

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34423

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07446

研究課題名(和文)新規褐色脂肪化因子による褐色脂肪化メカニズムの解明と応用基盤の確立

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism of brown adipogenesis by a novel regulator of brown adipocyte differentiation and establishment of its application base

研究代表者

楠堂 達也 (KUSUDO, Tatsuya)

帝塚山学院大学・人間科学部・准教授

研究者番号：00460535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満はメタボリックシンドロームの基盤となっており、その予防・治療法の開発が急務となっている。褐色脂肪細胞はエネルギーを燃焼する特殊な機能を持つ細胞であり、抗肥満対策法として期待されている。本研究では、我々が発見した新規褐色脂肪化因子CREG1について、その褐色脂肪化メカニズムの解明と生理作用の検討を行い、CREG1が甲状腺ホルモン系に作用する事、褐色脂肪化だけでなく抗肥満作用、耐糖能改善作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is emerging as a major public health problem. Since obesity is a predominant risk factor for metabolic syndrome, to provide effective approaches for prevention and treatment of obesity are strongly desired. Brown adipocytes specialize in dissipating energy as heat. Therefore, utilizing brown adipose tissue is attracting attention as a new therapeutic strategy for the treatment of obesity. We have identified CREG1 as a novel regulator of brown adipogenesis. In this study, we investigated the mechanism of brown adipogenesis by CREG1 and revealed that CREG1 exerts its function through the thyroid hormone system. Furthermore, we clarified that CREG1 has an anti-obesity effect on high-fat diet-induced obesity and improves glucose tolerance.

研究分野：食品生化学、分子生物学

キーワード：CREG1 褐色脂肪

1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームの基盤となっており、その予防・治療法の開発が急務となっている。脂肪組織にはエネルギーの蓄積に働く白色脂肪組織とエネルギーの消費に働く褐色脂肪組織が存在する。数年前まで褐色脂肪組織は、新生児には豊富に含まれるものの成人では生理的に意味のある量は存在しないと考えられてきた。しかし、近年、褐色脂肪組織が成人においても生理的に機能しているだけでなく、その減少が肥満や糖尿病の原因となることが明らかとなり、褐色脂肪の活性化、増量、及び白色脂肪組織の褐色脂肪化は画期的な肥満対策法として期待されている。

これまでの所、ヒトの褐色脂肪組織を活性化する方法として寒冷暴露やカプシノイド類の摂取などが報告されている。しかしながら、褐色脂肪組織量は個人差が非常に大きく、これらの方法は褐色脂肪組織が十分にある人には有効であるが、褐色脂肪組織を殆どもたない人には有効とはいえない。また、褐色脂肪組織量は肝心の肥満者や高血糖者で少なく、また、加齢に伴い減少することも報告されている。従って、抗肥満対策として褐色脂肪組織を用いるためには、褐色脂肪化のメカニズムを解明し、食品などの摂取しやすい形で提供する必要があり、そのターゲット分子の探索は必要不可欠である。我々は鼠蹊部脂肪組織が顕著に褐色脂肪化した表現型をもつ遺伝子改変マウスの解析から、その原因分子として分泌型糖タンパク質である Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (以下 CREG1) を発見した。その後の研究から CREG1 は *in vitro*、*in vivo* の両方で褐色脂肪化因子として働くことが示され、褐色脂肪化、抗肥満のターゲット分子として非常に有望であると考えられた。

2. 研究の目的

エネルギーを消費する褐色脂肪組織の活性化や白色脂肪組織の褐色脂肪化は、抗肥満の新戦略として期待されている。上記のように、申請者らは分泌型糖タンパク質 CREG1 に褐色脂肪化作用があることを見出した。CREG1 は分泌型の糖タンパク質であることから、その応用可能性は非常に高く、機能的にも物性的にも抗肥満のターゲットとして理想的な条件を有している。そこで本研究では CREG1 の作用メカニズム、及び生理作用について検討し、応用化に向けた研究基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養と分化

C3H10T1/2 細胞の褐色脂肪細胞への分化、及び 3T3-L1 細胞の白色脂肪細胞への分化は、定法に従った。遺伝子発現解析は培養細胞から抽出した total RNA より cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法により測定した。甲状腺

ホルモン除去血清は血清を AG1-X8 樹脂 (Bio-rad) で処理することにより作製した。

(2) レポーターアッセイ

UCP1 プロモーターを pGL4.21 に挿入し、レポータープラスミドを作製した。本プラスミドと各種転写関連遺伝子、および CREG1 を COS7 細胞に導入した。24 時間後に培地を交換し、48 時間後に細胞を溶解し UCP1 プロモーター活性を測定した。薬剤を処理する場合には、トランスフェクション 24 時間後の培地交換の際に試薬を添加し、さらに 24 時間後に細胞を溶解し UCP1 プロモーター活性を測定した。

(3) T3、T4 測定

CREG1 安定発現 C3H10T1/2 細胞を甲状腺ホルモン除去血清を含む培地でサブコンフルエントにまで培養した。100 nM T4 を含む培地に交換し 48 時間培養した後、褐色脂肪細胞への分化を誘導し 7 日目に細胞を回収した。回収した細胞を PBS にて洗浄した後、PBS に懸濁し超音波処理を行った。20,000 x g で遠心し、上清を別のチューブに移し、内部標準 (T3-¹³C、T4-¹³C) を加えた。アセトニトリルを加え攪拌後、さらに酢酸エチルを加え攪拌した。20,000 x g で遠心し、上清を別のチューブに移して減圧乾燥した。作製したサンプルを 50%メタノールに溶解し、4000 QTRAP LC-MS/MS システムによって定量した。

(4) CREG1 相互作用タンパク質の探索

His タグ融合 CREG1 発現ベクターを COS7 細胞にトランスフェクションした。培養上清を回収し、硫酸沈殿、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムによって CREG1 を精製した。精製したタンパク質を Ni カラムに結合させ CREG1 固定化カラムを作製した。CREG1 固定化カラムに、分化した C3H10T1/2 細胞の膜画分、細胞質画分、核画分を供した。カラムを洗浄後、イミダゾールによって結合タンパク質を溶出した。回収液を、LC-MS/MS、ウエスタンブロッティングによって解析した。

(5) 浸透圧ポンプを用いた CREG1 タンパク質の長期投与試験

マウスは C57BL/6J に高脂肪食を 16 週間摂取させた食事誘導性肥満マウスを用いた。(4) と同様の方法で調整した精製 CREG1 を Alzet Osmotic Pump に充填し、麻酔下でマウス背部皮下に埋め込んだ。4 週間後に解剖し、組織重量、遺伝子発現量を検討した。

(6) 脂肪細胞特異的 CREG1 発現マウスの解析

aP2 プロモーター制御下で CREG1 を発現させる脂肪組織特異的 CREG1 発現トランスジェニック (CREG1-Tg) マウスを高脂肪食によって飼育し、体重増加、組織重量、遺伝子発現量を検討した。

4. 研究成果

(1) CREG1 による褐色脂肪化メカニズムの解明

① CREG1 と甲状腺ホルモン系との関り

CREG1 による褐色脂肪化メカニズムを明らかにするために、UCP1 プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、CREG1 の発現は UCP1 プロモーター活性を有意に上昇させることが示された。CREG1 は DNA 結合ドメインや転写制御ドメインを持たないことから、UCP1 プロモーターの活性化には、細胞内シグナルの活性化や、他の転写関連因子との協調が必要である。そこで、CREG1 と協調的に作用する転写関連因子の探索を行った。PPAR α 、PPAR γ 、E2F1、E2F4、DP1、RB、THR α 、THR β をそれぞれ CREG1 と共発現させレポーターアッセイを行った。その結果、甲状腺ホルモン受容体である THR α 、THR β の共発現が CREG1 による UCP1 プロモーターの活性化をさらに上昇させることが示された。甲状腺ホルモンは褐色脂肪化の必須要素であることから、CREG1 による褐色脂肪化には甲状腺ホルモン系が大きく関与していることが明らかとなった。

上記の結果より、CREG1 が甲状腺ホルモン系に関与することが示されたことから、CREG1 と甲状腺ホルモン受容体との直接的な相互作用を検討した。免疫沈降法によって両者の相互作用を検討した所、THR α 、及び THR β と CREG1 の相互作用を示す結果は得られなかった。

次に CREG1 と甲状腺ホルモンとの関係を明らかにするために、甲状腺ホルモン除去血清を用いた分化実験を行った。C3H10T1/2 細胞を甲状腺ホルモン除去血清で培養し分化誘導を行った。分化7日目に細胞を回収し遺伝子発現を検討した所、甲状腺ホルモン除去下では UCP1 や褐色脂肪化関連遺伝子の発現は顕著に減少した。しかしながら、CREG1 を発現させた細胞ではこれらの遺伝子の発現はコントロール細胞と比較して顕著に上昇し、多くは甲状腺ホルモンを含む培養条件下と同等レベルの発現量を示した。従って、CREG1 は甲状腺ホルモンの働きを代償する作用を有する可能性が示された。

CREG1 が甲状腺ホルモンの代償作用を有することが示されたが、実験に使用した甲状腺ホルモン除去血清中には活性型甲状腺ホルモンである T3 はほぼ完全に除かれているものの、非活性型の T4 はわずかながらに残っている。そこで、CREG1 が細胞内での T4 から T3 への変換を促進する可能性があるのではないかと考え、LC-MS/MS を用いた細胞内甲状腺ホルモンの測定を行った。その結果、分化前、分化後のいずれにおいても細胞内 T3、T4 濃度に差は認められなかった。

② 細胞特異性の検討

①の結果より、CREG1 は甲状腺ホルモン系に作用することが示唆されたが、CREG1 の作

用は褐色脂肪、白色脂肪を問わず脂肪細胞全般的な分化促進作用を有する可能性がある。そこで、白色脂肪細胞の培養細胞である 3T3-L1 を用い CREG1 の作用を検討した。siRNA による CREG1 発現抑制実験、及びレトロウイルスを用いた CREG1 の発現実験、共に 3T3-L1 細胞の分化にほとんど影響を与えなかった。従って、CREG1 は脂肪細胞全般的な分化促進作用は有さず、甲状腺ホルモン系に作用することにより褐色脂肪細胞特異的な作用を発揮することが明らかとなった。

③ CREG1 相互作用タンパク質の探索

CREG1 の作用メカニズムを明らかにする上で、相互作用分子の情報は非常に重要である。そこで CREG1 と相互作用する分子を網羅的かつ大量に取得することを目的とし、精製 CREG1 を用いた固定化カラムの作製を行った。作製したカラムに細胞抽出液を供し、洗浄後、吸着分子を溶出した。溶出液を SDS-PAGE で展開した所、図1に示す様に CREG1 固定化カラムに吸着する分子が複数確認された。回収された分子を LC-MS/MS、及びウエスタンブロッティングにより解析したところ、転写関連因子を含む複数の分子が確認され、メカニズムの解明における重要な候補分子を得ることができた。

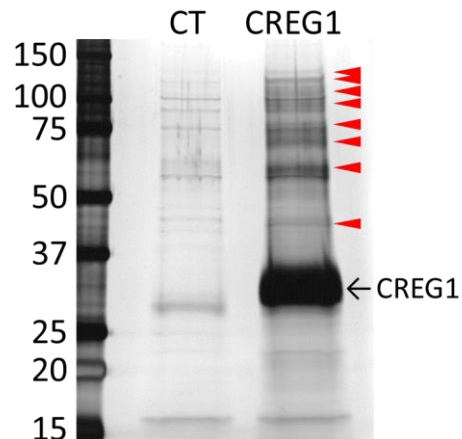


図1. 溶出フラクションの SDS-PAGE 展開像

(2) 個体レベルでの CREG1 の生理作用の検討

① 浸透圧ポンプを利用した CREG1 タンパク質の長期投与試験

高脂肪食によって食事誘導性肥満を呈した C57BL/6J マウスの背部皮下に精製 CREG1 タンパク質を充填した浸透圧ポンプを埋め込み1ヶ月間飼育することで、肥満に対する CREG1 タンパク質の効果を検討した。その結果、CREG1 投与群ではコントロールの PBS 投与群と比較して摂食量に差は認められなかったものの、体重増加の有意な抑制が認められた。組織学的解析を行った所、脂肪細胞のサイズの減少と鼠蹊部皮下脂肪組織における褐色脂肪化像が認められた。また、投与3週間後にグルコース負荷試験を行った所、PBS 投与群と比較して CREG1 投与群では耐糖

能に改善が認められた。さらに、CREG1 投与群においては高脂肪食摂食による脂肪肝の顕著な改善が認められた。以上の事から、CREG1 は抗肥満作用を有することが示され、抗メタボリックシンドロームの有力なターゲットとなることが示された。

② 脂肪細胞特異的 CREG1 発現マウスの解析

脂肪細胞特異的に CREG1 を発現する CREG1-Tg マウスを用い、脂肪細胞における CREG1 の働きを個体レベルで解析した。普通食摂取下では CREG1-Tg マウスは野生型マウスと比べ、摂食量、体重増加量、共に差は認められなかった。一方、高脂肪食摂食下では摂食量に差は認められなかったものの、CREG1-Tg マウスは野生型マウスと比べて体重増加量が有意に抑制されていた。組織学的解析から、CREG1-Tg マウスにおいては脂肪組織の褐色脂肪化が促進されていた。従って、脂肪組織における CREG1 の発現上昇により褐色脂肪化が促進され、その結果、エネルギー消費が増加し、体重増加が抑制されたと考えられた。

以上の研究より、CREG1 は甲状腺ホルモン系に作用することで褐色脂肪化作用を発揮するというメカニズムの一端が明らかとなった。また、動物実験から、CREG1 の投与や CREG1 の産生を促進することは抗肥満対策の有効な手段となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 橋本理尋、楠堂達也、竹内環、遠藤優貴、山下均、脂肪組織特異的 CREG1 トランスジェニックマウスを利用した褐色脂肪化促進と生活習慣病改善の検討、BIOMEDICALGERONTOLOGY(基礎老化研究)、2016、40(3):35-38、査読無

〔学会発表〕(計9件)

- ① 橋本理尋、楠堂達也、竹内環、山下均、生体内における CREG1 の褐色脂肪化促進作用の検討、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017/12
- ② 楠堂達也、橋本理尋、竹内環、遠藤優貴、山下均、白色脂肪組織の褐色脂肪化における CREG1 の役割、温熱生理研究会 2017、愛知、2017/8
- ③ Hashimoto M.、Kusudo T.、Takeuchi T.、Ohmi Y.、Yamashita H.、Study of pathophysiological role of CREG1 protein using aP2-CREG1 transgenic mice. 第 40 回基礎老化学会、愛知、2017/6
- ④ 遠藤優貴、橋本理尋、竹内環、楠堂達也、岡田只、山下均、CREG1 の抗肥満作用に対する環境温度の影響について、第 39 回日本分子生物学会年会、神奈川、2016/11
- ⑤ 楠堂達也、橋本理尋、竹内環、遠藤優貴、

山下均、新規な褐色脂肪化誘導因子・分泌糖タンパク質 CREG1、温熱生理研究会 2016、愛知、2016/8

- ⑥ 橋本理尋、楠堂達也、竹内環、遠藤優貴、山下均、脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスによる褐色脂肪化と生活習慣病改善の検討、第 39 回基礎老化学会、三重、2016/5
- ⑦ 岡田 只士、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、橋本 理尋、西沢 祐治、山下 均、個体レベルにおける分泌型糖タンパク質 CREG1 の作用、第 88 回日本生化学会第 38 回日本分子生物学会合同大、兵庫、2015/12
- ⑧ 楠堂 達也、片岡 直哉、橋本 理尋、岡田 只士、山下 均、褐色脂肪化における分泌糖タンパク質 CREG1 の作用の検討、第 36 回日本肥満学会肥満学会、大阪、2015/10
- ⑨ 楠堂 達也、遠藤優貴、片岡 直也、橋本理尋、岡田 只士、山下 均、分泌型糖タンパク質 CREG1 の褐色脂肪化作用、第 20 回アディポサイエンスシンポジウム、大阪、2015/8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠堂 達也 (KUSUDO, Tatsuya)

帝塚山学院大学・人間科学部・准教授

研究者番号：00460535