

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32714

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16220

研究課題名(和文) ベージュ脂肪細胞の分化に対するビタミンEの効果とその作用機序の解明

研究課題名(英文) The effects of vitamin E on beige adipocyte differentiation

研究代表者

田中 理恵子 (Tanaka, Rieko)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・助教

研究者番号：80579962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞はミトコンドリアを多く保有する細胞であり、UCP1を介した熱産生によって体温の保持等に寄与している。これらの細胞はエネルギーの消費を亢進する事から、肥満や代謝疾患に関する研究のターゲットとして注目されている。PPAR α のアゴニストがマウスの白色脂肪組織においてベージュ脂肪細胞の分化を促進するとの報告から、我々はPPAR α の発現を誘導する事が知られている α -トコフェロールに着目し、その効果を検討した。本研究の結果から、 α -トコフェロールが熱産生型脂肪細胞の分化を促進し、その作用機序にはPPAR α のコアクチベーターであるPGC-1 α の発現誘導が関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Beige and brown adipocytes, which constitute BAT, have many mitochondria containing uncoupling protein 1 (UCP1). UCP1 uncouples the respiratory chain, allowing for fast substrate oxidation, and functions as a radiator for thermogenesis to maintain body temperature. Activation of thermogenic adipocyte has been considered an attractive target for weight loss and treatment of metabolic disease. A PPAR α agonist, rosiglitazone, promotes thermogenic adipocyte differentiation in mouse WAT. It has been reported that α -tocopherol influence PPAR α expression and the target genes expression. In this study, we investigated that the effect of α -tocopherol on beige adipocyte differentiation. The results of our study suggest that α -tocopherol promotes thermogenic adipocyte differentiation. We also suggest that PGC-1 α upregulation by α -tocopherol contribute thermogenic adipocyte differentiation.

研究分野：食品機能学

キーワード：ベージュ脂肪細胞 ビタミンE α -トコフェロール UCP1 PGC-1

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞はエネルギーを熱として放出するためのラジエーターとして働く細胞であり、代謝調節や体温の保持に寄与している。褐色脂肪細胞は筋芽細胞と共通の前駆細胞から分化する事が知られているが、2012年に Spiegelman らのグループが白色脂肪細胞と同一の前駆細胞から褐色脂肪様の細胞（ベージュ脂肪細胞）が誘導される事を報告した¹⁾。

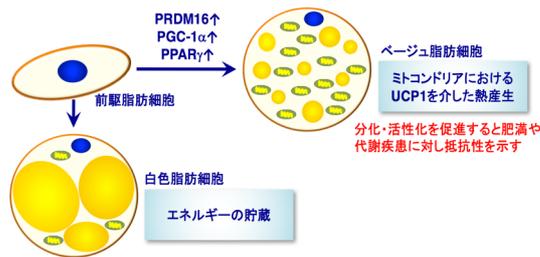


図1. 脂肪細胞の分化と機能

ベージュ脂肪細胞は UCP1 を介してエネルギーを熱へと変換する細胞であり、抗肥満研究の新規ターゲットとして近年注目を集めている。2012年以降もベージュ脂肪細胞の分化制御機構に関する研究は精力的に行われ、多彩な転写因子の関与が明らかとなった。また、 $\beta 3$ 受容体や PPAR γ のアゴニストがベージュ脂肪細胞の分化を促進すると報告されているが、これらの薬剤は深刻な副作用を呈する事から肥満治療への応用が困難とされている。そこで当研究室では、ベージュ脂肪細胞の分化を促進する食品成分の探索と作用機序の解明に向けた研究を行っている。

2. 研究の目的

当研究室では、ビタミン E の一種である α -トコフェロールを摂取したラットの皮下脂肪組織において、褐色脂肪様に多胞化した細胞が出現することを見出した。この多胞化した細胞は熱産生関連遺伝子を高発現しており、ビタミン E が肥満解消の鍵となるベージュ脂肪細胞の分化・増殖に寄与する可能性が示唆される。本研究では *In vivo* 並びに *In vitro* の両面からビタミン E によるベージュ脂肪細胞の分化促進効果とその作用機序の解明を目的とした検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ベージュ脂肪細胞分化を制御する転写因子の発現・活性化に対するビタミン E の影響

マウス白色脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞) の分化誘導時に Triiodothyronine (T_3) を添加すると、UCP1 を発現する細胞が出現することが報告されている²⁾。この知見をもとに、まず 3T3-L1 細胞から UCP1 発現細胞への分化を誘導する系を確立した。ベージュ脂肪細胞や褐色脂肪細胞の分化を制御する転写因子として、PRDM16, PGC-1 α , PPAR α , PPAR γ , TR 等が報告されている。これらの転写因子の発現レベルに α -トコフェロールが影響を与えるか検討した。また、脂肪滴の形状や細胞内のミトコンドリア含有量について観察を行った。

(2) ラット脂肪組織の褐色化におけるビタミン E の効果

通常食またはトコフェロール高含有食を 8 週間摂取したラットより各種脂肪組織を採取し、病理組織学的検査や UCP1、ベージュ脂肪細胞マーカーの発現解析を行った。また、脂肪組織における UCP1 の蛍光免疫染色を行い、白色脂肪組織において UCP1 発現細胞が見られるか検討した。

(3) 骨格筋における PGC-1 α の発現と Irisin 分泌に対するビタミン E 摂取の効果

ベージュ脂肪細胞の分化を促進するホルモンとして、PGC-1 α 依存的に分泌される Irisin が知られている。Irisin は膜貫通タンパク質 FNDC5 として同定された分子であり、運動刺激等によって切断され、血中へと分泌される。運動依存的な PGC-1 α の発現上昇は抗酸化物質の摂取によって促進される事が報告されており、 α -トコフェロール摂取によるベージュ脂肪細胞の分化促進が、Irisin の分泌促進を介している可能性が考えられる。そこで、通常食または α -トコフェロール高含有食を 8 週間摂取したラットより骨格筋を採取し、PGC-1 α 及び FNDC5 の発現解析を行った。また、血中の Irisin 濃度は ELISA 法で測定した。

(4) ビタミン E 同族体の効果の比較検討

トコフェロールには α -、 β -、 γ -、 δ - の 4 種類の

同族体が存在する。このうち α -、 γ -、 δ -型のトコフェロールを 3T3-L1 細胞に添加し、PGC-1 α 及び UCP1 の遺伝子発現量を定量することで、その効果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) α -トコフェロールは PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現を誘導する

α -トコフェロールまたは γ -トコフェロールを終濃度 1 μ M で添加した条件下で 3T3-L1 細胞を分化誘導し、各種転写因子と UCP1 の遺伝子発現量を定量した。その結果、 α -トコフェロールを添加した細胞では PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現量が有意に増加した。一方で、 γ -トコフェロールを添加した細胞ではこれらの遺伝子発現に影響が見られなかった。また、 α -トコフェロールは終濃度 1-100 μ M において濃度依存的に PGC-1 α の遺伝子発現量を増加させた (図 2)。

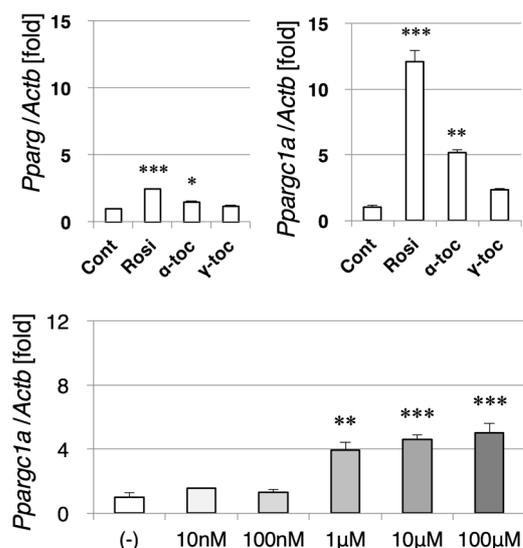


図 2. α -トコフェロールは 3T3-L1 細胞において PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現量を誘導する

(Mean \pm SD (n=3), *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs Cont or (1) by one-way ANOVA, Bonferroni test.)

ベージュ脂肪細胞は脂肪滴のサイズが比較的小型であり、ミトコンドリア含有量が多い事が特徴である。 α -トコフェロールを終濃度 1 μ M で添加した細胞では、脂肪滴の小型化が観察された。また、MitoTracker 染色によるミトコンドリアの観察を行った。その結果、 α -トコフェロールを添加した細胞では染色領域が増加しており、ミトコンドリア含有量が増加

している事が推察された (図 3)。これらの結果から、 α -トコフェロールが白色脂肪前駆細胞からベージュ脂肪細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

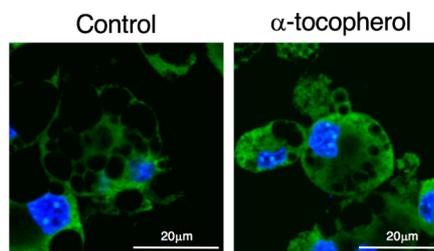


図 3. 3T3-L1 細胞におけるミトコンドリア染色

(2) α -トコフェロールの摂取はラット白色脂肪組織の褐色化を促進する

高脂肪食 (HFD 群) または高脂肪・トコフェロール高含有食 (α -toc 群、 γ -toc 群) で 8 週間飼育したラットより白色脂肪組織を採取し、各種分析を行った。齧歯類では鼠蹊部皮下脂肪組織においてベージュ脂肪細胞の分化が多く見られる事から、まず鼠蹊部皮下脂肪組織における PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現を解析した。また、ベージュ脂肪細胞マーカーである CD137 (*Tnfrsf9*) の遺伝子発現量についても定量した。これらの遺伝子発現量は α -toc 群で有意に増加しており (図 4、上段)、 α -トコフェロール摂取ラットの腎周囲脂肪組織中において多胞化した褐色脂肪様の細胞が観察された (図 4、下段)。

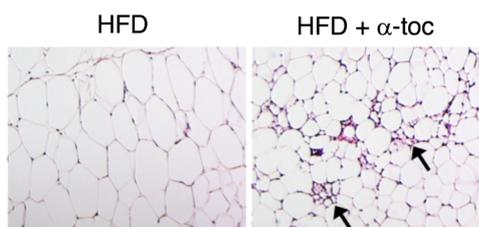
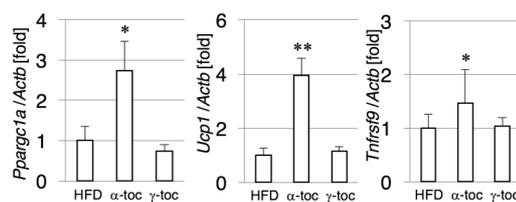


図 4. ラット白色脂肪組織における遺伝子発現解析と HE 染色による組織の観察

(Mean \pm SD (n=3), *: P<0.05, **: P<0.01 vs HFD group by one-way ANOVA, Bonferroni test.)

(3) α -トコフェロールの摂取は骨格筋からの Irisin 分泌に影響を与えない

Irisin は骨格筋から分泌されるミオカインの一種であり、褐色脂肪細胞における熱産生の亢進や、白色脂肪細胞の褐色化を誘導する。 α -トコフェロール摂取ラットで見られた白色脂肪組織の褐色化に、Irisin の分泌促進が関与するか検討した。その結果、ラットの骨格筋（大腿四頭筋）における FNDC5 の発現量、及び血中の Irisin 濃度に対してトコフェロールの摂取は影響を与えない事が明らかとなった。

(4) ビタミン E 同族体のうち、 δ -トコフェロールは最も強く PGC-1 α の発現を誘導する

食品中に多く含有されるビタミン E 同族体は主に α -トコフェロールや γ -トコフェロールであるが、ラズベリー等に含まれる δ -トコフェロールは抗がん作用等が報告されており、一部のがん細胞において PGC-1 α の上流因子である p38 MAPK の遺伝子発現量を増加させる事が報告されている。そこで、 δ -トコフェロールを含む各種同族体を終濃度 10 μ M で添加した条件下で 3T3-L1 細胞を分化誘導し、効果を比較検討した。その結果、 δ -トコフェロールを添加した細胞では PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現量が顕著に増加しており、その効果はポジティブコントロールとして用いた Rosiglitazone と同程度であった (図 5)。現在は δ -トコフェロールの効果についても、動物レベルで検討を進めている。

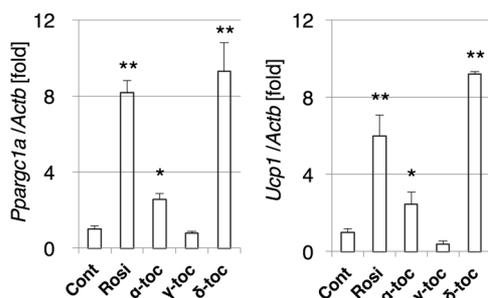


図 5. δ -トコフェロールは PGC-1 α と UCP1 の遺伝子発現を顕著に誘導する

本研究により、 α -トコフェロールが白色脂肪前駆細胞からベージュ脂肪細胞への分化を促進する事が明らかとなった。また、 δ -トコ

フェロールが α -トコフェロールと同等以上の効果を有する可能性が示唆された。今後は δ -トコフェロールが *In vivo* でもベージュ脂肪細胞の分化を誘導し、肥満を抑制するか様々なモデルを用いて検討する予定である。また、本研究の結果から、トコフェロールによるベージュ脂肪細胞の分化促進効果が PGC-1 α の発現誘導と活性化に起因する可能性が強く示唆される。今後は PGC-1 α の活性化因子に対するトコフェロールの影響についても検討する事で、更に詳細なメカニズムの解明を目指す。

<引用文献>

1) Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376, 2012.

2) Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, Nara T, Kato K, Matsui T, Funaba M. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *J Vet Med Sci*, 76(1), 57-64, 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件) 査読あり

Tanaka-Yachi R, Takahashi-Muto C, Adachi K, Tanimura Y, Aoki Y, Koike Y, Kiyose C. Promoting effect of α -tocopherol on beige adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells and rat white adipose tissue. *Journal of Oleo Science*, 66(2), 171-179, 2017.

[プロシーディング] (計 1 件)

田中 (谷地) 理恵子、高橋 (武藤) 知衣、清瀬千佳子、熱産生型脂肪細胞の分化におけるビタミン E 同族体の機能、*ビタミン E 研究の進歩*、17 巻、1-6 (2017)

[学会発表] (計 9 件)

① 梅原 由佳、白崎 雅人、高橋 知衣、清瀬千佳子、田中 理恵子：マウス脂肪細胞及び肝細胞の PGC-1 α 発現に対するビタミン E 同族

体の影響、第 29 回ビタミン E 研究会、2018 年 1 月 27 日、同志社大学今出川校地（京都府 京都市）

② 谷村 幸奈、高橋 知衣、清瀬 千佳子、田中理恵子： δ -tocopherol による熱産生型脂肪細胞の機能制御、日本ビタミン学会 第 69 回大会、2017 年 6 月 9 日、横浜市開港記念会館（神奈川県 横浜市）

③ 田中 理恵子：ビタミン E 同族体による熱産生型脂肪細胞の機能制御、第 5 回 あしなが予防医学研究会、2017 年 2 月 18 日、新潟大学（新潟県 新潟市）

④ 田中 理恵子、谷村 幸奈、栞島 彩希、高橋 知衣、清瀬 千佳子：ビタミン E 同族体による PGC-1 α の発現誘導とそのメカニズム、第 28 回ビタミン E 研究会、2017 年 1 月 21 日、東洋大学白山キャンパス（東京都 文京区）

⑤ 鈴木 鞠子、栞島 彩希、高橋 知衣、清瀬 千佳子、田中 理恵子：3T3-L1 細胞における熱産生脂肪細胞の分化と Tocopherol の機能、日本油化学会 第 55 回年会、2016 年 9 月 8 日、奈良女子大学（奈良県 奈良市）

⑥ 田中 理恵子、栞島 彩希、周防屋 夏美、嵐山 賢一、安次富 春乃、高橋 知衣、清瀬 千佳子：骨格筋からの Irisin 分泌と熱産生脂肪細胞の分化における Tocopherol の機能、日本ビタミン学会 第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日、富山国際会議場（富山県 富山市）

⑦ 田中 理恵子、高橋 知衣、足立 和也、嵐山 賢一、栞島 彩希、清瀬 千佳子：ビタミン E 同族体によるベージュ脂肪細胞の分化促進効果、日本油化学会 第 54 回年会、2015 年 9 月 10 日、名城大学（愛知県 名古屋市）

⑧ 田中 理恵子、高橋 知衣、栞島 彩希、嵐山 賢一、山田 翔太、清瀬 千佳子：ビタミン E 同族体による熱産生脂肪細胞の分化促進効果、第 18 回 Vitamin E Update Forum、2015 年 8 月 28 日、如水会館（東京都 千代田区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 理恵子（TANAKA. Rieko）
神奈川工科大学・応用バイオ科学科・助教
研究者番号：80579962