

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23745

研究課題名(和文)加齢による褐色脂肪細胞の減少メカニズムの解明

研究課題名(英文)The study of mechanism how brown adipocytes decrease by aging

研究代表者

池田 賢司(Ikeda, Kenji)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30846944

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):褐色脂肪細胞は熱を産生し、エネルギー消費量を増やすことで抗肥満作用を示し全身の糖代謝・脂質代謝を制御する。加齢により褐色脂肪細胞が減少することが知られており、褐色脂肪細胞の減少は肥満と糖代謝異常に関連することが示唆されている。加齢に伴い褐色脂肪細胞の前駆細胞の増殖が低下することが報告されているが、その機序の多くは不明である。本研究では褐色脂肪細胞減少-再生マウスモデルを用いて褐色脂肪細胞の再生メカニズム解析に取り組みました。また、本研究ではシングルセル解析を用いた褐色脂肪細胞、前駆細胞の解析系に取り組み、褐色脂肪細胞の再生メカニズムの解明に結びつく手法を開発しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪細胞は余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積する白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が知られています。褐色脂肪細胞は熱を産生し、エネルギー消費量を増やすため肥満症や糖尿病治療への治療応用が期待されています。一方、加齢によって褐色脂肪細胞がヒトやマウスにおいて減少することが知られており、褐色脂肪細胞の減少は肥満や糖代謝異常に関連することが示唆されていますが、そのしくみは明らかになっておりません。本研究では、褐色脂肪細胞を一細胞毎に分析するための解析方法を開発しました。本研究成果が褐色脂肪細胞の再生メカニズムの解明に結びつき、肥満症や糖尿病の新しい治療に結びつくことが期待されます。

研究成果の概要(英文):Brown adipocytes dissipate energy as heat. And more, brown adipocytes increase energy expenditure and regulate glucose homeostasis and lipid metabolism systemically. Aging condition reduced brown adipocytes amount inhibits the induction of beige adipocytes. Still, how cell senescence regulates the differentiation of beige adipocytes remains incompletely understood. In this study, we developed a brown adipocytes-reduce-recovery model to investigate the mechanism of the regeneration process in brown adipocytes. Moreover, we developed a single-cell analysis in adipose tissue.

研究分野：熱産生脂肪

キーワード：褐色脂肪細胞 熱産生脂肪 褐色脂肪細胞の再生 シングルセル解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

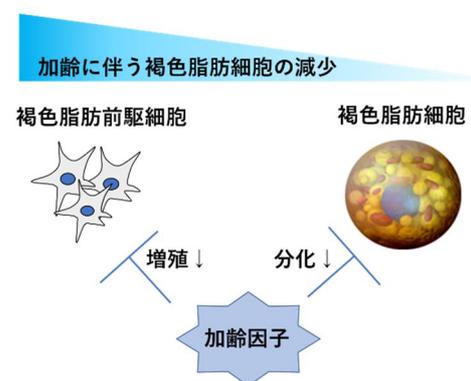
## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 褐色脂肪細胞は熱を産生し、エネルギー消費量を増やすことで抗肥満作用を示し全身の糖代謝・脂質代謝を制御する。
- (2) 加齢により褐色脂肪細胞が減少することが知られており、褐色脂肪細胞の減少は肥満と糖代謝異常に関連することが示唆されている。加齢に伴い褐色脂肪細胞の前駆細胞の増殖が低下することが報告されているが、その機序の多くは不明である。
- (3) 近年、褐色脂肪細胞のインスリン受容体のノックアウトにより褐色脂肪細胞が著明に減少するマウスモデルが報告された(*Cell Metabolism*, 2017)。興味深いことにこのマウスは、褐色脂肪細胞の減少の後、褐色脂肪前駆細胞が増殖、分化し褐色脂肪細胞が再生する。褐色脂肪細胞減少-再生マウスモデルを用いて褐色脂肪前駆細胞の増殖・分化による褐色脂肪細胞の再生メカニズムについて解析し、未だ明らかになっていない加齢による褐色脂肪細胞減少の分子メカニズムを明らかにすることで、肥満症・糖尿病に対する新規治療開発に繋がることが期待される。

## 2. 研究の目的

- (1) 褐色脂肪細胞は加齢によって顕著に減少し、そのことが肥満や糖代謝異常と関連することが報告されている(*N Engl J Med.* 2009)。加齢に伴い褐色脂肪前駆細胞の増殖が低下することが知られているが(*Am J Physiol.* 1998)、そのメカニズムは未だ明らかでない。加齢による褐色脂肪細胞の減少に褐色脂肪前駆細胞の増殖・分化の低下が関与していることが示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、褐色脂肪細胞の再生を若齢と老齢マウスで比較し、なぜ加齢に伴い褐色脂肪細胞の減少が生じるのかそのメカニズムの解明を目指すこととした(図1)。
- (2) 脂肪組織は脂肪細胞以外に脂肪前駆細胞や内皮細胞、免疫細胞が存在し、多様な細胞間の相互作用が組織の恒常性維持に関わることが明らかになりつつある。褐色脂肪細胞の再生過程を単一細胞レベルで評価することが可能になれば、褐色脂肪組織の細胞間相互作用や褐色脂肪組織に存在する細胞のサブタイプなどを詳細に明らかにすることはメカニズム解析において非常に重要な課題である。近年シングルセル解析技術の進歩によって、脂肪組織でもシングルセル解析が可能となっている。
- (3) 本研究では、褐色脂肪細胞減少-再生マウスモデルを用いて褐色脂肪前駆細胞の増殖・分化による褐色脂肪細胞の再生メカニズムについて解析し、加齢による褐色脂肪細胞の減少機序を解明することとした。本研究によって得られる知見は、加齢に伴う褐色脂肪細胞の減少を認める高齢者の肥満症・糖尿病に対する新規治療に繋がる可能性が期待される。

図1 加齢に伴う褐色脂肪細胞の減少メカニズム(仮説)



## 3. 研究の方法

### (1) 褐色脂肪細胞減少 再生マウスモデルの構築

褐色脂肪細胞の選択的に発現している UCP1 遺伝子のプロモーター下に CreERT2 (タモキシフェン誘導型 Cre) を発現するマウス (UCP1CreERT2) を作製した。このマウスとインスリン受容体 flox マウスを掛け合わせて UCP1CreERT2-IR fl/fl マウスを作製した。インスリン受容体を欠損した脂肪細胞は減少し、再生することが知られており UCP1CreERT2-IR fl/fl マウスを用いた褐色脂肪細胞減少-再生マウスモデルによる実験系を用いることとした。

## (2) 脂肪組織のシングルセル調整

脂肪組織の構成細胞を単一細胞レベルで評価するための評価系を構築した。脂肪組織から実際にシングルセルを調整した。マウスの皮下脂肪組織をシングルセルに単離し、シングルセル RNA シークエンス解析を行い、遺伝子プロファイルから細胞群を同定し細胞のサブタイプを同定した。脂肪組織はコラゲナーゼによる酵素処理をよって細胞調整を行った。

## (3) シングルセル RNA シークエンス及び細胞集団の同定

シングルセルに単離した細胞に対して 10xGenomics プラットフォームを用いてシングルセル RNA シークエンスを行った。Seurat を用いて uniform manifold approximation and projection(UMAP)による細胞集団の同定を行った。

## 4 . 研究成果

### (1)UCP1CreERT2 マウスの作製

当初はインスリン受容体 flox マウスに対してアデノ随伴ウイルス 8 (AAV8) を用いた褐色脂肪細胞減少-再生マウスモデルによる褐色脂肪細胞再生の評価を検討していたが COVID-19 の影響による研究計画の遅延により研究計画を変更し、褐色脂肪細胞減少-再生を確認できるより確度の高いマウスモデルとして褐色脂肪細胞に選択的に発現している UCP1 遺伝子のプロモーター下に CreERT2(タモキシフェン誘導型 Cre)を発現するマウス(UCP1CreERT2)を CRISPR-Cas9 を用いて作製した。CreERT2 が褐色脂肪細胞に発現していることを確認した。現在、インスリン受容体 flox マウスと掛け合わせており後天的に任意のタイミングで褐色脂肪細胞を消去することができる褐色脂肪細胞除去マウス(UCP1CreERT2-IRf1/fl マウス)を作製し実験を進める予定である。

### (2) 脂肪組織のシングルセル RNA シークエンス及び細胞集団の同定

シングルセルに単離した細胞に対して 10xGenomics プラットフォームを用いてシングルセル RNA シークエンスを行った。Seurat を用いて uniform manifold approximation and projection(UMAP)による細胞集団の同定を行った。皮下脂肪組織構成細胞についてシングルセル解析を行ったところ、脂肪組織を構成する細胞である脂肪前駆細胞と各免疫細胞(B細胞、T細胞、マクロファージ)等が細胞集団として同定された。更に、それぞれの集団に選択的に発現しているマーカー遺伝子を同定した(図2)

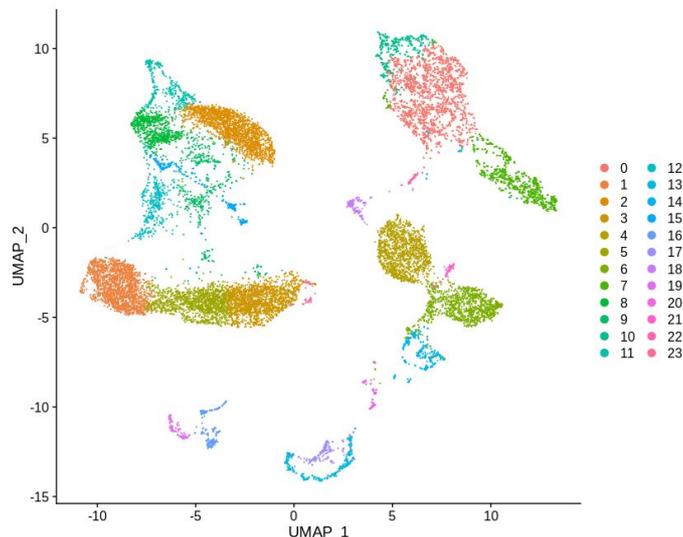


図2. シングルセル解析による皮下脂肪組織の細胞集団の同定

#### (5)考察

脂肪組織の細胞群集団をシングルセル解析によって明らかにすることが可能であった。今後作製したマウスを用いて褐色脂肪細胞がどのように再生していくのか、単一細胞レベルで評価を行い褐色脂肪細胞の再生メカニズムを明らかとしたい。また、加齢によって再生メカニズムがどのように障害されるのかを明らかにしたい。前年度において若齢マウスと老齢マウスの検討から老齢マウスの褐色脂肪組織では細胞内代謝、組織の炎症関連遺伝子の増加などを認めることが明らかになっている（本報告書では詳細を省かせていただきます）。したがって、若齢マウスと老齢マウスの褐色脂肪組織では組織の構成細胞が大きく異なることが考えられる。脂肪組織のシングルセル解析評価系を確立しており、今後作製したマウスを用いて褐色脂肪細胞がどのように再生していくのか、単一細胞レベルで評価を行い褐色脂肪細胞の再生メカニズムを明らかにする。また、加齢によって再生メカニズムがどのように障害されるのかを明らかにしたい。

#### (6)まとめ

脂肪組織の細胞群集団をシングルセル解析によって明らかにすることが可能であった。今後作製したマウスを用いて褐色脂肪細胞がどのように再生していくのか、単一細胞レベルで評価を行い褐色脂肪細胞の再生メカニズムを明らかとしたい。また、加齢によって再生メカニズムがどのように障害されるのかを明らかにしたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Kenji Ikeda, Tetsuya Yamada. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*. 2020, Vol.11, 498. (査読あり)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Kenji, Yamada Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.00498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------