

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14513

研究課題名(和文) 化学変化を捉える顕微鏡法の開発と脂質代謝研究への応用

研究課題名(英文) Innovation and application of lipid metabolism imaging

研究代表者

宮内 崇行 (Miyuchi, Takayuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：00392142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂質代謝を可視化する手法の開発と、肥満糖尿病を抑制するアクアポリン7 (AQP7) 依存性脂質制御シグナリングの解明を目的とした。脂肪組織及び培養脂肪細胞において脂肪の合成と分解および脂質動態を無染色に高感度ライブイメージングでき、また、AQP7 が白色脂肪細胞の脂質代謝制御蛋白質を制御し、脂肪の合成と分解の量を変えていることが分かった。当該の機能は脂肪細胞のカテコールアミン誘導脂肪分解においてもマウス個体においても確認された。脂肪細胞によるエネルギー代謝の恒常性の維持、および各種ホルモン放出で全身代謝を制御するにおいて関与すると示唆された。知見は薬剤開発に応用していく計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色脂肪組織の脂肪細胞は、脂肪の合成蓄積と分解放出により全身のエネルギー代謝の恒常性を担い、かつ各種ホルモンを放出することで全身の代謝制御に関与する。脂肪代謝を改善させる手段として、脂肪の合成蓄積と分解放出とのバランスに係る経路の重要性が本研究により明らかになった。ヒトの白色脂肪細胞において当該のバランス調整経路を制御する薬剤の、糖尿病への治療効果、さらにはがんや精神神経疾患の治療や予防への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed techniques of imaging for fat metabolism in tissue and single cells, and found the mechanism of fat storage modulation by AQP7. The generation and degradation of triglycerides are regulated by the dynamic subcellular localization of AQP7 in mouse white adipose tissue and single adipocytes. The expression and localization of the adipocyte proteins are controlled by the AQP7 signaling. AQP7 is centrally involved in lipid storage management supported by the observation that AQP7-null mice exhibit marked hypertrophy of adipose tissue, obesity and diabetes. We recently found that AQP7 was relocalized from the plasma membrane to intracellular regions during catecholamine-induced lipolysis in white adipocytes. These functions suggested a potential treatment for metabolic disorders: the pharmacological modulation of the AQP7-mediated lipid storage regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質代謝 脂肪細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪組織の脂肪細胞は、脂肪の合成蓄積と分解放出により全身のエネルギー代謝の恒常性を担保している。脂肪細胞は脂肪滴を内包し、脂肪滴を成長または縮小させることで脂肪の合成蓄積と分解放出を遂行する。脂肪滴の表面に局在化している脂肪滴関連蛋白質が脂肪の制御に重要で、合成と蓄積を促進するものと、反対に、脂肪分解を促進して脂肪滴を小さくする因子が存在することが近年の活発な研究により明らかにされてきた。脂肪の調整に重要なのは合成蓄積と分解放出とのバランスであり、いわばアクセル / ブレーキの連携の乱れは代謝異常疾患 (2 型糖尿病 etc.) に直結する。それにもかかわらず、蓄積と分解とを橋渡しするシグナル伝達経路には謎が多く、脂肪コントロールのミッシングリンクである。

アクアポリン 7 (AQP7) は、水の選択的チャネルであるアクアポリン蛋白質ファミリーの中のアクアグリセロポリンと呼ばれるサブファミリーに属し、水分子だけでなく、グリセロールなど電気的中性な小分子を透過させる蛋白質である。AQP7 ノックアウトマウスが糖尿病病態と白色脂肪組織脂肪細胞の肥大を示すことは、AQP7 がインスリン抵抗性や体脂肪の過剰蓄積を防ぐ分子であることを示唆している。ところが、白色脂肪組織の血管に AQP7 が発現していることの関与は示唆されてきたものの、どのように機能を発揮するかというメカニズムが不明で、(null マウスにおいて顕著に肥大する) 脂肪細胞において AQP7 が働く細胞内の領域がわからず脂肪コントロール研究の大きな謎であった。

2. 研究の目的

生体組織細胞内のどこでどれだけ代謝が行われるかを可視化すれば、代謝異常を伴う疾患の理解に有用であるものの、現状でその可

視化は困難であることを踏まえ、本研究ではまず、代謝をサブ細胞レベルに検出する手法を開発し、新イメージング手法を、体脂肪の蓄積および分解を制御する蛋白質の機能解析に応用することとした。

体脂肪コントロールの研究は AQP7 の発現プロファイルの同定からスタートさせ、結果、マウス白色脂肪組織の脂肪細胞に AQP7 が発現していること、さらに脂肪分解の際にダイナミックな細胞内局在変化が起こることが分かった。このような知見が示唆するのは、AQP7 が脂肪制御蛋白質に直接的に作用し作用されること、すなわち脂肪代謝を AQP7 およびそのシグナル伝達経路への干渉により制御する可能性である。脂肪細胞は、栄養の安定的供給を担い、かつ、多様な生理活性因子 (アディポサイトカイン: 一般的に善玉ホルモンや悪玉ホルモンと呼ばれる) を送り出す内分泌器官として働いており、脂肪制御蛋白質への関与は、ヒトを含めた動物個体の健康増進をもたらし得る。

AQP7 依存的な脂肪代謝制御シグナル伝達機構の解明、および AQP7 シグナリングで働く分子を制御するメカニズムの探索を脂肪組織における代謝解析の中心に置き、発展的に脂肪蓄積の恒常性維持方法の同定や代謝異常を伴う疾患の克服への貢献を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

主たるマテリアル: 白色脂肪モデル 3T3-L1 細胞、Cos7 細胞、AQP7 ノックアウトおよびコントロールマウス. 技術: coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 顕微鏡、超分解顕微鏡.

新イメージング手法の開発 = 培養細胞に脂肪滴形成を誘導して、脂肪蓄積と分解における代謝の現象を可視化した; 新イメージング手法の定量性検定; 体脂肪の蓄積と分解を制御するシグナル経路を細胞生物学的手

法で探索した。

4. 研究成果

(1) CARS 顕微鏡の応用により、増減する脂肪を無染色で可視化し、脂肪細胞モデル培養細胞やマウス脂肪組織白色脂肪細胞の脂肪滴の経時的变化を測定、さらに蛍光イメージングと組み合わせることにより、細胞内蛋白質のダイナミックな挙動と脂肪の合成分解を同時に観察した。観察対象とする分子の選定、背景光を抑制する手法の開発や細胞内局在を調べる方法の開発が重要であった。

(2) AQP7 の脂肪組織における発現プロファイルの同定を目的に、抗体組織染色の高感度化を行った。染色方法の最適化を試み、脂肪組織の取り出し方など生体組織の扱い方法を検討するとともに、固定法のスクリーニングを進めた。結果、有効な固定化法の同定をはじめ高感度を獲得させることが出来て、白色脂肪組織脂肪細胞に AQP7 は発現し、その細胞内局在は主に細胞膜であることを確認した。

(3) 続いて生きた培養細胞、そこから発展させて、マウス脂肪組織の細胞生物学的研究を可能にする観察技術の開発を進めた。組織の細胞を生かしたまま脂肪分解を刺激して脂肪代謝を可視化できる脂肪組織培養法も最適化した。マウス脂肪組織における AQP7 局在の刺激依存的な変化を調べる上で、脂肪組織を構成する個々の細胞に与える刺激の強度を、厳密にコントロールするのは困難であることが大きな問題であった。ダメージがほとんどない状態で脂肪組織の代謝をライブイメージングし、さらに脂肪細胞内の分子の局在変化を観察することを可能にした。

(4) 上述(1-3)と超解像顕微鏡法を含めた蛍光イメージングの組み合わせにより、AQP7

がカテコールアミン(ノルアドレナリン等)刺激の下流で局在変化することが分かった。さらに cAMP 産生を亢進するフォルスコリンの投与によっても、AQP7 局在変化が惹起された。故に、脂肪細胞において、protein kinase A (PKA) 活性化の下流で変化する因子を上流制御因子の候補として、AQP7 局在に影響を与えるものを探索することとした。

(5) モデル脂肪細胞 3T3-L1 と遺伝子導入による誘導脂肪滴を作らせた Cos7 細胞を用いた。AQP7 の局在を変化させるものを探索したところ、comparative gene identification 58 (CGI-58) を見出した。

(6) CARS 顕微鏡にて、細胞内の H₂O が D₂O (重水) に交換される際の速度測定により、細胞膜に局在化する AQP7 量変化を検出した。これは AQP7 が水チャンネルとして機能するのを利用している。水交換の速度定数を統計解析すると、CGI-58 および AQP7 発現依存的に、モデル脂肪細胞の水透過性は有意に変化する。AQP7 の細胞内局在制御が確かめられ、また内在性 AQP7 の局在変化を捉えることが可能になった。

(7) 細胞生物学的手法により、脂肪滴のサイズ、個数、細胞 1 つに蓄積される脂肪の量が変化するかどうかを検討した。結果、AQP7 シグナリング関連蛋白質の働きが、脂肪の蓄積量を有意に変化させることを観察した。大きなオルガネラほど大きな影響を受けると考えられた。AQP7 を含むシグナル伝達経路を介して脂肪蓄積を抑制するメカニズムが存在すること、AQP7 ノックアウトマウス表現型から考えられる AQP7 のインスリン抵抗性や体脂肪の過剰蓄積を抑制する機能は、当該のシグナル伝達経路によって発揮されると示すことが出来た。AQP7 の局在変化の上流、下流においてそれぞれ、脂肪細胞内の

蛋白質配置を動かす複合体も同定した。

脂肪細胞は脂肪滴を内包し、脂肪滴を成長または縮小させることで脂肪の合成蓄積と分解放出を遂行しているが、AQP7 が脂肪細胞蛋白質の局在変化と分解により変調させるのは、合成蓄積と分解放出であると明らかに出来た。当該の AQP7 機能は、培養脂肪細胞のカテコールアミン誘導脂肪分解においても、マウス個体においても観察された。

白色脂肪組織の脂肪細胞は、脂肪の合成蓄積と分解放出により全身のエネルギー代謝の恒常性を担保し、かつ各種ホルモンを放出することで全身の代謝制御に関与しており、本研究で得られた白色脂肪細胞の細胞内情報伝達についての知見を、健康増進に有用な薬剤開発に今後繋げていく計画である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Huang, P., Takai, Y., Kusano-Arai, O., Ramadhanti, J., Iwanari, H., Miyauchi, T., Sakihama, T., Han, J. Y., Aoki, M., Hamakubo, T., Fujihara, K., Yasui, M. & Abe, Y.

The binding property of a monoclonal antibody against the extracellular domains of aquaporin-4 directs aquaporin-4 toward endocytosis.

Biochemistry and Biophysics Reports 7, 77-83 (2016)

DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.05.017

(査読有)

(2) Shibata, A., Uchida, K., Kodo, K., Miyauchi, T., Mikoshiba, K., Takahashi, T., & Yamagishi, H.

Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis.

Heart Vessels., 34, 724-734 (2019)

DOI: 10.1007/s00380-018-1304-4

(査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○ 取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

www.water-channeling-life.com

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮内崇行 (Takayuki Miyauchi)
慶應義塾大学・先導研究センター医学部信
濃町・特任講師
研究者番号：00392142

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

該当無し