

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34423

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05511

研究課題名(和文) ビタミンDの新規生理作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel physiological function of vitamin D

研究代表者

楠堂 達也 (KUSUDO, Tatsuya)

帝塚山学院大学・人間科学部・准教授

研究者番号：00460535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンDの新規生理作用として褐色脂肪分化促進作用について検討した。その結果、生理的濃度の活性型ビタミンDは分化初期に作用して促進作用を示すこと、この作用は褐色脂肪特異的であることを明らかにした。また、応用化に向けた分子基盤を構築するために、複数のビタミンDアナログについて褐色脂肪分化促進作用を検討した。その結果、非常に高い作用を有するビタミンDアナログが見いだされ、応用化につながる成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、内臓脂肪の蓄積、いわゆる肥満を基盤としたメタボリックシンドロームが社会的問題となっており、その新しい対策法としてエネルギーを消費して熱に変換する褐色脂肪組織が注目されている。本研究では、ビタミンDが生理的濃度において褐色脂肪特異的に分化促進作用を有することを明らかにした。本研究成果は、ビタミンDの新規な生理作用を付加するという学術的意義のみならず、メタボリックシンドローム治療薬の開発のためのシーズを提供する成果として高い社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the promoting effect of vitamin D on brown adipocyte differentiation. We found that the active form of vitamin D, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ [1, 25(OH)₂D₃], acts in the early stage of differentiation and promotes brown adipogenesis at physiological concentration. This action was specific for brown adipogenesis. To build an application platform for drug development to improve metabolic syndrome, we examine the ability of vitamin D analogs to promote brown adipogenesis. As a result, we found a vitamin D analog with a high brown adipocyte differentiation-promoting effect.

研究分野：栄養生化学

キーワード：褐色脂肪 褐色脂肪分化 ビタミンD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪の過剰な蓄積、いわゆる肥満を基盤としたメタボリックシンドロームが社会問題となっており予防法、治療法が求められている。脂肪組織には白色脂肪組織と褐色脂肪組織の2種類が存在し、白色脂肪組織がエネルギーを蓄積する貯蔵器官であるのに対して、褐色脂肪組織はエネルギーを消費して熱として放出する燃焼器官である。ヒトの場合、褐色脂肪組織は新生児期には豊富に存在するものの、その後急激に減少することから、**10**年ほど前までは、成人では生理的に意義のある量の褐色脂肪組織は存在しないと考えられてきた。しかし、近年、成人においても褐色脂肪細胞が存在し、その減少が肥満や糖尿病の原因と密接な関連があることが分かってきた。従って、褐色脂肪組織の活性化や増量は、メタボリックシンドロームの画期的な対策法として期待されている。しかしながら、これまでの所、褐色脂肪を活用した有効な治療法は確立されていない。

ビタミン **D** は脂溶性ビタミンの **1** つであり、肝臓で **25** 位が水酸化され **25(OH)D** となった後、腎臓で **1 α** 位が水酸化を受けて活性型ビタミン **D** である **1 α , 25(OH) $_2$ D** となる。活性型ビタミン **D** の働きとしてはカルシウムの恒常性維持や骨形成がよく知られているが、その他にも、免疫、炎症、発癌など広く生体機能の調節に関与している。ビタミン **D** の生理作用の多くはビタミン **D** 受容体(**VDR**)を介したものであるが、**VDR** は生体内のあらゆる組織に存在していることから、ビタミン **D** には更なる未知の生理作用が存在する可能性が高いと考えられる。先行研究において、我々はビタミン **D** の新規生理作用として褐色脂肪分化促進作用を見出した。しかしながら、その作用メカニズムや他のビタミン **D** 類縁化合物(ビタミン **D** アナログ)が褐色脂肪分化に与える影響については不明であった。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞はエネルギーを熱に変換する機能を有することから、肥満を基盤とするメタボリックシンドロームに対する有望な治療・予防手段として注目されている。我々は、活性型ビタミン **D** に褐色脂肪分化促進作用があることを発見した。本研究では、活性型ビタミン **D** が褐色脂肪化を促進する作用メカニズム、生理的意義を明らかにすると共に、本作用を利用したメタボリックシンドローム改善剤開発のための応用基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞の培養と分化

褐色脂肪のモデル細胞である **C3H10T1/2** 細胞の褐色脂肪細胞への分化、及び白色脂肪のモデル細胞である **3T3-L1** 細胞の白色脂肪細胞への分化は、定法に従った。褐色脂肪細胞への分化は **Ucp1** 遺伝子の発現量を指標とした。

VDR ノックダウン実験

細胞における **VDR** のノックダウンには **Stealth RNAi** を使用し、**Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent** を用いて細胞に導入した。導入翌日に培地を交換し、さらに **2** 日間培養後に分化誘導を行った。

細胞生存アッセイ

活性型ビタミン **D** が未分化、及び分化した細胞に与える細胞障害性については、**Cell counting Kit-8** を用いた細胞生存アッセイによって評価した。

レポーターアッセイ

Ucp1 プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを **COS7** 細胞、及び **C3H10T1/2** 細胞に導入した。**24** 時間培養後、培地を交換し活性型ビタミン **D** を添加した。さらに **24** 時間培養した後、細胞を溶解し **Ucp1** プロモーター活性を測定した。

VDR 抑制アデノ随伴ウイルスの作製

VDR 抑制アデノ随伴ウイルスベクターの作製には **AAVpro Helper Free System** を用いた。**HEK293T** 細胞を用いて **VDR** 抑制アデノ随伴ウイルスを産生させ、**AAVpro Purification Kit** を用いて精製した。

VDR 抑制アデノ随伴ウイルスベクターのマウス褐色脂肪組織への投与

8 週齢の **C57BL/6J(雄)** マウスの背部を麻酔下で剃毛した。肩甲骨の上の皮膚を切開し、肩甲骨間褐色脂肪組織に **VDR** 抑制アデノ随伴ウイルスベクターを直接投与した。投与後、**2** 週間飼育し解剖した。

なお、本研究における動物実験、及び遺伝子組換え実験は、帝塚山学院大学の動物実験委員会、及び組換え **DNA** 実験安全委員会の承認を受けその規定に従って行った。

4. 研究成果

(1) ビタミン D による褐色脂肪化メカニズムの解析

褐色脂肪分化に対するビタミン D シグナルの関与

C3H10T1/2 細胞の褐色脂肪分化に対するビタミン D シグナルの役割について検討するために、**VDR** ノックダウン実験を行った。その結果、**VDR** の抑制により脂肪滴の蓄積は著しく減少し、褐色脂肪マーカーである **UCP1** の遺伝子発現量、及びタンパク質発現量はともに顕著に抑制された。このことから、ビタミン D シグナルが **C3H10T1/2** 細胞の褐色脂肪分化に重要な働きをしていることが示された。

活性型ビタミン D が褐色脂肪分化促進作用を発揮する条件

我々は、活性型ビタミン D が **C3H10T1/2** 細胞の褐色脂肪分化を促進することを発見した。そこで、活性型ビタミン D が褐色脂肪分化促進作用を発揮する条件（濃度、添加時期、添加期間）を検討した。その結果、活性型ビタミン D が本作用を発揮する濃度は、活性型ビタミン D の生理的濃度である **50-250 pM** であった。また、それ以上の濃度では濃度依存的に分化は抑制され、細胞生存率も低下した。添加時期に関しては、分化期間（7日間）を通して活性型ビタミン D を添加した場合と、分化誘導開始から **48** 時間のみ添加した場合では効果はほぼ同じであった。一方、分化誘導 **48** 時間以降に活性型ビタミン D を添加した場合には効果は見られなかった。従って、活性型ビタミン D は **C3H10T1/2** 細胞の褐色脂肪分化に対して、分化初期に作用することが明らかとなった。また、これらの作用は白色脂肪細胞のモデル細胞である **3T3-L1** 細胞では見られなかったことから、褐色脂肪細胞の分化に特異的な作用であることが示された。

褐色脂肪分化関連因子の発現変化

活性型ビタミン D が褐色脂肪分化の初期段階に作用することが明らかとなったことから、活性型ビタミン D による褐色脂肪分化促進作用のメカニズムを解析するために、既知の褐色脂肪分化関連因子の発現変化を検討した。褐色脂肪分化の初期に働く **PPARs** や **C/EBPs** などの発現について、経時的に測定を行った。しかしながら、これらの因子の遺伝子発現量、およびタンパク質発現量は活性型ビタミン D 添加によって変化を示さなかった。また、**Ucp1** プロモーターを用いたレポーター解析の結果から、活性型ビタミン D が直接的に **Ucp1** 遺伝子の発現に関与している可能性は否定された。

シグナルタンパク質のリン酸化状態の変化

Akt、**ERK**、**AMPK**、**CREB**、**CaMKII** などのシグナルタンパク質のリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより検討した。分化誘導 **24** 時間、**48** 時間の時点で細胞を回収し、リン酸化状態を解析した。しかし、大きな変化は認められず、褐色脂肪分化促進メカニズムに関連した変化を発見することはできなかった。

シクロオキシゲナーゼ(COX)シグナルの関与について

活性型ビタミン D は **COX** シグナルに影響することが報告されている。一方、**COX-2** シグナルが褐色脂肪分化に関与していることが報告されている。そこで、**COX** シグナルがビタミン D による褐色脂肪分化に関与しているかを検討した。**COX-1**、**COX-2** の遺伝子発現量、及びタンパク質発現量は、活性型ビタミン D の添加によって変化しなかった。また、**COX-2** 阻害剤であるセレコキシブの添加効果を検討した。しかし、セレコキシブの添加は褐色脂肪分化に影響せず、活性型ビタミン D による分化促進作用もセレコキシブ添加によって変化しなかった。したがって、**COX** シグナルは本作用メカニズムには関与しないと考えられた。

以上、～ より、ビタミン D による褐色脂肪分化促進作用は、既存のメカニズムとは異なることが示唆された。

(2) ビタミン D による褐色脂肪化の個体レベルでの検証

褐色脂肪分化におけるビタミン D の関与を個体レベルで明らかにするために、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた褐色脂肪組織特異的 **VDR** ノックダウン実験を行った。**8** 週齢の **C57BL/6J**(雄)マウスの褐色脂肪組織に **VDR** 抑制アデノ随伴ウイルスベクターを直接投与し、**2** 週間後に解剖した。その結果、**VDR** の遺伝子発現は **30%**減少していたものの、**Ucp1** 遺伝子の発現量に有意な変化は認められなかった。

(3) 応用基盤の確立

ビタミン D による褐色脂肪分化促進作用を利用したメタボリックシンドローム改善剤開発のための応用基盤を構築するために、**7** 種類のビタミン D アナログについて作用を検討した。その結果、ほとんどのビタミン D アナログに活性型ビタミン D と同様の褐色脂肪分化促進作用が確認された。また、非常に高い作用を有するビタミン D アナログが見いだされ、応用化につながる成果を得ることができた。

以上より、生理的濃度の活性型ビタミン D が分化初期に作用して分化促進作用を示すこと、この作用は褐色脂肪の分化に特異的であることが明らかとなった。また、非常に高い作用を有するビタミン D アナログを見出すことに成功し、応用化につながる成果を得ることができた。一方、作用メカニズムの特定、及び個体レベルでの検証については今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楠堂 達也
2. 発表標題 ビタミンDは褐色脂肪分化を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠堂 達也
2. 発表標題 ビタミンDの新規生理作用
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠堂 達也
2. 発表標題 ビタミンDの褐色脂肪分化促進作用
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規褐色脂肪細胞分化誘導剤	発明者 楠堂達也、向井貴子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-40037	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	向井 貴子 (MUKAI Takako) (60701464)	帝塚山学院大学・人間科学部・助手 (34423)	

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