

## 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：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670124

研究課題名(和文)新しいベージュ脂肪細胞の分化・誘導シグナリング機構の解明と創薬への応用

研究課題名(英文)Elucidation of a new differentiation mechanism of beige adipocytes and its application for drug design

研究代表者

齋藤 尚亮(SAITO, NAOAKI)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：60178499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Racを介したケラチノサイトから脂肪細胞への分化・誘導シグナリングの同定とその機構の詳細の解明を行った。ケラチノサイトからRacの活性化により分泌される因子5つ(a,b,c,d,e)を、DNAマイクロアレイによるスクリーニングとRT-PCRにより同定した。更に、a+b, a+cの組み合わせ刺激をした場合には、a, b, cの単独刺激に比し劇的に脂肪細胞への分化が促進される事を、未分化中胚葉細胞3T3-L1細胞を用いた実験により見出した。これらの脂肪分化シグナルが白色脂肪細胞あるいは褐色脂肪細胞へのシグナルであるかを検討し、糖・脂質代謝障害の治療薬の開発につなげるたい。

研究成果の概要(英文)：We studied a new Rac-mediated pathway which can induce the differentiation of adipocytes. Using DNA microarray and RT-PCR, we found 5 factors (a,b,c,d,e) secreted from keratinocytes when Rac-mediated pathway is activated. Differentiation of adipocyte (3T3-L1 cells) was significantly enhanced when the cells were treated with the combination of a+b or a+c, much more than treated with a, b or c alone. We further elucidate whether the signal induces the differentiation to white or beige adipocyte and we study the new drug target for the disorder of lipid/glucose metabolism.

研究分野：薬理学

キーワード：脂肪細胞 分化誘導因子 ケラチノサイト Rac

## 1. 研究開始当初の背景

低分子量 G 蛋白質である Rac は、細胞接着、運動、増殖、極性・分化に関与する。申請者らは、3 種の Rac 分子種 (Rac1~3) が相互に機能を代償し合える事を報告したが、Rac1 と Rac3 が相反する機能を果たすとの報告もなされている。そこで、Rac 分子種の特異的機能解明を目標に、表皮ケラチノサイトで Rac1 と Rac3 をダブルノックアウトする (Rac1/Rac3 DKO) マウスを作製し、このマウスが Rac1 KO マウスの表現型の増悪を来さず事から、少なくとも表皮では Rac1 と Rac3 が協調して機能することを明らかにした。この発見に加え、Rac1 KO マウスが天寿を全うするのに対し、Rac1/Rac3 DKO マウスは、生後 3 週齢までに全例が死亡することを見出している。その原因が脂肪層菲薄化と考えられることから、ケラチノサイトから脂肪細胞への分化・誘導シグナルの低下であると考え、その機構の解明は、脂肪代謝に関与する慢性疾患 (糖尿病など) の治療薬の開発につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、表皮ケラチノサイト特異的 Rac1/Rac3 ダブルノックアウト (Rac1/Rac3 DKO) マウスを用いた研究により、表皮ケラチノサイトから脂肪細胞への分化・誘導シグナルの存在の可能性、更には、このシグナル伝達システムを利用することにより表皮ケラチノサイトを介した脂肪細胞の分化・誘導・増殖の制御の可能性を見出した (未報告)。本研究は、ケラチノサイトを介した脂肪細胞への分化・誘導システムの詳細を明らかにすると共に、経皮的に脂肪細胞、特にペーリュ脂肪の機能を調節し得る薬物を開発し、糖代謝障害や肥満に対する新規治療薬や新しいタイプの治療法に発展させることを目標とした。

## 3. 研究の方法

申請者が作製した表皮ケラチノサイトで Rac1/Rac3 を double KO するマウスを用いて、以下に挙げる 3 つの研究計画を順次遂行する事により、脂肪細胞の分化・誘導におけるケラチノサイトからのシグナリ

ングを解明し、糖・脂質代謝障害の新規治療法開発に繋げることを試みた。

- A) Rac を介したケラチノサイトから脂肪細胞への分化・誘導シグナリングの同定とその機構の詳細
- B) ケラチノサイトからのシグナルが褐色脂肪細胞様 (ペーリュ脂肪) 細胞誘導因子である可能性の検討
- C) 糖代謝障害や肥満を予防・治療する新規治療薬として、B) で同定した因子のケラチノサイトからの分泌を亢進することでペーリュ脂肪細胞への誘導を促進する化合物をスクリーニング・開発

## 4. 研究成果

Rac を介したケラチノサイトから脂肪細胞への分化・誘導シグナリングの同定とその機構の詳細の解明を行った。まず、ケラチノサイトから Rac の活性化により分泌される因子 5 つ (a~e) を、DNA マイクロアレイによるスクリーニングと RT-PCR による確認解析により同定した。更に、a+b, a+c の組み合わせ刺激をした場合には、a, b, c の単独刺激に比し劇的に脂肪細胞への分化が促進される事を、未分化中胚葉細胞 3T3-L1 細胞を用いた実験により見出した。

次いで、脂肪細胞への分化に最も関与するケラチノサイトからの分泌因子 a, b の Rac を介しての分泌機序を、種々の阻害剤を用いて検索し (マウス初代培養ケラチノサイトに阻害剤を処置後、ELISA 法により、a, b の分泌量を定量)、ERK 阻害剤が最も効果的であることより、ERK シグナルの関与を突きとめた。

現在、我々が発見した脂肪分化シグナルが、脂肪細胞の中でも白色細胞への分化を促進するのか、それとも褐色細胞への分化を促進するのかの同定を定量的 PCR (UCP, PGC1a, Cidea, IGFBP3, TCF21, FABP4 に着目) により試みている。

本研究は、未だ報告を見ない世界最先端の研究である。今後、我々が発見した a+b 刺激が、白色細胞よりもむしろ褐色脂肪細胞に分化させるシグナルであることが同定できれば、肥満などの生活習慣を含めた糖・脂質代謝障害の新規治療法開発に繋げることが出来ると確信している。

## ケラチノサイト から脂肪層への分化・誘導シグナル



### 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 12 件)

1. Maeda J, Inoue K, Ichimura R, Takahashi M, Kodama Y, Saito N, Yoshida M. Essential role of constitutive androstane receptor in Ginkgo biloba extract induced liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2015 Jun 24;83:201-209. doi: 10.1016/j.fct.2015.06.010. 査読あり

2. Ueyama T, Sakuma M, Ninoyu Y, Hamada T, Dupuy C, Geiszt M, Leto TL, Saito N. The Extracellular A-loop of Dual Oxidases Affects the Specificity of Reactive Oxygen Species Release. *J Biol Chem.* 2015 290(10):6495-506. doi: 10.1074/jbc.M114.592717. 査読あり

3. Takahashi, H., Adachi, N., Shirafuji, T., Danno, S., Ueyama, T., Vendruscolo, M., Shuvaev, A.N., Sugimoto, T., Seki, T., Hamada, D., Irie, K., Hirai, H., Sakai, N. and Saito, N. Identification and characterization of PKC $\gamma$ , a kinase associated with SCA14, as an amyloidogenic protein. *Human Mol. Genetics.* 24(2):525-39. 2015. doi: 10.1093/hmg/ddu472. 査読あり

4. Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmielewsky, F., Haddad, O., Laguillier, C., Guyot, E., Ueyama, T., Oudar, O., Sutton, A., Charnaux, N. RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biology Open* 3(10):995-1004. 2014 doi:10.1242/bio.20148227 査読あり

5. Makino-Okamura, C., Niki, Y., Takeuchi, S., Nishigori, C., Declercq, L., Yaroch D.B.,

and Saito, N. Heparin inhibits melanosome uptake and inflammatory response coupled with phagocytosis through blocking PI3k/Akt and MEK/ERK signaling pathways in human epidermal keratinocytes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 1063-74.2014 DOI: 10.1111/pcmr.12287 査読あり

6. Shirafuji, T., Ueyama, T., Yoshino, K-I., Takahashi, H., Adachi, N., Ago, Y., Koda, K., Nashida, T., Hiramatsu, N., Matsuda, T., Toda, T., Sakai, N., and Saito, N. The role of Pak-Interacting Exchange Factor- $\beta$  phosphorylation at Serines 340 and 583 by PKC $\gamma$  in dopamine release. *J Neurosci.* 34(28) 9268-9280, 2014. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4278-13.2014 査読あり

7. Maeda, J., Kijima, A., Inoue, K., Ishii, Y., Ichimura, R., Takasu, S., Kuroda, K., Matsushita, K., Kodama, Y., Saito, N., Umemura, T., and Yoshida, M. *In Vivo* Genotoxicity Assessment of *Ginkgo biloba* Extract Using the Comet, Micronucleus, and Gene Mutation Assay, *Toxicological Sciences*, 140, 298-306, 2014 doi: 10.1093/toxsci/kfu090 査読あり

8. Yamamoto, K., Seki, T., Yamamoto, H., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N. Deregulation of the actin cytoskeleton and macropinocytosis in response to phorbol ester by the mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 *Frontiers in Physiology*, 5:216(1-10),2014 doi: 10.3389/fphys.2014.00126. eCollection 2014. 査読あり

9. Shirai, Y and Saito, N. Diacylglycerol kinase as a possible therapeutic target for neuronal diseases. *Journal of Biomedical Science*, 21:28-28, 2014 査読あり

10. Kano, T., Kouzuki, T., Mizuno, S., Ueda, S., Yamanoue, M., Sakane, F., Saito, N. and Shirai, Y. Both the C1 domain and a basic amino acid cluster at C-terminus are important for neurite and branch induction ability of DGK $\beta$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 447:89-94, 2014 doi:

10.1016/j.bbrc.2014.03.113. 査読あり

11. Sakuma, M., Shirai, Y., Ueyama, T., and Saito, N. Diacylglycerol kinase gamma regulates antigen-induced mast cell degranulation by mediating Ca<sup>2+</sup> influxes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445(2):340-5, 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.197 査読あり

12. Ueyama, T., Sakaguchi, H., Nakamura, T., Goto, A., Morioka, S., Shimizu, A., Nakao, K., Hishikawa, Y., Ninoyu, Y., Kassai, H., Suetsugu, J., Koji, T., Fritzsche, B., Yonemura, S., Hisa, Y., Matsuda, M., Aiba, A., and Saito, N. Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells, *J. Cell Sci.* 127: 2040-2052, 2014 doi:10.1242/jcs.143602 査読あり

[学会発表](計8件)

1. Protein kinase C and its involvement in neuronal diseases. Saito, N. 第2回 Neuroscience Network in Kobe シンポジウム、平成28年2月19日、兵庫県(口頭発表、英語)

2. 聴毛のインテグリティ維持の破綻により発症する難聴のメカニズム解明 上山健彦、齋藤尚亮 第89回日本薬理学会年会・シンポジウム、平成28年3月9~11日、神奈川県(口頭発表、日本語)

3. 脊髄小脳変性症14型におけるPKC $\gamma$ のアミロイド様構造体の形成と治療法 足立直子、高橋英之、中園 葵、濱田大三、上山健彦、関 貴弘、酒井規雄、齋藤尚亮 第89回日本薬理学会年会、平成28年3月9~11日、神奈川県(口頭発表、英語)

4. 黒質線状体系におけるPKC $\gamma$ 基質の解析: ドパミン遊離と神経細胞生存におけるPKC $\gamma$ によるリン酸化の役割 白藤俊彦、上山健彦、吉野健一、足立直子、秀 和泉、田中 茂、齋藤尚亮、酒井規雄 第89回日本薬理学会年会・シンポジウム、平成28年3月9~11日、神奈川県(ポスター・日本語)

5. 脊髄小脳変性症14型におけるPKC $\gamma$ のアミロイド様構造体の形成と疾患への関与

足立直子、高橋英之、白藤俊彦、上山健彦、Michele, Vendruscolo.、入江一浩、平井宏和、酒井規雄、齋藤尚亮 第38回日本神経科学大会、平成27年7月28~31日、兵庫県(口頭発表、英語)

6. Analysis of PKC $\gamma$  substrates in nigro-striatum system by using phosphoproteome. Kaneoka, A.、Shirafuji, T.、Ueyama, T.、Uwada, J.、Yoshini, K.、Adachi, N.、Takahashi, H.、Hide, I.、Tanaka, S.、Saito, N. and Sakai, N. 第38回日本神経科学大会、平成27年7月28~31日、兵庫県(口頭発表、英語)

7. Radial migration of cerebellar granule neuron regulated by Rac through a new signaling pathway. Ninoyu, Y.、Ueyama, T.、Nakamura, T.、Ishii, T.、Kohta, M.、Kasahara, M.、Sakaguchi, H.、Hisa, Y.、Kohmura, E.、Aiba, A. and Saito, N. 日本薬理学会年会、平成27年3月18~20日、愛知県(口頭発表・日本語)

8. 生体防御に関する活性酸素産生酵素の食胞・頂側膜へのターゲティング及び会合メカニズム 上山健彦、齋藤尚亮 第92回日本生理学会大会、平成27年3月21~23日、兵庫県(口頭発表・日本語)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
齋藤 尚亮 (SAITO, Naoaki)  
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授  
研究者番号: 60178499

(2)研究分担者  
上山 健彦 (UEYAMA, Takehiko)  
神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授  
研究者番号: 80346254