

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19919

研究課題名(和文) ページュ脂肪細胞の分化・活性化における分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of beige adipocyte differentiation and activation

研究代表者

花田 俊勝 (Hanada, Toshikatsu)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10363350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ページュ脂肪細胞の分化および活性化に関する分子の探索を行なった。ページュ脂肪細胞の遺伝子発現プロファイル解析から、まずCD105に着目し、CD105がSmad2の活性化を抑制することでページュ脂肪細胞への分化を維持していることを明らかにした。さらに、遺伝子発現プロファイルからNeuromedin B (NMB)およびGastrin Releasing Peptide (GRP)に着目し、両分子の遺伝子欠損マウスを作製し解析を行なったところ、NMB遺伝子欠損マウス群では褐色脂肪組織における熱産生が増加し、高脂肪食摂餌による体重増加と肝臓への異所性脂肪蓄積が抑制され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

ページュ脂肪細胞は、寒冷刺激などの環境刺激において白色脂肪組織中に出現し、発熱やエネルギー消費に関与する。特に成人においては褐色脂肪細胞よりむしろページュ脂肪細胞がエネルギー代謝に関与するため、肥満症や代謝異常症の治療標的として注目されている。しかしその分化機構に関しては未だ不明な点が多い。本研究において、CD105からのSmadシグナル伝達機構がページュ脂肪細胞の分化に重要であること、ボンベシン様ペプチドのNMBとGRPがページュ脂肪を介して肥満を抑制することが示唆された。これらの分子を標的として、新たな抗肥満薬・代謝改善薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecules involved in the differentiation and activation of beige adipocyte, a thermogenic adipocyte located in white adipose tissue. From the data of Gene expression profile analysis between white adipocytes and beige adipocytes, we first focused on CD105. We found that CD105 maintains differentiation into beige adipocytes by inhibiting Smad2 activation (Higa et al., Mol. Cell. Endocrinol., 2018). Next, we also focused on Neuromedin B (NMB) and Gastrin Releasing Peptide (GRP), which are bombesin-like peptides. We generated knockout mice lacking the genes for both molecules. We found that the mice lacking the NMB gene had increased Thermo production in brown adipose tissue and suppressed high-fat diet-induced weight gain and ectopic fat accumulation in the liver. These data suggest that these molecules may be the therapeutic target for obesity and its related metabolic diseases.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：脂肪細胞 肥満 代謝疾患 マウス疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

これまでヒトにおいては、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞とエネルギーを消費する褐色脂肪細胞の存在が知られていたが、近年、第三の脂肪細胞として白色脂肪組織中に存在するエネルギー燃焼型白色脂肪細胞「ベージュ脂肪細胞」が発見され注目されている¹⁾。この脂肪細胞は、寒冷刺激などの環境刺激において白色脂肪組織中に出現し、発熱やエネルギー消費に関与する。その遺伝子発現プロファイルから白色脂肪細胞とは独立した細胞系列であり、脱共役タンパク質 UCP1 を介した熱産生を起こすことが明らかとなっている。小児においては熱産生に褐色脂肪が重要な役割を持っているが、成人において褐色脂肪はほぼ消失し、代わりにベージュ脂肪細胞が熱産生やエネルギー消費に関与するとの報告がなされている。よって、ベージュ脂肪細胞の活性化が内蔵型肥満や代謝異常の重要な治療戦略になりえるものと考えられる。しかしながら、その発生機構に関しては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ベージュ脂肪細胞の分化・活性化に関与する分子機構を解明し、抗肥満・代謝改善薬の分子標的としての可能性を持つ分子を同定することである。我々は、単一のマウス個体から独自に白色脂肪前駆細胞株とベージュ脂肪前駆細胞株を樹立し、ベージュ脂肪細胞の分化段階における遺伝子発現プロファイル解析を行うとともに、7,500 個の shRNA ライブラリー (約 5,000 個の遺伝子を標的とする) を用いてベージュ脂肪細胞の分化・活性化に関与する分子のスクリーニングを行った。その中から得られた候補遺伝子遺伝子について、細胞レベルにおけるベージュ脂肪細胞分化への関与と、生体レベルにおける肥満や代謝異常への関与について解析を行う。

3. 研究の方法

スクリーニングでヒットした候補分子の検証と、どのようなメカニズムでベージュ脂肪細胞の分化または活性化に関与するのか、その分子メカニズムについて *in vitro* または *in vivo* のモデルを用いて解析をおこなう。

(1) CRISPR/CAS9 システムを用いた候補遺伝子の遺伝子欠損細胞の作製

ベージュ脂肪前駆細胞に対し、候補遺伝子に対する特異的 PAM 配列を導入したノックアウトベクター (pX330 : Addgene) を nucleofection 法で導入する (Lonza 社)。限界希釈法にてクローニングし、シークエンスを行って遺伝子欠損細胞を同定する。この各遺伝子欠損ベージュ脂肪細胞における分化度と活性化度 (UCP1 発現) を調べる。

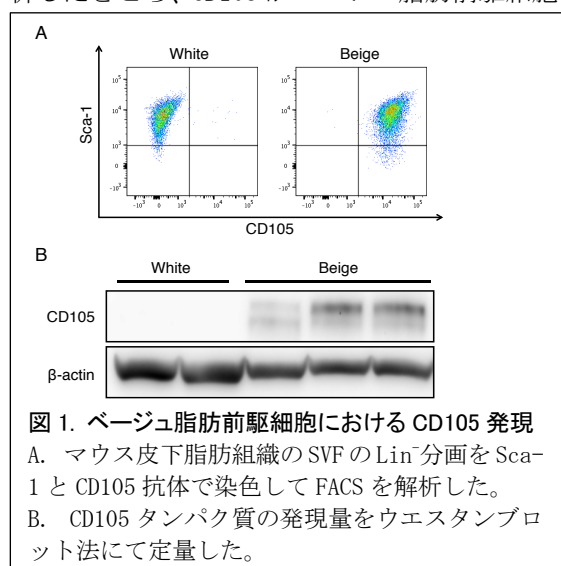
(2) 候補分子の生体レベルでの検証

候補分子の遺伝子改変マウスを作製し、皮下脂肪組織におけるベージュ脂肪細胞の分化や肥満、糖代謝に対する影響を解析する。遺伝子改変マウスは、CRISPR/CAS9 システムを用いたゲノム編集により作製する。これらの遺伝子改変マウスの皮下脂肪組織におけるベージュ脂肪細胞の分化・活性化の程度を判定する。さらに、高脂肪食負荷による肥満モデルを作製し、肥満の程度と代謝異常について解析を行う。

4. 研究成果

(1) CD105

ベージュ脂肪細胞で特異的に発現し、分化・活性化に関与する分子を探索するため、マウス白色脂肪細胞とマウスベージュ脂肪細胞の遺伝子発現の差異を RNA シークエンスにて網羅的に解析したところ、CD105 がベージュ脂肪前駆細胞で高発現を認めた (図 1)。マウスにおいてベージュ脂肪細胞は皮下脂肪に多く存在し、褐色脂肪組織および内臓脂肪組織にはあまり存在しないことから、もし CD105 がベージュ脂肪前駆細胞のマーカーとして有用であるとするなら、CD105 陽性脂肪前駆細胞は主に皮下脂肪組織に存在すると考えられる。そこで、褐色脂肪組織、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織において CD105 陽性の脂肪前駆細胞分画を調べたところ、皮下脂肪組織において高い細胞数を認めた (図 2)。よって、CD105 はベージュ脂肪前駆細胞の細胞マーカーになり得る可能性が示唆された。



次に、CD105 がベージュ脂肪前駆細胞において、細胞分化または UCP1 の発現等活性化に機能するのか検討するため、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて CD105 遺伝子欠損細胞 (CD105^{-/-}) を作製した。CD105^{-/-}細胞において CD105 タンパク質の発現が消失していることを

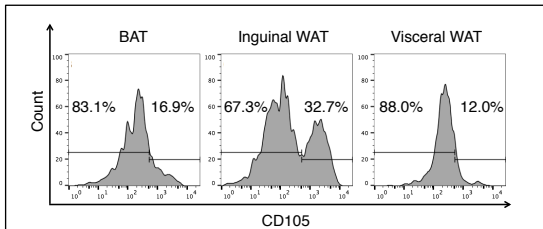


図 2. 各脂肪組織における CD105 陽性脂肪前駆細胞の割合

マウスの各脂肪組織より分離した SVF 中における CD105 陰性細胞および陽性細胞の割合を FACS にて解析した。

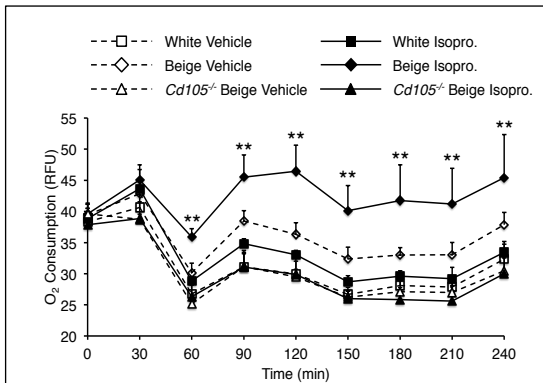


図 3. CD105 遺伝子欠損ベージュ脂肪細胞におけるエネルギー代謝量の低下

FACS 解析にて確認した。この細胞を用いて、分化および活性化について野生型ベージュ脂肪前駆細胞と比較を行った。成熟脂肪細胞への分化については差がなかったが、分化後 $\beta 3$ アゴニスト (Isoproterenol) 刺激による UCP1 の発現を検討したところ、CD105^{-/-}細胞においてほぼ完全に消失していることが判明した。さらに、実際に UCP1 発現低下だけではなくベージュ脂肪細胞としての特性であるエネルギー代謝活性が低下しているか検討するため、酸素感受性プローブを用いた MitoXpress-Xtra oxygen consumption assay を行い細胞内呼吸を評価した。図 3 に示す通り、予想通り CD105^{-/-}細胞より分化したベージュ細胞は白色脂肪細胞と同程度にエネルギー代謝効率が低下していた。これらの結果より、CD105 はベージュ脂肪前駆細胞が機能的なベージュ脂肪細胞に分化成熟化する上で重要な役割を担っていることが示唆された。CD105 は、TGF β ファミリー受容体の共受容体としてシグナルを調節していることが報告されている²⁾。そこで、下流シグナルである Smad2/3 分子のリン酸化について調べたところ、CD105 遺伝子欠損細胞において Smad2 のリン酸化が白色脂肪細胞と同程度に増強していることが判明した。つまり、CD105 は、ベージュ脂肪前駆細胞においては TGF- β ファミリー受容体のシグナルを負に制御し、Smad2 の活性化を抑制することでベージュ脂肪細胞への分化が保持されていることが明らかとなった。

(2) ボンベシン様ペプチド NMB および GRP

我々は、独自に樹立したマウス由来ベージュ脂肪細胞株を用いて、shRNA ライブラリースクリーニングおよび網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ボンベシン様ペプチドである Neuromedin B (NMB) がベージュ脂肪細胞の分化を抑制することを見出した。さらに、ベージュ脂肪細胞の活性化によって、同じくボンベシン様ペプチドである Gastrin Releasing Peptide (GRP) の遺伝子発現が著明に増加していることが明らかとなった。そこで、褐色およびベージュ脂肪細胞の活性化を含む全身のエネルギー代謝調節機構における NMB と GRP の機能について明らかにするため、独自に作製した NMB 遺伝子欠損マウスおよび GRP 遺伝子欠損マウスを詳細に解析した。

まず、NMB 遺伝子欠損マウスにおいて、通常食および高脂肪食摂取下における体重変化を野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群間で検討した。通常食摂取下では野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群間において有意な体重差は認められなかった。一方、高脂肪食摂取下では、野生型マウス群に比べ NMB 遺伝子欠損マウス群において体重増加量の有意な減少が認められた。続いて、普通食および高脂肪食摂取下における摂食量、活動量および酸素消費量について検討を行ったところ、摂食量および活動量については両群間で有意な差は認められなかった。一方、酸素消費量については、高脂肪食摂取下において、野生型に比べ NMB 遺伝子欠損マウス群で有意に増加していることが明らかとなった。また、普通食摂取下では NMB 遺伝子欠損マウス群の褐色脂肪組織における脂肪滴の蓄積が野生型に比べて減少していた。加えて、NMB 遺伝子欠損マウス群では高脂肪食負荷後の肝臓重量が野生型群に比べ著明に低下していた。以上のことから、NMB 遺伝子欠損マウス群では褐色脂肪組織における熱産生の増加によって、高脂肪食摂取による体重増加および肝臓への異所性脂肪の蓄積が抑制されていることが示唆された。

次に、GRP 遺伝子欠損マウスにおいて、通常食および高脂肪食摂取下における体重変化を野生型マウス群と NMB 遺伝子欠損マウス群間で検討した。GRP 遺伝子欠損マウスについては通常食および高脂肪食摂取の両方において体重増加量、摂食量、活動量、酸素消費量について両群間で有意な差は認められなかった。続いて、糖負荷試験を行ったところ、血中グルコース濃度については野生型と GRP 遺伝子欠損マウス群間で有意な差は認められなかったものの、GRP 遺伝子欠損マウス群においてグルコース負荷後 15 分における血清インスリン濃度が野生型群に比べ減少している傾向が認められた。今後、さらに NMB および GRP のシグナルがどのような分子メカニズムでエネルギー代謝機構に関与するのか、解析を進める。

<引用文献>

- ① Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 20: 366-76.
- ② Whitman M, Raftery L. TGF β signaling at the summit. 2005; 132: 4205-10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Masanori, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Yatsuka Hiroyuki, Fujinami Hiroyuki, Morisaki Ikuko, Nishida Yoshihiro, Matsubara Etsuro, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Matsumoto Masaki, Penninger Josef M., Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 525
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 726 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.157	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 該当する

1. 著者名 Fujinami Hiroyuki, Shiraishi Hiroshi, Hada Kazumasa, Inoue Masanori, Morisaki Ikuko, Higa Ryoko, Shin Toshitaka, Kobayashi Takashi, Hanada Reiko, Penninger Josef M., Mimata Hiromitsu, Hanada Toshikatsu	4. 巻 525
2. 論文標題 CLP1 acts as the main RNA kinase in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 129 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.066	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 該当する

1. 著者名 Rao Shuan, Mondragon Laura, Pranjic Blanka, Hanada Toshikatsu, 他28名	4. 巻 29
2. 論文標題 AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Research	6. 最初と最後の頁 579 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41422-019-0181-4	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 該当する

1. 著者名 Hada Kazumasa, Hirota Keiko, Inanobe Ai, Kako Koichiro, Miyata Mai, Araoi Sho, Matsumoto Masaki, Ohta Reiya, Arisawa Mitsuhiro, Daitoku Hiroaki, Hanada Toshikatsu, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 294
2. 論文標題 Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3091 ~ 3099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.RA118.004726	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 Higa Ryoko, Hanada Toshikatsu, Teranishi Hitoshi, Miki Daisuke, Seo Kazuyuki, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Mimata Hiromitsu, Hanada Reiko, Kangawa Kenji, Murai Toshiya, Nakao Kazuwa	4. 巻 474
2. 論文標題 CD105 maintains the thermogenic program of beige adipocytes by regulating Smad2 signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 184 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.mce.2018.03.008	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 Teranishi H, Hayashi M, Higa R, Mori K, Miyazawa T, Hino J, Amano Y, Tozawa R, Ida T, Hanada T, Miyazato M, Hanada R, Kangawa K, Nakao K.	4. 巻 99
2. 論文標題 Role of neuromedin U in accelerating of non-alcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 134-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2017.09.011.	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 花田俊勝, 比嘉涼子, 花田礼子	4. 巻 23
2. 論文標題 褐色脂肪研究の今	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 肥満研究	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Madeline Carrasco, Ryoko Higa, Kenshiro Shikano, Ryohei Umeda, Masanori Inoue, Kyoko Kiyota, Toshiikatsu Hanada, Kenji Ihara, Reiko Hanada
2. 発表標題 Molecular mechanism of APPL2 on NAFLD/NASH pathogenesis in zebrafish
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoko Higa, Ikuko Morisaki, Kenshiro Shikano, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 Physiological function of Neuromedin B in beige adipocyte.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoko Higa, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 CD105 maintains the rhermogenic program of beige adipocyte.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉涼子、森崎郁子、鹿野健史郎、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 ページ脂肪細胞におけるNeuromedine B (NEB)の機能解析
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿野健史郎、森崎郁子、比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9法による視床下部内分泌性小タンパク質NPGL/NPGM遺伝子欠損モデル動物の作出及び表現型解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉涼子、寺西仁志、花田礼子、花田俊勝、中尾一和
2. 発表標題 マウス由来誘導型褐色脂肪細胞におけるCD105の機能解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田礼子、花田俊勝、寒川賢治、中尾一和
2. 発表標題 ベージュ細胞の熱産生機構におけるCD105の役割
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田礼子、花田俊勝
2. 発表標題 CD105は誘導型褐色脂肪細胞において熱産生プログラムを調節する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子 ベージュ脂肪細胞におけるCD105の機能解析
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞におけるCD105の機能解析
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子、中尾一和
2. 発表標題 マウス鼠径部白色脂肪組織の誘導型褐色脂肪細胞におけるCD105の機能解析
3. 学会等名 第38回日本肥満学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田欣広、太田三紀、北村裕和、檜原久司、花田俊勝、濱中良志
2. 発表標題 セクレターゼの欠損はGHRH receptorを介した胎児発育不良と関連している
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奈良 勲 (花田俊勝 分担)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 344 (うちp16 - 36を担当)
3. 書名 移動と歩行	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大分大学医学部細胞生物学講座 http://www.med.oita-u.ac.jp/seika1/</p>
--

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
研究分担者	花田 礼子 (Hanada Reiko) (00343707)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	波田 一誠 (Hada Kazumasa) (00546202)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	西田 欣広 (Nishida Yoshihiro) (10336274)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究協力者	比嘉 涼子 (Higa Ryoko)		
研究協力者	白石 裕士 (Shiraishi Hiroshi)		