

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	高 弼虎
<p>学位論文題目</p> <p>Repeated immobilization stress increased activity and expression levels of uncoupling protein 1 in Wistar rats 「脱共役タンパク質 (UCP1) 機能に及ぼす拘束ストレス負荷の影響」</p> <p>内海計、大日向浩、橋本真明、黒島晨汎</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>寒冷暴露、拘束など生体機能を攪乱する外部環境からの様々な刺激を受けた時、生体はホメオスタシスを維持するため神経系、内分泌系を動員した広範囲な一連の生理反応を引き起こす。黒島らの研究グループは、拘束負荷がラットの非ふるえ熱産生能を増強させると報告している。一日3時間金網で木板に固定する拘束ストレスを4週間反復負荷したラットでは、同週齢の対照群と比較して体重の増加が少ない事、更に、その耐寒性が改善された事を示し、非ふるえ熱産生能の増加によるものと推定した。</p> <p>体重と摂食に関連する中枢性調節機構はよく研究されており、各種のストレスによるそれらの中枢機構の変調についても比較的研究が進んでいる。体重はエネルギー収支で決まる事から、消費面の調節機構の研究も重要である。しかし、非温熱性刺激である拘束ストレスによる熱産生の分子機構は不明瞭である。ラットなどの小動物では褐色脂肪組織 (BAT) がエネルギー消費面の重要な効果器であるが、その効果器反応を支える熱産生の分子機構とストレスとの関係には不明な点が多い。</p> <p>非ふるえ熱産生の主要発現部位であるBATのミトコンドリアに特異的に発現する脱共役タンパク質 (UCP1) が、この組織の熱産生の機能分子として知られている。UCP1 機能は BAT に豊富に分布する交感神経により、その活性と発現量両面から調節される。拘束ストレスは交感神経活動を有意に高めることが知られている。従って、拘束負荷は UCP1 機能を促進すると考えられる。一方、拘束ストレスは副腎ホルモンの放出も強く刺激し、そのグルココルチコイドが UCP1 機能を強く抑制する事が報告されている。</p> <p>以上の事から、反復拘束ストレスはUCP1 機能を促進し BAT 熱産生能を増加させる事で耐寒</p>			

性の改善と体重増加量の減少に寄与したと推測される。この仮説を検証するため、本研究では急性と反復性に拘束負荷を加えたラットの UCPI 機能の変化を検討した。更に、拘束ストレス時の UCPI 機能に及ぼす副腎ホルモンの影響を副腎摘除ラットを用いて検討した。

材 料 ・ 方 法

実験 1：7 週令の Wistar 系雄ラットを無拘束対照群、一回拘束群、反復拘束群の 3 群に分け、自由摂食摂水、室温 25℃、相対湿度 50%、07:00 点灯—19:00 消灯の明暗環境条件下で飼育を開始、UCPI 機能に及ぼす拘束負荷の影響を検討した。全群の飼育期間は最も長い反復負荷群に合わせ、4 週間とした。各群の BAT 摘出までの履歴は次の通りであった。1) 無拘束 4 週間飼育後、屠殺、BAT を摘出 (無拘束対照群)。2) 無拘束 4 週間飼育、最後の 3 時間のみ拘束した直後に屠殺 (一回拘束群)。3) 毎日 3 時間の拘束を (日曜を除く) 4 週間続け、最終日は拘束せず、屠殺 (反復拘束群 1)。4) 毎日 3 時間の拘束を (日曜を除く) 4 週間続け、最後の拘束直後に屠殺 (反復拘束群 2)。拘束は毎日 10:00~13:00 の間に行った。飼育期間中の体重と摂食量を毎日測定した。

実験 2：10 週令の Wistar 系雄ラットを用い、偽手術群、副腎摘除群で拘束時 UCPI 機能に及ぼす内因性グルココルチコイドの影響を検討した。ラットをラボナールで麻酔し、副腎摘除群は両側の副腎を摘出、偽手術群は副腎は摘除せず摘除群と同様の手術を施した。副腎摘除群は手術後生理食塩水を飲ませた。手術から 48 時間後、各群の半数のラットに 3 時間の拘束負荷を加え、負荷終了直後に全ての動物を屠殺、BAT を摘出した。

いずれの実験においても、断頭屠殺後、肩胛骨間 BAT を素早く摘出し、UCPI 活性の指標として知られている GDP binding の測定と Northern 及び Western blotting による UCPI の mRNA 及びタンパク質の発現解析を行った。負荷終了直後の結腸温の測定と実験 2 では血中コルチコステロン濃度を測定した。

成 績

実験 1：実験最終日、反復拘束群の体重は無拘束対象群より有意に低い値 (80%) を示した。100g 体重あたりの摂食量は両群で差は見られなかった。一回拘束群、反復拘束群 1 および反復拘束群 2 の GDP binding は、いずれも無拘束対照群より有意に高い値を示した (180%、140%、220%)。急性拘束負荷による GDP binding の増加程度は一回拘束群に比べ、反復拘束群で有意に高かった。UCPI mRNA 発現量は急性拘束負荷により変化はしなかった。無拘束対照群、一回拘束群と比較して、UCPI mRNA 発現量は反復拘束群 1、反復拘束群 2 共に有意に増加した (140%、140%)。UCPI タンパク質発現量は、mRNA の発現パターンと同様の変化を示した。急性拘束ストレスによって全群のラットの結腸温は有意に上昇した。

実験 2：急性拘束負荷により血中コルチコステロン濃度は偽手術群で有意に増加した。副腎摘除群

では低レベルに保たれており、急性拘束でもその濃度に変化は見られなかった。偽手術群では、急性拘束により GDP binding が有意に増加した（140%）。副腎摘除群では偽手術群に比べ GDP binding の基礎レベルが有意に増加し（140%）、急性拘束によりその結合量はさらに増加した（170%）。偽手術群では、急性拘束ストレスによる UCP1 mRNA レベルに変化はなかった。一方、副腎摘除群では偽手術群に比べ UCP1 mRNA の基礎レベルは有意に増加し（110%）、急性拘束によりそのレベルはさらに増加した（130%）。急性拘束ストレスにより偽手術群のラットの結腸温は有意に上昇したが、副腎摘除群では変化しなかった。

考 案

BAT は寒冷暴露などの交感神経活動が亢進するような生理的条件下では熱産生を大幅に増加させ、体温維持や過食時の余剰エネルギーの散逸に寄与すると考えられている。本実験結果から、急性及び反復の拘束ストレス負荷はいずれも BAT 熱産生機能分子である UCP1 の活性を亢進させる事や、拘束ストレスの反復履歴は UCP1 の発現を増加させて UCP1 機能の更なる亢進に寄与する事が明らかになった。この UCP1 機能の亢進によって BAT 熱産生能が増大し、ラットの耐寒性増大に寄与すると考えられる。また、その UCP1 機能亢進によって大量のエネルギーが熱として散逸され得る事は、反復拘束負荷群の体重増加が小さかった原因の一つとなると考えられる。

更に、本研究の結果から、拘束ストレスによるラットの体温上昇に、UCP1 機能亢進が密接に関与すると考えられる。反復拘束負荷を経験したラットの UCP1 機能は、非経験群と比べて有意に高い事から、急性拘束負荷に対する体温上昇反応の程度は反復拘束群で高いと予測したが、有意な差は見られなかった。これは推定の域を出ないが、反復拘束を経験したラットでは熱放散が促進され、過度の体温上昇を抑えるよう機能しているのかもしれない。

本実験条件下では、急性拘束負荷によりグルココルチコイドの放出が促進されていた。また、副腎摘除ラットでは安静時の UCP1 機能が対照群より高く、急性拘束負荷に対する UCP1 機能亢進も増強されていた。これらの結果は、拘束負荷により分泌が促進される内因性グルココルチコイドは UCP1 機能に対して抑制的に働くことを示唆する。一方、副腎摘除ラットでは UCP 機能がより高いにもかかわらず、急性拘束による体温上昇が見られなかった。これは恐らく、内因性グルココルチコイドが糖新生を刺激することや、カテコラミンの血管収縮反応に許容的に作用し熱放散抑制を増強することなどが知られていることから、体温調節に対するそれらの機能が失われた事によるものであろう。

結 論

拘束ストレスはラットの UCP1 機能を高め、BAT 熱産生増大に寄与するものと考えられる。更に、このストレスの反復履歴は、UCP1 の活性及び発現の両面を修飾し、より熱産生能力を高めるものと推測される。このような BAT 熱産生能の増大が拘束負荷ラットに見られる耐寒性の改善と体重調節に寄

与するものと考えられる。




引用文献

1. Kuroshima, A., Y. Habara, A. Uehara, K. Murazumi, T. Yahata, and T. Ohno. Cross adaption between stress and cold in rats. *Pflugers Arch* 402: 402-8, 1984.
2. Lowell, B. B., and B. M. Spiegelman. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-60, 2000.
3. Nedergaard, J., V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, and B. Cannon. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504: 82-106, 2001.

参考文献

1. Kikuchi-Utsumi, K., Gao, B., Ohinata, H., Hashimoto, M., Yamamoto, N., and Kuroshima, A. Enhanced gene expression of endothelial oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 282: R623-R626, 2002;
2. Hashimoto, M., Gao, B., Kikuchi-Utsumi, K., Ohinata, H., Osborne GP. Arousal from hibernation and BAT thermogenesis against cold: central mechanism and molecular basis. *Journal of Thermal Biology* 27 (6), 503-515, 2002.

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	高 弼 虎
<p>審査委員長 高井 章 </p> <p>審査委員 坂本 尚志 </p> <p>審査委員 鈴木 裕 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Repeated immobilization increased activity and expression levels of UCP1 in Wistar rats</p> <p>「脱共役タンパク質(UCP1)機能に及ぼす拘束ストレス負荷の影響」</p>			
<p>褐色脂肪組織(BAT)は、球形で内膜のよく発達したミトコンドリアと脂肪滴の充満した細胞からなる産熱器官である。ヒトを含め多くの哺乳動物の出生直後に多く見られ、体温調節機能の発達に伴い徐々に退化するのが普通であるが、ネズミなど成体にかかなりの量が見出される場合も多く、寒冷馴化に伴って増加する。すなわち、動物を寒冷曝露するとこの組織に多く分布する交感神経の節後末端から分泌されるノルアドレナリンの作用のもとに、BAT ミトコンドリア内膜に特異的に存在する脱共役タンパク (UCP) が活性化され、プロトンチャネルとして働いてエネルギーが ATP 合成に使われる代りに熱となって放出され体温低下を抑制する。寒冷刺激が長く続くと UCP の新規合成が誘導されその量も増える。このように、寒冷曝露が BAT のはたらきを亢進させる最も普通で生理的な外的刺激と考えられるが、物理的拘束のような一見寒冷とは関係のない他のストレス性刺激でも交感神経を介して BAT が同様の反応を起し、寒冷馴化と似た変化を示す一種の交叉馴化 (cross acclimatization) の現象がみられることが、黒島らによって報告されている。今回の学位論文は、ラットにおけるこの種の交叉馴化に伴う BAT の変化を UCP の動態を中心に検討したものである。</p>			

実験 1： 7 週齢の雄 Wistar 系ラット（総計 62 匹）を用い物理的拘束の影響を調べた。4 週間にわたり日曜日を除く毎日 10:00 から 13:00 の 3 時間、金網固定により呼吸を除く随意運動を強く制限する拘束負荷を繰返すと、体重が 20%減少、UCP1 含量が 40%増加、UCP の GDP 結合能（UCP 活性化の度合を示す）も 40%増加するのが観察された。このような変化は、拘束刺激を反復した場合のみ観察され、1 回だけの刺激では有意な変化を見なかった。なお、拘束負荷ごとに直腸温が約 2 度上昇するのが観察され、負荷が熱産生を増加させることが確認された。

実験 2： 10 週齢の雄 Wistar 系ラット（総計 48 匹）を用い、拘束負荷に伴う反応への副腎摘出の影響を調べた。副腎摘出後 18 時間の動物では、UCP1 mRNA が通常の 113%に増加しており、1 回の拘束刺激を与えるとさらに 130%に上昇した。対照群のラットでは拘束刺激による mRNA の変化は見られなかった。副腎摘出ラットではまた、UCP の GDP 結合能が通常の 130%に高まっていた。なお、対照群の動物では、血中コルチコステロン濃度は 13 ± 2 ng/ml であり、これが 1 回の拘束刺激により 60%増加した。それに対し、副腎摘出ラットではコルチコステロンは測定限度以下であり、拘束刺激によっても変化しなかった。

このように、本研究により、反復拘束負荷が UCP の発現量と活性の両方を高めることがはじめて確認された。また、一般に拘束負荷のようなストレス性負荷で交感神経の緊張とともに高まることが知られている副腎皮質からのグルココルチコイド分泌が、交感神経とはいわば拮抗的にはたらいっていることがはじめて明らかになった。これは、ストレスに対する過度の応答が、生体を傷つけるのを防ぐ防衛反応の一種と見られる興味深い知見であり評価できる。

論文提出者は、3 名の審査員による個別の口頭試問においても、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、本人がこの領域に置いて十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。