

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21620

研究課題名（和文）皮膚依存的な体温調節応答の理解に基づく代謝制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Re-understanding of Systemic Metabolism through Skin-mediated Thermal Regulation

研究代表者

植木 浩二郎（Ueki, Kohjiro）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・糖尿病研究センター長

研究者番号：00396714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：プロスタサイクリンアナログをマウス尾部の皮膚に塗布したところ、実際にマウス尾部の皮膚温上昇がサーモグラフィにより確認され、熱放散亢進モデルと考えられた。この時興味深いことに、随時血糖の有意な低下と肝臓糖新生関連遺伝子の有意な発現変化が認められ、こうした変化は寒冷刺激時に見られるものと非常に似通っていた。更に、皮膚が肥満状態において変化し、病態生理に積極的な役割を果たしている可能性を検討するため、肥満モデルマウス皮膚のシングルセルRNAシーケンシング解析を行なった。肥満モデルマウスでは皮膚の各種細胞での遺伝子変化が生じており、特にその一部は炎症や全身の熱産生などに関わりうる分子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究を通じ、肥満状態においては皮膚の分子生物学的性質変化が生じうること、さらにまたそうした皮膚の機能変化が、実際に全身の代謝に対して影響を持ちうることを初めて示した。これまでの代謝研究では皮膚は糖尿病の合併臓器として捉えられることが常であったが、本研究に基づき皮膚が全身の代謝制御に積極的な役割を果たしている可能性が提示され、今後の皮膚代謝学というべき分野として、発展的研究を進めるための根拠が得られた。

研究成果の概要（英文）：When prostacyclin analogs were topically applied to the skin of the mouse tail, an increase in skin temperature of the tail was observed by thermography, establishing a mouse model of enhanced heat dissipation. Interestingly, there was a significant decrease in blood glucose, which was associated with a significant change in expression of genes related to liver gluconeogenesis. These changes were very similar to those seen during cold stimulation. To further investigate the possibility that the alteration of skin physiology occurs in obesity and plays an active role in its pathophysiology, single-cell RNA sequencing analysis of mouse skin was conducted. In an obese mouse model, alterations of gene expressions in various cell clusters within the skin were observed, some of which were molecules that are involved in inflammation and systemic heat production.

研究分野：代謝学

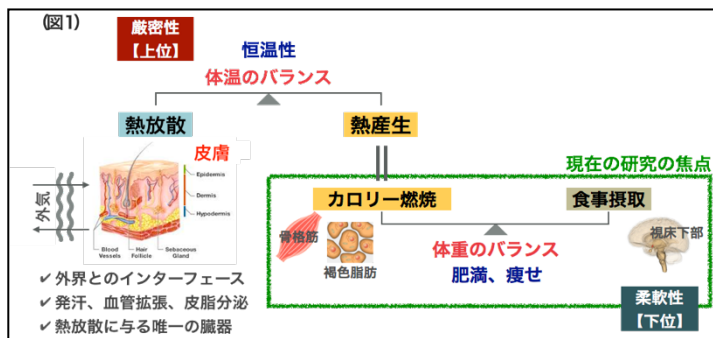
キーワード：皮膚 シングルセル解析 糖代謝 肥満 熱放散

1. 研究開始当初の背景

肥満研究の中で、エネルギーの燃焼は体重を規定する重要な要素と考えられている。しかしながら、エネルギー燃焼は恒温動物にとっては体温を維持するために重要な機能でもある。ここでは、エネルギーの燃焼量は個体からの熱放散と平衡状態にある。

エネルギー燃焼 vs 熱放散 → 体温

重要なことに、エネルギーの燃焼が筋肉や褐色脂肪組織など複数の組織で起きるのに対し、個体の熱放散は唯一、皮膚のみによって担われており、これは毛細血管の拡張・収縮や発汗、皮脂の分泌調節などの機能に因っている。恒温動物にとって体温は極めて厳密に制御される必要があるため、熱放散の調節器官としての皮膚と、エネルギー燃焼のシステムとは、常に緊密なバランスを取りながら機能しなければならない(図)。このことは、皮膚の熱放散調節・適応応答及びその破綻が、代謝調節及び体重増加を含めた代謝障害の制御因子となると同時に、熱放散へのインターベンションが全身の代謝を変化させる可能性を示唆している。



皮膚は実際に個体にとって最大の臓器の一つであり、単なるバリアーとして機能するのみでなく、外界との唯一のインターフェースとして、温度や湿度など外界環境のセンシングを行う一方で毛細血管の拡張・収縮や発汗、皮脂の分泌を行い、外界への適応応答に積極的に関わっている。しかしながら、これまでの代謝研究では、皮膚は主に糖尿病合併症の標的臓器として捉えられるのみであり、代謝における皮膚の積極的な役割は殆ど研究されておらず、全身エネルギー代謝におけるその位置付けについて、我々の理解は不十分なものとどまっている。

皮膚は実際に個体にとって最大の臓器の一つであり、単なるバリアーとして機能するのみでなく、外界との唯一のインターフェースとして、温度や湿度など外界環境のセンシングを行う一方で毛細血管の拡張・収縮や発汗、皮脂の分泌を行い、外界への適応応答に積極的に関わっている。しかしながら、これまでの代謝研究では、皮膚は主に糖尿病合併症の標的臓器として捉えられるのみであり、代謝における皮膚の積極的な役割は殆ど研究されておらず、全身エネルギー代謝におけるその位置付けについて、我々の理解は不十分なものとどまっている。

2. 研究の目的

本研究では皮膚の熱放散へのインターベンションが、エネルギー燃焼の変化、あるいは全身性の代謝異常に対する治療効果をもたらすか否かを検討することを第一の目的とした。また、この様な熱放散機構の異常が肥満病態において生じているか否か、その病態生理における意義を解析することを目標とした。

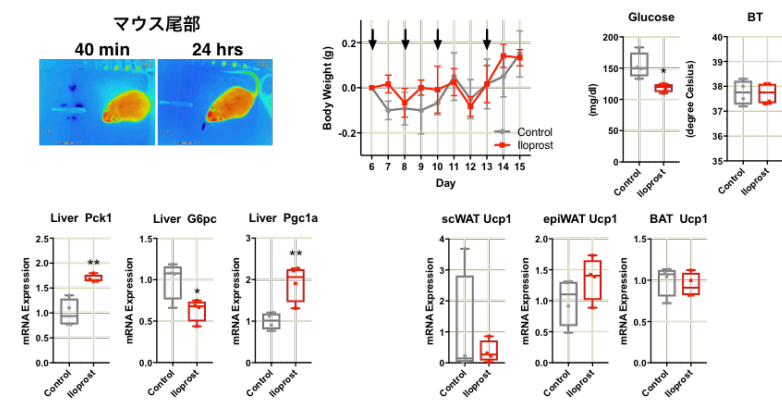
3. 研究の方法

皮膚は外界に露出した臓器であるため、非侵襲的な方法で機能測定・介入ができるというメリットがある。その中でもマウス尾部は体毛が無くかつ血流が豊富なため、マウス全体の熱放散の20%を担うとされる。肺高血圧の治療薬として用いられるプロスタサイクリンアナログ Iloprost (Ventavis®) をマウス尾部の皮膚に塗布し、熱放散の変化、および全身の代謝に対する影響の評価を行なった。

また、皮膚が肥満状態において変化し、その病態生理に積極的な役割を果たしているか否かを網羅的に解析するため、痩せ型マウスおよび肥満モデルマウスの皮膚を採取、これを単一細胞化し、シングルセル RNA シークエンシング解析を行ない、肥満モデルマウスにおける皮膚の各種細胞での遺伝子変化を網羅的に検討した。

4. 研究成果

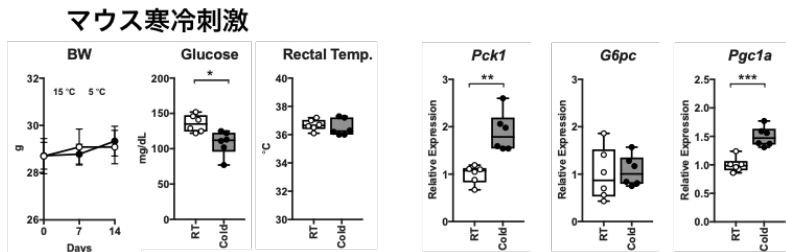
(1) マウス熱放散へのインターベンション



Iloprost を皮膚に塗布した場合、24 時間以上にわたって皮膚の血管拡張反応及び皮膚温の上昇が認められた (Drury JK et al., 1985, 及び自験例)。これを承けて、野生型マウス尾部に Iloprost を隔日に塗布し、2 週間の観察を行なった。Iloprost のマウス尾部塗布により、マウス尾部の皮膚温上昇がサーモグラフィーにより確認され、このモ

デルではマウス尾部からの熱放散が亢進していることが示唆された。

この時興味深いことに、随時血糖の有意な低下と肝臓糖新生関連遺伝子の有意な発現変化が認められた。こうした変化は、寒冷刺激時に見られるものと非常に似通っており、実際に皮膚からの熱放散の変化が全身の代謝に影響を与えた可能性が示唆された。



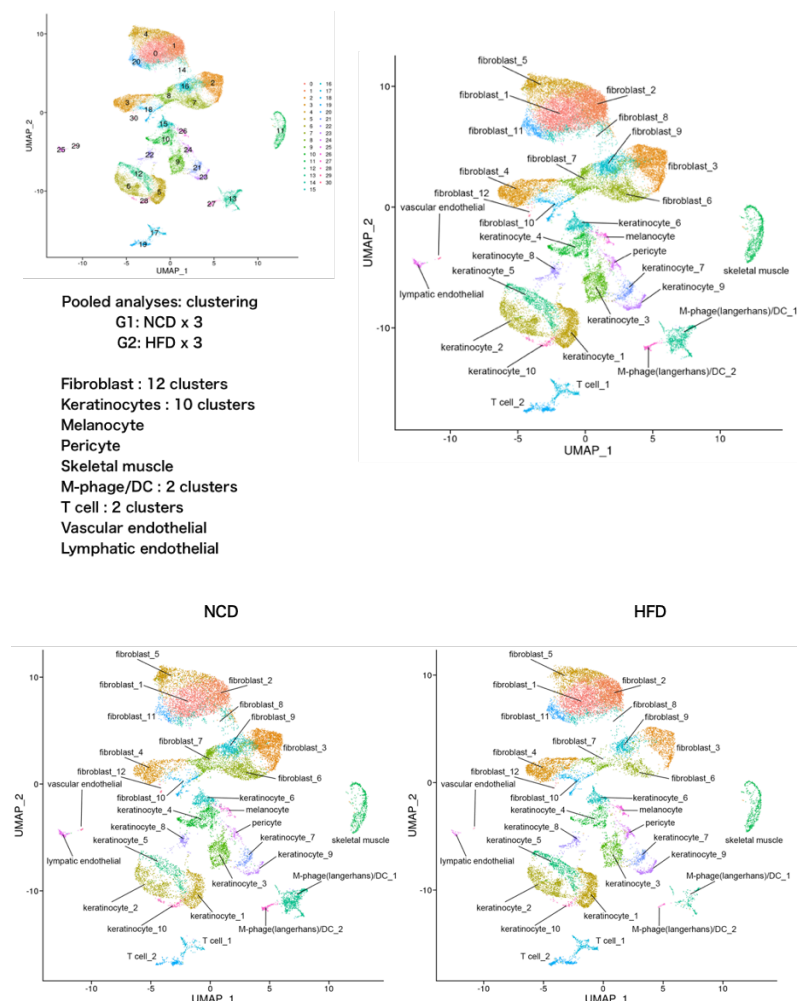
## (2) 肥満モデルマウス皮膚のシングルセル遺伝子解析

(1)の結果から、皮膚、特に皮膚からの熱放散と全身の代謝の間には、実際にこれまで想定されている以上の関わりがある可能性が示唆された。このことを受け、肥満モデルマウス皮膚では何らかの遺伝子発現の変化が生じ、これが肥満時に認められる代謝異常や全身性の合併症の発症に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。

そこで、本研究において当初は熱放散に焦点を当てて解析を進める予定であったが、より網羅的に肥満における皮膚の遺伝子発現変化を解析し、その一端として熱放散に関わりうる遺伝子発現の変化を確認できると考え、痩せ型マウスおよび肥満モデルマウスの皮膚についてシングルセル RNA シークエンシング解析を行うこととした。

### ① シングルセル解析概要

24 週令の肥満モデルマウスおよびコントロールの同週令の痩せ型マウスの背部皮膚を剃毛後、1 x 2cm 程度の皮膚片を採取した。これを酵素消化によりシングルセル化した後、シングルセル RNA シークエンシング解析を行なった。



シングルセルシークエンシングの結果、UMAPでは痩せ型・肥満型マウスの皮膚を合わせた解析により合計 30 クラスターの細胞群が良好に分離された。内訳として線維芽細胞が 12 クラスター、表皮細胞が 10 クラスターの他、メラノサイト、周皮細胞、筋細胞、各種免疫細胞が観察された (上図)。

この時、痩せ型マウス (NCD)、肥満モデルマウス (HFD) の皮膚をそれぞれ解したところ、高脂肪食負荷によって出現する様な新たな細胞群は観察されず、両者から得られるクラスターは非常に似通っており、細胞構成のロバストネスが示唆された。

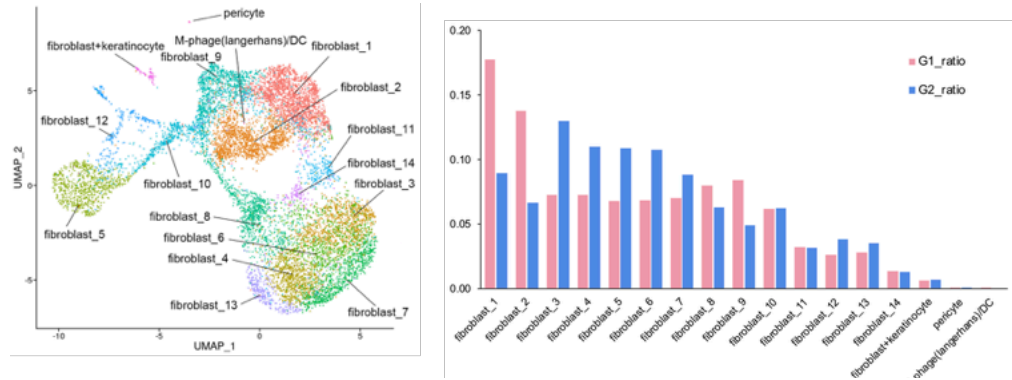
この結果を受けて、各々の細胞クラスターにおいて、痩せ型マウスと肥満モデルマウスを比較し、遺伝子発現の変化を観察することとした。

以下に主な変化につき概要を記載する。

② 各クラスターにおける遺伝子発現変化の解析

a) 線維芽細胞

線維芽細胞は全 10 クラスターに区分されたが、肥満モデルマウスにおいては痩せ型マウスに比して多くの細胞群で *Ilf6*, *Nfkb1* など炎症関連マーカー遺伝子の発現上昇、および *Klf2*, *Klf4*, *Junb*, *Jund*, *Fos11*, *Fos12* などの細胞増殖関連遺伝子の上昇が認められた。こうした炎症の上昇は、線維芽細胞のみを対象にサブクラスタリングを施行した場合にも、炎症性プロファイルを有する細胞群の割合の増加として観察された（下図）。また興味深いことに、肥満モデルマウス皮膚線維芽細胞においては *Irs2*



cluster	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Marker Gene	<i>Cilp</i>	<i>Cst3</i>	<i>Cxcl2</i>	<i>Smpd3</i>	<i>Col1a1</i>	<i>Uap1</i>	<i>Cxcl13</i>	<i>Postn</i>	<i>Hmcn2</i>
	<i>Cygb</i>	<i>Cxcl14</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Sbsn</i>	<i>Col1a2</i>	<i>Il33</i>	<i>Procr</i>	<i>Fbn1</i>	<i>Thbs4</i>
	<i>Fmo2</i>	<i>Fth1</i>	<i>Ptx3</i>	<i>Pi16</i>	<i>Ctla2a</i>	<i>Gfpt2</i>	<i>Plpp3</i>	<i>Ccn3</i>	<i>Jun</i>
	<i>Gas6</i>	<i>Tmsb10</i>	<i>Ptgs2</i>	<i>Igfbp5</i>	<i>Ctsk</i>			<i>Il1r1</i>	<i>Col6a3</i>
	<i>Gpx3</i>	<i>Apod</i>	<i>Cd55</i>	<i>C3</i>	<i>Sparc</i>			<i>Mfap5</i>	<i>Abca8a</i>
	<i>Igfbp7</i>	<i>Gdf10</i>	<i>Eif4e</i>	<i>Sema3c</i>	<i>Col3a1</i>			<i>Akr1c18</i>	<i>Fos</i>
	<i>Mgp</i>	<i>Apoe</i>	<i>Ugdh</i>	<i>Anxa3</i>	<i>Lum</i>			<i>Fstl1</i>	
	<i>Myoc</i>	<i>C7</i>	<i>Il6</i>	<i>Igfbp4</i>	<i>Ndufa4l2</i>				
	<i>Sfrp4</i>		<i>Ccl2</i>	<i>Sema3e</i>	<i>Cpz</i>				
	<i>Tm4sf1</i>		<i>Plat</i>	<i>Dmkn</i>	<i>Tgfb1</i>				

遺伝子の発現上昇が認められた。これらに対し、肥満に伴って発現が減少した遺伝子として *Timp1* が目立った。皮膚における *Timp1* の発現は紫外線ダメージや老化に伴い低下し、皮膚リモデリング機構の障害に伴う皮膚の老化に関わることが知られており（Yokose U et al., J Invest Dermatol, 2012）、肥満と老化との関連を示唆する所見として興味深いものと考えられた。

b) 表皮細胞

表皮細胞は全 9 クラスターに分類されたが、肥満モデルマウスと痩せ型マウスを比較して、やはり各クラスターで共通して発現変化を示す遺伝子が目立った。その中でも *Ccl27a* は多くの表皮細胞のクラスターで発現が上昇していた。CCL-27a は表皮細胞、中でもおもに基底細胞に多く存在するケモカインであり、その受容体 CCR-10 と結合することで T 細胞誘導性の炎症を皮膚に惹起する（Homey B et al., Nat Med, 2002）。興味深いことに *Ccl27a* の発現は IL-1b や TNF $\alpha$  といった炎症性サイトカインにより正に制御される。また近年、皮膚の炎症性疾患は肥満により増悪し、この変化は皮膚の T cell の character の変化を伴うことなどが報告されている（Bapet SP et al, Nature, 2022）。これらの所見からは、肥満における皮膚の炎症性の変化とその中で表皮細胞由来のケモカインの果たす役割が想定され、今後検証すべき課題と考えられる。

c) 筋細胞

ここで検出された筋細胞は遺伝子発現の性質としても骨格筋細胞であり、立毛筋や血管周囲の筋細胞などの平滑筋由来の細胞とは考えられないことから、*Panniculus carnosus* muscle に由来するものと推測された。筋細胞のクラスターにおいては、*Sarcophilin* (*Sln*) 遺伝子の著明な減少が観察された。サルコリピンは筋肉由来の非震え熱産生 non-shivering thermogenesis に重要な遺伝子として知られ、興味深いことに *Sln* 欠損マウスは高脂肪食下で肥満を呈することが報告されている（Bal NC et al., Nat Med, 2012）。一方肥満においては *Sln* の発現はむしろ上昇することが分かってお

り、皮膚での  $SIn$  の低下は少なくともマウスにおいてはエネルギー燃焼の低下を介し体重増加に寄与する可能性が想定され、今後の研究対象として興味深いものと考えられた。

### (3) まとめ・今後の方針

以上我々は、皮膚における熱放散の変化が全身の代謝に対して影響を与えうること、また肥満においてはシングルセル遺伝子解析によって明らかとなった通り各種細胞群において遺伝子発現の変化が生じており、その一部は炎症や全身の熱産生などに関わりうることを見出した。

今後これらの遺伝子変化について、実際に病態に関わりうるものであるかどうかを検証する必要があり、現在モデルマウスの構築を行っている。

また、マウスにおける皮膚の変化として得られた知見が、そのままヒトの病態に外挿できるものであるか否かが不明であり、大きな課題と考えられる。このため、今後ヒトの皮膚を用いた単一細胞解析を行い、マウスで得られた知見と比較すること、さらにヒトとマウスで共通に発現変化が認められる遺伝子に関して細胞種特異的・皮膚特異的な遺伝子欠損マウスを作成し、当該遺伝子変化の病態における役割を検討したいと考えている。

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
研究分担者	粟澤 元晴  (Awazawa Motoharu)  (90466764)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・糖尿病研究センター 分子糖尿病医学研究部 統合生理学研究室長    (82610)	

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