

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06411

研究課題名(和文) 脂肪細胞分化抑制活性を示すコンドロイチン硫酸種の同定と機能の解明・脂肪量の制御

研究課題名(英文) Identification of chondroitin sulfate isotypes with adipocyte differentiation inhibitory activity, elucidation of their functions, and regulation of fat mass

研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA, Yoshinao)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00337023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞分化とコンドロイチン硫酸(CS)の関係に着目し、主に以下を実施した。1) CSを添加したメディウム中で、脂肪前駆細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化を誘導し、脂肪分化抑制活性が高いCS種を確認した。C型を多く含むCSに、強い脂肪細胞分化抑制活性があることが分かった。2) 脂肪細胞への分化前後のCS糖鎖の変化を詳細に解析し、糖鎖の量、構成するCS種および割合が変化した。さらには、平均糖鎖長も分化後は短化しており、脂肪細胞の分化進行に伴い細胞を取り巻くCSの質的・量的変化が起きていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外マトリックスとして存在するCSが、その質や量(構成する糖鎖の種類、割合、糖鎖長など)を絶妙に変化させて、脂肪細胞の分化を制御していることを本課題で、初めて詳細に確認し、報告した。得られた成果の応用、すなわち、CSの量や質を部位・時期特異的に変化させる技術を開発することで、将来、脂肪細胞の分化抑制、すなわち脂肪量の人為的制御が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the relationship between adipocyte differentiation and chondroitin sulfate (CS), the following experiments were conducted. 1) Induced the differentiation of progenitor adipocyte 3T3-L1 into adipocytes in a medium containing CS, and attempted to identify CS species with high adipogenic differentiation inhibitory activity. As a result, C type rich CS showed strong inhibitory activity against adipogenesis. 2) Analyzed in detail the changes in CS chains before and after differentiation into adipocytes, and found that the amount of chains, the CS species constituting them, and their proportions changed. Furthermore, the average chain length also became shorter after differentiation, indicating that qualitative and quantitative changes in the CSs surrounding the cells occurred with the progress of adipocyte differentiation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：脂肪細胞分化 コンドロイチン硫酸 糖鎖量 糖鎖の構成割合 糖鎖長 3T3-L1 細胞外マトリックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病や高血圧、動脈硬化など生活習慣病の高リスク因子である。脂肪細胞の肥大・増殖のメカニズムを追究できれば、肥満にともなう代謝異常や生活習慣病の発症予防につながるが、同細胞の肥大化や増殖のメカニズムは、まだ完全には解明されていない。

一方、前駆脂肪細胞が、コンドロイチン硫酸 (CS) の存在下では脂肪細胞へ分化しにくいことを先行研究で把握していた。しかし、CS と脂肪細胞への分化抑制との関連や、また、その作用メカニズムについての情報は皆無であったため、脂肪細胞と CS に関する基本情報を把握しておく必要があると考えた。

2. 研究の目的

CS は複数のサブタイプに分類されるが、どの CS 種が脂肪細胞の形成に影響を与え、どのような機構で、いかなる作用を發揮するのかは、未解明のままである。本課題では脂肪細胞の分化に影響を及ぼす CS 種を推定し、その機能や作用メカニズムを解明すること、そして、その CS を応用して脂肪細胞への分化の調節を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

1) CS の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化抑制活性の確認

脂肪前駆細胞 3T3-L1 の培養メディウム中に CS を加えて脂肪細胞への分化を誘導した。その後、脂肪細胞マーカーの発現や細胞中の脂肪の含有レベルを計測し、脂肪細胞分化の抑制を比較評価した。使用した CS は軟骨魚 (アオザメ、ヨシキリザメ、コモンカスベ、アカエイ) に由来する CS である (Takeda *et al*, 2016, Carbohydrate Research)。

2) 脂肪細胞分化過程での CS 産生動態の解析

3T3-L1 を脂肪細胞へ 10 日間分化誘導し、分化後の CS やヒアルロン酸 (HA) にいかなる変化が生じるかを分化前の細胞と比較した。分化前および分化後の培養細胞をそれぞれアセトンで固定・風乾した。その後、抽出糖を最終的に糖の最小単位である二単糖に酵素処理で分解し、分解物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で解析した。さらには、糖鎖長も計測することで、脂肪細胞分化過程での CS 産生の動態を明らかにした。

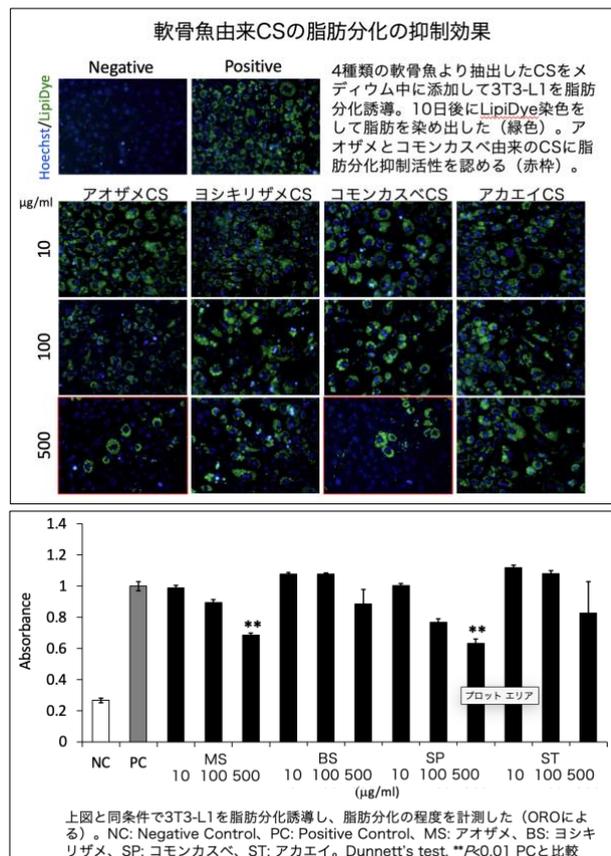
4. 研究成果

1) CS の脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化抑制活性の確認

はじめに、CS による 3T3-L1 の細胞増殖性への影響を確認した。検索した 4 種類の CS は、いずれも細胞毒性は示さなかった。

続いて、分化誘導メディウム中に CS を添加し 10 日間脂肪分化誘導を行った。期間終了後に LipiDye 及び Oil Red O で細胞中の脂肪滴を染色したところ、アオザメおよびコモンカスベより抽出した CS を加えた群での脂肪分化の程度が低く、これらの CS は強い脂肪細胞分化抑制活性を備えることが明らかとなった。この実験で用いた CS は、主に CS-A、C および D から構成され、特に CS-C の割合が高いのが特徴である。また、CS-E は全く含まれない。

過去に間葉系幹細胞である KUSA-A1 を用いて、脂肪分化実験を行ったところ、イカ由来の E 型を多量に含む CS がたの CS 種より高い脂肪細胞分化抑制活性を示し



た。今回も、予備実験として CS-E 存在下で 3T3-L1 の脂肪分化誘導を行ってみたが、興味深いことに 3T3-L1 に対する分化抑制活性を見出すことは出来なかった。細胞の系統あるいは分化ステージによって、脂肪細胞への分化抑制の活性が異なる可能性が考えられた。

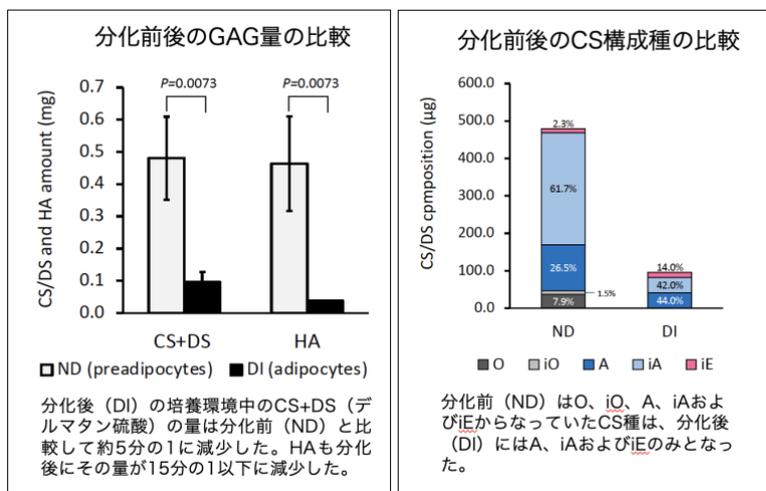
2) 脂肪細胞分化過程での CS 産生動態の解析

3T3-L1 を脂肪細胞へ分化させたところ、培養環境中の CS 量（デルマトン硫酸も含む）は、分化前と比較して約 5 分の 1 に減少した。また、HPLC による測定でも、構成する CS 種や各 CS の構成割合が変化した。例えば、分化前は CS-O、iO、A、iA および iE からなっていた CS 種は、分化後は CS-A、iA および iE のみとなり、CS-O および iO は検出限界以下であった。また、HA も分化後にその量が

15 分の 1 以下に減少した。さらには、分化後の CS の平均糖鎖長が、分化前と比較して有意に短くなっていた。このように、脂肪細胞への分化の進行に伴い、細胞を取り巻く CS の質や量に顕著な変化が生じていることを明らかにした。

脂肪細胞の分化と CS の関連、すなわち脂肪細胞の分化進行に伴う CS 糖鎖の量の減少や構成する CS 種の減少、および平均糖鎖長の短化をはじめを確認した。これらのことは細胞外マトリクスとして存在・分布する CS がその質と量を変化させることで脂肪細胞の分化を調節していることを意味するだろう。

ただし、脂肪細胞分化制御の詳細な調整メカニズムの解明は課題として残っている。今後、本メカニズムの詳細な解明を行い、生体での脂肪量の制御を目指したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cahyadi Danang Dwi, Okamoto Munehiro, Warita Katsuhiko, Takeda-Okuda Naoko, Tamura Jun-ichi, Hosaka Yoshinao Z	4. 巻 86
2. 論文標題 Compositional analysis of chondroitin/dermatan sulfate in rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 811-818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Danang Dwi Cahyadi, Munehiro Okamoto, Katsuhiko Warita, Naoko Takeda-Okuda, Jun-ichi Tamura, Yoshinao Z. Hosaka
2. 発表標題 Compositional analysis of glycosaminoglycans from several tissues in rhesus monkey (Macaca mulatta)
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022京都大会（オンライン）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Danang Dwi Cahyadi, Munehiro Okamoto, Katsuhiko Warita, Naoko Takeda-Okuda, Jun-ichi Tamura, Yoshinao Z. Hosaka
2. 発表標題 Compositional Analysis of Chondroitin/Dermatan Sulfate in Rhesus Monkeys (Macaca mulatta)
3. 学会等名 6th AJIVE Symposium - 2022（オンライン）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Danang Dwi Cahyadi, Katsuhiko Warita, Naoko Takeda-Okuda, Jun-ichi Tamura, Yoshinao Z. Hosaka
2. 発表標題 Quantitative and qualitative analysis of chondroitin/dermatan sulfate in 3T3-L1 cells before and after induction of adipogenesis
3. 学会等名 7th AJIVE Symposium - 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学農学部 http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/about/staff/ Researchmap https://researchmap.jp/Hosaka4470 鳥取大学農学部 http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/about/staff/ Researchmap https://researchmap.jp/Hosaka4470
--

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
研究分担者	田村 純一 (TAMURA Jun-ichi) (30221401)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	
研究分担者	割田 克彦 (WARITA Katsuhiko) (40452669)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究分担者	北村 直樹 (KITAMURA Naoki) (80301951)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	

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		
インドネシア	IPB University		