

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0188

研究課題名（和文）高効率の褐色化を示す新規脂肪組織の分子解剖

研究課題名（英文）Elucidation of a Novel Fat Depot with Potent Beiging after Cold Exposure

研究代表者

李 恩瑛（LEE, EUNYOUNG）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60583424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円

渡航期間： 25ヶ月

研究成果の概要（和文）：我々は皮下脂肪組織より高効率に褐色化する、新規の脂肪組織を発見し、iBAT (inducible BAT)と命名した。そして、寒冷曝露によりiBAT特異的に発現誘導される35個の遺伝子（CIG1-CIG35）を同定した。この中のCIG1は寒冷曝露によりiBATで最も発現が増加した遺伝子であり、CIG1はヒトiPS細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導時には一過性の発現上昇が見られた。一方、寒冷曝露後にはiBATではUCP1陽性細胞にCIG1の遺伝子発現が誘導された。従って、CIG1は発生初期の脂肪細胞の分化とiBATの寒冷曝露時の褐色化という、2つの異なる機能を有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

今や全世界中で人口の多くが肥満を有しており、糖尿病、高血圧、動脈硬化など深刻な生活習慣病を引き起こす。しかし、脂肪エネルギーを熱に変換する褐色脂肪細胞を活性化することにより、肥満やインスリン抵抗性が改善することが知られており、これらの褐色脂肪細胞はヒト成人でも寒冷曝露により活性化することが報告されている。我々が発見した高効率の褐色化を示す新規脂肪組織での分子機序から遺伝子CIG1が脂肪細胞の分化や褐色化に重要であることが示されたことは学術的に意義が大きい。さらにもしCIG1を皮下脂肪細胞に発現誘導することにより、皮下脂肪の褐色化が誘導できれば新規の肥満治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We identified a new white adipose depot with high beiging capacity after cold exposure that surpluses that in other white adipose tissue depots, as assessed by cold-induced gene expression of UCP1, a brown adipose tissue (BAT)-specific marker. Therefore, we coined as iBAT (inducible BAT). From our RNA-seq analysis, we found that the expressions of 35 genes (CIG1-35; cold-induced, iBAT-specific gene 1-35) were significantly increased in iBAT compared with inguinal WAT. Interestingly, CIG1, the most robustly increased gene, was found to be expressed in UCP1-positive cells in iBAT after cold exposure. In addition, we found that CIG1 expression was temporarily increased during differentiation of induced pluripotent stem cells (iPS) cells into brown adipocytes. These results suggest that CIG1 is suggested to be involved not only in early stage of adipocyte differentiation but also in beiging of iBAT under cold exposure.

研究分野：代謝生理

キーワード：脂肪細胞 褐色化 組織幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

我々は「脂肪細胞による肝における胆汁酸と糖代謝の制御」の課題名で、インスリン抵抗性下での脂肪組織の代謝変化が肝臓をはじめとする全身の糖代謝制御に及ぼす影響について解析している。この解析で、野生型マウスの脂肪組織を糖尿病マウスへ移植することにより高血糖が大きく改善することを見いだした。移植する脂肪組織の細胞特性を検討する過程で、申請者は移植する脂肪組織の中に、寒冷曝露により高度に褐色化する特殊な白色脂肪組織が混在していることに気付いた。この脂肪組織の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、白色脂肪細胞の褐色化に関与することが既に示されている複数の遺伝子群が、典型的な褐色化を示す単径部白色脂肪組織 (WAT) と比較し、はるかに効率よく発現誘導されることを見いだした。我々はこの新規の脂肪組織を iBAT (inducible Brown Adipose Tissue) と命名し、その細胞特性の解析を行った。解析の結果、①iBAT では、寒冷曝露により褐色化に関わる多くの遺伝子群が著明に発現誘導されること、②特に、褐色脂肪組織の重要なマーカー分子である UCP1 の蛋白レベルが褐色脂肪組織 (BAT) と同等のレベルまで発現誘導がされることから、本脂肪組織は極めて高効率に褐色化する新たな WAT であることが明らかになった。そこで、我々は iBAT で高効率に褐色化が誘導される分子メカニズムを解析した。

2. 研究の目的

上記の通り、iBAT は室温下では他の WAT と同様の形態と遺伝子発現特性を示すが、寒冷曝露時には古典的 BAT と非常に類似した形態と遺伝子発現特性を示すことがわかった。WAT の褐色化は糖尿病や肥満などの代謝疾患の新規治療標的となる可能性があることから、本研究では我々が発見した高効率に褐色化する新規の脂肪組織である iBAT での分子メカニズムの解明や生理学的意義の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 寒冷曝露により iBAT 特異的に誘導される遺伝子 CIG1 の褐色化への関与

我々はまず、寒冷曝露後の遺伝子プロファイルを解析し、単径部 WAT と比較し iBAT 特異的に遺伝子発現が誘導される 35 個の遺伝子を (cold-induced, iBAT-specific gene 1-35, CIG1-CIG35) 同定した。中でも最も大きく発現が誘導された CIG1 に着目して、CIG1 の発現パターンとその制御を解析した。すなわち、CIG1 の遺伝子発現は iBAT において寒冷曝露により著明に上昇したことから、脂肪細胞株や各脂肪組織の初代培養細胞を用いて、成熟脂肪細胞への分化やベージュ化誘導実験を行い、各ステージでの CIG1 の遺伝子発現を解析した。

この目的で、褐色脂肪細胞株である pBAT、白色脂肪細胞株である 3T3L1 細胞を成熟細胞へ分化させ、各分化過程 (Day0, Day2, Day4, Day6, Day8) で、各ステージの分化マーカーを用いてその過程を確認し、また CIG1 の遺伝子発現を解析した。また、細胞株の解析では in vivo での生理的特徴を反映できない可能性を考慮し、4~6 週齢のマウスの BAT, iBAT, WAT から前駆脂肪細胞や幹細胞が存在していると言われている間質血管細胞群 (stromal vascular fraction: SVF) 分画を単離し、成熟脂肪細胞へ分化させ、その過程での CIG1 の発現変化を解析した。また、in vivo での寒冷曝露時の状況を in vitro で模倣するため、細胞株を成熟脂肪細胞へ分化させた 8 日後にノルエピネフリンで刺激し、ベージュ化を誘導した際の CIG1 の発現変化も解析した。さらに、ヒト iPSC 細胞から褐色脂肪細胞への分化の過程での CIG1 の発現プロファイルも解析した。また、CIG1 は CIG1 isoform2 (以下 CIG1-iso2), CIG1 isoform3 (以下 CIG1-iso3) というアイソフォームが存在することが報告されており、これらのアイソフォームの発現も解析した。

(2) CIG1 のノックアウトマウスを用いた寒冷曝露時の生体応答への CIG1 の役割の解明

上記の in vitro, ex vivo, ヒト iPSC 細胞の成熟褐色脂肪細胞への分化実験から、CIG1 の発現は細胞株のタイプにより異なることが明らかになった。そこで、生体での CIG1 の発現パターンとその制御を解析する目的で、CIG1 の遺伝子座に GFP をノックインしたマウス (CIG1GFP/+マウス) を用いて、寒冷曝露後にどの様な細胞に CIG1 の発現が誘導されるのかを解析した。さらに、CIG1 のノックアウトマウス (CIG1GFP/GFP マウス) での寒冷曝露時の体温調節機構を解析した。

4. 研究成果

1) 寒冷曝露により iBAT 特異的に誘導される CIG1 の褐色化への役割

(1-1) 細胞株を用いた検討

我々はまず、マウスの褐色脂肪細胞株である pBAT 細胞を成熟細胞へ分化させた。分化とともに褐色脂肪細胞のマーカーである Ucp1, Prdm16, Pgc1a の明らかな上昇が見られたが (図 1)、iBAT において寒冷曝露時に発現増加した CIG1 は予測と反して分化とともに発現はむしろ

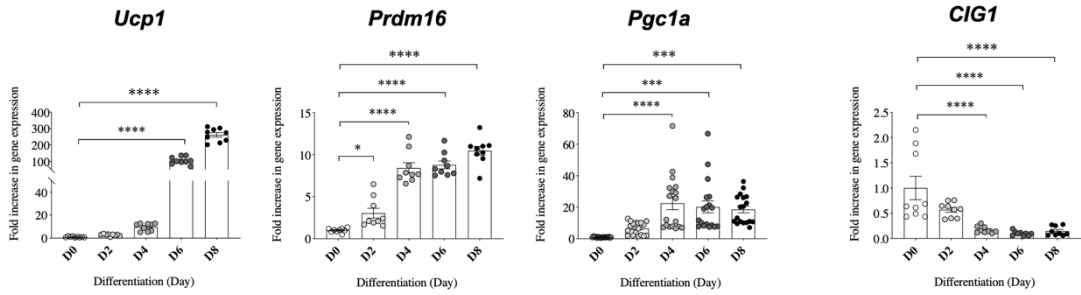


図1 pBATでの分化による褐色脂肪細胞マーカー検討

図2 pBATでの分化によるCIG1の発現検討

明らかに抑制されていた (図2)。また、白色脂肪細胞への分化実験として、マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞を用いた。成熟白色脂肪細胞へと分化させると成熟マーカーである Adiponectin, Pparg2, Cd36 の発現上昇は見られたが (図3)、CIG1 の発現は in vivo の

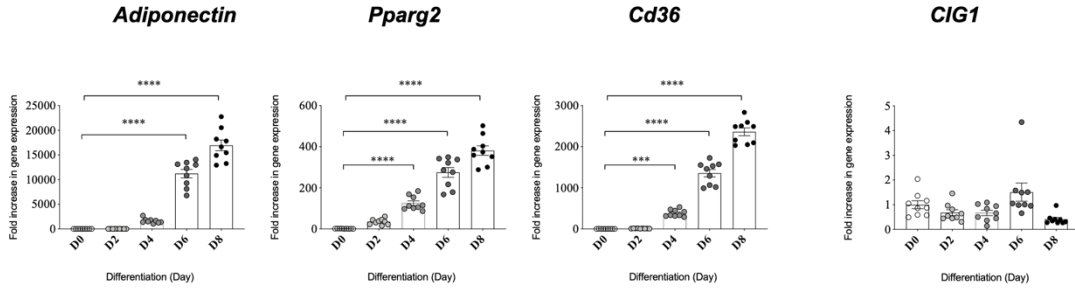


図3 3T3L1細胞での分化による白色脂肪細胞マーカー検討

図4 3T3L1細胞での分化によるCIG1の発現検討

WAT と同じくほとんど発現が見られず、分化による上昇も見られなかった (図4)。CIG1 が他の組織での幹細胞のマーカーであるとの報告があることと、本実験で細胞株では分化時の CIG1 の発現が上昇しなかったことから、前駆細胞やもっと早期の組織幹細胞が CIG1 を発現している可能性が考えられた。

(1-2) 初代脂肪細胞を用いた検討

用いた細胞株では組織幹細胞が存在しないことや in vivo では見られた細胞特性を失っている可能性を考え、マウスから BAT, iBAT, WAT で前駆細胞を単離し、それぞれ成熟細胞へ分化させた。Ucp1 発現は BAT から単離した前駆脂肪細胞と SVF 分画を成熟脂肪細胞へ分化させた際、明らかに上昇したが、iBAT, WAT では室温飼育下での in vivo 実験と同じくほとんど Ucp1 発現は見られなかった。一方、adiponectin は分化とともに全ての脂肪細胞で上昇していた。しかしながら、前駆細胞から成熟脂肪細胞へ分化させた際は CIG1 の発現は非常に低値を示した (図5)。このことから、CIG1 は脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化は必須の役割を果たしていないと考えられた。

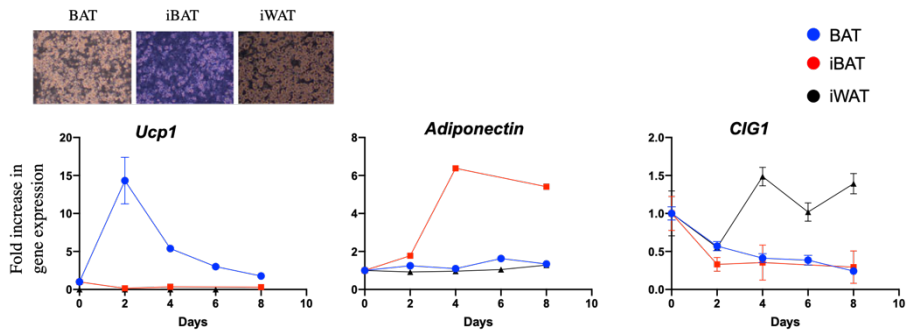


図5 初代脂肪細胞を成熟脂肪細胞に分化した際の遺伝子発現検討

CIG1 は寒冷曝露時に iBAT で有意に上昇するため、我々は次にそれぞれの脂肪組織から単離した前駆細胞を成熟脂肪細胞へ分化させ、8日後にベージュ化を誘導させるためノルエピネフリンで刺激し、Ucp1 と CIG1 の発現を検討した。すると、既報の通り内臓脂肪 (eWAT) ではノルエピネフリンによる Ucp1 発現上昇

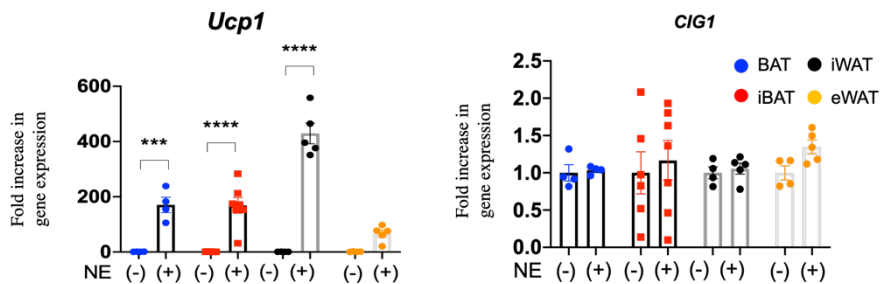


図6 初代成熟脂肪細胞でのベージュ化誘導による遺伝子発現検討

は見られないものの、BAT, iBAT, WAT では有意に上昇していた。また、面白いことに神経制御の関与が除外できる *in vitro* 培養下ではノルエピネフリンによる Ucp1 発現上昇は BAT, iBAT, WAT で差が見られなかった。このことから、*in vivo* での寒冷曝露による Ucp1 発現誘導には神経制御も関与していることも示唆された。しかし、CIG1 の発現誘導に関しては *in vivo* の結果と異なってノルエピネフリンによる上昇は見られなかった (図6) ことから、前駆細胞や SVF の分画から成熟細胞に培養した際に、幹細胞の特性を失っている可能性と、寒冷曝露による CIG1 の発現上昇は脂肪細胞以外からの液性因子により誘導される可能性が示唆された。

(1-3) iPS 細胞の脂肪細胞分化系を用いた検討

細胞株や初代脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化時には CIG1 の発現上昇が見られなかったことからこれらの細胞あるいは培養条件では幹細胞の特性が失われている可能性が考えられた。そこで、我々はヒト iPS 細胞を用いて褐色脂肪細胞へ分化させる実験系を用いた。すると、分化とともに Ucp1 発現は上昇した。また、面白いことに CIG1 とアイソフォームである遺伝子 CIG1-iso2, CIG1-iso3 は分化とともに一時的な発現上昇を示した。すなわち、CIG1-iso2 は初期の幹細胞の時期に発現が誘導され、CIG1 は Ucp1 発現上昇する前の前駆脂肪細胞の段階で一時的に上昇していた (図7)。これらの結果から CIG1 はヒト iPS 細胞では褐色脂肪細胞への分化に関与している可能性が示唆された。しかしながら、これらの遺伝子発現の褐色脂肪細胞への分化への関与を解析する目的で *crispr-cas9* system を用いてそれぞれの遺伝子をノックアウトした iPS 細胞を作成した。今後このノックアウト iPS 細胞を用いて褐色脂肪へ分化の関与を解析する予定である。

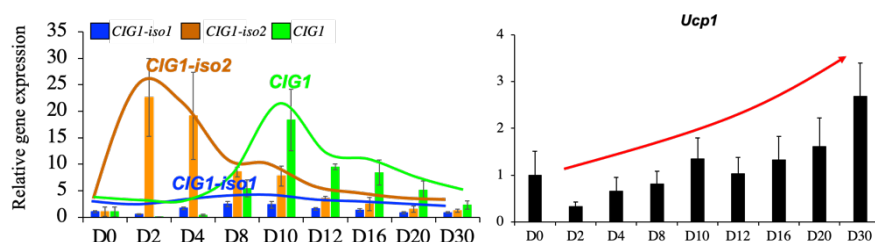


図7 ヒトiPS細胞の褐色脂肪細胞へ分化させた際に遺伝子発現検討

への分化に関与している可能性が示唆された。しかしながら、これらの遺伝子発現の褐色脂肪細胞への分化への関与を解析する目的で *crispr-cas9* system を用いてそれぞれの遺伝子をノックアウトした iPS 細胞を作成した。今後このノックアウト iPS 細胞を用いて褐色脂肪へ分化の関与を解析する予定である。

(2) CIG1^{GFP/+}マウスを用いた寒冷曝露時の生体応答の解析

以上の結果から、CIG1 は未分化な細胞ステージに限局して発現していることが明らかになった。しかしながら、寒冷曝露時に BAT や iBAT で明らかに上昇する CIG1 がどのような細胞に発現しているのかは不明である。そこで、CIG1 遺伝子座に GFP をノックインしたマウス (CIG1^{GFP/+}マウス) を用いて解析した。その結果、CIG1 の発現は iBAT では室温では発現がほとんどみられないが、寒冷曝露により UCP1 と並行して著明に増加することを見出した。意外なことに、*in vitro* の実験からは CIG1 が成熟褐色脂肪細胞の分化への関与は示されなかったにも関わらず、CIG1 陽性細胞はほぼ全ての細胞で UCP1 が陽性であった (図8)。一方、初代脂肪細胞から前駆細胞と SVF 分画を単離し、成熟脂肪細胞へ分化させベージュ化を誘導した際には CIG1 の発現上昇は見られなかった。さらに、今後は CIG1 のノックアウトマウス (CIG1^{GFP/GFP} マウス) での寒冷曝露時の体温調節機構を解析する予定である。

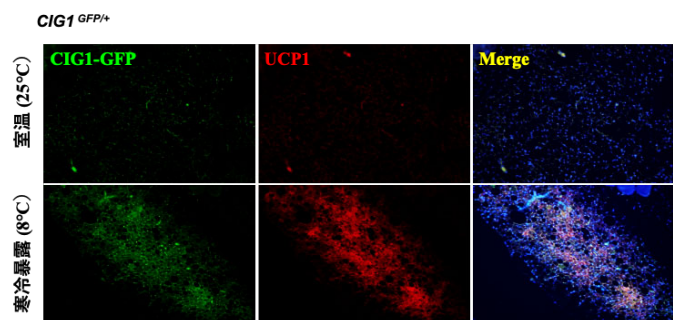


図8 iBATでの寒冷曝露によるCIG1とUCP1の共発現

以上の解析結果から、CIG1 は発生初期の脂肪細胞ではその分化に関わり、iBAT では寒冷曝露時の褐色化に関わるという、2つの異なる機能を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lee Eunyoung, Miedzybrodzka Emily L., Zhang Xilin, Hatano Ryo, Miyamoto Junki, Kimura Ikuo, Fujimoto Kosuke, Uematsu Satoshi, Rodriguez-Cuenca Sergio, Vidal-Puig Antonio, Gribble Fiona M., Reimann Frank, Miki Takashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Diet-Induced Obese Mice and Leptin-Deficient Lepob/ob Mice Exhibit Increased Circulating GIP Levels Produced by Different Mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4448 ~ 4448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitamoto Takumi, Sakurai Kenichi, Lee Eun Young, Yokote Koutaro, Accili Domenico, Miki Takashi	4. 巻 82
2. 論文標題 Distinct roles of systemic and local actions of insulin on pancreatic β -cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 100 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2017.12.017	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 Lee Eun-Young, Zhang Xilin, Miyamoto Junki, Kimura Ikuo, Taknaka Tomoaki, Furusawa Kenichi, Jomori Takahito, Fujimoto Kosuke, Uematsu Satoshi, Miki Takashi	4. 巻 239
2. 論文標題 Gut carbohydrate inhibits GIP secretion via a microbiota/SCFA/FFAR3 pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-18-0241	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 Li J, Zhang Y, Ye Y, Li D, Liu Y, Lee E, Zhang M, Dai X, Zhang X, Wang S, Zhang J, Jia W, Zen K, Vidal-Puig A, Jiang X, Zhang CY.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pancreatic β cells control glucose homeostasis via the secretion of exosomal miR-29 family.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Extracell Vesicles	6. 最初と最後の頁 e12055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wada, M., Yukawa, K., Ogasawara, H. Suzawa, K., Maekawa, T., Yamamoto, Y., Ohta, T., Lee, E., Miki, T.	4. 巻 24
2. 論文標題 GPR52 accelerates fatty acid biosynthesis in a ligand-dependent manner in hepatocytes and in response to excessive fat intake in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Eun-Young Lee, Xilin Zhang, Junki Miyamoto, Ikuo Kimura, Ryo Hatano, Takashi Miki
2. 発表標題 Distinct mechanism for the elevation of plasma glucose-dependent insulintropic polypeptide by high-fat-diet and by leptin-deficiency
3. 学会等名 55th EASD Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 6.李恩瑛、張錫麟、宮本潤基、木村郁夫、波多野亮、三木隆司
2. 発表標題 肥満における高GIP血症の発症機序
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李恩瑛
2. 発表標題 脂肪組織の代謝シグナルによる糖調節機構
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木隆司、李恩瑛、宮本潤基、木村郁夫
2. 発表標題 腸管内の栄養素感知とインクレチン分泌制御
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019 / 日本薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波多野亮, 高山実樹子, 川口高德, 福富俊之, 木村徹, 櫻井裕之, 李恩瑛, 三木隆司, 浅野真司
2. 発表標題 エズリンの腎近位尿管における膜タンパク質の局在制御と溶質再吸収調節機構
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 Lee, E.Y., Miyamoto, J., Kimura, I., Miki, T.
2. 発表標題 Gut microbiome induced by intra-intestinal carbohydrates suppresses glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion.
3. 学会等名 53rd EASD Annual Meeting, Berlin (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李恩瑛、張錫麟、宮本潤基、木村郁夫、三木隆司
2. 発表標題 腸内細菌叢を介したGIP分泌抑制のメカニズム
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波多野亮, 高山実樹子, 川口高德, 福富俊之, 木村徹, 櫻井裕之, 李恩瑛, 三木隆司, 浅野真司
2. 発表標題 エズリンの腎近位尿管における膜タンパク質の局在制御と溶質再吸収調節機構
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 三木隆司、波多野亮、張錫麟、陳雪、馬玉潔、金田篤志、李恩瑛
2. 発表標題 脾 細胞再生の分子機構
3. 学会等名 令和2年度生理研研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuo Wada, Kayo Yukawa, Hiroyuki Ogasawara, Koichi Suzawa, Tatsuya Maekawa, Yoshihisa Yamamoto, Takeshi Ohta, Eunyoung Lee, Takashi Miki.
2. 発表標題 Regulation of fatty acid biosynthesis in liver through GPR52 signaling.
3. 学会等名 第98回日本生理学会 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮, 張錫麟, 馬玉潔, 陳雪, 李恩瑛, 金田篤志, 三木 隆司
2. 発表標題 脾 細胞傷害モデルマウスを用いた脾島再生機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会大会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Hatano, Xillin Zhang, Chen Xue, Eunyoung Lee, Atsushi Kaneda, Takashi Miki
2. 発表標題 Investigation of molecular mechanisms in pancreatic cell regeneration using -cell-specific injured mice
3. 学会等名 第98回日本生理学会 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヴィダルーブッシュ アントニオ (Vidal-Puig Antonio)	ケンブリッジ大学・Institute of Metabolic Science・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カロビオ ステファニア (Carobbio Stefania)	ケンブリッジ大学・Wellcome Sanger Institute・Research associate	

6. 研究組織（つづき）

	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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ロドリゲス・クエンカ セルジオ (Rodriguez-Cuenca Sergio)	ケンブリッジ大学・Institute of Metabolic Science・ Research associate	

	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
その他の研究協力者	李 菁 (Li Jing)	南京大学・Institute of Artificial Intelligence Biomedicine・Associate professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Cambridge			
中国	Nanjing University			