

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：25503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18954

研究課題名(和文) 体内時計による脂肪細胞分化始動調節に着目した生活習慣病の発症機序の解明

研究課題名(英文) Evaluation of a mechanism of lifestyle-related diseases focusing on the initiate-regulation of adipocyte differentiation by the clock system

研究代表者

牛島 健太郎 (Ushijima, Kentaro)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：70448843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた基礎研究において、entinostatを投与したob/obマウスでは脂肪細胞の細胞径分布が小さい細胞へシフトしてインスリン感受性が改善すること、これらの変化はDBPタンパク質の増加を介したPpar- (脂肪細胞分化のレギュレーター)の発現上昇に起因するものと考えられた。ヒト内臓脂肪組織を用いた研究においても、Dbp およびPpar- のmRNA発現量は、2型糖尿病患者の方が非糖尿病患者よりも有意に低値であり、マウスの内臓脂肪組織と同様の変化であった。このような2型糖尿病患者と非糖尿病患者間の違いは大網脂肪組織で認められたが、腸間膜脂肪組織では認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂肪細胞の分化調節における時計遺伝子Dbpの役割が明らかとなった。また、糖尿病における内臓脂肪内Dbp発現量の低下はマウスのみならず、ヒト内臓脂肪組織(大網脂肪)においても同様に観察された。これらの成果は、体内時計による恒常性維持機構の理解に新たな知見を与えるものである。今後、Dbp発現量を上昇させる手法を開発することで、新たな糖尿病の治療方法を開拓できると期待できる。また、糖尿病患者の内臓脂肪組織においてDbp発現が低下している主要原因を明らかにすることで、新たな病態解明や疾患発症リスクを提唱できる。

研究成果の概要(英文)：The animal experiments using ob/ob mice showed that the distribution of adipocytes was shifted to a smaller cell size and insulin sensitivity was improved by entinostat. These changes were considered to be due to the increased expression of Ppar- (regulator of adipocyte differentiation) mediated by the increase of DBP protein. In a study using human visceral adipose tissue, mRNA expressions of Dbp and Ppar- were also significantly lower in type 2 diabetic patients than in non-diabetic patients. These observations were similar to those in animal experiments. Such a difference between type 2 diabetic patients and non-diabetic patients was observed in omental adipose tissue, but not in mesenteric adipose tissue.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 インスリン感受性 脂肪細胞分化 前駆脂肪細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の様々な生理機能には約 24 時間を 1 周期とする概日リズムが存在しており、“時計遺伝子”と呼ばれる遺伝子群により厳密に制御されている。生体リズムの異常、すなわち時計遺伝子の異常は癌や心血管疾患などの発症に密接に関連しているものと考えられている。時計遺伝子の 1 つである *Clock* の変異マウスがメタボリックシンドローム様症状を呈することが報告され (Turek et al. *Nature*, 2005)、それ以降、生活習慣病と体内時計の関連性について多くの研究が行われた。近年の疫学調査によると、交代勤務者では脂質代謝だけでなくインスリン感受性も悪化していることが明らかにされており (Esquirol et al. *Chronobiol Int*, 2012)、体内時計による糖代謝制御機構が存在するものと推察される。

申請者らはこれまでに、糖尿病モデルマウス (*ob/ob* マウス) の末梢臓器における時計遺伝子発現異常は、エピゲノムレベルでの異常 (H3 ヒストンのアセチル化レベルの低下) に起因すること、このエピゲノム異常を是正することによりマウスのインスリン感受性が改善することを明らかにした (Ishikawa-Kobayashi et al. *Chronobiol Int*, 2012)。この時、*ob/ob* マウスのエピゲノム異常は脂肪組織において顕著であり、薬物投与に反応した時計遺伝子は、*PAR-bZIP* (proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper) に分類される遺伝子群 (*Dbp*, *Tef* および *Hlf*) であり、その中で特に *Dbp* 遺伝子の反応が顕著であった。したがって、体内時計による糖代謝制御には脂肪組織における *Dbp* 遺伝子が重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、「脂肪組織における *PAR-bZIP* 時計遺伝子の異常が糖代謝異常を引き起こす」ことを作業仮説として、以下の検討を行う。

- (1). これまでの検討から、*PAR-bZIP* 時計遺伝子は分化促進因子の発現を増加させることにより、脂肪細胞の分化を始動させるものと考えられる。マウスおよび培養細胞を用いた基礎研究により、前駆脂肪細胞から脂肪細胞へ分化する過程における *PAR-bZIP* 時計遺伝子の作用点を明らかにする。
- (2). 外科手術の際に摘出されたヒト内臓脂肪を用いて、マウスでの検討と同様に、糖尿病を合併している患者の脂肪組織では *PAR-bZIP* 時計遺伝子の発現が低下しているか否か明らかにする。また、*ob/ob* マウスで認められたヒストン修飾異常が *PAR-bZIP* 時計遺伝子の発現異常の普遍的な要因であるのか否かも明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. マウスを用いた検討

3-1-1. *ob/ob* マウスのインスリン感受性に及ぼす *entinostat* の影響

8 週齢 *ob/ob* 雄性マウスに *entinostat* (HDAC クラス I 特異的阻害薬) または *vehicle* (5% DMSO) を 1 日おきに腹腔内投与し、投与開始 24 日目にインスリン負荷試験を実施した。この負荷試験は、7:00(ZT0)および 19:00(ZT12)の 2 時点で実施したが、それぞれ異なるマウスを使用した。続いて 25 日目に投薬後、26 日目の 7:00(ZT0)および 19:00(ZT12)の 2 時点で血漿および精巣上体脂肪組織を採取した。血漿からは ELISA 法によりアディポネクチン濃度を測定した。精巣上体脂肪組織から脂肪細胞を分画して、オスミウム酸で固定後、コールターカウンターを用いて脂肪細胞径分布を測定した。

3-1-2. 対照コントロールマウスと *ob/ob* マウスの比較

10 週齢 *ob/ob* 雄性マウスおよび 8 週齢の野生型雄性マウスから、精巣上体脂肪組織を採取して後述の検討に供した。[1] 分画した脂肪細胞をオスミウム酸固定後、コールターカウンターを用いて脂肪細胞径分布を測定した。[2] 分画した前駆脂肪細胞から総 RNA およびタンパク質を抽出して、Real-time PCR 法を用いて各遺伝子の mRNA 発現量を、western blot 法を用いてタンパク質発現量をそれぞれ定量した。[3] 分画した前駆脂肪細胞をホルマリンで固定後、超音波破碎により断片化クロマチンサンプルを調製した。このサンプルを用いてクロマチン免疫沈降後、*Ppar-γ* 遺伝子の転写調節領域における *DBP* 結合量を、Real-time PCR 法により定量した。

3-1-3. *Entinostat* を投与した *ob/ob* マウスの前駆脂肪細胞を用いた検討

8 週齢 *ob/ob* 雄性マウスに *entinostat* または *vehicle* を 1 日おきに腹腔内投与した。投与開始から 26 日目の 7:00(ZT0)および 19:00(ZT12)の 2 時点において、精巣上体脂肪組織を採取して前駆脂肪細胞を分画した。分画した前駆脂肪細胞を用いて、前述の 3-1-2 と同様に各遺伝子の mRNA 発現量、タンパク質発現量および *Ppar-γ* 遺伝子の転写調節領域における *DBP* 結合量をそれぞれ測定した。

3-2. マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を用いた検討

細胞の培養には、培地として DMEM に 10%FBS と抗生物質 (100 U/ml Penicillin および 100 µg/ml Streptomycin) を加えたものを用い、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で培養した。

細胞を 6 ウェルの細胞培養プレートに播種し、翌日に Dbp 特異的 siRNA をリポフェクション法によりトランスフェクトした。その 2 日後に、細胞密度が 100%コンフルエントに到達したことを確認して、脂肪細胞への分化誘導処置を施した。分化誘導開始初日に、DMEM/FBS 中に 0.25 µM dexamethasone、500 µM isobutyl methylxanthin および 1 µg/ml insulin を加えて誘導させた。3 日目に、培地を終末分化用培地 (DMEM/FBS 中に 1 µg/ml insulin) へ置換した。6 日目には通常の培養用培地 (DMEM/FBS) へ置換した。

脂肪細胞への分化誘導開始日、および 3, 6, および 8 日目にそれぞれ細胞を回収し、PPAR-γ タンパク質発現量を western blot 法により測定した。また、他の well に播種した細胞を用いて Oil Red O 染色を行い、脂肪細胞分化の程度を評価した。

3-3. ヒト内臓脂肪組織を用いた検討

3-3-1. 対象者および試料の採取

ヒト内臓脂肪組織を用いた検討は、自治医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (遺 19-変 34 号)。自治医科大学附属病院消化器外科に入院中で、胃癌または大腸癌のためにリンパ節廓清を伴う摘出術を受ける患者を対象とした。対象者に文書を用いて研究内容を説明し、文書による同意を得た。本研究では、手術開始の予定時刻が午前 9 時になっている患者のみを対象とし、試料回収時刻が一定の範囲内に収まるようにした。

対象者の手術が終了して病理標本作製用の組織が病理診断部に到着後、直ちに自治医科大学人体病理学部門の共同研究者が大網脂肪組織を分取した。採取した脂肪組織は用途別に以下の前処理を行った。

3-3-2. 試料からのサンプル調製および測定

手術により摘出された脂肪組織を、以下の実験に供した。[1] 脂肪組織から総 RNA を抽出して、Real-time PCR 法を用いて各遺伝子の mRNA 発現量を測定した。[2] 脂肪組織をホルマリン固定後、超音波破碎により断片化クロマチンサンプルを調製した。このサンプルを用いてクロマチン免疫沈降後、Dbp 遺伝子の転写調節領域におけるヒストン H3K9 のアセチル化レベルを、Real-time PCR 法により定量した。

4. 研究成果

4-1. マウスおよび 3T3-L1 細胞を用いた検討

肥満糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用いたインスリン負荷試験において、インスリン投与後の血糖値の低下は、vehicle 群よりも entinostat 投与群の方が有意に大であった。Vehicle 群の脂肪細胞径分布は 80-100 µm にピークを示したが、entinostat 投与群では 60-80 µm にピークを示した (図 1)。さらに、血漿中のアディポネクチン濃度は、entinostat 投与群の方が vehicle 群よりも有意に大であった。以上より、ob/ob マウスに entinostat を投与した結果、脂肪細胞からアディポネクチン分泌が増加してインスリン感受性が改善したものと考えられる。また、entinostat 投与群では脂肪細胞径の分布が小さい粒径に移動していたことから、entinostat により前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が促進されたものと推測される。

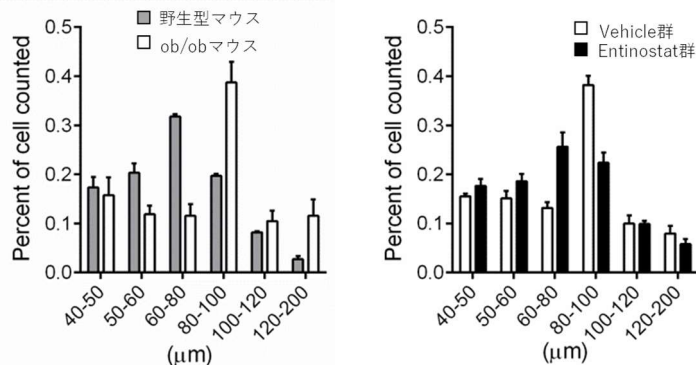


図 1. 脂肪細胞径分布
(左) 野生型 vs. ob/ob、(右) vehicle vs. entinostat

野生型の対照マウスと比較して、ob/ob マウスの脂肪組織内 Dbp 発現量は顕著に減少していることが明らかとなっている。また本研究において、entinostat 投与群の脂肪組織では Dbp 発現量が有意に増加した。前述の脂肪細胞径分布の結果と合わせて、ob/ob マウスでは Dbp 発現量が低下しているために、脂肪細胞への分化誘導活性が低下していると推察した。そこで、マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を用いて、Dbp 発現抑制が脂肪細胞分化に及ぼす影響を評価した。3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導すると、誘導開始3日目より PPAR- γ 1 および PPAR- γ 2 タンパク質発現量が増加し、誘導 6 日目より細胞内に脂肪滴が形成された。一方、Dbp をノックダウンした細胞では、誘導開始後の PPAR- γ タンパク質発現量および細胞内の脂肪滴形成が抑制された。

培養細胞を用いた検討の結果から、Dbp が脂肪細胞分化の調節因子であると推察して、野生型マウスと ob/ob マウスの前駆脂肪細胞を用いた検討を行った。脂肪細胞分化のレギュレーターである Ppar- γ 遺伝子には、その転写調節領域に DBP の結合領域が発見され、DBP により転写が促進されるマウスのアイソフォーム (Ppar- γ 1sv) が報告されている。本研究において、ob/ob マウスの前駆脂肪細胞内 Ppar- γ 1sv mRNA 発現量および PPAR- γ 1 タンパク質発現量は野生型マウスよりも低く、転写調節領域における DBP 結合量も有意に小であった。さらに、ob/ob マウスに entinostat を投与すると、前駆脂肪細胞内 Ppar- γ 1sv mRNA 発現量、タンパク質発現量および遺伝子転写調節領域上の DBP 結合量も有意に増加することが明らかとなった (図2)。

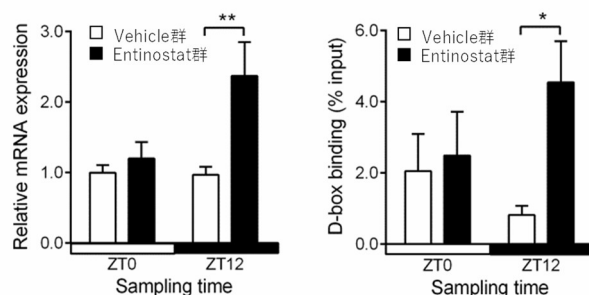


図2. Entinostatの効果
(左) Ppar- γ 1sv mRNA 発現量
(右) Ppar- γ 遺伝子上流へのDBP結合量

4-2. ヒト内臓脂肪組織を用いた検討

胃癌患者から摘出された大網脂肪組織を用いた検討において、2型糖尿病患者 (T2DM) 群の大網脂肪組織内 Dbp mRNA 発現量は、非糖尿病患者 (Non-DM) 群と比較して有意に低値を示した (図3)。一方、他の時計遺伝子 (Clock, Bmal1, Per1, Per2 および Cry1) mRNA 発現量には、T2DM 群と Non-DM 群の間に有意な差を認めなかった。Dbp 遺伝子の転写調節領域における H3K9 のアセチル化レベルは、T2DM 群の方が Non-DM 群よりも有意に低値であった。

前述のマウス Ppar- γ アイソフォーム (Ppar- γ 1sv) と同様に、ヒトにおいても DBP で転写活性化される新規アイソフォーム novel Ppar- γ が同定されている (Takahashi et al, *J Atheroscler Thromb*, 2010)。そこで、大網脂肪組織中の novel Ppar- γ 、Ppar- γ 1 および Ppar- γ 2 mRNA 発現量を測定した結果、T2DM 群の novel Ppar- γ および Ppar- γ 2 mRNA 発現量は、Non-DM 群と比較して有意に低値を示した (図3)。さらに、大網脂肪組織中の Dbp mRNA 発現量および novel Ppar- γ mRNA 発現量の間に有意な正相関を認めた (図4)。

しかしながら、大腸癌患者から摘出された腸間膜脂肪を用いて同様の検討を行ったところ、時計遺伝子 mRNA 発現量、Dbp 遺伝子の H3K9 アセチル化レベルおよび全アイソフォームの Ppar- γ mRNA 発現量に T2DM 群と Non-DM 群の間に差を認めなかった。

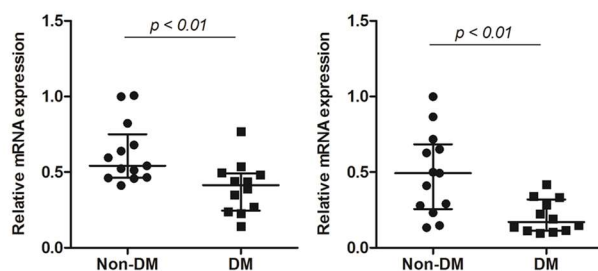


図3. 大網脂肪組織内遺伝子発現量の比較
(左) Dbp mRNA、(右) novel Ppar- γ mRNA

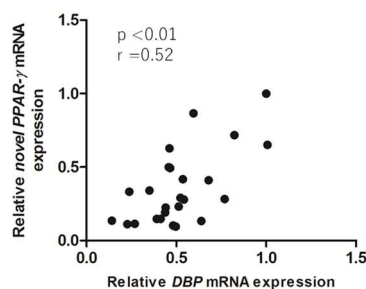


図4. 大網脂肪組織内における遺伝子発現量の相関

4-3. まとめ

本研究では、「脂肪組織中の **Dbp** 発現量が低下することで、インスリン抵抗性が惹起される」を作業仮設とした。マウスを用いた基礎研究において、糖尿病モデルマウスに **entinostat** を投与して前期脂肪細胞内の **Dbp** 発現量を上昇させた結果、**PPAR-γ** タンパク質の発現量が増加した。これにより、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が促進されて、アディポネクチン分泌量が上昇する結果、マウスのインスリン感受性に改善が認められた (図 5)。

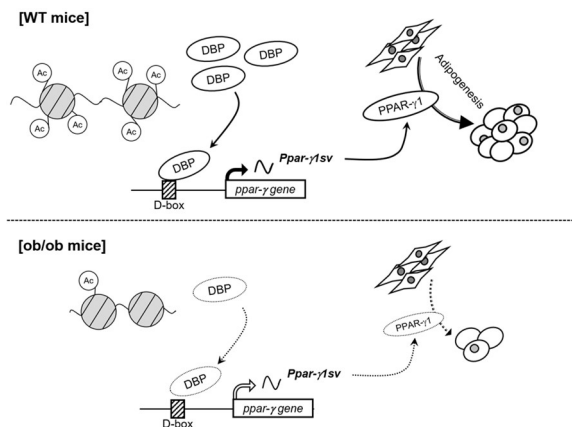


図 5. 本研究成果の概要図

ヒト大網脂肪組織を用いた研究では、**ob/ob** マウスと同様に、**T2DM** 群の脂肪組織では **Dbp** および **PPAR-γ mRNA** 発現量が **Non-DM** 群よりも低値であった。このことから、糖尿病における脂肪組織内 **Dbp** 発現量の低下は、マウスに特異的な事象ではないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arakawa Y, Ushijima K, Tsuchiya H, Morishige JI, Mii A, Ando H, Tsuruoka SI, Fujimura A.	4. 巻 46
2. 論文標題 Influence of renal ischemia-reperfusion injury on renal neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor (24p3R) in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Pharmacol Physiol	6. 最初と最後の頁 1166-1173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1681.13129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1.Suzuki C, Ushijima K, Ando H, Kitamura H, Horiguchi M, Akita T, Yamashita C, Fujimura A.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Induction of Dbp by a histone deacetylase inhibitor is involved in amelioration of insulin sensitivity via adipocyte differentiation in ob/ob mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07420528.2019.1602841.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushijima K, Suzuki C, Kitamura H, Shimada K, Kawata H, Tanaka A, Horie H, Hosoya Y, Imai Y, Yamashita C, Fujimura A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of clock gene Dbp in omental and mesenteric adipose tissue in type 2 diabetic patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛島健太郎、安藤仁、藤村昭夫
2. 発表標題 体内時計システムを活用した臨床薬理学研究ならびに毒性学研究
3. 学会等名 第44回 日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木智理、牛島健太郎、安藤仁、北村広子、秋田智后、今井靖、山下親正、藤村昭夫
2. 発表標題 脂肪細胞分化における時計遺伝子Dbpの関与
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牛島健太郎、安藤仁、藤村昭夫
2. 発表標題 生体リズム研究の医療応用と3Rの促進に向けた取り組み
3. 学会等名 第29回日本動物実験代替法学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap webページ https://researchmap.jp/ken_ushijima

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤村 昭夫 (Fujimura Akio)	自治医科大学・客員教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	安藤 仁 (Ando Hitoshi)	金沢大学・教授 (13301)	