熱産生組織・褐色脂肪組織の機能と増殖の調節因子に関する研究

研究課題番号　62480111

昭和63年度　科学研究費補助金（一般研究B）

研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者　黒島晨汎

（旭川医科大学医学部　教授）

研究組織

研究代表者：黒島晨汎　（旭川医科大学医学部　教授）

研究協力者：八幡剛浩　（旭川医科大学医学部　助手）

研究経費

昭和６２年度	５，０００　千円
昭和６３年度	１，５００　千円
計	６，５００　千円

研究発表

（1）学会誌等

1) Murazumi,K.,Yahata,T. and Kuroshima,A.,Effect of cold and immobilization stress on noradrenaline turnover in brown adipose tissue of rat,Jpn.J. Physiol.,37(4):601-607,1987.

2) Yahata,T,Murazumi,K. and Kuroshima,A.,Stress- and cold-induced adrenocortical responses in repetitively immobilized or cold-acclimated rats,Can.J. Physiol.Pharmacol.,65(7):1448-1451,1987.

3) Yahata,T. and Kuroshima,A.,Cold-induced changes in glucagon of brown adipose tissue,Jpn.J.Physiol.,37(5):773-782,1987.

4) Habara,Y. and Kuroshima,A.,Enhanced formation of cyclic AMP after cold acclimation in the rat,Jpn.J.Physiol.,37(6):1051-1056,1987.

5) Kuroshima,A.,Yahata,T. and Ohno.T.,Effect of noradrenaline on plasma hormones and metabolites in cold-acclimated rats,Jpn.J.Physiol.,38(2):199-207,1988.

6) Kuroshima,A. and Ohno,T.,Gangliosides and energy substrates in brown adipose tissue,Jpn.J.Physiol.,38(3):393-398,1988.

7) Yahata,T. and Kuroshima,A.,Metabolic cold acclimation after repetitive cold exposure in rat, Jpn.J.Physiol. 投稿中.

8) Kuroshima,A. and Yahata,T.,Noradrenaline induced changes in rat brown adipose tissue glucagon, Jpn.J.Physiol. 投稿中.

（2）口頭発表

1) Kuroshima,A.,Yahata,T. and Murazumi,K.,Metabolic and endocrine mechanisms in

cold acclimation under various conditions of cold exposure, 日本生理誌, 49 (8.9):595,1987(第64回日本生理学会大会,1987.4.1,千葉).

2) Yahata,T. and Kuroshima,A.,Brown adipose tissue(BAT) glucagon in cold and immobilization stress, 日本生理誌,49(8.9):595,1987(第64回日本生理学会大会, 1987.4.1,千葉)

3) Murazumi,K.,Yahata,T. and Kuroshima,A.,Effects of repetitive immobilization stress and cold acclimation on the catecholamine turnover of brown adipose tissue (BAT) and adrenocortical hormone secretion, 日本生理誌,49(8.9):596, 1987(第64回日本生理学会大会,1987.4.1,千葉)

4) 黒島晨汎, 八幡剛浩, 大野都美恵, 寒冷馴化ラットにおけるノルアドレナリン非ふるえ熱産生時のグルカゴンおよびグルコオルチコイド, 日生気誌, 24(Suppl.):65, 1987(第26回日本生気象学会総会,1987.11.17,京都)

5) 八幡剛浩, 黒島晨汎, 反復性間欠的寒冷暴露による寒冷馴化, 日本生理誌,49(11): 648-685,1987(第67回北海道医学大会生理系,1987.9.12, 札幌)

6) 八幡剛浩, 黒島晨汎, 反復寒冷暴露による寒冷馴化の成立と脱馴化, 日生気誌,24 (Suppl.):64,1987(第26回日本生気象学会総会,1987.11.17,京都)

7) Kuroshima,A.,What is thermal acclimation ?,日本生理誌,50(8.9):360,1988(第65回日本生理学会大会,1988.4.5,和歌山)

8) Kuroshima,A.,Yahata,T. and Ohno,T.,Correlation in hormonal secretions in non-shivering thermogenesis(NST),日本生理誌,50(8.9):610,1988(第65回日本生理学会大会,1988.4.5,和歌山)

9) Yahata,T. and Kuroshima,A.,Nonshivering thermogenesis(NST) and its controling mechanism in the neonatal rat, 日本生理誌,50(8.9):633,1988(第65回日本生理学会大会,1988.4.5,和歌山)

10) 八幡剛浩, 黒島晨汎, 褐色脂肪組織(BAT) 細片の酸素電極による酸素消費測定法の検討, 日本生理誌,50(11):722,1988(第68回北海道医学大会生理系,1988.9.10, 札幌)

11) 大野都美恵，黒島晨汎，寒冷馴化にろう熱産生器官・褐色脂肪組織のエネルギー基質とガングリオシド(G) の変化，日本生理誌,50(11):723,1988(第68回北海道医学大会生理系,1988.9.10. 札幌)

（3）出版物

1) 黒島晨汎，非ふるえ熱産生，新生理科学大系 22 エネルギー・体温調節の生理学（中山昭雄・入来正躬編集),pp.130-144，医学書院,1987.9.1.

2) Kuroshima,A.,Yahata,T. and Ohno,T.,Role of glucagon in nonshivering thermogenesis during cold acclimation,In " High-Altitude Medical Science (ed. by Ueda,G.,Kusama,S. and Voelkel,N.F.)",pp.366-370,Shinshu Universityity.1988.6.1.

3) Yahata,T.,Murazumi,K. & Kuroshima,A.,Effects of immobilization stress and cold on noradrenaline turnover in brown adipose tissue and adrenocortical responses in rats,In " High-Altitude Medical Science (ed. by Ueda,G.,Kusama,S. and Voeldkel,N.F.)",pp.366-370,Shinshu University,1988.6.1.

研究成果

1．はじめに

代謝性寒冷馴化の特性はふるえによらない熱産生，すなわち非ふるえ熱産生の促進である．その主要な発現部位は熱産生を専門に営む脂肪組織である褐色脂肪組織であることが明らかにされている．特に小型の恒温動物であるラット，マウスなどでは中等度の寒冷にたいする馴化により安静時代謝の２倍にも達する非ふるえ熱産生の促進が起こり，ふるえを完全に置換することができる．ヒトでもその程度は安静時代謝の２０％前後ではあるが，寒冷馴化により非ふるえ熱産生の促進が認められる．動物実験の結果はこの非ふるえ熱産生の１／２以上が褐色脂肪組織における熱産生によって賄われていることを示している．褐色脂肪組織は寒冷馴化により著しい組織増殖をみせ，個々の細胞の代謝活性も促進し全体としての熱産生能力の増強のもたらされることがその原因となっている．

このような寒冷馴化による褐色脂肪組織機能の変化の主な調節因子は交感神経から放出されるノルアドレナリンであることが明らかにされているが，さらに種々のホルモン性因子の関与が示唆されている．また生理的刺激によって褐色脂肪組織ほど著明な増殖を示す組織は他に例をみないが，その調節機構については明らかにされていない．

本研究では褐色脂肪組織の熱産生の調節因子としての可能性をこれまで検討してきた膵ホルモンのグルカゴンについて，非ふるえ熱産生の促進における意義をさらに究明するとともに，細胞膜の糖脂質・ガングリオシドの増殖調節因子としての可能性を検討した．

2．実験方法

実験動物はWistar系オスラットを使用したが，一部の実験ではモルモットを使用した．寒冷馴化は5 ℃で行い，温暖対照動物は25℃の室温で飼育した．

非ふるえ熱産生はノルアドレナリン(40 μ/100 ,腹腔内投与）による熱産生から推定した．in vitroにおける褐色脂肪組織の熱産生は約1 ㎜角に細切した褐色脂肪組織脂肪組織

のグルコースーウシアルブミン添加Krebs-Ringer phosphate buffer 中での酸素電極によって測定した．測定条件は約2-3 時間のpreincubation,37℃で行った．

他の実験方法については添付論文に記載されている．

3．非ふるえ熱産生と褐色脂肪組織グルカゴン

褐色脂肪組織のグルカゴンレベルは血漿レベルに比較して3－4倍高く，背頸部褐色脂肪組織は肩甲骨間褐色脂肪組織に比較して高いという部位による差が認められた．ノルアドレナリンのレベルについても同様であり，これは褐色脂肪組織の分化の程度が部によって異なっているためと考えられ．寒冷馴化は褐色脂肪組織グルカゴンレベルを上昇させた．上昇後のレベルも背頸部が肩甲骨部に比べて高い値を示した．急性寒冷暴露（-5℃,15 min)は血漿グルカゴンレベルを温暖対照群，寒冷馴化群でともに上昇させたが，褐色脂肪組織のグルカゴンレベルは温暖対照群でのみ上昇した（添付論文　1）．この結果はグルカゴンが褐色脂肪組織を標的組織として，血漿レベルより高い濃度で作用していることを示している．

ノルアドレナリンによって非ふるえ熱産生を最大に発現させると，同時に血漿グルカゴンレベルの上昇がみられる．その程度は寒冷馴化によって増強された（添付論文　2）．非ふるえ熱産生はノルアドレナリンとともに，ノルアドレナリンによって分泌を刺激されたグルカゴンによっても促進させられていると考えられる．

さらにノルアドレナリンによって非ふるえ熱産生が発現しているとき，血漿グルカゴンレベルの上昇に伴って褐色脂肪組織グルカゴンレベルの上昇も生じる（添付論文　3，Jpn.J.Physiol.に投稿中）．しかし血漿グルカゴンの場合と異なり，その上昇の程度は寒冷馴化によって影響を受けなかったが，寒冷馴化ラットの褐色脂肪組織グルカゴンレベルはやはり温暖対照群に比較して高いレベルを示した．

4．間欠的反復性寒冷暴露と褐色脂肪組織グルカゴン

1日6時間の寒冷暴露を4週間行う間欠的反復性寒冷暴露は非ふるえ熱産生を促進させることによって4週間の持続的寒冷暴露と同程度の寒冷適応を発現差せることができる．また褐色脂肪組織のグルカゴンレベルも上昇を示し，グルカゴンがこのタイプの寒冷馴化にも非ふるえ熱産生の促進を介して関与していることが推測される（添付論文　4，Jpn. J.Physiol.に投稿中）．

5．褐色脂肪組織のin vitro　熱産生とグルカゴン

寒冷馴化はノルアドレナリン，グルカゴンの熱産生作用に対する反応を増強することが明らかにされており，この現象はin situ の褐色脂肪組織でも認められ，非ふるえ熱産生の主要部位であることを示した実験結果と一致するものである．しかしラットの褐色脂肪組織から脂肪細胞を分離してin vitroで酸素消費量から熱産生を測定したこれまでの報告では寒冷馴化によってむしろノルアドレナリンに対する反応は顕著に抑制されることが示された．褐色脂肪細胞の分離過程で代謝活性の高い細胞は回収されるのが少ないという報告があるので，寒冷馴化した褐色脂肪組織では特にその程度が強いことによって反応が低くなったのではないかという可能性がある．そこで組織そのものを用いて実験を行うことで，in situ と同じ結果が得られるのではないかと考え，褐色脂肪組織の細片を用いて酸素電極によって酸素消費量を測定した．

Fig.1 に寒冷馴化ラット(CA)と温暖対照ラット(WC)の褐色脂肪組織のノルアドレナリンおよびグルカゴン(それぞれ 1 mg/ml) に対する最大反応を示した．組織でもこれまでの報告と同様に寒冷馴化によって反応の抑制がみられる．褐色脂肪組織ではアデノシンが代謝活性を抑制することが明らかにされている．ここで用いた標本でアデノシンが蓄積している可能性が考えられる．そこで予めadenosine deaminase を投与してからノルアドレナリン，グルカゴンの効果を検討した．しかしTable 1 に示すようにadenosin deaminaseの効果はみられなかった．

モルモットでは寒冷馴化によって褐色脂肪細胞のノルアドレナリンに対する反応が，in

situでの反応と同様に促進をみせたと報告されている．そこでラットの場合と同じ条件でモルモットで実験を行った．Table 2 はその結果であるが，寒冷馴化によって褐色脂肪組織のノルアドレナリン，そしてグルカゴンに対する反応は促進し，細胞レベルで得られた結果を確認できた．またグルカゴンに対する反応から，モルモットにおいてもグルカゴンが褐色脂肪組織，そして非ふるえ熱産生の促進の調節に働いていることが示唆された．この結果からモルモットの褐色脂肪組織の寒冷馴化によるin situ での現象をin vitroでも組織レベルで，あるいは細胞レベルで再現できるといえる．ラットでin situ とin vitro の結果が何故逆に現れるのかは明らかでなく，検討すべき問題である．この点の解明は褐色脂肪組織の機能調節について一層の知見を与えてくれるものと予想される．

6．褐色脂肪組織のガングリオシドの寒冷馴化および生後発達による変化

ノルアドレナリンやグルカゴンにより褐色脂肪組織は寒冷馴化にみられると同様の増殖をもたらすことが示されている．しかし増殖に関係する直接的な因子については明らかでない．最近膜成分の一つである糖脂質・ガングリオシドの研究が進み，この物質のレベルが細胞周期，細胞増殖，分化，癌化に伴い著明に変化することが明らかにされている．さらに細胞の増殖がガングリオシドによって抑制あるいは刺激されることが示されている．従って褐色脂肪組織の寒冷による増殖がこの物質によって調節されている可能性がある．

また褐色脂肪組織の体重当たりの重量は生後１－５日にかけて最大であり，その後漸減して成熟時には１／３程度に減少する．また機能についても，ミトコンドリアの酸化酵素であるチトクローム－Ｃ－オキシダーゼ，コハク酸デヒドロゲナーゼ，α－グリセロデヒドロゲナーゼの活性，褐色脂肪組織の熱産生能の指標であるミトコンドリアのGDP結合能なども生後高く，成熟後低下することが示されている．しかし成熟ラットを寒冷に純化させると以上にあげた褐色脂肪組織の指標が再び生後直後の高い値に近づくように変化してその機能を促進する，すなわち寒冷馴化は褐色脂肪組織に関して，組織としての幼若化といえる変化をもたらすといえる．従って褐色脂肪組織のガングリオシドについて，その

寒冷馴化による変化とともに，また生後発達に伴う変化をみることによって，この物質の意義を一層明確にすることができると考えられる．

そこで先ず褐色脂肪組織の薄層クロマトグラフィー（HPTLC)によるガングリオシドの測定について検討した．褐色脂肪組織では冷アセトンで脂肪をある程度除去してから通常のガングリオシド抽出を行うことがHPTLC でガングリオシドを検出測定するために必要であることが明らかにされた．この方法によって褐色脂肪組織のガングリオシドはGM3 が主要なものであり，寒冷馴化によりこのガングリオシドが肩甲骨間褐色脂肪組織の組織重量当たり，脂肪除去乾燥重量当たりで増加することが見い出された(添付論文　5）．

その後，ガングリオシドの発色法を改善してresorcinol- 硫酸試薬の代わりにresorcinol-塩酸試薬を使用することによって一層良好な検出ができることが分かったので，この方法でさらに検討を行った．その結果褐色脂肪組織の主要ガングリオシドがGM3 であること，寒冷馴化がそのレベルを上昇させることを確認した．さらに累代寒冷飼育によって非ふるえ熱産生能が一層促進していることが報告されているラットの褐色脂肪組織GM3 レベルも同程度の上昇をみせた（Fig. 2）．結果は褐色脂肪組織脂肪除去乾燥重量当たりでも同様であった．Fig. 3は生後の変化をみたものである．褐色脂肪組織の体重当たり重量は生後4日（409 ±10.5 /100 g)が最大で，生後2週後（265 ±5.7 /100)にかけて小さくなり，成熟した１２週齢ではG2±1.4 mg/100 gと1/7 から1/5 になった．GM3 レベルは生後4日，2週でFig. 3に示されているように12週齢に比べて高く，脂肪除去乾燥重量当たりでも同様であった．生後4日と2週齢の間には差がなかった．

現在ガングリオシドの機能に関しては確かなことは分かっていない．ガングリオシドのあるものは神経細胞，グリア細胞の増殖を刺激すること，またGM3 が肝の再生，肝癌などで増加することなどが報告されている．本研究で示された褐色脂肪組織の増殖や機能変化と関連したGM3 レベルの変化は，このガングリオシドが褐色脂肪組織の寒冷馴化による変化の調節因子として働いていることを推測させる．その機序は不明であるが現在までの知見から褐色脂肪組織に対する種々の調節因子の受容体を修飾することによって，特に細胞の増殖を制御している可能性が考えられる．今後さらに細胞膜レベルでの検討によっ

てガングリオシドの褐色脂肪組織における意義を解明する必要がある．

7．　結論

寒冷馴化の代謝特性である非ふるえ熱産生の主要部位は褐色脂肪組織である．その寒冷馴化による変化は細胞増殖と代謝活性の亢進であるり，主要な調節因子は交感神経から放出されるノルアドレナリンであることが明らかにされている．本研究の結果は膵ホルモンのグルカゴンがノルアドレナリンとともに褐色脂肪組織の熱産生の調節に関与していることを示すものといえる．また褐色脂肪組織のガングリオシドはGM3 が主要成分であることが明らかにされた．そして寒冷馴化，生後発達における褐色脂肪組織のGM3 レベルの変動からこの物質が褐色脂肪組織の増殖の調節制御因子として働いていることが推測された．

褐色脂肪組織の機能は多因子性の調節を受けており，その全貌を解明することが温度適応の機構を知る上に不可欠であると考えられる．

Table 1 Effect of adenosine deaminase(AD) on noradrenaline(NA)- and glucagon(G)-induced oxygen consumption of interscapular brown adipose tissue(BAT) from cold-acclimated rats.

	Oxygen consumption nM O_2/min/mg BAT			
	Basal	Δ 10 min after AD	Δ 10 min	Δ 20 min
I				
G (1 μg/ml) + AD (2 μg/ml) (9)	187 ± 25.2	6 ± 10.1	109 ± 20.6	118 ± 21.1
G (9)	154 ± 17.9	—	124 ± 35.6	117 ± 23.7
	NS		NS	NS
II				
NA (1 μg/ml) + AD (2 μg/ml)(8)	160 ± 31.9	1.9 ± 12.5	103 ± 16.7	105 ± 10.5
NA (8)	146 ± 22.8	—	99 ± 18.7	92 ± 18.9
	NS		NS	NS

Number in parentheses indicates the number of animals. NS : not significantly different.

Table 2 Effect of noradrenaline(NA) and glucagon(G) on oxygen consumption of interscapular brown adipose tissue(BAT) in warm controls(WC) and cold-acclimated(CA) guinea pigs.

	Body weight (g)		BAT weight		Oxygen consumption (nM O_2/min/mg BAT)		
	Initial	At experiment	mg	mg/100g	Basal	Δ10 min	Δ20 min
A. NA (1 μg/ml)							
I WC (10)	362 ± 10.3	595 ± 13.4	4422 ± 516.1	732 ± 79.4	76 ± 18.3	60 ± 8.2	96 ± 15.6
II CA (10)	368 ± 6.4	498 ± 10.7	2439 ± 235.4	485 ± 40.2	133 ± 18.3	328 ± 44.1	345 ± 55.6
P vs WC	NS	<0.001	<0.02	<0.02	NS	<0.001	<0.001
B. G (1 μg/ml)							
I WC (10)					65 ± 10.9	68 ± 9.9	64 ± 16.0
II CA (10)					124 ± 29.5	205 ± 26.1	217 ± 27.1
P vs WC					NS	<0.001	<0.001

Legends are same as in Table 1.

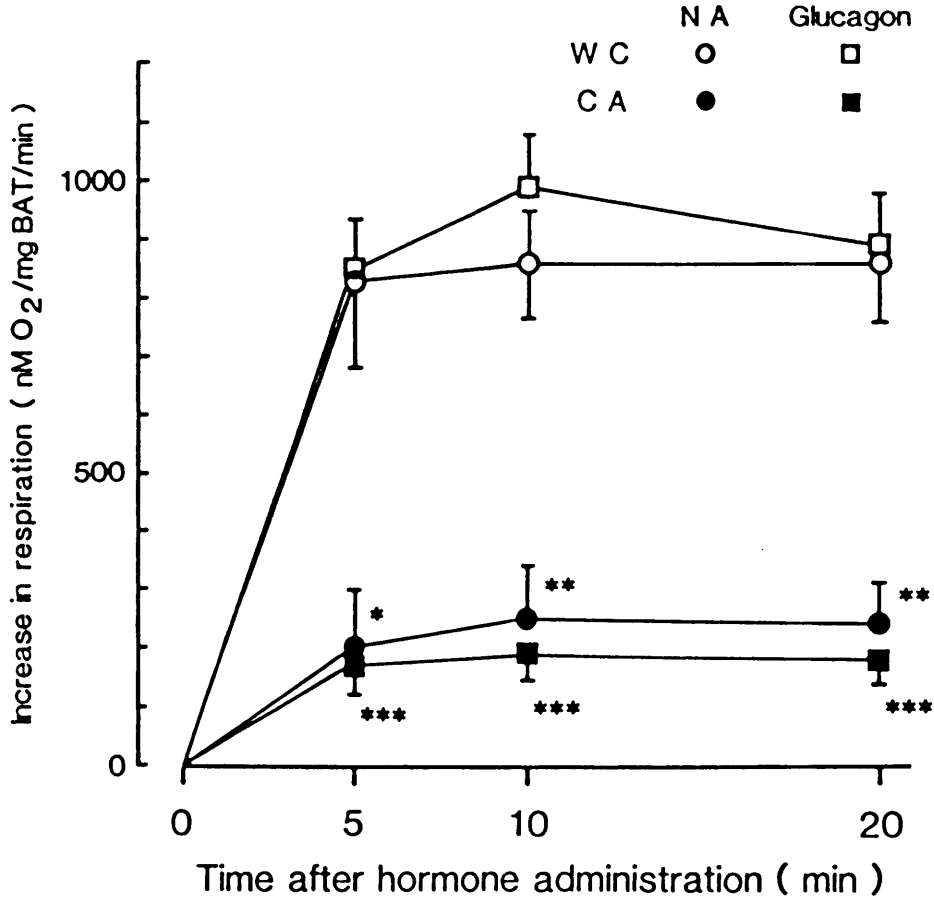

Fig. 1 Effect of noradrenaline (NA) and glucagon on oxygen consumption of interscapular brown adipose tissue (BAT) in warm controls (WC) and cold-acclimated rats (CA). NA and glucagon: 1 μg/ml.

*, **, ***: p vs WC <0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

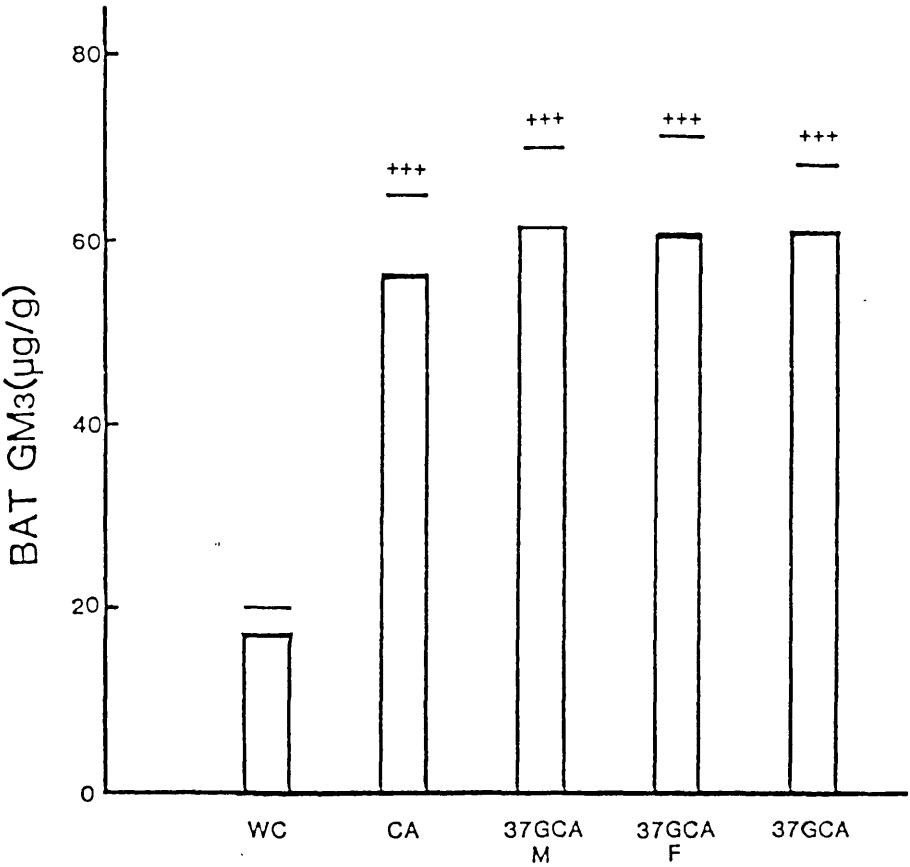

Fig. 2 GM_3 level of interscapular brown adipose tissue (BAT) (μg/g fresh weight) in warm- and cold-exposed rats.

WC: warm controls, CA: cold-acclimated rats, 37GCA: rats reared in cold for 37 generations.

M: male, F: female

***: p vs WC <0.001.

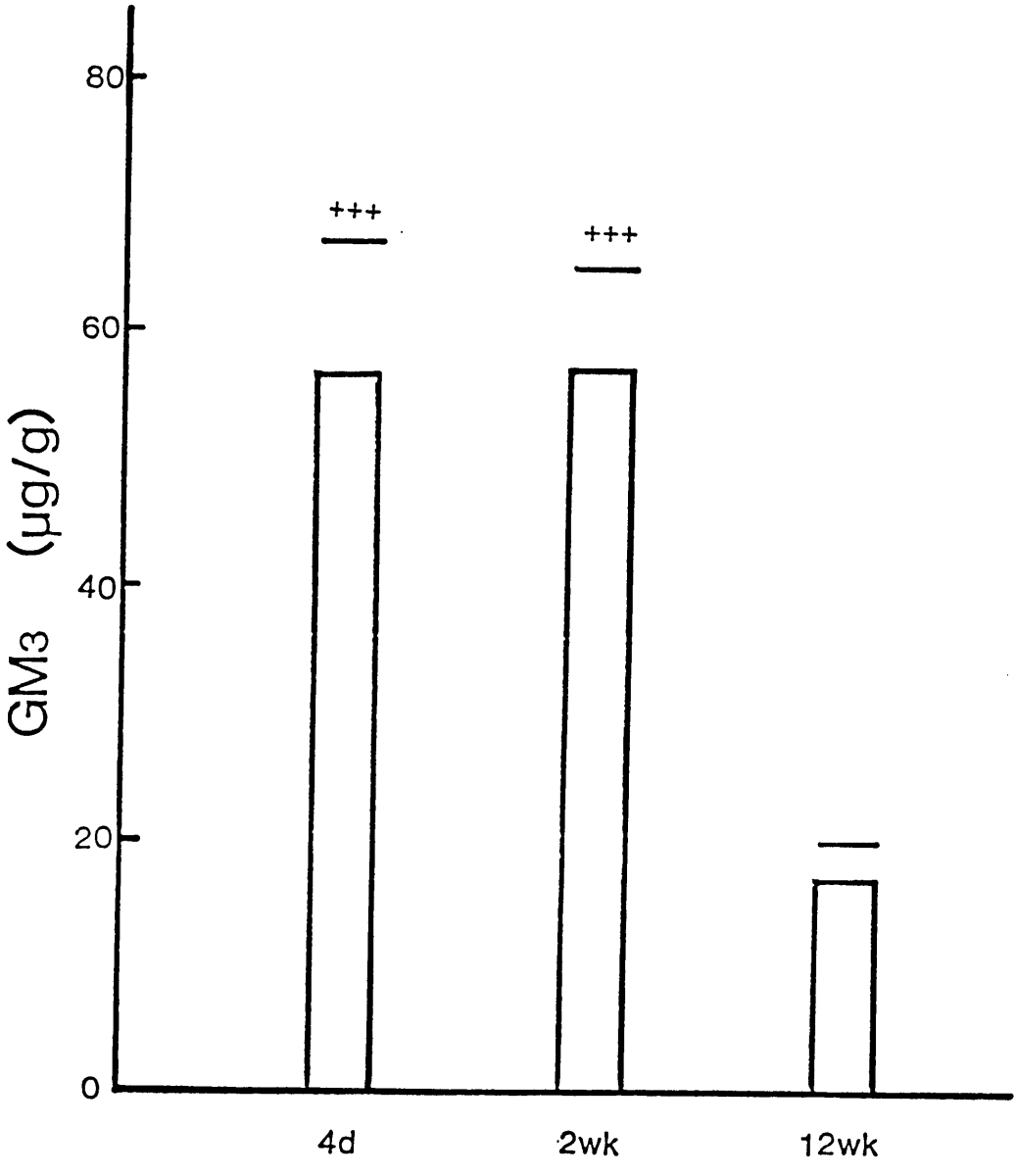

Fig. 3 GM_3 levels (μg/g fresh weight) of BAT at different days after birth in rats.

Legends are the same as in Fig. 2

d: days, wk: weeks.