

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15090

研究課題名(和文) ビタミンAによる脂肪細胞の分化制御を調節する新規メカニズムの探索

研究課題名(英文) Approach to identify a novel mechanism which modulates vitaminA regulation of adipocyte differentiation

研究代表者

木岡 紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90234179

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)：間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、ビタミンAの活性成分であるレチノイン酸、および、細胞を取り囲む細胞外基質の「硬さ」により調節されている。細胞外基質の硬さを感じ取るセンサーとして働く接着斑タンパク質ビネキシンがレチノイン酸受容体(RAR) と結合することから、レチノイン酸が「硬さ」応答性と協調することで、幹細胞の分化を制御している、という仮説を考え検証した。ビネキシンの発現抑制は、レチノイン酸による骨芽細胞分化マーカーの発現上昇を亢進し、仮説を支持した。ただ明確に解釈できない結果も得られた。今後さらにこの制御メカニズムについて検討すべきである。

研究成果の概要(英文)：Differentiation of mesenchymal stem cells can be regulated by either retinoic acid, an active metabolite of vitamin A, or stiffness of extracellular matrix (ECM). We previously reported that vinexin, a focal adhesion protein, is involved in sensing ECM stiffness. Given the association of vinexin with retinoic acid receptor, it is hypothesized that retinoic acid and ECM stiffness function cooperatively for regulating the differentiation of mesenchymal stem cells. We examined the effect of vinexin depletion on retinoic acid-induced differentiation. The result partly supports the hypothesis, but also suggests complicated regulation.

研究分野：応用細胞生物学

キーワード：ビタミンA 脂肪細胞 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

中高年男性の三人に一人が肥満(脂肪組織の肥大)のため、代謝異常症の予備軍となるなど、肥満は日本人の健康に大きな問題となっている。逆に畜産業においては幹細胞の脂肪細胞への分化を促進させ、筋肉に効率よく脂肪を交雑させる(霜降り肉)ことが望まれている。このように幹細胞の脂肪細胞への分化を制御することは非常に重要な課題である。

細胞を取り囲むコラーゲンなどの細胞外基質の硬さには、幹細胞が分化するための至適な硬さがあることがわかってきた。軟らかい(数 kPa)範囲では脂肪細胞への分化に至適であり、やや硬い(~10kPa)範囲やもっと硬い(数 10kPa)範囲ではそれぞれ筋芽細胞と骨芽細胞への分化に至適である。申請者は細胞と細胞外基質の接着部位に局在するタンパク質ピネキシンとピンキュリンが硬さを感じ取るセンサーであることを繊維芽細胞で見だし、ピンキュリンが脂肪細胞への分化の「至適な硬さ」の調節に必要であることを明らかにしている。

ビタミン A は脂肪細胞への分化を抑制し、筋芽細胞への分化を促進する。畜産業では、ビタミン A 欠乏食による脂肪分化促進を利用し、和牛(霜降り肉)の生産が行われている。しかしビタミン A 欠乏による失明、浮腫などが動物福祉の観点から問題となっている。ビタミン A の活性成分であるレチノイン酸は、核内受容体であるレチノイン酸受容体 RAR と結合して機能を発揮する。最近、申請者が細胞外基質の硬さを感じ取るセンサーであることを明らかにしたピネキシンが RAR の一つ RAR と結合することが報告された。また、RAR の核局在が細胞外基質の硬さにより調節される可能性も示唆されている。これらの報告は、レチノイン酸と細胞外基質の硬さという性質の異なる要因が統合され、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を制御しているという全く新しい可能性を示すが、詳細は

不明である。

2. 研究の目的

レチノイン酸経路と細胞外基質の硬さの感知というシグナル経路が統合され、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を制御しているという仮説を検証するために、本研究ではレチノイン酸(および RAR)と ECM の硬さによる間葉系幹細胞の分化調節に関わるピネキシンととの関連について検討した。

3. 研究の方法

(1) 結合実験

間葉系幹細胞として、本研究ではマウス間葉系幹細胞株 10T1/2 細胞および ST2 細胞を用いた。これら間葉系幹細胞内での RAR とピネキシン、との相互作用について、精製ピネキシン、を用いたプルダウンアッセイと共免疫沈降実験を行った。

(2) 細胞分化の条件、および分化の評価

レンチウイルスを用いてピネキシンの発現を抑制した間葉系幹細胞株 10T1/2、ST2 を作製した。この細胞をデキサメタゾン、インスリン、IBMX で 2 日間刺激し、その後インスリン含有培地で 4~8 日間培養することで細胞分化を誘導した。脂肪細胞への分化は、脂肪酸結合タンパク質 aP2 と脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR の mRNA 発現量を、骨芽細胞への分化はアルカリホスファターゼ(ALP)の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量することで評価した。

4. 研究成果

(1) ピネキシンと RAR 結合について

ピネキシンと RAR の結合をまず *in vitro* プルダウンアッセイで確認した。ピネキシンのスプライシングバリエーションであるピネキシン とピネキシン を大腸菌で発現、精製し、これを用いて 293T 細胞で発現させた RAR を沈降させた。ピネキシン はピネキシンの領域に加え、N 末端側に 404 アミノ酸を含む長いバリエーションである。ピネキシン およ

び は、3種類のレチノイン酸受容体(RAR、
、)をのうち、RAR をより多く共沈降
させた。ピネキシンはピネキシンのより多
くのRAR を共沈降させた。

次に間葉系幹細胞内でのピネキシンと
RARの結合について、10T1/2細胞を用いた
共免疫沈降実験で評価した。その結果、ピネ
キシン、ピネキシンのともにRARを共沈
降させたが、*in vitro* プルダウンアッセイと
同様、ピネキシンの方が効率よくRARと
共沈降した。これらの結果から、ピネキシ
ンおよびは間葉系幹細胞でRARに結合し、
機能することが示唆された。

(2) レチノイン酸による分化制御へピネキシ ンが与える影響

レンチウイルスを用いてピネキシンの発
現を抑制した10T1/2細胞を作製し、レチ
ノイン酸とピネキシンが分化に与える効果
を調べた。細胞をシャーレに播種し、分化刺激

を加えるとともに
レチノイン酸
(1 μM)を持続的
に添加したとこ
ろ、コントロール
細胞のaP2発
現は抑制され、
ALPの発現は上
昇した(図)。この
レチノイン酸添

加の効果はピネキシン発現抑制細胞ではよ
り顕著に表れることがわかった。また、同様
の実験を軟らかい培養基板であるアミノカ
プロン酸アクリルアミドゲル上に細胞を播
種して行ったところ、同様の効果が見られた。
このことからピネキシンがレチノイン酸経
路を調節している可能性が示唆された。

次にピネキシンの効果を確認するために、
ピネキシン発現抑制細胞にピネキシンを再
発現させた細胞を作成した。再発現細胞でア
ルカリホスファターゼなどの分化マーカー

の発現が一部の条件でレスキューされたが、
レスキューされない条件、指標もあった。

10T1/2細胞で見られたピネキシンとレチ
ノイン酸経路との関連が細胞特異的か間葉
系幹細胞で普遍的にみられるものかについ
て検証するために、別の間葉系幹細胞株ST2
を用いて同様の実験を行った。その結果、
10T1/2細胞と同様にピネキシン発現抑制細
胞ではコントロール細胞に比べて脂肪細胞
マーカー(aP2、PPAR γ)のmRNA発現量が低
く、また一方でALPのmRNA発現量が高か
った。この傾向は2種類のピネキシン発現抑
制細胞で確認された。一方で、ST2細胞もピ
ネキシン再発現細胞を作成したが、再発現に
よるレスキューは一部の条件、指標で見られ
たが、レスキューしない条件、指標もあった。
これらの結果は、ピネキシンとレチノイン酸
シグナルが協調して細胞分化を制御してい
るという仮説を支持しているが、同時に複雑
な制御メカニズムが働いていることも示唆
している。今後さらに検討をすすめ、この複
雑な制御メカニズムを解明すべきである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9件)

Ishigami, M., Ogasawara, F., Nagao, K.,
Hashimoto, H., Kimura, Y., Kioka, N.,
and Ueda, K. Temporary sequestration of
cholesterol and phosphatidylcholine
within extracellular domains of ABCA1
during nascent HDL generation. **Sci Rep**,
2018, 8,
6170,10.1038/s41598-018-24428-6.

Kuroda, M., Wada, H., Kimura, Y., Ueda,
K., and Kioka, N. Vinculin promotes
nuclear localization of TAZ to inhibit
ECM stiffness-dependent differentiation
into adipocytes. **J Cell Sci**, 2017, 130,
989-1002,10.1242/jcs.194779.

Ichikawa, T., Kita, M., Matsui, T. S.,
Nagasato, A. I., Araki, T., Chiang, S. H.,
Sezaki, T., Kimura, Y., Ueda, K., Deguchi,
S., Saltiel, A. R., and Kioka, N. Vinexin
family (SORBS) proteins play different
roles in stiffness-sensing and contractile
force generation. **J Cell Sci**, 2017, 130,
3517-3531,10.1242/jcs.200691.

- Nagasato, A. I., Yamashita, H., Matsuo, M., Ueda, K., and Kioka, N. The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in sensing stiffness of extracellular matrix. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2017, 81, 1136-1147,10.1080/09168451.2017.1289074.
- Omachi, T., Ichikawa, T., Kimura, Y., Ueda, K., and Kioka, N. Vinculin association with actin cytoskeleton is necessary for stiffness-dependent regulation of vinculin behavior. **PLoS One**, 2017, 12, e0175324,10.1371/journal.pone.0175324
- Fukuda, S. P., Matsui, T. S., Ichikawa, T., Furukawa, T., Kioka, N., Fukushima, S., and Deguchi, S. Cellular force assay detects altered contractility caused by a nephritis-associated mutation in nonmuscle myosin IIA. **Dev Growth Differ**, 2017, 59, 423-433,10.1111/dgd.12379.
- Fukada, T., Sakajiri, H., Kuroda, M., Kioka, N., and Sugimoto, K. Fluid shear stress applied by orbital shaking induces MG-63 osteosarcoma cells to activate ERK in two phases through distinct signaling pathways. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 2017, 9, 257-265,http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.01.004.
- Tomioka, M., Toda, Y., Manucat, N. B., Akatsu, H., Fukumoto, M., Kono, N., Arai, H., Kioka, N., and Ueda, K. Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. **Biochim Biophys Acta**, 2017, 1862, 658-665,10.1016/j.bbalip.2017.03.012.
- Sano, O., Tsujita, M., Shimizu, Y., Kato, R., Kobayashi, A., Kioka, N., Remaley, A. T., Michikawa, M., Ueda, K., and Matsuo, M. ABCG1 and ABCG4 Suppress gamma-Secretase Activity and Amyloid beta Production. **PLoS one**, 2016, 11, e0155400,10.1371/journal.pone.0155400.
- [学会発表](計 22 件)
1. 間葉系幹細胞の細胞外基質の硬さに対する応答における SORBS ファミリータンパク質の役割, 口頭, "黒田美都, 植田和光, 木岡紀幸", 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2017 年 3 月 15-18 日、国内
 2. ABCA1 は細胞内でコレステロールを動かすことによって細胞遊走を制御する, 口頭, 伊藤志帆, 木岡紀幸, 植田和光, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2017 年 3 月 15-18 日、国内
 3. 超音波処理を用いた接着斑単離法の確立, 口頭, 柴原正和, 市川尚文, 箕浦広大, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2017 年 3 月 15-19 日、国内
 4. "VINCULIN AND VINEXIN FAMILY (SORBS) PROTEINS IN MECHANOSENSING AND MECHANOTRANSDUCTION", 招待講演, "Noriyuki Kioka, Takafumi Ichikawa, Mito Kuroda, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda", 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MECHANOBIOLOGY, 2017 年 12/11-14 国外
 5. The Distribution of Vinculin to Lipid Rafts Plays an Important Role in Sensing Stiffness of Extracellular Matrix, ポスター, "Ayaka Nagasato-Ichikawa, Hiroshi Yamashita, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka", Mechanical forces in Biology, 2017 年 7 月 12 日 ~ 15 日、国外
 6. Vinculin Promotes Nuclear Localization of TAZ to Inhibit ECM Stiffness-Dependent Differentiation into Adipocytes, poster, "Mito Kuroda, Hiroki Wada, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka", "Gorden Research Seminar on Fibronectin, Integrin & Related Molecules", 2017/1/28-29
 7. Vinculin Promotes Nuclear Localization of TAZ to Inhibit ECM Stiffness-Dependent Differentiation into Adipocytes, poster, "Mito Kuroda, Hiroki Wada, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka", "Gorden Research Conference on Fibronectin, Integrin & Related Molecules", 2017/1/29-2/3
 8. 細胞外マトリックスの硬さによる細胞分化制御へのピンキュリン-YAP/TAZ 系の関与, 招待講演, 黒田美都, 市川尚文, 長里彩花, 大町朋弘, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12/6-9、国内
 9. 接着斑タンパク質ピネキシンおよび CAP は YAP/TAZ の核局在を調節する, ポスター, "黒田美都, 植田和光, 木岡紀幸", 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 7 日、国内
 10. 接着斑タンパク質ピネキシンがレチノイン酸により制御される間葉系幹細胞分化に与える効果, ポスター, 高田恭子, 黒田美都, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 7 日、国内
 11. ABCA1 は細胞内でコレステロールを

- 動かすことによって細胞遊走を制御する,ポスター,伊藤志帆、木岡紀幸、植田和光,2017年度生命科学系学会合同年次大会,2017年12/6-9、国内
12. ビンキュリンはアクチン細胞骨格を介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する,口演,"黒田 美都, 植田 和光, 木岡 紀幸",2017年(平成30年度)日本農芸化学学会大会,2017/3/17-20
 13. 間葉系幹細胞分化のレチノイン酸制御に与える接着斑タンパク質ピネキシンの影響,口演,"高田 恭子,黒田 美都, 木村 泰久,植田 和光, 木岡 紀幸",2017年(平成30年度)日本農芸化学学会大会,2017/3/17-20
 14. ビネキシンのホスファチジン酸結合領域の解析,口演,伊藤 有亮.、市川 尚文、折田 雄一郎、安部 真人、木村 泰久、植田 和光、三芳 秀人、木岡 紀幸,2017年(平成29年度)日本農芸化学学会大会,2017/3/17-20
 15. ビネキシンの両親媒性ヘリックスはビンキュリンの構造変化に必要である,口演,日野直也、市川尚文、木村泰久、植田和光、木岡紀幸,2017年(平成29年度)日本農芸化学学会大会,2017/3/17-20
 16. 細胞収縮力発生におけるピネキシシンファミリータンパク質の役割,口演,市川尚文、松井 翼、荒木 智彦、喜多 真弘、植田 和光、出口 真次、木岡 紀幸,2017年(平成29年度)日本農芸化学学会大会,2017/3/17-20
 17. 細胞外基質の硬さの感知と収縮力発生におけるピネキシシンファミリータンパク質の役割,口演、ポスター,市川尚文、喜多真弘、植田和光、○木岡紀幸,第69回日本細胞生物学会大会,2017年6月13日~15日、国内
 18. "ビンキュリンは細胞外基質の硬さに応じてTAZの核局在を促進し、脂肪細胞への分化を抑制する",口演、ポスター,"黒田美都, 和田洋樹, 植田和光, 木岡紀幸",第69回日本細胞生物学会大会,2017年6月13日~15日、国内
 19. 間葉系幹細胞の脂肪細胞分化におけるピネキシシンファミリータンパク質の役割,ポスター,"黒田美都, 植田和光, 木岡紀幸",第22回アディポサイエンス・シンポジウム,2017年8月19日、国内
 20. 細胞収縮力発生におけるピネキシシンファミリータンパク質の役割,口演,"市川尚文 1、木村泰久 1、植田和光 1,2、木岡紀幸 1,2",2017年 生体運動研究合同班会議,2017/1/6-1/8
 21. Focal Adhesion Protein Vinculin Regulates ECM-Stiffness Dependent Differentiation to Adipocytes through

Promoting Nuclear Localization of YAP/TAZ,poster,"Mito Kuroda, Hiroki Wada, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka",12th International Congress on Cell Biology (ICCB2016),2016/7/21-25

22. 細胞非接着能を有するフッ素改質基材の開発,口演,小泉美子†、久保田浩治†、森田正道†、木岡紀幸‡、植田和光‡,第65回高分子討論会,2016/9/14-9/16

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木岡紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90234179