

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870401

研究課題名(和文) エイコサペンタエン酸によるGPR120を介したベージュ細胞誘導効果の研究

研究課題名(英文) Eicosapentaenoic acid for browning effect through GPR120

研究代表者

大野 晴也 (Haruya, Ohno)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：60725894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エイコサペンタエン酸の受容体であるGPR120が褐色脂肪細胞機能に与える影響について検討した。培養褐色脂肪細胞にGPR120アゴニストであるGW9508を投与すると、Ucp-1などの褐色脂肪細胞特異的遺伝子群の上昇を認め、GPR120のノックダウンやMEK1/2阻害薬によりその上昇は解除された。エイコサペンタエン酸はGPR120およびMAPK経路を介して褐色脂肪細胞を活性化させている可能性が考えられた。また、褐色細胞腫患者における腎周囲脂肪組織の特徴を検討したところ、ヒト褐色脂肪細胞の誘導にヒストン修飾酵素であるEHMT1が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of Eicosapentaenoic acid on brown fat functions through one of its receptor, GPR120. GW9508, a specific GPR120 agonist, elevated brown fat specific genes including Ucp-1 in brown adipocytes. Knockdown of GPR120 or addition of MEK1/2 inhibitors canceled the activating effect of GW9508. Eicosapentaenoic acid might activate brown adipocytes through the GPR120 and MAPK pathway. Morphological and gene expression analyses in perirenal adipose tissue in pheochromocytoma patients revealed that EHMT1, a histon methyltransferase, might play an important role for developing brown adipocytes in adult human.

研究分野：代謝

キーワード：褐色脂肪細胞 ベージュ脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 褐色脂肪細胞は細胞特異的な UCP1 (uncoupling protein 1) というタンパクを通じてエネルギーを熱として放出する機能を有している。以前は胎児やげっ歯類など小動物にのみ存在するとされていた褐色脂肪細胞だが、最近の研究で成人にも活性のある褐色脂肪細胞が存在することが判明した。さらにヒト褐色脂肪細胞は、寒冷刺激などの環境刺激で白色脂肪組織中に誘導されるタイプの「ベージュ細胞」であることも知られるようになってきている。このベージュ細胞は成人後にも外部刺激により形成誘導が可能であり、従来から知られている褐色脂肪細胞と同様にエネルギー代謝を亢進させる特徴を有しているため、ヒト成人においてこのベージュ細胞を誘導し基礎代謝を増加させることで、糖尿病や肥満症の治療の応用へと繋がっていくことが大きく期待されている。

一方で、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) はマウスにおいては抗肥満作用や抗糖尿病効果が示されており、その受容体として G タンパク共役型受容体 (G protein-coupled receptors; GPCR) である GPR120 が近年同定された (Oh D.Y. et al. Cell 142: 687-698, 2010)。さらに GPR120 の機能低下により、基礎代謝量低下に伴い肥満や糖尿病を惹起することが報告された (Ichimura A. et al. Nature, 483, 350-354, 2012)。しかし、EPA による体重減少効果や、逆に GPR120 機能欠失に伴う基礎代謝量の低下および肥満発症の詳細なメカニズムは不明である。

(2) 研究代表者らは、褐色脂肪細胞の分化制御においてヒストン修飾酵素である EHMT1 (Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1) が必須であることを明らかにしてきた (Ohno H. et al Nature. 504, 163-167: 2013)。ヒトにおいて EHMT1 変異により小児期の肥満を呈することが知られているが、EHMT1 のヒト褐色脂肪細胞形成や機能に与える影響については全く知られていない。

2. 研究の目的

(1) GPR120 がベージュ細胞形成に与える影響、および褐色脂肪細胞機能に与える効果とその機序を明らかにする。

(2) ヒト褐色脂肪細胞形成における EHMT1 の役割を検討する

3. 研究の方法

(1)

褐色脂肪細胞株を常法に従い分化させて、分化過程における *Gpr120* の経時的発現変化 (分化前, 分化3日後, 分化5日後) について定量 PCR 法を用いて検討する。

鼠径部より採取した初代培養白色脂肪細胞を常法に従って脂肪細胞へと分化させる。その分化過程において GPR120 アゴニストである GW9508 (GW) を添加し、分化後の褐色脂肪細胞特異的遺伝子群を定量 PCR 法にて評価する。

GW の短期的な効果を検討するため、十分に分化させた褐色脂肪細胞に GW を添加し、4 時間後の熱産生関連遺伝子の変化を検討する。さらに、3 アゴニストである forskolin (FSK) の添加も行い、GW との効果の違いや相互作用も検討する。

siRNA を用いて GPR120 のノックダウンを行った後に褐色脂肪細胞へと分化させ、GW の添加を行い、熱産生関連遺伝子群の変化を検討する。

褐色脂肪細胞に GW 添加を行い、その遺伝子変化に関してマイクロアレイを用いて網羅的に検討する。

(2) カテコラミンを持続的に産生する腫瘍である褐色細胞腫患者においては、高カテコラミン血症に伴い褐色脂肪組織が活性化している。そこで褐色細胞腫患者 (PHE0: 11 名) と非機能性副腎腫患者 (NF: 7 名) において、腹腔鏡下副腎摘出術施行時に腎周囲の脂肪組織も採取し、その遺伝子発現の変化や組織学的特色を検討する。

4. 研究成果

(1) 褐色脂肪細胞の分化過程における *Gpr120* の発現は、分化日数に伴い増加し、*Ucp1* などの褐色脂肪細胞特異的遺伝子の発現パターンと同じ動きを示した (図 1)。

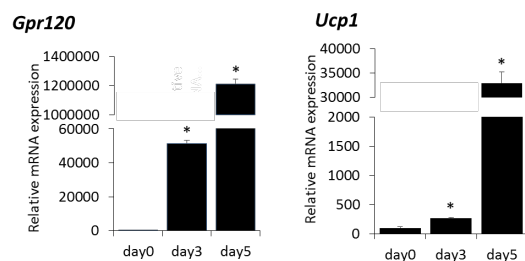


図 1 褐色脂肪細胞の分化過程における *Gpr120* の発現変化 (* $p < 0.05$: day0 と比較)

次に GPR120 がベージュ化に与える影響を検討するために、初代白色脂肪細胞の分化過程において、GW による持続的な刺激を加えた GW 添加によりベージュ化の促進を期待したが、予想に反して GW によって脂肪細胞の分化そのものが抑制されてしまう結果となった。GPR120 受容体の慢性刺激に伴い、脂肪分解そのものが促進してしまうと考えられ、この現象は、動物モデルにおいてベージュ化を促進する 3 アゴニスト投与が、細胞への投与により脂肪分解を来すため、そのベージュ化作用を細胞レベルで再現することが困難

であることと近似していた。3 アゴニストを褐色脂肪細胞へ加えることで、*Ucp1* などの褐色脂肪細胞特異的遺伝子が活性化されることが知られている。

そこで、十分に分化した褐色脂肪細胞に GW を加え、その急性期の効果を検討したところ、GW 添加により4時間後の *Ucp1* の上昇を認め、また3アゴニストである FSK との相乗効果も認めた(図2)。

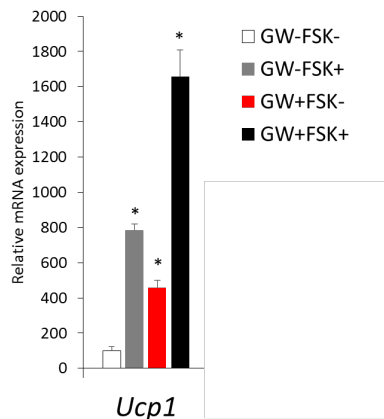


図2 GW 投与に伴う熱産生遺伝子の増加 (* $p < 0.05$: GW-, FSK- と比較)

GW 添加に伴う熱産生遺伝子増加における GPR120 の関与を検討するため、siRNA を用いて GPR120 のノックダウンを行った後に、GW 添加を行った。GPR120 のノックダウンにより GW 誘導性の *Ucp1* の増加は認められなくなり、GPR120 を介した熱産生遺伝子の誘導が考えられた。

GW による褐色脂肪細胞の活性化機序を詳細に検討する目的で GW 添加後の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に検討したところ、褐色脂肪細胞特異的遺伝子群の上昇を認め、またパスウェイ解析により MAPK カスケード関連遺伝子群の変化を認めた。そこで MEK1/2 阻害薬である PD184161 を添加し遺伝子変化を検討したところ褐色脂肪細胞特異的遺伝子群の上昇を認めなくなった(図3)。GPR120 は MAPK 経路を介して褐色脂肪細胞を活性化させている可能性が考えられた。

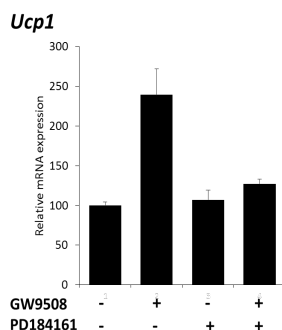


図3 .GW は MEK1/2 経路を介して熱産生遺伝子の発現を制御している

(2) 褐色細胞腫患者(PHEO)と非機能性副腎腺腫患者(NF)での腎周囲の脂肪組織における *UCP1* の発現レベルの検討、および組織学的検討により、PHEO においてより褐色脂肪細胞が誘導されていることが明らかとなった(図4)。

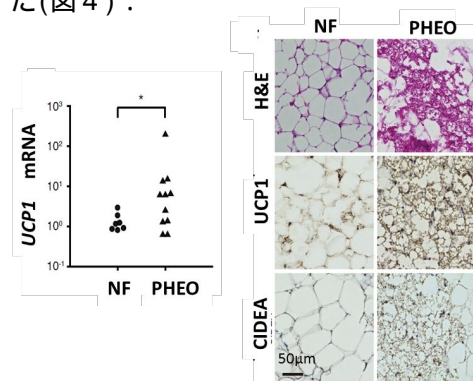


図4 ヒト成人における腎周囲部の脂肪組織において持続的なカテコラミン刺激で褐色脂肪細胞が誘導される

またさらにこの褐色細胞誘導と *EHMT1* の発現レベルとの相関を検討すると、*EHMT1* の発現増加に伴い、*UCP1* などの褐色脂肪細胞特異的遺伝子群の発現が上昇しており、ヒト成人においても *EHMT1* が褐色脂肪細胞の誘導に関与している可能性が考えられた(図5)。

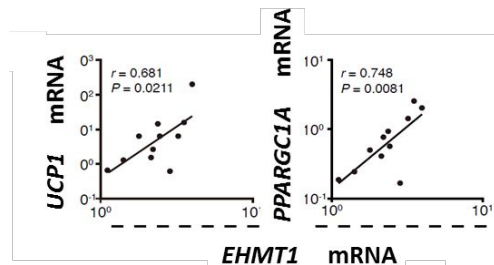


図5 *EHMT1* の発現は褐色脂肪細胞特異的遺伝子群の発現レベルと相関している。

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)

1. Nagano G, Ohno H, Oki K, Kobuke K, Shiwa T, Yoneda M, Kohno N: Activation of Classical Brown Adipocytes in the Adult Human Perirenal Depot Is Highly Correlated with PRDM16-EHMT1 Complex Expression. *PLoS One*. 10(3): e0122584, 2015. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 森田好美, 大野晴也, 長野学, 米田真康. GPR120 agonist は褐色脂肪細胞における熱産生遺伝子の発現を上昇させる. 第

- 36 回日本肥満学会. 2015/10/2-3, 名古屋国際会議場(名古屋), 日本
2. 長野学, 大野晴也, 森田好美, 米田真康. メチル基供与体合成酵素 MATII は褐色脂肪細胞熱産生能を制御する. 第 36 回日本肥満学会. 2015/10/2-3 名古屋国際会議場(名古屋), 日本
 3. 大野晴也. EHMT1 による褐色脂肪細胞の分化と熱産生能の制御. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015/5/21-24 海峽メッセ下関(下関), 日本
 4. 長野学, 大野晴也, 森田好美, 沖健司, 米田 真康. ヒト腎周囲の古典的褐色脂肪細胞は PRDM16/EHMT1 依存的に再誘導される. 第 35 回日本肥満学会, 2014/10/24 シーガイアコンベンションセンター(宮崎), 日本
 5. G. Nagano, H. Ohno, T. Shiwa, K. Oki, M. Yoneda. EHMT1 and the stimulation with elevated catecholamines can reinduce the perirenal brown adipocytes possessing classical features in adult humans. 50th EASD Annual Meeting. 2014.9.15-2014.9.19. ウィーン, オーストリア

〔図書〕(計 2 件)

1. 大野晴也(分担) メディカルビュー社, Diabetes Frontier 「褐色脂肪細胞の分化とインスリン感受性制御」, 2015 年 342-346
2. 大野晴也, 梶村真吾(分担) 医歯薬出版株式会社, 医学のあゆみ 「褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の由来」 2015 年 811-815

〔産業財産権〕

特記事項なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 晴也 (OHNO HARUYA)

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院
助教

研究者番号: 60725894

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし