

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17942

研究課題名(和文) ビタミンEが脂肪細胞の分化を制御する転写因子やmicroRNAの発現に与える影響

研究課題名(英文) The effects of vitamin E on adipocyte differentiation and the mechanisms.

研究代表者

田中 理恵子 (Tanaka, Rieko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・(非)研究員

研究者番号：80579962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織(BAT)は2種類の熱産生型脂肪細胞(褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞)で構成され、これらの細胞はミトコンドリアに存在するUCP1を介してエネルギーを熱に変換する。本研究で我々は、ビタミンE同族体のうち-トコフェロールと-トコフェロールがp38 MAPK経路を介して転写補因子PGC-1を活性化し、熱産生型脂肪細胞の分化と機能を上方制御する事を明らかにした。また、褐色脂肪細胞において-トコフェロールと-トコフェロールが炎症による熱産生能の低下を抑制する可能性を見出した。これらの結果は、トコフェロールがBATの機能亢進を介して肥満と肥満関連疾患を抑制する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってビタミンE同族体のうち特に-トコフェロールが褐色脂肪組織における熱産生を亢進する事が明らかとなり、-トコフェロールの摂取が肥満を抑制する可能性が示された。これらの知見は肥満をターゲットとした医薬品やサプリメントの開発シーズとして非常に有用である。また、本研究の成果はビタミンEの機能として報告されている代謝疾患の改善に、脂肪組織における熱産生能の向上が関与する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Activation of thermogenic adipocytes has been considered an attractive target for weight loss and treatment of metabolic disease. Thermogenic adipocytes (beige and brown) adipocytes, which constitute brown adipose tissue (BAT), have many mitochondria containing uncoupling protein 1 (UCP1). We found that tocopherols upregulate peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 (PGC1-) activation via p38 MAPK pathway and promotes thermogenic adipocyte differentiation in mammalian adipocytes. Our present findings suggest that tocopherols have a potential ability to prevent obesity and obesity-related disease by enhance of energy consumption in adipocyte.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、食品機能学

キーワード：Tocopherol Thermogenic adipocyte Beige adipocyte Brown adipocyte UCP1 PGC-1 p38 MAPK

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先進国において、食生活や運動習慣の変化に伴い肥満症の罹患率が増加している。肥満を背景として発症する心疾患や脳血管疾患は日本人の死因のおよそ4分の1を占めており、肥満や生活習慣病の発症に対する新規の予防法及び治療法の開発が強く望まれている。

褐色脂肪細胞は熱産生型の脂肪細胞であり、筋芽細胞と共通の *Myf-5* 系列前駆細胞から分化する事が知られている。一方で、2012年に Spiegelman らのグループが白色脂肪細胞と同一の前駆細胞からも熱産生を行う細胞(ベージュ脂肪細胞)が誘導される事を報告した (Cell. 150(2), 366-376, 2012)。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と同様にミトコンドリアを多く保有し、脱共役タンパク質 (UCP1) を介して熱産生を行う細胞である。2012年以降もベージュ脂肪細胞の分化制御機構に関する研究は精力的に行われ、多彩な転写因子 (PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PRDM16) や miRNA による調節機構が明らかとなった。我々の研究グループは、代表的なビタミン E 同族体である  $\alpha$ -tocopherol がラットの皮下脂肪組織において PGC-1 $\alpha$  の発現と活性化を誘導し、脱共役タンパク質 UCP1 の発現を誘導する事を報告している (J Oleo Sci, 66(2), 171-179, 2017)。しかしながら、他の同族体の効果や PGC-1 $\alpha$  活性化のメカニズム等は不明であった。そこで本研究では、ビタミン E 同族体が熱産生型脂肪細胞の機能に与える影響とその作用機序についてさらに詳細な検討を行うに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、熱産生型脂肪細胞(ベージュ脂肪細胞と褐色脂肪細胞)の分化と機能に対するビタミン E 同族体の作用について検討を行った。ベージュ脂肪細胞は誘導性の熱産生型脂肪細胞である事から、ベージュ脂肪細胞の分化制御を行う転写因子として同定されている PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , PRDM16, C/EBP $\beta$  と、その上流因子 (ERK, p38 MAPK, AMPK, S6K, SIRT1) に着目した。一方で、褐色脂肪細胞における熱産生プログラムは炎症性サイトカイン等による炎症シグナルによって障害を受ける事が知られている。ビタミン E は多方面から抗炎症作用が報告されている事から、ビタミン E が炎症シグナルを抑制する事で褐色脂肪細胞の機能を保護するかについても検討を行った。また、*In vivo* ではマウスを用いてビタミン E 同族体の摂取が高エネルギー食負荷による体重増加を抑制するか検討し、ビタミン E 同族体が熱産生型脂肪細胞の分化・活性化を介して肥満を抑制するか検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビタミン E 同族体の効果比較

各種ビタミン E 同族体の効果を比較するために、3種類の Tocopherol ( $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -tocopherol) を終濃度 10 $\mu$ M となるよう 3T3-L1 細胞に添加し、分化誘導培地で 10 日間培養して分化誘導を行った。その後細胞を回収して総 RNA を抽出し、PGC-1 $\alpha$  及び UCP1 の発現誘導能を比較した。

#### (2) PGC-1 $\alpha$ の活性化を制御する上流因子に対する $\delta$ -tocopherol の影響

PGC-1 $\alpha$  の活性化状態はアセチル化やリン酸化によって制御されている。そこで  $\delta$ -tocopherol 存在下で分化誘導した 3T3-L1 細胞より総 RNA を抽出し、PGC-1 $\alpha$  の活性調節に関わるリン酸化酵素 (ERK, p38 MAPK, AMPK, S6K) や脱アセチル化酵素 (SIRT1) の遺伝子発現量を定量した。有意な発現誘導が見られた p38 MAPK についてはウエスタンブロットリングによるタンパク質発現解析を行い、さらに p38 MAPK 特異的阻害剤 (SB203580) 処理による影響を検討した。また、 $\delta$ -tocopherol 添加細胞より microRNA 画分を抽出し、miR-133, miR-155, miR-196a, miR696 の発現解析を行った。

#### (3) 食餌性肥満に対する Tocopherol 摂取の効果

$\alpha$ -tocopherol と  $\delta$ -tocopherol が生体レベルでも熱産生脂肪細胞の分化と機能を亢進し、高エネルギー食摂取による肥満を抑制するか検討した。マウスに高脂肪・高ショ糖食 (HFSD) または HFSD +  $\alpha$ -tocopherol 食、HFSD +  $\delta$ -tocopherol 食を摂取させ、体重推移、脂肪組織重量等を比較した。また、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織における遺伝子発現解析と病理組織学的検査を行った。

#### (4) 炎症による褐色脂肪細胞の機能低下と Tocopherol による保護効果

炎症シグナルは褐色脂肪細胞において熱産生を阻害する事が知られている。そこで Tocopherol が褐色脂肪細胞において炎症を抑制し、熱産生能を保護するか検討した。実験にはラットの初代培養褐色脂肪前駆細胞を使用した。分化誘導と同時に各 Tocopherol を終濃度 10 $\mu$ M となるよう添加して 3 日間培養した。分化誘導後、TNF- $\alpha$  を終濃度 10 ng/mL となるよう添加して炎症を惹起した。TNF- $\alpha$  の添加から 24 時間後に細胞を回収し、遺伝子発現解析及びタンパク質発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ビタミン E 同族体の効果比較

ビタミン E 同族体による分化促進効果を比較検討した結果、 $\delta$ -tocopherol が最も顕著に PGC-1 $\alpha$  及び UCP1 の遺伝子発現を誘導した (図 1)。 $\delta$ -tocopherol 添加細胞では PGC-1 $\alpha$  の核内移行が亢進しており、 $\delta$ -tocopherol が PGC-1 $\alpha$  の活性化を促進する事が示唆された。また、PGC-1 $\alpha$  のノックダウンによって  $\delta$ -tocopherol の効果がキャンセルされる事から、 $\delta$ -tocopherol による UCP1 の発現誘導は PGC-1 $\alpha$  の発現誘導と活性化を介している事が明らかとなった。

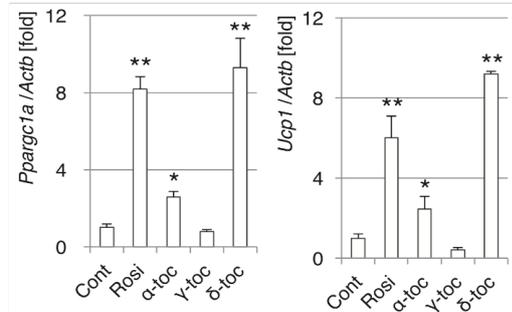


図 1. PGC-1 $\alpha$  と UCP1 の遺伝子発現に対する各種 Tocopherol 添加の影響

##### (2) PGC-1 $\alpha$ の活性化を制御する上流因子に対する $\delta$ -tocopherol の影響

上述の通り、 $\delta$ -tocopherol が PGC-1 $\alpha$  活性化を介して熱産生型脂肪細胞の分化を促進する可能性が示唆された。そこで PGC-1 $\alpha$  の活性化に関わる上流因子 (ERK, p38 MAPK, AMPK, S6K, SIRT1) の遺伝子発現を解析した結果、p38 MAPK の発現が  $\delta$ -tocopherol の添加によって有意に増加した (図 2)。そこで p38 MAPK の活性化状態を評価する為にリン酸化型 p38 MAPK (p-p38 MAPK) のウエスタンブロッティングを行った。p-p38 MAPK の発現量は  $\delta$ -tocopherol の添加によって有意に増加した。また、p38 MAPK 阻害剤による p38 MAPK 活性の抑制は、 $\delta$ -tocopherol による UCP1 の発現誘導効果を減弱させた。これらの結果は  $\delta$ -tocopherol が p38 MAPK を介して PGC-1 $\alpha$  を活性化し、熱産生能を向上させる可能性を示唆している。

PGC-1 $\alpha$  の他、ベージュ脂肪細胞の分化に寄与するいくつかの転写因子 (C/EBP $\beta$ , PRDM16 等) は miRNA によって翻訳調節を受ける事が知られている。そこで Tocopherol がベージュ脂肪細胞の分化を制御する microRNA (miR-133, miR-138, miR-155, miR-196a, miR-696) の発現に与える影響についても検討した。結果として、これらの miRNA の発現を Tocopherol は抑制せず、 $\delta$ -tocopherol による UCP1 の発現誘導効果には直接関与しないものと考察している。

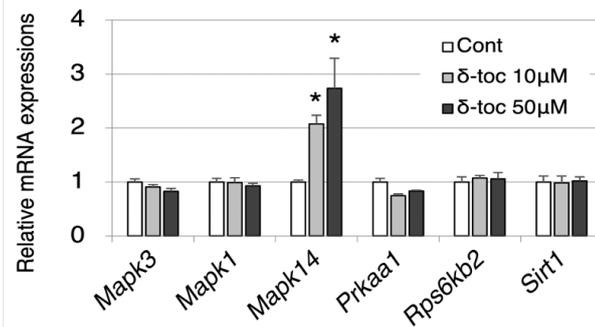


図 2. PGC-1 $\alpha$  の活性化を制御する上流因子の遺伝子発現

##### (3) 食餌性肥満に対する Tocopherol 摂取の効果

$\alpha$ -tocopherol または  $\delta$ -tocopherol の摂取は、高脂肪・高シヨ糖食負荷による体重及び脂肪組織重量の増加を有意に抑制した。病理組織学的検査では腎周囲脂肪組織において一部多胞化した UCP1 陽性細胞が観察された他、褐色脂肪組織では細胞の肥大化が顕著に抑制されていた (図 2)。また、 $\delta$ -tocopherol 摂取群の褐色脂肪組織においては UCP1 の遺伝子発現が有意に増加していた。

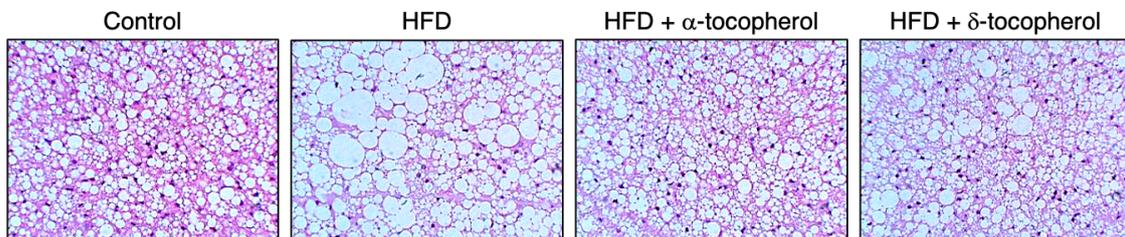


図 3. 褐色脂肪組織における病理組織学的検査

##### (4) 炎症による褐色脂肪細胞の機能低下と Tocopherol による保護効果

炎症性サイトカインは ERK や Junk を介して褐色脂肪細胞における熱産生プログラムを阻害する。ラット初代培養褐色脂肪細胞に TNF- $\alpha$  を添加して炎症を惹起すると、UCP1 の発現量は有意に低下した。 $\alpha$ -tocopherol と  $\delta$ -tocopherol の添加は TNF- $\alpha$  刺激による ERK の発現誘導を抑制し、UCP1 の発現低下を有意に改善した。これらの結果は、Tocopherol が白色脂肪組織に存在するベージュ脂肪細胞のみならず、褐色脂肪組織の熱産生能も亢進する事で肥満を改善する可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田中 理恵子	4. 巻 95
2. 論文標題 ビタミンEの抗肥満作用 熱産生型脂肪細胞をターゲットとした新しいアプローチによる解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 322-326
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 Tanaka-Yachi Rieko, Shirasaki Masato, Otsu Rena, Takahashi-Muto Chie, Inoue Hideki, Aoki Yoshinori, Koike Taisuke, Kiyose Chikako	4. 巻 506
2. 論文標題 -Tocopherol promotes thermogenic gene expression via PGC-1 upregulation in 3T3-L1 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.021	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 田中理恵子
2. 発表標題 ビタミンEの抗肥満作用 ~熱産生型脂肪細胞をターゲットとした新しいアプローチ~
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津 玲奈、杉山 涼乃、高橋 知衣、清瀬 千佳子、田中 理恵子
2. 発表標題 炎症による褐色脂肪細胞の機能低下とビタミンEによる改善効果
3. 学会等名 第73回 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 理恵子、大津 玲奈、杉山 涼乃、高橋 知衣、清瀬 千佳子
2. 発表標題 褐色脂肪細胞の機能におけるビタミンE同族体の保護効果
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rena Otsu, Chie Takahashi, Chikako Kiyose and Rieko Tanaka
2. 発表標題 The effects of tocopherols on inflammation and thermogenesis in brown adipocytes
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津玲奈 <sup>1</sup> ・廣瀬友輝 <sup>1</sup> ・高橋知衣 <sup>2</sup> ・清瀬千佳子 <sup>3</sup> ・田中理恵子
2. 発表標題 褐色脂肪細胞の機能におけるTocopherolの作用
3. 学会等名 日本油化学会 第58回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 理恵子、大津 玲奈、白崎 雅人、高橋 知衣、清瀬 千佳子
2. 発表標題 -tocopherolによるPGC-1 の活性化機構
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第70回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山 涼乃、大津 玲奈、高橋 知衣、清瀬 千佳子、田中 理恵子
2. 発表標題 TocopherolによるPGC-1 の活性化と脂肪細胞における熱産生の亢進
3. 学会等名 日本油化学会 第57回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大津 玲奈、杉山 涼乃、高橋 知衣、清瀬 千佳子、田中 理恵子
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞と褐色脂肪細胞の機能におけるビタミンEの効果
3. 学会等名 第30回 ビタミンE研究会
4. 発表年 2019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