

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19730

研究課題名（和文）褐色脂肪組織由来の新規筋再生制御因子の同定・解析 環境温度と筋再生の関連性の検討

研究課題名（英文）The study on the brown adipose tissue-derived novel factors which are related to the regulation of muscle regeneration

研究代表者

後藤 剛（GOTO, Tsuyoshi）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10550311

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）：本研究課題では、筋細胞と褐色脂肪細胞の発生分化段階でのクロストークについての検証を目的として各種検討を行った。筋細胞分化とBAT機能の関連性を生体レベルで明らかにするため、BAT機能を欠失したマウス（BAT欠失マウス）を用いて、筋損傷後の筋再生過程について検討を行なった。その結果、BAT欠失マウスでは、筋再生過程で惹起される免疫細胞の浸潤に変化が生じる可能性が見出された。また、褐色脂肪細胞由来培養上清添加が筋分化に促進的に機能することが明らかになり、褐色脂肪細胞由来筋分化促進因子の存在が示唆された。以上より、褐色脂肪細胞由来の筋分化制御機能を有する液性因子の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、褐色脂肪細胞由来の筋細胞分化亢進因子の存在が示唆された。新規な筋細胞分化制御因子は、超高齢化社会における健康寿命延伸に加え、筋ジストロフィー治療法や畜産業における食肉生産においても活用が期待され、大きな波及効果が期待できる。さらに、存在が示唆された筋細胞分化亢進因子は液性因子であり、血流を介して遠隔組織の応答を誘導する性質上、将来的な医薬品・機能性食品等への活用が十分に期待できる。加えて、BATによる新規の骨格筋制御機構の解明は特に健康科学・スポーツ科学・内分泌代謝学・畜産学などの関連研究分野に対して大きな学術的インパクトも期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, experiments were conducted to verify the crosstalk between myocytes and brown adipocytes at the developmental stage. To clarify the relationship between myotube formation and BAT function at the in vivo level, we examined the process of muscle regeneration after muscle injury using mice lacking BAT function (BAT-deficient mice). We found that BAT-deficient mice may have altered immune cell infiltration, which is induced during the muscle regeneration process. In addition, the addition of brown adipocyte-derived culture supernatant during myocyte differentiation period promoted myotube formation, suggesting the presence of a brown adipocyte-derived factor that promotes muscle differentiation. These results suggest the existence of a hormonal factor that regulates muscle differentiation derived from brown adipocytes.

研究分野：食品科学

キーワード：褐色脂肪組織 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織 (BAT) は主に褐色脂肪細胞により構成される。褐色脂肪細胞はそのミトコンドリア内膜上に特異的に存在する uncoupling protein 1 (UCP1) の機能により高い熱産生機能を示すため、BAT は特に寒冷環境下における体温維持に重要な役割を担っている。成人における機能的な BAT が報告された 2009 年以降、BAT の高い熱産生機能調節機構に関する研究は活発化し、BAT は肥満症の標的組織として注目を集めている。近年では、BAT 機能研究は熱産生以外の領域にも発展し、BAT が多彩な生理活性物質 (BATokines) を産生する内分泌組織であることが明らかになりつつある。

体温調節を目的とした積極的熱産生は主に骨格筋と褐色脂肪組織 (BAT) において行われる。また、骨格筋を構成する筋細胞と褐色脂肪組織を構成する褐色脂肪細胞はともに myogenic factor 5 (Myf5) 陽性の前駆細胞より発生分化する。機能的・発生起源的類似性を有する BAT と骨格筋は互いに制御関係にある可能性が示唆され、実際に BAT の熱産生機能制御活性を有する骨格筋由来の複数の液性因子が報告されている。一方で、BAT 由来の骨格筋機能制御因子として運動機能を制御する液性因子の報告例はあるが、骨格筋の発達・維持に関わる制御因子の報告は少ない。

申請者らは先行研究において、褐色脂肪細胞特異的にイソプレノイド合成経路を欠損させたマウス (BAT less マウス) では、褐色脂肪細胞のアポトーシス亢進により BAT が顕著に萎縮し、寒冷誘導性の熱産生が顕著に減弱していることを示した。BAT less マウスは新規の BAT 萎縮モデルであり、BAT の新機能を見出すために極めて有用なモデルマウスであると考え、本マウスを用いて、骨格筋の発達・維持における BAT の役割を検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究課題の研究目的は、筋細胞と褐色脂肪細胞の発生分化段階でのクロストークの有無について検証するとともに、その分子メカニズムを検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格筋再生過程における BAT の役割の検討

BAT less マウスおよび対照マウス (Ctrl) の左前脛骨筋に Cardiotoxin (CTX) を筋肉内注射することで筋損傷を誘導し、その後惹起される筋再生過程において経時的に以下の各項目について検討を行った。前脛骨筋重量の変化。遺伝子発現量の変化。遺伝子発現量は RNA を回収後、oligo(dT)プライマーを用いて逆転写し、得られた cDNA を用いて定量 PCR を行うことで測定した。組織学的解析。クライオスタットを用いて摘出した前脛骨筋の凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的解析を行った。また、各マウスの右前脛骨筋には対照として生理食塩水を筋肉内注射した (Sham)。

### (2) 褐色脂肪細胞由来の筋細胞分化制御因子の検討

マウス由来培養褐色前駆脂肪細胞株である HB2 細胞およびマウス由来筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて検討を行った。HB2 細胞は、10% FBS 存在下で Dexamethasone、3-Isobutyl-1-methylxanthine、Insulin 処理により褐色脂肪細胞へと分化誘導を行った。C2C12 細胞は 2% horse serum 処理により筋管形成を誘導した。筋管の形成度合いについては、骨格筋の分化マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) で免疫染色することにより、評価した。褐色脂肪細胞培養上清は限外膜ろ過を用いて、分子サイズによる分画を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 骨格筋再生過程における BAT の役割の検討

前脛骨筋重量については、Sham 側、CTX 投与側ともに BAT less 群と Ctrl 群との間に観察機関を通じて有意差は認められなかったが、処置後早期の段階 (処置後 5 日目) においては、CTX 投与を行った BAT less 群において、CTX 投与を行った Ctrl 群に比して低値を示す傾向が観察された。また、処置後早期の段階において、CTX 投与を行った BAT less 群において、CTX 投与を行った Ctrl 群に比して間質細胞の集積の減少が観察されたが、その後の筋再生過程においては、BAT 欠失による変化は観察できなかった。

筋再生に関わる筋衛星細胞の活性化と筋分化の段階は、転写因子の発現の変化と連動している。静止状態の筋衛星細胞は Pax7 を発現するが、活性化後では Pax7 の発現上昇に加え、Myod1 や Myf5 を発現する。さらに筋細胞へと分化が進むと、Myog の発現が上昇することが知られている。定量 PCR によりこれらの筋再生関連遺伝子の発現量を測定した結果、CTX 投与後 5、7、10 日目において、CTX 投与側前脛骨筋の筋再生関連遺伝子の発現量はそれぞれの Sham 側と比

較して増加し、筋損傷後の筋衛星細胞の活性化および分化が進んでいることが確認された。また、CTX 投与後 5 日目の筋再生関連遺伝子の発現量は、CTX 処理を行った BAT less 群において、CTX 処理を行った Ctrl 群に比していずれも上昇傾向を示し、CTX 投与後 7 日目では、CTX 投与側の Pax7 の遺伝子発現量が BAT less 群では Ctrl 群と比較して低下傾向を示した。一方で、CTX 投与後 30 日目における遺伝子発現量では、BAT less 群と Ctrl 群の間に差が認められなかった。

CTX による筋損傷後、筋再生にむけ炎症反応が進行する。また、炎症初期段階には筋衛星細胞の活性化や筋分化に必要な遺伝子の転写が開始される。これらは、マクロファージの浸潤、活性化による炎症性サイトカインの高発現と同時期に認められ、筋再生の進行とともに、炎症反応は徐々に解消される。CTX 投与後 5 日目において、BAT less 群では Ctrl 群と比較して間質細胞の集積抑制が観察されたことから、マクロファージの浸潤、活性化に変化がある可能性が考えられた。そこで、マクロファージ関連遺伝子の発現量を測定した結果、CTX 投与後 5 日目において、BAT less 群、Ctrl 群ともに筋損傷によるマクロファージ関連遺伝子の発現量の増加が確認された。また、CTX 投与後 7 日目において、BAT less 群では Ctrl 群と比較して CTX 側のマクロファージ関連遺伝子の発現が抑制された。これらの結果から、BAT の萎縮が CTX 誘導性の炎症反応の制御に関与する可能性が示唆された。

以上より、BAT の萎縮は筋損傷後の筋再生過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、CTX 筋損傷時に誘導される炎症反応の軽減が示唆された。

## (2) 褐色脂肪細胞由来の筋細胞分化制御因子の検討

近年、BAT 由来の生理活性物質の多彩な機能が明らかになりつつあることから、褐色脂肪細胞由来の液性因子が筋芽細胞の分化に及ぼす影響を明らかにするため、HB2 褐色前駆脂肪細胞および C2C12 筋芽細胞を用いて、HB2 細胞から回収した培養上清 (CM) が C2C12 細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。

Oil Red O 染色により十分に脂肪滴の蓄積が認められた分化誘導後 8 日目の HB2 褐色脂肪細胞より CM を回収した。DMEM (Ctrl) もしくは HB2 褐色脂肪細胞由来の CM (グルコースを Ctrl と同濃度に調整) を用いて C2C12 細胞を分化誘導し、5 日間培養後、MHC の免疫染色および Hoechst 染色を行った。その結果、HB2 CM 処理は C2C12 細胞の分化を促進させることが明らかになった。白色脂肪細胞由来の CM を用いて同様の検討を行ったが、この場合の MHC 染色面積は Ctrl 時と変化が認められなかったことから、褐色脂肪細胞特異的な液性因子の存在が示唆された。

そこで、次に HB2 由来の筋分化制御因子の特定を目指し、HB2 CM を限外膜ろ過によりサイズ分画した。サイズ分画を行った CM を用いて、同様の検討を行ったところ、HB2 CM の中・高分子量画分 (3 kDa 以上) 添加時に Ctrl 群と比較して C2C12 細胞の分化促進効果が認められたことから、これらの画分に C2C12 細胞の分化制御因子が含まれることが示唆された。

以上の結果から、HB2 褐色脂肪細胞由来の培養上清中には C2C12 筋芽細胞の筋細胞分化を亢進させる因子が存在すること、それらは 3 kDa 以上の分子量を持つものであることが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Kwon Jungin, Aoki Yumeko, Takahashi Haruya, Nakata Rieko, Kawarasaki Satoko, Ni Zheng, Yu Rina, Inoue Hiroyasu, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 1866
2. 論文標題 Inflammation-induced nitric oxide suppresses PPAR expression and function via downregulation of Sp1 transcriptional activity in adipocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms	6. 最初と最後の頁 194987 ~ 194987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagr.2023.194987	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 剛
2. 発表標題 レポーターシステムを用いた熱産生脂肪細胞機能活性化因子の探索
3. 学会等名 一般社団法人先端バイオ工学推進機構 機能性食品分科会 第23回会合（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 後藤 剛、川原崎 聡子、高橋 春弥、井上 和生
2. 発表標題 レポーターシステムを活用した熱産生脂肪細胞活性化因子の探索と機能評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 後藤剛、川原崎聡子、高橋春弥、井上和生、河田照雄
2. 発表標題 レポーターシステムを活用した熱産生脂肪細胞活性化因子の探索
3. 学会等名 第77回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻食品分子機能学分野  
<http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

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	瀬尾 茂人 (SENO Shigeto) (30432462)	大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  (14401)	
研究分担者	高橋 春弥 (TAKAHASHI Haruya) (30750369)	京都大学・農学研究科・助教  (14301)	
研究分担者	亀井 康富 (KAMEI Yasutomi) (70300829)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授  (24302)	

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		
韓国	University of Ulsan		