

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21453

研究課題名(和文) 脂肪特異的Creg1-Tgマウスを用いる褐色脂肪化とメタボリック症候群改善の検討

研究課題名(英文) Acceleration of brown adipocyte differentiation and improvement of metabolic syndrome in aP2-Creg1 transgenic mice

研究代表者

橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：90724253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自に樹立した脂肪組織特異的に分泌糖タンパク質であるCREG1の発現が誘導されるトランスジェニックマウス(aP2-CREG1-Tgマウス)を用いて、CREG1が生体内で褐色脂肪化促進因子として機能し、抗肥満作用を示すことを明らかとした。加えて、高脂肪食摂取による食餌誘導性肥満の条件下では、肝臓や血中におけるトリグリセリドやコレステロール等の脂質レベルの蓄積がTgマウスで抑制されている傾向があり、インスリン抵抗性等にも改善が認められた。本研究で得られた結果より、CREG1が肥満をはじめとする様々な生活習慣病態の改善に寄与する多機能性の内分泌因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocyte differentiation was stimulated in adipose tissues and diet-induced obesity was reduced in aP2-CREG1-Tg mice under HFD feeding condition. In addition, oxygen consumption level was increased in aP2-CREG1-Tg mice after administration of 3-adrenergic receptor agonist, suggesting that thermogenic capacity is increased in these mice. Insulin resistance associated with diet-induced obesity was also improved in aP2-CREG1-Tg mice compared with WT mice. These results suggest that CREG1 could be a novel endocrine factor with therapeutic potential for obesity and metabolic syndromes.

研究分野：分子病態学

キーワード：CREG1 UCP1 褐色脂肪 メタボリックシンドローム 分子病態学

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脂肪細胞は多様であり、中性脂肪としてエネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞以外にも、中性脂肪を燃焼させることにより熱産生を行う褐色脂肪細胞なども存在している。褐色脂肪細胞は加齢に伴い減少することがわかっており、この減少が肥満や糖尿病、メタボリックシンドローム発症の一因であることが明らかとなってきた (N Eng J Med 360:1509-1517, 2009)。故に褐色脂肪細胞への分化誘導促進が可能となれば、先進国で深刻な社会問題となっている加齢に伴うメタボ発症やその悪化を抑制する有効な手段になるものと期待される。未分化脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化は、熱産生の中心的な役割を果たすミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP1) の発現上昇で特徴づけられる。古くから知られている褐色脂肪細胞への分化誘導機構は、ノルエピネフリンや甲状腺ホルモン T3 などの内分泌因子を介するものである。ノルエピネフリンは脂肪細胞表面の  $\beta$ 3-アドレナリン受容体を介して PKA や CREB を活性化することにより、Ucp1 転写を促進している。一方で、T3 は甲状腺ホルモン核内受容体を介して Ucp1 の転写を促進している。加えて、BMP7、Irisin、FGF21、Natriuretic peptides などが褐色脂肪細胞への分化誘導に関与していることも明らかとなった (Cell Metab 17:1-6, 2013) [図 1]。最近の研究では、PRDM16 や Eht1 などの転写制御因子が関わっていることも報告されている (Cell Metab 19:593-604, 2014)。一方で、申請者の所属研究室では UCP1 欠損マウスを作製し (Nature 387:90-94, 1997)、そのマウスを用いた先行研究の中で、褐色脂肪細胞の分化誘導に関連する内分泌因子として分泌糖タンパク質である Cellular Repressor of E1A-stimulated genes 1 (Creg1) の新規同定に成功した。その後の培養細胞を用いた脂肪細胞の分化誘導実験により、*in vitro* では Creg1 が褐色脂肪細胞への分化誘導を促進・補助することが明らかとなってきた。しかしながら、Creg1 の分化誘導機構の分子レベルでの解明は遅れており、未だ明らかとなっていない。Creg1 がマンノース-6-リン酸/インスリン様増殖因子 2 型受容体 (M6P/IGF2R) と相互作用して細胞増殖や細胞分化に関わっているという報告もあるが (Oncogene 22:5436-5445, 2003)、申請者らの先行研究では Creg1 と M6P/IGF2R の相互作用を確認できていない。よって、Creg1 と相互作用する分子や受容体の同定は、褐色脂肪細胞の分化誘導メカニズムを解明するための大きな足掛かりとなることが期待されるが、それに関する研究報告はほぼ無いのが現状である。*in vivo* においては、申請者らの先行研究により寒冷刺激を与えたマウスでは、褐色脂肪組織の増大に伴って Creg1 発現が上昇していることが明ら

かとなった。しかしながら、*in vivo* での褐色脂肪分化誘導における Creg1 の効果については検証が十分ではなかった。

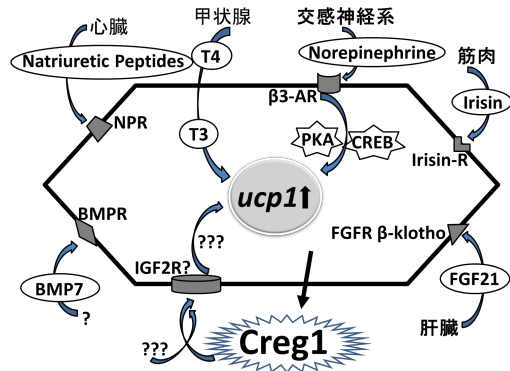


図 1 褐色脂肪細胞分化の関連因子

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞は中性脂肪の燃焼により熱産生を行う特殊な細胞であり、全身の脂肪組織における褐色脂肪への分化促進が肥満やメタボ予防・治療に効果的であることが明らかとなってきた。申請者らは、褐色脂肪細胞への分化誘導に関連する内分泌因子として Creg1 の同定に成功している。本研究では、独自に樹立した脂肪組織特異的に Creg1 の発現が誘導されるトランスジェニックマウス (aP2-Creg1-Tg マウス) を用いて、褐色脂肪化促進による肥満や糖尿病などのメタボ病態の改善効果について検証を進めることとした。

本申請研究は、Creg1 が生体においても褐色脂肪細胞への分化誘導剤として機能するかを検証し、メタボ予防・治療への有用な標的分子と成り得るかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 食餌誘導性肥満マウスの作成

全ての解析に、N5 世代以降まで戻し交配を進めた雄性の aP2-Creg1-Tg マウスを使用した。これらのマウスに対して、9 週齢から 60% 高脂肪食を投与して食餌誘導性肥満マウスを作成し、21 週齢で各組織の採取を行った。

(2) 遺伝子発現量の解析

採取した組織における Ucp1 等の褐色脂肪関連遺伝子の発現量について、Real-time PCR 法を用いて解析を行った。各組織からの RNA 抽出は Trizol reagent (Invitrogen) を用いて行った。得られた total RNA を鋳型として、High Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA の合成を行った。Real-time PCR 解析は、Light-Cycler and FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR GREEN I (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。各遺伝子の発現量は、36B4 遺伝子の発現量で標準化して算出した。

### (3) タンパク質発現量の解析

各タンパク質の発現レベルの解析は、ウェスタンブロッティング法を用いて行った(プロトコルは、Wang *et al.*, 2008 に従った)。

### (4) 組織学的な解析

各組織のパラフィンブロックを作成し、6  $\mu\text{m}$  で薄切を行った。これらの切片についてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色をし、観察を行った。加えて、褐色脂肪マーカーである UCP1 について免疫染色を行った (ab23841, Abcam, Cambridge, UK)。

### (5) 血糖値測定及びインスリン感受性試験

血糖値は、マウス尾部の静脈から血液を採取し、グルコースメーター (NovoAssist Plus, Novo Nordisk, Tokyo, Japan) により測定を行った。インスリン感受性試験は、4 時間絶食を行ったマウスに対してインスリンを 0.75U/kg で腹腔内投与し、30 分間隔で投与後 2 時間までの血糖値を測定した。

### (6) トリグリセリドの測定

肝臓におけるトリグリセリドの測定には、TG E-test kits (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いた。プロトコルは、添付のものに従った。

尚、本研究計画に関わる全ての遺伝子組み換え実験及び動物実験は、当該研究施設の組織換え DNA 実験安全委員会および実験動物倫理委員会による審査を受け、承認を得られた上で行った。

## 4. 研究成果

我々は、C3H10 細胞や COS7 細胞等の既知の培養細胞系や、マウスの白色脂肪組織から調製した初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で、分泌糖タンパク質である Creg1 が褐色脂肪細胞の分化誘導に関与している可能性を示す先行結果を得ていた。加えて、精製した Creg1 タンパク質を浸透圧ポンプによりマウスの皮下に投与し、食餌誘導性肥満の条件下で褐色脂肪化や体重抑制効果が認められるかの *in vivo* の検証も行われた。精製 Creg1 タンパク質を投与したマウス群では、対照群と比較して、褐色脂肪化が促進されており、抗肥満効果も確認された。これらの結果は、生体においても Creg1 が褐色脂肪細胞の分化を促進し、肥満抑制及び生活習慣病態の改善に寄与している可能性を示唆しているものであった。しかしながら、精製の技術上の方法から、一定以上の高濃度で CREG1 タンパク質を投与することは難しく、浸透圧ポンプの容量も限られているため、一定期間以

上の長期投与も難しい状況であった。よって、我々は、Creg1 の生体内での生理機能をより詳細に検討するため、脂肪組織特異的に Creg1 の発現が誘導される aP2-Creg1-Tg マウスを独自に樹立した。我々は、aP2-Creg1-Tg マウスのラインの選定を行い、高発現ライン (Line52) と低発現ライン (Line49) の 2 ラインを得ることに成功した。

我々は、はじめに aP2-Creg1-Tg マウスの抗肥満作用について検証するため、9 週齢から高脂肪食を投与し、食餌誘導性肥満の条件下で体重の推移を調べた。Tg マウス群では野生型のマウス群と比較して、体重の増加が有意に抑制された。これらの Tg マウスでは、白色脂肪の組織重量が減少していた。次に、CREG1 の褐色脂肪化への影響を調べるため、褐色脂肪組織 (BAT)、鼠蹊部白色脂肪組織 (IWAT)、精巣周囲白色脂肪組織 (EWAT)、後腹膜白色脂肪組織 (RWAT) における褐色脂肪関連遺伝子の発現量を RT-PCR 法により測定を行った。Tg マウスの褐色脂肪組織では、褐色脂肪マーカーである *Ucp1* の遺伝子発現量の増加が認められた。一方で、白色脂肪組織における *Ucp1* mRNA レベルの変化は、褐色脂肪組織ほど顕著ではなかった。しかしながら、ウェスタンブロッティング法による各脂肪組織における UCP1 タンパク質レベルの解析では、Tg マウスの褐色脂肪組織と白色脂肪組織で共に UCP1 タンパク質量が有意に増加している結果が得られた。これらの結果は、Tg マウスの脂肪組織において褐色脂肪化が促進されている可能性を示唆するものであった。

次に我々は、食餌誘導性肥満の Tg マウスの脂肪組織において実際に褐色脂肪化が促進されているかを確かめるため、組織学的な解析を行った。HE 染色法による解析では、野生型のマウスと比較して Tg マウスの褐色脂肪組織では、細胞径や脂肪滴がより小さくなっていることが明らかとなった。この所見は、褐色脂肪化が促進された時に見られる特徴的な変化と一致する。よって、より詳細に検討するため、UCP1 抗体による組織免疫染色を実施した。興味深いことに、野生型マウスと比べて、Tg マウスの各脂肪組織では UCP1 シグナルが著しく強いことが明らかとなった。これらの組織学的な解析から、Tg マウスの脂肪組織では UCP1 タンパク質量が増加しており、褐色脂肪化が促進されていることが明らかとなった。

ここまでの研究結果より、脂肪組織で Creg1 が過剰発現している aP2-Creg1-Tg マウスでは、全身の脂肪組織で褐色脂肪化が促進されており、体重増加が抑制されていることが示された。故に我々は、抗肥満効果が認められた Tg マウスでは、慢性的な肥満に伴い進行する生活習慣病態に変化がみられる可能性を考え、インスリン感受性試験を実施した。Tg マウスでは、野生型マウスと比較して、有意なインスリン感受性低下の抑制が認め

られた。

次に我々は、肥満に伴い進行する脂肪肝の病態についても何らかの変化がある可能性を考え、肝臓におけるトリグリセリドやコレステロール等の脂質レベルの解析を行った。Tg マウスの肝臓では、脂質の蓄積が抑制される傾向にあることが明らかとなった。この結果は、脂肪組織で過剰発現された Creg1 タンパク質が、脂肪組織での機能に留まらず、全身で様々な生理機能を担っている可能性を示唆しており、大変興味深い結果であった。

尚、本研究における aP2-Creg1-Tg マウスを用いた解析は、全て Line52 と Line49 の異なる 2 ラインで行い、同じ傾向を示す結果を得た。

本研究で得られた結果より、Creg1 が肥満をはじめとする様々な生活習慣病態の改善に寄与する多機能性の内分泌因子である可能性が示唆された。しかしながら、生体における褐色脂肪化の制御メカニズムは複雑であるため、現時点では Creg1 が褐色脂肪化の分化制御を行う分子メカニズムを特定することが出来ていない。故に、その解明が今後の研究の課題となる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) 橋本 理尋, 楠堂 達也, 竹内 環, 遠藤 優貴, 山下 均

「脂肪組織特異的 CREG1 トランスジェニックマウスを利用した褐色脂肪化促進と生活習慣病改善の検討」

BIOMEDICAL GERONTOLOGY (査読有)

40(3), 35-38 (2016)

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 橋本 理尋 (代表)

「生体内における CREG1 の褐色脂肪化促進作用の検討」(口頭)

第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年

(2) Michihiro HASHIMOTO (代表)

「CREG1 is a novel factor stimulating brown adipocyte differentiation in vivo」(ポスター)

第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年

(3) 楠堂 達也 (代表)

「白色脂肪組織の褐色脂肪化における CREG1 の役割」(口頭)

温熱生理研究会 2017, 2017 年

(4) Michihiro HASHIMOTO (代表)

「Study of pathophysiological role of CREG1 protein using aP2-CREG1 transgenic mice」(口頭)

第 40 回日本基礎老化学会大会, 2017 年

(5) 遠藤 優貴 (代表)

「CREG1 の抗肥満作用に対する環境温度の影響について」(ポスター)

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

(6) 橋本 理尋 (代表)

「脂肪組織特異的 CREG1-Tg マウスによる褐色脂肪化と生活習慣病改善の検討」(口頭)

第 39 回日本基礎老化学会大会, 2016 年

〔その他〕

ホームページ

<https://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/3ed0ff57edaf26bf678d800c87600ded4df04b7d.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号: 90724253

(2) 研究協力者

山下 均 (YAMASHITA, Hitoshi)

中部大学・生命健康科学部・教授