

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05030

研究課題名(和文) 栄養状態に応じて脂肪幹細胞の増殖・初期分化が調節される新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Novel stemness markers in murine adipose-derived stem cells

研究代表者

山口 賢彦 (Yamaguchi, Masahiko)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00632639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満の進行により糖尿病や高血圧などの生活習慣病に罹りやすいことが知られている。脂肪組織の肥大化は、脂肪組織の脂肪幹細胞が増殖かつ分化し、成熟脂肪細胞数が増加することが一因である。しかし脂肪分化のON/OFFを決定づける分子機構はほとんど理解されていない。本研究ではその脂肪幹細胞において高発現しているNr4a familyに着目し、機能の解析を行った。Nr4a familyを安定発現させた脂肪前駆細胞を作製し機能解析したところ、脂肪分化抑制作用をもつことが明らかとなった。さらにNr4a familyは脂肪分化促進因子のプロモーターに結合してその作用を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪幹細胞においてNr4a familyが未分化性維持に寄与していることが示唆された。この結果は脂肪分化のON/OFFを決定づける分子機構の解明に繋がるため、脂肪幹細胞をターゲットとして肥満を予防する分子標的薬の探索へと発展させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Obesity is associated with proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells (ADSCs) into mature adipocytes. Nutritional stimuli induce ADSCs proliferation and differentiation, and this process is well established because master regulators of adipogenic differentiation, C/EBPalpha and PPARgamma were identified. However, under normal condition, molecular mechanisms to maintain stemness of ADSCs are largely unknown. To identify genes essential for the maintenance, microarray analysis was performed on murine ADSCs and 4-day cultured ADSCs (preadipocytes). Among the 223 up-regulated transcriptional factor genes in ADSCs, we focused on nuclear receptor 4a (Nr4a) family, which play diverse roles including metabolic processes. Nr4a-overexpressed preadipocytes showed reduced accumulation of lipid droplet and decreased expressions of C/EBPalpha and PPARgamma. ChIP analysis confirmed that Nr4a directly bound to C/EBPalpha and PPARgamma promoter.

研究分野：生活習慣病

キーワード：組織幹細胞 生活習慣病 肥満 核内受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満による内臓脂肪の蓄積が慢性炎症を引き起こし、生活習慣病の病態基盤となることが近年明らかとなってきた。したがって生活習慣病の治療法として慢性炎症を抑制する方法や熱産生能を向上させて脂質を分解する方法が国内外で盛んに研究されている (Kolaczowska et al., *Nature Reviews Immunology*, 2013)。申請者もこれまでに脂質メディエーターである血小板活性化因子 (PAF) が熱産生能を向上させることで肥満を抑制することを明らかにした (Yamaguchi et al., *Biochem Pharmacol*, 2014)。

しかしながら、脂肪の蓄積は数か月から数年単位の長期にわたって進行し、慢性炎症が増悪しても自覚症状はない。したがって生活習慣病の発症に至る前に肥満を予防することが国民の QOL の向上と医療費の削減に重要である。そこで申請者は成熟脂肪細胞へと分化する“脂肪幹細胞” (脂肪組織に存在する間葉系幹細胞) に新たに着目した。最近の研究から、肥満時にはこの脂肪幹細胞が増殖して成熟脂肪細胞へと分化することが証明されたが (Lee et al., *Cell metabolism*, 2012)、増殖・脂肪分化を調節する機構はほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

脂肪幹細胞において高発現している遺伝子明らかにし、その遺伝子が幹細胞の増殖・分化の調節を介して、生理機能の恒常性維持もしくは疾患発症に関連する可能性を調べることを目的とした。これまで進めてきた研究から、脂肪幹細胞に高発現していた遺伝子群について IPA アルゴリズムを用いたパスウェイ解析を行ったところ、その遺伝子群全体の発現変動と強く相関する遺伝子として Nuclear receptor 4a/1/2/3 (Nr4a family) を同定した。そこで脂肪幹細胞における Nr4a family に着目し、その機能解析を行った。

3. 研究の方法

脂肪分化に対する Nr4a family の機能を検討するため、Nr4a1、Nr4a2、Nr4a3 をそれぞれ安定発現させた脂肪前駆細胞を作製した。作製した細胞を用いて脂肪分化のマスター制御因子の発現を定量し、脂肪滴を観察した。

また、Nr4a1 の *in vivo* における役割を検討するために、Tamoxifen 誘導性の Cre-loxP システムを利用した脂肪幹細胞選択的 Nr4a1 欠損マウスを作製した。

4. 研究成果

各 Nr4a family を発現させた細胞では C/EBP α と PPAR γ の発現が低下し、脂肪滴の形成が抑制されていた。次に Nr4a family による C/EBP α および PPAR γ の発現抑制機構を検討した。DNA-転写因子の結合を予測するデータベース JASPAR を用いて C/EBP α および PPAR γ プロモーターに対する Nr4a family の結合部位を探索したところ、複数の結合候補配列が得られた。得られた候補配列について ChIP assay 法により解析したところ、Nr4a family の結合を示すシグナルが有意に増加していた。従って、Nr4a family が C/EBP α 、PPAR γ の転写を抑制することで脂肪分化を抑制することが明らかとなった。

Nr4a family を安定発現させることで、脂肪前駆細胞は脂肪幹細胞様の性質を示すことが明らかとなったので、次に脂肪幹細胞の Nr4a family を欠損させることでその機能を解析した。Nr4a1 欠損マウスは Tamoxifen を 25 μ g/g/day で 6 日間腹腔内投与し、普通食摂餌下で 10 日間回復期間を設けた。その後、脂肪組織を単離して flow cytometry 法により脂肪幹細胞を分取した。Nr4a1 の発現量を RT-qPCR 法にて定量した結果、Nr4a1 欠損マウスにおいて減少傾向

を示した。また脂肪幹細胞の割合も減少傾向を示した。一方で脂肪分化促進因子である PPAR γ や C/EBP α の発現には変化がみられず、普通食摂餌下では脂肪分化能への影響はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto K, Sakatoku K, Sugimoto S, Iwasaki N, Sano Y, Yamaguchi M, Kurokawa J	4. 巻 140
2. 論文標題 Continued exposure of anti-cancer drugs to human iPS cell-derived cardiomyocytes can unmask their cardiotoxic effects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci,	6. 最初と最後の頁 345-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruhashi R, Akizuki R, Sato T, Matsunaga T, Endo S, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sakai H, Ikari A	4. 巻 1865
2. 論文標題 Elevation of sensitivity to anticancer agents of human lung adenocarcinoma A549 cells by knockdown of claudin-2 expression in monolayer and spheroid culture models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.	6. 最初と最後の頁 470-479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1016/j.bbamcr.2017.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Chisa, Fujii Naoko, Manabe Aya, Matsunaga Toshiyuki, Endo Satoshi, Hasegawa Hajime, Ito Yoshinori, Yamaguchi Masahiko, Yamazaki Yasuhiro, Ikari Akira	4. 巻 232
2. 論文標題 Up-Regulation of Transient Receptor Potential Melastatin 6 Channel Expression by Tumor Necrosis Factor- in the Presence of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2841 ~ 2850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.25709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Marunaka Kana, Furukawa Chisa, Fujii Naoko, Kimura Toru, Furuta Takumi, Matsunaga Toshiyuki, Endo Satoshi, Hasegawa Hajime, Anzai Naohiko, Yamazaki Yasuhiro, Yamaguchi Masahiko, Ikari Akira	4. 巻 292
2. 論文標題 The RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3 controls localization of the Mg2+regulator claudin-16 in renal tube epithelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13034 ~ 13044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.779405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruhashi Ryohei, Akizuki Risa, Sato Tomonari, Matsunaga Toshiyuki, Endo Satoshi, Yamaguchi Masahiko, Yamazaki Yasuhiro, Sakai Hideki, Ikari Akira	4. 巻 1865
2. 論文標題 Elevation of sensitivity to anticancer agents of human lung adenocarcinoma A549 cells by knockdown of claudin-2 expression in monolayer and spheroid culture models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 470 ~ 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2017.12.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 山口賢彦、寺阪祐紀、西山麗紗、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪幹細胞の未分化性維持におけるNuclear receptor 4aの機能解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Yamaguchi, Kenta Ito, Yuki Terasaka, Risa Nishiyama, and Junko Kurokawa
2. 発表標題 Roles of nuclear receptor 4a family in maintenance of stemness of murine adipose-derived stem cells
3. 学会等名 第92回薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口賢彦、寺阪祐紀、西山麗紗、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化過程におけるNuclear receptor 4aの役割
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木一生、山口賢彦、寺坂祐紀、西山麗紗、黒川洵子
2. 発表標題 Nuclear receptor 4a family を介した 脂肪幹細胞の未分化性維持機構の解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Issei Suzuki, Masahiko Yamaguchi, Yuki Terasaka, Risa Nishiyama, and Junko Kurokawa
2. 発表標題 A molecular switch regulating adipose-derived stem cell differentiation
3. 学会等名 第 24 回静岡健康・長寿学術フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺坂 祐紀、西山 麗紗、鈴木 一生、山口 賢彦、黒川 洵子
2. 発表標題 マウス脂肪幹細胞の未分化性維持における Nr4a family の機能解析
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺坂 祐紀 , 伊藤 謙汰 , 西山 麗紗 , 山口 賢彦 , 黒川 洵子
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞の未分化性維持における Nuclear receptor 4a2 の機能解析
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤謙汰、石村裕樹、山口賢彦、黒川洵子
2. 発表標題 Nuclear receptor 4a familyを介した脂肪幹細胞の未分化性維持機構の解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Yamaguchi, Mana Takahashi, Kenta Ito, Hiroki Ishimura, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Novel receptors for maintenance of stemness in murine adipose-derived stem cells.
3. 学会等名 WCP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋茉那、山口賢彦、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪幹細胞において高発現するGタンパク質共役型受容体の脂肪分化に対する作用解析
3. 学会等名 第4回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤謙汰、西山麗紗、山口賢彦、黒川洵子
2. 発表標題 Nuclear receptor 4a family を介した脂肪幹細胞の未分化性維持機構の解析
3. 学会等名 第4回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ito, Hiroki Ishimura, Masahiko Yamaguchi Junko Kurokawa
2. 発表標題 Roles of nuclear receptor 4a family in maintenance of adipose-derived stem cells.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiho Okada, Masahiko Yamaguchi, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Localization of YAP in the differentiation process of murine adipose stem cells
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mana Takahashi, Masahiko Yamaguchi, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Roles of G-protein-coupled receptor 3 in adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Yamaguchi, Kenta Ito, Mana Takahashi, Risa Nishiyama, and Junko Kurokawa
2. 発表標題 Roles of nuclear receptor 4a in maintenance of stemness of murine adipose-derived stem cells.
3. 学会等名 The 13th Japan-China International Symposium on Health Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Yamaguchi, Kenta Ito, Yuki Terasaka,
2. 発表標題 Roles of nuclear receptor 4a family in maintenance of stemness of murine adipose-derived stem cells
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of The JPS
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Yamaguchi, Hiroki Ishimura, Kenta Ito, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Novel stemness markers in murine adipose-derived stem cell
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石村裕樹、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪幹細胞における核内受容体Nr4aの細胞内局在および機能の解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水口敦史、山口賢彦、山崎泰広、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の遺伝子発現および増殖・脂肪分化における性差解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋茉那、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞の増殖・脂肪分化に対するGタンパク質共役型受容体の機能解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村亮介、山口賢彦、山崎泰広、黒川洵子
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞において高発現するPou3f1の機能解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamaguchi M, Kodama M, Okuno R, Arima Y, Nishiyama K, Kurihara H, Kurokawa J
2. 発表標題 An origin of sex differences in coronary arteries of embryonic mice.
3. 学会等名 8th Congress of the International Society for Gender Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤謙汰、石村裕樹、山口賢彦、黒川洵子
2. 発表標題 Nuclear receptor 4a family を介した脂肪幹細胞の未分化性維持の細胞内制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田千穂、山口賢彦、黒川洵子
2. 発表標題 マウス脂肪幹細胞の分化機構におけるYes-associated protein の基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学薬学部 生体情報分子解析学分野HP https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/ 静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学分野 http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/index.html

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考