

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08508

研究課題名(和文) 脂肪細胞における新規形質転換メカニズムの組織学的解析

研究課題名(英文) Histological analysis of novel transforming mechanisms in adipocytes

研究代表者

中野 知之 (Nakano, Tomoyuki)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00333948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DGのリン酸化を介してエネルギー代謝と細胞内情報伝達系を調整する。DGKは、細胞内での脂質合成部位である小胞体に局在することから、本プロジェクトではDGK遺伝子欠損マウスを用いた研究を行った。同マウスを高脂肪食で長期間給餌すると、精巣上体白脂肪組織に褐色化が生じることが明らかとなった。寒冷暴露実験においては、同マウスは寒冷刺激に脆弱であることが示唆され、体温低下を補うためベージュ化が生じることが明らかとなった。本プロジェクトにより、高エネルギー負荷や寒冷暴露などの生体刺激により、DGK欠損は脂肪組織における形質転換を惹起することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色脂肪組織中に褐色脂肪細胞が誘導される褐色化は、肥満治療の観点で注目を集めているが、脂肪細胞の形質転換メカニズムという基礎的な、解剖学的に興味深い現象である。本研究プロジェクトの結果から、高エネルギー条件や寒冷環境において、DGKe欠損によるDG代謝の低下が褐色化を促進するという新規メカニズムが明らかとなった。特に、高エネルギー条件においては、DGKeと同じく小胞体に局在するシクロオキシゲナーゼ2依存的に褐色化が生じることが、小胞体における脂質代謝が褐色化に影響を与える点で興味深い知見である。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol kinase (DGK) is an enzyme that converts DG to phosphatidic acid. DG is known as an intermediate product for triglyceride synthesis, but also is known as a lipidic second messenger. Thus, DG serves as a hub between energy metabolism and intracellular signaling. DGKe resides in the endoplasmic reticulum (ER). Since ER is known as a central site for lipid synthesis, current study focused on DGKe using its knock out mice. Two animal experiments were conducted in this project. One experiment revealed that beige adipogenesis was induced in the epididymal white adipose tissue (WAT) of DGKe-KO mice under long term High fat diet (HFD) feeding. The other experiment showed that DGKe-KO mice was susceptible to cold exposure. To compensate body heat loss, beige adipogenesis was induced in inguinal WAT. Present projected concluded that stress conditions in adipose tissue such as HFD feeding and cold exposure, DGKe-deletion confers susceptibility to adipose tissue remodeling.

研究分野：解剖学一般

キーワード：脂肪組織 ベージュ化 ジアシルグリセロールキナーゼ 高脂肪食 寒冷暴露

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は白色脂肪と褐色脂肪に大別される。前者は単胞性脂肪滴を有してエネルギー貯蔵を主な機能とあり、後者は多胞性脂肪的に蓄えた脂質を、熱産生のエネルギー源として消費し、震えを伴わない体温産生の中心的な場として機能している。また近年、白色脂肪組織中に褐色脂肪様細胞が誘導される現象が見出され、ベージュ化と称され、肥満治療・予防の観点でも注目され、そのメカニズムの解明が待たれている。研究代表者は、ジアシルグリセロールのリン酸化酵素 DGK の機能解析に従事してきた。これまでに型 DGK の遺伝子欠損マウスを高脂肪食で 40 日給餌すると、野生型に比して急速な脂肪沈着が生じ、肥満および耐糖能異常をきたすことを報告した (Nakano et al. 2018)。その後、同マウスを高脂肪食で長期間給餌すると、野生型マウスとの体重差が認められなくなることを見出し、さらに内臓脂肪中に多胞性脂肪滴を有する細胞が出現することから、DGK -KO マウスではベージュ化 (褐色化) が促進する可能性を考え、本研究プロジェクトを立案した。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、DGK -KO マウスの白色脂肪組織中に観察される多胞性脂肪滴を有する細胞の同定を行い、ベージュ化が生じることを確認する。さらに DGK 欠損によるベージュ化メカニズムを解明し、ジアシルグリセロール代謝を介した新規脂肪組織の形質転換機構を精査することを目的とした。

3. 研究の方法

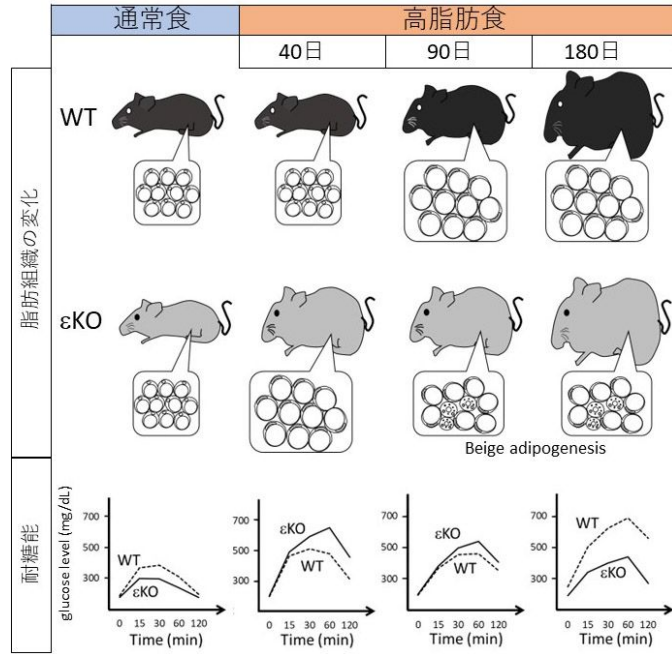
本研究課題の解明のため、以下 2 つの動物モデルを作製した。(1) **長期高脂肪食給餌モデル**: 6 週齢雄野生型 (C57BL6J) および DGK -KO マウスを高脂肪食 (HFD-60, オリエンタル酵母) および通常食 (F2, オリエンタル酵母) で飼育し、90 日および 180 日後にマウスの体重および血糖値を測定した後に精巢上体白色脂肪を摘出した。(2) **寒冷暴露モデル**: 8 週齢雄野生型 (C57BL6J) および DGK -KO マウスを 30 で 14 日間飼育した後、2 群に分け、それぞれ 6 および 30 でさらに 14 日間飼育した。飼育期間終了後、マウスの体重、直腸温、血糖値および肩甲骨間褐色脂肪領域体表温度をサーモカメラを用いて測定した。マウスから血液、精巢上体周囲白色脂肪、鼠経部皮下脂肪、肩甲骨間褐色脂肪、肝臓、骨格筋、膵臓および脳を採材した。

組織学的解析: 採材した組織は、固定の後定法に則りパラフィンに包埋、またはシュクロース置換後に -20 で凍結してミクロトーム (クライオスタット) でそれぞれ 6 μm もしくは 20 μm 厚切片を作製した。免疫組織化学染色には、パラフィン切片の場合、脱パラフィン後に 0.01M クエン酸バッファーで抗原賦活を行い、その後 Triton-X100 で処理し、ブロッキングの後に特異抗体と反応した。**ウェスタンブロット解析**: 組織は、ポリトロンホモジナイザーで破碎し、遠心 (12000xg, 4 , 10 分) 後の上清をタンパクサンプルとして用いた。BCA 法にて濃度測定を行い、10 μg タンパクを用いて SDS/PAGE で展開し、PVDF 膜に転写、ブロッキング後に特異抗体と反応させた。

4. 研究成果

(1) **長期高脂肪食給餌モデル**: 既報の通り、DGK -KO マウスは 40 日間の HFD 給餌により、肥満および耐糖能悪化が認められる (Nakano et al 2018)。本プロジェクトにおいて、HFD で 90 日給餌すると、DGK -KO マウスと野生型マウスとの間に脂肪沈着レベルに差が認められなくなった。さらに耐糖能にも差が認められなくなっていた。HFD180 日給餌条件では、90 日と同様、脂肪沈着レベルに差が認められないのに加え、DGK -KO マウスの耐糖能は野生型マウスよりも改善することが明らかとなった。組織学的解析の結果、HFD90 日給餌条件の DGK -KO

マウス精巣上体周囲白色脂肪組織には、cyclooxygenase-2 (COX-2)免疫陽性反応を示す細胞が出現し、この細胞は多胞性脂肪滴を有することが明らかとなった。よって、白色脂肪組織中に褐色脂肪様細胞が出現するベージュ化が進行している可能性を考え、マーカータンパクである uncoupling protein1(UCP1)に注目すると、タンパク発現が亢進しており、免疫組織化学的にも、多胞性脂肪滴を有する細胞は UCP1 免疫陽性反応を呈することが明らかとなった。よって DGK -KO マウスの内臓脂肪では長期間の



高脂肪食給餌により、ベージュ化が進行することが明らかとなった。この現象が COX-2 由来のプロスタグランジンにより惹起される可能性を考え、COX-2 阻害剤であるセレコキシブ投与を行った。その結果、UCP1 免疫陽性反応を示す細胞の減少が認められ、ベージュ化が抑制されることが明らかとなった。よって、長期間の高脂肪食給餌条件において、DGK -KO マウスでは COX-2 依存的にベージュ化が生じ、その結果、肥満進行の鈍化および耐糖能の改善が生じることが明らかとなった。以上の結果を論文にまとめ、国際誌に発表した (Nakano et al. 2020, Nakano and Goto 2022)。

(2) 寒冷暴露モデル：14 日間の 6 飼育条件下において、DGK -KO マウスの鼠径部皮下脂肪では、野生型に比べてベージュ化が促進していた。このメカニズムを解明する過程で、6 飼育の DGK -KO マウスでは直腸温が野生型を下回ることが明らかになった。ベージュ化が進行するにも関わらず、体温の低下が認められたことから、体温産生の中心部位である褐色脂肪組織に注目した解析を行った。その結果、DGK -KO マウスの褐色脂肪組織では熱産生責任分子である UCP1 発現には野生型と差がないにも関わらず、熱産生が障害されて体温低下が生じることが明らかとなった。DGK -KO マウスでは、体温低下を補うため、ベージュ化が進行すると考えられた。寒冷暴露モデルにおける結果は、解析を終え現在論文投稿準備中である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano T., Topham M.K. and Goto K.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Mice lacking DGKepsilon show increased beige adipogenesis in visceral WAT after long-term high fat diet in a COX-2-dependent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbior.2019.100659. Epub 2019 Oct 5	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 該当する

1. 著者名 Nakano Tomoyuki, Goto Kaoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Diacylglycerol Kinase in Adipose Tissues: A Crosstalk Between Signal Transduction and Energy Metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 815085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.815085	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 -

1. 著者名 Nakano Tomoyuki, Ogasawara Satoshi, Tanaka Toshiaki, Hozumi Yasukazu, Sano Masato, Sayama Yusuke, Yamada Shinji, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Goto Kaoru	4. 巻 38
2. 論文標題 DzMab-1: Anti-Human Diacylglycerol Kinase Monoclonal Antibody for Immunocytochemistry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 179 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2019.0024	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakano T. and Goto K
2. 発表標題 DGK epsilon-deficient mice show impaired adaptive thermogenesis under cold exposure
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野知之、後藤薫
2. 発表標題 DGK 欠損マウスにおける体温調節メカニズムの異常
3. 学会等名 第66回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakano T. and Goto K.
2. 発表標題 DGKepsilon-deficient visceral adipose tissue is prone to phenotypic switching under high fat diet conditions.
3. 学会等名 Obesity and NAFLD (B3) in Keystone symposia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野知之、後藤薫
2. 発表標題 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損は皮下脂肪における褐色化を促進する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野知之、後藤薫
2. 発表標題 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損は白色脂肪組織の褐色化を惹起する
3. 学会等名 第65回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野知之、後藤 薫
2. 発表標題 DGK epsilonはCOX-2を介して脂肪組織のリモデリングを制御する
3. 学会等名 第64回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野知之、後藤 薫
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase epsilon欠損による脂肪組織リモデリングの解析-寒冷暴露による変化-
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野知之、後藤 薫
2. 発表標題 DGK 欠損は白色脂肪細胞における脂質代謝異常を惹起する
3. 学会等名 第63回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------