

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19790086

研究課題名 (和文) 白色および褐色脂肪細胞の機能制御と RNA world の解明

研究課題名 (英文)

Elucidation of functional regulation and RNA world in white and brown adipocytes

研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任講師

研究者番号：10416216

研究成果の概要：本研究では、脂肪細胞の成り立ちや機能制御のメカニズムを遺伝子レベルで正しく理解することを目的とし、ラットの白色及び褐色脂肪細胞の初代培養系を用いて、未分化から成熟までの各段階について遺伝子の発現変動を経時的に追跡した。その結果、褐色脂肪細胞の分化初期にのみ特異的に発現する遺伝子を見いだすことに成功した。この遺伝子から産生されるペプチド分子をラットに1週間に2回の間隔で反復投与したところ、対照群と比較して体重増加が10%程度抑制されたことから、新しい肥満予防法への応用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：細胞生物学・分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：白色脂肪細胞・褐色脂肪細胞・RNA・網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

食事などから摂取したエネルギーの余剰分は、中性脂肪として皮下や内臓に存在する白色脂肪組織 (WAT) に蓄積される。これは自然界で動物が生存するために獲得した極めて合目的な機能であるが、現代社会に生きる我々にとっては、過剰な脂肪の蓄積が肥満を始めとする様々な生活習慣病の発症要因となっている。一方で、哺乳類の体内には、褐色脂肪組織 (BAT) と呼ばれるもう一つの脂肪組織が存在する。BAT は WAT とは異なり、蓄積した脂肪を積極的に燃焼することによ

って、筋肉運動を必要としない非ふるえ熱産生を行うことで体温維持やエネルギー恒常性の維持に関与する重要な組織である。これまで肥満予防の観点から WAT の機能に関する研究は盛んに行われており、WAT が単に脂肪を蓄積するだけでなく、レプチン (Nature **372**, 1994) やアジポネクチン (Biochem Biophys Res Commun **257**, 1999) といった様々なホルモンやサイトカインを分泌して全身のエネルギーバランスを調節する内分泌器官として機能していることが明らかにされつつある。一方、BAT に関してはエネルギー代謝の

場であるミトコンドリアが豊富に存在し、脱共役タンパク質 (UCP1) が組織特異的に発現することによって活発なエネルギー消費が可能となっていることが古くから知られているが (Physiol Rev 64, 1984)、その機能制御のメカニズムなどに関しては、ほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

上述の通り、これまで肥満予防を目的とした研究の多くは、白色脂肪細胞の機能を対象としており、さらにその多くは 3T3-L1 などのモデル細胞系を用いて行われてきた。このようなモデル細胞を用いた研究は組織や個体レベルでの研究と異なり、他の組織や細胞あるいは環境の影響といった問題を排除できるため、細胞の機能を分子レベルで解明する上で非常に有用である。しかしながら、得られた結果が実際に生体内に存在する脂肪細胞とは一致しないという危険性も含まれている。また、褐色脂肪細胞については 3T3-L1 のように有用なモデル細胞系が確立されていないこともあり、機能制御のメカニズムについて白色脂肪細胞ほど詳細な研究が行われていなかった。

そこで、研究代表者らがこれまでに確立した白色および褐色脂肪細胞の初代培養系を用い、未分化から成熟に至るまで全ての段階について遺伝子の発現変動を経時的に追跡することにより、白色および褐色脂肪細胞の成り立ちや機能制御のメカニズムを遺伝子レベルで正しく理解することを目的として本研究に着手した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

4 週齢 Wistar 雄ラット (日本 SLC) を用いた。

(2) 白色および褐色脂肪細胞の初代培養

副睾丸 WAT および肩甲骨間 BAT を摘出し、コラゲナーゼ処理および遠心分離により間質血管画分を単離して培養に供した。培養開始から 2~3 日後、培地に分化誘導剤を添加することにより脂肪細胞の分化を誘導した。48 時間の分化誘導処理の後、培地を交換し、さらに 3 日間培養することで成熟した白色および褐色脂肪細胞を得た。

(3) RNA 抽出

上記の白色および褐色脂肪細胞の初代培養の過程で、未分化から成熟までの各段階の細胞から Trizol 試薬 (インビトロジェン社) を用いて total RNA を抽出・精製した。

(4) マイクロアレイ解析

上記の RNA サンプルを、Low RNA Linear Amp. Kit (アジレント社) を用いて蛍光標識 (Cy3) し、Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (アジレント社) に 65°C で 17 時間ハ

イブリダイゼーションした。17 時間後、スライドを洗浄し、DNA マイクロアレイスキャナ (アジレント社、GA2565BA 型) を用いて各遺伝子の発現強度を解析した。

(5) ペプチドのイオントフォレシス

① Neuromedin U ペプチド

非標識およびローダミンで蛍光標識した neuromedin U ペプチドは、クラボウ社が合成・精製したものをを用いた。

② イオントフォレシス

0.4mg/ml のペプチド水溶液を調製し、300 μ l をイオントフォレシス用パッチ (TTI エルビュー社) に充填して、バリカンで剃毛した 4 週齢 Wistar 雄ラットの背部皮膚に貼付し、0.15mA/cm² 定電流で 1 時間通電した。

(6) ペプチドの体内動態解析

上記の方法で、ローダミン標識ペプチドを経皮投与した直後の皮膚、あるいは投与から 24 時間後の WAT、BAT および肺を摘出し、凍結切片を作製して共焦点レーザーสキャニング顕微鏡 (カールツァイス社、LSM510) を用いて観察した。

(7) 血漿中濃度測定

上記の方法で、非標識の neuromedin U ペプチドを経皮投与し、通電開始時を 0 時間として 0、1、3、6、24 時間後に尾静脈から血液を採取し、遠心分離により血漿サンプルを調製した。得られた血漿サンプルと Neuromedin U EIA Kit (ペニスーラ社) を用いて血漿中 neuromedin U 濃度推移を解析した。

(8) 反復投与と体重変化

上記の方法で、非標識の neuromedin U ペプチドを経皮投与し、1 週間に 2 回の間隔で投与し、その間の体重変化を追跡した。

(9) 免疫組織化学的解析

上記の方法で、非標識の neuromedin U ペプチドを 4 週間反復投与したラットの副睾丸 WAT を摘出し、2~3mm 程度の小片に細切して 4% パラホルムアルデヒド溶液に浸漬して固定した。固定した小片を UCP1 に対する一次抗体 (Alpha Diagnostic 社) および Alexa488 で蛍光標識した二次抗体 (インビトロジェン社) を用いて免疫蛍光染色し、共焦点レーザースキャニング顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 白色および褐色脂肪細胞の初代培養

ラットの白色および褐色脂肪細胞の初代培養を行い、未分化から成熟までの形態変化を顕微鏡下で観察した結果を図 1 に示した。いずれの細胞も未分化時には繊維芽様の形態を示し、分化・成熟に伴って次第に丸みを帯びると共に、その内部に多数の小胞に分かれた脂肪滴を蓄積した。顕微鏡下の観察では、両者の形態に大きな差異は認められなかった。結果は示していないが、BAT 由来の未分

化細胞が分化・成熟した際に、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子である UCP1 が発現することを RT-PCR 法により確認しており、WAT 由来の細胞では UCP1 の発現は認められない。これは、全く同じ培養条件下においても、BAT 由来の未分化細胞は褐色脂肪細胞に、WAT 由来の未分化細胞は白色脂肪細胞に分化することを意味している。

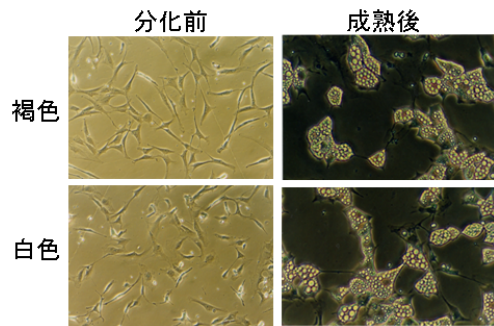


図1. 白色および褐色初代培養細胞
(2) マイクロアレイ解析

上記の初代培養系において、分化誘導開始時を day0 とし、成熟 (day5) までの各段階にある細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイにより、それぞれの遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。図2に示したように、BAT および WAT 由来初代培養細胞のどちらか一方において他方よりも発現レベルに 10 倍以上の差異が認められた遺伝子が、day0 から day5 までの各時点において、それぞれ 300 種類程度見いだされた。さらに、解析を行った全ての時点において 10 倍以上の差異が認められた遺伝子が 57 種類見いだされた。これらの結果は、BAT および WAT 内に存在する全く起源の異なる細胞であることを意味しており、本研究によって見いだされた 57 種類の遺伝子は、褐色あるいは白色脂肪細胞の起源や成り立ちを解明する上で極めて重要な遺伝子であると考えられる。

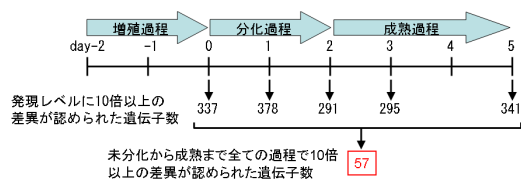


図2. マイクロアレイ解析のまとめ

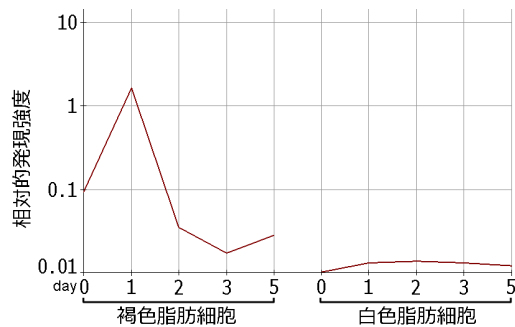


図3. Neuromedin U 遺伝子の発現変動

次に、褐色脂肪細胞の分化初期に着目し、この時期にのみ特異的に発現レベルが上昇する遺伝子を探索したところ、非常に興味深い遺伝子が見いだされた (図3)。この遺伝子は neuromedin U と呼ばれる分泌性のペプチド分子をコードしており、BAT 由来初代培養細胞の分化初期にのみ特異的かつ一過的に発現が認められるのに対し、WAT 由来初代培養細胞では全く発現していないことが明らかとなった。Neuromedin U は、主に小腸や視床下部において産生・分泌されるペプチドであり、中枢に作用させた場合に顕著な食欲抑制作用を示すことが報告されている。さらに、Neuromedin U 遺伝子を人為的に欠損させたノックアウトマウスは顕著な肥満を呈すると共に、BAT における UCP1 の発現が野生型と比較して 50%程度低下することも明らかにされており、肥満との関連性から注目されているペプチド分子である。しかしながら、褐色脂肪細胞の分化や機能制御との関連性については、これまでに全く報告されておらず、本研究において初めて明らかとなった。

そこで次に、neuromedin U ペプチドをラットに投与することにより、体内で褐色脂肪細胞の形成を促進することができるのではないかと考え、*in vivo* での機能評価を行うこととした。

(3) Neuromedin U ペプチドの経皮投与

一般に、ペプチド分子は、体内でプロテアーゼにより速やかに代謝・排泄されるため、経口や静脈注射のような投与方法では十分な効果を得ることが困難である。このことが多くの生理活性ペプチドの医薬品への応用を妨げる大きな要因となっている。そこで我々は、経皮投与の利点に着目し、neuromedin U ペプチドを充填したパッチを作製し、皮膚表面に貼付すれば、長時間にわたって持続的にペプチドを体内に送達できるのではないかと考えた。しかし、皮膚表面を構成する角質層は、薬物投与において大きなバリアーであり、neuromedin U ペプチドのような水溶性の高分子化合物は、極めて吸収されにくい。そこで、neuromedin U が生理的条件下で正電荷を有するペプチドであることに着目し、電気的反発力を利用して薬物の経皮吸収を促進させるイオントフォレシスと呼ばれる手法を用いることでこの問題を解決できると推察された。

まず始めに、イオントフォレシスを用いて neuromedin U ペプチドを経皮投与することが可能か否かを確認するため、ローダミンで蛍光標識したペプチドを合成し、*in vivo* でイオントフォレシスを行った直後のラット皮膚切片を作製して共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡で観察した。その結果、図4に示したように、ローダミンの蛍光は、投与部位の皮膚表面全体から皮内に浸透しており、角質層、

表皮層を越えて真皮層にまで到達していた。

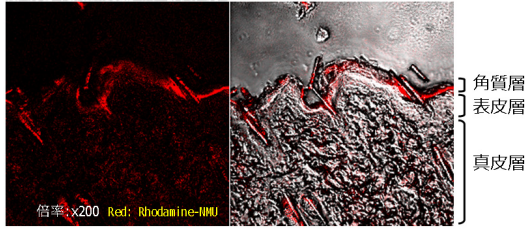


図 4. ローダミン標識ペプチドの皮内動態

このことから、neuromedin U ペプチドはイオントフォレシスを用いることにより経皮投与可能であることが明らかとなった。そこで次に、皮内に浸透したペプチドが循環血流に移行し全身へ送達されるか否かを調べるため、非標識 neuromedin U ペプチドをイオントフォレシスにて経皮投与し、血漿中 neuromedin U 濃度の推移を ELISA 法にて追跡した (図 5)。その結果、投与前に比べて、イオントフォレシス終了直後の血漿中 neuromedin U 濃度は約 2 倍に上昇しており、その後、少なくとも 24hr まで同レベルを維持していた。対照として、同容量のペプチドを皮下注射にて投与した場合においてもほぼ同様の推移が得られた。

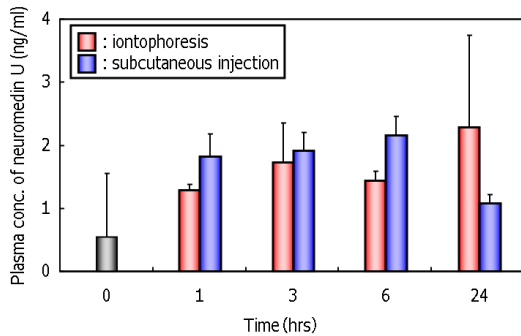


図 5. Neuromedin U 血漿中濃度推移

ただし、皮下注射の場合、24hr 後においては血漿中濃度はやや減少しイオントフォレシス投与の場合に比べて約 1/2 程度であった。以上のことから、イオントフォレシスにて経皮投与した neuromedin U ペプチドは皮内から循環血に移行し、全身に送達されること、また血中濃度は長時間に渡って維持されることが強く示唆された。

そこで次に、neuromedin U 経皮投与の体重に及ぼす影響について調べるため、1 週間に 2 回の間隔で反復投与を行い、その間の体重の推移を追跡した。その結果、図 7 に示したように、neuromedin U ペプチドをイオントフォレシスにて経皮投与した場合、初回投与から 10 日後 (3 回目の投与の直前) 以降において、コントロール群 (生理食塩水をイオントフォレシス) や皮下注射投与群と比較して有意に体重増加量が抑制されることが明らかとなった。

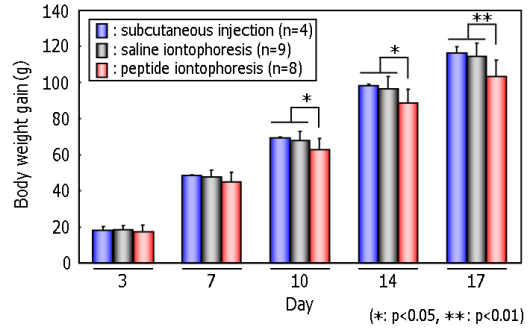


図 7. 体重増加量の推移

Neuromedin U ペプチドを中枢 (脳室内) に直接投与した場合には、食欲抑制作用により体重増加が抑制されることは既に知られているが、本研究のように、末梢投与によって体重増加の有意な抑制がみられたという報告はこれまでになされていない。皮下注射による投与では全く抑制効果がみられなかったことから、投与後の血中濃度を長時間に渡って維持することが最も重要であり、他の投与方法には無い経皮投与の利点が現れたものと考えられた。

以上、本研究の遂行により、褐色脂肪細胞の分化初期において時期特異的且つ一過的に neuromedin U 遺伝子の発現が急激に上昇することが明らかとなり、この遺伝子がコードする neuromedin U ペプチドをイオントフォレシスを用いて経皮投与することにより、ラットの体重増加を有意に抑制することに成功した。

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)

上記研究成果について現在、論文投稿準備中である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任講師

研究者番号：10416216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし