

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06179

研究課題名（和文）ミトコンドリア動態制御因子による褐色脂肪細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanisms Regulating Brown Adipocyte Differentiation by Mitochondrial Dynamics Factors

研究代表者

長島 駿（Nagashima, Shun）

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：40634465

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）：肥満は2型糖尿病、脂肪肝、脂質異常症などのリスク要因であり、健康寿命を延ばすためにはその予防が重要である。褐色脂肪細胞は中性脂肪を熱エネルギーに変換して消費することで、肥満防止に寄与する。本研究では、ミトコンドリア動態制御因子が褐色脂肪細胞の分化を制御する転写因子の活性化を調節することを見出した。さらに、褐色脂肪細胞の分化を制御するミトコンドリア動態制御因子の機能ドメインを同定することができた。本研究は、ミトコンドリア動態制御因子による褐色脂肪細胞の分化制御機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミトコンドリア動態制御因子が褐色脂肪細胞の分化を制御する機構の一端を解明し、分化を制御する機能ドメインを同定した。ミトコンドリア動態制御因子の特定の機能ドメインをターゲットとした低分子化合物の開発は、褐色脂肪細胞の活性化を介した肥満に対する予防・治療薬の創薬につながる可能性がある。これにより、肥満や関連する代謝疾患に対する新たな治療アプローチの確立、そして健康寿命の延伸に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Obesity is a risk factor for type 2 diabetes, fatty liver, and dyslipidemia, and its prevention is crucial for extending healthy lifespan. Brown adipocytes contribute to the prevention of obesity by converting neutral fats into thermal energy and consuming them. In this study, we found that mitochondrial dynamics factors regulate the activation of transcription factors that control the differentiation of brown adipocytes. Furthermore, we identified the functional domains of mitochondrial dynamics factors that regulate the differentiation of brown adipocytes. This research elucidated part of the mechanism by which mitochondrial dynamics factors control the differentiation of brown adipocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 褐色脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満や生活習慣病は心疾患などのリスクを高めることから、肥満の予防は健康寿命の延伸に重要であると考えられている。体内には大きく2つの異なる役割をもつ脂肪細胞が存在する。白色脂肪細胞はエネルギーを溜め込むのに対し、褐色脂肪細胞は熱産生による体温調節を担い、エネルギーを消費する役割を持つ。肥満に伴って白色脂肪細胞が肥大化し、肥大化によって脂肪細胞が機能不全に陥ることが生活習慣病の発症につながると考えられている。反対に、褐色脂肪細胞の量が多い人は体脂肪が少なく、肥満度を表す指数であるBMIが低いとの報告があることから、褐色脂肪細胞の活性化が脂肪を燃焼し、肥満や糖尿病などの生活習慣病の予防や改善に大きな効果を持つことが期待されている。近年の研究では、褐色脂肪細胞と同様に寒冷刺激時に熱産生を行う褐色脂肪様細胞(ベージュ脂肪細胞)が注目を集めており、肥満などの生活習慣病との関連が多く報告されている。ベージュ脂肪細胞は、白色脂肪細胞から褐色化すること(ブラウニング)が知られており、ブラウニングを増やすことが生活習慣病の予防法、治療法の一つの課題といえる。

褐色脂肪細胞の特徴として、ミトコンドリアが多く、小さい脂肪滴が数多くある。褐色脂肪細胞のミトコンドリアはATP産生ではなく、熱産生を主に行う。この熱産生にミトコンドリアタンパク質 uncoupling protein 1(UCP1)が中心的な役割を担っている。褐色脂肪細胞の分化時にUCP1の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC1) や PRDM16 が活性化され、UCP1などの熱産生に関与する遺伝子が誘導される。PGC1はミトコンドリア合成の転写誘導にも関与することから、褐色脂肪細胞の分化時にミトコンドリアは顕著に増加する。実際に褐色脂肪前駆細胞を分化誘導させると、ミトコンドリア量の増加とその形態変化が認められる。興味深いことに、分化誘導とともに小胞体が減少することが報告されており、褐色脂肪細胞の分化の際にオルガネラがダイナミックに変化する。近年、ミトコンドリアと小胞体とのコンタクトがカルシウムや脂質のやりとり、細胞死の制御など細胞内で重要な役割を担うことが多く報告されており、オルガネラ間コンタクトの機能解明や制御機構の解明の重要性が注目されている。脂肪細胞においても脂肪滴とミトコンドリアが接着すること、脂肪滴に接着したミトコンドリアはエネルギー産生能力が高いことが報告されている。また、寒冷刺激時に褐色脂肪細胞のミトコンドリアは分裂することが報告されている。しかしながら、褐色脂肪細胞の分化機構におけるオルガネラ新生・分解・分裂・融合・オルガネラ間コンタクト(オルガネラ動態)の役割は不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

褐色脂肪前駆細胞では、長く伸びた形態や分岐した形態のミトコンドリアが多く観察される。一方、分化した褐色脂肪細胞では、ミトコンドリア内部のクリステが発達しており、球状の小さな形態のミトコンドリアが多く観察される。褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化の過程で、ミトコンドリアの構造はダイナミックに変化する。また、ミトコンドリアと小胞体の接着点も大きく変化すると考えられている。褐色脂肪細胞への分化の過程で、ミトコンドリアやミトコンドリアと他のオルガネラのコンタクトは変化するが、これらの構造変化が褐色脂肪細胞の分化に与える影響に関しては未解明な点が多く残されている。本研究は、褐色脂肪細胞の分化におけるミトコンドリア形態変化の役割を解明することを目的とした。本研究で得られた成果は、褐色脂肪細胞の活性化を介した生活習慣病の予防や治療法の創薬研究に繋がる研究基盤の構築に貢献できると考える。

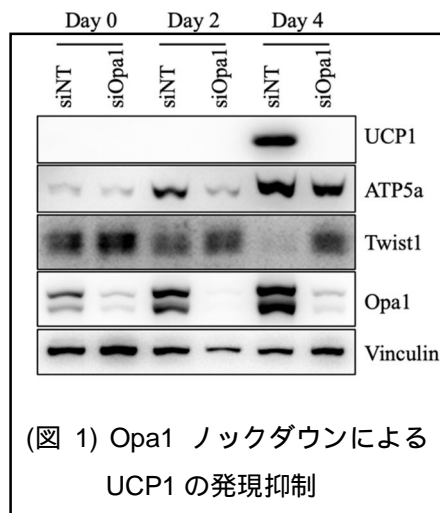
3. 研究の方法

マウス褐色脂肪細胞はE17.5胚まで未分化状態の前駆細胞として存在する。その後、脂肪滴の形成やUCP1の発現誘導などを経て、成熟した褐色脂肪細胞へと分化する。分化前の褐色脂肪前駆細胞が豊富に存在する産後間もないpostnatal day 0 (P0)の個体、あるいはembryonic day 18.5 (E18.5)の個体の肩甲骨間から未分化な褐色脂肪細胞組織を採取し、初代培養法にて褐色脂肪前駆細胞を取得した。未分化な褐色脂肪前駆細胞は、Differentiation Induce Medium (DI)に2日間培養、次いでDifferentiation Enhance Medium (DE)に2日間培養することにより、UCP1の発現が認められる褐色脂肪細胞へと分化誘導する実験系を用いて研究を行った。siRNAを用いて目的遺伝子を発現抑制することにより、褐色脂肪細胞の分化におけるミトコンドリア形態を制御する因子の役割の解明を進めた。

4. 研究成果

Optic Atrophy 1 (Opa1) はミトコンドリア内膜に局在する GTPase タンパク質であり、ミトコンドリア内膜の融合や内膜構造の形成に関与する。褐色脂肪細胞の分化にミトコンドリアの内膜構造の変化が関与するか検証するために、siRNA を用いて Opa1 をノックダウンした褐色脂肪前駆細胞を分化誘導し、解析を進めた。Opa1 を発現抑制した結果、褐色脂肪細胞特異的タンパク質である UCP1 の発現の減少が認められた (図 1)。また、mRNA レベルでも UCP1 の発現が減少し、分化後期に UCP1 を誘導する CIDEA や、UCP1 の誘導を促す甲状腺ホルモン活性化酵素である Dio2、脂肪細胞特異的に高発現する aP2 などの分化マーカーの発現低下も認められた。さらに、不死化褐色脂肪前駆細胞である T37i 細胞においても同様に Opa1 をノックダウンし、分化誘導を行ったところ、UCP1 のタンパク質レベルの低下が認められた。これらの結果から、Opa1 の欠失が褐色脂肪細胞の分化に重要な分子の発現を抑制することが示唆され、Opa1 が褐色脂肪細胞の分化において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

褐色脂肪細胞は発生学的に沿軸中胚葉由来であり、間葉系幹細胞を経て Myf5 陽性前駆細胞から分化する。褐色脂肪細胞の後期分化制御因子の一つである PRDM16 が欠損すると、Myf5 陽性の前駆細胞が褐色脂肪細胞ではなく骨格筋に分化することが報告されている。Opa1 欠失褐色脂肪細胞において PRDM16 の mRNA レベルを定量化したところ、PRDM16 の発現誘導の低下が認められた。この低下により、Opa1 欠失細胞が褐色脂肪細胞ではなく骨格筋に分化する可能性を qRT-PCR 法で検証した。しかし、Opa1 の発現抑制をしても骨格筋マーカーである MHC、MyoD、Myg の発現増加は認められなかった。これらの結果から、Opa1 を欠失した褐色脂肪前駆細胞が骨格筋に分化することはなく、褐色脂肪細胞への分化過程で Opa1 の機能が欠失することで分化異常が生じている可能性が示唆された。



(図 1) Opa1 ノックダウンによる UCP1 の発現抑制

Opa1 欠失による褐色脂肪細胞の分化異常の原因を明らかにするため、RNA シーケンスを行い、網羅的に mRNA 発現変動の解析を行った。その中でも mRNA 量の Fold change が顕著に増加していた遺伝子が Twist1 である。Twist1 は褐色脂肪細胞内において分化開始因子として知られる C/EBP によって誘導され、後期分化誘導転写因子である PGC1 の機能を抑制する。Twist1 は褐色脂肪細胞の分化前に多く発現し、分化が進むにつれて発現を減少させるタンパク質である。転写因子の活性を示す motif enrichment 解析を行った結果、Twist1 およびその下流遺伝子の発現量の増加が認められた。実際に、Opa1 を欠失させた褐色脂肪細胞ではタンパク質レベルで Twist1 の蓄積が確認され (図 1)、この蓄積が Opa1 欠失による分化障害の原因であることが示唆された。そこで、Opa1 欠失による Twist1 の蓄積が褐色脂肪細胞の分化異常を引き起こしているかを検証するため、Opa1 と Twist1 を siRNA で同時にノックダウンし、褐色脂肪細胞の機能回復を調べたが、予想とは異なりタンパク質レベル、mRNA レベルでの UCP1 の回復は認められなかった。これにより、Opa1 欠失による分化異常が生じた後に Twist1 が蓄積していることが示唆された。

褐色脂肪細胞の分化前期には CEBP ファミリーが大きく関与する。CEBP ファミリーは脂肪細胞の分化に関わるマスター遺伝子である PPAR や、熱産生タンパク質である UCP1 の誘導を行う転写因子である。Opa1 欠失時の褐色脂肪細胞の分化異常は Twist1 の蓄積に依存していなかったことから、褐色脂肪細胞の分化初期の異常が原因であると推測される。そのため、CEBP ファミリーに含まれる遺伝子を qPCR で定量化した。その結果、Opa1 の欠失により CEBP α 、CEBP β の発現レベルの低下が認められた。また、CEBP ファミリーにより分化後期に誘導される脂肪細胞のマスター遺伝子である PPAR γ の発現量も低下していることから、Opa1 の欠失による分化異常は早期段階で CEBP α 、CEBP β が関与する経路に異常が生じることで発生すると推察される。

Opa1 はミトコンドリアの融合と内膜の構造形成に関わっている。Opa1 はミトコンドリア内膜のクリステ接合部 (クリステジャンクション) でオリゴマーを形成し、ミトコンドリア内膜を折りたたむことでクリステの形成と維持に関与する。同様にクリステの形成・維持に関わるタンパク質群が Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System (MICOS) 複合体である。MICOS 複合体はそれぞれのタンパク質が異なる役割を持ち、複合体としてクリステやミトコンドリア内膜と外膜の接合点 (コンタクトサイト) の構造を維持している。本研究では、MICOS 複合体のサブユニットのうち、コアとなるタンパク質である Mic60、Mic10、Opa1 と相互作用するこ

とが報告されている Mic19 が褐色脂肪細胞の分化に関与するか検証を行った。Mic60、Mic10、Mic19 のいずれをノックダウンさせたときも、Opa1 ノックダウンと同様に褐色脂肪細胞の分化に異常が生じた。これらの結果から、褐色脂肪細胞の分化には MICOS 複合体の Mic60 と Mic10 のサブユニットの形成が必要であり、Opa1 と MICOS 複合体によるミトコンドリア内膜構造の形成が重要であることが示唆された。

以上のように、本研究課題ではミトコンドリア内膜構造の形成を担う Opa1、Mic60、Mic10、Mic19 が正常な褐色脂肪細胞の分化に重要な役割を持つことを示し、クリステなどのミトコンドリア内膜の構造形成が分化に影響を与えることを明らかとした。ミトコンドリア外膜融合因子である Mitofusin1、Mitofusin2 も褐色脂肪細胞の分化に寄与することも見出しており、今後の研究でミトコンドリアの構造が細胞の分化を制御する分子メカニズムの解明を目指したい。これらの成果は、褐色脂肪細胞の活性化を介した生活習慣病の予防や治療法の創薬研究に繋がることが期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagashima Shun, Ito Naoki, Shiiba Isshin, Shimura Hiroki, Yanagi Shigeru	4. 巻 173
2. 論文標題 Ubiquitin-mediated mitochondrial regulation by MITOL/MARCHF5 at a glance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac092	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長島 駿
2. 発表標題 ミトコンドリア融合因子Mfn1・Mfn2による褐色脂肪細胞の分化制御
3. 学会等名 第22回日本ミトコンドリア学会 年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------