

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18822

研究課題名(和文) 成熟脂肪細胞における脱分化および多能性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms related to actin cytoskeleton dynamics of dedifferentiation and acquisition of multipotency in mature adipocytes

研究代表者

沖 嘉尚 (OKI, Yoshinao)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70525667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成熟脂肪細胞の脱分化過程では、アクチン細胞骨格の再編成とともに、細胞質の脂肪滴が消失した。脱分化前後の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した結果、脂肪細胞の脱分化および多能性獲得にかかわると考えられるアクチン結合性転写調節因子であるMKL1が抽出された。成熟脂肪細胞の細胞質にアクチンファイバーが形成されると、細胞質のMKL1は核内に移行した。それに伴って、脂肪細胞の分化制御因子であるPPARの発現が減少した。以上のことから、アクチン細胞骨格の形成によるMKL1の局在変化が、成熟脂肪細胞の脱分化および多能性獲得を惹起することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は極めて簡便な方法によって体細胞から脱分化および多能性獲得した細胞を大量に取得できる独自の培養系を用いて、その仕組みを解明するものである。幹細胞のみが具備すると考えられている多能性について、脱分化細胞がなぜその能力を有するのかを明らかにすることは、一個の受精卵から多種多様な機能をもつ細胞(分化細胞)が生ずる仕組みの解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During the mature adipocyte dedifferentiation, loss of lipid droplets occurs with remodeling of actin cytoskeleton. Transcriptome analysis identified MKL1 also known as actin-binding transcriptional coactivator, as upregulated gene after dedifferentiation of mature adipocyte. Formation of actin stress fiber in dedifferentiation of mature adipocyte resulted in the nuclear accumulation of MKL1. Furthermore, the formation of actin stress fibres and the nuclear translocation of MKL1 was accompanied by a marked decrease in the expression of PPAR. These results suggest that regulation of MKL1 by actin cytoskeleton dynamics is a critical part of dedifferentiation of mature adipocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪細胞 アクチン細胞骨格 脱分化

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

1. 研究開始当初の背景

細胞は分化に伴って、それぞれの機能細胞に特徴的な形態へと変化することが知られている。また、それらの細胞が特徴的な細胞形態を示すことは、組織内において特殊化した機能を発揮することに重要であると考えられている。細胞の形態は主にアクチン細胞骨格によって決定されており、モノマーアクチン (G-アクチン) が重合あるいは、アクチンフィラメント (F-アクチン) が脱重合することによってアクチン細胞骨格を再構築し、直接的に細胞の形態を制御する。脂肪細胞の形態は脂肪組織内において脂質貯蔵に重要であり、前駆脂肪細胞は分化に伴って細長い線維芽細胞様の形態から脂肪細胞特有の球状形態へと変化し、細胞質に脂肪滴を蓄積する。その際に、細胞内では、F-アクチンが脱重合することによってストレスファイバーが崩壊し、再構築されることによって表層アクチンが形成される(図1)。また、脂肪細胞分化においてアクチンストレスファイバーの崩壊を阻害すると、分化が抑制されることも報告されている。これらのことは、前駆脂肪細胞の分化に伴う形態変化が脂肪細胞に特異的な機能の発現と密接に関連することを示す。

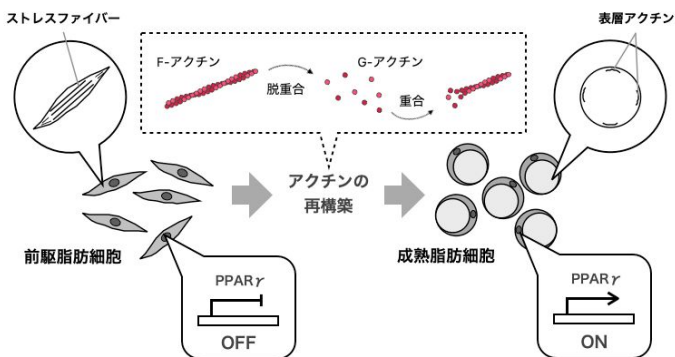


図1 脂肪細胞分化とアクチン細胞骨格の変化

一般的に、細胞の分化は、まず特定の転写因子が発現することによって開始されると考えられており、脂肪細胞の分化においては PPAR の発現が必須である。研究代表者らは、これまでに脂肪細胞の分化過程において、PPAR の発現よりも細胞の形態変化が先に起こることを見出し、アクチン細胞骨格の動態変化が MKL1 という転写調節因子を直接制御することで、PPAR の発現を ON にし、脂肪細胞への分化を誘導することを報告した (Nobusue et al., 2014)。

一方で、我々の研究室では、皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を体外培養し、自発的に脱分化させることによって、線維芽細胞様の DFAT (dedifferentiated fat) 細胞を取得できることを明らかにしてきた (Yagi et al., 2004, Nobusue et al., 2008) (図2)。また、DFAT 細胞が脂肪細胞に再分化するだけでなく、骨芽細胞や骨格筋細胞などに分化することを報告した (Oki et al., 2008, Kazama et al., 2008)。しかしながら、終末分化した脂肪細胞が脱分化し、多能性を獲得するメカニズムについては明らかでない。

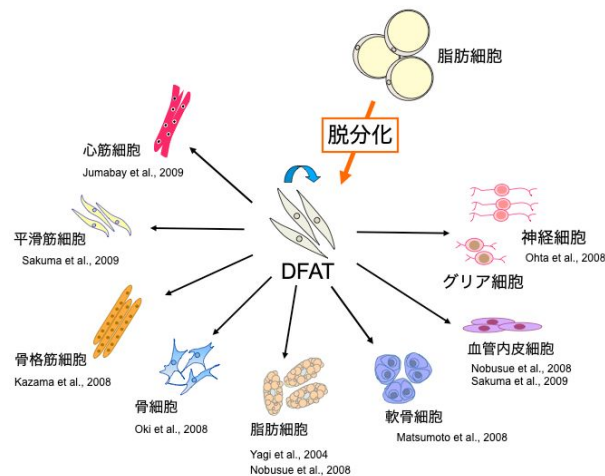


図2 成熟脂肪細胞の脱分化および多能性の獲得

2. 研究の目的

成熟脂肪細胞は脱分化する過程において、脂肪細胞特有の球状形態から細長い線維芽細胞様の形態へと変化し、細胞質に蓄積された脂肪滴を消失する。本研究では、成熟脂肪細胞の脱分化がアクチンストレスファイバーの形成によって PPAR の発現が OFF にされることで誘導されるという、前駆脂肪細胞の分化とは逆のメカニズムによって起こるとの仮説に基づいて、アクチン細胞骨格の動態が脱分化を制御する分子メカニズムの解明を目的として実施した。

3. 研究の方法

- (1) 成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるアクチン細胞骨格の動態変化
食肉センターで採取したブタ皮下組織から酵素処理および遠心分離によって単離した成熟脂肪細胞を天井培養し、脱分化過程におけるアクチン細胞骨格の動態を調べた。また、脂肪細胞の特異的機能である脂肪滴の蓄積についてもペリリピンの発現状況によって評価した。
- (2) 成熟脂肪細胞の脱分化過程において発現増加するアクチン結合性転写調節因子の探索
ブタおよびマウス成熟脂肪細胞の脱分化過程において有意に発現変動した遺伝子セットを DNA マイクロアレイ解析によって抽出した。さらに、AmiGO (amigo.geneontology.org/) を利用して、transcription regulator activity (GO:0140110) と actin binding (GO:0003779) のアノテーション情報をもつ遺伝子に絞り込むことによって、成熟脂肪細胞の脱分化過程においてアクチン細胞骨格の動態変化に直接的にかかわる転写調節因子の同定を試みた。
- (3) 成熟脂肪細胞の脱分化過程における PPAR および MKL1 の細胞内での局在の変化
(2) の遺伝子発現解析によって同定された MKL1 について、成熟脂肪細胞の脱分化過程にお

るタンパク質レベルでの発現状況と細胞内での局在の経時的変化を調べた。また、PPAR γ の局在性とアクチン細胞骨格の動態との関連性についても併せて調べた。

4. 研究成果

(1) 成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるアクチン細胞骨格の動態変化

ブタ成熟脂肪細胞の脱分化過程で消失する脂肪滴と細胞形態の変化に伴うアクチン細胞骨格の局在および配向との関連性を調べた。単離直後の脂肪細胞は細胞質を一つの大きな脂肪滴に占有されており、アクチンは細胞表面に局在した(図3)。培養2日後、脂肪細胞は単胞性の脂肪滴を維持した状態で糸状仮足を形成し、仮足部位にはアクチンの集積が認められた。培養4日後では、細胞質に多数の微小な脂肪滴をもつ線維芽細胞様脂肪細胞へと変化し、さらに伸展した葉状仮足内にアクチンファイバーが形成された。培養7日後では、細胞質内の脂肪滴が消失し、細胞全体にアクチンストレスファイバーを形成した。以上の結果から、成熟脂肪細胞の形態変化に伴うアクチンファイバーの形成が脂肪滴の消失に関連する可能性が示された。

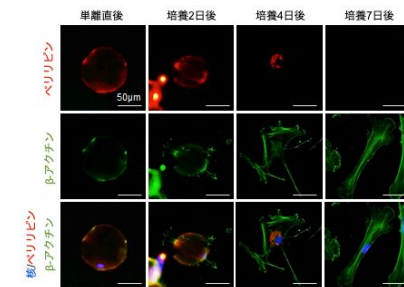


図3 アクチンファイバーの形成に伴う脂肪滴の消失

(2) 成熟脂肪細胞の脱分化過程において発現増加するアクチン結合性転写調節因子の探索

ブタおよびマウス成熟脂肪細胞の脱分化前後の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、脱分化過程において有意に発現増加する遺伝子セットを明らかにした。次に、Gene Ontologyのアノテーション情報を使用して、それらの遺伝子セットの中からアクチン結合活性(GO:0003779)かつ転写調節活性(GO:0140110)に関連する遺伝子を絞り込んだ。その結果、ブタでは14個、マウスでは8個のプロンプが候補遺伝子のプロンプとして抽出された(図4)。さらに、抽出された候補遺伝子の中からブタとマウスの両方に共通する遺伝子を調べた結果、MKL1を含む4つのアクチン結合性転写調節因子の抽出に成功した。以上の結果から、ブタおよびマウス成熟脂肪細胞の脱分化においてアクチン細胞骨格の動態に関連して遺伝子発現を制御する転写調節因子としてMKL1を同定した。

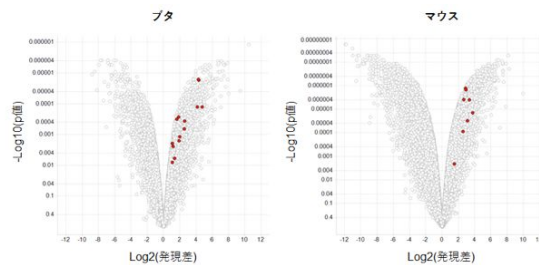


図4 ブタおよびマウス成熟脂肪細胞の脱分化過程において発現増加するアクチン結合性転写調節因子の抽出

(3) 成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるPPAR γ およびMKL1の細胞内での局在の変化

成熟脂肪細胞の脱分化において重要な役割をもつ転写調節遺伝子の1つとしてMKL1を抽出した。MKL1は前駆脂肪細胞の核内においてPPAR γ の発現抑制にかかわっており、脂肪分化に伴ってアクチンファイバーの脱重合が起こると、増加したモノマーのアクチンと結合することによってMKL1の核移行が阻害され、PPAR γ の発現が誘導されることが報告されている(Nobusue et al., 2014)。そこで、脱分化過程の脂肪細胞におけるMKL1の細胞内局在を調べた結果、単離直後の脂肪細胞において細胞質に局在していたMKL1はアクチンファイバーが形成される培養2日後から4日後にかけて核移行した(図5)。また、単離直後の脂肪細胞において核内だけに局在していたPPAR γ は培養2日後から4日後にかけて顕著に減少することが分かった(図6)。さらに、MKL1が核移行し、PPAR γ の発現が減少する培養2日後から4日後は、脂肪細胞の脂肪滴が単胞性から多数の微小な脂肪滴へと変化する時間と一致した(図3)。

以上の結果から、MKL1は前駆脂肪細胞の分化とは逆のメカニズムによって、脂肪細胞の脱分化を制御する働きをもつ因子である可能性が示唆された。

今後、MKL1の発現あるいは核移行を阻害することによって、成熟脂肪細胞の脱分化を抑制することができるかを検討するとともに、遺伝子発現解析によって同定されたその他の候補因子の役割についても明らかにしていきたい。

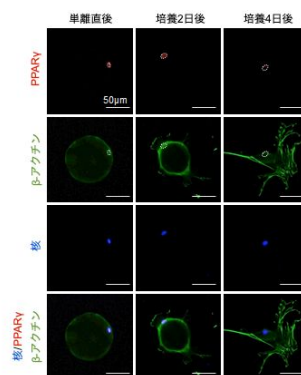


図5 アクチンファイバーの形成に伴うPPAR γ の細胞内局在の変化

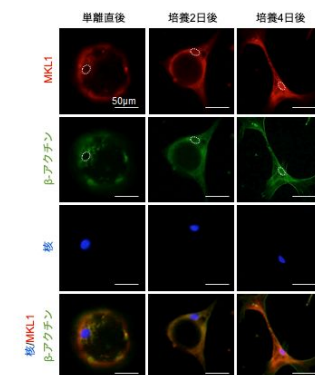


図6 アクチンファイバーの形成に伴うMKL1の細胞内局在の変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama, T, Oki, Y, Saito Y, Tonogi M, Shimizu N, Effect of collagenase concentration for isolating small adipocytes from human buccal fat pad. Journal of Oral Science、査読有、60/ 1、2018、14-23、<https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0786>

〔学会発表〕(計7件)

萩原 玲子, 沖 嘉尚, 加野 浩一郎、脱分化脂肪細胞に由来する肝細胞は中心静脈周辺領域の肝細胞の特徴をもつ、日本畜産学会第125回大会、2019

萩原 玲子, 沖 嘉尚, 加野 浩一郎、公共データベースを利用した脱分化脂肪細胞における肝細胞分化制御因子の探索、第70回日本生物工学会大会、2018

Reiko Hagiwara, Yoshinao Oki, Koichiro Kano, Identification of master regulator genes for hepatocyte differentiation in de-differentiated fat (DFAT) cells、Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB、2018

萩原玲子, 伊林志穂, 沖嘉尚, 加野浩一郎、脱分化脂肪細胞における肝細胞分化制御因子の探索、日本畜産学会124回大会、2018

Reiko Hagiwara, Shiho Ibayashi, Yoshinao Oki, Koichiro Kano, Identification of the master regulator gene for hepatocyte differentiation in de-differentiated fat (DFAT) cells、Consortium of Biological Sciences 2017、2017

沖嘉尚、渡辺真平、加野浩一郎、成熟脂肪細胞由来のDFATはセロトニンおよびグルタミン酸作動性神経細胞様細胞へと分化する、日本畜産学会第122回大会、2017

渡辺真平、沖嘉尚、加野浩一郎、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞のセロトニン作動性神経細胞様細胞への分化、第39回日本分子生物学会年会、2016

〔その他〕

ホームページ等

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室ホームページ

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~seitaikiko/k/TOP.html>

6 . 研究組織

該当なし

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。