

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07846

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞分化を誘導する分泌タンパク質Creg1の作用機序と生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological role of Creg1 on brown adipogenesis

研究代表者

山下 均 (YAMASHITA, Hitoshi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：20342967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞はエネルギーを消費して熱産生を行う特殊な細胞であり、その減少は肥満やメタボの進展と相関することから、褐色脂肪細胞の分化誘導機構の解明が求められている。本研究では、新規に見出されたCreg1の褐色脂肪細胞分化誘導メカニズムとその生理的役割について検討した。培養細胞を用いた解析から、Creg1はIGF2受容体に結合することやUcp1の転写を促進することが明らかとなった。また、脂肪組織特異的Creg1-Tgマウスの解析から、Creg1は生体内においても脂肪組織の褐色脂肪化を誘導し、エネルギー代謝を促進することにより肥満の進展を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes play a specific role for heat production by dissipating caloric energy, contributing to body temperature and weight regulation; however, the mechanism of brown adipogenesis remains to be fully understood. We recently found that cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (Creg1) is a novel regulator of brown adipogenesis. In the present study, we investigated the action mechanism of Creg1 and its physiological role. As the results, we found that Creg1 binds to IGF2R and stimulated Ucp1 transcription in vitro. In addition, we created aP2-Creg1-Tg mice, in which brown/beige adipogenesis was prominent in adipose tissues compared to wild-type mice. These results suggested that Creg1 acts as a transcriptional regulator for brown adipogenesis through autocrine/paracrine mechanism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：褐色脂肪細胞 Creg1 肥満

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脂肪細胞には、中性脂肪としてエネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞と、中性脂肪を利用して熱をつくり体温調節に寄与する褐色脂肪細胞が存在する。褐色脂肪細胞は熱産生により余剰エネルギーを熱として消費することから、肥満や糖尿病とも関連して興味もたれてきた。申請者らは褐色脂肪細胞における熱産生の中心分子であるミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP1) 欠損マウスを作製し (*Nature* 387: 90-94, 1997)、このマウスが加齢と共に食事誘導性肥満となることを報告した (*Aging Cell* 4: 147-155, 2005)。また近年、ヒト褐色脂肪細胞に関する知見が蓄積し褐色脂肪細胞の加齢による減少とメタボリックシンドロームの進展が逆相関することが明らかとなったことから (*N Engl J Med* 360: 1509-1517, 2009)、褐色脂肪細胞を増やすための分化誘導法の開発に世界的な注目が集まっている (科学技術動向 2009 年 6 月号)。最近の研究から、褐色脂肪細胞の分化を制御する PRDM16 や Ehmt1 などの様々な転写調節因子 (*Cell Metab* 19: 593-604, 2014) が明らかとなっている。褐色脂肪細胞の分化を促進する内分泌因子としては、古くからノルエピネフリンや甲状腺ホルモン T3 が知られている。その作用としてノルエピネフリンは 3 アドレナリン受容体を介して PKA 及び CREB 活性化により、また T3 は核内受容体である甲状腺ホルモン受容体のリガンドとして UCP1 の転写を促進する。最近新たな促進因子として Natriuretic peptides、BMP7、Irisin、FGF21 などのペプチドホルモンや増殖因子が褐色脂肪細胞の分化に関連することが報告されている (*Cell Metab* 17: 1-6, 2013.)。

一方、申請者は UCP1 欠損マウスを利用した先行研究において白色脂肪組織の褐色脂肪化に関連する遺伝子群を解析し、その中から褐色脂肪化に伴い発現が上昇する転写調

節関連遺伝子として Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (Creg1) を見出した。Creg1 遺伝子産物は分子量 24,000 の分泌糖タンパク質であり Rb などの転写因子との相互作用により細胞増殖や分化の制御に関与すること、分泌タンパク質としてマンノース-6-リン酸/インスリン様増殖因子 2 型受容体 (M6P/IGF2R) に作用することなどが報告されている。しかし、Creg1 に関する報告は少なく、褐色脂肪細胞分化における機能や役割については全く分かっていなかった。このような状況において申請者は、Creg1 は寒冷刺激などに応答して褐色脂肪細胞が産生分泌し、オートクリン/パラクリン作用により未分化前駆細胞の褐色脂肪細胞への分化誘導を促進する新規内分泌因子との仮説の下に本研究を推進することとした。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞は中性脂肪を燃焼して熱を産生する特殊な細胞であり、加齢と共に減少することが肥満やメタボ発症の原因となることが明らかとなってきた。現在、画期的なメタボ予防/治療法として褐色脂肪細胞を誘導する方法の開発に注目が集まっている。申請者は、褐色脂肪細胞の分化誘導が強力に促進されるマウスの先行研究において、その分化誘導に関連する新規内分泌因子 Creg1 を見出した。本研究では、褐色脂肪細胞培養系を用いて Creg1 の作用メカニズムを明らかにするとともに、独自に開発した脂肪組織特異的 Creg1-Tg マウスを用いて Creg1 の生理的役割ならびに肥満や糖尿病などのメタボ病態に対する改善作用を検証し、メタボ予防/治療のための褐色脂肪細胞誘導剤としての Creg1 の有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CREG1 タンパク質の調製

CREG1 の C 末に Myc 及び His タグを結合した

CREG1-MH を産生する cDNA を Cos7 細胞に導入し、培養液中に分泌された CREG1-MH を各種クロマトグラフィーにより精製した。

(2) CREG1 結合タンパク質の同定

常法によりコンフルエントまで増殖した C3H10 細胞から細胞抽出液を調製し、CREG1-MH を結合した Ni カラムにチャージした。カラムを洗浄後、イミダゾール溶液により CREG1 に結合したタンパク質を溶出した。回収した溶出液を用いてウエスタンブロッティングを行い CREG1 結合タンパク質の同定を試みた。

(3) 遺伝子ノックダウン実験

市販の RNA 発現抑制 (RNAi) 試薬を用いて IGF2R をノックダウンし C3H10 細胞における分化への影響を検討した。褐色脂肪細胞への分化の評価は、培養細胞から抽出した total RNA を用いて cDNA を合成し、定量的 PCR 法により UCP1 などの遺伝子発現を指標として評価した。

(4) Ucp1 レポーターアッセイ

Ucp1 遺伝子上流 4.3kb を含むプロモーターを組んだレポーターベクターを作製し、Creg1 発現プラスミドと共に Cos7 細胞に導入して Ucp1 の転写に対する CREG1 の作用を検討した。

(5) 動物実験

脂肪組織特異的 Creg1 発現トランスジェニック (Creg1-Tg) マウスを作製し、C57BL/6 への戻し交配を繰り返して最終的に CREG1 低発現と高発現ラインを樹立した。マウスは 9 週齢から高脂肪食で飼育し、各種実験に用いた。代謝量はオキシマックスを用いて行った。また、食事誘導性肥満を誘導した C57BL/6 マウスに対して、皮下埋込み型ポンプを用いて精製 Creg1 タンパク質を投与し 2 週間後に組織を採取し遺伝子発現などを解析した。

尚、本研究計画に関わる全ての遺伝子組み換え実験及び動物実験は、当該研究施設の組換え DNA 実験安全委員会および実験動物倫理

委員会による審査を受け、承認を得られた上で行った。

4. 研究成果

(1) Creg1 の作用メカニズムの検討

Creg1 の褐色脂肪化促進の作用メカニズムを明らかにするために培養細胞を用いた実験を行った。まず、従来報告では分泌タンパク質である Creg1 は IGF2R を介して作用する可能性が示唆されてきた。そこで組換え CREG1 タンパク質を固定化したカラムに C3H10 細胞抽出液をチャージし、CREG1 と相互作用するタンパク質の解析を行った。結果として、CREG1 と IGF2R の結合を確認したが、同様に報告されている Rb タンパク質との結合を検出することはできなかった。CREG1 と Rb との結合は免疫沈降実験においても確認できなかった。次に、siRNA 実験を行った結果、IGF2R をノックダウンすると C3H10 細胞の褐色脂肪化が阻害され Ucp1 の発現が大きく低下することが明らかとなった。Creg1 と Rb との相互作用を確認できなかったが、我々は Creg1 の Ucp1 発現に対する作用について Ucp1 プロモーターを用いたレポーター解析により検討した。面白いことに、Ucp1 プロモーター活性は Creg1 発現誘導により有意に上昇することが明らかとなった。さらに、Creg1 による褐色脂肪化促進と共に褐色脂肪細胞やベージュ細胞の分化に関わることが報告されている Fgf21 の発現が有意に上昇することが明らかとなった (論文投稿中)。以上の結果から、細胞培養系において CREG1 は IGF2R と相互作用する。IGF2R は褐色脂肪化に必須の分子である。CREG1 は Ucp1 の転写を促進する。Creg1 は Fgf21 の発現を促進する、ことが示された。Creg1 が IGF2R を介してどのような経路で Ucp1 の転写を制御するか今後さらに検討を行っていく。

(2) Creg1 の生理的、病理的役割の検討
Creg1-Tg マウスを用いた研究において、Tg

マウスの戻し交配と表現型解析を行い、Creg1 低発現ラインと高発現ラインの樹立に成功した。これら2つのTgラインに対して2~3ヶ月齢から高脂肪食を投与した結果、野生型マウスに比べて摂食量に差はないが体重増加が有意に抑制され、Tg マウスは食事誘導性肥満に対して耐性を示すことが明らかとなった。脂肪組織の解析から、Tgマウスの褐色脂肪組織におけるUCP1タンパク質量が上昇し、白色脂肪組織の褐色脂肪化も確認された。さらに、3アドレナリン受容体活性化剤の投与により酸素消費量の上昇が認められたことから、Tg マウスでは褐色脂肪組織のエネルギー代謝容量の増加が示唆された。また、Tg マウスでは肥満に伴う脂肪肝や耐糖能の増悪が抑制された(論文投稿中)。

CREG1 の肥満病態に対する予防改善効果をさらに検証するために、精製 CREG1 を皮下埋込型浸透圧ポンプにより食事誘導性肥満マウスに1ヶ月間投与する実験を行った。その結果、CREG1 投与群において一部の皮下白色脂肪組織の褐色化と褐色脂肪組織におけるUCP1 発現レベルの上昇が確認された。また、Tg マウスの実験と同様に、コントロール群に比べて CREG1 投与群では体重増加が抑制され、脂肪肝や耐糖能の増悪が抑制された(論文投稿中)。

以上の結果から、CREG1 は生体内においてもオートクリン/パラクリン作用により褐色脂肪細胞の分化を誘導し、エネルギー代謝を亢進することにより、肥満やその関連病態の予防改善に働く新規内分泌因子であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

(1)橋本 理尋, 楠堂 達也, 竹内 環, 遠藤 優貴, 山下 均「脂肪組織特異的 CREG1 トランスジェニックマウスを利用した褐色脂肪

化促進と生活習慣病改善の検討」

BIOMEDICAL GERONTOLOGY 40(3), 35-38 (2016)

(査読有)

〔学会発表〕(計 9件)

(1) 橋本理尋、楠堂達也、竹内環、山下 均：生体内における CREG1 の褐色脂肪化促進作用の検討。第40回日本分子生物学会・第90回日本生化学会大会合同大会、2017年

(2) 楠堂達也、橋本理尋、竹内環、片岡直也、山下 均：白色脂肪組織の褐色脂肪化における CREG1 の役割。平成29年度温熱生理研究会、2017年

(3) HASHIMOTO M, KUSUDO T, TAKEUCHI T, OHMI Y, YAMASHITA H. Study of pathophysiological role of CREG1 protein using aP2-CREG1 transgenic mice. 第40回日本基礎老化学会大会、2017年

(4) 遠藤優貴、橋本理尋、竹内環、楠堂達也、岡田只士、山下 均：CREG1の抗肥満作用に対する環境温度の影響について。第39回日本分子生物学会、2016年

(5) 楠堂達也、橋本理尋、竹内環、片岡直也、山下均：新規な褐色脂肪化誘導因子・分泌糖タンパク質 CREG1。平成28年度温熱生理研究会、2016年

(6) 橋本 理尋、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、山下 均：脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスによる褐色脂肪化と生活習慣病改善の検討。第39回日本基礎老化学会大会、2016年

(7) 岡田 只士、楠堂 達也、竹内 環、遠藤 優貴、橋本理尋、西沢祐治、山下 均：個体レベルにおける分泌型糖タンパク質 CREG1 の作用。第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年

(8) 楠堂 達也、片岡 直也、橋本 理尋、岡田 只士、山下 均：褐色脂肪化における分泌糖タンパク質 CREG1 の作用の検討。第36回日本肥満学会、2015年

(9) 楠堂 達也、遠藤優貴、片岡 直也、橋本理尋、岡田 只士、山下 均：分泌型糖タンバ

ク質 CREG1 の褐色脂肪化作用. 第 20 回アデ
イポサイエンス・シンポジウム、2015 年

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.chubu.ac.jp/about/faculty/p
rofile/00c58411b9436c50b3506ad5466a895e
79d608cb.html](https://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/00c58411b9436c50b3506ad5466a895e79d608cb.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 均 (YAMASHITA, Hitoshi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：20342967

(2) 連携研究者

楠堂 達也 (KUSUDO, Tatsuya)
帝塚山学院大学・人間科学部・准教授
研究者番号：00460535

(3) 研究協力者

橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)
竹内 環 (TAKEUCHI, Tamaki)
岡田 只士 (OKADA, Tadashi)
遠藤 優貴 (ENDO, Yuki)