

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460265

研究課題名(和文) スンクスにおける脂肪幹細胞の分布と分化能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the distribution and differentiation potency of adipocyte precursor cells in mesentery of Suncus murinus

研究代表者

易 勤 (Yi, Shuang-Qin)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：70334753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： スンクスの精巢上体，後腹膜，皮下白色脂肪組織ではその脂肪幹細胞は存在していたが，腸間膜では皆無であることが判明した。スンクスの腸間膜から細胞を分離，培養した結果，成熟脂肪細胞には全く分化しなかった。スンクスの脂肪移植実験には，腸間膜組織を皮下脂肪環境下におくことで，腸間膜脂肪の誘導分化までに至らなかった。スンクスに高脂肪食を与えた場合と，スンクスの毎日の摂食量は少なかったが，毎日摂食したカロリー量は変わらなかったため，スンクス体重の変化はなく，腸間膜脂肪の形成もなかった。スンクスは高カロリー負荷に対して抵抗性があると推測された。

研究成果の概要(英文)： The adipocyte precursor cells existed with the epididymal, retroperitoneal, and subcutaneous white adipose tissue, but not in the mesentery in Suncus murinus. As a result of isolating a cell from a mesentery of the Suncus, and having cultured it, it did not differentiate to a maturity adipose cell at all.

In a fat transplant experiment of the Suncus, it did not lead to differentiation of the mesenteric tissues by transplanting a mesentery tissue under subcutaneous environment. There was little reduction of food consumption of the Suncus in a high-fat meal, however, as the caloric intake did not change to general meal every day, there was not the change of the weight, and there was not the formation of the mesenteric adipose. It was suggested that the Suncus had resistance for caloric load.

研究分野： 消化器系自律神経と癌の転移

キーワード： 腸間膜脂肪蓄積 脂肪幹細胞 脂肪移植 Gold Thigluucose Pioglitazone

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪の蓄積は、高血圧、高血糖、脂質代謝異常などさまざまな生活習慣病や動脈硬化性疾患の発症に深く関与している。最近では『内臓脂肪症候群』、いわゆる『メタボリックシンドローム』として大きな医学的・社会的問題となっている。日本人の3大死因のうち、2位の心臓病、3位の脳卒中に罹患する危険性を飛躍的に高めており、国内外でその予防手段、治療法の早急な開発が望まれている。

一方、これまで、肥満とその病態の解明には、肥満患者や、肥満型実験動物における高脂肪食負荷モデルやレプチン関連遺伝子変異動物を対象にした内臓脂肪蓄積の測定と画像診断、中性脂肪の代謝遅延、インスリン抵抗性、アディポサイトカイン、生活習慣との関連、食事や運動による治療など、すでに肥満になっている状態の解析、あるいは肥満状態にするアプローチのみであり、脂肪組織・細胞、特に内臓脂肪の代表である腸間膜脂肪組織・細胞を欠損したモデルからのアプローチはこれまでは無く全く新しいものである。

申請者らは食虫目の代表動物であるスunks (学名 *Suncus murinus*, 日本名ジャコウネズミ) の形態形成の研究を継続している。我々の最近の研究により、スunksの体重が生後二ヶ月以降ほとんど変わらず、内臓脂肪である腸間膜脂肪も蓄積しないことを見出し、スunksは唯一の抗内臓脂肪蓄積の実験動物モデルとして、肥満・脂肪細胞分化の研究に有用であることを報告してきた。

更に、スunksの抗肥満・抗内臓脂肪蓄積の特性のメカニズムを解明するため、スunksに高脂肪食を与え、食餌誘導性肥満 (diet induced obesity: DIO) を起こす実験を行い、その体重、全身の脂肪、血清脂質などの変化を検討した。高脂肪食に対してスunks体重の変化はなく、腸間膜脂肪の形成はなかった。スunksの抗肥満特徴は低脂肪食

が原因ではなく、脂肪代謝あるいは全く新規のメカニズムによるものと考えられた。

加えて、スunksの胃における ghrelin よび腹腔内投与の研究を行い、ラットに比べ、スunksの分布量が有意に少なく、血清 ghrelin レベルも有意に低いことを報告してきた。加えて、摂食関連因子である膵ポリペプチド (PP) 細胞の再生および PP family および receptors におけるスunksの消化管における局在により、Y4 receptor の広範分布と PP 以外の PP family and receptors は直腸に集中的に分布しているという特徴が見いだされた。

加えて、摂食関連因子である膵ポリペプチド (PP) 細胞の再生および PP family および receptors におけるスunks消化管における免疫局在の解析により、Y4 receptor の広範囲分布と PP 以外の PP family and receptors の直腸における集中的に分布という特徴が見いだされた。

本研究はこれらの研究結果を踏まえ、さらに新たにスunksの脂肪幹細胞に注目し、脂肪幹細胞の同定、その存在・分布の解析と成熟脂肪細胞への分化能について検討する。

対照コントロールとしては腸間膜脂肪以外の皮下脂肪、後腹膜脂肪などの white adipose および brown adipose、これらにマウスの組織を加え、食餌・薬剤による in vitro および in vivo 脂肪分化誘導による変化を探求する。また、腸間膜組織においてスunksでのみ脂肪幹細胞が欠落していることが見いだされた場合には、その欠落のメカニズムの解明にも迫る。合わせて、皮下脂肪組織の腹腔内・腸間膜への移植、その逆に腸間膜組織の皮下脂肪領域への移植実験を行って、成熟脂肪細胞への分化能・脱分化能についても検討を加える。

2. 研究の目的

スunksの脂肪幹細胞の分布・分化能を解

析するため、次の四点を説明する。

(1) スンクス脂肪幹細胞の同定を行い、その存在・分布を調べる。特に腸間膜における脂肪幹細胞の分布が存在しているかを調べる。

(2) 食餌・薬剤による脂肪幹細胞の分化・誘導により、全身の脂肪、特に腸間膜脂肪の分化・誘導が可能なのかを調べる。

(3) 満腹中枢破壊による視床下部性肥満の誘導法で、スンクスの肥満・腸間膜脂肪の形成を導くことが可能なのかを調べる。

(4) 皮下脂肪と腸間膜組織の間に相互移植により、腸間膜に脂肪の分化・誘導が可能なのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) **スンクス脂肪幹細胞の同定,その存在と分布状況の調査**

腸間膜に白色脂肪組織が存在しない理由を明らかにするため、脂肪幹細胞の存在の有無につきマルチカラーフローサイトメトリー法を使って調べる。具体的には、精巣上体脂肪、後腹膜脂肪、皮下脂肪、両肩甲骨間の褐色脂肪組織と腸間膜組織を採集し、Lineage cocktail (Lin), CD31, Ly6A/E (Sca1), CD34, CD29, CD24 などの各抗体がスンクスにおいても使用可能であることをまず確認し、それぞれの抗体の組み合わせで解析する。それと同時に、次世代シーケンサーでスンクスのゲノム解析を行い主要な幹細胞表面マーカーのアミノ酸配列情報を得ておく。

PI⁺CD31⁺Lin⁺ 細胞 (死細胞, 内皮細胞, 血球系分化細胞) をまず除外し, 組織重量当たりのマウスで既に報告されている脂肪幹細胞 CD34⁺CD29⁺Ly6A/E (Sca1)⁺CD24⁺ の細胞数を調べる。その他, 各抗体の組み合わせによる幹細胞の存在数も確認する。

(2) **スンクス内臓脂肪幹細胞の成熟分化誘導の調査**

スンクスの皮下脂肪組織と腸間膜組織からコラゲナーゼ処理により、それぞれ単核細胞を分離して脂肪細胞への分化誘導培地で2週間培養し、Oil Red Oで染色することで、成熟脂肪細胞へと分化誘導されるかどうか確認する。各細胞集団をセルソーターによって分取し, *in vitro* での成熟脂肪細胞への分化誘導を確認する。成熟脂肪細胞となることが確認できた細胞集団は脂肪幹細胞であるといえる。

(3) **組織学的なアプローチによるスンクス脂肪幹細胞の存在の調査**

スンクスの下腹部の皮下脂肪組織, 精巣上体脂肪組織, 後腹膜脂肪組織, 両肩甲骨間の褐色脂肪組織と腸間膜組織をそれぞれ採集し, CD31, Ly6A/E (Sca1), CD34, CD29, CD24 などの各抗体において, それぞれの抗体の組み合わせで, 二重・三重免疫蛍光染色を行い, 各脂肪部位別における脂肪幹細胞の局在を解析する。

(4) **Gold Thioglucose の腹腔内投与によるスンクスの肥満誘導実験**

金硫化グルコース (Gold Thioglucose: GTG) を成熟マウスに投与すると, 満腹中枢 (satiety center) である視床下部腹内側核 (ventromedial hypothalamus: VMH) の外側部が破壊され, 過食・肥満・インスリン抵抗性が誘導される。本研究ではスンクスの腹腔内に GTG を投与し, 過食・肥満を誘導させ, スンクス全身の脂肪組織分布の変化を調べ, 腸間膜脂肪の生成が誘導されるかを確認する。

(5) **Pioglitazone の投与によるスンクスの脂肪幹細胞の分化誘導実験**

ピオグリタゾン Pioglitazone は脂肪細胞の分化に関わ

る核内転写促進因子 (PPAR- γ , ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体) のリガンドとして, インスリン抵抗性改善作用との関連が注目されている。本実験では, Pioglitazone を脂肪細胞の分化誘導因子として投与し, スンクスの腸間膜において脂肪細胞が誘導・発生するかを解析する。

(6) **スンクス脂肪移植実験:** 皮下脂肪組織と腸間膜脂肪組織は異なる発生, 分化過程により形成される可能性がある。スンクスの皮下脂肪組織と腸間膜脂肪組織の生体内環境を変化させることにより, 脂肪の再生・分化にどのような影響があるかを調べる。

すなわち, 腸間膜組織が腹腔内の腸間膜の環境から離れ, 皮下へ移植された場合, 腸間膜組織から成熟脂肪細胞・脂肪幹細胞の形成が可能なのか?

一方, 形成・分化できるスンクスの皮下脂肪を皮下の環境から離れ, 腹腔内に移植し, 腸間膜系からの環境シグナルを受ける場合は, 皮下脂肪の生長・分化にどのような変化が生じるか?

4. 研究成果

- (1) スンクスの脂肪幹細胞の同定, その存在・分布の解析と成熟脂肪細胞への分化能について, 検討した結果, 脂肪幹細胞と考えられる CD34⁺CD29⁺Ly6A/E(Sca1)⁺CD24⁺ の存在を確かめるとともに, 定量的解析を行うと, 精巣上体, 後腹膜, 皮下白色脂肪組織ではその脂肪幹細胞は存在していたが, 腸間膜では皆無であることが判明した。
- (2) スンクスの腸間膜から細胞を分離, 培養して分化誘導培地で2週間培養を試みたが, 脂肪染色であるOil Red O染色陽性となる成熟脂肪細胞には全く分化しなかった。
- (3) in vivoで脂肪幹細胞分化誘導因子であるPioglitazoneの投与や, 満腹中枢破壊・視床下部性肥満の誘導法で

あるGold Thioglucoseの腹腔内投与を行ったが, 腸間膜脂肪の誘導分化に至らなかった。

- (4) 皮下脂肪・腸間膜組織間の相互移植実験も行い, 腸間膜組織を皮下脂肪環境下におくことで成熟脂肪細胞が発生するかどうかを確かめたが, 腸間膜脂肪の誘導分化までに至らなかった。
- (5) スンクスのエネルギー吸収・代謝を調べ, 食餌誘導性肥満を起こす実験を行うため, スンクスに高脂肪食を与え, その体重, 全身脂肪, 血清脂質および糞の脂質成分の変化を検討した。通常の餌に比べ, 高脂肪食を与えた場合は, スンクスの毎日の摂食量は少なかったが, 毎日摂食したカロリー量は変わらなかったため, スンクス体重の変化はなく, 腸間膜脂肪の形成もなかった。スンクスは高カロリー負荷に対して抵抗性があると推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

易 勤、佐藤 徹、三輪 容子、Ren K、Dai YD、木下 正信、永川 裕一、土田 明彦. 膵頭神経叢の分布形態の再検討. 胆膵の病態生理 32, 2016 (in press) 査読なし
Yi SQ, Ren K, Kinoshita M, Takano N, Itoh M, Ozaki N. Innervation of extrahepatic biliary tract, with special reference to the direct bidirectional neural connections of the gallbladder, sphincter of Oddi and duodenum in *Suncus murinus*, in whole-mount immunohistochemical study. Anat Histol Embryol. 2016 45: 184-8. DOI: 10.1111/ahe.12186. 査読あり
Ren K, Kinoshita M, Dai Y, Wang H, Yi K, Itoh M, Yi SQ. A new model for localized pancreatitis, ventral pancreatic duct ligation in the adult house musk shrew, *Suncus murinus*. Academia J Biotechnol 4: 55-61, 2016.

DOI: 10.15413/ajb.2015.0242 査読あり
Terayama H, Yi SQ, Shoji S, Tanaka O, Kanazawa T, Kosemura N, Tamura M, Sekiguchi M, Naito M, Akamatsu T, Sakabe K. Anomalous connection of the left posterior renal vein with the left ascending lumbar vein in a Japanese cadaver. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015; 74: 544-547.

DOI: 10.5603/FM.2015.0121. 査読あり
永川裕一, 細川勇一, 佐原八束, 瀧下智恵, 中島哲史, 土方陽介, 笠原健大, 粕谷和彦, 易 勤, 土田明彦。適切な神経叢郭清を併施する膵頭部癌根治術。消化器外科 38: 15-24, 2015 査読なし

Terayama H, Yi SQ, Hirai S, Qu N, Naito M, Hatayama N, Kawata S, Itoh M. Gross anatomical study of bilateral megaureters associated with renal pelvis dilatation and a giant urinary bladder: an adult cadaver with a brief review of the literature. *Anat Sci Int*. 2013 88: 171-174.

DOI: 10.1007/s12565-013-0172-3. 査読あり

Yamamoto Y, Yi SQ, Saito H, Munesue S, Ozaki N, Yamamoto H. *Suncus murinus* is a unique animal model lacking mesenteric fat and adipocyte progenitor cells 糖尿病 56: 207 (2013.04) 査読なし

堀 紀代美, 林功栄, 安井正佐也, 杉浦康夫, 白石 昌武, 中村 恒夫, 易 勤, 山口 豪, 尾崎 紀之。新たに開発したモデル動物を用いた末梢性動脈疾患に伴う疼痛機序の解明。第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集 P110, 2013 査読なし

〔学会発表〕(計 16 件)

Dai YD, Ren K, Yi K, Kinoshita M, Yi SQ. Inhibitory effect and mechanism of low-dose paclitaxel in chronic pancreatitis and pancreatic fibrosis in rat pancreatic duct ligation model. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 28~30 日 ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

Yi K, Ren K, Hori K, Ozaki N, Dai YD, Kinoshita M, Itoh M, Ohta T, Yi SQ. The effect of valproic acid in prevention of oxaliplatin-induced neuropathy in the rat model. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 28~30 日 ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

Ren K, Miwa Y, Sato I, Yi K, Dai YD, Kinoshita M, Yi SQ. Reinvestigation of the suspensory muscle of the duodenum in cadaver dissection. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 28~30 日 ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

易 勤, 佐藤巖、三輪容子、木下正信、Ren K、Dai YD、Yi K、伊藤正裕、永川裕一、土田明彦。PD 術式による膵臓の神経分布様式の再認識。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 28~30 日 ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

易 勤。Mesopancreas の視点から膵頭神経叢の分布形態を考える。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 28~30 日 ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

易 勤。Mesopancreas の視点から膵頭神経叢の分布形態の再検討。有明臨床解剖シンポジウム 2015 年 11 月 7 日有明医療大学学内(東京都・江東区)

永川裕一, 易 勤, 土田明彦。膵頭部癌における膵外神経叢浸潤の進展形式と膵外神経叢の解剖からみた適切な郭清法。第 23 回日本消化器関連学会週間 (シンポジウム) 2015 年 10 月 8 日~11 日 グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール・グランドプリンスホテル高輪 (東京都・品川区)

永川裕一, 易 勤, 細川勇一, 佐原八束, 瀧下智恵, 中島哲史, 土方陽介, 粕谷和彦, 土田明彦。膵頭部癌における膵外神経叢の浸潤形式と解剖からみた適切な神経叢郭清。第 42 回日本膵切研究会学術集会 2015 年 8 月 28-29 日 関西医科大学 (大阪市・枚方市)

易 勤。Mesopancreas の視点から膵頭神経叢の分布形態を考える。第 32 回日本胆膵病態・生理研究会 2015 年 6 月 14 日 京王プラザホテル・新宿 (東京都・新宿区)

易 勤。膵臓の形態・発生による臨床応用について。第 25 回日本解剖学会関東支部懇話会 2015 年 6 月 13 日 日本歯科大学・解剖学第一講座 日本歯科大学本館 (東京都・千代田区)

Ren K, Kinoshita M, Watanabe M, Takano N, Itoh M, Yi SQ. Inhibitory effects of Saiko-keishi-to (TJ-10) on pancreatitis-reduced pain in a rat model of chronic pancreatitis. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 20~23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Takano N, Itoh M, Ren K, Kinoshita M, Yi SQ. Re-evaluation of the development in the rat shoulder joint. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 20~23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Yi SQ, Yamamoto Y, Ren K, Kinoshita M, Yamamoto H, Ozaki N. Absence of

adipocyte precursor cells in mesentery of *Suncus murinus*. The 18th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists. IFAA August 8-10, 2014 Beijing (China)

易 勤, 山本靖彦, 中村恒夫, ニン カ, 渡辺賢, 木下正信, 山本博, 尾崎紀之。「スunksの脂肪移植および脂肪細胞分化誘導実験研究」。第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27~29 日 自治医科大学内 (栃木県・下野市)

易 勤, 中村恒夫, 林省吾, 堀紀代美, 山口豪, 伊藤正裕, 山本靖彦, 山本博, 尾崎紀之。「スunksを用いた高脂肪食負荷による抗肥満研究」。第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27~29 日 自治医科大学内 (栃木県・下野市)

Yamamoto Y, Yi SQ, Saito H, Munesue S, Ozaki N, Yamamoto H. Absence of mature adipocytes and adipocyte precursor cells in mesentery of *Suncus murinus*. June 21-25, 2013 73rd Scientific Sessions (2013) Chicago (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

易 勤 (YI, Shuang-Qin)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授
研究者番号: 70334753

(2) 研究分担者

山本 靖彦 (YAMAMOTO, Yasuhiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 20313637