

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21790055  
 研究課題名（和文） 褐色脂肪細胞の正常な分化を制御する鍵因子の同定と分子基盤の確立  
 研究課題名（英文） Identification of a key factor regulating the normal differentiation of 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・特任准教授  
 研究者番号：10416216

## 研究成果の概要（和文）：

褐色脂肪細胞は、生体内の余剰なエネルギーを積極的に消費して熱産生を行う唯一の細胞であり、エネルギー恒常性の維持に極めて重要な役割を担っている。我々は、褐色脂肪細胞が正常に形成されるために必須の因子の探索を行った。その結果、高濃度のインスリン存在下では、褐色脂肪細胞の熱産生に必須の UCP1 遺伝子の発現がほぼ完全に消失することが明らかになり、正常な褐色脂肪細胞の機能を保つためには、インスリン濃度を厳密にコントロールする必要があることが判明した。また、脂質代謝と糖代謝のバランスを制御する PDK4 遺伝子の発現が高濃度のインスリンによってほぼ完全に抑制されることが判明し、これが熱産生機能の著しい低下を引き起こす原因の一つであることを明らかとした。

## 研究成果の概要（英文）：

Brown adipocytes play an important role in energy homeostasis because of their unique function dissipating excess energy as heat. We attempted to identify a key factor regulating the normal differentiation of brown adipocytes. As a result, in presence of high concentration of insulin, the expression of UCP1, which is essential for energy consumption in brown adipocytes, is significantly suppressed. In addition, high concentration of insulin also suppressed the expression of PDK4, which is known as a key regulatory enzyme involved in switching the energy source from glucose to fatty acids. From this result, it was suggested that the induction of PDK4 during brown adipocyte differentiation is essential for the energy dissipating function of the normal brown adipocytes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1)細胞・組織、(2)発現制御、(3)発生・分化、(4)褐色脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた哺乳動物の体内には2種類の脂肪組織（白色脂肪組織（WAT）と褐色脂肪組織（BAT））が存在する。WATは生体が摂取したエネルギーの余剰分を中性脂肪として貯蔵するとともに、様々な生理活性物質を分泌して生体機能を調節する内分泌器官として機能している。WATが過剰に脂肪を蓄積した肥満の状態になると、内分泌機能が破綻を来し、糖尿病や高脂血症、高血圧などの進展を惹起することも明らかになっており、近年、問題となっているメタボリックシンドロームの中心的役割を果たす組織として注目されている。一方、BATに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内部に蓄えた脂肪を積極的に燃焼して熱産生を行うことが古くから知られている（Physiol Rev 64, 1984）。

我々の最近の研究で、ラットのBATから単離した未分化細胞をある特定の条件下で培養すると、脂肪の蓄積は認められるが、褐色脂肪細胞のマーカであるUCP1を全く発現しない細胞に分化・成熟することが明らかになった。この細胞は、遺伝子の発現パターンなどから、白色脂肪細胞と類似した特徴を有していることも判明しつつあり、BAT内に存在する未分化細胞は、条件によって褐色あるいは白色いずれの脂肪細胞にも分化できる能力を持った共通の幹細胞である可能性が考えられた。さらに、肥満モデルラットのBATは、同系統の野生型と比較して顕著に白色を帯びて肥大化しており、遺伝子の発現パターンも多く、WATと共通していることが申請者らの最近の研究で判明しつつある。しかし、完全に白色化していたわけではなく、BATとしての特徴も併せ持っていたことから、栄養過多やホルモンバランスの変化などによって、本来、褐色脂肪細胞に分化すべき未分化細胞の一部が白色脂肪細胞様に分化したか、あるいは褐色脂肪細胞が過剰に脂肪を蓄積することで白色脂肪細胞様に変化したかのいずれかの可能性が考えられた。いずれにしても、細胞あるいは組織レベルで「褐色→白色様」という形態学的、機能的変化が起こり得るとともに、このような変化が生体内のエネルギーバランスに破綻を来す要因の一つになると考えられた。

## 2. 研究の目的

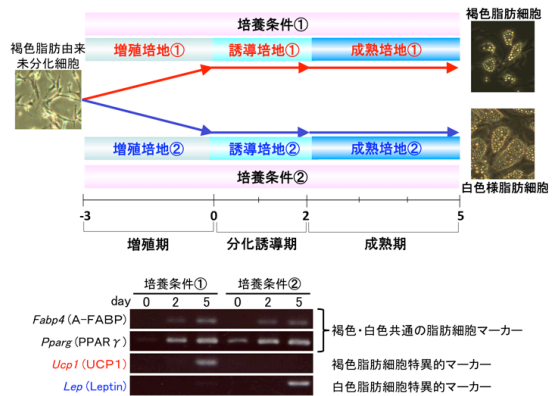
上述のような背景から、本研究では、脂肪を積極的に燃焼して熱産生を行う褐色脂肪組織中に存在する未分化細胞が、正常な機能を有する褐色脂肪細胞に分化するプロセスを支配する鍵因子を同定して、その分子メカニズムを解明することを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 褐色脂肪細胞の正常な分化を制御する細胞外因子の同定

我々は、褐色脂肪組織から単離した未分化細胞を正常な褐色脂肪細胞に分化させる初代培養系を確立しており（培養条件1）、さらに培養条件によっては、白色脂肪細胞様の特徴を有する脂肪細胞に分化する（培養条件2）という非常に興味深い現象を見出した。

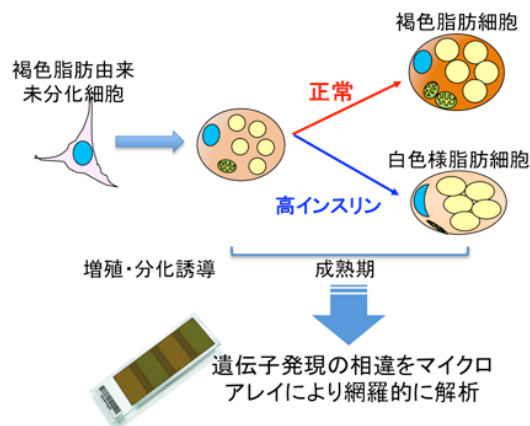
両者の培養条件における相違点は、増殖過



程、分化誘導過程、成熟過程で使用する培地の成分のみであることから、いずれかの培地中に含まれる成分によって、最終的な褐色脂肪細胞の機能が大きく影響を受けることを意味している。そこで、両者の培地組成の相違点に着目し、褐色脂肪細胞の正常な分化を制御する細胞外因子を同定するための検討を行った。

### (2) 網羅的遺伝子発現解析に基づく褐色脂肪細胞の正常分化を制御する因子の探索

詳細は後述するが、上記(1)の検討によって、成熟期に使用する培地中のインスリン濃度が1nM以上の条件下では、正常な褐色脂肪細胞の分化が著しく阻害され、白色脂肪細胞様に分化することを見出した。そこで次に、成熟期のインスリン濃度の相違によって引き起こされる細胞内での変化を詳細に解析



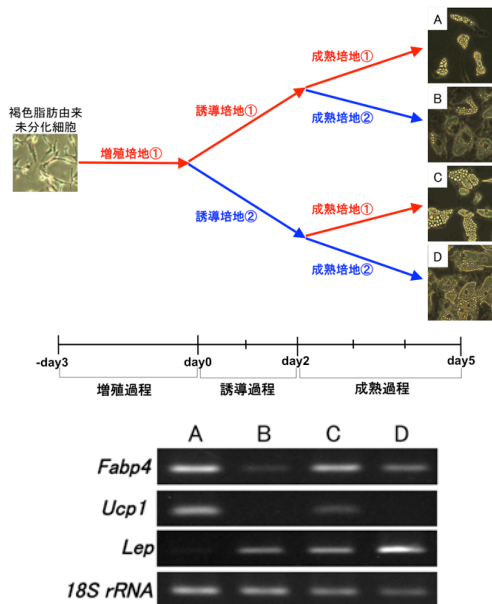
するため、異なるインスリン濃度下で培養し

た細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 褐色脂肪細胞の正常な分化を制御する細胞外因子の同定

2通りの培養条件では、増殖培地・分化誘導培地・成熟培地のそれぞれ3種類の培地を使用する。そこで、まず始めに、正常な褐色脂肪細胞に分化する条件1および白色脂肪細胞様に分化する条件2で使用する培地の組み合わせを変えて培養することで、正常な褐色脂肪細胞の分化に対して最も影響を及ぼす培地を絞り込むための検討を行った。その結果、増殖および分化誘導時に用いる培地に関わらず、成熟培地1の時に褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子 *Ucp1* の発現が認められ、成熟培地2の時に *Ucp1* の発現が顕著に低下することが明らかとなった。

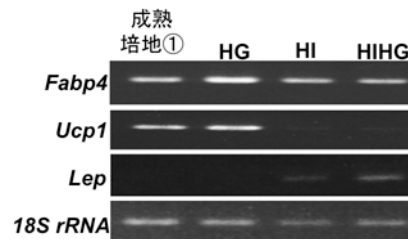


これらの結果から、正常な褐色脂肪細胞に分化するか否かは、主として成熟期に使用する培地中の何らかの成分によって大きく影響を受けることが明らかとなった。そこで、成熟培地1および2の組成を詳細に比較し、細かな相違点は多数認められたが、最も大きな相違点の一つとして、インスリン濃度が両者で1万倍以上異なる（成熟培地1では0.1nMであるのに対し、成熟培地2では1.74 μM）という点に着目した。また、それに付随してグルコースの濃度も約1.5倍の差があったため（成熟培地1では約3g/Lであるのに対し、成熟培地2では4.5g/L）、成熟培地中のインスリンとグルコースの濃度が褐色脂肪細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、増殖期および分化誘導に使用する培地はいずれも条件1のものに固定し、成熟培地1中のインスリンおよび

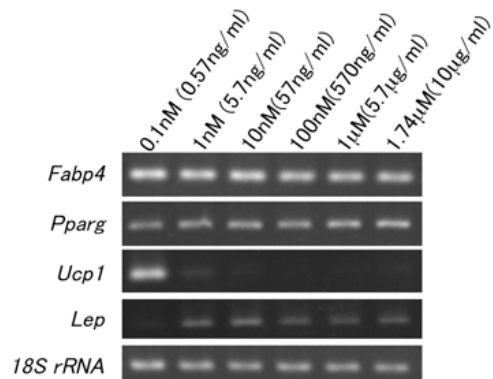
グルコースの濃度のみを変えて培養を行った。

	成熟培地①	HG	HI	HIHG
グルコース	3 g/L	4.5 g/L	3 g/L	4.5 g/L
インスリン	0.1 nM	0.1 nM	1.74 μM	1.74 μM

その結果、下図に示したように、高濃度のインスリン存在下では *Ucp1* の発現が著しく低下し、*Lep* の発現が誘導されることが明らかとなった。また、グルコース濃度は単独ではほとんど影響を及ぼさなかったが、高濃度のインスリン存在下では、グルコースの濃度が高いほどインスリンの影響がより強くなることが示唆された。



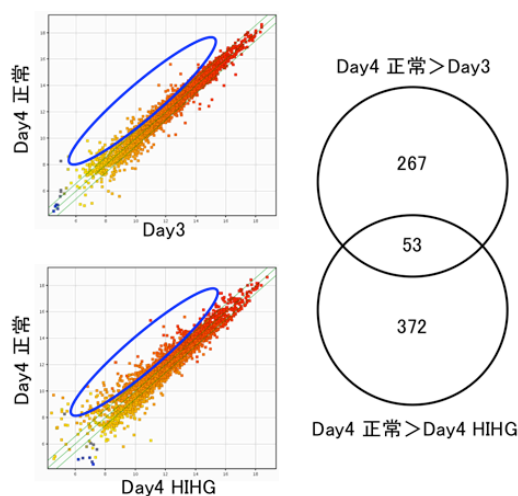
この、1.74 μM (10 μg/ml) というインスリン濃度は、白色脂肪細胞のモデル細胞株である3T3-L1細胞を培養する際に良く使用される濃度であり、生理的なインスリン濃度（数ng/ml程度から高インスリン血症でも数十ng/ml）からすると、あまりにも高濃度であるため、上記の結果だけでは、生理的にも起こり得る現象か否かは評価できない。そこで、0.1nM (0.57ng/ml) ~1.74 μM (10 μg/ml) までの範囲でインスリン濃度を変化させ、生理的なインスリン濃度域においても同様の現象が認められるか否かについて検討を行った結果、下図に示した通り、インスリンの濃度依存的に *Ucp1* 発現の減少と *Lep* の発現誘導が認められ、生理的には高インスリン血症の状態とほぼ同程度である10nM (57ng/ml) では *Ucp1* の発現は顕著に抑制されることが明らかとなった。



従って、我々が見いだした高濃度のインスリンが正常な褐色脂肪細胞の分化を著しく抑制するという現象は、生理的にも十分に起こり得ることが強く示唆され、正常な褐色脂肪細胞の形成を促すためにはインスリン濃度を厳密にコントロールして過度の上昇を防ぐ必要があることが重要であると考えられる。

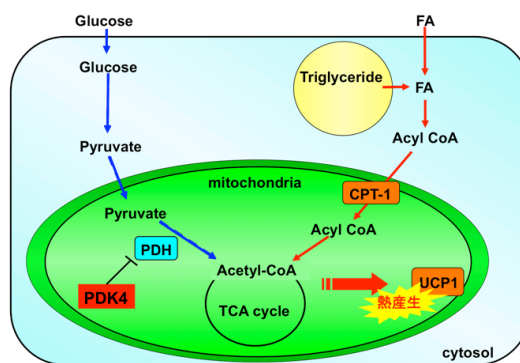
## (2) 網羅的遺伝子発現解析に基づく褐色脂肪細胞の正常分化を制御する因子の探索

褐色脂肪細胞の分化過程において、高濃度のインスリンがどのような影響を及ぼすかを詳細に解析することで、正常な分化に必須のプロセスが浮かび上がってくると考え、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。まず、正常な褐色脂肪細胞の分化過程において、成熟期の day3~day4 の間で発現量が上昇する (1.5 倍以上) 遺伝子が 320 種類見いだされた。また、day3~day4 までの 24 時間だけ HIHG 培地で処理した細胞と比較した場合は、正常分化の過程では 425 種類の遺伝子が高発現していた。この両者に重複して含まれる遺伝子を抽出したところ、53 種類の遺伝子が見いだされた。

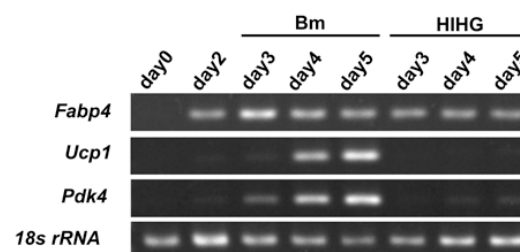


この 53 種類の遺伝子の中には Ucp1 も含まれていたことから、その他の遺伝子群も正常な褐色脂肪細胞の分化・成熟プロセスにおいて重要な役割を担っているものが多数含まれているとされる。中でも、特に、エネルギー代謝調節の鍵酵素として知られている PDK4 遺伝子の機能に注目した。PDK4 は、解糖系の最終産物であるピルビン酸からアセチル CoA を合成する反応を阻害することで、細胞内でのエネルギー源を糖質から脂質へと変換する働きを有している。正常な熱産生機能を有する褐色脂肪細胞では、その主なエネルギー源は脂肪酸であることから、褐色脂肪組織中に存在する未分化細胞が、正常な褐色脂肪細胞に分化・成熟する際に PDK4 遺

伝子の発現が誘導され、糖代謝から脂質代謝へのスイッチが行われると考えられる。



実際、正常な分化過程と HIHG 処理化での分化過程における PDK4 遺伝子の発現パターンを解析した結果、Ucp1 と全く同様に正常な分化過程においては著しく発現が誘導されるのに対し、HIHG 処理化では発現の誘導が顕著に阻害された。



本来は、成熟過程において PDK4 の発現が誘導されることで、糖代謝から脂質代謝への転換が起こるのに対し、高濃度のインスリンによって、その発現誘導が阻害されることで、脂質代謝への転換が生じず、結果的に糖代謝が促進されると考えられる。解糖系の副産物としてグリセロール産生が亢進した結果、細胞内でのトリグリセリド蓄積が亢進し、白色脂肪細胞と類似した状態に陥ったものと考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- Ikeda Y, Hama S, Kajimoto K, Okuno T, Tsuchiya H, Kogure K. "Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats" *Biol Pharm Bull* 2011 in press 査読有
- Hayashi Y, Kajimoto K, Iida S, Sato Y, Mizufune S, Kaji N, Kamiya H, Baba Y, Harashima H. "DNA microarray analysis of whole blood cells and insulin-sensitive tissues

reveals the usefulness of blood RNA profiling as a source of markers for predicting type 2 diabetes.” *Biol Pharm Bull.* (2010) 33; 1033-1042. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 梶本和昭. “網羅的遺伝子発現解析から分かる褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の分化と起源” 日本薬学会北海道支部第134回例会総説講演, 2010年5月8日(札幌)
2. 梶本和昭, 白澤北斗, 小暮健太朗, 片岡正俊, 篠原康雄 “網羅的遺伝子発現解析に基づく脂肪細胞の多様性の解析.” 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日(岡山)
3. 池田義人, 濱進, 梶本和昭, 小暮健太朗 “脂肪細胞における各アディポサイトカイン連関の解明.” 日本薬学会第130年会, 2010年3月28日(岡山)

## 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・特任准教授

研究者番号：10416216

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし