

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06233・19K21332

研究課題名(和文) ページュ脂肪細胞におけるニューロメジンBの新たな機能の解明

研究課題名(英文) Function of Neuromedin B in beige adipocyte

研究代表者

比嘉 涼子 (Higa, Ryoko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10819642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロメジンB(NMB)が熱産生脂肪細胞であるページュ脂肪細胞の分化に関与しているという知見を得たため、NMB遺伝子欠損マウスを独自に作製し、解析を行った。その結果、高脂肪食摂取下において、NMB 遺伝子欠損マウス群は野生型マウス群に比べ体重増加量の有意な減少が認められた。摂食量および活動量については両群間で有意な差は認められなかった。一方、酸素消費量については、NMB 遺伝子欠損マウス群は野生型マウス群に比べ有意に増加していた。このことから、NMB 遺伝子欠損マウスは熱産生量の増加によって、高脂肪食摂取による体重増加が抑制されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱産生脂肪細胞である褐色脂肪細胞およびページュ脂肪細胞の活性化は抗肥満作用を持つことが報告されている。しかし、その活性化機構については未だ不明な点が多い。本研究において、NMB遺伝子欠損マウスが褐色脂肪細胞の活性化およびエネルギー代謝調節機構の制御に関与していることを示唆する知見を得た。このことからNMBが肥満治療の有用なターゲットとなることが考えられ、新たな肥満・代謝異常の病態解明と抗肥満治療薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Beige adipocytes are expected to have therapeutic potential in anti-obesity. However, their activation mechanism remains unclear. Since we found that NMB is candidate gene of regulating differentiation of beige adipocyte, we establish NMB gene-deficient mice. Wild-type mice and NMB gene-deficient mice were fed a normal diet (ND) or high fat diet (HFD). As a result, NMB gene-deficient mice fed a high fat diet decrease body weight gain compared to the wild-type mice significantly. There is no difference in food intake and activity between wild-type mice and NMB gene-deficient mice. On the other hand, the oxygen consumption in the NMB gene-deficient mice fed HFD are significantly higher than that in the wild-type mice. Our data suggested that the NMB gene-deficient mice were suppressed in the weight gain due to the high-fat diet by increasing the heat production.

研究分野：代謝学

キーワード：Neuromedin B エネルギー代謝調節機構 ページュ脂肪細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は高血糖、高血圧、高脂血症を含むメタボリックシンドロームの主要なリスクファクターであり、世界的に問題視されている。近年、肥満の新たな治療ターゲットとして注目されているのが、褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞といった熱産生機構を有する脂肪細胞である。これらの熱産生脂肪細胞は成人ヒトでも存在することが確認されており、全身におけるエネルギー代謝量を増加させ、肥満や糖尿病、インスリン抵抗性などの代謝異常を改善する作用を持つことが報告されていることから有用な肥満治療のターゲットとして世界で盛んに研究が行われている。しかし、生体内における褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の活性化機構については未だ不明な点が多い。

ベージュ脂肪細胞の分化を制御する分子を同定するため、独自に樹立したベージュ脂肪前駆細胞株を用いて、shRNA ライブラリースクリーニングを行った。その結果、易分化性を獲得したベージュ脂肪前駆細胞株を単離し(Higa R *et al.* Mol Cell Endocrinol, 2018)、その細胞株に導入された shRNA がニューロメジン B(NMB)を標的にしたものであることが明らかとなった。このことから、NMB がベージュ脂肪細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。

NMB はポンペシン様ペプチドとして単離された神経ペプチドであり、中枢神経系を介した摂食行動やエネルギー代謝調節機構に関与し、全身のホメオスタシスを保つ役割を担っていることが報告されている(Oliveira KJ *et al.* Regul Pept.2008)。また、NMB 受容体遺伝子欠損マウスでは高脂肪食餌下において野生型マウスに比べて体重増加や糖代謝異常が生じにくいという表現型が報告されているが(Paula GS *et al.* J Physiol.2010)、その分子機構については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ベージュ脂肪細胞の増殖、分化、活性化機構ならびに全身のエネルギー代謝調節機構における NMB の役割について解明することを目的とした。NMB 遺伝子欠損マウスを新たに作製し、エネルギー代謝調節機構に関わる一連の解析を行うことで、全身のエネルギー代謝調節機構における NMB の生理機能解明を目指した。加えて、独自に樹立した白色脂肪前駆細胞およびベージュ脂肪前駆細胞を用いた解析を行い、ベージュ脂肪細胞の増殖、分化、活性化における NMB の機能について明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) NMB 遺伝子欠損マウスの作製

遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて、マウス NMB 遺伝子の改変を行った。NMB 遺伝子のエクソン 1 領域の 2 箇所をターゲットとした sgRNA および Cas9 タンパク質発現ベクターをマウス胚に導入し、遺伝子改変を行った。得られた産仔について、標的領域の PCR およびシーケンス解析を行い、フレームシフト変異によって NMB 遺伝子を欠失したマウスの樹立を目指した。

#### (2) 白色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の分化における NMB 機能の解明

独自に樹立した野生型白色脂肪前駆細胞株およびベージュ脂肪前駆細胞株を成熟脂肪細胞分化誘導する際に NMB ペプチドを添加し、成熟脂肪細胞への分化への影響を細胞への脂肪滴の蓄積を指標に形態学的に検討した。

野生型マウスおよび NMB 遺伝子欠損マウスの肩甲骨間褐色脂肪組織、鼠蹊部皮下白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織より、間質血管画分 (SVF) を単離・培養した後、ロシグリタゾン・デキサメタゾン・インスリン・IBMX の 4 剤添加またはロシグリタゾン単剤添加によって成熟脂肪細胞への分化誘導を行い、各脂肪細胞の分化能について、細胞形態および qPCR による FABP4 遺伝子発現解析により検討した。

#### (3) エネルギー代謝調節機構における NMB の生理機能の解析

本研究にて作製した NMB 遺伝子欠損マウスを用いて以下の実験を行い、エネルギー代謝調節機構における NMB の生理機能について検討した。

③ アドレナリン受容体作動薬 (CL316,243) を NMB 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに 1 週間腹腔内投与 (1mg/kg/day) し、鼠蹊部皮下脂肪組織における UCP1 の発現量をウエスタンブロット法を用いて解析し、両マウス群におけるベージュ脂肪細胞の活性化について検討した。

NMB 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに 3 ヶ月齢より通常食または高脂肪食摂餌させ、経時的に体重および摂食量を測定した。また、通常食または高脂肪食摂餌開始 3 ヶ月後に酸素消費量および活動量について、代謝ケージおよび運動量測定装置を用いて解析した。

通常食および高脂肪食摂餌期間終了後、肩甲骨間褐色脂肪組織、鼠蹊部皮下白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肝臓組織の重量の測定、HE 染色による組織形態解析を行った。

高脂肪食負荷 8 週間後に野生型マウスおよび NMB 遺伝子欠損マウスに経口グルコース負荷試験 (OGTT) ならびに絶食時血中グルコース濃度および血清インスリン濃度測定を行い、両マウス群における耐糖能を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NMB 遺伝子欠損マウスの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いた NMB 遺伝子の改変を行い、得られた産仔について PCR およびシーケンス解析を行ったところ、NMB 遺伝子をコードするゲノムの 62 塩基が欠失したマウスが得られた。このマウスでは NMB 遺伝子のフレームシフト変異により機能的な NMB タンパク質が欠失しているものと考えられ、NMB 遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。

##### (2) 白色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の分化における NMB 機能の解明

野生型白色脂肪前駆細胞株およびベージュ脂肪前駆細胞株に NMB を添加することによる成熟脂肪細胞への分化への影響を検討したが、白色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞ともに NMB 添加による成熟脂肪細胞への分化誘導への影響は認められなかった。

野生型および NMB 遺伝子欠損マウスの肩甲骨間褐色脂肪組織、鼠蹊部皮下白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織から間質血管画分 (SVF) を単離・培養した後、成熟脂肪細胞へ分化誘導を行ったが、いずれの脂肪細胞においても、分化誘導試薬 4 剤添加群およびロシグリタゾン単剤添加群ともに野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群間で成熟脂肪細胞の形態および FABP4 遺伝子の発現量について有意な差は認められなかった。

##### (3) NMB 遺伝子欠損マウスを用いたエネルギー代謝調節機構に関する解析

野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群共に  $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬投与によって鼠蹊部皮下脂肪組織における UCP1 タンパク質の発現増加が認められたが、両群間で有意な発現量の差は認められなかった。このことから、 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬によるベージュ脂肪細胞の活性化において NMB は関与しないことが示唆された。 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬刺激と寒冷刺激ではベージュ脂肪細胞の活性化機構が異なるという報告があることから (Yuwei Jiang *et al.* eLife 2017)、今後、寒冷刺激によるベージュ脂肪細胞活性化における NMB の機能について検討したい。

通常食摂餌下では野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群間において、体重および摂食量について有意な差は認められなかった。また、酸素消費量、活動量についても両群間で有意な差は認められなかった。一方、高脂肪食摂餌下では、野生型マウス群に比べ NMB 遺伝子欠損マウス群において体重増加量の有意な減少が認められた。摂食量、活動量については両マウス群間で有意な差は認められなかった。一方、酸素消費量については、高脂肪食摂餌下において、野生型に比べ NMB 遺伝子欠損マウス群で有意に増加していることが明らかとなった。このことから、NMB 遺伝子欠損マウスはエネルギー消費量の増加により高脂肪食摂餌による体重増加が抑制されていることが示唆された。

通常食摂餌下では NMB 遺伝子欠損マウス群の褐色脂肪組織重量が野生型マウス群に比べて減少傾向にあり、脂肪滴の蓄積も減少していた。皮下脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肝臓については両マウス群間で重量・組織形態共に有意な差は認められなかった。高脂肪食摂餌においては NMB 遺伝子欠損マウス群では肝臓重量が野生型群に比べ著明に低下しており、肝臓における脂肪滴の蓄積も野生型マウス群に比べ減少していた。以上のことから、NMB 遺伝子欠損マウス群では褐色脂肪組織における熱産生量が増加しており、高脂肪食摂餌における肝臓への異所性脂肪の蓄積が抑制されていることが示唆された。

高脂肪食負荷 8 週間後の野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群では絶食時血中グルコース濃度および経口グルコース負荷試験 (OGTT) における血糖値に有意な差は認められなかった。一方、NMB 遺伝子欠損マウス群では絶食時血清インスリン濃度が野生型マウス群に比べ有意に低下していた。NMB はインスリン分泌に関与している報告があることから (K Kawai *et al.* Endocrinol. Jpn. 1989)、今後、OGTT における血糖量と血清インスリン量の相関について経時的な解析を行いたい。

以上の結果から、細胞株を用いた *in vitro* における解析では、NMB の白色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の分化に対する機能については明らかにすることが出来なかった。しかし、NMB 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* での解析から、NMB は全身のエネルギー代謝調節機構に関与し、高脂肪食摂餌による体重増加を抑制することが明らかとなった。今後、この表現系についてさらに詳細に解析することで、ベージュ脂肪細胞活性化を含むエネルギー代謝調節機構における NMB の機能を明らかにしたい。

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 Higa Ryoko, Hanada Toshikatsu, Teranishi Hitoshi, Miki Daisuke, Seo Kazuyuki, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Mimata Hiromitsu, Hanada Reiko, Kangawa Kenji, Murai Toshiya, Nakao Kazuwa	4. 巻 474
2. 論文標題 CD105 maintains the thermogenic program of beige adipocytes by regulating Smad2 signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 184 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2018.03.008	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 Fujinami Hiroyuki, Shiraishi Hiroshi, Hada Kazumasa, Inoue Masanori, Morisaki Ikuko, Higa Ryoko, Shin Toshitaka, Kobayashi Takashi, Hanada Reiko, Penninger Josef M., Mimata Hiromitsu, Hanada Toshikatsu	4. 巻 525
2. 論文標題 CLP1 acts as the main RNA kinase in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 129 ~ 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.066	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 比嘉涼子、寺西仁志、花田礼子、花田俊勝、中尾一和
2. 発表標題 マウス由来誘導型褐色脂肪細胞におけるCD105の機能解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉 涼子、花田 礼子、花田 俊勝、寒川 賢治、中尾 一和
2. 発表標題 ベージュ細胞の熱産生機構におけるCD105の役割
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田礼子、花田俊勝
2. 発表標題 CD105は誘導型褐色脂肪細胞において熱産生プログラムを調節する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞におけるCD105の機能解析
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoko Higa, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 CD105 maintains the rhermogenic program of beige adipocyte.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、森崎郁子、鹿野健史朗、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞におけるNeuromedin B (NMB) の機能解析
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoko Higa, Ikuko Morisaki, Kenshiro Shikano, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 Physiological function of Neuromedin B in beige adipocyte
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020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