

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580499

研究課題名(和文)褐色脂肪細胞の誘導と分化転換機構に関する研究

研究課題名(英文)Study of the mechanism inducing brown adipocyte differentiation

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：中性脂肪を燃焼してエネルギーを消費する褐色脂肪細胞の分化誘導機構の解明は肥満やメタボ予防と関連して極めて重要である。我々は褐色脂肪細胞の分化誘導に関連する新規遺伝子群の中から分泌蛋白質Creg1を見出した。細胞培養系においてCreg1発現は褐色脂肪細胞の分化と共に上昇し、精製Creg1刺激により褐色脂肪細胞への分化が促進された。動物実験において精製Creg1投与により皮下白色脂肪組織の褐色脂肪化と脂肪肝の改善が確認された。Creg1は褐色脂肪細胞の分化誘導を促進し全身のエネルギー代謝を制御する新規内分泌因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes dissipate caloric energy as heat, thereby being a potential therapeutic target in the battle against obesity and metabolic diseases. To clarify the mechanism of brown adipocyte differentiation, we investigated a number of candidate genes expected to be involved in the process and found a novel gene, cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1), coding a secreted glycoprotein. In adipocyte culture, Creg1 gene expression increased with the differentiation of brown adipocytes, which was also stimulated by addition of the purified protein. Administration of CREG1 protein stimulated brown adipocyte differentiation and improved fatty liver in mice. Our results suggest that CREG1 contributes to the regulation of whole body energy homeostasis as an endocrine molecule.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：褐色脂肪細胞 CREG1 エネルギー代謝 肥満 代謝性疾患

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、肥満や糖尿病との関連に興味をもたれてきた。申請者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)。マウスなどの実験動物と異なりヒトの褐色脂肪細胞は加齢とともに消退し、実質的な役割はヒトではほとんどないと考えられてきた。しかし、褐色脂肪細胞は量的には少ないものの成人にも存在し、その存在量が肥満度や血糖値と逆相関することが明らかとなり (N Engl J Med 360: 1509-1517, 2009)、褐色脂肪細胞の分化誘導が肥満やメタボリックシンドロームの予防・治療に役立つのではないかと大きな注目を集めることとなった。褐色脂肪細胞の分化を制御する転写調節因子については、PGC1 やPRDM16が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。また、褐色脂肪細胞の起源には筋・褐色脂肪前駆細胞と脂肪前駆細胞があり (J Biol Chem 285: 7153-7164, 2010)、PRDM16はどちらの起源の細胞に対しても褐色脂肪細胞への分化を誘導すると考えられている。さらに、白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞へのTransdifferentiation (分化転換) を示唆する報告もなされている (Am J Physiol 298: E1244-E1253, 2010)。しかし、脂肪細胞の分化制御においてPRDM16の上流または下流に位置し、褐色脂肪細胞の分化誘導に働く転写因子が存在すると予想され、それら未知遺伝子の同定が重要な課題となっている。

一方、申請者は動脈硬化進展における

UCP1 欠損の影響を検討するために、UCP1 欠損マウスと動脈硬化モデルであるアポリポロタン E (ApoE) 欠損マウスを掛け合わせ UCP1/ApoE ダブル欠損 (DKO) マウスを作製して検討を進めてきた。この DKO マウスは高脂肪食負荷により肥満とともに重度の動脈硬化を発症すると予想されたが、UCP1 を欠損するにもかかわらず、意外にも動脈硬化の進展に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。また、ApoE 欠損マウスや UCP1 欠損マウスでは通常白色脂肪組織が存在する皮下鼠径部が、DKO マウスでは褐色脂肪様組織に変化していることが明らかとなった。さらに、DKO マウスの褐色脂肪様組織における遺伝子発現を検討した結果、褐色脂肪細胞のマーカーとなる CIDEA や Elovl3 などの遺伝子の発現が顕著に増加しており、この褐色脂肪様組織は実際に褐色脂肪細胞により構成されていると判断された。加えて、PRDM16 など既知の遺伝子の発現レベルに変化はみられなかったが、機能が十分に分かっていない種々の転写因子の遺伝子発現が有意に上昇していることが明らかとなった。以上の結果は、これら機能未知の転写因子が脂肪前駆細胞の褐色脂肪細胞への分化、あるいは白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞への分化転換に関与した可能性を示唆するものであり、本研究では各転写因子の褐色脂肪細胞の誘導への寄与とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

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が、そのためには褐色脂肪細胞の分化誘導機構の理解が必要である。申請者は、褐色脂肪細胞

の分化誘導が強力に促進される新規マウスを創出し、その分化誘導に関連する可能性のある転写因子遺伝子群を見出した。本研究では、これらの遺伝子が実際に褐色脂肪細胞の分化誘導に働くかどうかを検証し、メタボ予防/治療のための褐色脂肪細胞誘導剤や再生医療の開発につながる基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析

白色脂肪組織の褐色脂肪組織化に係る候補転写因子遺伝子について、市販の RNA 発現抑制(RNAi)試薬を用いてノックダウンシマウス褐色脂肪細胞初代培養または 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 と PRDM16 の遺伝子発現を指標として、転写因子の分化に対する寄与を評価する。

(2) 遺伝子発現ベクターの構築

候補遺伝子を cDNA クローニングし、レトロウイルスベクターに挿入した発現ベクターを作製し、3T3-L1 脂肪前駆細胞に感染して褐色脂肪細胞への分化に対する影響を検討した。また、Creg1 および Factor K 遺伝子を培養細胞や組織で過剰発現するアデノウイルスベクター系の構築を行った。

(3) Creg1 タンパク質の調製

Creg1 cDNA を Cos7 細胞に導入し、培養液中に分泌された Creg1 を各種クロマトグラフィーにより精製した。

(4) 動物実験

Creg1 発現アデノウイルスをマウス皮下白色脂肪組織に投与し2週間後に組織を採取し解析した。同様に、皮下埋込み型ポンプを用いてマウスに精製 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。また、脂肪組織特異的 Creg1 発

現トランスジェニック (Creg1-Tg) マウスの作製を行った。

尚、遺伝子組換え実験、動物実験については、研究計画申請を当該研究施設に提出し、その内容については倫理委員会または実験動物倫理委員会において審査され、承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 褐色脂肪細胞の分化誘導と関連する可能性のある遺伝子について検討した結果、4種類の遺伝子とその発現抑制によりUCP1遺伝子の発現も減少することを確認し褐色脂肪細胞の分化への関連が示唆された。これらの遺伝子について褐色脂肪細胞分化の過程における発現変化を調べた結果、褐色脂肪細胞の分化とともに発現上昇する新規遺伝子としてCreg1とFactor K (仮称)を見出した。また、アデノウイルスベクター系を用いてこれらの遺伝子の発現誘導により褐色脂肪細胞への分化が促進されることを確認した。さらに、精製Creg1タンパク質をC3H10細胞培養系に添加することにより、褐色脂肪細胞の分化が促進されることが明らかとなった。

(2) Creg1発現アデノウイルスをマウス皮下白色脂肪組織に投与し、褐色脂肪化に対する効果を検討した結果、コントロールウイルス投与群に比べて、Creg1発現ウイルス投与群の皮下白色脂肪組織においてUCP1の発現が上昇し褐色脂肪細胞の分化が促進されていることが明らかとなった。また、精製Creg1のポンプ投与実験ではPBS投与群とCreg1投与群における体重変化に有意な差は認められなかったが、Creg1投与群で皮下白色脂肪組織におけるUCP1の発現が上昇するとともに脂肪肝の顕著な改善が観察された。これらの結果は、Creg1が生体内においても褐色脂肪細胞の分化を誘導し脂質代謝を改善することを示唆するものと考えられた。

(3) Creg1の褐色脂肪化促進のメカニズムについてUCP1遺伝子に対する転写調節作用を検討した結果、Creg1は褐色脂肪細胞の分化に重要なシグナル伝達経路を活性化し、UCP1の転写を促進することが示唆された。

(4) 脂肪組織特異的Creg1-Tgマウスの作製を行いTgファウンダーマウスを取得した。遺伝的バックグラウンドを均質化するために、C57BL/6マウスへの戻し交配を行い4ラインのTgマウスについてN4世代を得た。今後はN6世代まで戻し交配を行いCreg1の褐色脂肪化作用や抗肥満作用について個体レベルの研究に利用していく。

以上の研究を通して、新規遺伝子Creg1の褐色脂肪細胞誘導作用を世界で初めて明らかにし、国際肥満学会にて大きな評価を得た。また、これらの研究成果について国内および国際特許を出願した。今後はCreg1の詳細な作用メカニズムの解明と抗肥満/抗メタボ剤としての応用研究の進展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7件)

野崎 絢、分泌型糖タンパク質 CREG1 は褐色脂肪細胞の分化を促進する .第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (横浜) .

楠堂達也、分泌型糖タンパク質 CREG1 による褐色脂肪化作用の解析 .第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 24 日、シーガイアコンベンションセンター (宮崎) .

Kusudo, T. Cellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 is a novel regulator of brown adipocyte differentiation. 12th International Congress on Obesity (ICO2014), Mar 19 2014, Kuala Lumpur (Malaysia) .

楠堂達也、CREG1 による褐色脂肪化作用の検討 .第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 12 日、東京国際フォーラム(東京) .

楠堂達也、リコンビナント CREG1 による褐色脂肪分化作用の検討 .日本農芸化学会 2013 大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学 (仙台) .

小島基希、コレステロール食による動脈硬化進展に対する UCP1 欠損の影響について .第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 16 日、マリンメッセ福岡 (福岡) .

李勇学、UCP1/ApoE ダブルノックアウトマウスにおける皮下白色脂肪の褐色脂肪化に関連する遺伝子の解析 .第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日、ホテルグランヴィア京都 (京都) .

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 褐色脂肪細胞分化誘導剤
発明者: 山下 均、楠堂達也
権利者: 学校法人中部大学
種類: 特許
番号

特願 2014-530534
US14/421, 903
EP13 879 526.5

出願年月日
2015.2.8

2015.2.16
2015.3.6

国内外の別: 国内及び国外

〔その他〕

ホームページ

<http://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: 2 4 5 8 0 4 9 9

(2) 連携研究者

楠堂達也 (KUSUDO, Tatsuya)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号: 0 0 4 6 0 5 3 5

(3) 研究協力者

片岡直也 (KATAOKA, Naoya)
李 勇学 (LI, Yongxue)
小島基希 (KOJIMA, Motoki)
野崎 絢 (NOZAKI, Aya)