

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K09779  
研究課題名(和文) 脂肪萎縮症の病態解明から肥満症・メタボリックシンドロームの新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology of lipodystrophy and exploration of novel therapeutic targets of obesity and metabolic syndrome

研究代表者  
野口 倫生 (Noguchi, Michio)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長

研究者番号：00432394  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子であるBSC12(セイピン)のノックアウトラットを用いて病態を解析した。組織学的解析で脂肪組織は線維化が進展しており、脂肪組織の網羅的遺伝子発現解析では野生型と比較して、典型的な肥満脂肪組織で発現上昇が認められる線維化関連遺伝子群とは異なるタイプの遺伝子群の発現上昇が認められた。ラット間質血管分画(SVF)前駆脂肪細胞分画の脂肪細胞分化誘導では熟脂肪細胞マーカーの発現低下が認められた一方で、分化誘導前の前駆細胞では一部の線維化関連遺伝子群の発現上昇が認められ、病態との関連が示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪萎縮症は脂肪組織のexpandabilityの低下から脂肪組織における脂肪貯蔵の限界をきたし、肝臓や骨格筋等において異所性脂肪蓄積を引き起こす。脂肪組織量では対極にありながら脂肪萎縮症と肥満症は異所性脂肪蓄積や全身の糖脂質代謝異常を呈する点で非常に共通点が多い。脂肪組織の炎症・線維化に着目した本研究課題は脂肪萎縮症と肥満症の共通基盤病態の解明と肥満症・メタボリックシンドロームの新規治療標的の探索を行い、複数の治療標的候補分子を同定した。脂肪蓄積異常を呈する病態の統合的な理解と新たな創薬の研究領域の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we addressed the molecular and cellular mechanisms of lipodystrophy using Seipin knockout rats (SKO rats). Histological analyses revealed the fibrosis of the tissue of SKO rats. Then, gene expression of fibrosis-related molecules such as extracellular matrix and matrix metalloproteinase, which were different types from those of adipose tissue fibrosis in obesity model animals, were elevated. Furthermore, we developed the methods of culture and adipogenic induction of stromal-vascular fraction of the adipose tissue of rats. After adipogenic induction, gene expression of mature adipocyte markers were remarkably decreased, while before the induction, gene expression of a set of fibrosis-related molecules were elevated. These findings suggested the molecular mechanisms of fibrosis of residual adipose tissue in lipodystrophy.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：脂肪萎縮症 肥満症 脂肪蓄積

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪萎縮症は脂肪組織の欠失に起因する疾患であり、高度のインスリン抵抗性、著明な糖脂質代謝異常などを伴う難治性糖尿病を呈する。脂肪萎縮症では脂肪組織の欠失により脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンなどのアディポサイトカインが欠乏する。また本来貯蔵されるべき脂肪細胞の欠失により異所性脂肪蓄積が亢進し、脂肪萎縮症の病態は肥満症・メタボリック症候群と共通する病態が数多く認められる(図1)。つまり脂肪萎縮症の治療法の開発が異所性脂肪蓄積を伴う肥満・メタボリックシンドロームの治療法の開発に応用される可能性を秘めている。

申請者の研究室では、脂肪萎縮症モデルマウスである A-ZIP/F1 マウスと当研究室で開発したレプチン過剰発現トランスジェニック skinny マウス (*J Clin Invest* 2000, *Diabetes* 1999, *Diabetes* 1999) の交配によりレプチンによる糖脂質代謝異常の著明な改善効果を報告した (*Diabetes* 2001)。その成果を踏まえ、レプチンのトランスレショナルリサーチとして 10 症例の脂肪萎縮症患者にレプチン補充治療を試み、糖脂質代謝の劇的な改善を報告している (*N Engl J Med* 2004, *J Clin End Metab* 2007)。

また申請者らはヒト iPS 細胞が脂肪細胞への分化能を有することを報告し (*FEBS Lett* 2009)、iPS 細胞由来脂肪細胞が脂肪細胞機能を有することを明らかにした (*Stem Cells Dev* 2013)。続いて 8 例の脂肪萎縮症患者から iPS 細胞を樹立し、脂肪細胞分化について検討した。Seipin 遺伝子異常を有する疾患特異的 iPS 細胞は健常者由来 iPS 細胞と比較し顕著に脂肪蓄積が低下しており、脂肪萎縮症の病態を再現しうるヒト疾患モデルとしての有用性を示した (*Metabolism* 2016)。しかし現時点では十分な脂肪細胞分化能を持つヒト iPS 細胞由来前駆脂肪細胞が単離できず、詳細なメカニズムの解析は困難である。

一方、動物モデルでは従来の A-ZIP/F1 マウスなどのモデル動物でも脂肪組織が残存しないため十分な解析が困難であった。我々は ENU ミュータジェネシス法により 20 番目のアミノ酸がストップコドンに置換されるセイピンノックアウト (SK0) ラットを作製した (*Hum Mol Genet* 2015)。このモデル動物はヒト脂肪萎縮症と同様に高血糖、インスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝を呈し、脂肪組織については従来のモデル動物と比較すると脂肪萎縮はきたすものの僅かに脂肪組織が残存する。SK0 ラットの残存脂肪組織を用いて脂肪萎縮の分子基盤の解明から新たな肥満症・メタボリックシンドロームの新規治療標的の探索を目指す。

## 2. 研究の目的

脂肪萎縮症では脂肪組織の形成不全による脂肪組織の expandability の低下から脂肪組織における脂肪貯蔵の限界をきたし、肝臓や骨格筋等において異所性脂肪蓄積を引き起こす。一方、肥満症では肥満の進展に伴い脂肪細胞は肥大化し、脂肪組織リモデリングを引き起こし、脂肪組織の expandability の低下と lipid overflow により、肝臓や骨格筋等において異所性脂肪蓄積を引き起こす。脂肪組織量では対極にありながら脂肪萎縮症と肥満症は異所性脂肪蓄積や全身の糖脂質代謝異常を呈する点で非常に共通点が多い。本研究課題では脂肪萎縮症の残存脂肪組織を解析することで脂肪萎縮症の病態解明から肥満症・メタボリックシンドロームの治療を目指す。

## 3. 研究の方法

脂肪萎縮症と肥満症の共通病態としての脂肪組織炎症と線維化に着目しその病態を明らかにする(図1)。肥満の進展において認められる慢性炎症はインスリン抵抗性の発症基盤となり、さらに脂肪組織の線維化は脂肪組織の expandability の低下から脂肪組織における脂肪貯蔵の

限界をきたし、脂肪肝などの異所性脂肪蓄積を引き起こす。脂肪萎縮症における脂肪組織線維化は肥満症と同様に慢性炎症を伴い、ECM リモデリングを惹起するかについて組織学的、分子生物学的に詳細に検討する。さらに脂肪萎縮症モデルの SK0 ラットの残存脂肪組織の SVF 培養系を用いて、セイピンの脂肪細胞における役割を明らかにし脂肪萎縮の分子基盤の解明を行う。

## 脂肪組織炎症と脂肪組織線維化

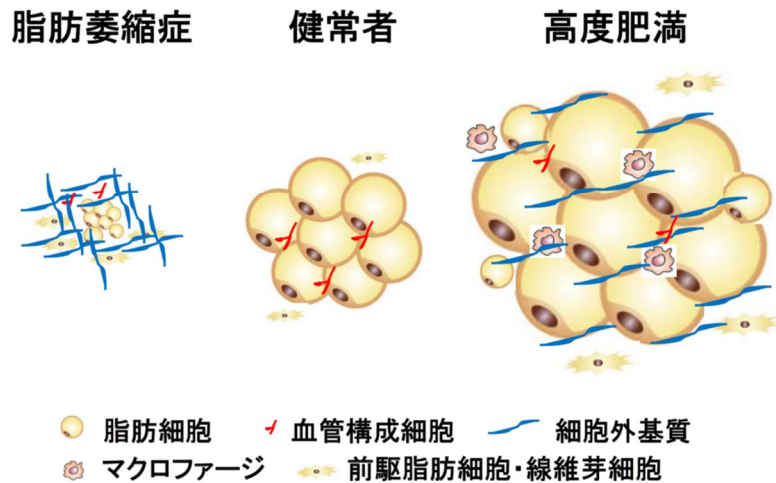


図 1

### 4. 研究成果

SK0 ラットは糖代謝プロファイルで脂肪萎縮症と同様に高血糖、高インスリン血症、高中性脂肪血症、脂肪肝などを呈した。

SK0 ラットの脂肪組織（鼠径部皮下脂肪組織、精巣周囲脂肪組織）では HE 染色と MTC 染色にて野生型と比較して顕著な脂肪蓄積の低下と結合織の増生が認められた。また電子顕微鏡像においても著な脂肪蓄積の低下と結合織の増生が認められた。

次に SK0 ラットと野生型ラットの遺伝子発現の検討を microarray で行い、QPCR で検証した。細胞外マトリックスを構成するコラーゲン (Col 1, 3, 4, 5, 6)、フィブロネクチン、プロテオグリカン、ラミニン等の発現と分解系の Matrix Metalloproteinase (MMP) 分子群の発現について検討を行った。マクロファージの浸潤や線維化を惹起する growth factor や chemokine 等の発現を検討した。

この結果、典型的な肥満脂肪組織で発現上昇が認められる線維化関連遺伝子群は脂肪萎縮症の残存脂肪組織では発現が低値であった。また同じく典型的な肥満脂肪組織で発現上昇が認められるマクロファージマーカー、ケモカイン、炎症性サイトカイン等の炎症関連遺伝子群も脂肪萎縮症の残存脂肪組織で顕著な上昇を認めるものはなかった。

続いて申請者らは既報 (Science 322:583-6, 2008) を参考にラット SVF 培養系を確立した。ラット間質血管分画 (SVF) の初代培養から前駆脂肪細胞分画を調整し、高効率な脂肪細胞分化誘導系の確立を行った。1 野生型ラット脂肪組織を従来の collagenase による digestion にて脂肪細胞分画と間質血管分画に分離する。2 間質血管分画から vasculature debris を除去し、40 μm フィルターに通し可能な限り血管構成細胞を除去する。3 培養皿に播種し、接着細胞が増殖する。コンフルエント 2 日後に脂肪細胞分化誘導開始。同様の手法を用いて SK0 ラットからも前駆脂肪細胞分画を調整した。得られた細胞集団の前駆脂肪細胞としての characterization を FACS による細胞表面抗原解析を行い、両者が同様の解析結果が得られている。分化誘導後、SK0

ラット由来細胞は野生型由来細胞と比較して著明な脂肪細胞分化障害及び脂肪蓄積障害をきたした。野生型と比較して分化誘導後の SK0 ラットの SVF では成熟脂肪細胞関連遺伝子群の低下が認められ、一方、分化誘導前の SK0 ラットの SVF において一部の線維化関連遺伝子の著明な発現上昇が認められ、脂肪萎縮の病態との関連が示唆され、今後の詳細な検討が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Ryota, Kusakabe Toru, Noguchi Michio, Iwakura Hiroshi, Tanaka Tomohiro, Miyazawa Takashi, Aotani Daisuke, Hosoda Kiminori, Kangawa Kenji, Nakao Kazuwa	4. 巻 59
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated Angptl8 knockout suppresses plasma triglyceride concentrations and adiposity in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1575 ~ 1585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M082099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada-Goto Nobuko, Ochi Yukari, Katsuura Goro, Yamashita Yui, Ebihara Ken, Noguchi Michio, Fujikura Junji, Taura Daisuke, Sone Masakatsu, Hosoda Kiminori, Gottschall Paul E., Nakao Kazuwa	4. 巻 65
2. 論文標題 Neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells as a functional tool of melanocortin system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 10 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.npep.2017.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口 倫生、日下部 徹、泉 諒太、中尾 一和
2. 発表標題 肝炎、肝硬変症例におけるANGPTL8遺伝子発現及び血中濃度と病態との関連についての検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日下部 徹、泉 諒太、野口 倫生、岩倉 浩、田中 智洋、青谷 大介、細田 公則、寒川 賢治、中尾 一和
2. 発表標題 ANGPTL8は肥満に合併する高中性脂肪血症発症に関与する可能性がある
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松原正樹、神田一、今村博臣、井上真由美、野口倫生、細田公則、垣塚彰、中尾一和
2. 発表標題 細胞治療を目指したiPS細胞のミトコンドリア機能解析
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 泉諒太、日下部徹、野口倫生、岩倉浩、小山博之、坂東美佳、宮澤崇、田中智洋、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 ANGPTL8のノックアウトラットの開発とその糖・脂質代謝調節における意義の検討
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 日下部徹、泉諒太、野口倫生、岩倉浩、宮澤崇、田中智洋、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 メタボリックシンドローム症例におけるANGPTL8/Betatrophinの組織別遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 泉諒太、日下部徹、野口倫生、岩倉浩、小山博之、坂東美佳、宮澤崇、田中智洋、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 ANGPTL8のノックアウトラットの開発とその糖・脂質代謝調節における意義の検討
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 野口倫生 中尾一和
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を用いた脂肪萎縮症の病態解明
3. 学会等名 第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野口倫生、日下部徹、泉諒太、中尾一和
2. 発表標題 セイビンノックアウトラットにおける脂肪萎縮の病態解明
3. 学会等名 第37回日本肥満学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 日下部徹、田中智洋、宮澤崇、青谷大介、野口倫生、阿部恵、海老原健、中尾一和
2. 発表標題 AGPAT2遺伝子変異による脂肪萎縮症～我が国における先天性脂肪萎縮症の遺伝子解析
3. 学会等名 第37回日本肥満学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森栄作、藤倉純二、中尾一泰、野口倫生、日下部徹、海老原健、田中孝之、浅香勲、細田公則、稲垣暢也、中尾一和
2. 発表標題 BSCL2遺伝子異常を有する先天性全身性脂肪萎縮症患者からの疾患特異的iPS細胞樹立と解析
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 泉諒太、日下部徹、野口倫生、岩倉浩、小山博之、坂東美佳、宮澤崇、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 Betatrophin/ANGPTL8のノックアウトラット開発とその糖脂質代謝調節における意義の解明
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 泉諒太、日下部徹、野口倫生、岩倉浩、小山博之、坂東美佳、宮澤崇、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 ベータトロフィンのノックアウトラット開発とその糖脂質代謝調節における意義の解明
3. 学会等名 第89回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2016年

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