

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659442

研究課題名(和文) 高脂肪食負荷・肥満において活性化する新規脂肪重量調節因子の探索

研究課題名(英文) Screening of novel factors for those regulating fat mass under the nutrient excess state

研究代表者

泉 哲郎 (Izumi, Tetsuro)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：00212952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見出した脂肪蓄積因子ALK7は、TGFbeta受容体ファミリーに属するオルファン受容体で、その機能解明には未知リガンドを同定することが重要である。我々は、TGFbetaファミリー-33種のうち、肥満あるいは過栄養状態において発現が亢進するもの4種を同定し、うち3種が細胞レベルでALK7リガンド活性があることを見出した。これらリガンド候補分子は、脂肪組織の特定細胞に高発現しており、オートクラインあるいはパラクラインの機序で作用していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We recently discovered a novel signaling pathway involving ALK7, one of the type I TGFbeta receptors, which increases both the adipocyte size and lipid content by suppressing lipolysis. To understand the function and regulation of this pathway, it is essential to identify its unknown ligands of this orphan receptor. For this purpose, 33 mammalian TGFbeta family members were screened for those upregulated under a nutrient excess state. As a result, four members were found to be upregulated. Furthermore, three of them showed ligand activities to increase gene expression through ALK7 in cultured cells. All the three candidate ligands were highly expressed in adipose tissue, although each of them was expressed in different kinds of cells. These results suggest that these ALK7 ligands function in an autocrine or paracrine manner to regulate the lipid metabolism and content of mature adipocytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂肪蓄積 脂肪代謝 脂肪細胞 肥満 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

これまで単一遺伝子性肥満症の原因・病態として、脂肪細胞より分泌されるレプチンが脳視床下部に作用して、食餌摂取やエネルギー消費量を制御する系が、中心的に研究されてきた。本経路は、肥満モデルマウス *ob/ob* の原因遺伝子レプチンの発見がきっかけになって明らかとなり、疾患モデル動物遺伝学的解析の有用例として有名なものである。その後、レプチンの下流で働く、食餌摂取やエネルギー消費に関わる分子の機能解明が飛躍的に進展し、レプチンの他に、レプチン受容体、POMC、PC1、MC4R などの遺伝子変異が、ヒトにおける単一遺伝子性高度肥満症の原因となることが明らかになった。このように、ホルモン様生理活性物質の発見は、それが制御する生理機構やその破綻による病態の解明に大きく貢献するが、成熟脂肪細胞の脂質代謝を直接制御する(アディポ)サイトカインは知られていない。またこれまで、ヒト肥満症の原因として、脂肪細胞自身の脂質代謝を介して脂肪重量を規定する遺伝子異常についてもほとんど知られていない(O'Rahilly, Nature 462, 307-314, 2009)。我々は、肥満・糖尿病モデル TSOD (Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes) マウスの遺伝学的解析を行い、その体重、血糖値、インスリン値などが多因子遺伝性に制御されていることを示し、これら量的形質に関わる遺伝子の染色体局在部位を決定した(Hirayama et al., Diabetes 48, 1183-1191, 1999)。このうちマウス第2染色体に存在する *Nidd5* は、体重、特に脂肪重量を制御している。*Nidd5* 領域のみ対照マウス由来のゲノムに置換したコンジェニックマウスを複数系統作製して、その表現型を解析することにより、その局在部位や作用機序を限定した(Mizutani et al., Mamm. Genome 17, 375-384, 2006)。さらに *Nidd5* の実体が、I 型 TGF $\beta$  受容体 activin receptor-like kinase7 (ALK7) のキナーゼ領域に存在するナンセンス変異によることを見出

した(申請時未発表)。レプチン経路が、過栄養時に体重を減少する方向に働き、その機能低下が肥満症の原因となるのに対して、ALK7 経路は、過栄養時に脂肪蓄積を促す方向に働き、その機能抑制は脂肪量、体重を減少させる点に大きな違いがある。すなわち ALK7 経路は、現代社会が直面する飽食時代の肥満症や合併症の病態形成に、生理的かつ直接的に関わっていると考えられ、その機能解明の意義は大きいと期待される。

## 2. 研究の目的

ALK7 は、分化後の成熟脂肪細胞に特異的に発現している。本研究では、まず、脂肪蓄積に関与する ALK7 シグナルがどのような条件で活性化し、肥満症におけるインスリン抵抗性や慢性炎症に関与するかを調べる。すなわち ALK7 は過栄養状態で脂肪分解を抑制することにより、余分のエネルギー源を脂肪細胞に蓄積させる生理作用があるが、この状態が慢性的に持続すると、脂肪細胞の大型化、脂質リモデリングの停滞を招き、慢性炎症状態やインスリン抵抗性を惹起すると考えられ、この仮説を実証する。次に、リガンドが特定されていないオルファン受容体である ALK7 の機能的意義を理解するために、この受容体キナーゼを活性化するリガンドの同定を試みる。さらに、ALK7 リガンドの発現細胞、遺伝子発現調節機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ALK7 シグナル活性化と肥満の関係  
栄養状態と ALK7 シグナルの関係を調べるために、肥満マウスとやせマウスにおいて ALK7 遺伝子変異の有無が、シグナル下流の PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  などの脂肪分化主要転写因子やリパーゼ遺伝子発現、および脂肪分解量にどのような影響を及ぼすかを調べる。具体的には、ALK7 遺伝子正常肥満マウス、ALK7 遺伝子異常肥満マウス、ALK7 遺伝子正常やせマウス、ALK7 遺伝子異常やせマウスの 4

群間で、脂肪組織中の遺伝子発現や脂肪分解を比較する。

#### (2) ALK7 リガンドの同定

TGFβスーパーファミリーは、その1次配列の相同性より、ヒトなどの哺乳類では33種同定されているが、機能未知のものが多い。まず、これら33種すべてについて、quantitative PCR (qPCR) 法で、高脂肪食負荷時に発現が変化するものをスクリーニングする。次にこれら候補分子のリコンビナントタンパク質を大腸菌または培養細胞に発現させて精製し、野生型マウス、または ALK7 キナーゼ活性欠失マウス由来の脂肪細胞に付加し、Smad 依存性の luciferase レポーター遺伝子の発現や、ATGL, HSL など脂肪細胞リパーゼの発現への影響を調べ、リガンド活性の有無を検討する。

#### (3) ALK7 リガンド発現細胞の特定

上記で同定された ALK7 リガンドを高発現する組織を、qPCR アッセイ法により見出し、さらに組織中のリガンド発現細胞を特定する。これまで調べた ALK7 リガンド候補分子の多くは、脂肪組織中に高い発現が認められ、かつ高脂肪食でその発現がさらに誘導されることを見出している。まず、脂肪組織を脂肪細胞と SVF (stroma-vascular fraction, 間質血管成分) に分け、どちらの分画に発現しているかを大まかに決める。これまでの予備的知見では、候補リガンド分子の一部は脂肪細胞自身に発現しているが、他のいくつかは SVF に発現している。後者の場合、肥満により脂肪組織中に動員されるマクロファージなどの血球系細胞がリガンドを分泌して、脂肪細胞中の ALK7 キナーゼ・シグナルを活性化する可能性が示唆される。そこでこれら血球系細胞を表面マーカーに対する蛍光標識抗体を用いて FACS 解析により分画して、リガンド発現細胞を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) ALK7 シグナル活性化と肥満の関係

ALK7 遺伝子機能欠失変異があると、肥満の

有無にかかわらず、脂肪細胞における PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  両転写因子の発現が亢進した。以上のことより ALK7 シグナルは、やせマウスでも、ある程度活性化していることになる。しかし C/EBP $\alpha$  の発現が、肥満の有無にかかわらず、ALK7 の機能欠失により同程度に亢進するのに対し、PPAR $\gamma$  の発現は、肥満状態で ALK7 非依存性の機序によっても発現が抑制されていた。すなわち PPAR $\gamma$  は、ALK7 遺伝子異常やせマウスで最も発現が高く、ALK7 遺伝子正常やせマウス、ALK7 遺伝子異常肥満マウス、ALK7 遺伝子正常肥満マウスの順に発現が抑制されていた。この PPAR $\gamma$  の活性順に、リパーゼの発現や脂肪分解能も低下していることから、PPAR $\gamma$  が脂肪代謝を介する成熟脂肪細胞のサイズを決定していると考えられる。脂肪サイズを反映し、より小型の ALK7 遺伝子変異肥満マウス脂肪細胞からは、ALK7 遺伝子正常肥満マウス脂肪細胞に比し、善玉アディポカインであるアディポネクチンの発現が増加し、悪玉アディポカインの MCP-1 や TNF $\alpha$  の発現が低下していた。このことから ALK7 シグナル系は、脂肪細胞の脂質ターンオーバーのみならず、アディポカインの変化によって、肥満症に伴うインスリン抵抗性や慢性炎症病態に関与していると考えられる。

#### (2) ALK7 リガンドの同定

33 種類の哺乳類 TGF $\beta$  ファミリーの網羅的スクリーニングを行い、高脂肪食負荷および肥満状態において発現の変化するもの 5 種を同定した。このうち、過栄養状態で発現が亢進するものは 4 種で、残りの 1 種は逆に低下した。発現が亢進 4 種のリコンビナントタンパク質のうち 3 種が、シグナル下流因子 SMAD の結合配列直下にルシフェラーゼ遺伝子を発現させた 293 細胞において、ALK7 受容体と Cripto 共受容体の発現下でのみ、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を促進することがわかり、ALK7 リガンド活性を有することが

わかった。さらに ALK7 遺伝子野生型、変異型マウスの脂肪細胞で、少なくとも 1 種のリガンド・タンパク質が、ALK7 依存性に、すなわち ALK7 野生型脂肪細胞でのみ、リガゼ遺伝子の発現を低下させて脂肪分解を抑制した。

### (3) ALK7 リガンド発現細胞の特定

過栄養状態で発現が亢進したリガンド候補遺伝子の発現分布（脳、胸腺、肝、脾、褐色脂肪組織、白色脂肪組織、骨髄、骨格筋）を調べたところ、上記 293 細胞でリガンド活性を示さなかった 1 種を除き、すべて脂肪組織に特異的に高発現していた。しかし脂肪組織中での発現細胞を調べると、残りの 3 種それぞれは、白色脂肪組織中の脂肪細胞、前駆脂肪細胞、マクロファージと、異なる細胞に発現していた。現在、細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体を用いた FACS 解析で、さらに詳しい細胞種を特定している。これらリガンド因子は、脂肪組織中でオートクラインあるいはパラクラインの機序で、脂肪代謝制御を介する脂肪蓄積量を調節するのみならず、それに起因するインスリン抵抗性や慢性炎症病態にも関与することが示唆された。今後、実際に ALK7 リガンドとして機能しているかどうかを、個体レベルで検証する必要がある。

### 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 4 件)

1. Izumi T (2012). Adipose cell and lipid turnovers in obesity and insulin resistance. *Diabetol. Int.*, 3, 184-186.
2. Yogosawa S, Mizutani S, Ogawa Y, and Izumi T (2013). Activin receptor-like kinase 7 suppresses lipolysis to accumulate fat in obesity through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *Diabetes*, 62, 115-123.
3. Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda

K, Shingyouchi A, Naka A, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yahagi N, Shimada M, Yatah S, Suzuki H, Yogosawa S, Izumi T, Sone H, Urayama O, Yamada N, and Shimano H (2013). TFE3 controls lipid metabolism in adipose tissue of male mice by suppressing lipolysis and thermogenesis. *Endocrinology*, 154, 3577-3588.

4. Yogosawa S, and Izumi T (2013). Roles of activin receptor-like kinase 7 signaling and its target, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , in lean and obese adipocytes. *Adipocyte*, 2, 246-250.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 與五沢 里美、水谷 伸、小川 佳宏、泉哲郎。糖尿病・肥満モデルマウスにおける脂肪蓄積に関与する遺伝子の解析。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜、2012 年 5 月 17 日。
2. 與五沢 里美、水谷 伸、小川 佳宏、泉哲郎。糖尿病・肥満モデルマウスにおける脂肪蓄積に関与する遺伝子の解析。第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー、伊香保温泉・渋川、2012 年 7 月 13 日。
3. 與五沢 里美、水谷 伸、小川 佳宏、泉哲郎。糖尿病・肥満モデルマウスにおける脂肪蓄積に関与する遺伝子の解析。第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会、東京、2013 年 2 月 22 日。
4. 與五沢 里美、水谷 伸、小川 佳宏、泉哲郎。糖尿病・肥満モデルマウスにおける新たな脂肪蓄積遺伝子 ALK7 の解析。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、熊本、2013 年 5 月 16 日。
5. 與五沢 里美、泉哲郎。新規脂肪蓄積遺伝子 ALK7 の機能解析。第 34 回日本肥満学会、東京、2013 年 10 月 12 日。

〔図書〕(計 2 件)

1. 泉哲郎 (2013)。新たな脂肪蓄積遺伝

子 ALK7 . 増大特集「細胞表面受容体」生体の科学 ( 医学書院、東京 ) 64, 5, 446-447.

2. 與五沢 里美、泉 哲郎 (2013). ALK7 による脂肪分解抑制作用 . 特集「インスリン感受性、エネルギー代謝の新規モディファイヤー」 内分泌・糖尿病・代謝内科 ( 科学評論社、東京 ) 37, 617-622.

〔産業財産権〕

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://molend.showa.gunma-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

泉 哲郎 ( IZUMI TETSUROU )

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号 : 00212952

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :