

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860739

研究課題名(和文) 脂肪蓄積に機能する新規内因性リガンドの探索と分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of novel ALK7 ligand in fat accumulation in obesity

研究代表者

與五沢 里美 (YOGOSAWA, Satomi)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：60392437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TGF β リガンドファミリーの中から過栄養状態においてALK7シグナルを活性化させる新規内因性リガンドの探索を行った。その結果、対照マウスに比べ、高脂肪食負荷および肥満状態において、脂肪組織で強く発現誘導される遺伝子4種を同定した。これらリガンドはALK7リガンド活性を有し、脂肪細胞、CD11b陽性マクロファージに発現していることがわかった。これらリガンドは、分化させた脂肪細胞、腹腔マクロファージには発現していないことから、肥大化した脂肪組織環境下において特異的に発現誘導しており、ALK7の新規リガンドとして機能する可能性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that ALK7, one of the TGF β receptors, suppresses lipolysis to accumulate fat in obese mice. However, it remains unknown how the ALK7-signaling is activated during fat accumulation in obesity. In this study, we explored a novel endogenous ligand for ALK7 in TGF β family. Under high-fat diet (or obesity) condition, several TGF β family ligands were highly expressed in adipose tissue of mice compared with normal diet condition. These ligands have transactivation activity depend on ALK7 and its coreceptor, Cripto in 293T cells. Furthermore, these ligands were expressed in mature adipocytes or CD11b-positive macrophages in adipose tissue of obese mice. Further analysis should be done to validate that whether these ligands activate the ALK7-signaling in vivo.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満 糖尿病 脂肪蓄積 脂肪細胞 TGF

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームでは、肥満に伴ってインスリン抵抗性や糖・脂質代謝異常が惹起されることが知られている。近年、脂肪細胞における脂肪蓄積と分解のバランスがインスリン抵抗性と深く関与していることが明らかとなり、脂肪蓄積・分解メカニズムの解明がメタボリックシンドロームの発症機序を明らかにする手がかりになると考えられる。

所属研究室では、これまでに糖尿病・肥満モデルマウスである TSOD マウスを用いた遺伝学的な解析から、第2染色体上に体脂肪量制御に関与する遺伝子領域を同定した。TSOD マウス系統からこの遺伝子領域のみを対照マウスの染色体と置換したコンジェニックマウスでは、白色脂肪重量が減少し、脂肪細胞サイズが小型になることを見出した。TSOD マウス系統からこの遺伝子領域のみを対照マウスの染色体と置換したコンジェニックマウスでは、白色脂肪重量が減少し、脂肪細胞サイズが小型になることを見出した。

申請者らは、この遺伝子領域に存在する遺伝子の塩基配列を調べ、その結果、コンジェニックマウスにおいて、TGF 受容体ファミリーの一つである ALK7 遺伝子の塩基配列にストップコドンをもつことを見出した(引用文献)。従って、この ALK7 遺伝子変異が、コンジェニックマウスで認められる脂肪量の減少に寄与している可能性が示唆された。さらに解析を進めると、ALK7 は脂肪細胞に強く発現し、ALK7 変異コンジェニックマウスでは、TSOD に比べ脂肪細胞の分化に重要な転写因子 PPAR、C/EBP が活性化され、脂肪分解酵素(リパーゼ)の発現上昇を介して脂肪分解能の亢進、脂肪量の減少が認められた。また、この ALK7 変異マウスでは、個体レベルにおいて耐糖能とインスリン抵抗性の改善と脂質燃焼の促進が認められた。以上のことから、ALK7 は、過栄養状態において PPAR、C/EBP、リパーゼ遺伝子発現を抑制することにより、余分なエネルギーを脂肪細胞に蓄積させる作用があることがわかった。

従って、ALK7 活性を抑制できれば肥満症やそれに伴う代謝異常の改善につながると考

えられるが、ALK7 シグナルを活性化する内因性リガンドは解明されておらず、その抑制手段も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、リパーゼ発現抑制に機能する ALK7 の内因性リガンドを探索し、その発現、作用メカニズムを解明する。それにより、肥満症とそれに伴うインスリン抵抗性の成・病態生理の解明と、ALK7 シグナルをターゲットとした治療法開発の基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 新規 ALK7 リガンド候補の探索

ALK7 変異コンジェニックマウスは、対照肥満マウス TSOD に比べ、週齢に伴って体重、脂肪重量が減少しており、ALK7 は、過食や肥満状態で脂肪蓄積に機能していることが考えられる。しかしながら、ALK7 の発現は、正常マウスに比べ肥満マウスでわずかに低下していたことから(引用文献)、ALK7 シグナルの活性化はリガンド発現量に依存しており、ALK7 のリガンドは肥満状態で強く発現していることが示唆される。

そこで、TGF リガンドファミリーの中から過栄養状態において ALK7 シグナルを活性化する新規内因性リガンドの探索を行った。初めに、通常食および高脂肪食負荷マウス2系統(C57BL/6N、BALB/cA)と糖尿病・肥満モデルマウス2系統(TSOD、ALK7 変異コンジェニック)を用意した。これらマウスから代謝系組織9種を単離した。定量PCR法を用いて、これら組織における TGF リガンドファミリーの遺伝子発現を調べ、肥満状態で強く発現しているリガンド遺伝子を同定することを試みた。

(2) ALK7 リガンド活性の検討

網羅的発現解析から、リガンド候補遺伝子を見出した。次に、これら候補遺伝子が ALK7 リガンド活性を有するかを調べるため、293T細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

まず TGF の下流転写因子である Smad の

DNA 結合配列とルシフェラーゼ遺伝子をつないだベクターを作製した。作製したベクターを ALK7 とコレセプターである Cripto と共に 293T 細胞に導入した。この後、候補リガンドタンパク質をふりかけ、ルシフェラーゼアッセイを行い、(1) で見出した候補遺伝子の ALK7 リガンド活性を調べた。

(3) リガンド発現細胞の検討

リガンド候補遺伝子は、(1) の解析から褐色及び白色脂肪組織で強く発現していた。そこで、脂肪組織から以下の方法により細胞を分離し、リガンド発現細胞を同定することを試みた。まず、褐色及び白色脂肪組織を、コラーゲナーゼ処理により脂肪細胞と間質血管細胞群 (SVF) に分けた。さらに、細胞表面マーカー抗体を結合した磁気ビーズを用いて SVF から脂肪前駆細胞 (CD34+)、免疫系細胞 (マクロファージ (CD11b+)、CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞 (CD4+, CD8+))、血管内皮細胞 (CD31+) など分離した。得られた細胞におけるリガンド発現を定量 PCR 法で調べた。

4 . 研究成果

(1) 新規内因性リガンド候補の探索

発現解析の結果、対照となる野生型マウスに比べ、高脂肪食負荷および肥満状態のマウスの脂肪組織 (白色脂肪、または、褐色脂肪組織) で強く発現誘導される遺伝子 4 種を見出した。これら遺伝子を ALK7 リガンド候補として見出すことができ、以降の解析を行った。

(2) ALK7 リガンド活性の検討

(1) で見出した候補リガンド 4 種のうち、3 種リガンドは ALK7 と Cripto 存在下でリガンド活性を有することがわかった。従って、これらリガンド遺伝子は、過栄養状態において脂肪組織中に強く発現し、脂肪細胞の ALK7 に結合することにより、ALK7 シグナルを活性化する可能性が示唆された。

(3) リガンド発現細胞の検討

次に、免疫学的手法を用いてマウス脂肪組

織におけるリガンド発現細胞を調べたところ、成熟脂肪細胞、CD11b 陽性マクロファージに発現していることがわかった。これらリガンドは、分化させた脂肪細胞や腹腔マクロファージには発現が見られないことから、肥大化した脂肪組織環境下において特異的に発現誘導しており、ALK7 の内因性リガンドとして機能している可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Yogosawa S, Mizutani S, Ogawa Y, and Izumi T.

Activin receptor-like kinase 7 suppresses lipolysis to accumulate fat in obesity through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor and C/EBP

Diabetes、査読有、Vol.62、No.1、2013、pp.115-23、DOI:10.2337/db12-0295.

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 1 件)

Yogosawa S and Izumi T.
Roles of activin receptor-like kinase 7 signaling and its target, peroxisome proliferator-activated receptor , in lean and obese adipocytes
Adipocyte、査読有、Vol.2、No.4、2013、pp.246-50、DOI:10.4161/adip.24974.

[学会発表] (計 2 件)

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 5 6 回日本糖尿病学会年次学術集会
2 0 1 3 年 5 月 1 6 日
熊日生涯学習プラザ (熊本県熊本市)

與五沢 里美、泉 哲郎
新規脂肪蓄積遺伝子 ALK7 の機能解析
第 3 4 回日本肥満学会学術大会

2013年10月12日
東京国際フォーラム（東京都千代田区）

〔図書〕(計1件)

與五沢 里美、泉 哲郎

科学評論社、ALK7 による脂肪分解抑制作用
2013、92(591-682)

〔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

與五沢 里美 (YOGOSAWA, Satomi)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：60392437

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし