

令和元年6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16614

研究課題名(和文) 内臓脂肪組織の部位や発現遺伝子の違いが肥満・糖尿病発症に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of adipose tissue localization and gene expression pattern on the development of obesity and diabetes

研究代表者

宇田川 陽秀 (Udagawa, Haruhide)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・上級研究員

研究者番号：50533882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、内臓脂肪組織優位に発現する遺伝子の生物学的・機能的意義を検証した。まず、内臓脂肪優位に発現する転写因子Gata5に着目し、マウスの各種脂肪組織で発現を確認した結果、マウスにおいてもGata5の発現は内臓脂肪優位であった。C3H10T1/2細胞にGata5遺伝子を過剰発現させたGata5-C3H細胞株を樹立し機能を解析した。その結果、Gata5遺伝子の過剰発現は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を顕著に抑制した。さらに分化誘導過程の発現解析から、脂肪細胞分化に重要な遺伝子のCebpb, Cebp d, Cebpa, Ppargの発現を有意に抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内臓脂肪・皮下脂肪など各脂肪組織の違いにおける生物学的・機能的意義を解明することは、生命予後の不良な高度肥満の病態解明とともに、日本人肥満・糖尿病の本質的な治療法開発にも貢献できる。本研究では高脂肪食マウスの内臓脂肪と皮下脂肪組織を採取し、各部位の脂肪細胞の遺伝子発現量の差が肥満・糖尿病の病態に関わる意義について探索した。ヒトおよびマウス内臓脂肪で共通して皮下脂肪と発現が異なる遺伝子群(内臓脂肪遺伝子群)および内臓脂肪優位な遺伝子Gata5を同定した。今後候補遺伝子の脂肪細胞における機能や標的遺伝子を探索することで創薬や肥満病態の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the pathogenic mechanism of obesity and type 2 diabetes by identifying functional and pathological roles of genes differentially expressed in visceral fat and subcutaneous fat of morbidly obese subjects. We focused on transcription factor Gata5 which is predominantly expressed in visceral fat from transcriptome analysis of visceral fat and subcutaneous fat of morbidly obese subjects. Expression of Gata5 mRNA in epididymal fat was significantly higher in SV fraction than in adipocyte fraction and significantly decreased in high fat mice. In overexpression of Gata5 gene in C3H10T1/2 cells (G5-C3H), the differentiation efficiency was significantly decreased. The expression of Cebpb, Cebp d, Pparg and Cebpa in Gata5-C3H cells were significantly decreased on the first day of differentiation. These results suggest that Gata5 is expressed predominantly in preadipocyte of visceral fat, and is a transcription factor regulating adipocyte differentiation.

研究分野：糖尿病・代謝学

キーワード：内臓脂肪 皮下脂肪 転写因子 Gata5 高度肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、2 型糖尿病をはじめ多くの疾患のリスク因子となり、国民の健康増進の上で介入すべき最も重要な病態である。肥満における脂肪組織は、量だけでなく、分布による生物学的な違いが注目され、日本人が白人に比して、肥満度が小さくても健康障害を生じやすい原因の一つとして、内臓脂肪を蓄積しやすいことも想定されている。したがって内臓脂肪、皮下脂肪の特徴を明らかにすることは、日本人の肥満や糖尿病など代謝疾患の病態解明に必須であるが、ヒトではほとんど解明されていない。これまでに我々は、多層的疾患オミックス解析プロジェクトの一環で、高度肥満患者のヒト内臓脂肪・皮下脂肪のトランスクリプトーム解析を行い、内臓脂肪と皮下脂肪それぞれに特異的に発現する遺伝子群を同定してきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスの大網、精巣上体、腸間膜、皮下の4種の脂肪組織を抽出し、各組織の遺伝子発現パターンを明らかにして、ヒトのデータと比較するとともに、肥満・糖尿病の病態に関わる意義について探索する。特に、高脂肪食などで増大する内臓脂肪(大網など)に着目し、内臓脂肪特異的な遺伝子やその発現調節機構、肥満および糖尿病発症における内臓脂肪の機能的意義について検討すると共に、これら一連の解析とヒト高度肥満患者のオミックス解析結果から創薬標的となる分子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 各脂肪組織における遺伝子発現解析

肥満モデル *ob/ob* マウスから、大網脂肪(Ome)、精巣上体脂肪(Epi)、腸間膜脂肪(Mes)、皮下脂肪(Sub)の4組織を抽出し、RNAを抽出後、遺伝子発現解析を行った。さらに、ヒト内臓脂肪および皮下脂肪組織のトランスクリプトーム解析から、得られた遺伝子群のマウス脂肪組織における発現パターンを検証した。

#### 各脂肪組織由来脂肪細胞と間質血管画分の分画と発現解析

高脂肪食マウスの4箇所の脂肪組織から脂肪細胞と間質血管画分(stromal vascular fraction: SVF)に分離し、ヒト高度肥満患者由来の重要遺伝子リストの候補遺伝子の発現パターンを確認した。

#### 脂肪組織由来転写因子の機能解析

内臓脂肪優位な mesenchymal stem cells で脂肪細胞にも分化する C3H10T1/2 細胞株を用いて候補遺伝子の機能解析を行うために、ドキシサイクリン(Dox)の添加により Gata5 の発現を誘導できる Tet-On 3G vector を導入し、薬剤セレクションおよび限界希釈法によるシングルセルクローニングをおこない、Gata5 過剰発現 C3H10T1/2 (C3H) 細胞株を樹立した。IN Cell Analyzer 6000 を用いた脂肪細胞の形態評価と脂肪細胞機能関連遺伝子の発現解析から、脂肪細胞機能に及ぼす Gata5 発現の影響を検討した。

### 4. 研究成果

研究成果 :

まず、ヒト高度肥満患者の内臓脂肪と皮下脂肪組織のトランスクリプトーム解析から、皮下脂肪組織と比較して内臓脂肪優位に発現する転写因子(TF $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , Gata5)に着目した。これら遺伝子の発現は、肥満・糖尿病モデル *ob/ob* マウスの大網脂肪 (Ome)、腸間膜脂肪 (Mes)、精巣上体脂肪 (Epi) と皮下脂肪組織 (Sub) を抽出し、RNA を抽出した後に、TaqMan 法による定量 PCR で測定した。

まず、肥満モデルの *ob/ob* マウスにおける TF $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , Gata5 の発現は皮下脂肪と比較して Ome, Mes, Epi などの内臓脂肪優位であることが認められた。従って、候補遺伝子の発現の優位性は、ヒト内臓脂肪と同様にマウス内臓脂肪でも再現された。次に Gata5 遺伝子のマウス脂肪組織での発現パターンや、脂肪負荷の影響について高脂肪食(HFD) マウスを用いて検証した。まず、通常(ND)食およびHFDマウスから、内臓、皮下の脂肪組織を採取し、コラゲナーゼにより脂肪細胞と間質血管(SV)画分に分離し、それぞれにおい

図1 *ob/ob*マウスの内臓脂肪優位な転写因子群の mRNA 発現

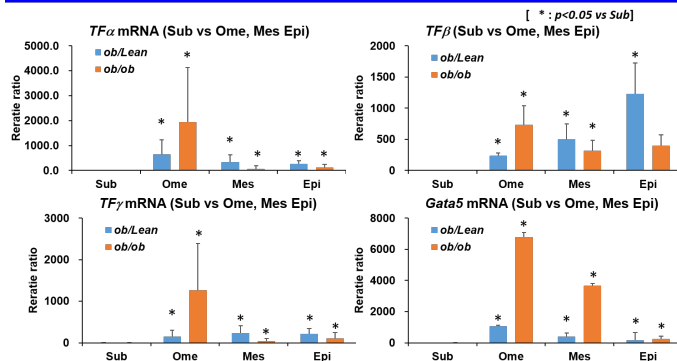
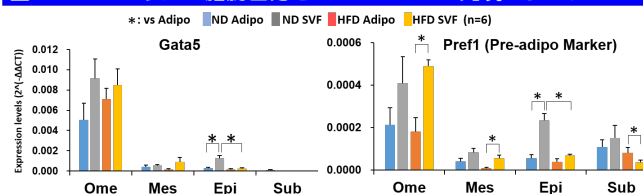


図2 HFDマウスの脂肪画分とSVFのGata5 発現パターン



て、*Gata5*の発現を定量PCRで確認した。前駆脂肪細胞マーカーである*Pref-1*の発現は普通食マウスのEpi脂肪細胞に比較してSV画分で発現が有意に増加し、高脂肪食負荷によりその発現は有意に低下した(図2)。

次に内臓脂肪での*Gata5*の発現は、*Pref1*と同様に、Epi脂肪細胞に比してSV画分で有意に発現が高く、高脂肪食負荷により有意に低下した。以上の結果から、*Gata5*の発現は内臓脂肪組織のSV画分優位に発現することが示唆され、SV画分に多く含まれる前駆脂肪細胞において何らかの機能的意義を有する可能性が示唆された。

そこで次に、培養細胞を用いて前駆および成熟脂肪細胞における*Gata5*遺伝子の機能的意義を検証した。ドキシサイクリン(Dox)の添加により*Gata5*の発現を誘導できるTet-On 3G vectorを導入し薬剤セレクションおよび限界希釈法によるシングルセルクローニングをおこない、*Gata5*過剰発現C3H10T1/2(C3H)細胞株を樹立した。

図3に示す通り、試験期間中4種類のDox添加条件を検討した。Dox無添加(A)、分化誘導後6日目からDoxを添加(B)、分化前までDoxを添加(C)、試験期間中Doxを添加(D)の4条件として、*Gata5*発現が脂肪細胞機能に及ぼす影響を検討した。まず各条件の脂肪細胞を固定し、脂溶性蛍光色素BODIPY 493/503(中性脂肪染色)とHoechst 33258(核染色)で染色しIN Cell Analyzer6000を用いて脂肪細胞の形態評価をおこなった。

その結果、条件CとDで示される通り(図4)、分化誘導前からDoxを添加し*Gata5*を強制発現させたC3H細胞は、分化誘導後12日目において分化誘導効率および脂肪滴内の中性脂肪含量が有意に低下し、脂肪細胞機能に重要な遺伝子である*Fasn*や*AdipoQ*の発現が有意に減少することが認められた。分化誘導初期において、分化誘導関連遺伝子の発現を詳細に解析すると、分化初期に発現が増加する*Cebpb*や*Cebpd*の発現が分化1日目、3日目で有意に低下していた。続いて発現が誘導される脂肪細胞分化に重要な遺伝子である*Pparg*、*Cebpa*、*Cebpe*発現の有意な低下が認められた。従って、成熟脂肪細胞での変化と合わせ、*Gata5*高発現により脂肪細胞への分化が抑制される可能性が示唆された。

そこで、分化過程において分化抑制に寄与する*Gata5*のターゲット遺伝子を探索するために、脂肪細胞分化誘導1日目のマイクロアレイ分析をおこなった。その結果、様々な細胞において、増殖、分化、成長に関わるCyclin D1をコードする*Ccnd1*の発現が顕著に増加していたことから、*Ccnd1*に着目し、*Gata5*-C3H細胞の分化0~5日目での*Ccnd1*の発現を確認した。その結果、*Gata5*の発現が低いDox(-)のC3H細胞では、分化誘導により*Ccnd1*の発現が低下するにも関わらず、*Gata5*の発現が高いDox(+)のC3H細胞では、*Ccnd1*の発現が有意に増加・維持されていることが認められた。CyclinD1は、脂肪組織においても、PPARの発現と転写活性を抑制することが知られており、*Ccnd1*が低下しないことが*Pparg*の発現が低下している原因の可能性が示唆された。

以上の結果から、分化誘導過程における*Gata5*の過剰発現は、*Pparg*や*Cebp*などの発現が低下し、分化を著しく抑制していることが認められた。これは、分化誘導初期に発現する*Cebp*ファミリーの発現を*Gata5*が直接調節している可能性や、*Gata5*の過剰発現により誘導された*Ccnd1*の発現を介して間接的に*Pparg*の発現を調節している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

1. Nammo T, Udagawa H, Funahashi N, Kawaguchi M, Uebanso T, Hiramoto M, Nishimura W, Yasuda K. Genome-wide profiling of histone H3K27 acetylation featured fatty acid signalling in pancreatic beta cells in diet-induced obesity in mice. *Diabetologia*. 61(12): 2608-2620 2018.
2. Hiramoto M, Udagawa H, Ishibashi N, Takahashi E, Kaburagi Y, Miyazawa K, Funahashi N, Nammo T, Yasuda K. A type 2 diabetes-associated SNP in KCNQ1 (rs163184) modulates the binding activity of the locus for Sp3 and Lsd1/Kdm1a, potentially affecting CDKN1C expression. *Int J Mol Med*. 41(2):717-728 2018.

[学会発表](計 6件)

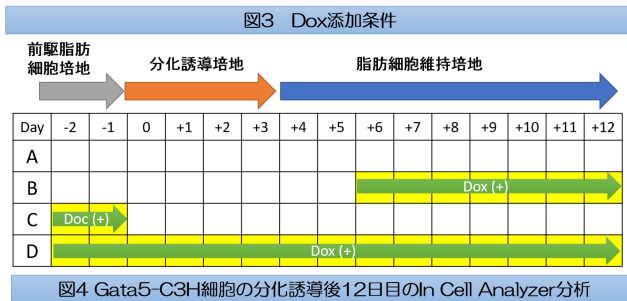


図4 *Gata5*-C3H細胞の分化誘導後12日目のIn Cell Analyzer分析

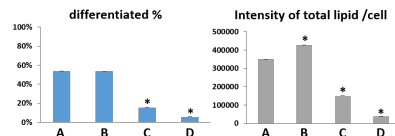
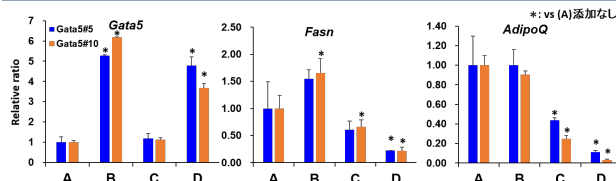


図5 *Gata5*-C3H細胞分化誘導後12日目の遺伝子発現変化



1. 宇田川 陽秀, 南茂隆生, 舟橋伸昭, 平本 正樹, 西村 渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田 和基, 高度肥満患者および肥満マウス由来内臓脂肪・皮下脂肪発現遺伝子の比較解析, 第 37 回日本肥満学会 2016 年 10 月, 東京
2. 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 西村渉, 平本正樹, 川口美穂, 南茂隆生, 安田和基, 脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日~5 月 21 日, 国立京都国際会館
3. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 上番増喬, 西村渉, 平本正樹, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田和基, 日本人高度肥満症由来 NASH 肝のトランスクリプトーム解析, 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2016 年 7 月 16 日, 石川県立音楽堂邦楽ホール・交流ホール
4. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 中西美紗緒, 矢野哲, 箕浦茂樹, 福岡秀興, 安田和基, 妊婦栄養状態と DNA メチル化状態との関連性の検討, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日~5 月 21 日, 国立京都国際会館
5. 南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基, ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日~5 月 21 日, 国立京都国際会館
6. 安田和基, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 舟橋伸昭, 平本正樹, 西村渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 高度肥満患者由来内臓脂肪・皮下脂肪の遺伝子発現の比較解析, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 19 日~5 月 21 日, 国立京都国際会館
7. 宇田川 陽秀, 舟橋伸昭, 南茂隆生, 平本 正樹, 西村 渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田 和基, 高度肥満患者の内臓脂肪組織優位に発現する転写因子 Gata5 の機能解析, 第 60 回日本糖尿病学会, 2017 年 5 月, 名古屋
8. 宇田川 陽秀, 南茂隆生, 舟橋伸昭, 平本 正樹, 西村 渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田 和基, 脂肪細胞における Gata5 の過剰発現は内臓脂肪特異的分泌因子の発現を誘導する, 第 38 回日本肥満学会 2017 年 10 月, 大阪
9. 南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基, 「遺伝子 cis 調節領域の網羅的エピゲノム解析と膵島代償機序に關与する転写因子モチーフの検討」, 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、愛知、2017 年 5 月
10. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 中西美紗緒, 矢野哲, 箕浦茂樹, 福岡秀興, 安田和基, 「児の出生体重, 胎盤重量と DNA メチル化状態との関連性の検討」, 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、愛知、2017 年 5 月
11. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 中西美紗緒, 矢野哲, 箕浦茂樹, 福岡秀興, 安田和基, 「児の出生体重, 胎盤重量と DNA メチル化状態および遺伝子発現量との関連性の検討」, 第 6 回日本 DOHaD 学会学術集会、東京、2017 年 8 月
12. 宇田川 陽秀, 南茂 隆生, 舟橋 伸昭, 平本 正樹, 西村 渉, 松本健治, 関洋介, 笠間和典, 安田 和基, Gata5 はグルタチオン-S-トランスフェラーゼの発現を増強させ内臓脂肪の酸化ストレス防御機構を調節する, 第 39 回日本肥満学会 2018 年 10 月, 神戸
13. 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 西村渉, 平本正樹, 南茂隆生, 安田和基, 「インスリン分泌抑制因子 Necab1 の GR を介した発現調節機構」, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2018 年 5 月
14. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 安田和基, 「肝細胞における AKR1B10 の発現制御メカニズムの解析」, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2018 年 5 月
15. 南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基, 「高脂肪食にて活性増加する膵島 cis 調節領域の網羅的検討から見出された結合因子 Nuclear respiratory factor 1 (Nrf1) の機能的検討」, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2018 年 5 月
16. 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 安田和基, 「ヒト NASH 肝で高発現する AKR1B15 の発現制御機序および機能解析」, 第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会、鳥取、2018 年 7 月

〔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

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者: なし
- (2) 研究協力者

研究協力者氏名：安田和基、南茂隆生、舟橋伸昭

ローマ字氏名：Yasuda Kazuki, Nammo Takao, Funahashi Nobuaki

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。