

令和元年6月19日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26350136

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム治療に向けたベージュ細胞の基礎的研究

研究課題名(英文)Therapeutic potential of beige aduocyte in metabolic syndrome.

研究代表者

安井 菜穂美 (YASUI, Naomi)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：70399145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脂肪細胞には、白色・褐色のほかに、白色に混在し、褐色と同様な熱産生能をもつ「ベージュ細胞」の存在が明らかとなった。本研究では、メタボリックシンドロームにおける脂肪細胞の特性について解析した。ヒトのメタボリックシンドロームと同様な病態を示すSHRSP.ZFラットでは、脂肪細胞の増加に伴い、脂肪細胞の肥大化、肩甲骨間にみられる褐色脂肪細胞の減少が認められた。それらの肥満に伴う脂肪組織の変化において、4種のマイクロRNA(miR-1188、138、143、466b-2)が関与している可能性が示唆された。また、ルイボス茶の熱水抽出物が白色脂肪細胞の褐色化に影響を与えることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、メタボリックシンドロームモデル動物を用い、脂肪細胞でその機能変化に関与する因子として、4種のマイクロRNA(miR-1188、138、143、466b-2)が確認された。miR-138はインスリン抵抗性との関連が報告されているが、その他は脂肪細胞において新しく見出されたものであり、肥満およびその関連疾患の発症・進展メカニズムの解明に応用できるものである。また、実用的なアプローチとして、本研究で安全かつ継続可能な食品由来成分から脂肪細胞の褐色化候補因子が見出されたことは、脂肪組織を標的とした糖尿病や肥満関連疾患の治療法考案の上で役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, a type of inducible “brown-like” adipocyte can developed in Wwhite adipose tissue depots in response to specific stimuli, such as chronic cold exposure or beta adrenergic stimulation. These UCP-1 expressing adipocytes are referred to as beige adipocytes. In this study, we examined factors which related in the adipocyte characteristics by using SHRSP.ZF rats, a metabolic syndrome model. We identified 4 miRNAs in adipocytes were changed in SHRSP.ZF adipose tissue, which may related to the dysfunction of white adipose tissue.

Rooibos contains a rich complement of polyphenols, including flavonoids. To examine the effect of rooibos hot water soluble solids on adipocyte browning by using differentiating 3T3-L1 adipocytes. Increased UCP-1 mRNA level in Rooibos may have preventive effect in obesity.

A better understanding of the mechanisms regulating browning in obesity is required for the development of future therapeutic approaches in obesity-associated metabolic complications.

研究分野：生活習慣病

キーワード：肥満 脂肪細胞 ベージュ細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は、大きく白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞に分けられる。白色脂肪細胞はエネルギー源となる脂質が貯蔵されるのに対し、褐色脂肪はエネルギー消費産生器官として機能する。胎児・新生児の体温維持には褐色脂肪細胞が必要であるが、成長に伴って退縮し、成人では白色脂肪が大部分をしめていると考えられてきた。しかし近年、ヒト成人において、白色脂肪組織内に、「ベージュ細胞」と呼ばれる褐色様脂肪細胞が存在し、エネルギー消費や体脂肪調節に関与していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。メタボリックシンドロームをはじめとする肥満関連疾患の治療戦略として、褐色脂肪細胞誘導が提案されつつあるが、新たに、ベージュ細胞誘導(browning)が注目されている。

我々が開発したメタボリックシンドロームモデルである SHRSP.Z-Lepr<sup>fa</sup> ラット (SHRSP.ZF) は、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルラット SHRSP の遺伝背景に遺伝性肥満 Zucker fatty ラットのレプチン受容体変異遺伝子を有するコンジェニックラットであり、若週齢より内臓脂肪蓄積型肥満・高血圧に加え、インスリン抵抗性・脂質代謝異常を呈し、ヒトメタボリックシンドロームと同様な病態が観察される。このようなモデル動物を用いることで、病態進展に伴う組織及び時期(週齢)特異的な解析が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、メタボリックシンドロームにおける白色、褐色及びベージュ細胞の病態発症及び進展への関与を調べた。また、ベージュ細胞誘導候補物質についても検討した。

(1) 肥満において、脂肪細胞の特性を考慮したメカニズムの解明、治療の有用性が検討されつつある。本研究では、SHRSP.ZF ラットを用い、メタボリックシンドロームにおける白色脂肪細胞及びベージュ細胞の時期(週齢)特異的な形態変化を観察した。

近年、がんなどの治療にも導入されつつあるマイクロRNA(miRNA)は、その標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の 3'UTR を認識して、標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。褐色脂肪細胞は、*in vivo* では Myf5 養成筋芽前駆細胞から Prdm16 の作用によって分化することが示されており、褐色脂肪細胞に多く発現する miR-193b、miR-365 の発現を抑制すると、褐色脂肪細胞分化が障害され、筋分化マーカーの発現が誘導されることが報告されている<sup>2)</sup>。また、寒冷刺激におけるベージュ細胞の PGC1- $\alpha$  を介した熱産生能には、miR-494-3p の関与が報告されている<sup>3)</sup>。このように、脂肪細胞の機能変化に miRNA の関与が示唆されている。

(2) 褐色及びベージュ細胞を誘導する因子として、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体刺激や筋由来分泌因子 Irisin、寒冷刺激などが報告されているが、先の 2 つについては、副作用等の問題からヒトでの実用化には至っていない。また、これらの刺激により誘導されたベージュ細胞は、刺激がなくなると減少し、消失することが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、作用は微弱であるが、より安全で日常的に摂取が可能な食品成分でベージュ細胞の誘導を助長する因子の探索は予防の観点からも重要である。候補物質としてのルイボス茶は、アレルギー症状や免疫機能改善作用、抗酸化作用などが報告されており、フラボノイドを豊富に含んでいる。一方、ユーグレナは動物と植物の両方を併せ持つ生物であり、高栄養源としても注目されているが、生理作用として Th2 系のサイトカイン分泌抑制作用によりアトピー性皮膚炎の改善についても報告されている<sup>5)</sup>。

### 3. 研究の方法

メタボリックシンドロームにおけるベージュ細胞や白色脂肪細胞の特性変化およびその基礎検討を行うため、メタボリックシンドロームモデル動物 SHRSP.ZF ラットを用いた。

SHRSP.ZF ラットは、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルラット SHRSP の遺伝背景に遺伝性肥満 Zucker fatty ラットのレプチン受容体変異遺伝子を有するコンジェニックラットであり、若週齢より内臓脂肪蓄積型肥満・高血圧に加え、インスリン抵抗性・脂質代謝異常を呈し、ヒトメタボリックシンドロームと同様な病態が観察される。このモデルは、若週齢より肥満を呈し、加齢に伴って病態が進展する。

(1) SHRSP.ZF ラットの 12 週齢におけるメタボリックシンドロームの病態進展における肥満の影響について、その対照動物である非肥満ラットと比較検討をおこなった。

雄性 SHRSP.ZF ラットの 6 週齢、12 週齢、18 週齢において、内臓脂肪組織重量、及び白色脂肪細胞、ベージュ細胞、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子の mRNA 発現量を比較した。また、脂肪組織標本を作製し、脂肪細胞の分布について検討した。対照動物として、非肥満の同胞(レプチン受容体遺伝子 *fa*<sup>+/+</sup>、以後、非肥満ラット)を用いた。非肥満ラットは、脳卒中易発症ラット由来の高血圧を呈する。非肥満ラットと比較することで、SHRSP.ZF ラットの肥満に起因する状態を検討することが可能である。

SHRSP.ZF ラットの脂肪組織において、miRNA を抽出し、miRNA のプロファイリング解析(miRCURY LNA<sup>TM</sup> Array、エキシコン社)を行い、発現量に変化が認められた miRNA について、メタボリックシンドロームにおける各 miRNA の関与を調べた。

(2) 褐色及びベージュ細胞の活性化因子の検討については、マウス線維芽細胞 3T3-L1 の褐色化モデル<sup>3)</sup>を用いた。3T3-L1 細胞は、DMEM (2.5 g/L glucose、10% fecal calf serum 含有) 培

地で培養し、confluent 2 日後より isobutyl-methylxanthine ( IBMX) ( 0.5 mM)、dexamethasone ( 0.5 mM)、insulin (10  $\mu$  g/ml)を添加した分化誘導培地で 2 日間培養した。ベージュ細胞の誘導には、5 日目から 7 日目までは IBMX( 0.25mM)、トリヨードチロニン ( T3 ) (50nM)、Rosiglitazone (1  $\mu$  M)を培地に添加し、isoproterenol (10  $\mu$  M)添加 24 時間を行った。8 日目に細胞を回収し、褐色化マーカーについて遺伝子発現量を測定した。

ルイボス茶の茶葉 3.5g を 50ml の水を加えて加熱し、熱水抽出物とした。ユーグレナは、粉末 50g を 50ml の水を加えて加熱し、同じく熱水抽出物を得た。これらの試料は、分化誘導 3 日目から 8 日目まで全体重の 5%、10%、20%の濃度になるよう添加し、ベージュ化誘導作用について、そのマーカーとなる遺伝子発現 ( UCP-1、Prdm16 ) を比較した。いずれの試料も、使用した濃度に細胞毒性がないことを MTT アッセイにて確認した。

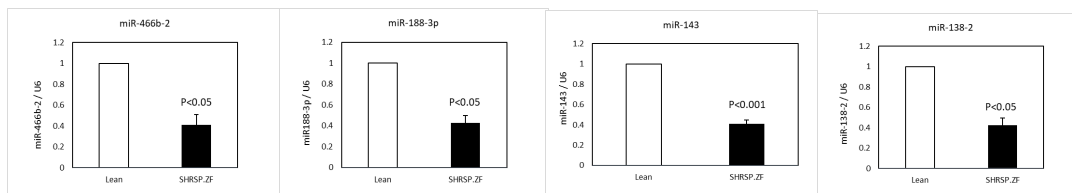
#### 4 . 研究成果

(1) SHRSP.ZF は、4 週齢より肥満が認められ、12 週齢では非肥満ラットと比較して、体重は約 2 倍となり、皮下及び内臓脂肪 ( 精巣周囲・腎臓周囲 ) は約 10 倍まで増加している個体もあった。また高血圧、糖尿病、腎障害が認められ、脂肪細胞由来の炎症性サイトカイン ( Resistin、MCP-1 ) は肥満で有意に増加しており、さらに週齢に伴いこれらの病態は増悪化していた。SHRSP.ZF ラットの非肥満ラットにおいては、12 週齢以降も肩甲骨間に褐色脂肪細胞の存在が認められたのに対し、過度の肥満を呈する SHRSP.ZF ラットでは、加齢に伴い、褐色脂肪細胞及びベージュ細胞の発現の消失がみられ、肩甲骨間に認められる褐色脂肪細胞の白色化が観察された。SHRSP.ZF ラットにおいて、褐色脂肪細胞及びベージュ細胞特異的遺伝子発現量は、12 週齢で既に発現は認められなかった。

肥満の進展に伴い、褐色脂肪細胞の白色化が認められた。このことは、数少ない褐色脂肪細胞も炎症性アディポカインの影響等、白色脂肪細胞の増加によりさらに褐色脂肪細胞の機能低下を助長する可能性が考えられた。

SHRSP.ZF ラットの脂肪細胞から miRNA を抽出し、miRNA プロファイリングを行った。非肥満ラットと比較し、miR-1188、138、143、466b-2 において、SHRSP.ZF ラットで発現変化が認められ、中でも miR-143 は著しく発現抑制されていた。肝臓における miR-143 の発現低下がインスリン抵抗性の増大に関与しており、脂肪細胞の分化にも関与しているが、実際には脂肪細胞の組織学的変化は認められなかったとの報告もある<sup>6)</sup>。SHRSP.ZF ラットの肥満進展に miR-143 の関与も考えられるが、詳細な機能解析が必要とされる。

図 1 . SHRSP.ZF における miRNA 発現量比較



(2) ルイボス茶及びユーグレナの熱水抽出物 ( 含有率 5%、10%、20% ) を 3T3-L1 細胞に添加し、ベージュ細胞の活性化作用について検討した。ベージュ細胞が活性化すると、UCP-1 ( uncoupling protein 1 ) 発現が亢進する。前述した方法により 3T3-L1 細胞をベージュ様脂肪細胞に分化させたところ、ユーグレナについては、今回の条件ではそのベージュ化作用は認められなかったが、20%ルイボス茶熱水抽出物 ( R20 ) において、ベージュ化させたコントロール細胞 ( Bei ) 同様、UCP-1 発現量の増加が認められた ( 図 2 )。UCP-1 と同様なベージュ化マーカー遺伝子である Prdm16 については、細胞間の誤差が大きく、顕著な発現量の差は認められなかった。

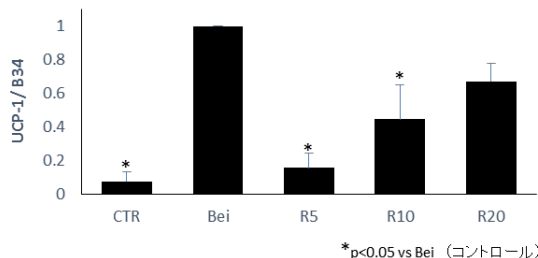
ルイボス茶熱水抽出物により、脂肪細胞分化抑制効果はみとめられなかったが、ベージュ細胞を活性化する可能性が示唆された。ルイボス茶はフラボノイドが豊富に含まれており、有効成分の特定や量については今後の詳細な検討が必要である。

本研究において得られた結果にさらなる検討が必要であるが、増加し続けているメタボリックシンドロームの新たな治療法につながる一助として役立つことが期待される。

#### 引用文献

SharpLZ, *et al.*, Human bat possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *Plos One*. 2012, 7: e49452.

図 2 . ルイボス茶添加細胞における UCP-1 発現量



Sun L et.al., Mir-193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol.* 2011, 13: 958-965

Lemecha M, Morino K, *et al.* MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- $\alpha$  signalling in beige adipocytes. *Science Reports.* 2018, 8: 15096- 5109.

Altshuler-Keylin S et.al. Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* 2016, 24(3): 402- 419

Sugiyama A , Hata S, *et.al* Oral administration of paramylon, a beta- 1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* A inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Vet Med Sci.* 2010, 72: 755-763.

Jordan SD, Krüger M. *et. al.*, *Nat Cell Biol.* 2011, 13(4):434-446.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：池田克巳

ローマ字氏名：(IKEDA, katsumi)

所属研究機関名：武庫川女子大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 80273499

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：北森一哉

ローマ字氏名：(KITAMORI, kazuya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。