

令和元年6月21日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12728

研究課題名(和文) ページュ脂肪細胞の可視化を目指した生体イメージング法の確立と抗肥満成分の探索

研究課題名(英文) Establishment of in vivo imaging methods for visualization of beige adipose cells and functional identification of anti-obesity components.

研究代表者

井原 勇人 (IHARA, HAYATO)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師

研究者番号：00223298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまで白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞様に変化させるページュ化を熱産生タンパクUCP-1遺伝子発現を指標にイメージングする系を研究してきた。この系を用いてページュ化を引き起こし、抗肥満効果を示す成分のスクリーニング並びに混合物から活性のある分画を同定することに用いることができるのではないかと考え、その可能性について検討してきた。UCP-1/ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いて、サンショウ成分のページュ化誘導作用を担う成分同定を試みた。また、培養脂肪細胞を用いてサンショウ分画成分の脂肪分化に与える影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今や国民の6人に1人が、メタボリック症候群もしくはその予備軍と考えられており、肥満症の予防・治療方法の確立は喫緊の課題である。蓄積エネルギー消費亢進機構に基づく抗肥満薬は今の所ない。我々は、これまでサンショウにはページュ化誘導を伴う抗肥満効果があることを示してきたが、有効成分が明らかではないため、熱産生タンパク遺伝子発現を指標に、生体イメージング方による抗肥満効果を示す成分を同定する方法を検証した。

研究成果の概要(英文)：We have studied the imaging methods for visualization of beige adipose cells using in vitro, in vivo systems. Among these studies, we thought this in vivo system using UCP-1/Luciferase reporter transgenic mice could be useful to identify anti-obesity compounds from natural foods. After oral administration of Sansho compounds (3% in diet) to the transgenic reporter mice, we used the IVIS-XR Imaging System to monitor luciferase activity in these transgenic mice. In abdominal tissue, we first detected luciferase signal in 4 weeks after administration of Sansho compounds and luciferase signal was increased every week. In some cases, we ectopically detected luciferase signal in testis. These observations indicate that this in vivo system would be useful as a screening tool. We need further investigation to assess tight correlation between luciferase activity and endogenous UCP-1 protein expression level.

研究分野：分子病態生理学

キーワード：生体イメージング 抗肥満成分 UCP-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、白色脂肪組織中に、様々な環境刺激や食事由来成分によって褐色細胞様に分化誘導されるベージュ脂肪細胞が、エネルギー消費を亢進する事から新しい肥満症治療への応用が期待されている。代表申請者 井原は、これまでメタボリック症候群発症の主な原因の1つである脂肪組織における悪玉のアディポカイン遺伝子発現増強の分子機構を研究する中で、1) 血栓危険因子 PAI-1 が、脂肪細胞分化に伴い核内受容体型転写因子 PPAR γ によって発現増強すること、また 2) レスベラトロールが脂肪細胞分化を抑制し、インスリン抵抗性惹起因子レジスチン遺伝子発現を抑制し、アポトーシス誘導する事をライブセルイメージング法で解析してきた。さらに 3) 悪玉アディポカインの PAI-1 転写調節領域/Luc レポーター導入脂肪細胞をヌードマウスに移植し、生体内光イメージング画像解析装置を用いて定量的に解析することも行ってきた。これまでの悪玉アディポカイン遺伝子発現解析とそのイメージング研究の経緯から、ベージュ化に関連する UCP-1 遺伝子発現を指標にベージュ化誘導因子を探索・同定する方法の開発をすべく今回の着想に至った。

2. 研究の目的

近年、肥満治療の観点から、食事、寒冷、 β 3 アドレナリン受容体や PPAR γ アゴニスト刺激により、白色脂肪の中に誘導される褐色脂肪様細胞（ベージュ細胞）が注目されている。蓄積脂肪のエネルギーを熱として放散する UCP-1 をはじめとするベージュ細胞マーカー遺伝子発現を指標とした新規生体イメージング法を開発し、その遺伝子発現を誘導する食品由来機能性素材を生体レベルで探索・同定する系を確立する事を目的とする。併せて、抗肥満活性を有する機能性素材をモデル候補化合物（特開 2016-108242）として、確立系の有効性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

ベージュ脂肪細胞イメージング可視化技術を確立するため、1) レポータートランスジェニックマウスを用いる系を用いて有効な機能性成分の同定を行うと共に、2) HPLC で分画した候補化合物を用いて培養脂肪細胞の分化に与える影響について解析を行う。

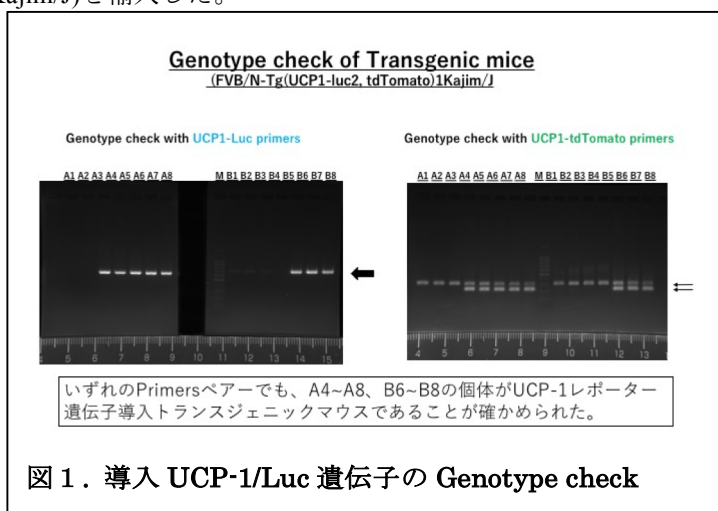
4. 研究成果

1) レポータートランスジェニックマウスを用いた機能性成分の探索と同定

当初上記 UCP-1/ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子導入トランスジェニックマウスを受託作成する予定であったが、米国ジャクソン研究所から入手することが可能であることがわかったため、UCP-1/Luciferase レポーター遺伝子を導入した Thermo Mouse (FVB/N-Tg(Ucp1-luc2, -tdTomato)/1Kajim/J) を輸入した。

これら輸入したマウスを繁殖させ個体数を増やすと同時に、個体識別のための耳パンチをした際に生じた耳片組織を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR 法により UCP-1/Luciferase レポーター導入遺伝子の存在を確認した（図 1）。矢印で示すように、UCP-1-Luc primers では 1 本のバンドが、また UCP1-

tdTomato primers では 2 本のバンドが検出された。それぞれ A4~A8 及び B6~B8 までの個体がトランスジェニックマウスである。導入遺伝子が確認された個体を用いてサンショウ成分投与実験に用いることとした。トランスジーンが確認されたのはいずれも雄の個体であった。Y 染色体にトランスジーンが挿入されているためであると、後に判明した。以降はオスの個体を用いて実験することとした。



まず最初に低温暴露に対する反応性を検討した。9℃でオーバーナイトに放置後、16時間後に IVIS-XR でルシフェラーゼ発光を観察したところ、褐色脂肪組織での発光が認められた(図2)。しかしながら睪丸での発光もみとめられ、Y染色体にレポーター遺伝子が挿入されていることに起因するものと考えられたが、原因は不明である。

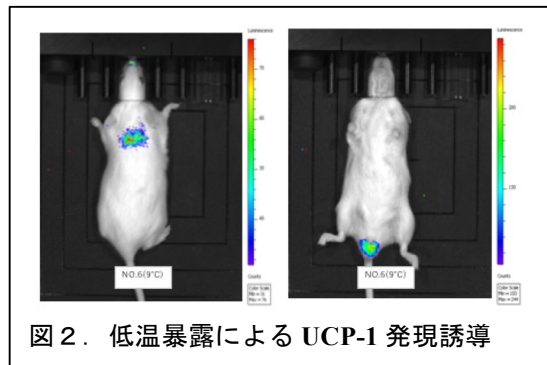


図2. 低温暴露による UCP-1 発現誘導

次に、β-アゴニスト CL-316,243 の腹腔内投与により、UCP-1/Luciferase の反応性も合わせて確認をした。CL-316,243 を 25 μg/mouse (1 mg/kg)を毎日1週間連続投与したところ、弱いながら腹腔内にルシフェラーゼ発光が認められた(図3)。予想に反して、褐色脂肪組織でのシグナルは認められていない。

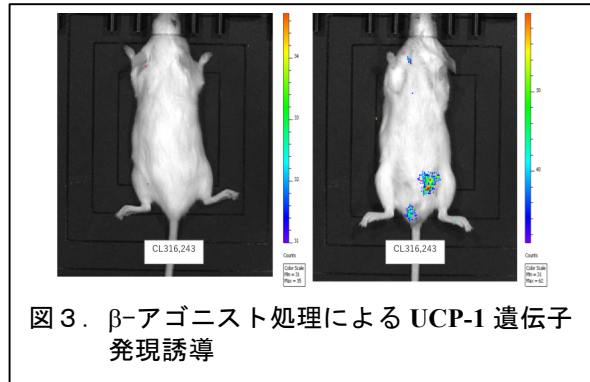


図3. β-アゴニスト処理による UCP-1 遺伝子発現誘導

抗肥満活性を示すサンショウ成分(サンショウの粉碎物)を3%混餌したものを連続投与し、腹腔内の UCP-1 発現について、レポータールシフェラーゼ発光を同一個体で経時的に観察した。図4には、同一個体での UCP-1/ルシフェラーゼによる発光シグナルの変化を示す。腹腔内の発光シグナルはサンショウ成分の投与後4週目あたりから観察されはじめ、5週目、6週目には睪丸と思われる場所に強いシグナルが認められている。さらに、7週目、8週目には腹腔内の部位にシグナルが認められ、8週、9週とサンショウ成分投与期間が長くなるにつれ、シグナルは強くなっているのが認められた。

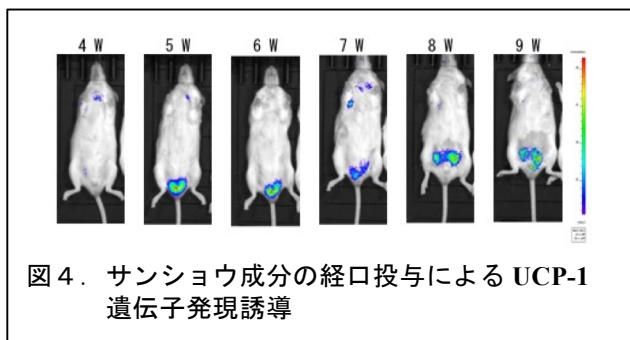


図4. サンショウ成分の経口投与による UCP-1 遺伝子発現誘導

以上のことから、Thermo Mouse (FVB/N-Tg(Ucp1-luc2, -tdTomato) / 1 Kajib/J)を用いた UCP-1/Luciferase シグナルを指標とした生体イメージング法によるベージュ化誘導化合物のスクリーニングに使用できる可能性が示された。しかしながら、睪丸部位が発光する非特異的なシグナル発現が見られるなどの問題点が見られることから、発光部位の特定と内在性 UCP-1 遺伝子発現との整合性を確認する必要があるものと考えられる。現在、下記の分取型 HPLC によるピーク画分を用いて UCP-1 遺伝子発現誘導が起こるかどうか、引き続き生体イメージング法で確認しているところである。ベージュ化誘導成分の特定ができるものと思われる。

2) サンショウ成分の脂肪細胞分化に対する影響

HPLC 分析によってサンショウ成分を分画したところ、抗肥満活性のあった 70%EtOH 画分には、フラボノイド類の他、Hydroxy-α, β, α, β, γ, δなどのサンショオール類が存在することが明らかとなった(図5)。これらの単一成分画分は分取型 HPLC で分取することにしたが、分取できる量は非常に少ない。

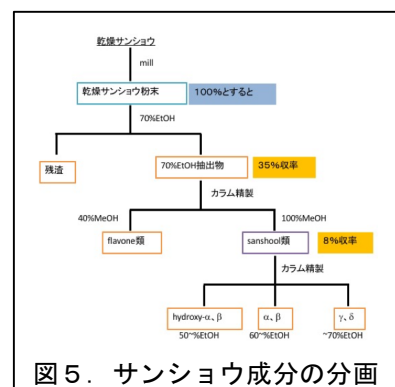


図5. サンショウ成分の分画

そこで、まず培養脂肪細胞 3T3-L1 を用いて、分画成分の脂肪細胞分化に与える影響を見ることにした。70%EtOH (エタノール) 抽出物は、出発物質を 100%とすると収量 35%であり、さらにカラム精製後 100%MeOH (メタノール) 抽出物は、主にサンショオール類であった。これらを分化誘導物質 (インスリン、デキサメサゾン、IBMX) と共に同時添加した場合脂肪細胞分化過程においてどのような影響があるかを検討した (図 6)。

3 μ g/ml, 10 μ g/ml, 30 μ g/ml を添加し、経過時間に伴う脂肪細胞の形態的变化と Oil Red O (ORO)染色による脂肪細胞分化の度合いを評価した。

図 6 に示されるように、両分画とも 3 μ g/ml, 10 μ g/ml 各濃度添加により、特に脂肪細胞分化の大きな形態的な変化は見られなかった。さらに ORO 染色で脂肪の蓄積を評価したが、染色像の大きな変化は見られなかった。一方で 100%MeOH 抽出画分 30 μ g/ml の濃度添加では、脂肪細胞が培養プレートから剥がれ死滅していることが観察された。その後もプレートに残存した前駆脂肪細胞が増殖したが、他の濃度添加のものとは大きく形態が異なった。また ORO 染色では、ほとんど染まる細胞はなかった。

以上の結果から、分化誘導過程において 100%MeOH 抽出画分 30 μ g/ml を添加すると脂肪細胞分化を抑え、分化過程にある前駆脂肪細胞もしくは脂肪細胞そのものを死滅することが明らかとなった。

100%MeOH 抽出画分には、主にサンショオール類が中心に存在していることから、次に存在割合が最も多い Hydroxy- α -sanshool 及び Hydroxy- β -sanshool 画分を用いて検討を行った。

上記の実験と同じく分化誘導物質と共に同時添加し、Day 5 での ORO 染色の結果を図 7 に示す。100%MeOH 抽出画分 30 μ g/ml を添加したものと同様、Hydroxy- β -sanshool 画分 (単一成分ではない) を 45 μ g/ml を添加したものでは、脂肪細胞が培養プレートから剥がれ死滅していることが観察された。Hydroxy- β -sanshool 画分には、アポトーシスカネクロシスかは不明であるが、分化過程にある前駆脂肪細胞もしくは脂肪細胞そのものを死滅させる活性があるものと推察される。

サンショオール類は、経口投与の後、脂肪組織に到達し直接作用を及ぼしているかどうかはまだ不明であるが、作用機序として 1) ベージュ化により蓄積脂肪を燃焼させる効果と、2) 新しく生じる分化脂肪細胞を死滅させる効果の異なる作用効果があるものと考えられる。

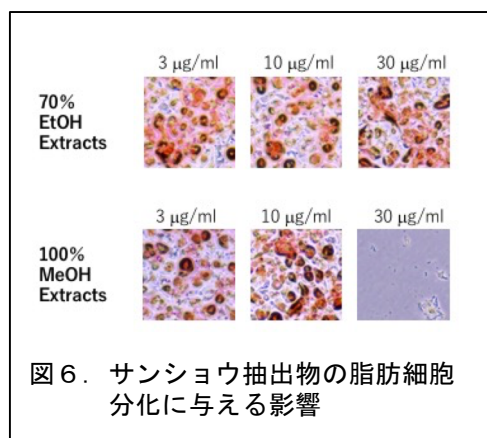


図 6. サンショウ抽出物の脂肪細胞分化に与える影響

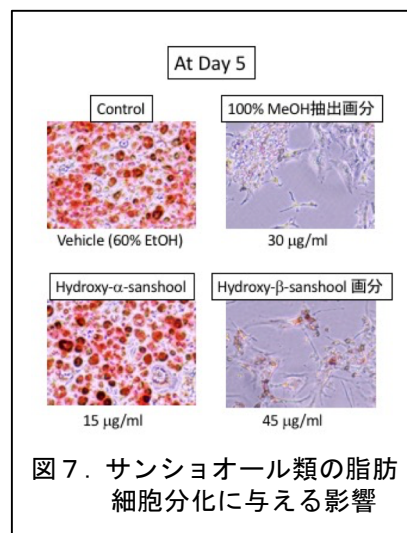


図 7. サンショオール類の脂肪細胞分化に与える影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Goto M, Yasuoka Y, Nagahama H, Muto J, Omori Y, Ihara H, and Mukai T. ANOMALOUS CHANGES IN ATMOSPHERIC RADON CONCENTRATION BEFORE AND AFTER THE 2011

NORTHERN WAKAYAMA EARTHQUAKE (MJ 5.5) *Radiation Protection Dosimetry* (2016), pp. 1–7 doi:10.1093/rpd/ncw142

2. Nakao T, Kohsaka A, Otsuka T, Thein LZ, Le HT, Waki H, Gouraud SS, Ihara H, Nakanishi M, Sato F, Muragaki Y, Maeda M. Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice. *Chronobiol Int*, ;35 (4): 499 -510. 2018
3. Takehima K, Ariyasu H, Ishibashi T, Kawai S, Uraki S, Koh J, Ito H, Akamizu T. Myotonic dystrophy type 1 with diabetes mellitus, mixed hypogonadism and adrenal insufficiency. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2018 Jan 18;2018. pii: 17-0143. doi: 10.1530/EDM-17-0143. eCollection 2018.
4. Takehima K, Ariyasu H, Iwakura H, Kawai S, Uraki S, Inaba H, Furuta M, Warigaya K, Murata SI, Akamizu T. Predominant Improvement of Alpha Cell Function after Steroid Therapy in a Patient with Autoimmune Pancreatitis: Case Report. *Diabetes Ther*. 2018 Jun;9(3):1385-1395. doi: 10.1007/s13300-018-0434-0. Epub 2018 May 3.

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 中尾友美、向阪 彰、レ ティ フォエ、大塚剛司、テン ソウ レン、佐藤冬樹、井原勇人、村垣泰光、前田正信 「Comparative transcriptome analysis between *Bmal1* and *Rev-erba* deficient hearts reveals the transcriptional network linking clock and heart function」第 23 回 日本時間生物学会学術大会 2016. 11. 12-13 名古屋大学
2. 中尾友美、向阪 彰、レ ティ フォエ、大塚剛司、テン ソウ レン、佐藤冬樹、井原勇人、前田正信 「時計遺伝子欠損マウスのトランスクリプトーム解析による慢性心不全の原因遺伝子の探索」第 109 回 近畿生理学談話会 2016. 11. 5 大阪市立大学
3. 井原勇人 「和歌山県産サンショウの抗肥満効果について」 *メディカルジャパン 2017* 関西広域連合 研究成果起業家促進セミナー 2017. 2. 15 インテックス大阪
4. Nakao, T., Kohsaka, A., Stuka, T., Le, H.T., Thein, Z.L., Sato, F., Ihara, H., Murasaki, Y., Maeda, M. Heart-specific disruption of *Bmal 1* leads to hepatic insulin resistance in mice. : Experimental Biology 2017 (EB2017) シカゴ、USA
5. 井原勇人、竹島健、山下雅礼、門脇昭夫、大西沙代、岸田邦博、我藤伸樹、赤水尚史 : 和歌山県産サンショウの抗肥満効果の解析 第 71 回 日本栄養食糧学会大会 那覇
6. 井原勇人、竹島健、山下雅礼、門脇昭夫、大西沙代、岸田邦博、我藤伸樹、赤水尚史 : Anti-obesity effects of Japanese pepper, Sansho, in high-fat diet-induced obese mice through induction of beige adipocytes (白色脂肪細胞のベージュ化を伴うサンショウの抗肥満効果の解析) : 生命科学系学会合同年次大会 2017 (ConBio2017)
7. 井原勇人、竹島健、山下雅礼、門脇昭夫、大西沙代、岸田邦博、我藤伸樹、赤水尚史 白色脂肪細胞のベージュ化を伴うサンショウの抗肥満効果の解析 第 15 回 日本機能性食品医学学会総会
8. 中尾友美、向阪彰、レティ ファオ、大塚剛司、テン ソーレン、佐藤冬樹、井原勇人、前田正信 心臓特異的な時計遺伝子 *Bmal 1* の欠損は肝臓のインスリン抵抗性を惹起する 第 90 回 日本内分泌学会学術総会

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：「血中パラメータ改善剤」

発明者：我藤伸樹、門脇昭夫、井原勇人

権利者：中野 BC（株）、和歌山県立医科大学

種類：特許

番号：特開 2016-108242

出願年：2014
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：向阪 彰

ローマ字氏名：Kousaka Akira

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00458051

研究分担者氏名：竹島 健

ローマ字氏名：Takeshima Ken

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：40647517

※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。