

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860237

研究課題名(和文) 前駆内臓脂肪細胞の同定とそれを用いたメタボリックシンドローム治療薬の創出

研究課題名(英文) Identification of Mouse Mesenteric Adipocyte Progenitor Cells and Development of anti-metabolic syndrome drugs

研究代表者

宮田 佑吾 (Miyata, Yugo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：70623453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織は内臓脂肪と皮下脂肪に大別され、各脂肪組織に特異的な前駆脂肪細胞が存在することが示唆されている。しかし現在までに前駆内臓脂肪細胞は同定されていない。そこで私共は前駆内臓脂肪細胞を同定することと、それらを用いてメタボリックシンドローム治療薬を創出することを目指して検討を行った。その結果、*in vitro*スクリーニングおよび*in vivo*での移植実験を経て前駆内臓脂肪細胞を同定した。しかも各前駆脂肪細胞から*in vitro*で得られる各成熟脂肪細胞が異なる性質を有していることを確認した。また各前駆脂肪細胞を用いて*in vitro*の汎用的な実験系を構築できた。

研究成果の概要(英文)：White adipose tissues (WATs) are classified into visceral and subcutaneous WAT and they have distinct metabolic and biological properties. Many reports have suggested that there are depot specific preadipocytes in each WAT. However, visceral preadipocytes has not been identified until now. In the present study, we aimed to identify preadipocytes from mouse visceral and subcutaneous WATs, and to develop new anti-metabolic syndrome drugs by using mature visceral adipocytes from visceral preadipocytes.

Through *in vitro* screening and *in vivo* implantation experiments, visceral preadipocytes were identified. Furthermore, we confirmed that differentiated adipocytes obtained from mesenteric and subcutaneous preadipocytes maintained each characteristic phenotype *in vitro* as reported in each WAT *in vivo*. We also developed a simple method for culturing those preadipocytes.

研究分野：分生物学

キーワード：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では食生活の変化と運動不足や車社会を反映し、肥満が急増している。特に、内臓脂肪の蓄積は内臓脂肪自体のインスリン抵抗性やアディポサイトカインの産生異常等の機能異常を引き起こす。そして内臓脂肪の機能異常は全身の高血糖・高血圧・脂質代謝異常を惹起し、メタボリックシンドロームの発症要因となる (Fujioka et al. Metabolism 1987, Kanai et al. Hypertension 1990)。さらにメタボリックシンドロームが致死的な動脈硬化性疾患へと進展することが知られている (Matsuzawa et al. Ann NY Acad Sci 1993)。しかし、動脈硬化性疾患の予防策として高血糖・高血圧・脂質代謝異常といった個別病態に対する治療しか行われておらず、メタボリックシンドロームの根本病因である内臓脂肪の機能異常に対する薬物治療は存在しない。このようにメタボリックシンドロームの根本的治療薬が存在していないため、いまだ動脈硬化性疾患による死亡率は悪性新生物と同等である。

メタボリックシンドローム患者が爆発的に増加している今日において、メタボリックシンドロームの根本病因である「内臓脂肪の機能異常」を標的とした薬が期待されているが、全く開発されていない。その理由として内臓脂肪細胞の *in vitro* 実験系が存在しないことが挙げられる。一般的な脂肪細胞の *in vitro* 実験系として、脂肪組織中の間質細胞全体を単離・培養し、分化誘導処理をすることで成熟脂肪細胞を得る手法が提唱されている。しかしながら、内臓脂肪の間質細胞のうち脂肪細胞への分化能を持つものはごく一部である。即ち内臓脂肪中の前駆脂肪細胞は極めて少なく、特に腸間膜脂肪においては、従来の手法を用いても成熟脂肪細胞はほとんど得られない。しかも、その精製・単離方法も確立されていない。つまり、「前駆内臓脂肪細胞が同定されていない」ため、*in vitro* での実験が制限され、「薬剤スクリーニングが行えず、創薬に発展しない」ことがメタボリックシンドローム研究の大きな課題となっている。

2. 研究の目的

上記の課題を解決するため、前駆内臓脂肪細胞の同定、そしてメタボリックシンドロームの根本病因「内臓脂肪の機能異常」を標的とした薬剤の創出を目標として、内臓脂肪細胞を標的としたメタボリックシンドローム治療薬のスクリーニングを目指した前駆内臓脂肪細胞の継代培養系の確立を目的とする。

3. 研究の方法

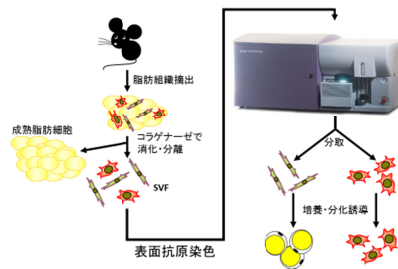
内臓脂肪である腸間膜脂肪組織から間質-血管画分細胞を単離し、その分画の細胞に対して100種類以上の幹細胞関連表面抗原の発現をフローサイトメトリーにて半網羅的に検

討した。次に有意に発現が確認された表面抗原に関して、その発現の有無で細胞をセルソーターによって分取、さらに培養を行った。そして分取・培養した細胞が前駆脂肪細胞であるかを判定するため、複数の方法で脂肪細胞へと分化誘導処理を施すことにより分化効率を検討した。分化効率の評価は、細胞内の油滴形成を検討した。生化学的指標として当教室で同定した脂肪細胞特異的分泌蛋白質、アディポネクチンの培養上清濃度を測定した。前駆脂肪細胞の判定基準として Oil Red O 染色の定量値に1.5倍以上の差があること、かつ培養上清中のアディポネクチン濃度に10倍以上の差があることの2つを設定した。さらに *in vitro* で前駆内臓脂肪細胞マーカー候補として同定された表面抗原に関して、*in vivo* での分化能の検証も行った。GFP-Tgマウスの脂肪組織から各表面抗原陽性・陰性分画を分取・培養し、マトリゲルニ懸濁して野生型マウスに移植した。内臓脂肪由来の細胞は内臓脂肪に、皮下脂肪由来の細胞は皮下に移植し、1週間後に摘出して脂肪細胞に分化しているかを検討した。

4. 研究成果

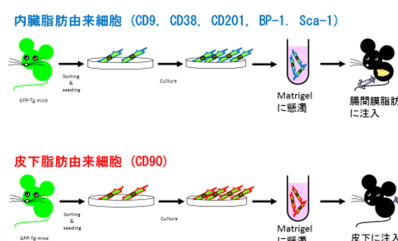
各脂肪組織由来の細胞に対して100種類以上の幹細胞関連表面抗原の発現をフローサイトメトリーにて半網羅的に検討した結果(図1)、30個の表面抗原に関して有意に発現が確認された。次にその発現の有無で細胞をセルソーターによって分取・培養し分化誘導処理を行った。その結果、Oil Red O 染色の定量値と培養上清中のアディポネクチン濃度の判定基準を満たす表面抗原マーカー候補が同定された。

図1 脂肪組織中の前駆脂肪細胞の同定



次に各マーカー候補因子に関して *in vivo* での分化能を検討した(図2)。その結果、各前駆脂肪細胞分画を同定することに成功した。

図2 *in vivo*での分化実験(移植実験)



さらに同定した各前駆脂肪細胞から *in vitro* で得られる成熟脂肪細胞が、今まで *in vivo* や *ex vivo* の実験系で報告されていた性質を再現できるか検討した(図3)。まずアディポネクチンの分泌量を検討したところ皮下脂肪細胞より内臓脂肪細胞の方が高いことを再現できた(図4)。次に定常状態の脂肪分解能を検討したところ、皮下脂肪細胞より内臓脂肪細胞の方が高いことも再現できた(図5)。さらにイソプロテレノール刺激による脂肪分解の亢進に対するインスリンの抑制効果を検討した。その結果、内臓脂肪細胞より皮下脂肪細胞の方が抑制効果は高いことを再現できた。(図6)さらにイソプロテレノール刺激における容量依存性の違い

図3 各成熟脂肪細胞の性質の差異

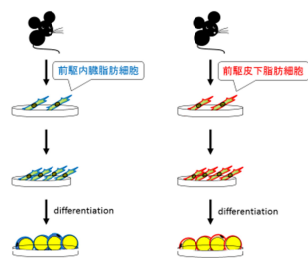


図4 各脂肪細胞の脂肪分解能

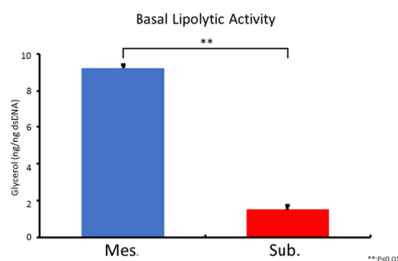


図5 各脂肪細胞のadiponectin分泌能

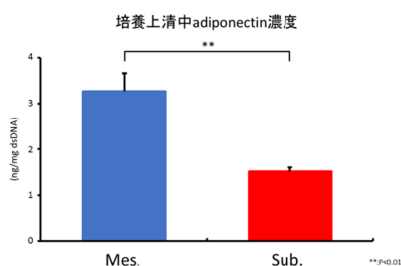
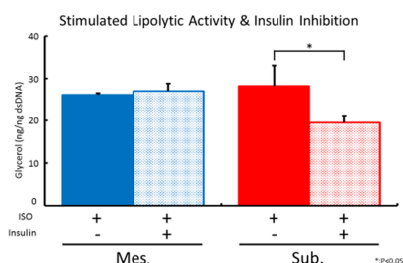


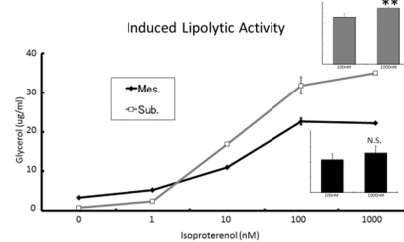
図6 各脂肪細胞の脂肪分解能



を見出すことができた。(図7)

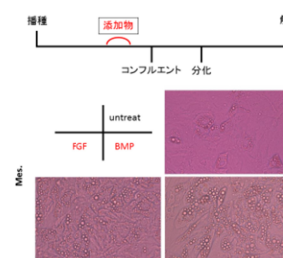
同定した各前駆脂肪細胞は培養条件下で全

図7 各脂肪細胞の脂肪分解能



ての細胞が脂肪細胞に分化することを確認している。しかし、継代培養を繰り返すと分化能を失ってしまい、汎用性を欠いている。そこで、継代培養による分化能の低下を防ぐことと、分化効率を上げてスクリーニング感度を上げるために見当を行った。その結果、数種類の液性因子を組み合わせることで、または培養基面を加工することで分化能の低下を改善できることを見出し

図8 液性因子による培養系改善



た(図8)

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0件)

[学会発表](計3件)

宮田 佑吾、マウス前駆内臓脂肪細胞および前駆皮下脂肪細胞の同定、第19回アディポサイエンス・シンポジウム、2014年8月23日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

宮田 佑吾、マウス前駆内臓脂肪細胞と前駆皮下脂肪細胞の同定、第57回糖尿病学会、2014年5月24日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

Yugo Miyata, Identification of Mouse Mesenteric Fat Progenitor Cells, Keystone Symposia Obesity: A Multisystems Perspective, 2014年1月14日, Vancouver (Canada)

[図書](計0件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 佑吾 (MIYATA Yugo)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究
員
研究者番号：70623453

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：