

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23650487

研究課題名(和文) Wntシグナル伝達経路を介する食品因子による脂肪細胞の分化制御

研究課題名(英文) Regulation of adipocyte differentiation by Wnt signaling pathway

研究代表者

金 東浩 (KIM, DONGHO)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教授

研究者番号：70326271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞などの細胞へ分化能をもつ細胞であり、この細胞の分化機構を制御すれば肥満発症を抑えることができると考えられる。Wntシグナル伝達経路は脂肪分化に関与することが示され、間葉系幹細胞におけるWntシグナル伝達経路を制御すれば、メタボリック症候群の成因である肥満発症を抑制できると考えられる。従って、肥満発症を制御する鍵は、Wntシグナル伝達経路を制御することであり、その活性を有する食品因子を同定できればメタボリック症候群を抑制できると期待できる。本研究では、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化機構に果たすWntシグナルの役割について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Adipocytes are critically involved in enhancing the clinical risk of metabolic syndrome. Adipocytes can arise from mesenchymal stem cells (MSCs) that can differentiate into many cell types such as adipocytes, bone, cartilage, tendon, muscle, skin, and nerves. Wnts are secreted signaling proteins that regulate differentiation into osteoblast of MSCs. On the other hand, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) is a critical factor for adipogenesis. PPAR agonists induce the differentiation of MSCs into adipocytes but Wnts inhibit adipocyte differentiation. Wnt proteins are comprised a large family of nineteen proteins and highly conserved in many species. To date major signaling branches downstream of the Fz receptor have been identified including a canonical or Wnt/ $\beta$ -catenin dependent pathway and the non-canonical or  $\beta$ -catenin-independent pathway. Here we show that role of the Wnt signaling in the differentiation mechanism from the MSC into adipocytes.

研究分野：分子栄養学

キーワード：リポ蛋白質受容体 Wntシグナル 食品因子 脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が加速する現代社会において、メタボリック症候群は万人に起こりうる疾病であり、その予防は急務の研究課題である。メタボリック症候群の病態が肥満に加えて糖尿病、脂質異常症、高血圧などの生活習慣病が重複し発症することから、メタボリック症候群の予防は、肥満発症の抑制が最も重要視されている。肥満は遺伝的および環境的要因によるカロリーの過剰な摂取の結果、脂肪細胞の数的な増加や脂肪細胞に過剰な脂肪が蓄積した状態である。肥満発症の抑制を成功させるためには、まず、脂肪細胞の数的な増加に関係する脂肪細胞の分化機構を理解した上で、その調節機構を解明する必要がある。脂肪細胞の分化機構を研究する上で、間葉系幹細胞は最も適切である。間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、筋細胞、軟骨細胞の間葉系に属する細胞への分化能をもつ細胞であり、この細胞の分化機構を制御すれば肥満発症を抑えることができると考えられる。細胞の分化は細胞内外の様々な分子間相互作用によるシグナル伝達によって制御されている。なかでも、Wnt シグナル伝達経路は個体発生時の細胞の分化や増殖を調節し、体軸や体節形成などの形態形成において中枢的な役割を担っている。近年、Wnt シグナル伝達経路は形態形成のみならず脂肪分化にも関与することが示されている。以上から、間葉系幹細胞における Wnt シグナル伝達経路を制御すれば、メタボリック症候群の成因である肥満発症を抑制することが示唆される。従って、肥満発症を制御する鍵は、Wnt シグナル伝達経路を制御することであり、その活性を有する食品因子を同定できればメタボリック症候群を抑制できると期待できる。

食事として摂取したコレステロールや、体内で合成されたコレステロールは、低密度リポ蛋白質に結合して体内を循環し、細胞膜上に存在する低密度リポ蛋白質受容体 (LDLR)

を介して細胞内に取り込まれる。低密度リポ蛋白質受容体は細胞内のコレステロール量を一定に保つセンサーとして働き、その遺伝子異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つである家族性高コレステロール血症を引き起こす。更に、近年、リポ蛋白質受容体がコレステロール代謝のみならず、肥満、高脂質血症、糖尿病、骨粗鬆症に大きく関与することが明らかとなった。即ち、超低密度リポ蛋白質受容体 (VLDLR) の機能異常は、肥満、高脂質血症に関与し、低密度リポ蛋白質受容体類似蛋白質 5 (LRP5) の機能異常は糖尿病、骨粗鬆症に関与する。特に、LRP5 や 6 は Wnt シグナル伝達経路を活性化する受容体であることが明らかとなり、リポタンパク質受容体が Wnt シグナルを制御することが示された。

私たちは、近年、新規のリポタンパク質受容体である LRP10 を発見し、LRP10 が Wnt シグナルを抑制することを明らかにしている。以上の実験事実は、リポ蛋白質受容体が Wnt シグナル伝達経路を正と負に調節することにより、脂肪細胞の分化を制御することを強く示唆する。従って、脂肪細胞の分化を抑制する鍵は、リポ蛋白質受容体の活性を制御することであり、その活性を有する食品因子を同定できれば肥満をはじめとするメタボリック症候群を抑制できると期待できる。

## 2. 研究の目的

メタボリック症候群の発症原因の根幹をなす肥満を抑制することは、現代栄養科学に課せられた急務の研究課題である。食品因子によって肥満を抑制するには、肥満を形成する脂肪細胞の分化機構を明らかにする必要がある。本研究では、肥満を抑制する食品因子を明らかにすることを目的に、多様な細胞に分化する能力を有する間葉系幹細胞を用い、本細胞から脂肪細胞への分化を抑制する食品因子の探索と、その抑制機構の分子機構を明らかにすることを目的とした。従来から、

食品成分によって脂肪細胞の分化を抑制しようとする研究例は多数存在するが、その殆んどは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制を検討しているにすぎない。しかし、前駆脂肪細胞は脂肪細胞に分化することを運命付けられた組織であり、脂肪細胞への分化を根本的に明らかにするには、全く未分化の状態にある間葉系幹細胞を研究に用いるべきであると考えた。

間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化は PPAR $\gamma$  のアゴニストにより誘導されるが、Wnt はそれを抑制する。Wnt ファミリーには 19 種類が知られ、各 Wnt によって活性化されるシグナル経路は、 $\beta$ -catenin の安定化と核内移行を伴う  $\beta$ -catenin 依存的な canonical 経路と  $\beta$ -catenin 非依存的な non-canonical 経路に大別される。現在、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化機構に果たす canonical 経路と non-canonical 経路の役割については不明な点が多い。

本研究では、まず、はじめに各種のリポ蛋白質受容体 (LDLR、VLDLR、LRP3、LRP4、LRP6、LRP8、LRP10) が過剰発現する細胞を作製し、各受容体が Wnt シグナルに与える影響を検討した。次に、株化間葉系幹細胞である ST2 細胞の脂肪分化において canonical 経路と non-canonical 経路の役割について検討し、脂肪分化を抑制する食品因子を迅速かつ鋭敏にスクリーニング出来る *in vitro* 実験系の構築を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) リポ蛋白質受容体が Wnt シグナルの canonical 経路に与える影響の検討

各リポ蛋白質受容体の cDNA の末端に myc タグを挿入した DNA 断片を PCR により増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した遺伝子組換え DNA を作製した後、HEK293 細胞に導入することによりリポ蛋白質受容体の過剰発現系を確立した。

各リポ蛋白質受容体の過剰発現は myc 抗体を用いた免疫プロットにより行い、発現量と細胞内局在を確認した。

Wnt シグナルの canonical 経路活性化の指標である TCF レポータープラスミド (TOP-Flash) を、Wnt3a 遺伝子または上記で作製したリポ蛋白質受容体遺伝子と共に HEK293 細胞に導入し、TCF 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定し、リポタンパク質受容体が Wnt シグナルに与える影響を検討した。

#### (2) ST2 細胞の脂肪分化における Wnt シグナル伝達経路の関与の検討

マウス骨髄由来間質系細胞である ST2 細胞に PPAR $\gamma$  のアゴニストである troglitazone を添加し、脂肪分化を誘導した後、Wnt シグナルの canonical 経路を活性化する Wnt3a や non-canonical 経路を活性化する Wnt5a を添加し、脂肪分化に与える影響を検討した。脂肪細胞への分化は Wnt を添加した 7 日目に Oil-Red 染色により確認した。

ST2 細胞に troglitazone を添加し、脂肪分化を誘導した後、Wnt シグナルの canonical 経路の阻害剤や  $\beta$ -catenin のノックダウン、あるいは  $\beta$ -catenin の常時活性化が脂肪分化に与える影響を調べ、脂肪分化における canonical 経路の詳細な分子機構を検討した。

ST2 細胞に troglitazone を添加し、脂肪分化を誘導した後、Wnt シグナルの non-canonical 経路の阻害剤が脂肪分化に与える影響を調べ、脂肪分化における non-canonical 経路の詳細な分子機構を検討した。

### 4. 研究成果

(1) リポ蛋白質受容体は Wnt シグナルの canonical 経路を正や負に制御した

各リポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子が過剰発現する細胞の作製に成功し、それぞれのリポ蛋白質受容体の過剰発現によって、Wnt シグナルの canonical 経路の活性化に影響を与えることを見出した(図 1)。

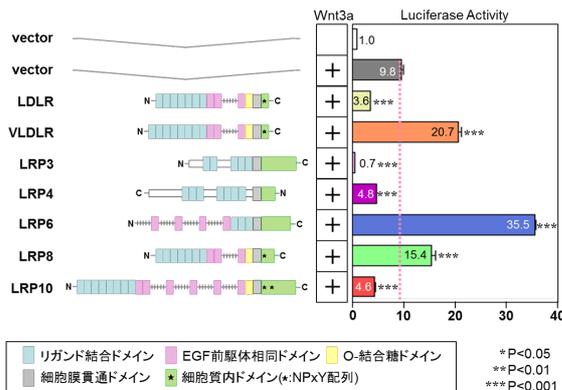


図 1. Wnt シグナルの canonical 経路におけるリポタンパク質受容体の影響

すなわち、Wnt シグナルの canonical 経路の活性は、Wnt3a によって9.8倍まで上昇し、さらに VLDLR、LRP6、LRP8 の過剰発現によって亢進したが、LDLR、LRP3、LRP4、LRP10 の過剰発現によって抑制された。このことは、リポ蛋白質受容体が Wnt シグナルの canonical 経路を正と負に調節することにより、脂肪細胞の分化を制御することが示唆される。

(2) ST2 細胞の脂肪細胞への分化は canonical 経路によって抑制された

ST2 細胞に PPAR $\gamma$  のアゴニストである Troglitazone を添加すると脂肪滴が赤く染まり、Wnt3a の添加割合を増加していくと脂肪滴は減少し、Wnt3a が脂肪分化を抑制した(図 2.)。一方、Wnt5a は脂肪分化を抑制しなかった。

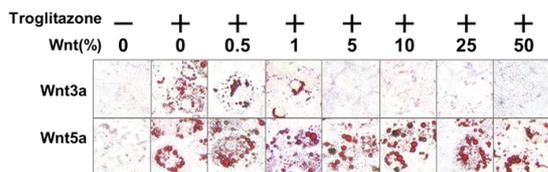


図 2. ST2 細胞の脂肪細胞への分化における Wnt シグナルの canonical と non-canonical

## 経路の影響

このことは、脂肪細胞への分化抑制は、Wnt3a による canonical 経路を介して発現することを示唆する。次に、Wnt3a による脂肪分化の抑制が、canonical 経路依存性であるかを、canonical 経路阻害剤によって更に検討した。GSK3 $\beta$  を活性化することで  $\beta$ -catenin の分解を促進し、canonical 経路を阻害する XAV939 を添加すると濃度依存的に脂肪細胞の分化が誘導された(図 3.)。



図 3. ST2 細胞の脂肪細胞への分化における Wnt シグナルの canonical 経路の阻害剤の影響

さらに、Wnt3a による脂肪分化の抑制が、 $\beta$ -catenin を介する TCF の活性化によるものであるならば、 $\beta$ -catenin をノックダウンすれば、TCF 活性の上昇は阻害され、脂肪分化の抑制は起こらないはずだと考え、ST2 細胞の  $\beta$ -catenin を siRNA によってノックダウンしたところ、Wnt3a による脂肪分化の抑制が消失して、再び脂肪細胞の分化が誘導された(図 4.)。

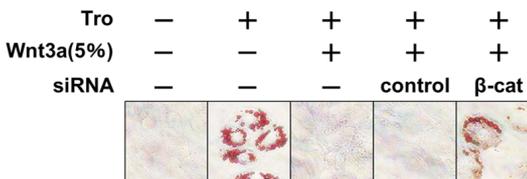


図 4. ST2 細胞の脂肪細胞への分化における Wnt シグナルの canonical 経路の  $\beta$ -catenin ノックダウンの影響

次の実験では、Wnt3a 非存在下でも、TCF 活性を活性化すれば、脂肪細胞への分化が抑制されると考え、Wnt3a 非存在下で、活性型  $\beta$  カテニンを ST2 細胞にトランスフェクション

したところ、TCF 活性は著しく上昇したが、活性型 カテニンは、脂肪細胞の分化を抑制しなかった(図 5.)。

Troglitazone	-	+	+	+
Wnt3a (5%)	-	-	+	-
β-cat S33Y	-	-	-	+

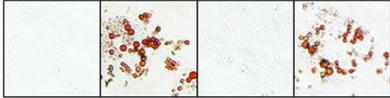


図 5 . ST2 細胞の脂肪細胞への分化における Wnt シグナルの canonical 経路の活性型βカテニンの影響

これらの結果より、ST2 細胞の脂肪細胞への分化は、Wnt3a によって誘導される canonical 経路に依存的に抑制されるが、TCF 活性の上昇だけでは誘導されず、Wnt3a によって誘導される別の経路の関与が示唆された。

(3) ST2 細胞の脂肪細胞への分化は non-canonical 経路によって抑制されなかった

Wnt3a は canonical 経路だけでなく、non-canonical 経路も活性化することから、ST2 の脂肪分化に non-canonical 経路の関与が考えられ、Wnt3a と同時に、non-canonical 経路の阻害剤を用いて実験を行った。図 6 に示すように、いずれの阻害剤も、Wnt3a による脂肪細胞の分化抑制には影響を及ぼさなかった。この結果は、Wnt3a による脂肪分化抑制には、non-canonical 経路は関与しないことを示唆する。

Troglitazone	-	+	+	+	+	+	+
Wnt3a(5%)	-	-	+	+	+	+	+
Inhibitor	-	-	-	Che	KN	CsA	NSC



図 6 . ST2 細胞の脂肪細胞への分化における Wnt シグナルの non-canonical 経路の阻害剤の影響

以上のように、ST2 細胞の脂肪細胞への分

化は canonical 経路によって抑制されたが、non-canonical 経路によって抑制されなかった。また、脂肪細胞への分化抑制は canonical 経路の TCF 活性の上昇のみでは発現しなかった。これらの結果より、脂肪細胞への分化抑制には canonical 経路の活性化によって誘導される未知の分子が関与することが考えられる。今後、本研究により確立した実験系を用いて canonical 経路の活性化によって誘導される未知の分子の探索や脂肪細胞への分化を抑制する食品因子の同定が可能になると期待できる。

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 12 件 )

谷口実由紀、田中 牧、鬼丸祐二、鏝方綾香、山岸あづみ、金 東造、佐伯 茂、間葉系幹細胞から脂肪細胞への Wnt シグナルによる分化制御、日本農芸化学会 2014 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県岡山市)

田中 牧、谷口実由紀、鬼丸祐二、鏝方綾香、細田明美、金 東造、佐伯 茂、間葉系幹細胞から骨芽細胞への Wnt シグナルによる分化制御、日本農芸化学会 2014 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学(岡山県岡山市)

谷口実由紀、田中 牧、鏝方綾香、鬼丸祐二、細田明美、金 東造、佐伯 茂、間葉系幹細胞から骨芽細胞への Wnt シグナルによる分化制御、日本栄養・食糧学会 第 53 回近畿支部大会、2014 年 10 月 26 日、京都府立大学(京都府京都市)

田中 牧、鬼丸祐二、鏝方綾香、谷口実由紀、細田明美、金 東造、佐伯 茂、Wnt シグナルによる間葉系幹細胞の骨芽細胞と脂肪細胞への分化制御、第 68 回日

本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日、  
酪農学園大学(北海道江別市)

鑄方綾香、鬼丸祐二、田中 牧、細田明  
美、山岸あづみ、福村知恵、金 東浩、  
佐伯 茂、リポ蛋白質受容体ファミリー  
による canonical Wnt シグナル経路介する  
脂肪細胞の分化制御、第 67 回日本栄養・  
食糧学会大会、2013年5月25日、名古屋  
大学(愛知県名古屋市)

鬼丸祐二、鑄方綾香、田中 牧、福村知  
恵、金 東浩、佐伯 茂、リポ蛋白質受  
容体ファミリーによる canonical Wnt シグ  
ナル経路の活性化調節、第 67 回日本栄  
養・食糧学会大会 2013年5月25日、名古  
屋大学(愛知県名古屋市)

鬼丸祐二、細田明美、山岸あづみ、福村  
知恵、金 東浩、佐伯 茂、リポ蛋白質  
受容体ファミリーによる Wnt/  $\beta$ -catenin  
シグナル伝達経路の活性化調節、日本農芸  
化学会 2013 年度大会、2013年3月26日、  
東北大学(宮城県仙台市)

Dong-Ho Kim、Ryoko Okamoto、Kazuo  
Ikeda、Mingjuan Ye、Tomoe Fukumura  
and Shigeru Saeki、Molecular  
Characterization of Mouse Intestinal  
Lactoferrin-Binding Protein、2012  
International Symposium for Exchange  
Program、8 November 2012、  
KyungSan(Korea)

Shigeru Saeki、Yuji Onimaru、Ayaka  
Ikata、Tomoe Fukumura and Dong-Ho Kim、  
The LDL Receptor Gene Family with  
Biological Multifunctions beyond the  
Endocytosis of Lipoproteins、2012  
International Symposium for Exchange  
Program、8 November 2012、  
KyungSan(Korea)

鬼丸祐二、平田倫子、関屋麻奈美、細田  
明美、山岸あづみ、福村知恵、金 東浩、  
佐伯 茂、Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル伝達

経路に対するリポ蛋白質受容体ファミリ  
ーの影響、日本農芸化学会 2012 年度大会、  
2012年3月24日、京都女子大学(京都府  
京都市)

鑄方綾香、平田倫子、関屋麻奈美、細田  
明美、山岸あづみ、福村知恵、金 東浩、  
佐伯 茂、リポ蛋白質受容体ファミリー  
LRP10 による Wnt シグナル経路を介する骨  
芽細胞の分化制御、日本農芸化学会 2012  
年度大会、2012年3月24日、京都女子大  
学(京都府京都市)

金 東浩、岡本涼子、池田一雄、福村知  
恵、佐伯 茂、ラクトフェイリン結合タ  
ンパク質の精製と機能解析、日本農芸化学  
会 2012 年度大会、2012年3月24日、京  
都女子大学(京都府京都市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金 東浩 (KIM DONGHO)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教  
授

研究者番号 : 70326271