

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659447

研究課題名（和文）ヒト褐色脂肪細胞が産生する新規分泌たんぱくの機能解明

研究課題名（英文）Analyses of soluble factors produced by human brown adipocytes.

研究代表者

松田 修 (Osam Mazda)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00271164

研究成果の概要（和文）：褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞とは対照的に、余剰エネルギーを放散し非震え熱産生に寄与する細胞である。しかしながら、ヒト成人における褐色脂肪細胞の存在は最近まで分かっておらず、ヒトの褐色脂肪細胞の機能と役割には未解明の部分が多い。また、褐色脂肪細胞が何らかの液性因子を産生し、それらが全身的な代謝調節にどのような役割を担っているかについては、これまでほとんど明らかにされていない。本研究では褐色脂肪細胞が産生する液性因子の解析とその機能解析を目的として行った。DNA マイクロアレイ解析を行って、ヒト褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞との遺伝子発現プロファイルをゲノムワイドに解析した結果、褐色脂肪細胞が選択的に産生し、細胞外に分泌されると予想されるいくつかのたんぱくを見出した。これらたんぱくに FLAG を融合させたキメラたんぱくの遺伝子を構築し、電気穿孔法で培養細胞株に導入した。抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにて解析した結果、培養細胞株のライセートに FLAG 融合たんぱくの発現が認められた。他方で、RNA interference によって UCP1 をノックダウンしたヒト褐色脂肪細胞を作成し、種々のアッセイに供したところ、UCP1 を発現する褐色脂肪細胞よりは低いものの、一部の機能については発揮されることが示唆され、さらにこれらは液性因子を介する可能性が考えられた。したがって、褐色脂肪細胞は全身的に作用する液性因子を分泌することで、UCP1 非依存性の機能を果たしている可能性が示唆された。本研究の成果は、糖尿病やメタボリック症候群の理解と制御に結びつく可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）： Unlike white adipocytes, brown adipocytes contribute to energy expenditure and non-shivering heat generation. However, the functions and roles of human brown adipocytes have not been fully understood, because the existence of brown adipocytes in adult human remained controversial until recently. It remains almost unknown whether some soluble factors are produced by brown adipocytes and play regulatory roles in systemic metabolism. Here, we attempted to analyze functions of soluble factors produced by human brown adipocytes. Genome-wide gene expression analysis of brown and white adipocytes using DNA chips suggested some putative protein that may be selectively secreted by brown adipocytes. We constructed chimeric genes for the candidate proteins fused with FLAG, and transfected them to cultured cells via electroporation. Western blot analyses using anti-FLAG antibody demonstrated expression of the chimeric proteins in the lysates of the transfected cells. In contrast, we also knocked down expression of the uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipocytes by short interfering RNA, and subjected the cells to some functional analyses. The UCP1-knocked down cells retained some functions, albeit at a low level compared with wild type. Further analyses suggested that the function was possibly mediated through some soluble factors. Thus, brown adipocytes may exert UCP1-independent functions through producing soluble factors. The present results may have strong implications to understanding and control of

diabetes mellitus and metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：細胞分化、再生医療

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪細胞は、食物由来の余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵するのみならず、体内で最大の内分泌器官として、レプチン、アディポネクチン等、さまざまなアディポサイトカインを産生し、遠隔他臓器に作用して全身的な代謝制御に関与している。

一方、褐色脂肪細胞は、ヒトでは乳児期にのみ存在し、成人では存在しないと、最近まで考えられてきた。2009年になって、成人の鎖骨上部、縦隔、傍脊柱、腎周囲等に褐色脂肪組織が存在し、機能していることが明らかにされた。褐色脂肪細胞の数と機能は、BMIと空腹時血糖に逆相関し、肥満、糖尿病、高脂血症の患者ではほとんど存在しない。これらの事実から、褐色脂肪細胞は、ヒトにおいても白色脂肪細胞とは逆に、肥満と耐糖能異常を抑制すると考えられるが、その詳細はよく分かっていない。また、褐色脂肪細胞による代謝制御のメカニズムとして広く知られている、UCP1によるエネルギー消費・熱産生以外に、褐色脂肪細胞にどのような機能があるかに関しては、ほとんど未知である。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞は、ミトコンドリア内膜に特異的に発現するUCP1 (Uncoupling protein 1) が、電子伝達系により形成されたミトコンドリア内膜内外のプロトン濃度勾配を、ATP合成とカップルせずに解消することによって、脂肪酸を酸化分解したエネルギーを熱として放出する細胞であり、エネルギー出納と糖脂質代謝調節に関与する細胞である。また内臓型肥満、耐糖能異常と脂質代謝異常の是正に重要な役割を果たす。しかしながら、UCP1を介する以外の機能、とくに液性因子を介した機能については、ほとんど知られていない。

我々は、褐色脂肪細胞を誘導する技術を開発した。そこで本研究では、この技術を用いて褐色脂肪細胞が産生する液性因子の解析とその機能解析を行った。

3. 研究の方法

[遺伝子発現解析] 褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞からRNAを採取し、affymetrix社DNA chip解析を行ってゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを解析した。

[in vitro 遺伝子導入実験と解析] 褐色脂肪細胞が選択的に産生し、細胞外に分泌されると予想されるいくつかのたんぱくについて、FLAGを融合させたキメラたんぱくの遺伝子を構築し、その発現ベクターを作成した。培養細胞株に電気穿孔法で導入した。細胞のライセートと培養上清を採取し、抗FLAG抗体を用いたウェスタン・ブロットで解析した。

[UCP1非依存的機能の解析] 褐色脂肪細胞にUCP1に特異的なshort interfering RNA (siRNA)を導入した。UCP1の発現量をreal time RT-PCRで評価後、種々のアッセイに供した

4. 研究成果

[遺伝子発現解析] DNAマイクロアレイ解析を行って白色脂肪細胞との遺伝子発現プロファイルをゲノムワイドに解析した結果、褐色脂肪細胞が選択的に産生し、細胞外に分泌されると予想されるいくつかのたんぱくを見出した。

[in vitro 遺伝子導入実験と解析] FLAGを融合したキメラたんぱくの遺伝子を培養細胞株にin vitro導入しウェスタンブロットにて解析したところ、培養細胞株のライセートでのみ、導入遺伝子の産物が認められ

た (図1に典型例を示す)。

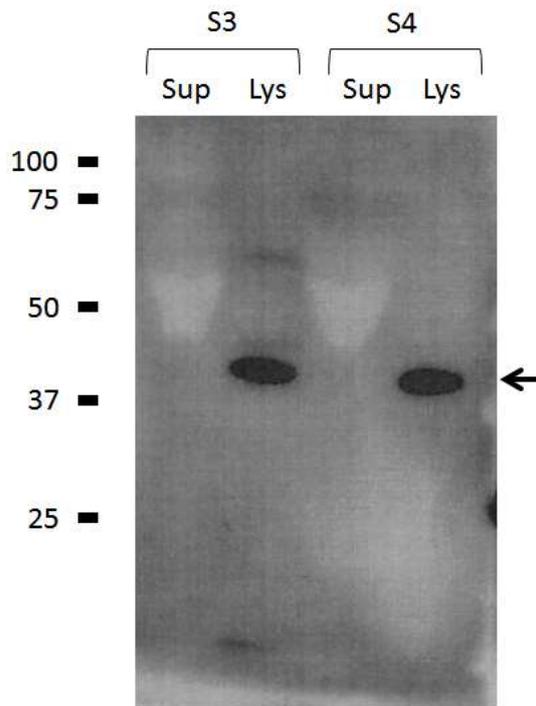


図1 FLAG 融合たんぱく S3、S4 の遺伝子を、C2C12 細胞に電気穿孔法にて導入し、16 時間後に細胞上清 (Sup) とライセート (Lys) を調整した。抗 FLAG 抗体を用いたウェスタン・ブロット解析を行った。

[UCP1 非依存的機能の解析] UCP1 をノックダウンした褐色脂肪細胞を作成して、種々のアッセイに供したところ、UCP1 を発現する褐色脂肪細胞よりは低いものの、一部の機能が有意に発揮されることが示唆された (data not shown)。これらの機能は液性因子を介する可能性が考えられた (data not shown)。したがって、褐色脂肪細胞は全身的に作用する液性因子を分泌することで、UCP1 非依存性の機能を果たしている可能性が示唆された (投稿準備中)。

本研究の成果は、糖尿病やメタボリック症候群の理解と制御に結びつく可能性が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

- 1) Lansoprazole Inhibits Nitric Oxide and Prostaglandin E(2) Production in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells.

Nakagawa S, Arai Y*, Kishida T, Hiraoka N, Tsuchida S, Inoue H, Sakai R, Mazda O, & Kubo T. *Inflammation*. 2012 Jun;35(3):1062-8. doi:

10.1007/s10753-011-9412-7. (査読有)

- 2) Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. Tsuchida S, Arai Y, Kishida T, Takahashi K, Honjo K, Terauchi R, Inoue H, Oda R, Mazda O, & Kubo T. 2013 Apr;31(4):525-30. doi:

10.1002/jor.22263. Epub 2012 Nov 19. (査読有)

- 3) Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. Gao F, Kishida T, Ejima A, Gojo S & Mazda O*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013 Feb 8; 431 (2): 309-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.105. Epub 2013 Jan 4. (査読有)

- 4) In vivo gene transfer using pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes: Influence of chondroitin sulfate on the stability of freeze-dried complexes and transgene expression in vivo. Hagiwara K, Kishimoto S, Ishihara M, Koyama Y, Mazda O, & Sato T. * *J Gene Med.* 2013 Feb;15(2):83-92. doi: 10.1002/jgm.2694. (査読有)

- 5) Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte. Hiraoka N, Arai Y, Takahashi KA, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tsuchida S, Inoue H, Morino S, Suico MA, Kai H, & Kubo T. *J Orthop Res.* 2013 Jun;31(6):894-900. doi: 10.1002/jor.22307. Epub 2013 Jan 17. (査読有)

[産業財産権]

発明の名称：褐色脂肪細胞及びその調製方法
 発明者：岸田綱郎、松田 修
 出願番号：特願 2012-156066

出願人：京都府公立大学法人

出願日：2012（平成24）年7月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00271164

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川人 豊 (KAWAHITO YUTAKA)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50336731