

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17991

研究課題名(和文) K0ラット由来繊維芽細胞を用いた脂肪細胞分化におけるセイピンの意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the significance of seipin in adipocyte differentiation using K0 rat-derived fibroblasts

研究代表者

海老原 千尋 (ebihara, chihiro)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90790915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：BSCL2は先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子として2001年に同定されわが国では申請者らのグループが初めてBSCL2遺伝子異常症を報告した。BSCL2がコードするセイピンは既知タンパク質と相同性を認めず、その生理的意義については不明である。申請者らはセイピンノックアウト(SK0)ラットを作製し、脂肪組織の発生・分化にセイピンが必要不可欠であることを証明した。本研究ではSK0ラット由来の初代培養ラット皮膚繊維芽細胞を用いた脂肪細胞分化誘導実験系により、脂肪細胞の分化過程におけるセイピンの役割を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪萎縮症は脂肪組織が減少あるいは消失する疾患の総称で、障害部位により全身性と部分性に分類される。また原因も様々で、全身性、部分性それぞれに、先天性と後天性が存在する。しかしながら、いずれの場合においても一定以上の脂肪組織が消失すると強いインスリン抵抗性を伴う糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝など種々の糖脂質代謝異常を呈する。先天性全身性脂肪萎縮症患者の平均寿命は30～40歳と言われ極めて予後不良である。脂肪細胞分化におけるセイピンの分子生物学的意義の解明は、先天性全身性脂肪萎縮症の治療に結びつくだけでなく、脂肪細胞研究の発展に広く寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：BSCL2 was identified as the causative gene of congenital systemic lipodystrophy in 2001 and the applicant's group was the first to report BSCL2 dysgenesis in Japan. The BSCL2-encoded seipin is thought to be a two-fold transmembrane protein consisting of 398 amino acids, but it shows no homology to known proteins and its physiological significance is unknown. We have previously generated seipin knockout (SK0) rats and demonstrated that seipin is essential for the development and differentiation of adipose tissue. In the present study, we will elucidate the role of seipin in the process of adipocyte differentiation by using an experimental system to induce adipocyte differentiation using primary cultured rat skin fibroblasts derived from SK0 rats. Elucidation of the molecular biological significance of seipin in adipocyte differentiation will not only lead to the treatment of congenital systemic lipodystrophy, but will also contribute to the development of adipocyte research.

研究分野：糖尿病、肥満

キーワード：seisin ラット 脂肪萎縮症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪萎縮症は脂肪組織が減少あるいは消失する疾患の総称で、障害部位により全身性と部分性に分類される。また原因も様々で、全身性、部分性それぞれに、遺伝的要因による先天性のものと自己免疫異常などによる後天性のものが存在する。しかしながら、いずれの場合においても一定以上の脂肪組織が消失すると強いインスリン抵抗性を伴う糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝など種々の糖脂質代謝異常を呈する。脂肪萎縮症では強いインスリン抵抗性のため、従来の経口血糖降下薬は無効であることが多く、インスリンも大量投与が必要となる。インスリン大量投与は脂肪肝の促進、肥大型心筋症の誘発など副作用の面から好ましい治療方法とは言えず、先天性全身性脂肪萎縮症患者の平均寿命は30～40歳と言われ極めて予後不良である。

一方、申請者らのグループは、と脂肪組織由来ホルモンであるレプチンの血中濃度低下が脂肪萎縮症におけるインスリン抵抗性の原因であることを報告した (Ebihara et al. *Diabetes* 2001)。この成果を踏まえて、申請者が以前在籍していた京都大学において脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法の臨床研究が開始された (Ebihara et al. *N Engl J Med* 2004)。申請者も医師主導治験および高度医療 (先進医療 B) を含むレプチン補充療法の臨床研究に研究分担医師として携わった。これらの治療成績から脂肪萎縮症におけるレプチン製剤の有効性、安全性が認められ、2013年には薬事承認を受けてレプチン製剤の市販が開始された。レプチン製剤の市販開始により脂肪萎縮症の糖脂質代謝異常を良好にコントロールすることが可能となったが、レプチン製剤は高額であり経済的負担が大きいこと、脂肪萎縮そのものの治療法は依然未開発であることから、2015年脂肪萎縮症は医療費が公費助成対象となる難病に指定された。京都大学でレプチン補充療法を実施した症例は16例で、このうち14例が遺伝子異常による先天性症例であった。さらにこのうち10例がセイピン遺伝子 (*BSCL2*) 異常による先天性全身性脂肪萎縮症であった。*BSCL2* は先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子として2001年に同定され (Magre et al. *Nat Genet* 2001)、わが国では申請者らのグループが初めて *BSCL2* 遺伝子異常症を報告した (Ebihara et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2004)。*BSCL2* がコードするセイピンは398アミノ酸からなる2回膜貫通型のタンパク質と考えられているが、既知タンパク質と相同性を認めず、現在に至るまでその生理的意義については不明である。特に、脂肪細胞の発生・分化におけるセイピンの意義は未解明である。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに生体におけるセイピンの病態生理的意義の解明を目的として *BSCL2* 遺伝子異常症の動物モデルを作成し解析を行った。ヒトの *BSCL2* 遺伝子異常症では全身性脂肪萎縮症の他に精神発達遅滞が高頻度に認め、ヒトにおいて *BSCL2* は脂肪組織以外に脳および精巣に高発現する。そこで疾患モデル動物の作成にあたり動物種の選定を目的として、マウスおよびラットにおける *BSCL2* の臓器別発現を検討した。マウスでは精巣で *BSCL2* が高発現しているが脳では高発現を認めなかった。一方、ラットではヒトと同様に脳および精巣の両方で *BSCL2* が高発現していた。そこで申請者は、通常用いられるマウスではなく、ラットを対象に *BSCL2* 遺伝子異常症モデルを作成した。ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラット作製システムを用いてセイピンタンパク質20番目のアミノ酸がストップコドンに置換されるセイピン遺伝子変異ラットを得た (Ebihara et al. *Hum Mol Genet* 2015)。この変異はヒトの *BSCL2* 遺伝子異常症で報告されているいずれの変異部位より上流

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

に位置し、第一膜貫通部位よりも上流であることから事実上のセイピンノックアウト(SKO)であると考えた。SKO ラットでは全身の脂肪組織が消失し、ヒトの *BSCL2* 遺伝子異常症と同様にインスリン抵抗性の糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝を呈することが確認され、脂肪組織の発生におけるセイピンの重要性が直接的に証明された。これまでに3つの独立した海外の施設からマウスでセイピンノックアウトを作成し解析したとする報告がある (Cui et al. *Hum Mol Genet* 2011、Chen et al. *Mol Cell Biol* 2012、Prieur et al. *Diabetologia* 2013)。しかし、いずれの報告でも、マウスでのセイピンノックアウトでは脂肪組織が相当量残存し、血中中性脂肪濃度は低値を示し、ヒトの *BSCL2* 遺伝子異常症の表現型とは乖離していた。一方、申請者はSKO ラットではヒトの *BSCL2* 遺伝子異常症と共通して認知機能の低下や精子低形成が認められることを明らかにした。以上より、SKO ラットはヒトの表現型をよく再現する優れた *BSCL2* 遺伝子異常症モデル動物である。そこで本研究では、SKO ラットより調整した初代培養ラット皮膚繊維芽細胞を用いた脂肪細胞分化誘導実験系により、脂肪細胞の分化過程におけるセイピンの分子生物学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

申請者らはすでに初代培養ラット皮膚線維芽細胞 (RDF: rat dermal fibroblast) を用いた脂肪細胞分化誘導実験系を確立している。そこで野生型ラットと SKO ラットから RDF を調整し、脂肪細胞分化誘導実験を実施して両者を比較検討する。さらに SKO ラット由来 RDF に PPAR アゴニストであるピオグリタゾンを追加した時の脂肪細胞分化を検討する。脂肪細胞分化は Oil Red O 染色後に Oil Red O 抽出を行い脂肪蓄積を定量化することにより評価する。

4. 研究成果

SKO ラット由来 RDF は野生型ラット由来 RDF と比較して insulin、dexamethasone、isobutylmethylxanthine (IBMX)で脂肪細胞分化を誘導した際、著しく脂肪蓄積が抑制されていた。またこの時、SKO ラット由来 RDF では脂肪細胞分化の鍵分子である PPAR の遺伝子発現が著しく低下していた。そこで、SKO ラット由来 RDF に PPAR アゴニストであるピオグリタゾンを添加し脂肪細胞分化誘導を実施したところ、分化誘導開始後7日目までは野生型ラット由来 RDF と同程度かそれ以上に脂肪蓄積増加が認められた。しかし、分化誘導開始後14日目まで培養を続けたところ、7日目以降はピオグリタゾン存在下であるにもかかわらず SKO ラット由来 RDF の脂肪蓄積は減少を認めた。一方、野生型ラット由来 RDF では14日目まで脂肪蓄積増加が継続して認められた。分化誘導開始後7日目以降にホルモン感受性リパーゼ (HSL) のリン酸化を検討したところ、SKO ラット由来 RDF では野生型ラット由来 RDF と比較して HSL のリン酸化が増加しており、HSL が活性化していることが明らかとなった。HSL の活性化が SKO ラット由来 RDF における7日目以降の脂肪蓄積減少の原因であることを検証するためにピオグリタゾンに加えて HSL 特異的阻害薬である Cay10499 を添加し SKO ラット由来 RDF の脂肪細胞分化誘導を実施した。Cay10499 添加により SKO ラット由来 RDF の脂肪蓄積は7日目以降も継続して増加が認められた。一方、ピオグリタゾンは添加せずに Cay10499 のみを添加しても SKO ラット由来 RDF の脂肪蓄積は分化誘導後14日目まで著しく抑制されたままであった。

以上より、セイピンの欠損により脂肪細胞分化過程において早期には PPAR の発現が抑制され、後期には HSL の活性が亢進することが明らかとなった。このことはセイピンが PPAR

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

の発現促進と HSL の活性化抑制の両方に関与していることを示している。今後はセイピンの PPAR 発現促進メカニズムおよび HSL の活性化抑制メカニズムについて検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------