

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790139

研究課題名（和文）*In vitro* 脂肪細胞肥大化評価モデル構築と脂肪細胞肥大化機構の解明に関する研究研究課題名（英文）Construction of Evaluation Model for Adipocyte Hypertrophy *in vitro* and Study on Elucidation of Mechanism of Adipocyte Enlargement.

研究代表者

門田 佳人 (KADOTA YOSHITO)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：60461365

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病や動脈硬化症の原因となる肥満に関与する脂肪細胞肥大化の生体外モデルを構築する目的で、マウス脂肪細胞を3次的に培養し評価した。その結果、生体で見られるような肥大化脂肪細胞が観察された。また脂肪細胞肥大化に関与する遺伝子 *MEST* の発現機構を解析した。この *MEST* の発現は、脂肪細胞分化初期および成熟時に上昇するというユニークな変動を示し、またその発現制御の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We constructed 3D cell culture system of evaluation model for adipocyte hypertrophy *in vitro*. As a result, enlarged adipocytes with a unilocular lipid droplet were observed. We also analyzed expression patterns of adipocyte enlargement maker gene, *MEST*. *MEST* mRNA was upregulated by increasing intracellular cAMP during adipocyte differentiation. We also found an enhancer region sensitive to the cAMP elevation, which is located 5' -upstream of the *MEST* promoter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：細胞・組織、脂質、肥満

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織は、エネルギーを貯蓄するばかりではなく、アディポカインと総称される生理活性物質を産生・分泌し、全身の恒常性の維持に関わっていることがわかってきた。この脂肪組織の拡張を肥満と呼ぶが、肥満のタイプには2種類存在する。1つが、脂肪組織内の脂肪細胞の分化・増殖を伴う「皮下脂肪型肥満」と、もう1つが、正常な脂肪細胞が肥大化脂肪細胞へと変移する「内臓脂肪型肥満」である。特に「内臓脂肪型肥満」

は、過剰なエネルギー摂取により肥大化した脂肪細胞がその本来の機能を失うことで全身の恒常性が破綻し、動脈硬化性疾患の危険因子群の合併、すなわちメタボリックシンドローム発症の引き金となるため、先進諸国における公衆衛生学的問題となっている。

脂肪細胞は、中胚葉を起源とする前駆脂肪細胞を経て成熟脂肪細胞へと分化するが、それら細胞分化を制御するメカニズムは、国内外で数多く研究され、薬物治療の標的とされている。一方で肥大化脂肪細胞は、脂肪細胞

が過栄養により多くの脂肪を溜めこんだ病的な状態であり、正常な脂肪細胞とは異なるインスリン抵抗性や動脈硬化を促進させるアディポカインを分泌する。このアディポカインは、脂肪細胞自身だけでなく周囲の血管の細胞やマクロファージ、最終的には全身性に影響を与えて、ついにはメタボリックシンドロームに至る。この肥大化脂肪細胞が、動脈硬化性疾患のリスクを増大させることはよく研究されているものの、それに至るまでの肥大化のメカニズムに関しては十分研究されていないのが現状である。脂肪細胞の肥大化は、エネルギーの過剰摂取・過食による場所が大きいものの、同じエネルギー量を摂取しても太りやすい人・太りにくい人がいるように、遺伝的要因（個人差、性差や人種差など）や環境的要因（ストレス、化学物質摂取など）などの相互関係も未知の部分が多い。従って、脂肪細胞肥大化調節機構の解明は、新しい肥満治療のターゲットとなりうる可能性を有するとともに、肥満発症リスクのマーカーの開発にも応用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

脂肪細胞の肥大化は、肥満発症に必須であり心血管疾患の危険因子となるが、脂肪細胞肥大化過程については未解明な部分が多く、その機構を簡便にモデル化した実験系も存在しないのが現状である。本研究では、その脂肪細胞の肥大化調節機構に着目し、肥満治療の標的や肥満診断マーカーの候補を探索するための基礎となる培養細胞を用いた *in vitro* における脂肪細胞肥大化モデルを構築する。このモデル構築では、まず脂肪細胞肥大化のマーカー遺伝子と考えられている *MEST* 遺伝子の発現量を指標とし、脂肪細胞肥大化促進機構を解明し、遺伝や環境要因が脂肪細胞の肥大化に与える影響について解析する。脂肪細胞の肥大化研究は、現在はマウスなどの実験動物に高脂肪食を摂取させることにより構築されている。しかし、実験動物では、エネルギー代謝に関わる肝臓や筋肉などの器官のはたらきも影響を無視することができない。また実験動物の脂肪肥大化までの期間は比較的長い。

脂肪細胞の分化機構研究には、3T3-L1 などの前駆脂肪細胞株の単層培養系が古くから用いられ、成熟脂肪細胞は得られるが、接着が強固なため脂質を添加しても生体で見られる十分な肥大化脂肪細胞は得られず、脂肪細胞肥大化機構のモデル系が存在しないのが現状である。そこで本研究では、*in vitro* で脂肪細胞の肥大化を観察できるモデル系を構築することとした。このモデルの構築後は、脂肪細胞肥大化マーカーと考えられる *MEST* 遺伝子の発現調節機構に焦点を絞って

未知の脂肪細胞肥大化機構を解析した。将来的には、脂肪細胞肥大化に関わるとされる要因（過食やストレスなどの環境要因、遺伝的要因）がどのような機構で肥大化を調節し運命づけるのかを調査し、新規肥満診断・治療研究の足掛かりとする。

## 3. 研究の方法

本研究では、脂肪細胞肥大化の *in vitro* 評価系モデルを確立し、また脂肪細胞肥大化関連遺伝子を研究対象として脂肪細胞肥大化機構の解明することを目的とし、新規肥満治療の基盤となる研究として以下の2点について解析した。

### (1) *In vitro* 脂肪細胞肥大評価モデル構築

マウス培養脂肪前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を細胞外基質を模したコラーゲングル上に播種して生体に近い状態で3次元培養した。その後、一般的に用いられる脂肪細胞分化誘導培地（インスリン、デキサメタゾン、キサンチン誘導体含有）で分化誘導し、脂肪細胞を多量に獲得した。得られた脂肪細胞の脂肪細胞特異的遺伝子（*PPAR $\gamma$*  など）や脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子（*MEST* など）の mRNA 発現量で確認した。

### (2) 脂肪細胞肥大化機構の解析—脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子 *MEST* の発現機構を中心に—

脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子 *MEST* (Mesoderm Specific Transcript) の未知の発現調節機構に着目し、焦点を絞って解析した。*MEST* は、食餌性および遺伝性に脂肪細胞の肥大化時に発現が増大するマーカー遺伝子であり、脂肪細胞肥大化促進遺伝子であるとともに、前駆脂肪細胞の増殖・分化を亢進させるが、その発現調節機構は未だ不明である。そこで、*in vitro* においてマウス脂肪細胞分化誘導時の発現を解析した。また *MEST* 遺伝子の転写制御を解明する目的で、*MEST* 遺伝子 5' 上流領域の転写活性を肥大化評価モデルとレポーターアッセイを組み合わせで解析した。マウスゲノムを単離し、*MEST* 遺伝子 5' 上流領域を PCR により増幅し、その全長あるいは部分配列を組込んだホタルルシフェラーゼ改変遺伝子を有するレポーターベクターを構築してレポーターアッセイを行った。

## 4. 研究成果

### (1) *In vitro* 脂肪細胞肥大評価モデル構築

脂肪細胞分化モデル細胞 3T3-L1 を通常の単層培養あるいはコラーゲングル混合培地により3次元培養下で脂肪細胞に分化誘導して脂肪細胞肥大化モデルを評価した。その結果、単層培養では平板状の多胞性脂肪滴を有する脂肪細胞が認められた（図1：通常の単層培養、矢頭）。一方、コラーゲングル中で分化誘導を行った場合、マウス生体脂肪組

織中で見られる単胞性球状の脂肪滴を有する細胞が観察され、高度な脂肪蓄積が認められ (図1: 3D, 矢頭)、より生体に近い脂肪細胞モデルが構築できたと考える。

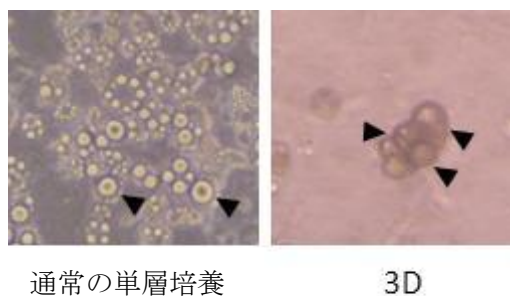


図1

これら単層培養と3次元培養の細胞において、前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化する間 (Day0~7) の各種脂肪細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR 法で比較解析した。その結果、脂肪細胞のマスター調節因子 PPAR $\gamma_2$  および脂肪酸結合タンパク質 aP2 などの脂肪特異的遺伝子の発現は、未分化 (Day0) 時および分化誘導後1日 (Day1)、7日 (Day7) において、単層 (normal) および3次元培養 (3D) 間で有意な差は認められなかった (図2)。脂肪細胞分化開始に必要な転写因子 C/EBP $\delta$  の mRNA は、分化誘導前 (Day0) で単層培養に比べ3次元培養で減少傾向が認められたが、分化誘導によってその発現は単層培養レベルまで増大した (図2)。一方、脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子 *MEST* は、肥大化脂肪細胞の形態を示している3次元培養 (図2: 3D) において、通常の単層培養 (図2: normal) と比べて大きく発現量が減少した。

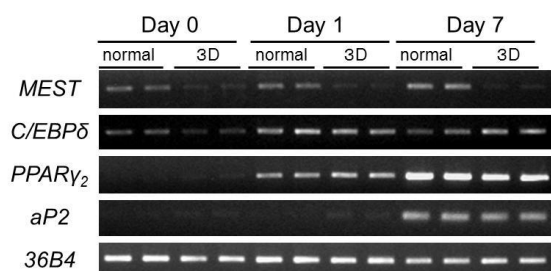


図2

脂肪細胞の形態観察 (図1) から、3次元培養による分化脂肪細胞は、単層培養の細胞に比べ生体に近い脂肪細胞を呈していると考えられる。PPAR $\gamma_2$  遺伝子などは、肥満マウス生体の脂肪細胞においても発現が変動しないと報告されており、*in vivo* と本結果は相関した。一方、脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子 *MEST* は、予想に反して発現が大きく抑制された。今回の培養系では、肥大化の度合いが小さい可能性が考えられ、さらなる脂肪蓄積が必要となるかもしれない。少なくとも、

*MEST* は、他の脂肪細胞関連遺伝子とは異なり同一の分化誘導刺激下であっても細胞の周環境や細胞の形態に大きく影響を受けて発現が変動する遺伝子であることが確認できた。今後さらに脂肪細胞肥大化にかかわる遺伝子をこの3次元培養モデルを用いて解析していきたい。

## (2) 脂肪細胞肥大化機構の解析—脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子 *MEST* の発現機構を中心に—

食餌性および遺伝性に脂肪細胞の肥大化時に発現が増大する脂肪細胞肥大化マーカー遺伝子である *MEST* の未知の発現調節機構に着目した。新生児マウス腹部脂肪組織より独自に樹立した前駆脂肪細胞株 (Adipocyte-derived stromal cells: ADCs) を用いて、その脂肪細胞分化過程における *MEST* 遺伝子発現変動について RT-PCR 法により検討した (図3)。

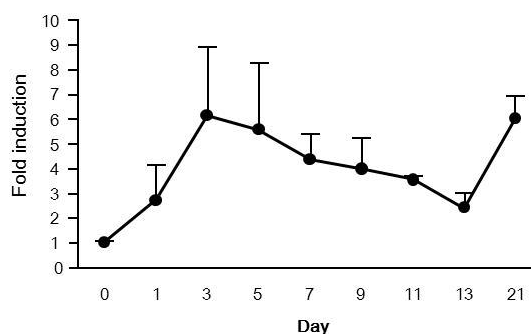


図3: 脂肪細胞分化誘導時における *Mest* mRNA 発現変動  
Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. (n=4)

その結果、*MEST* 遺伝子の発現は、分化誘導初期 (Day 1~5) に顕著に増大した後に一旦は減少するものの、2~3週目 (Day13~21) に再度発現が上昇するという、極めてユニークな発現変動を示すことが分かった (図3)。

またこの分化誘導初期における *MEST* 発現増大は、分化誘導剤中のキサンチン誘導体 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) によって惹起されていることがわかった (未掲載)。IBMX は、ホスホジエステラーゼ阻害作用による細胞内 cAMP 増大を伴って PKA を活性化する。そこで、*MEST* 発現増大が cAMP 依存性 PKA 経路を介して起こるかどうか確認した (図4)。その結果、cAMP アナログ 8-Br-cAMP によって *MEST* 発現は増大し (図4A)、また PKA 阻害剤 H89 の前処理によって IBMX による発現増大は抑制されたため (図4B)、分化誘導初期における *MEST* 発現増大は、cAMP 依存性 PKA 経路を介して起こることがわかった。

さらに、マウス *MEST* 遺伝子座の TATA ボックスを含む 5' 上流領域 (2.7 kb: 図5A, F5) あるいはその部分配列 (図5A, F1~F4) を組込んだ改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc2) を有するレポーターベクターを構築

して *MEST* 遺伝子の転写活性化能をレポーターアッセイで解析した(図 6)。細胞は、3T3-L1 細胞を用いた。

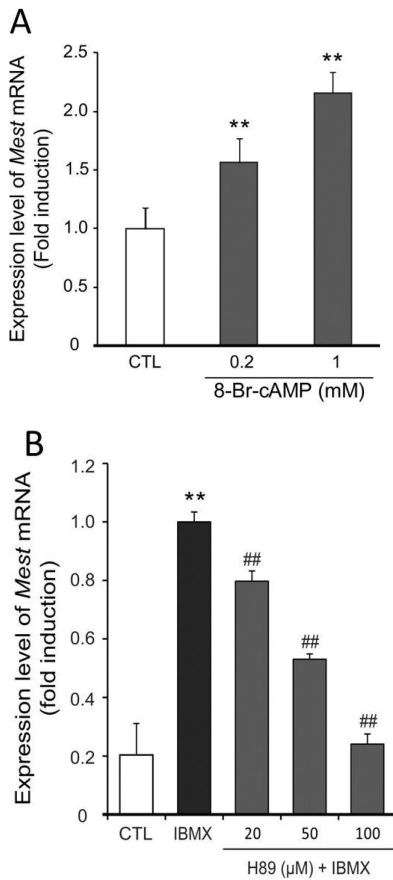


図 4 : *Mest* 遺伝子発現に対する外因性 cAMP (A) および PKA 阻害剤 (B) の効果  
Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3).  
 $P^{**}<0.01$  vs CTL,  $P^{##}<0.01$  vs group treated with 0.5 mM IBMX alone.

その結果、*MEST* 遺伝子の 5' 上流領域断片 F2 から上流にかけて IBMX 添加に反応する領域が含まれていることが確認された(図 6A)。さらに領域 F2 およびその前部 (F2F) と後部 (F2R) に分割した配列を最小プロモーター (miniP) と易分解改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc2P) に連結したレポーターベクター(図 5B)を構築して同様に実験を行った。その結果、プロモーターに近い前部領域 (F2F) に IBMX 応答性の配列が認められ(図 6B)、細胞内 cAMP 上昇に反応する領域を見出した。また IBMX 非存在でも転写活性化がみられることから、cAMP 非依存性のエンハンサーと思われる領域が近傍に存在すると考えられる(図 6)。この配列中には、細胞内 cAMP の増加に反応する転写因子 CREB (cAMP response element-binding protein) が結合するエレメントである CRE 配列が見当たらなかった。したがって、*MEST* は、CREB 活性化によって発現する別の転写因子を介して、あ

るいは PKA を介する CREB 非依存的な転写因子によって発現誘導されると考えられる。この転写制御機構は、脂肪細胞関連遺伝子の中においても非常にユニークであると予想されるため、*MEST* の発現調節機構を解析し、新たな脂肪細胞分化や肥満のメカニズムの一端を明らかにしたい。

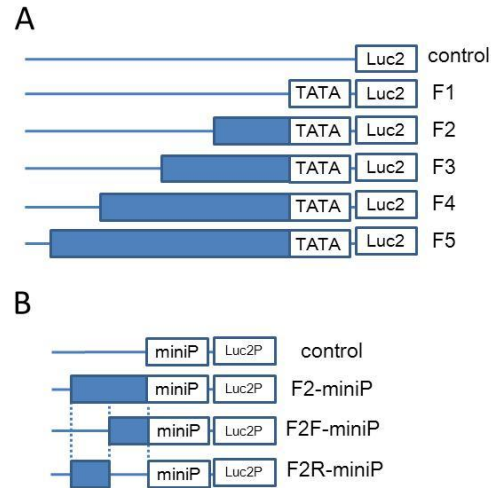


図 5 レポーターアッセイベクターの構築

Luc2: 改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子、TATA: TATA ボックス  
miniP: 最終プロモーター、Luc2P: 易分解改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子

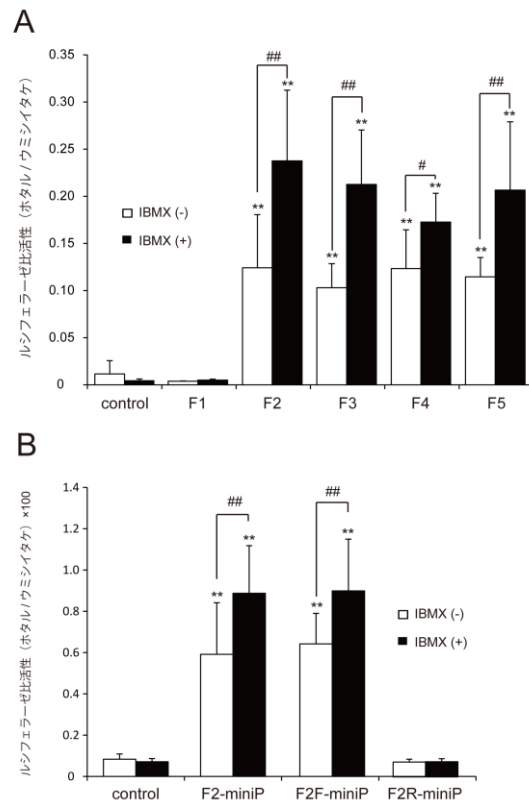


図 6 : *MEST* 遺伝子 5' 上流領域のレポーターアッセイ  
Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=8).  
 $P^* < 0.05$  and  $P^{**} < 0.01$  vs control,  $P^{##} < 0.01$  vs group Treated without IBMX

## 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4件)

Kadota Y, Yanagawa M, Nakaya T, Kawakami T, Sato M, Suzuki S. Gene expression of mesoderm-specific transcript is upregulated as preadipocytes differentiate to adipocytes in vitro. (2012) J Physiol Sci. in press. 査読有

Kawakami T, Hanao N, Nishiyama K, Kadota Y, Inoue M, Sato M, Suzuki S. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. (2012) Toxicol Appl Pharmacol. 258, pp. 32-42. 査読有

Sato M, Ishibashi S, Higashimoto M, Kadota Y, Kawakami T, Suzuki S. Early changes induced by environmental stresses in insulin sensitivity-related genes. (2011) Eur J Pharmacol. 668, pp. 472-6. 査読有

Sato M, Kawakami T, Kondoh M, Takiguchi M, Kadota Y, Himeno S, Suzuki S. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. (2010) FASEB J. 24, pp. 2375-84. 査読有

[学会発表] (計3件)

門田 佳人、柳川 真澄、中矢 誠子、細野 佑衣、川上 隆茂、佐藤 政男、鈴木 真也、脂肪細胞関連遺伝子 Mest は 脂肪細胞分化時に発現が増大する、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌・北海道大学

門田 佳人、柳川 真澄、中矢 誠子、川上 隆茂、佐藤 政男、鈴木 真也、脂肪細胞肥大化促進遺伝子 Mest のマウス培養脂肪細胞分化誘導時における発現変動に関する研究、フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー、2011 年 10 月 28 日、金沢・エクセルホテル東急

門田佳人、柳川真澄、中矢誠子、川上隆茂、佐藤政男、鈴木真也、脂肪細胞肥大化促進遺伝子 MEST の脂肪細胞分化時における発現機構の解析、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡・ツインメッセ静岡

[その他]

ホームページ等

<http://ph.bunri-u.ac.jp/lab11/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門田 佳人 (Kadota Yoshito)  
徳島文理大学・薬学部・助教  
研究者番号：60461365

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：