

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K09386

研究課題名(和文)血管新生抑制因子THBS1の白色脂肪細胞褐色化における意義

研究課題名(英文)Significance of angiogenesis inhibitor THBS1 in white adipocyte browning

研究代表者

井上 真由美 (INOUE, MAYUMI)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：80512079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、褐色脂肪細胞様の組織が成人にも存在し、その全身のエネルギー消費への影響が示唆されている。我々は血管新生抑制因子THBS1のKOマウスの白色脂肪組織に褐色細胞様変化が見られることを発見した。さらに脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸に対するTHBS1の役割の検討を行ったところ、THBS1KOあるいはKD細胞ではミトコンドリア呼吸は上昇していた。THBS1KOマウスではWTマウスに比べて脂肪組織における毛細血管が増加していた。これらは白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を強く示唆する。さらに我々は、これらの動物実験で得られた結果をヒトで実証するために検診で得られた臨床データをもとに検証を始めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
食事量が同じでも、太る人と太らない人がいる。また、太っていてもメタボリックシンドロームになる人と、ならない人がいる。それらの疑問の一つの答えの解明、また、適正体重の維持、また例え太っても致命的な疾患に至らないための方法の一つを解明しつつある。また主に動物で証明してきた事柄をヒトで実証することによりさらに本質的な病態の解明にせまる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, brown adipocytes-like tissue is also present in adults, and its effect on the energy consumption of the whole body has been suggested. We found that brown cell-like changes were seen in the white adipose tissue of KO mice of angiogenesis inhibitor THBS1. Furthermore, mitochondrial respiration in adipocytes was elevated in THBS1KO or KD cells. THBS1KO mice capillaries in adipose tissue was increased compared to WT mice. These results strongly suggest the browning change of white adipocytes. In addition, we began to verify based on clinical data obtained by the examination to demonstrate the results obtained in these animal experiments in humans.

研究分野：代謝内科学

キーワード：肥満 ECM THBS1 褐色脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞 (Brown fat) は、従来、げっ歯類やヒトでは胎児にのみ存在し、その体温の維持に関わることが知られていた。しかし近年、褐色脂肪細胞様の組織が成人にも存在し、また、通常の白色脂肪組織の中にも“褐色細胞様(Brownish=Beige)”の構造が存在することが発見され、その全身の代謝への影響が示唆されている (Cypress et al., *N Engl J Med*; Wu et al., *Cell*)。褐色脂肪細胞はミトコンドリアを多く含み、細胞呼吸つまりエネルギーの代謝が白色細胞より活発であり、このエネルギー消費の大きな組織が体内に多く存在すると、同量のエネルギーを摂取しても肥満を呈しにくい状態になることが期待できる。最近いくつかの研究がその褐色脂肪細胞の分化や、白色脂肪細胞の褐色化(Brown 化)の機序について発表されているがその全体像についてはまだ明らかになってはいない (Tseng et al., *Nature*; Schulz et al., *Nature*)。

褐色脂肪細胞は細胞あたりのミトコンドリア数が多く、代謝が活発ゆえ、多くの酸素やブドウ糖、脂肪酸を必要とする。そのため、多くの血流を必要とし、毛細血管密度が非常に高いことが特徴的である。その名のとおり褐色を呈しているのは豊富な血流のためと言われる。THBS1 はこれまで主に血管新生抑制効果が注目され、臨床的には癌に対する抑制効果を期待して THBS1 のアナログペプチドを用いた臨床試験も行われた。興味深いことにそのペプチドの副作用として高血糖が見られたが (Ebbinghaus et al., *Clin Cancer Res*; Gordon et al., *Cancer*)、その機序は明らかではなかった。

また、近年、肥満患者の白色脂肪組織および血液中の THBS1 濃度が体脂肪率や耐糖能異常の度合いと比例して上昇していることが報告され (Varma et al., *Diabetes*)、我々はそれらの点に注目して *Thbs1* ノックアウト (*Thbs1* KO) マウスを用いた検討を行った。

Thbs1 KO マウスは高脂肪食を与えた場合、摂食量が同じにもかかわらず体重増加が野生型に比べ有意に抑制され、脂肪組織の増大も抑制された。体重増加に伴い野生型マウスはインスリン反応性が低下するが、*Thbs1* KO マウスはインスリン反応性を維持していた (Inoue et al., *Endocrinology*)。そして興味深いことに、*Thbs1* KO マウスの皮下脂肪組織は野生型のそれらに比べて、大きさが小さいだけでなく細胞質優位で脂肪滴が小さく褐色脂肪組織様の特徴を示した。褐色脂肪組織に多く発現する UCP1 の発現を免疫染色で調べたところ、野生型の皮下脂肪組織では発現が同定できなかったが、*Thbs1* KO マウスでは皮下 (白色) 脂肪組織の特異的な構造部に一致して UCP1 が多く発現していることがわかった。また、*Thbs1* KO マウスの皮下脂肪組織では RNA レベルでもミトコンドリア関連遺伝子の発現が亢進していた。

代謝ケージ (CLAMS) を用いた測定では、野生型に比べて *Thbs1* KO マウスはその全身の酸素消費が亢進していた。また、細胞レベルでも野生型の脂肪細胞に比べて *Thbs1* KO マウス由来の脂肪細胞のほうがミトコンドリアによる細胞呼吸が亢進しており、褐色脂肪細胞に近い形質を獲得している可能性が示されつつあった。これら結果は、THBS1 の有無が白色脂肪組織の褐色化にかかわる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

近年、褐色脂肪細胞様の組織が成人にも存在し、その全身のエネルギー消費への影響が示唆されている。最近我々は血管新生抑制因子 THBS1 の KO マウスの白色脂肪組織に褐色細胞様変化が見られることを発見した。そのメカニズムを明らかにするために以下のことを検討する。

- (1) 脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸に対する THBS1 の役割の検討
- (2) 脂肪組織での血管新生における THBS1 の意義の解析
- (3) THBS1 をはじめとする ECM のヒトの肥満、代謝疾患における意義の検討

以上のことを検討し、血管新生抑制因子 THBS1 をターゲットとした肥満および糖尿病の治療を開発することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸に対する THBS1 の役割の検討
細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XF analyzer) を用いて、脂肪細胞でのミトコンド

リアによる呼吸を測定する。野生型の細胞の *Thbs1* を RNAi を用いてノックダウンし、同様の形質が再現できるか、また精製した THBS1 タンパクやペプチドを野生型細胞に添加することで、細胞あたりのミトコンドリア呼吸の変化がみられるかを検討する。

(2) 脂肪組織での血管新生における THBS1 の意義の解析

これまで *Thbs1*KO マウスなどを用いた脂肪組織での毛細血管を観察し蓄積してきたデータをもとに解析する。さらに野生型と *Thbs1*KO マウスの脂肪組織における血管内皮細胞特異的遺伝子の発現を定量的 PCR で検討し、タンパクレベルでは内皮細胞特異抗体で標識して免疫組織染色およびフローサイトメトリーを用いて定量化して検討する。

(3) THBS1 をはじめとする ECM のヒトの肥満、代謝疾患における意義の検討

我々が動物実験であきらかにしてきた THBS1 という細胞外マトリックスの肥満や耐糖能異常における役割を、今度はさらにヒトの病態の中であきらかにするため、京都大学先制医療・生活習慣病研究センターの任意検診受診者 4500 名のデータ、血液検体を用い、ヒトにおける THBS1 などの細胞外マトリックスの意義を検討する。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸に対する THBS1 の役割の検討

我々は、*Thbs1*KO マウスの脂肪組織において、ミトコンドリア活性が亢進し、エネルギー消費が増大していわゆる白色脂肪組織の“Brown/Beige 化”が起こっていると仮定した。我々は、**細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XF analyzer)** を用いて、マウス由来の脂肪細胞でのミトコンドリアによる呼吸を測定し、*Thbs1*KO マウス由来の脂肪細胞が野生型に比べて細胞あたりのミトコンドリア呼吸が増強していることを見出している。一方、この実験系を *in vitro* の系で *Thbs1*KD 系を用いて行い、アナログペプチドの添加実験を行ったが有意差は得られなかった。この結果については今後の検討を要する。

(2) 脂肪組織での血管新生における THBS1 の意義の解析

これまで *Thbs1*KO マウスなどを用いた脂肪組織での毛細血管を観察し蓄積してきたデータをもとに解析を行ったところ、明らかに KO マウスで脂肪組織での毛細血管の増加が見られることが確認された。その後 *in vitro* の系でこの形質の再現を行うべく 3 次元細胞培養による co-culture などのアッセイ系を確立しつつある。

また *Thbs1*KO マウスと野生型の脂肪組織および *in vitro* の系で *Thbs1*KD 細胞とコントロール細胞における血管内皮細胞特異的遺伝子の発現を定量的 PCR で検討したところ、*Thbs1* 発現量と血管関連遺伝子発現量は相関を示した。現在さらに詳しく検討中である。

また 1) と 2) のメカニズムをあきらかにするため、*Thbs1*KD 細胞における遺伝子発現を正常細胞と比較し、その違いからメカニズムを説明できる遺伝子候補をいくつか見出し、現在それらの解析を進めているところである。

(3) THBS1 をはじめとする ECM のヒトの肥満、代謝疾患における意義の検討

京都大学医学部附属病院先制医療・生活習慣病研究センターの任意検診受診者のデータを用いて臨床研究を開始している。受診者の BMI や InBody による体組成、内臓脂肪面積、血液検査結果、骨密度、腹部エコー、内視鏡検査結果などをデータベース化し解析をしている。また同意を得て収集した血液検体を用いて THBS1 をはじめとする細胞外マトリックスの測定をできるようにセットアップした。画像診断では全身の MRI 検査、FDG-PET-CT 検査を行っており、それらの画像から成人検診受診者の褐色脂肪組織の同定を試みており、興味深い結果を得ている。これらは本研究の次のステップへの礎となるものであり、データ蓄積を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----