

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07343

研究課題名（和文）UCP1イメージングマウスを用いたベージュ脂肪細胞誘導メカニズムの解析

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of beige adipocyte induction using the Ucp1-imaging mice

研究代表者

福田 綾（Fukuda, Aya）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50436276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肥満は世界的に深刻な問題となっている。肥満を解消する有用な候補の一つとして熱産生タンパク質UCP1を発現する褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞が近年注目されている。我々は当研究で作製したUcp1欠損マウスにおいて恒常的にベージュ脂肪細胞の誘導シグナルが活性化されていることを見出した。Ucp1欠損マウスと野生型マウスのベージュ脂肪組織の遺伝子発現解析から酸化還元関連経路など複数のシグナル経路がベージュ脂肪細胞誘導に関与することが示唆された。また、同定した経路に関連する酸化還元関連因子の一つがベージュ脂肪細胞誘導に重要な働きをする可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベージュ脂肪細胞は、寒冷刺激やアドレナリン等によって白色脂肪組織内に誘導され、褐色脂肪細胞と同様に熱産生機能を有する。ヒト成人においても褐色脂肪細胞が存在することが近年明らかになっており、寒冷刺激で活性化されるなどベージュ脂肪細胞に近い性質を持つと言われている。また、肥満度と褐色脂肪組織の活性には相関があり、褐色脂肪細胞を活性化させると安静時代謝量の増加が見られるという報告もある。これらのことより、ベージュ脂肪細胞の誘導経路を明らかにし、安全かつ継続的にベージュ脂肪細胞を増加させる方法の開発に繋げることができれば、肥満解消に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Obesity has become a serious problem worldwide. Brown adipocytes and beige adipocytes, which express the thermogenic protein UCP1, have recently attracted attention as useful candidates for reducing obesity. We found that beige adipocyte induction signals were constantly activated in the Ucp1-deficient mice which was made in our previous study. RNA-seq analysis of beige adipose tissues of Ucp1-deficient mice and wild-type mice suggested that multiple signal pathways, including redox-related pathways, are involved in the beige adipocyte induction. We also found that one of the redox enzymes associated with the identified pathway may play an important role in the beige adipocyte induction.

研究分野：遺伝子制御

キーワード：UCP1 ベージュ脂肪細胞 分化

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病やがんなどを併発して生命を脅かすうえ、社会的経済損失にも繋がる。近年、世界人口の1/3が肥満あるいは過体重と言われ、子供の肥満も深刻な問題となっている。これまでに食欲抑制剤や脂質消化酵素リパーゼの阻害剤など多数の肥満治療薬が開発されたが、副作用などの問題によりほとんどが継続的な実用に至っていない。一方、肥満を解消する有用な候補の一つとして褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞が近年注目されている。これらの脂肪細胞には脱共役タンパク質 UCP1 が発現しており、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化を脱共役させてエネルギーを熱として放散させる。ベージュ脂肪細胞は、寒冷刺激やアドレナリン 3 受容体アゴニスト等によって白色脂肪組織内に誘導され、褐色脂肪細胞と同様に熱産生機能をもつ。ヒトでは乳幼児に褐色脂肪細胞が多く存在し、体温維持に重要な働きを持つことが知られているが、成人においても褐色脂肪細胞が存在することが近年明らかになっている。また、肥満度と褐色脂肪組織の活性には相関があり、褐色脂肪細胞を活性化させると安静時代謝量の増加が見られるという報告もある<sup>1</sup>。さらに、ヒト褐色脂肪細胞は、寒冷刺激やアドレナリン 3 受容体アゴニストで活性化され、遺伝子発現パターンの比較などからマウスのベージュ脂肪細胞に近い性質を持つと言われている。これらのことより、ベージュ脂肪細胞の誘導経路を明らかにし、安全かつ継続的にベージュ脂肪細胞を増加させる方法を見出すことができれば、肥満解消に大いに役立つと期待できる。しかし、ベージュ脂肪細胞の誘導メカニズムについては、まだ不明な点が多い。

当研究では、これまでに、UCP1 の発現を蛍光により非侵襲的に観察できるイメージングマウスを作製し、*Ucp1* 遺伝子を欠損したホモ接合型 *Ucp1* ノックインマウス (*Ucp1*<sup>-/-</sup>; *iRFP720*<sup>+/+</sup>) (以下、*Ucp1* KI マウス) において恒常的にベージュ脂肪細胞の誘導シグナルが活性化されていることを見出した<sup>2</sup>。ベージュ脂肪細胞の誘導経路には多様性があることが近年示唆されており、*Ucp1* 欠損によるベージュ脂肪細胞の誘導は、低温曝露やアドレナリンなど既知の刺激とは異なる経路を介して行われている可能性がある。本研究では、我々が独自に作製した *Ucp1* KI マウスを詳細に解析し、新たなベージュ脂肪細胞誘導メカニズムの解明を目指す。

<sup>1</sup> Cypess AM et al. *Cell Metab.* 2015

<sup>2</sup> Fukuda A et al. *PLOS ONE* 2019

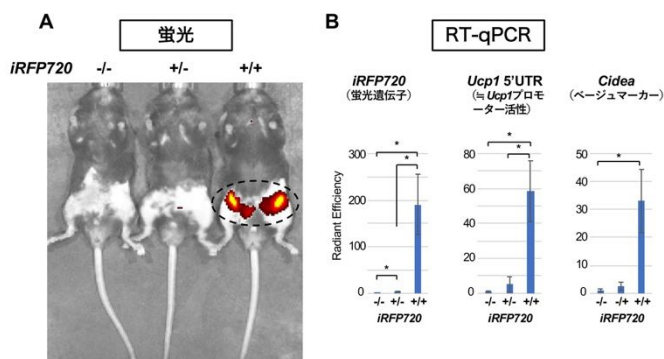


図1 UCP1イメージングマウスにおけるベージュ脂肪細胞の誘導

(A) ホモ接合型マウス (*Ucp1*<sup>-/-</sup>; *iRFP720*<sup>+/+</sup>) の皮下 (鼠蹊部) 白色脂肪組織における蛍光シグナル (破線部)

(B) 鼠蹊部白色脂肪組織における *iRFP720*、*Ucp1* 5'UTR および *Cidea* (ベージュマーカー) の発現。 *Ucp1* 5'UTR は *Ucp1* プロモーター活性を示す。

## 2. 研究の目的

ベージュ脂肪細胞は抗肥満効果が期待される一方、その分化誘導メカニズムはまだ不明な点が多い。体内でベージュ脂肪細胞を継続的に増加させるためには、多様なベージュ脂肪細胞の誘導メカニズムを解明する必要がある。我々は、これまでに、*Ucp1* KI マウスにおいてベージュ脂肪細胞が恒常的に誘導されていることを見出しており、これは、既知の刺激によるベージュ誘導とは異なる現象である。この *Ucp1* KI マウスを詳細に解析することでベージュ脂肪細胞の新しい誘導経路を解明できる可能性があることから、本研究では *Ucp1* 欠損によるベージュ脂肪細胞の誘導メカニズムの解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

(1) 鼠蹊部白色脂肪組織 Stroma vascular fraction (SVF) に含まれる細胞組成の解析  
ベージュ脂肪細胞には白色脂肪前駆細胞と異なる前駆細胞が存在することが報告されており、ベージュ誘導シグナルに伴って SVF の細胞組成が変化する可能性がある。脂肪組織の SVF には脂肪前駆細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など多様な細胞が含まれている。本研究では、野生型および *Ucp1* 欠損マウスの鼠蹊部白色脂肪組織から SVF を調製し、血管内皮細胞マーカーや白血球マーカーを用いて FACS により分画し、各細胞群の割合を調べた。

(2) ベージュ脂肪細胞の誘導に重要なシグナル経路の探索

UCP1 非存在下でのベージュ脂肪細胞誘導に重要なシグナル経路および関連分子を明らかにするため、*Ucp1* KI マウスと野生型マウスの鼠蹊部白色脂肪組織から脂肪前駆細胞を含む SVF を調製し、RNA-seq により遺伝子発現の違いを解析した。*Ucp1* KI マウスにおいて発現に違いがみられた遺伝子群についてパスウェイ解析を行い、ベージュ脂肪細胞誘導に関係する可能性のあるシグナル経路を探

索した。また、候補に上がったシグナル経路に含まれる主な遺伝子の発現について RT-qPCR によりそれぞれ解析した。

### (3) ベージュ脂肪細胞誘導における候補因子の影響

候補遺伝子のベージュ脂肪細胞誘導における影響を調べるため、まず *in vitro* でベージュ脂肪細胞を誘導する系を作製した。*Ucp1* KI マウスおよび野生型マウスの鼠蹊部白色脂肪組織から SVF を調製し、脂肪前駆細胞を採取した。SVF の調製は標準プロトコルに従い、コラーゲナーゼによる脂肪組織細胞の分離と、遠心による成熟脂肪細胞の除去により行った。得られた脂肪前駆細胞に分化誘導試薬を添加し、成熟脂肪細胞へ分化させた。候補因子に対する shRNA を発現するレトロウイルスベクターを作製し、これらの因子のノックダウンによるベージュ脂肪細胞誘導への影響を調べた。さらに、候補因子の過剰発現による影響も解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 鼠蹊部脂肪組織 SVF に含まれる細胞組成の解析

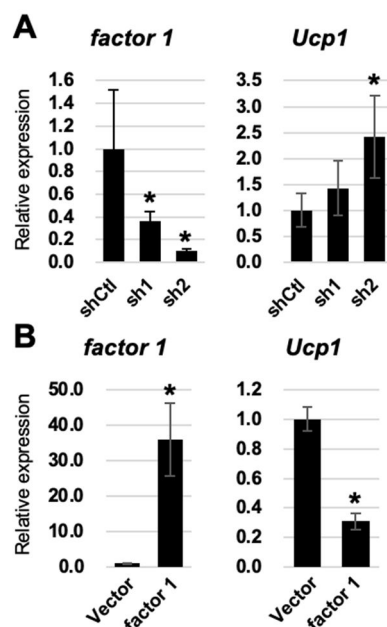
鼠蹊部白色脂肪組織の SVF に含まれる細胞を白血球マーカーおよび血管内皮細胞マーカーに対する抗体で染色し、FACS で解析した結果、白血球マーカー陽性細胞画分が SVF の約 85% を占めており、白血球系の細胞が多く含まれることが示唆された。また、この細胞画分に含まれる細胞のほとんどが血管内皮細胞マーカー陽性であった。ベージュ脂肪細胞誘導におけるこの細胞群の機能は明らかではないが、内臓(精巣上体周辺)白色脂肪組織や褐色脂肪組織ではこの細胞群はほとんど見られず、皮下(鼠蹊部)白色脂肪組織に特徴的な細胞集団であることが示唆された。一方、先行研究により脂肪前駆細胞は白血球マーカーおよび血管内皮細胞マーカー共に陰性の画分に含まれると報告されている。この画分の細胞を回収し *in vitro* で培養したところ、接着性が高く脂肪細胞への分化能を有する細胞が多く含まれていた。この細胞画分は鼠蹊部白色脂肪組織の SVF に占める割合が 10% 以下と低かったが、野生型マウスに比べて *UCP1* 欠損マウスではやや増加する傾向が見られ、ベージュ脂肪細胞の誘導に伴い、脂肪前駆細胞を含む細胞集団が増加している可能性が示唆された。

### (2) ベージュ脂肪細胞の誘導に重要なシグナル経路の探索

*Ucp1* KI マウスと野生型マウスの鼠蹊部白色脂肪組織 SVF を RNA-seq およびパスウェイ解析によって調べた結果、酸化還元反応や免疫反応等に関連する複数のシグナル経路がベージュ脂肪細胞誘導の関連経路の候補として挙げられた。各シグナル経路に関係する主な遺伝子について発現レベルを調べたところ、一部の酸化還元関連因子の発現が *Ucp1* KI マウスの鼠蹊部白色脂肪組織において有意に上昇していた。今回調べた範囲では他に有意な変化が見られる遺伝子はなかった。

### (3) ベージュ脂肪細胞誘導におけるグルタチオンペルオキシダーゼの影響

*Ucp1* KI マウスあるいは野生型マウスの SVF から採取した脂肪前駆細胞に分化誘導試薬を添加し、*in vitro* でベージュ脂肪細胞を誘導した。両 SVF 由来細胞において脂肪滴の蓄積やベージュ脂肪細胞関連遺伝子の誘導が見られ、大きな違いは認められなかった。この分化誘導系を用いて候補因子(factor 1)の発現変動を調べたところ、ベージュ脂肪細胞への分化後に発現が有意に減少することがわかり、*Ucp1* KI と野生型で差はほとんど見られなかった。factor 1 のベージュ脂肪細胞分化への影響を調べるため、shRNA を用いてノックダウンしたところ、分化後のベージュ脂肪細胞において *Ucp1* 遺伝子の発現が有意に増加し、他のベージュ関連遺伝子も増加傾向を示した。また factor 1 を過剰発現させた細胞では、*Ucp1* をはじめベージュ関連遺伝子の発現が減少する傾向が見られた。これらの結果から factor 1 がベージュ脂肪細胞の分化に抑制的に作用していることが示唆された。マウスに異なる薬剤を投与してベージュ脂肪細胞を誘導すると factor 1 の発現誘導に違いが見られることから、ベージュ誘導経路により factor 1 の関与が異なる可能性が考えられた。以上の結果から、*Ucp1* KI マウスで見られたベージュ脂肪細胞誘導には酸化還元関連因子を介した ROS 量や細胞内レドックス状態の変化が重要な役割を担っている可能性が示唆された。



factor 1ノックダウン(A)および過剰発現(B)による *Ucp1* 発現への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Le Phuong HA, Nishimura K, Kuno A, Nguyen TL, Kato T, Ohtaka M, Nakanishi M, Sugihara E, Sato T, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K	4. 巻 40
2. 論文標題 Downregulation of Odd-Skipped Related 2, a Novel Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition, Enables Efficient Somatic Cell Reprogramming	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 397-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxac012	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 Kumar A, Nishimura K, Kishimoto T, Hamzah M, Kuno A, Fukuda A, Hisatake K	4. 巻 23
2. 論文標題 Locus-Specific Isolation of the Nanog Chromatin Identifies Regulators Relevant to Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells and Reprogramming of Somatic Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232315242	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 Yamaki Y, Fukushima T, Yoshida N, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake L, Aso M, Sakasai T, Kijima-Tanaka J, Miwa Y, Nakanishi M, Sumazaki R, Takada H	4. 巻 113
2. 論文標題 Utilization of a novel Sendai virus vector in ex vivo gene therapy for hemophilia A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 493-499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03059-6	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 Aizawa S, Nishimura K, Mondejar GS, Kumar A, Bui PL, Tran YTH, Kuno A, Muratani M, Kobayashi S, Nabekura T, Shibuya A, Sugihara E, Sato T, Fukuda A, Hayashi Y, Hisatake K	4. 巻 17
2. 論文標題 Early reactivation of clustered genes on the inactive X chromosome during somatic cell reprogramming	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 53-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.008	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 Takei Y, Hirai R, Fukuda A, Miyazaki S, Shimada R, Okamatsu-Ogura Y, Saito M, Leproux P, Hisatake K, Kano H	4. 巻 155
2. 論文標題 Visualization of intracellular lipid metabolism in brown adipocytes by time-lapse ultra-multiplex CARS microspectroscopy with an onstage incubator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 125102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0063250	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 Thomas Mayers, Kazuya Morikawa, Aya Fukuda, Yukihide Watanabe, Yukari Okita, Emiko Noguchi, C.Kiong Ho	4. 巻 19
2. 論文標題 Involving high school students in medical science exchange programs: Experiences from the University of Tsukuba	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical English Education	6. 最初と最後の頁 40-44
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 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 Fukuda A, Honda S, Fujioka N, Sekiguchi Y, Mizuno S, Miwa Y, Sugiyama F, Hayashi Y, Nishimura K, Hisatake K	4. 巻 14
2. 論文標題 Non-invasive in vivo imaging of UCP1 expression in live mice via near-infrared fluorescent protein iRFP720.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0225213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225213	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 Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K	4. 巻 7
2. 論文標題 Mechanisms of the Metabolic Shift during Somatic Cell Reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 E2254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20092254	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 Bui PL, Nishimura K, Mondejar G, Kumar A, Aizawa S, Murano K, Nagata K, Hayashi Y, Fukuda A, Onuma Y, Ito Y, Nakanishi M, Hisatake K	4. 巻 29
2. 論文標題 Template Activating Factor-1 Regulates Retroviral Silencing during Reprogramming	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1909-1922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.010	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 Sekiguchi Y, Fukuda A, Nishimura K, Hisatake K	4. 巻 41
2. 論文標題 Engineering Critical Residues of SOX9 Discovers a Variant With Potent Capacity to Induce Chondrocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1157-1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxad066	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加納英明、武井祐樹、平井理愛、島田林太郎、福田綾、久武幸司
2. 発表標題 褐色脂肪細胞のライブセル非線形分光イメージング
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納英明、武井祐樹、平井理愛、下平雄貴、島田林太郎、福田綾、久武幸司
2. 発表標題 ライブセルCARS顕微鏡を用いた褐色脂肪細胞のリポクオリティイメージング
3. 学会等名 第17回医用分光学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納英明、武井祐樹、下平雄貴、島田林太郎、平井理愛、福田綾、久武幸司
2. 発表標題 ライブセルCARS顕微鏡を用いた褐色脂肪細胞の脂質動態イメージング
3. 学会等名 令和元年生細胞分光部会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村美波、福田綾、桶谷亮介、久武幸司、加納英明
2. 発表標題 褐色脂肪組織における脂質不飽和度のCARS顕微分光解析
3. 学会等名 日本分光学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 軟骨細胞様細胞の分化誘導方法	発明者 福田綾、関口裕也、 久武幸司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第7265763号	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

筑波大学遺伝子制御学研究室 <a href="https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/index.html">https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/index.html</a> 筑波大学遺伝子制御学研究室 <a href="https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/">https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/</a> 筑波大学遺伝子制御学研究室 <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/research3.html">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/research3.html</a> 筑波大学遺伝子制御学研究室 <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/research3.html">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/research3.html</a>
--

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
---------	---------