

令和 5 年 7 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03116

研究課題名(和文) 新アディポカインNT3、NT4の骨格筋形成、萎縮、形質転換と筋紡錘形成への関わり

研究課題名(英文) Novel adipokines, NT3 and NT4/5 control mesenchymal stem cells

研究代表者

木村 和弘 (Kimura, Kazuhiro)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：30192561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経栄養因子(NT)は非神経組織にも発現するが、その役割については未解明な点が多い。ラット白色脂肪組織より間質血管画分を分画してNTの作用について調べたところ、細胞数に変化はなかった。しかし、中和抗体添加で細胞数が減少し、この減少はサイトカインの余剰投与で回復した。一方、神経成長因子NGFではこのような作用はみられなかった。マウスでも同様の反応が見られNT3およびNT4/5のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。現在、このマウスを用いて前駆脂肪細胞や筋芽細胞の細胞数や前駆脂肪細胞増殖因子として知られるPDGFやインスリンに対する応答性と分化因子発現を確定させている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ニューロトロピンNT3及び、NT 4/5のあらたな役割を解明することを目的とした。その結果二つのニューロトロピンが、前駆脂肪細胞の生存や分化因子への応答性を維持することが明らかとなり、一方インスリン依存性の前駆骨格筋細胞においても様々な影響を与えることが明らかとなった。現在NT3とNT4ノックアウトマウスを作成したので最終的な結論を得るために実験を行なっている。結果は、脂肪細胞及び骨格筋細胞の形成過程にニューロトロピンがどのように作用するか明らかにしたものであり前駆細胞の役割を示すものであり生活習慣病対策を考える上で重要である。

研究成果の概要(英文)：Neurotrophic factors (NTs) are also expressed in non-neural tissues, but their roles remain unresolved. When the stromal vascular fraction was fractionated from rat white adipose tissue and examined for the effects of NT, cell numbers did not change. However, the addition of a neutralizing antibody decreased cell number, and this decrease was reversed by an extra dose of cytokine. On the other hand, nerve growth factor NGF had no such effect. A similar response was observed in mice, and NT3 and NT4/5 conditioned knockout mice were generated. We are currently using these mice to determine the cell counts of progenitor adipocytes and myoblasts, and their responsiveness to PDGF, a known progenitor adipocyte growth factor, and insulin, as well as differentiation factor expression.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：褐色脂肪 ペーリュ脂肪細胞 エネルギー消費 UCP1 生活習慣病予防

### 1. 研究開始当初の背景

近年、発展途上国を含め、糖尿病などの生活習慣病患者数が増加し、社会問題化している。さらにロコモティブシンドロームといわれる一連の運動器疾患が増えるとより複雑な病態を呈する。これらの病態発症の基礎には肥満による低レベルの炎症があると考えられているがその詳細の多くは明らかにされていない、たとえば、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) が増加し、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の発現を引き起こす。しかし、産生された NGF がどのような役割を担うのか未解明のままである。我々は、脂肪細胞分泌因子のひとつであるアディポネクチンが NGF と結合して神経細胞の増殖を抑制することを見出している。一方、アディポネクチンと TNF の間に相互作用は認められなかった。

NGF が属するニューロトロフィンファミリーには、NGF の他に脳由来成長因子 (brain-derived growth factor)、ニューロトロフィン 3 (NT3) 及びニューロトロフィン 4 (NT4) が含まれ、各々 TrkA, TrkB, TrkC あるいは低親和性の p75 受容体を刺激する。予備実験により NT3 と NT4 は NGF と同様に白色脂肪組織の間質血管画分により多く発現し、またアディポネクチンとの結合性を示した。そこで本研究ではニューロトロフィンの間葉系中胚葉由来細胞に対する作用を明らかにして、生体内での役割を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

神経成長因子と 2 つの神経栄養因子に焦点を当て、炎症応答のほか、未成熟あるいは未分化な細胞が多いとされる間質血管細胞に対する作用をあきらかにして、前駆脂肪細胞や筋芽細胞の形成にどのように影響するか明らかにすること。

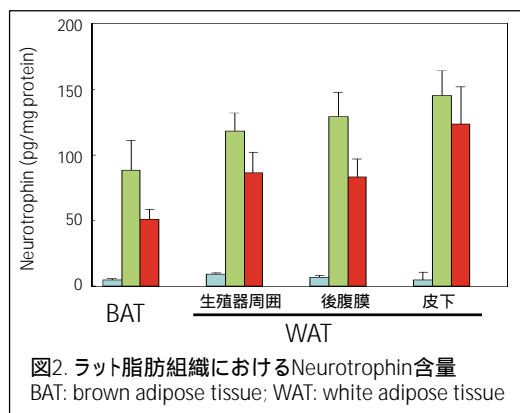
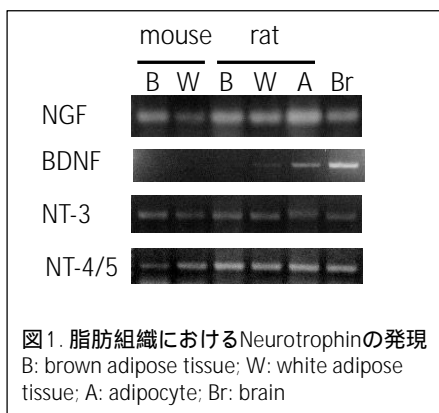
### 3. 研究の方法

実験には Wistar 系雄ラット、雄雌の C57BL/6J および 6N マウス、ならびに KK マウスを用いた。遺伝子の発現、サイトカインの定量は real-time PCR および ELISA を用いた。間質血管画分の分離培養はコラゲナーゼ法を用い、筋細胞の分離には通常のコラゲナーゼ法に加え組織培養を行った。細胞種の同定はローサイトメトリーを用いて解析した。サイトカイン、抗体等は購入した。得られたデータは統計処理を行い、有意差検定に供した。

### 4. 研究成果

はじめに、ラットに脂肪組織における NGF、NT3、NT4 の発現を確認したところ、白色脂肪組織において NGF と同レベルで NT3 と NT4 の mRNA が検出された (図 1)。また、組織中や培養上清に各タンパク質が存在することが確認された (図 2)。また前駆脂肪細胞のモデルのひとつである 3T3-L1 細胞を培養下で分化させると、NGF、NT3、NT4 の分泌は減少した。脂肪細胞への分化刺激は因子の誘導に抑制的であることがわかった。

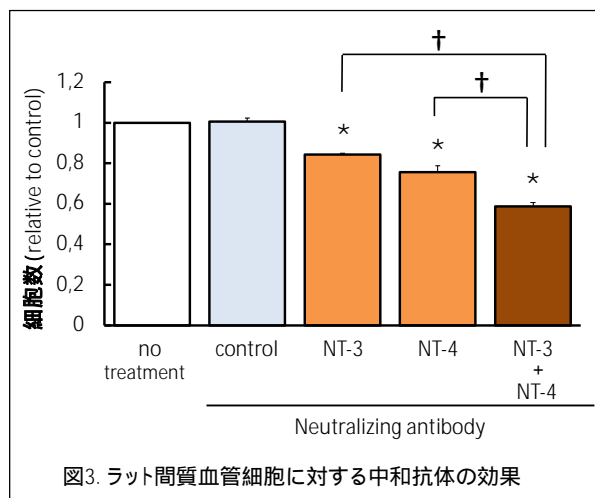
つぎに 3 つの因子について間質血管細胞の細胞数に対する影響を調べた。抗 NGF 抗体の添加は細胞数に影響を与えなかった。一方、抗 NT3 抗体あるいは抗 NT4 抗体の添加は細胞数を有意に減少させた (図 3)。興味深いことに効果は相加的であり、抗 NT3 抗体と抗 NT4 抗体の同時添加は、それぞれの単独添加に比べ細胞数をさらに減少させた。このように NT3 と NT4 には未分化な細胞の数を維持する役割がある事が示唆された。



マウスにおいてもラットと同様に、脂肪組織に NGF、NT3、NT4 の発現が認められ、間質血管細胞に培養下で神経栄養因子に対する抗体を添加するとラットの場合と同様に細胞数の減少が見られた。そこで、間質血管細胞のどの細胞に神経栄養因子が作用及ぼすかフローサイトメトリーを用いて解析した。CD45<sup>+</sup> (白血球) CD45<sup>-</sup>,CD31<sup>+</sup> (血管内皮細胞) CD45<sup>-</sup>,CD31<sup>+</sup>,CD34<sup>-</sup> (前駆脂肪細胞) CD45<sup>-</sup>,CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> (その他の細胞) に分画した。NGF 受容体である TrkA、NT3 受容体である TrkC、NT4 受容体である TrkB の 3 種の受容体の発現を調べたが、いずれの分画においても各受容体が 10~80%の細胞で発現し

ており、ニューロトロフィンの標的細胞を同定することはできなかった。また間質血管細胞を培養すると TrkA、TrkB、TrkC と低親和性受容体 p75 が消失した。つまり *in vitro* の状態では培養時の時間を厳密に制御する必要があると考えられた。

NT3 と NT4 の機能を明確にするため、それぞれコンディショナルノックアウトマウスを作製した。さらに両系統を交配させてコンディショナルダブルノックマウスを作成した。現在、NT3 および NT4 の発現抑制が細胞数に与える影響などを解析を行っている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Lee Ming-Liang, Matsunaga Hirokazu, Sugiura Yuki, Hayasaka Takahiro, Yamamoto Izumi, Ishimoto Taiga, Imoto Daigo, Suematsu Makoto, Iijima Norifumi, Kimura Kazuhiro, Diano Sabrina, Toda Chitoku	4. 巻 12
2. 論文標題 Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22431-6	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 Izawa Shuntaro, Yoneshiro Takeshi, Kondoh Kunio, Nakagiri Shohei, Okamatsu Ogura Yuko, Terao Akira, Minokoshi Yasuhiko, Yamanaka Akihiro, Kimura Kazuhiro	4. 巻 600
2. 論文標題 Melanin concentrating hormone producing neurons in the hypothalamus regulate brown adipose tissue and thus contribute to energy expenditure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 815 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP281241	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 -
1. 著者名 Mae Junnosuke, Nagaya Kazuki, Okamatsu-Ogura Yuko, Tsubota Ayumi, Matsuoka Shinya, Nio-Kobayashi Junko, Kimura Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Adipocytes and Stromal Cells Regulate Brown Adipogenesis Through Secretory Factors During the Postnatal White-to-Brown Conversion of Adipose Tissue in Syrian Hamsters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.698692	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 -
1. 著者名 Kim Dae-Yeon, Cheong Hee-Tae, Ra Chang-Six, Kimura Kazuhiro, Jung Bae Dong	4. 巻 18
2. 論文標題 Effect of 5-azacytidine (5-aza) on UCP2 expression in human liver and colon cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 2176 ~ 2186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.56564	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 Matsuoka Shinya, Suzuki Hiroyoshi, Kato Chieko, Kamikawa-Tokai Mai, Kamikawa Akihiro, Okamatsu-Ogura Yuko, Kimura Kazuhiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Expression of Grainyhead-like 2 in the Process of Ductal Development of Mouse Mammary Gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry and Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 373 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554211013715	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 -

1. 著者名 Slama Petr, Kabourkova Eliska, Sladek Zbysek, Zavadilova Terezie, Kratochvilova Lucie, Kharkevich Kristina, Roychoudhury Shubhadeep, Pavlik Ales, Roztocilova Andrea, Uhrincat Michal, Tancin Vladimir, Kimura Kazuhiro, Konecny Roman, Kiku Yoshio, Watanabe Atsushi, Kwak Jong-Young, Zouharova Monika	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Lipopolysaccharide and Muramyl Dipeptide on Apoptosis of Bovine Mammary Gland Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 990 ~ 990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani10060990	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 Oiwa Yuki, Oka Kaori, Yasui Hironobu, Higashikawa Kei, Bono Hidemasa, Kawamura Yoshimi, Miyawaki Shingo, Watarai Akiyuki, Kikusui Takefumi, Shimizu Atsushi, Okano Hideyuki, Kuge Yuji, Kimura Kazuhiro, Okamatsu-Ogura Yuko, Miura Kyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of brown adipose tissue thermogenesis in the naked mole-rat ( <i>Heterocephalus glaber</i> ), a heterothermic mammal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19488-19499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74929-6	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 Okamatsu-Ogura Yuko, Kuroda Masashi, Tsutsumi Rie, Tsubota Ayumi, Saito Masayuki, Kimura Kazuhiro, Sakaue Hiroshi	4. 巻 113
2. 論文標題 UCP1-dependent and UCP1-independent metabolic changes induced by acute cold exposure in brown adipose tissue of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 154396 ~ 154396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2020.154396	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 Tsubota, A., Okamatsu-Ogura, Y., Bariuan, J.V., Mae, J., Matsuoka, S., Nio-Kobayashi, J., and Kimura, K.	4. 巻 81
2. 論文標題 Role of brown adipose tissue in body temperature control during the early postnatal period in Syrian hamsters and mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1461 - 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0371	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------