

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700551

研究課題名（和文） 脂肪細胞の熱産生機能覚醒を目指した細胞応答不均一性の解析と分化転換に関する検討

研究課題名（英文） Single cell analysis system for brown and white adipocytes

研究代表者

野村 幸子(NOMURA SACHIKO)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30348784

研究成果の概要：

褐色脂肪細胞を標的とした従来の研究では、生体全体のエネルギーバランスを操作する事象が重要視され、褐色脂肪組織丸ごとのエネルギー消費容量を測定することができれば十分な成果が得られたものと判断されてきた。一方で、組織を構成する脂肪細胞の不均一性があるため、これらの研究では生体のエネルギー状態に応じて変化する脂肪細胞の適応過程の本質を捉えるには不十分である。本研究では、褐色脂肪組織に含まれる脂肪細胞について個々に測定し、その細胞の多様性を詳細に検討することにより、脂肪組織全体の機能変化を細胞レベルで明らかにすることを試みた。褐色脂肪細胞は貯蔵された中性脂肪を酸化分解し熱として散逸する。この褐色脂肪細胞による熱産生は細胞内に豊富に存在するミトコンドリアの機能に由来するが、細胞内のミトコンドリアの数は個々の細胞の成熟度などの違いによって異なることが報告されている。そこで、単一褐色脂肪細胞におけるミトコンドリア数のカウントを目的とした、マイクロ流体デバイスによる測定法の確立を目指した。ミトコンドリアの擬似試料として、外径 1 μm の蛍光粒子を内径 2 μm のキャピラリーを利用し泳動することで、その個数を計測することに成功した。また、細胞一個を捕獲・培養・破碎するマイクロ流体デバイスを開発した。さらに、これらの技術を組み合わせ、細胞一個のミトコンドリア数の測定を試みた。この単一脂肪細胞測定法を用いた解析から、従来の細胞集団実験や固定された組織の観察では得られなかった情報が得られることが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：運動生理学

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：褐色脂肪細胞、単一細胞分析、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年、「メタボリック症候群」の概念が定着しつつあり、肥満を背景とした同一個体における耐糖能異常や高脂血症などの代謝異常の集積が、虚血性心疾患などの発症に関与していることが明らかにされている。現在、わが国でも肥満者の割合は一貫して増え続けており、この症候群の本態を解明し予防法を確立することは健康科学の観点からきわめて重要である。

肥満やメタボリック症候群の発症に脂肪組織が直接関与することが実証されている。脂肪組織には褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue: BAT) と白色脂肪組織 (White adipose tissue: WAT) の二種類が存在する。WATは全身に広く分布しており、食物摂取後の余剰エネルギーを中性脂肪の形で貯蔵し、必要に応じて分解して脂肪酸とグリセロールの形で全身に再供給するために特殊化した器官である。本申請者は、この白色脂肪細胞の脂肪分解反応とその機構を明らかにするため、WATの脂肪細胞の懸濁液を用いて アドレナリン受容体 (adrenaline receptor; AR) 刺激を介した細胞性応答について検討してきた。その結果、運動トレーニングを行ったラットのWAT由来の脂肪細胞では、脂肪分解反応が亢進していることを明確にし、そのメカニズムには脂肪分解反応を調節するリン酸化酵素の細胞内分布が関わっていることを報告した。

WATにおける脂肪分解反応の亢進は、体脂肪の減少を誘導する可能性がある。しかし、

ARの刺激によって白色脂肪細胞に貯蔵された中性脂肪を分解しても、遊離した脂肪酸を消費しない限り白色脂肪細胞に再び取り込まれ、結果的には体脂肪はほとんど減少しないことが報告されている。運動トレーニングによる脂肪分解反応の増加は、白色脂肪細胞自身の変化に加え、運動時の骨格筋による脂質利用の増加が大きな役割を担っていると推定される。一方、国民栄養調査によると、最近のわが国での肥満者の増加は多食よりはむしろエネルギー消費の減少に負うところが大きいと考えられている。そのため、肥満の予防法を模索する上ではエネルギー消費の異常に注目することが重要である。実際、多くの肥満モデル動物ではエネルギー消費が低下しており、摂食を野生型の動物と同量

に制限しても肥満を完全には解消できないことが知られている。

生体のエネルギー消費に関与する因子の一つが、BATのミトコンドリア脱共役タンパク質1 (Uncoupling protein 1, UCP1) である。UCP1はミトコンドリアでの酸化リン酸化を脱共役させる活性を持っている。すなわち、ミトコンドリアでは電子伝達系とATP合成がプロトン濃度勾配を介して密接に共役しているが、UCP1はこの勾配を短絡的に解消する特殊なチャンネルである。そのため、UCP1が活性化されると化学エネルギーがATPを経ずに直接熱へと変換され散逸消費されることになる。UCP1は、小型げっ歯類などの熱産生部位であるBATに特異的なタンパク質として見出された分子であり、非ふるえ熱産生による体温維持に寄与している。寒冷曝露などの生理的刺激が加わり交感神経系の活動が亢進すると、AR刺激によってBATの脂肪分解反応が惹起され、細胞内の中性脂肪から脂肪酸が遊離する。この脂肪酸は熱産生の基質となると同時に、UCP1を直接活性化して発熱を引き起こす。さらに、

ARを介する熱産生は、体温調節のための発熱機構にとどまらず脂肪エネルギーを熱として散逸するエネルギー消費系と考えられる。その証拠として、絶食により摂取エネルギーが減少するとBATの交感神経活動が低下しUCP1発現が減少する。それに対し、多食ではUCP1によるエネルギー消費が増加する。

動物実験では、肥満解消のため開発された

AR作動薬はいずれも摂食量に関係なくエネルギー消費を増加させ、体脂肪を減らす効果があることが報告されている。この際、ミトコンドリア発生、UCP1発現増加を伴ってBATが過形成するとともに、通常はWATが局在する鼠径部や大網の脂肪組織中にミトコンドリアの増加とUCP1発現がみられ、細胞の構造がBAT由来の脂肪細胞のように変化していることが見出されている。一方、臨床応用についてはAR作動薬の効果が疑問視されている。その理由として、ヒトBATは新生児には多量に存在するが成長につれ退縮し成人では肉眼的にほとんど検出できないことによる。しかし、成人でも褐色細胞腫 (pheochromocytoma) や強度の寒冷曝露後などの交感神経亢進時には、BATが組織学的に検出される。これらの結果から、成人で

も褐色脂肪細胞の活性化による肥満予防効果が期待され、ヒト UCP1 活性化による肥満予防効果を再評価する機運が高まっている。

2. 研究の目的

以上のように、ヒト UCP1 活性化および褐色脂肪細胞のミトコンドリア発生による肥満予防効果を検討するためには、成人で潜在している褐色脂肪細胞の機能をいかに目覚めさせるかが重要な課題である。その鍵は、*in vivo*において実験動物 WAT 内で褐色脂肪細胞が出現した報告である。この現象は脂肪細胞の「分化転換」と称され WAT 由来脂肪細胞の褐色化あるいは BAT 由来脂肪細胞の白色化が起こることを示唆するものである。しかし、培養細胞では集団内で細胞機能の均一性が一定に保たれているが、脂肪組織から調製した細胞懸濁液は不均一な脂肪細胞の集団であることが実験の隘路となる。特に、BAT には多くの白色脂肪細胞が混在している。また、分化転換の結果、褐色化あるいは白色化する脂肪細胞は組織中に局所的に発生すると考えられる。これらのことから、組織学的・形態学的な手段が用いられる場合があるが、免疫組織化学的方法にせよ *in situ* ハイブリダイゼーション法にせよ褐色脂肪細胞の細胞性応答を十分に反映している実験的手段は今のところ存在しない。したがって、本研究ではまず、培養前駆脂肪細胞について検討することによって、単一細胞を対象に熱産生を測定できるシステムを構築する。さらに、実験動物から BAT あるいは WAT 由来脂肪細胞を調製し、個々の細胞について解析して、不均一性を損なうことなく脂肪細胞の機能を解析する方法を確立する。

3. 研究の方法

脂肪組織には成熟した脂肪細胞の他に前駆脂肪細胞が含まれている。前駆脂肪細胞はある程度の継代培養が可能であるとともに、培地に分化誘導因子（甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、インシュリンなど）を添加することによって成熟脂肪細胞を得ることができる。本研究ではまず、調製が容易でしかも集団内での細胞機能の均一性が一定に保たれている培養脂肪細胞を用いて、ミトコンドリア量をモニターする。続いて、実験動物脂肪組織由来の脂肪細胞について単一細胞を対象に熱産生能を評価する。BAT あるいは WAT から脂肪細胞を調製し、個々の細胞について解析して、不均一性を損なうことな

く脂肪細胞の機能を解析することを目指す。

このような現象を解析するために、既存の細胞生物学的な方法や大量のサンプルを用いたマス測定ではなく、個々の細胞をハンドリングし微小かつ微量の解析をハイスループットに行うマイクロテクノロジーを導入した。具体的には、マイクロテクノロジーを用いて構築した微小な空間において細胞を培養後、細胞応答の観察およびタンパク質や遺伝子の発現解析へと展開するシステムである。しかしこれらの適用では、細胞培養を行うために細胞の数や生育位置をコントロールできてはならず、多数の細胞を集団として扱うか、偶然的要素が大きいまま行うに留まっている。逆に、単一細胞を扱うためには、分離した細胞をひとつひとつマイクロピペットなどで移動させる必要があり、ハイスループット解析を行うまでには至っていない。したがって、細胞を非侵襲的に捕獲し、必要に応じて培養・増殖させた後に、細胞ひとつひとつを分離・解析することができるマイクロデバイスの開発をすすめた。特に、培養液の微小流を利用することにより、細胞懸濁液から単一細胞を捕獲し培養が可能なマイクロ流体システムを適用した。

一方、褐色脂肪細胞による熱産生は細胞内に豊富に存在するミトコンドリアの機能に由来するが、細胞内のミトコンドリアの数は個々の細胞の成熟度などの違いによって異なることが報告されている。そこで、単一培養した脂肪細胞の機能を解析するために、ミトコンドリア数のカウントを目的としたキャピラリー電気泳動による測定法の確立を進めた。

4. 研究成果

褐色脂肪細胞を標的とした肥満予防効果に関する研究は、ヒトの知見を含めて多くのデータが集積され始めている。これらの研究は、多くの場合、生体全体のエネルギーバランスを操作する事象が重要視され、褐色脂肪組織丸ごとのエネルギー消費容量を測定することができれば十分な成果が得られたものと推定される。しかし、組織を構成する脂肪細胞の不均一性があるため、生体のエネルギー状態に応じて変化する脂肪細胞の適応過程の本質を捉えるには不十分である。

本研究では、ミトコンドリアの擬似試料として、外径 $1\mu\text{m}$ の蛍光粒子を内径 $2\mu\text{m}$ のキャピラリーを利用し泳動することで、その個数を計測することに成功した。また、細胞一個を捕獲・培養・破碎するマイクロ流体デ

バイスを開発した。さらに、これらの技術を組み合わせ、細胞一個のミトコンドリア数を測定した。このように、褐色脂肪組織に含まれる脂肪細胞の細胞性応答について個々に検討し、その細胞の多様性を詳細に検討することにより、脂肪組織全体の機能変化を分子レベルで明らかにすることを試みた。この単一脂肪細胞の解析結果から、従来の細胞集団実験や固定された組織の観察では得られなかった情報が得られる可能性が高く、また現在まで確立された方法論に基づく肥満予防法の効率的な改善策を提案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 1件)

S. Nomura, T. Ichinose, M. Jinde, Y. Kawashima, T. Tachiyashiki, K. Imaizumi
Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue.
J Nutr Biochem;19(12):840-7(2008)査読有

[学会発表](計 5件)

Y. Murakami, T. Arakawa, S. Nomura, Y. Yamaguchi, S. Shoji
High performance microfluidic device for sequential trapping, labeling and content extraction of single cells
Micro Total Analysis Systems 2008
(2008.10, San Diego, USA)

S. Nomura, T. Ichinose, M. Jinde, Y. Kawashima, K. Tachiyashiki, K. Imaizumi
Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1
Experimental Biology Annual Meeting 2008
(2008.4, San Diego, USA)

S. Nomura, T. Ichinose, M. Jinde, Y. Kawashima, K. Tachiyashiki, K. Imaizumi
Effect of tea catechins on uncoupling proteins mRNA expressions in rat brown adipose tissues.
The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan

(2008. 3, Tokyo, Japan)

M. Jinde, S. Nomura, T. Ichinose, S. Akimoto, K. Tachiyashiki, K. Imaizumi
Lowering effects of tea catechin intake on adipose tissue weights in high fat fed rats.
Experimental Biology Annual Meeting 2007
(2007.5, Washington DC, USA)

S. Nomura, T. Ichinose, M. Jinde, Y. Kawashima, C. Shimada, K. Tachiyashiki, K. Imaizumi
Effects of tea catechins on lipolysis and UCP1 mRNA expression in rat adipose tissues.
Experimental Biology Annual Meeting 2007
(2007.5, Washington DC, USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 幸子(NOMURA SACHIKO)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号: 30348784

(2)研究分担者

(3)連携研究者