耐糖能も有意に低下していた（図 2e, 2f）。これらの結果から、BAT/ベージュ脂肪組織における BCAA 代謝は、全身のエネルギーバランスと耐糖能の制御に役立っていることが明らかになった。

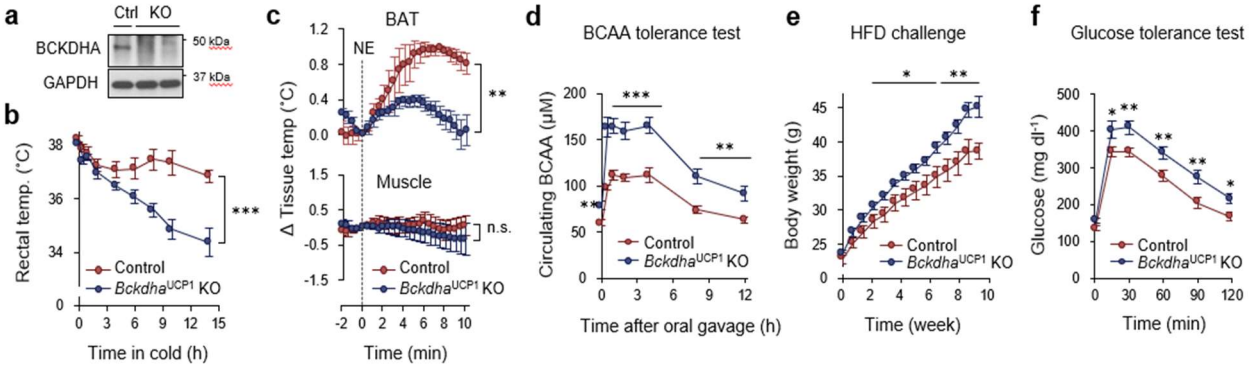


**図２．BAT/ベージュ脂肪組織特異的 BCAA 代謝阻害が熱産生、エネルギー代謝、耐糖能に及ぼす影響.**

a. BAT における BCAA 代謝酵素 BCKDHA の発現。b. 寒冷刺激（8℃）による *Bcdkha*$^{Ucp1}$ KO マウスの直腸温度変化。C. ノルエピネフリン（NE）i.p.投与による *Bcdkha*$^{Ucp1}$ KO マウスの BAT と骨格筋の組織温度変化。d. *Bcdkha*$^{Ucp1}$ KO マウスにおける BCAA 経口負荷（500 mg/kg）前後の血中 BCAA 濃度。経口投与後すぐに寒冷刺激を開始し、経時的に血液を採取した。e. 高脂肪食負荷による *Bcdkha*$^{Ucp1}$ KO マウスの体重変化。f. *Bcdkha*$^{Ucp1}$ KO マウスにおける i.p.グルコース負荷試験（高脂肪食負荷 10 週後）。

### 3. ミトコンドリア BCAA トランスポーターの同定

BAT/ベージュ脂肪におけるエネルギー基質の酸化と熱産生は主にミトコンドリアで行われる。ミトコンドリアで BCAA を代謝するためには、まず BCAA をミトコンドリア内に取り込む必要があるが、現在のところ、ミトコンドリアの BCAA トランスポーターは同定されていない。

我々は、ミトコンドリアに発現するキャリアーの中でもアミノ酸のトランスポーターではないかと想定されている Slc25a ファミリーに着目し、その発現量について、ヒトベージュ脂肪と白色脂肪の RNA-seq データセットを用いて解析した。その結果、*SLC25AX* が寒冷刺激応答性にベージュ脂肪組織特異的に発現上昇することが分かった（図 3a）。さらに、*SLC25AX* 発現量は *UCP1* や BCAA 代謝酵素（*BCKDHA*）の発現量と有意に正相関していた（図 3b）。

上記のヒトのベージュ脂肪サンプルにおける結果から、ミトコンドリア BCAA トランスポーターとして SLC25AX に焦点を絞り、CRISPR-Cas9 システムを用いて *Slc25ax* KO マウス褐色脂肪細胞株を作製した。*Slc25ax* KO 細胞からミトコンドリアを抽出し、放射線同位体アミノ酸を用いて取込みアッセイを行った。BCAA である valine と leucine の取込みは、対照細胞由来のミトコンドリアに比べて *Slc25ax* KO 細胞由来のミトコンドリアで減少した（図 3c）。一方、valine の代謝産物である KIV や、他のアミノ酸のミトコンドリア取り込みは対照細胞と *Slc25ax* KO 細胞の間に差が認められなかった（図 3c）。

これらの結果から、SLC25AX が BAT/ベージュ脂肪におけるミトコンドリア BCAA トランスポーターであると結論した。

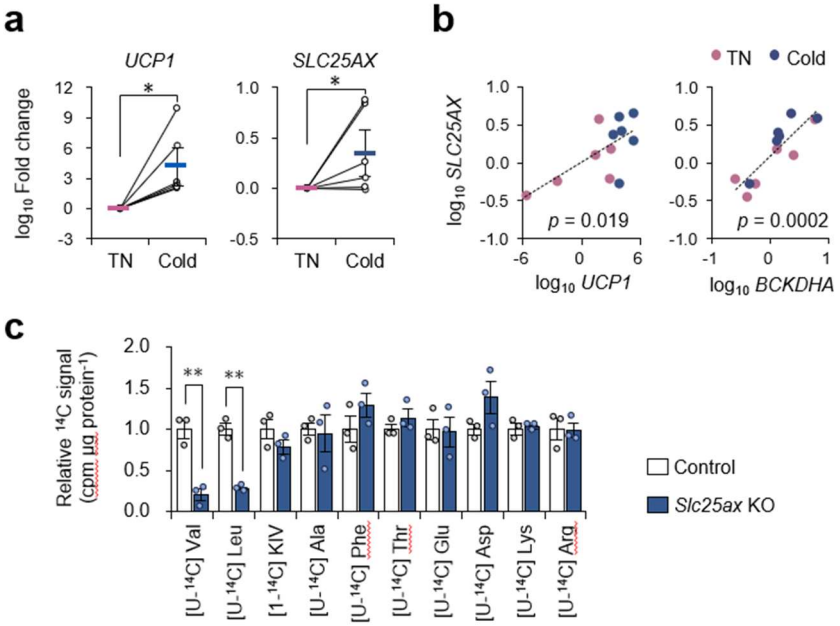


**図３．BCAA トランスポーターSLC25AX の発現パターンと機能.**

a. ヒトベージュ脂肪組織における熱産生分子 *UCP1* と *SLC25AX* の遺伝子発現と寒冷応答。C. *SLC25AX* 発現量と *UCP1*、*BCKDHA* 発現量の相関関係。d. *Slc25ax* KO マウス褐色脂肪細胞のミトコンドリアにおけるアミノ酸取込み。

### 4. BCAA トランスポーターSLC25AX の生理的役割

ミトコンドリア BCAA トランスポーターSLC25AX の生理的役割を調べるため、CRISPR-dCas9 KRAB トランスジェニックマウスと *Slc25ax* sgRNA トランスジェニックマウスをそれぞれ作製し、両者を掛け合わせることで *Slc25ax* ノックダウン（KD）マウスを作製した（図 4a）。次に、放射線性[1-$^{14}$C] valine を使用して BCAA 酸化活性を調べたところ、対照マウスに比べ、*Slc25ax* KD マウスでは BAT における BCAA 酸化活性が低下していた（図 4b）。この BCAA 消費の低下と一致し、NE 誘導性 BAT 熱産生も *Slc25ax* KD マウスで低下していた（図 4c）。さらに、*Slc25ax* KD マウスでは、対照マウスに比べ、寒冷環境下でより大きく深部体温が低下した（図 4d）。対照マウスは寒冷暴露により血中 BCAA が有意に低下したのに対し、*Slc25ax* KD マウスでは血中 BCAA クリアランスが起こらなかった（図 4e）。

次に、ヒトベージュ脂肪細胞株に *SLC25AX* shRNA を含んだレンチウイルスを感染させ、*SLC25AX* KD ヒトベージュ脂肪細胞を作製した。BCAA 代謝活性と熱産生活性を調べたところ、対照細胞に比べて、*SLC25AX* KD ヒトベージュ脂肪細胞では、BCAA 誘導性熱産生能が低下していた。

これらの結果から、ミトコンドリアトランスポーターSLC25AX を介した BCAA 代謝が BAT/ベージュ脂肪細胞の熱産生機能に不可欠であることが明らかになった。

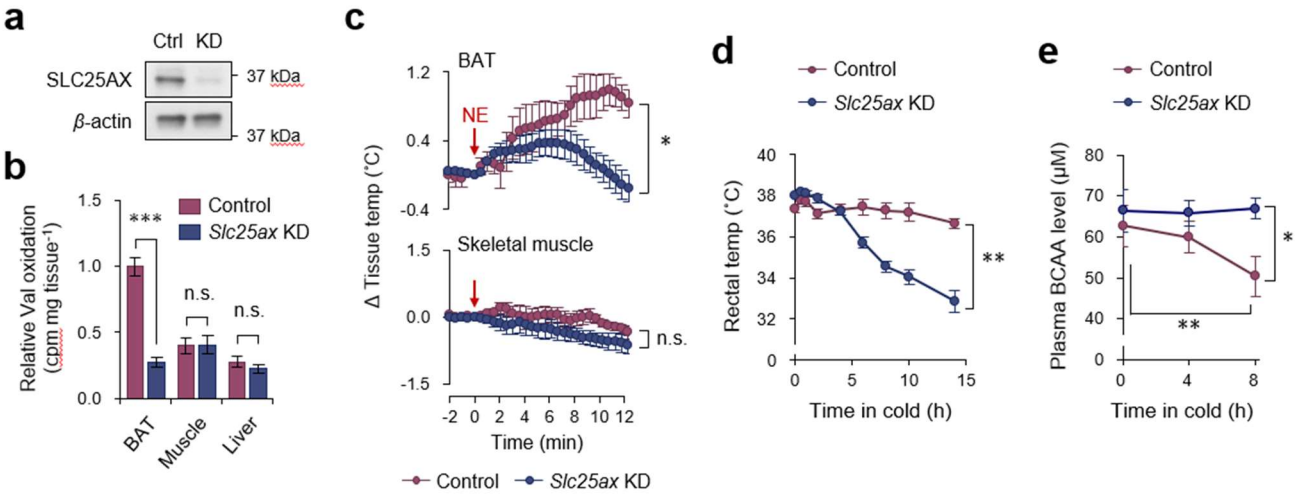


**図４．*Slc25ax* KD マウスにおける BCAA 代謝障害と BAT 熱産生能の低下.**

a. BAT における SLC25AX の発現。b. *Slc25ax* KD マウスの BAT、骨格筋、肝臓における[1-$^{14}$C] valine 酸化活性。c. ノルエピネフリン（NE）i.p.投与による *Slc25ax* KD マウスの BAT と骨格筋の組織温度変化。d. 寒冷刺激（8℃）による *Slc25ax* KD マウスの直腸温度の変化。e. *Slc25ax* KD マウスにおける寒冷誘導血中 BCAA クリアランス。

## ５．結論

以上の結果から、ヒトベージュ脂肪組織は熱産生を行うために BCAA を効率よく代謝し、この代謝活性によって血中 BCAA 濃度の調節に寄与していることが明らかになった。BCAA 代謝は BAT/ベージュ脂肪の熱産生能を維持するために必須であり、これを阻害すると食事性肥満と耐糖能異常を引き起こすことが判明した。さらに、ミトコンドリアキャリアーである SLC25AX が BCAA トランスポーターとして BAT/ベージュ脂肪における BCAA 代謝に不可欠であることが明らかになった（図 5）。

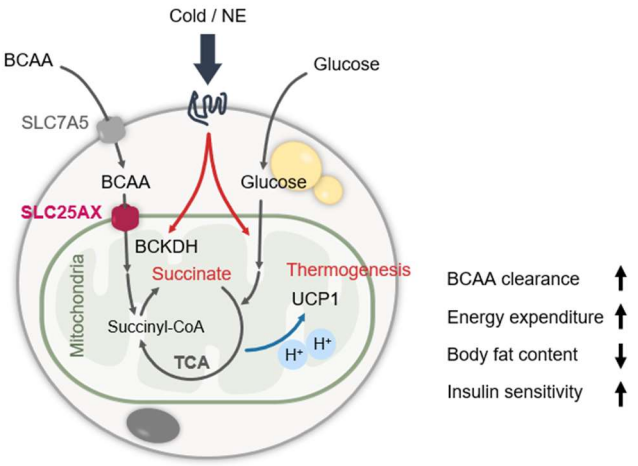


**図５．BAT/ベージュ脂肪における BCAA 代謝**

## ６．達成度

ヒト、マウス、細胞を用いた各実験で順調に結果が得られ、順調に進捗した。これまでに得られた成果の一部を、カリフォルニア大学サンフランシスコ校で行われたシンポジウムにて発表した。また、これまでの成果をまとめて原著論文として投稿中である。