様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 6 月 28 日現在

機関番号：23701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K14989

研究課題名（和文）Major Urinary Proteinの脂肪蓄積・脂肪細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文）The roles of major urinary protein 1 as a regulator for adipocyte differentiation in mice

研究代表者
永瀬　久光（NAGASE, HISAMITSU）
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40141395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Major Urinary Protein 1(MUP1)のメタボリック症候群における生理学的意義の解明を、全身でMUP1を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて行った。その結果、MUP1の過剰発現は高脂肪食付加に対して抵抗性を示すとともに、脂肪細胞分化誘導に対して抑制的に働くことが確認された。またMUP1はproliferator-activated receptor γの発現制御を行うことで、脂肪細胞分化を制御している可能性が示された。MUP1はアンドロゲン依存的に誘導されるが、以上の結果は、MUP1がアンドロゲンによる脂質代謝制御の一端を担っている可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the metabolic roles of MUP1 in obesity development, we generated the transgenic mice that overexpress MUP1 under the control of CAG promoter (MUP1-TG mice). Expression of MUP1 was very high in various tissues, including adipose tissue, of MUP1-TG mice compared to those of wild-type mice. Overexpression of MUP1 protected short-term high-fat diet (HFD)-induced lipidemia and body weight gain with increasing adipose tissue mass. In vitro model of adipocyte differentiation using mouse embryonic fibroblasts, overexpression of MUP1 suppressed the mRNA levels of adipocyte-related genes in the early stage, and prevent lipid droplet accumulation. Furthermore, the protection of HFD-induced lipidemia and body weight gain in MUP1-TG mice was attenuated by heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor γ knockouts. Our findings suggest a novel role of MUP1 which may maintain metabolic homeostasis by regulation of adipocyte differentiation in the early stage.

研究分野：毒性学

キーワード：リポカリン　尿中排泄蛋白質　メタボリック症候群　アンドロゲン　トランスジェニックマウス

１．研究開始当初の背景

メタボリック症候群の発症は性差があり、主な要因には性染色体に依存したもの[1]と生殖腺ホルモンに依存したものの２つが挙げられる。特に後者については、雄の低アンドロゲン状態が過剰な脂肪蓄積を誘導すること等が明らかになっている[2, 3]が、アンドロゲンが実際にどのような作用機構で、脂肪蓄積を制御しているのかについては不明な点が多い。

リポカリンファミリー分子である Major Urinary Protein Type1（MUP1）は全身で発現しており、尿中に排泄される低分子蛋白質である。またその発現はアンドロゲンによって誘導され、雌よりも雄の方が高い[4, 5]。MUP は、フェロモンの様な疎水性生理活性物質をリガンドとし、齧歯類の個体識別に関わっているとされている一方で、遺伝性の糖尿病肥満マウスの雄を用いた先行研究では、MUP1 が肝臓[6]や骨格筋[7]で作用することで病態を改善することから、糖脂質代謝異常疾患に関与する可能性が示唆されている。しかし、アンドロゲンによる脂肪蓄積制御機構と MUP1 との関わりについての報告は皆無であり、未だ不明な点が多く残されている。

このような背景のもと我々は、CAG プロモーター制御下で MUP1 を高発現する MUP1-TG マウスを作製し、その表現型の解析を試みている。MUP1-TG マウスは全身で MUP1 を高発現しており、特に雌において、野生型（WT）マウスではほとんど検出されない MUP1 が、MUP1-TG マウスでは雄性 WT マウスに近いレベルで発現している。

２．研究の目的

本研究では、アンドロゲンによる脂肪蓄積制御機構に MUP1 がどの程度関わっているのかを解明する目的で、①MUP1 は脂肪蓄積を制御する因子であるのか？②その具体的な作用機構は？③MUP1 の作用臓器や作用機構に性差はないのか？の 3 点を中心に、検討を行った。

３．研究の方法

（１）実験動物

MUP1-TG マウスは、C57BL/6J 系マウスと戻し交配を行った F7～F10 世代のマウスを用いた。Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ヘテロ欠損マウス[8]は、東京大学　門脇孝先生より御供与頂き、C57BL/6J 系マウスで継投維持したものを用いた。PPARγ ヘテロ欠損／MUP1-TG マウスは、MUP1-TG マウスと PPARγ ヘテロ欠損マウスを交配して得られたものを使用した。マウスの飼育は、温度 23 ± 2° C 、湿度 50% ± 10%、明期 12 時間暗期 12 時間の明暗周期下で飼育し、水と餌は自由に摂食させ、本研究におけるすべての動物実験は、「岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会」と「岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会」の承認を得た後、十分な動物擁護の配慮下で行った。

（２）高脂肪負荷試験

雌雄ともに 4 週齢から通常食（13 Kcal%fat）の代わりに高脂肪食（60 Kcal%fat）を 8 週間摂取させ、体重推移をモニタリングした。投与終了後、屠殺し、各臓器を摘出するとともに重量を測定した。また採血も行い、血清中のトリグリセリド濃度を測定した。

（３）定量リアルタイム RT-PCR

マウスの各臓器の Total RNA を抽出し、cDNA を調整した。得られた cDNA を鋳型として、各糖脂質代謝関連因子を標的分子として定量リアルタイム RT-PCR を行った。なお、内部標準には β-actin を用い、各測定値を補正した。

（４）各組織の組織学的解析

得られた各臓器を 4% パラホルムアルデヒド液にて固定後、パラフィンに包埋した。ミクロトームを用いて薄切切片を作成した後にスライドガラスに伸展させ、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を行った。その後、オイキッドにて封入し、各組織の形態観察を顕微鏡下にて行った。

（５）細胞培養

マウス胎生繊維芽細胞（MEF）は、胎齢 13.5 日から 15.5 日齢の WT および MUP1-TG の各胎仔から作製した。脂肪分化誘導は、上記の培養液に 0.5 mM IBMX、1 μM デキサメタゾン、10 μg / mL ヒトインスリン、100 nM ロジグリタゾンを加え分化誘導培地とした。分化誘導培地は、2 日おきに新鮮な培地と交換した。細胞内の MUP1 の局在については、DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を用いた核染色とウサギ抗 MUP1 ポリクローナル抗体および Alexa Flour 633 標式ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた免疫細胞化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察することで行った。脂肪分化誘導後の細胞内における脂肪滴の蓄積は、Oil Red O 染色により評価した。

４．研究成果

（１）高脂肪食負荷時における MUP1 高発現の影響

通常食摂取時における MUP1-TG マウスの表現型を観察したところ、マウスは健康に成長し、体重や肝臓、白色脂肪などの臓器重量においても雌雄ともに WT マウスとの差は認められなかった。また血中トリグリセリド値や肝臓、腎臓、白色脂肪、骨格筋中に存在する糖新生および脂肪酸合成に関与する遺伝子の mRNA 発現量にも変化は認められなかった。

高脂肪食負荷時には、WT マウスでは脂肪

重量の増加に起因する体重増加が確認されたが、MUP1-TG マウスでは雌雄ともに、体重増加に対して有意な抵抗性を示した。またWT マウスでは高脂肪食負荷により血中トリグリセリド値が高値となるが、雌性MUP1-TG マウスでは血中トリグリセリド値の上昇に対しても抵抗性を示した。その一方で、雄性 MUP1-TG マウスでは血中トリグリセリド値に対する影響は認められなかった。

また雌においては、高脂肪食負荷後に WT マウスで白色脂肪組織における MUP1 mRNA 発現が劇的に上昇していることが明らかとなった。さらに実験開始時から MUP1 の発現が高い MUP1-TG マウスでは、WT マウスと比較して、白色脂肪組織における PPARγ mRNA 発現の有意な上昇が確認された。この結果から、MUP1 による肥満抑制効果には、白色脂肪組織における PPARγ 発現誘導が関与している可能性が考えられた。

（２）脂肪細胞分化過程における MUP1 の影響

野生型 MEF（WT-MEF）と MUP1-TG の MEF (TG-MEF) をそれぞれ調整し、脂肪分化誘導実験を行った。各 MEF における MUP1 mRNA 発現量を測定した結果、TG-MEF は WT-MEF と比較して MUP1 を常に高発現していることが確認できた。そこで、脂肪細胞分化誘導を行った際の各種脂肪細胞分化関連因子の mRNA 発現について検討を行った。その結果、脂肪細胞分化誘導 2 日､4 日後の TG-MEF における C/EBPα aP2, CD36, GLUT4 発現量は､WT-MEF と比較して有意な抑制が認められ、PPARγ についても 2 日後の発現量が有意に抑制されていた。しかし、脂肪細胞分化 4 日後以降のこれら遺伝子の mRNA 発現量は、TG-MEF と WT-MEF との間で差は認められなかった。また MUP1 の脂肪滴蓄積に与える影響を検討したところ、脂肪細胞分化誘導因子の発現抑制の結果を反映して、WT-MEF において認められた脂肪滴の蓄積が TG-MEF においては抑制されていることが観察された。

さらに脂肪細胞分化誘導時の MUP1 の細胞内局在について検討を行ったところ、分化誘導前においては WT-MEF では細胞全体に、TG-MEF では細胞質に多く存在していたが、分化誘導を行うといずれの細胞においても MUP1 の核への集積が認められた。このことから､MUP1 は脂肪細胞分化誘導に核内に移行し、脂肪細胞分化関連因子の発現を制御することで、脂肪細胞分化誘導を抑制している可能性が考えられた。

（３）脂肪蓄積における MUP1 と PPARγ との関与

前項までの MEF を用いた *in vitro* アッセイ系の結果から、MUP1 は PPARγ の発現誘導に関与することによって脂肪細胞分化を制御している可能性が示唆された。そこで、PPARγ の発現を減弱させた際の MUP1 の脂肪蓄積抑制作用に与える影響を、PPARγ 欠損マウスを用いて検討した。PPARγ ホモ欠損マウスは胎生致死であるため[8]、本検討ではヘテロ欠損マウスを用いた。PPARγ ヘテロ欠損マウスは脂肪組織での PPARγ の mRNA 発現量が WT マウスの半分程度まで減弱しており、また作製した PPARγ ヘテロ欠損／MUP1-TG マウスにおいても同様に PPARγ mRNA 発現の減弱が認められた。

そこで次に、このマウスを用いて高脂肪食負荷試験を行った。4 週齢の雌性マウスに 8 週間高脂肪食を摂取させたところ、MUP1-TG マウスにおいて高脂肪食摂取による体重と脂肪重量の増加抑制が認められた一方、PPARγ ヘテロ欠損／MUP1-TG マウスにおいては、WT マウスと比較して体重と脂肪重量の有意な差は認められず､MUP1 による作用が PPARγ ヘテロ欠損により減弱された。さらに、血清中トリグリセリド濃度においても、MUP1-TG マウスにおいて有意に抑制された一方で、PPARγ ヘテロ欠損／MUP1-TG マウスにおいては WT マウスと比較して有意な差は認められず､MUP1 の作用が PPARγ ヘテロ欠損により減弱された。以上の結果から、MUP1 の脂肪蓄積作用は、PPARγ の発現制御を介することで、脂肪細胞分化を抑制しているものと考えられた。

＜引用文献＞

① Xuqi Chen, Rebecca McClusky, Jenny Chen, Simon W. Beaven, Peter Tontonoz, Arthur P. Arnold , Karen Reue: The Number of X Chromosomes Causes Sex Differences in Adiposity in Mice. PLoS Genetics 8, 2012, e1002709.

② WuQiang Fan, Toshihiko Yanase, Masatoshi Nomura, Taijiro Okabe, Kiminobu Goto, Takashi Sato, Hirotaka Kawano, Shigeaki Kato, Hajime Nawata: Androgen Receptor Null Male Mice Develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. Diabetes 54, 2005, 1000-1008.

③ Robin Haring, Henry Völzke, Stephan B. Felix, Sabine Schipf, Marcus Dörr, Dieter Rosskopf, Matthias Nauck, Christof Schöfl, Henri Wallaschofski: Prediction of metabolic syndrome by low serum testosterone levels in men: results from the study of health in Pomerania. Diabetes 58, 2009, 2027-2031.

④ Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C: Major urinary proteins, α_{2U}-globulins and aphrodisin. Biochimica et

Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1482, 2000, 218-228.

⑤ Yingjiang Zhou, Liangyou Rui: Major urinary protein regulation of chemical communication and nutrient metabolism. Vitamins and Hormones 83, 2010, 151-163.

⑥ Yingjiang Zhou, Lin Jiang, Liangyou Rui, Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. Journal of Biological Chemistry 284, 2009, 11152-11159.

⑦ Xiaoyan Hui, Weidong Zhu, Yu Wang, Karen S. L. Lam, Jialiang Zhang, Donghai Wu, Edward W. Kraegen, Yixue Li, Aimin Xu: Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. Journal of Biological Chemistry 284, 2009, 14050-14057.

⑧ Naoto Kubota, Yasuo Terauchi, Hiroshi Miki, Hiroyuki Tamemoto, Toshimasa Yamauchi, Kajuro Komeda, Shinobu Satoh, Ryosuke Nakano, Chikara Ishii, Takuya Sugiyama, Kazuhiro Eto, Yoshiharu Tsubamoto, Akira Okuno, Koji Murakami, Hisahiko Sekihara, Go Hasegawa, Makoto Naito, Yasushi Toyoshima, Satoshi Tanaka, Kunio Shiota, Toshio Kitamura, Toshiro Fujita, Osamu Ezaki, Shinichi Aizawa, Ryozo Nagai, Kazuyuki Tobe, Satoshi Kimura, Takashi Kadowaki: PPARγ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Molecular Cell 4, 2005, 597-609.

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Al-Sayed Al-Soudy, Tsuyoshi Nakanishi, Seiya Mizuno, Yoshikazu Hasegawa, Hossam H. Shawki, Megumi C. Katoh, Walaa A. Basha, Abdelaziz E. Ibrahim, Hany A. El-Shemy, Hiroyoshi Iseki, Atsushi Yoshiki, Youhei Hiromori, Hisamitsu Nagase, Satoru Takahashi, Hisashi Oishi, Fumihiro Sugiyama: Germline recombination in a novel Cre transgenic line, Prl3b1-Cre mouse. Genesis. 54, 2016, 389-397. (査読有)
DOI:http://dx.doi.org/10.1002/dvg.22944.
2. Akira Aoki, Kohei Fujitani, Kohei Takagi, Tomoki Kimura, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Male hypogonadism causes obesity associated with impairment of hepatic gluconeogenesis in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 39, 2016, 587-592. (査読有)
DOI:http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b15-00942
3. Youhei Hiromori, Akira Aoki, Jun-ichi Nishikawa, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Transactivation of the human retinoid X receptor by organotins: use of site-directed mutagenesis to identify critical amino acid residues for organotin-induced transactivation. Metallomics. 7, 2015, 1180-1188. (査読有)
DOI:http://dx.doi.org/10.1039/C5MT00086F

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 髙木 康平，藤谷 航平，青木 明，中西 剛，永瀬久光：抗アンドロゲン剤による肝糖代謝異常と脂肪蓄積の亢進，第 43 回日本毒性学会学術年会，2016 年 6 月 29 日，ウインクあいち（愛知県・名古屋市）
2. 廣森 洋平，竹内 優一郎，永瀬久光，中西 剛：フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)経口曝露が免疫組織に及ぼす影響, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016 年 6 月 29 日，ウインクあいち（愛知県・名古屋市）
3. 髙木 康平，藤谷 航平，青木 明，中西 剛，永瀬久光：抗アンドロゲン剤ばく露による肝臓の糖代謝異常を伴う脂肪蓄積の亢進と脂肪肝の誘発，日本薬学会第 136 年会，2016 年 3 月 27 日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
4. 髙木 康平，藤谷 航平，青木 明，中西 剛，永瀬久光：抗アンドロゲン剤ばく露による肝臓の糖代謝異常を伴う脂肪蓄積の亢進，フォーラム 2015：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2015 年 9 月 17 日，神戸学院大学（兵庫県・神戸市）
5. Akira Aoki, Kohei Takagi, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Anti-androgenic effects induce obesity associatedwith impairment of hepatic gluconeogesis in mice. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2015), September 15, 2015, Porto (Portugal)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/list/eisei/

６．研究組織
(1)研究代表者
永瀬久光（NAGASE HISAMITSU）
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号： 40141395

(2)研究分担者
中西　剛（NAKANISHI TSUYOSHI）
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50303988