

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15150

研究課題名(和文) C8 の脂肪細胞分化・糖脂質代謝系における生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological impact of C8 gamma in adipocyte differentiation and glycolipid metabolism

研究代表者

中西 剛 (Nakanishi, Tsuyoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50303988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR/Cas9システムを用いてC8欠損マウスを作製するとともに、このマウスを用いてC8の脂肪細胞分化・糖脂質代謝系における生理学的意義の解明を試みた。その結果、Exon5から下流のイントロン部分にかけて302 bpの欠失が認められたマウスが得られた。またC8の欠損は、通常時においては糖脂質代謝系に特段の影響を与えなかったが、高脂肪食摂取時においては雄性マウスにおいて有意な重量の低下作用が認められた。したがってC8は、高エネルギー摂取時の褐色脂肪の分化や形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In our current study, we generated C8 gamma-deficient mice using the CRISPR/Cas9 system and investigated the physiological impact of C8 gamma in adipocyte differentiation and glycolipid metabolism using the mice. Seven deletion-mutant mice were obtained and one of them (C8g-KO#1) was observed 302 bp DNA deletion from Exon5 to the intron portion of the downstream. In addition, mRNA expression of C8gamma was not detected in any tissue of homo C8g-KO#1. The deficient of C8 gamma had no effect on lipidemia and body weight gain induced by high-fat diet, but promoted the reduction of brown adipocyte mass. Our findings suggest that C8 gamma may be involved in brown adipocyte differentiation in obesity development.

研究分野：分子毒性学

キーワード：リポカリン メタボリック症候群 CRISPR/Cas9 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

リポカリン分子は、疎水性物質の運搬体として名付けられた分子量 15~25K Da の細胞外分泌タンパク質で、8本の逆平行 β 鎖からなる β -バレルとC末端側の α -ヘリックスで構成されている。脊椎動物のみならず、一部の無脊椎動物や植物、細菌類にまで存在し、現在では65種類以上の分子の存在が確認されている。元来リポカリン分子は、疎水的な有機物(レチノール、脂肪酸、ステロイドなど)と結合する分子として見いだされ、主にその輸送に関わると考えられてきたが、近年、予想もしなかった様々な生物機能に参与することが明らかにされつつある。

その典型例としては、肝臓から産生されるレチノール輸送担体として見いだされた Retinol-binding protein 4 (RBP4) が挙げられる。RBP4は、肝臓のみならず脂肪細胞からも産生され、脂肪細胞の Glucose transporter 4 (GLUT4) の発現を制御していることが近年明らかにされた。また最近では、インスリン抵抗性糖尿病の診断マーカーとしても応用されつつある[1,2]。この他にも Lipocalin-2 (LCN2) [3]、Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) [4]なども、脂肪細胞などから産生されることが明らかにされるとともに、その血中濃度が肥満やインスリン抵抗性糖尿病などと相関することが臨床的に示されている。リポカリン分子については、その機能に関する情報が極めて断片的であり、機能自体が不明な分子や一部の機能しか解明されていない分子が多く残されているが、我々は前述のような先行研究から、リポカリン分子が脂肪細胞分化や糖脂質代謝系において、なんらかのネットワークを構築しているのではないかという作業仮説を立てた。ここでいうところネットワークとは、サイトカインやステロイドホルモンのように、それぞれの産生や作用を互いに制御し合っているようなものを想定している。この作業仮説のもと、我々はマウス胎生線維芽細胞 (MEF) を用いた脂肪細胞分化モデルや、高脂肪食負荷をかけたマウスの白色脂肪組織におけるリポカリン分子の遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果、脂肪細胞分化に伴って発現が上昇する分子として C8 γ を新たに見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて C8 γ 欠損マウスを作製し、以下に挙げる項目について検討を行うことで、C8 γ の糖脂質代謝系における生理学的意義の解明を試みる。(1) C8 γ 欠損マウスの変異導入部位の解析、(2) C8 γ 欠損マウスのライン化、(3) 通常時および高脂肪食負荷時における全身

でのリポカリンおよび C8 γ 発現プロファイルの解析、(4) 高脂肪食負荷時における C8 γ 欠損マウスの表現型および糖脂質関連因子の解析

3. 研究の方法

(1) C8 γ 欠損マウスの作製

C8 γ 欠損マウスは、pX330 ベクターに2種類の sgRNA 配列 (PAM 領域を含む 23 bp ; #1 と #2) を導入したプラスミドを C57BL/6 マウス由来の受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植することで作製した。マウスの飼育は、温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 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) 変異導入の確認

得られたファウンダーマウスのゲノム DNA の標的部位を PCR で増幅し、ミスマッチ DNA 特異的に切断する酵素 T7 Endonuclease I (T7E1) で PCR 産物を処理後、その切断状況を電気泳動により確認した。さらに変異導入が認められた検体については、詳細な変異状態を確認するためにシーケンス解析を行った。変異導入が確認されたファウンダーマウスについては C57BL/6 マウスと交配し、ライン化を行った。

(3) 高脂肪食負荷試験

雌雄ともに4週齢から通常食(13 kcal% 脂肪含有量)の代わりに高脂肪食(60 kcal% 脂肪含有量)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。

(4) 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 を使い、各測定値を補正した。

(5) 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。

4. 研究成果

(1) C8 γ 欠損マウスにおける変異導入の確認

C8 γ は7つのExonから構成されているが、今回はExon2または5のそれぞれに変異を導入できる二種類のsgRNAを用いて欠損マウスの作製を行った。Exon2に変異を導入して得られた4匹のファウンダーマウスでは、いずれもExon2中に2bpの欠失が確認された。一方で、Exon5に変異を導入したマウスについては、Exon5から下流のイントロン部分にかけて302bpの欠失が認められたものが確認された。またこれ以外にもExon5中で11bpが欠失したものや、3bpが欠失して新たに13bpが挿入されたものが確認された。いずれの7匹ともにF1世代でも同様の変異が確認されたことから、生殖細胞列で変異が維持されているものと判断し、各マウスのライン化を行った。またsgRNAの上流配列全20bpに対し相同性の高い部位を探索し、上位10遺伝子を対象にオフターゲット効果について検討を行ったところ、変異導入は確認されなかった。

(2) 通常食飼育時におけるC8 γ 欠損の糖脂質代謝系への影響

302bpの欠失が認められたラインについてホモ化を行い、C8 γ 欠損マウスを作製した。このマウスを用いて、通常食飼育時におけるC8 γ 欠損の糖脂質代謝系への影響を検討した。その結果、ホモ欠損マウスでは雌雄共に肝臓におけるC8 γ mRNA発現およびタンパク質発現の消失が確認された。また4週齢から12週齢まで通常食を与えて野生型マウスと比較検討を行ったところ、体重変化に特段の差は認められず、12週齢における肝臓重量および脂肪重量にも変化は認められなかった。また雌雄マウスの各種血清マーカーについて検討を行ったところ、グルコース、コレステロール、トリグリセリド、中性脂肪の各レベルには影響が認められなかった。また白色脂肪中の糖脂質代謝関連遺伝子の発現にも影響が認められなかった。しがたってC8 γ は、通常時においては糖脂質代謝系に特段の影響を与えない可能性が示唆された。

(3) 高脂肪食負荷時におけるC8 γ 欠損の糖脂質代謝系への影響

次に4週齢から16週齢まで12週間高脂肪食(60kcal%脂肪含有量)負荷を与えた検討を行った。その結果、体重増加には影響が認められなかった。また実験終了時の臓器重量についても検討を行ったところ、肝臓、腎臓、

心臓、胸腺、脳、肺、精巣、精巣上体、前立腺、白色脂肪では影響が認められなかったが、褐色脂肪については、雄性C8 γ 欠損マウスにおいて有意な重量の低下が認められた。一方で、糖脂質代謝系に与える影響を検討するために各種血清マーカーについても検討を行ったが、グルコース、コレステロール、トリグリセリド、中性脂肪の各レベルには影響が認められなかった。しがたってC8 γ は、褐色脂肪の分化や形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Qin Yang, Timothy E. Graham, Nimesh Mody, Frederic Preitner, Odile D. Peroni, Janice M. Zabolotny, Ko Kotani, Loredana Quadro, Barbara B. Kahn: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 2005, 356-362.
- ② Timothy E. Graham, Qin Yang, Matthias Blüher, Ann Hammarstedt, Theodore P. Ciaraldi, Robert R. Henry, Christopher J. Wason, B.S., Andreas Oberbach, Per-Anders Jansson, Ulf Smith, Barbara B. Kahn: Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *The New England Journal of Medicine* 354, 2006, 2552-2563.
- ③ Yu Wang, Karen S. L. Lam, Edward W. Kraegen, Gary Sweeney, Jialiang Zhang, Annette W.K. Tso, Wing-Sun Chow, Nelson M.S. Wat, Jian Yu Xu, Ruby L.C. Hoo, Aimin Xu: Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. *Clinical Chemistry* 53, 2007, 34-41.
- ④ Kazuhisa Maeda, Haiming Cao, Keita Kono, Cem Z. Gorgun, Masato Furuhashi, Kadir T. Uysal, Qiong Cao, Genichi Atsumi, Harry Malone, Bala Krishnan, Yasuhiko Minokoshi, Barbara B. Kahn, Rex A. Parker, Gökhan S. Hotamisligil: Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 1, 2005, 107-119.

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. Yasushi Nishioka, Kazuki Tamai, Masanari Onda, Youhei Hiromori, Tomoki Kimura, Jianying Hu, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Potential interference of oil vehicles on genital tubercle development during the fetal period in ICR mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 41, 2018, 266-271. (査読有)
DOI:<https://doi.org/10.1248/bpb.b17-0830>
2. Akiko Ido, Youhei Hiromori, Liping Meng, Haruki Usuda, Hisamitsu Nagase, Min Yang, Jianying Hu, Tsuyoshi Nakanishi: Occurrence of fibrates and their metabolites in source and drinking water in Shanghai and Zhejiang, China. *Scientific Reports*. 7, 2017, 45931. (査読有)
DOI: 10.1038/srep45931
3. 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, Fumihiko Sugiyama: Germline recombination in a novel Cre transgenic line, Prl3b1-Cre mouse. *Genesis*. 54, 2016, 389-397. (査読有)
DOI: 10.1002/dvg.22944.

[学会発表] (計 5 件)

1. 椿原 伊織, 高木 康平, 中西 剛, 永瀬久光: フルタミドによる肝臓の糖脂質代謝異常の誘発とその分子メカニズムの解明, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 28 日, ホテル金沢 (石川県・金沢市)
2. 中西 剛: 核内受容体を介した有機スズ化合物の生態影響, 第 23 回ヒ素シンポジウム(招待講演), 2017 年 12 月 7 日, つくばイノベーションプラザ (茨城県・つくば市)
3. Erina Shiraishi, Akiko Ido, Youhei Hiromori, Kento Tanaka, Tsuyoshi Nakanishi, Hisamitsu Nagase: Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skin-sensitization

potential, Japan/Korea Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology, Sep, 1, 2017, Tohoku Med. Pharm. Univ. (Sendai, Japan)

4. 高木 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, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)
5. 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, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

[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/ist/eisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

伊川正人 (IKAWA MASAHITO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 20304066