

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13061

研究課題名(和文) 加齢に伴う脂肪組織のアディポカイン分泌の変動とサルコペニア肥満との関連性について

研究課題名(英文) Relationship between sarcopenic obesity and changes in adipokine secretion from adipose tissues with aging

研究代表者

服部 秀美(Hattori, Hidemi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80508549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢化社会を迎え、サルコペニア肥満などの加齢性疾患の増加が問題になっている。本研究では、サルコペニア肥満発症の原因の解明のため、脂肪細胞と筋芽細胞の相互作用による筋分化抑制及び脂肪分化の促進の作用メカニズムを検討した。加齢に伴い、脂肪組織のadipokineの発現は上昇し、それは脂肪細胞によるものではなく、免疫細胞に大きく影響を受けることが明らかとなった。また、筋分化においては、IGFのコントロールが重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the super-aging society, the increase in the incidence of age-related diseases such as sarcopenic obesity becomes a problem. To elucidate the pathogenic mechanisms of sarcopenic obesity, the relationship of inhibition of myogenic differentiation with promotion of adipogenic differentiation by the interaction between adipocytes and myoblasts was examined in the study. The expression levels of adipokines in adipose tissues increased with aging and were influenced by immunocytes, not by adipocytes. Myogenic differentiation was controlled by insulin-like growth factor expression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪細胞 筋芽細胞 アディポカイン マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の総人口の 27.3%が 65 歳以上の高齢者であり、2025 年には 30%を超えると予想されている(平成 29 年版高齢社会白書:内閣府)。超高齢化社会を迎え、サルコペニアやメタボリックシンドロームなどの加齢性疾患者の増加が問題になっている。サルコペニアとは、進行性・全身性の骨格筋量及び骨格筋力の低下を特徴とする症候群のことであり、それに肥満が伴うとサルコペニア肥満といわれる。現在、高齢者の約 3 割がこのサルコペニア肥満に該当するといわれ、40 歳以上の 4 人に 1 人がサルコペニア肥満もしくはその予備軍と言われている。サルコペニアは日常生活に支障をきたし、転倒から寝たきり状態になることもある。高齢者は内臓脂肪が蓄積しやすく、サルコペニア肥満と糖尿病をはじめとする各種疾病の罹患率とが関連することから、サルコペニア肥満の予防・治療対策が重要な課題となっている。

サルコペニア肥満の原因は、加齢によるホルモン分泌の低下、幹細胞数の減少、インスリン様成長因子(IGF)などの成長因子の分泌減少や炎症性アディポカインの作用によるといわれているが、詳細はよく分かっていない。IGF-1 は筋芽細胞・筋細胞に対して筋タンパク質の合成を導き、それにより骨格筋が肥大し成熟することから、骨格筋の維持・増量にとって重要な因子である。一方、脂肪組織から分泌される炎症性アディポカインは、骨格筋量減少の要因となっている。しかし、脂肪組織と骨格筋における炎症性アディポカインの作用、そして加齢による IGF の分泌量低下が筋分化及び脂肪分化にどの様に影響を与えるのかについては不明である。また、筋組織再生には IGF の作用が重要であるが、細胞外に存在する IGF のほとんどは単独で存在しておらず、IGF 結合タンパク質(IGFbp)と結合し、この IGFbp が IGF の作用をコントロールしているといわれる。

2. 研究の目的

本研究では、IGF-1 とアディポカイン、マイオカインに着目し、脂肪組織(脂肪細胞)と骨格筋(筋芽細胞)の相互作用による筋分化抑制及び脂肪分化の促進の機序を解明することによって、サルコペニア肥満発症の原因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス: 通常のマウスとして C57BL/6 を、肥満糖尿病マウスとして C57BLKS/J *lar*-*Lepr*^{db}/*Lepr*^{db}を使用した。

(2) 筋芽細胞: C2C12(理化学研究所バイオリソース研究センター)を使用した。増殖培地として、10%牛胎児血清(FBS)含有

Eagle's Minimal Essential Medium(E-MEM)もしくは Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(low glucose 及び high glucose)を使用した。条件によって、fibroblast growth factor(FGF)-2 を添加した。

(3) 筋分化: C2C12 の増殖培地の FBS 濃度を 2%にした培地を使用し、筋分化を誘導した。条件によって、fibroblast growth factor(FGF)-2 を添加した。

(4) 脂肪組織由来間質細胞(ASCs)の調整: マウス鼠蹊部の脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼタイプ I による処理で細胞を採取した。この細胞を脂肪組織由来細胞として用いた。脂肪組織由来細胞を 10%FBS 含有 DMEM で 3 継代培養し、大量培養した細胞を ASCs として用いた。

(5) 血清の調整: 上記 3.(4)の脂肪組織を摘出する際に、イソフルラン麻酔下で心臓採血を行い、キャピジェクトを使用し遠心分離によって血清を得た。

(6) 脂肪細胞への分化: プレートに細胞を播種し、脂肪細胞分化誘導培地(20 µg/ml インスリン、1.0 µM デキサメサゾン、0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、0.5 mM インドメタシン、10%FBS 含有 DMEM (high glucose))及び脂肪細胞維持培地(20 µg/ml インスリン、10%FBS 含有 DMEM high glucose))で 3 日おきに交互に培地交換することによって、脂肪細胞に分化させた。

(7) 血清及び培養上清中に含まれる増殖因子及びサイトカインを Bio-Plex 及び ELISA によって測定した。

(8) 筋管形成能については、抗 myosin heavy chain(MHC)抗体及びジアミノベンジジンを使用した免疫染色によって画像化し、画像解析によって定量した。

(9) 各 mRNA の発現は、細胞から抽出した total RNA から cDNA を作製し、RT-PCR によって定量した。

(10) C2C12 に対する siRNA のトランスフェクションは、XfectTM RNA Transfection Reagent を使用した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病マウスの血中アディポカインと筋管形成能

8 週令及び 15 週令の肥満糖尿病マウスの血中アディポカインを定量し比較した。週令が上がると炎症性アディポカインである IL-6、MCP-1 濃度が増加したが、adiponectin、leukemia inhibitory factor や、加齢と共に発現が低下するといわれる IL-2、IL-4、IGF-1 濃度には大きな変動はなかった。さらに糖尿病マウスの皮下脂肪組織中に存在する筋繊維様細胞の筋管形成能について *in vitro* で評価したところ、8 週令よりも 15 週令のマ

ウスの方が、MHC を発現する筋管の形成が少ない傾向が観察された。これらの結果は、既知の報告と同じであり、炎症性アディポカイン発現とその作用機序については、今後も検討する必要がある。

(2) 若齢・高齢マウス及び糖尿病マウスの脂肪組織由来細胞及び ASCs からのアディポカインの分泌

それぞれのマウスから採取した脂肪組織由来細胞 (passage 0) を 2 日間培養した。その上清中のアディポカインを定量したところ、若齢マウスより糖尿病マウスの方が、複数のアディポカインの分泌量が著しく高かった。また、ASCs が分泌するアディポカイン量を測定したところ、若齢及び糖尿病マウスともに脂肪組織由来細胞よりも多くの炎症性アディポカインの分泌量が低下したが、低下率は糖尿病マウスの方が高かった。初代培養 (passage 0) の脂肪組織由来細胞には炎症細胞が多く含まれ、それを継代することにより炎症細胞が除去されたと考えられる。フローサイトメトリーの解析によっても、どの細胞群においても脂肪組織由来細胞の 50%以上が血球系細胞であったが、3 継代すると血球計細胞は 0%となった。よって、脂肪組織の炎症細胞が炎症性アディポカインの分泌に影響を与えていると考えられた。IGF-1 の分泌量も同様に定量したところ、若齢及び糖尿病マウスともに脂肪組織由来細胞よりも脂肪組織由来間質細胞の方が低くなったが、低下率については同程度であった。IGF-1 の分泌には、炎症細胞の影響と別の機序があるのではないかと示唆された。

(3) FGF-2 による C2C12 の筋及び脂肪分化に対する影響

FGF-2 は、脂肪分化を促進させる作用を有するとの報告がなされている。そこで、FGF-2 の C2C12 に対する筋分化及び脂肪分化の影響を調べた。C2C12 の継代時及び分化誘導時に FGF-2 を添加し、脂肪細胞分化誘導培地及び脂肪細胞維持培地で培養したところ、C2C12 の継代時に FGF-2 を添加した場合において、わずかな細胞が脂肪細胞に分化したが、多くの細胞は筋管を形成した。FGF-2 が C2C12 において脂肪細胞への分化を促すことは見出せなかった。また、FGF-2 が筋分化と連動して発現する IGF の発現に対しても影響を与えることはなかった。グルコースの取り込みにはインスリンが大きく作用しており、筋分化及び脂肪分化ともにグルコースの取り込みによって分化が促進される。脂肪細胞分化誘導及び脂肪細胞維持培地にはインスリンが添加されており、FGF-2 がこのインスリンの作用を脂肪分化へと導くことなく、本来

の性質である筋への分化を促進したと考えられた。

(4) C2C12 における筋分化前後の IGF と IGFbps の発現変化

C2C12 の筋分化前後の IGF と IGFbps の mRNA の発現変化を調べた。分化前よりも分化後において IGF の発現が上昇した。また、IGFbp5, 6 においては、筋分化前後で発現が変わらなかったが、IGFbp2, 4 は、筋分化後に発現が上昇した。siRNA によって C2C12 の IGFbp2, 4 の発現をノックダウンした後、筋分化を誘導させた。その筋分化能について mRNA の発現レベルで検討したところ、ノックダウンによる筋分化の発現マーカーに変動は見られなかった。

(5) 培地条件で異なる筋分化

培地の違いによる C2C12 の筋分化能の影響を検討した。筋分化誘導 7 日後の筋分化マーカーの mRNA 発現を調べたところ、DMEM (low glucose 及び high glucose) 使用した場合と比べて、EMEM を使用した場合において、筋分化マーカー (MyoD, MHC) 及び IGF の発現が高くなった。また、C2C12 は、継代数が少ない細胞群ほど筋管形成能が高くなる傾向が観察された。さらに、マイオカインである IL-6 と myostatin の mRNA の発現を調べたところ、IL-6 の発現は筋分化とは相関がなかったが、myostatin は筋分化が進むほど、その発現が高くなった。この結果から、筋分化が促進されると共に筋肉の発達を抑制する myostatin の発現も亢進されたことから、筋肉の質を調べるためには、筋分化の発現だけでなく、抑制する myostatin の発現も調べることが重要ではないかと示唆された。

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1件)

(1) Masayuki Ishihara, Satoko Kishimoto, Shingo Nakamura, Koichi Fukuda, Yoko Sato, Hidemi Hattori, A review article on biomaterials as cell carriers for augmentation of adipose tissue-derived stromal cell transplantation, Bio-Medical Materials and Engineering, 2018. in press.

[学会発表](計2件)

山口貴史、今西陽亮、江藤望、服部秀美、高濃度のグルコース存在下におけるフルクトースの脂肪組織由来幹細胞の脂肪分化に与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会、

2018年3月15-18日、名城大学（名古屋市）

服部秀美、石原雅之、創傷治癒における脂肪組織由来間質細胞と炎症細胞との相互作用、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月17-20日、京都女子大学（京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 秀美 (HATTORI HIDEMI)

宮崎大学・農学部・応用生物科学科・准教授

研究者番号：80508549