

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590598
 研究課題名（和文） メタボリックシンドローム予防に向けた脂肪細胞における EGF-ErbB 系の機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of EGF-ErbB signalings in adipocytes for prevention of metabolic syndrome.
 研究代表者
 中野 法彦（NAKANO NORIHIKO）
 藍野大学・医療保健学部・特任准教授
 研究者番号：40322721

研究成果の概要：

培養脂肪細胞において、EGF 受容体（ErbB）ファミリーである ErbB1～4 はすべて発現しており、分化に伴って発現量の変化がみられた。経口糖尿病薬・グリクラジドおよび茶カテキンは、EGF による ErbB1 のリン酸化を抑制し、分化を促進することがわかった。さらにグリクラジドは成熟脂肪細胞の核抽出物における PPAR γ の DNA 結合能を低下させ、転写活性にも作用することを明らかにした。これらのことより、脂肪細胞における EGF-ErbB 系を制御することによってメタボリックシンドロームの予防・治療に寄与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：脂肪細胞、EGF、ErbB、メタボリックシンドローム、肥満、細胞増殖、細胞分化、チロシンリン酸化

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに関連した疾患は欧米のみならず我が国においても増加の一途を辿っている。我が国において、肥満の基準である BMI（体格指数） ≥ 25 を示す人は 2,300 万人に達し、国民の 5 人に 1 人が肥満と推計されている。肥満は、インスリン抵抗性を基盤として、糖尿病、高脂血症、高血圧をはじめとするメタボリックシンドロームを惹起することが知られており、我が国の死因の 3 分の

1 を占める心筋梗塞や脳梗塞といった心血管疾患の主要な原因である。肥満は白色脂肪細胞が肥大した状態であるため、白色脂肪組織の生理的・病理的機構の解明が重要性を増している。

従来、白色脂肪組織は余剰のエネルギーを中性脂肪の形で貯蔵する器官とされてきたが、近年、レプチン、アディポネクチンやペルオキシジーム増殖剤応答性受容体 γ （PPAR γ ）といった肥満にかかわる分子が次々に明

らかになってきている。脂肪組織は他の組織に比べても内分泌タンパク質の遺伝子発現の割合が非常に高いため、脂肪組織は内分泌臓器であるという概念が確立されてきている。脂肪組織が分泌する多彩な生理活性物質はアディポサイトカインとよばれ、メタボリックシンドロームの基盤病態であるインスリン抵抗性の形成に大きくかかわっていることが解明されてきた。

一方、脂肪細胞には、過剰エネルギーの貯蔵にかかわる通常の白色脂肪細胞と代謝的熱産生を行う褐色脂肪細胞が存在する。両者は生理的に相反する作用をもっているが、その由来や発生のメカニズムに関してはあまり解明が進んでいない。

他方、EGF-ErbB ファミリーは上皮細胞の増殖のみならず、脳神経系や心血管系の形成・維持にかかわっている。EGF（上皮増殖因子）ファミリーは現在までに 13 種類が報告され、それらにはアイソフォームも多く存在する。それらの受容体である ErbB は ErbB1（EGF receptor）から ErbB4 の 4 種類が細胞膜に存在し、ホモまたはヘテロ二量体を形成して情報伝達する。

脂肪細胞は EGF ファミリーの一員である HB-EGF を産生・分泌し、動脈硬化を促進するが、脂肪細胞自身への効果については知られていない。脂肪細胞における EGF-ErbB 系の役割については、主に EGF を用いて脂肪細胞の増殖・分化や機能発現にかかわっていることが報告されているものの解析は進んでいない。一方、脂肪組織は、交感神経だけでなく副交感神経の支配が最近明らかになった。神経細胞の増殖・機能維持に EGF ファミリーの neuregulin がかかわっているが、脂肪組織では効果は明らかになっていない。また、脂肪細胞の肥大には血管新生が不可欠であるが、EGF ファミリーが果たす役割は知られていない。したがって、脂肪細胞のみならず脂肪組織における EGF-ErbB 系の果たす機能は明らかでない課題が多く、それらの解析は意義深いと考える。

現在、ErbB1 阻害剤 Gefitinib（イレッサ）や ErbB2 阻害剤 Herceptin が臨床的に使われてがんの治療に効果をあげていることから、EGF-ErbB 系の制御は肥満をはじめとするメタボリックシンドロームにも有効である可能性が高い。したがって、EGF-ErbB 系の脂肪組織における生理的・病理的機能を解明することは、肥満の病態のメカニズムの解明につながり、これにより、肥満の治療のみならず、肥満に関連したメタボリックシンドロームの予防・治療に発展することが期待される。

2. 研究の目的

肥満は、脂肪細胞の増殖や肥大化の状態にとどまらず、糖尿病、高脂血症、高血圧などのメタボリックシンドロームを惹起する。脂肪細胞の生化学的・細胞生物学的解析は、治療の面においても注目されており、近年多方面から盛んに研究が進められている。脂肪細胞は分泌タンパク質を盛んに発現していることが知られており、その解析が進められているが、まだ詳細なメカニズムは明らかになっていない。脂肪細胞の増殖や肥大化に関しては、細胞内の情報伝達物質や転写因子についての研究は進んでいるが、細胞外からの増殖因子や伝達物質の研究は不明な点も多い。

そこで、白色脂肪細胞株 HW 細胞および褐色脂肪細胞株 HB2 細胞を用いて、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞へ分化する過程における EGF-ErbB ファミリーの発現量を経時的に解析する。上記の解析で発現が確認された主要な因子を用いて、脂肪細胞における ErbB やシグナル伝達分子のリン酸化を解析し、細胞の増殖・分化に対する役割を解析する。このとき、脂肪分化のマーカーとなる PPAR γ や脱共役タンパク質（UCP）の発現量やレプチン、アディポネクチン、TNF- α といったアディポサイトカインの分泌量への影響も測定する。また、経口糖尿病薬・グリクラジドや茶カテキンの EGF-ErbB 系に対する効果を検討し、脂肪細胞における EGF-ErbB 系の役割を解析する。

また、生体内の脂肪組織は脂肪細胞をはじめ間質細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、神経細胞など多くの種類の細胞から構成されており、お互い細胞間相互作用によって機能を発揮している。脂肪細胞と血管内皮細胞や神経細胞との共培養系の解析により、生態内環境モデルによる EGF-ErbB 系の役割について解析を行う。

これらの解析を通して脂肪細胞における EGF-ErbB 系の機能が解明されることにより、EGF-ErbB 系を介した、肥満とその関連するメタボリックシンドロームに対する予防と治療の道を切り拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞株の培養

マウス白色脂肪細胞株 HW 細胞および褐色脂肪細胞株 HB2 細胞は北海道大学（現、天使大学）齊藤昌之博士から供与していただいた。HW 細胞および HB2 細胞はコラーゲンコートしたディッシュを使用し 10% ウシ血清を含む D-MEM 中で培養した。細胞がコンフルエン

トになったのち、デキサメサゾンとイソブチルメチルキサンチンで 2 日間分化誘導を行い、その後インスリンとトリヨードチロニンを含む培地で 5-7 日間培養して成熟脂肪細胞に分化させた。

(2) ErbB ファミリーの発現量の解析

HW 細胞および HB2 細胞を培養し、成熟脂肪細胞に分化させる過程において、経時的に細胞を回収し、ErbB1 から B4 の mRNA およびタンパク質の発現を RT-PCR 法および Western blotting 法をもちいて解析した。

(3) EGF 刺激時の脂肪細胞の反応の解析

経口糖尿病薬・グリクラジドおよび茶カテキンを EGF 刺激時に脂肪細胞に添加して ErbB および細胞情報伝達物質 ERK 1/2 のチロシンリン酸化を免疫沈降法にて解析した。また、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に及ぼす影響をアディポサイトカインの leptin、アディポネクチン、TNF- α の分泌量を ELISA 法を用いて測定した。

(4) 脂肪組織の増殖と分化の解析

HW 細胞または HB2 細胞に EGF、グリクラジド、茶カテキンを加えて培養した。細胞増殖測定では 2 日後に WST-1 試薬を用いて細胞生存度を測定した。細胞分化測定では、4 から 5 日後に細胞内のトリグリセリド量を測定した。

(5) PPAR γ の測定

HW 細胞および HB2 細胞を分化誘導した成熟脂肪細胞にグリクラジドを添加した。24 時間後、細胞から核抽出物を回収して、PPAR γ の DNA 結合能を測定した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞における ErbB の発現

培養細胞での解析のためにマウス白色脂肪細胞株 HW 細胞および褐色脂肪細胞株 HB2 細胞を用いた。

ErbB ファミリーは現在 ErbB1~4 の 4 種類が知られているが、HW 細胞および HB2 細胞において ErbB1~4 のすべての発現が確認され、それらの発現量は脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴ってそれぞれ変化することもわかった。本研究では、これらの中で ErbB1 および ErbB2 の機能解析を重点的に行った。

(2) 脂肪細胞における EGF-ErbB 系の機能の解析

グリクラジドは、脂肪前駆細胞および成熟脂肪細胞において EGF による ErbB1 および ERK 1/2 のリン酸化を抑制し、それにより脂肪前駆細胞の増殖を抑制し成熟脂肪細胞への分化を促進することを明らかにした。茶カテキンにおいても同様の作用がみられた。

つぎにグリクラジドを成熟脂肪細胞に添

加したところ、その核抽出物における PPAR γ の DNA 結合能を低下させ、転写活性にも作用することを明らかにした。

このようにグリクラジドは、分化過程にある脂肪細胞の細胞内情報伝達系、および成熟脂肪細胞の転写活性を制御することによって、脂肪細胞の機能を制御している可能性が認められた。肥満と糖尿病はメタボリックシンドロームとして併発する場合が多く、経口糖尿病薬・グリクラジドが、肥満の予防・治療にも寄与することが示唆されたことは意義深いと考えている。

(3) 脂肪幹細胞を用いた解析

脂肪細胞は骨髄間質細胞から脂肪幹細胞を経て分化することが近年、明らかになってきた。そこで、まず Sprague-Dawley ラットの骨髄から骨髄間質細胞を採取し、その初代培養系を確立した。

つぎに脂肪組織由来幹細胞 (adipose tissue-derived stem cell: ADSC) を用いて脂肪細胞への分化過程における遺伝子発現の解析をした。その結果、運動トレーニングにより ADSC の脂肪細胞への分化を抑制し、血管内皮細胞への分化を促進させることを明らかにした。これにより、脂肪組織あたりの脂肪細胞数の減少と血管内皮細胞数の増加を引き起こすことが示唆された。

(4) 脂肪組織の生体内環境モデルの構築

生体内の脂肪組織は脂肪細胞をはじめ間質細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、神経細胞など多くの種類の細胞から構成されており、お互い細胞間相互作用によって機能を発揮している。そこで、共培養系での効果を検討するために、実験動物からの細胞を分離する手法の確立を行った。神経細胞は、生後 1 日目の SD ラットの海馬から分離し、ポリ-L-リジンコートしたディッシュにて初代培養を行い、免疫化学染色法により確認をした。他の細胞についても培養条件を確立しており、共培養での脂肪細胞の機能解析が今後発展していくと期待している。

以上のことより、脂肪細胞における生化学的・細胞生理学的な解析が行われた結果、脂肪細胞の増殖・分化や転写因子の制御が一部 EGF-ErbB 系を介してされていることが示唆された。したがって、EGF-ErbB 系による脂肪細胞の制御によって、肥満のみならず、肥満に関連したメタボリックシンドロームの予防・治療に発展することが期待される。

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 4 件)

- ① Sakurai T, Nishioka H, Fujii H, **Nakano N**, Kizaki T, Radak Z, Izawa T, Haga S & **Ohno H**. Antioxidative effects of a new lychee fruit-derived polyphenol mixture, oligonol, converted into a low-molecular form in adipocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 査読有り. 72, 2008, 463-476.
- ② Ide C, **Nakano N**, & Nakai Y. Clinical aspects of the central pattern generator in the human spinal cord. *Aino J*. 査読有り. 6, 2007, 55-61.
- ③ **Nakano N**, Miyazawa N, Sakurai T, Kizaki T, Kimoto K, Takahashi K, Ishida H, Takahashi M, Suzuki K & **Ohno H**. Gliclazide inhibits proliferation but stimulates differentiation of white and brown adipocytes. *J. Biochem*. 査読有り. 142, 2007, 639-645.
- ④ Watanabe S, Hitomi Y, Kawano F, Ohira Y, Kizaki T, **Nakano N**, Sakurai T, Izawa T, Suzuki K, Sudoh M, Roy RR & **Ohno H**. Transcription regulation of gene expression in rat pup brown adipose tissue in response to unloading or 2 G loading. *Acta Astronautica*. 査読有り. 60, 2007, 889-898.

〔学会発表〕(計 6件)

- ① 櫻井拓也、井澤鉄也、木崎節子、小笠原準悦、白土健、今泉和彦、人見嘉哲、**中野法彦**、芳賀脩光、**大野秀樹**：脂肪組織由来幹細胞の脂肪および血管内皮細胞への分化に対する運動トレーニングの影響。第79回日本衛生学会学術総会、2009年3月29日-4月1日、東京。
- ② 櫻井拓也、井澤鉄也、木崎節子、石橋義永、鈴木健二、**中野法彦**、長澤純一、大石修司、芳賀脩光、**大野秀樹**：運動トレーニングによって脂肪組織内酸化ストレスは軽減される。第78回日本衛生学会総会、2008年3月28~31日、熊本。
- ③ **中野法彦**、宮澤伸子、櫻井拓也、木崎節子、石橋義永、鈴木健二、井澤鉄也、石田均、**大野秀樹**：脂肪細胞の増殖・分化に対するグリクラジドの機能の解析。第80回日本生化学会大会、2007年12月11~15日、横浜。
- ④ 櫻井拓也、井澤達也、木崎節子、石橋義永、大石修司、長澤純一、鈴木健二、**中野法彦**、武政徹、斎藤大蔵、芳賀脩光、**大野秀樹**：運動トレーニングの脂肪組織内酸化ストレス軽減効果。第5回日本予防医学会学術総会、2007年11月23~24日、指宿。

- ⑤ **中野法彦**、鈴木健二、木本紀代子、宮澤伸子、櫻井拓也、木崎節子、下山達宏、石田均、**大野秀樹**：経口糖尿病薬グリクラジドの多機能性。レドックス生命科学第170委員会第18回研究会、2007年8月9~10日、蔵王。
- ⑥ Sakurai T, Nishioka H, Fujii H, **Nakano N**, Kizaki T, Izawa T, Haga S, Ishida H, Radak Z & **Ohno H**: New lychee-derived polyphenol Oligonol converted into a low-molecular form reduces oxidative stress in adipocytes. 16th European Congress on Obesity, Apr. 22-25, 2007, Budapest.

〔図書〕(計 2件)

- ① 大野秀樹・木崎節子編、ナッパ、運動と免疫、印刷中
- ② 八木達彦・福井俊郎・一島英治・鏡山博行・虎谷哲夫編、朝倉書店、酵素ハンドブック(第3版)、2008年、1012ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 法彦 (NAKANO NORIHIKO)
 藍野大学・医療保健学部・特任准教授
 研究者番号：40322721

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

大野秀樹 (OHNO HIDEKI)
 杏林大学・医学部・教授
 研究者番号：00133819