

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670449

研究課題名(和文) GDF5-Ifrd1シグナルによる褐色脂肪細胞活性化機構

研究課題名(英文) Activation of brown adipocyte by GDF5-Ifrd1 axis

研究代表者

檜井 栄一 (Hinoi, Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、褐色脂肪細胞活性化におけるGDF5-Ifrd1経路の重要性を明らかとすることを目的とした。脂肪組織特異的Ifrd1欠損マウスを作製し、表現型解析を行った。通常食条件下では、著明な変化は認められなかった。一方、高脂肪食負荷条件下において、脂肪組織特異的Ifrd1-KOマウスでは、野生型マウスと比較して、内臓脂肪蓄積量の減少と、脂肪組織における褐色脂肪細胞マーカー遺伝子の発現上昇が認められた。以上の結果から、GDF5-Ifrd1シグナルが褐色脂肪細胞活性化および全身エネルギー代謝に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated drastic upregulation of the bone morphogenic protein (BMP)/growth differentiation factor (GDF) family member, GDF5, which is capable of promoting brown adipogenesis, in brown adipose tissue (BAT) of obese mice. Moreover, we have identified that GDF5 activates a transcriptional coactivator/repressor, Interferon-related developmental regulator 1 (Ifrd1), in brown adipose tissue. Here, we show a possible interaction between GDF5-Ifrd1 axis and brown adipogenesis. Ifrd1 deficiency in adipose tissue did not affect body weight, fat mass, glucose tolerance and insulin sensitivity under normal chow condition, along with a trend toward the lower level of fat mass under high fat diet condition. Moreover, expression of brown adipocyte markers including Ucp1 was significantly increased in adipose tissue in adipocyte specific Ifrd1 knockout mice. Together, these findings suggest GDF5-Ifrd1 axis may control brown adipogenesis and energy homeostasis.

研究分野：薬理学

キーワード：肥満 褐色脂肪 転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪組織は脂肪を貯め込む貯蔵庫であるのに対して、褐色脂肪組織は脂肪を分解してエネルギー産生を行う器官であることは周知の事実である。肥満は、遺伝的および環境的要因によるカロリーの過剰な摂取の結果、脂肪の蓄積が増加した状態である。現在、日本では成人男性の約 30%、また成人女性の 20%が肥満者と判断されている。肥満に起因あるいは関連して、糖尿病、高脂血症、高血圧、冠動脈疾患あるいは脳梗塞など、いわゆる生活習慣病の多くの疾患が発症する。すなわち、褐色脂肪活性化は、肥満の抑制だけでなく、その関連疾患をも制御することにつながる。

抗肥満治療薬として、中枢性摂食制御薬の開発が行われているが、抗体産生などの問題により、その開発は難航している。また、末梢性抗肥満薬として、アドレナリン受容体作用薬などの応用が試みられてきたが、現在までにヒトで成功しておらず、現時点で「褐色脂肪細胞活性化による抗肥満治療」のゴールドスタンダードは確立されていない。このような事実を勘案すると、全く新しい観点からの肥満に対する効果的な治療法の確立および治療薬の開発は差し迫った社会的緊急課題である。

2. 研究の目的

ヒトにおいて褐色脂肪組織は成長に伴い退縮し、成人ではその機能はほとんどないと思われていた。しかしながら近年、複数のグループから、成人における褐色脂肪組織の存在とエネルギー代謝におけるその機能的役割が報告され、同組織の重要性にあらためて注目が集まっている。申請者らは、各種遺伝子改変マウスを用いた解析により、TGFβスーパーファミリーのひとつである Growth Differentiation Factor 5 (GDF5) が、「古典的褐色脂肪細胞」および皮下脂肪組織内における「誘導型褐色脂肪細胞 (beige cell/brite cell)」を活性化させることにより、全身エネルギー代謝を調節することを明らかとした (Hinoi et al., *Diabetes* 2013; 特願 2010-241776 号)。一方で申請者らは、白色脂肪細胞の分化・成熟化に影響を与える因子として、転写調節因子である Interferon-related developmental regulator 1 (Ifrd1) を同定した (Nakamura*, Hinoi* et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 2013: *equally contributed)。さらに、脂肪組織特異的 GDF5 発現マウス (*aP2-GDF5* マウス) の皮下脂肪組織に出現する beige cell/brite cell に、Ifrd1 が発現することを見出した。すなわち、GDF5 による褐色脂肪組織活性化に Ifrd1 が重要な役割を果たす可能性が示唆される。

したがって本研究では、遺伝子改変マウスを用いた遺伝学的な解析により、「Ifrd1

を含む転写調節複合体」と全身エネルギー代謝調節および肥満病態発現との関連性について解析し、さらに、GDF5 によるエネルギー代謝調節における Ifrd1 の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、脂肪組織特異的 *Ifrd1-KO* マウスおよび全身性 *Ifrd1-KO* マウスを用いて、全身エネルギー代謝および糖脂質代謝等の表現型を解析し、Ifrd1 の生理学的および病態生理学的役割を検討した。

脂肪細胞特異的 *Ifrd1-KO* マウスの作製

AdipoQ-Cre マウスおよび *aP2-Cre* マウスを用いて、脂肪組織特異的 *Ifrd1-KO* マウス (*AdipoQ-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウス) を作製した。

各種 *Ifrd1-KO* マウスの表現型解析

全身性および組織特異的 *Ifrd1-KO* マウスについて、経時的に体重、血糖値、体温測定を行った。また、一定期間飼育後の同マウスについて、グルコース耐性テストおよびインスリン感受性テストを行い (Lee, Hinoi et al., *Cell* 2007)、耐糖能およびインスリン抵抗性等を野生型マウスと比較した。レプチンやアディポネクチン等のホルモンの血中濃度を測定した。

各種 *Ifrd1-KO* マウスの組織学的解析

全身性および組織特異的 *Ifrd1-KO* マウスの白色脂肪組織と褐色脂肪組織を摘出し、hematoxylin and eosin 染色や uncoupling protein 1 (UCP1) 抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的に野生型マウスと比較検討した (Hinoi et al., *J. Cell Biol.* 2008)。肝臓や筋肉組織においても、組織学的に比較検討した。

各種 *Ifrd1-KO* マウスへの交感神経活性化刺激および高脂肪食負荷とその表現型解析

全身性および細胞特異的 *Ifrd1-KO* マウスに交感神経活性化刺激 ($\beta 3$ アドレナリン受容体アゴニストの投与、低温処置) および高脂肪食負荷を行い、とで測定した種々の項目について解析し、交感神経活性化および肥満発症における Ifrd1 の役割を検討した。

4. 研究成果

AdipoQ-Cre マウス、*aP2-Cre* マウスおよび *Ifrd1-flox* マウスを用いて、脂肪組織特異的 *Ifrd1-KO* マウス (*AdipoQ-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウス) を作製した。そして、各マウスの各臓器からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティング法により Ifrd1 の発現変動を観察した。その結果、*AdipoQ-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre; Ifrd1^{fl/fl}* マウスともに、脂肪組織における Ifrd1 の発現は、*Ifrd1^{fl/fl}* マウスと比

較して著明に低下をしていた。一方、脂肪外の臓器（脳および肝臓等）では、Ifrd1 の発現低下は観察されなかった。ついで、*AdipoQ-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスを用いて、通常食負荷および高脂肪食負荷における表現型解析を行った。通常食負荷条件下において、両マウスは *Ifrd1^{fl/fl}* マウスと比較して、体重、内臓脂肪重量、血糖値、耐糖能、インスリン抵抗性、ホルモン濃度に変化は認められなかった。一方、高脂肪食負荷群においても、*AdipoQ-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスは、*Ifrd1^{fl/fl}* マウスと比較して、血糖値、耐糖能、インスリン抵抗性、ホルモン濃度には変化は認められなかったが、内臓脂肪重量の減少傾向が認められた。さらに脂肪組織における遺伝子発現を real-time PCR 法により確認したところ、*AdipoQ-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスおよび *aP2-Cre;Ifrd1^{fl/fl}* マウスでは、*Ifrd1^{fl/fl}* マウスと比較して、peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α)や UCP1 などの褐色脂肪細胞マーカー遺伝子の有意な発現増加が認められた。

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5件)

Onishi Y., Fukasawa K., Ozaki K., Iezaki T., Yoneda Y., and Hinoi E. (2016): GDF1 is a novel mediator of macrophage infiltration in brown adipose tissue of obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5:216-223. *Corresponding author.(査読有)

Wei J., Shimazu J., Makinistoglu MP., Maurizi A., Kajimura D., Zong H., Takarada T., Iezaki T., Pessin JE., Hinoi E., and Karsenty G. (2015): Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 161:1576-1591. (査読有)

Yamaguchi T., Yoneyama M., Hinoi E., and Ogita K. (2015): Involvement of calpain in 4-hydroxynonenal-induced disruption of gap junction-mediated intercellular communication among fibrocytes in primary cultures derived from the cochlear spiral ligament. *J. Pharmacol. Sci.* 129:127-134. (査読有)

Hinoi E., Iezaki T., Ozaki K., and Yoneda Y. (2014): Nuclear factor- κ B is a common upstream signal for growth differentiation factor-5 expression in brown adipocytes exposed to

pro-inflammatory cytokines and palmitate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452:974-979. (査読有)

Hinoi E., Iezaki T., Fujita H., Watanabe T., Odaka Y., Ozaki K., and Yoneda Y. (2014): PI3K/Akt is involved in brown adipogenesis mediated by growth differentiation factor-5 in association with activation of the Smad pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50:255-260. (査読有)

[学会発表](計2件)

大西勇気、岡本舞香、尾崎翔、深澤和也、米田幸雄、金田勝幸、杉浦実、檜井栄一「 α -クリプトキサンチン摂取による破骨細胞活性化抑制を介した閉経後骨粗鬆症の予防効果」『日本薬学会第136年会』2016年3月27日、パシフィコ横浜(神奈川県)

家崎高志、深澤和也、尾崎翔、大西勇気、米田幸雄、金田勝幸、檜井栄一「破骨細胞機能および骨吸収における転写調節因子 Ifrd1 の役割」『第128回日本薬理学会近畿部会』2015年11月20日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

[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1件)

名称：幹細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導促進剤
発明者：檜井栄一、米田幸雄、高田紗矢、中村由香里、橋詰翔太
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：特許第5822189号
取得年月日：平成27年10月16日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/yakuri.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

檜井 栄一 (HINOI Eiichi)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：70360865

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

櫻井 武 (SAKURAI Takeshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60251055