

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09037

研究課題名(和文)EDA関連分子の機能解析によるそのシステムの全容解明

研究課題名(英文)Research of EDA and its associated molecules

研究代表者

栗澤 元晴 (Awazawa, Motoharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・糖尿病研究センター 分子糖尿病医学研究部 統合生理学研究室長

研究者番号：90466764

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)：EDAR刺激抗体によるEDA-A1シグナル活性化とその代謝に対する影響の検討およびAAVによるEDA-A1特異的な肝臓での過剰発現モデルの解析を行なったが、血糖は上昇傾向を示したものの顕著な代謝系表現系の変化は認められなかった。そこで発展的課題として皮膚と代謝との関連をとらえるべく検討を進めた。皮膚の熱放散へのインターベンションは、全身の代謝に対して影響を与えることが示された。また肥満モデルマウス皮膚のはシングルセル遺伝子解析を行い、各種細胞群において遺伝子発現の変化が生じており、その一部は炎症や全身の熱産生などに関わりうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EDAという皮膚関連分子が肥満成人の肝臓において発現増加を示すことを端緒に研究を進め、より広い意味で肥満状態においては皮膚の分子生物学的性質変化が生じること、さらにまたそうした皮膚の機能変化が、実際に全身の代謝に対して影響を持ちうることを初めて示した。これまでの代謝研究では皮膚は糖尿病の合併症臓器として捉えられることが常であったが、本研究に基づき皮膚が全身の代謝制御に積極的な役割を果たしている可能性が提示され、今後の発展的研究を進めるための根拠が得られた。

研究成果の概要(英文)：We performed the activation of EDA-A1 signaling by EDAR-stimulated antibodies and investigated its effects on metabolism. We also analyzed a model of EDA-A1-specific overexpression in the liver through AAV administration. Unfortunately, however, no significant changes in metabolic phenotype were observed, although blood glucose levels tended to increase. As a further step, we investigated the relationships between skin and metabolism in a broader perspective through investigating different models. Interventions on skin heat dissipation through topical application of PGI2 analogue had an effect on systemic metabolism. Single-cell gene analysis of skin from obese mouse models revealed changes in gene expression in various cell groups compared to lean control mouse skin, some of which were observed in the genes related to inflammation and systemic heat production.

研究分野：代謝学

キーワード：EDA 皮膚 代謝 肥満 熱放散 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析手法の進歩により、我々のゲノムの 90%以上にも及ぶ領域が、何らかのレベルで転写され RNA を産出している、という事実が明らかとなった (ENCODE)。これら RNA の大半は非コード RNA (non-coding RNA: ncRNA) であり、その中でも microRNA については近年目覚ましく研究が進んでいる。

さて転写がゲノムの広範にわたって起こるといふことの必然の結果として、一つの遺伝子座から複数の転写産物が産出されることがある (Multiple-Coding、右図)。興味深いことにこのような場合、それら転写産物はしばしば互いに協調的に発現調節され、また共通の経路に作用することで“システム”として強い作用を発揮する。近年申請者は肥満肝臓で増加するイントロン性 microRNA miR-676 を同定、そのホストに当たる蛋白コード遺伝子 Ectodysplasin A (EDA) の発現がマウスおよびヒト成人の脂肪肝において増加し、結果その血中濃度が肥満状態で上昇していることを見出した。もともと EDA は無汗性外胚葉形成不全症の原因遺伝子で、皮膚付属器 (毛根、汗腺、皮脂腺) の発生・発達に関わる分泌タンパクとして知られていたが、申請者は、これまでその意義が不明であった EDA の主要アイソフォームの一つ EDA-A2 が、分泌蛋白として主に骨筋筋へ働き、炎症経路の活性化を介してインスリン抵抗性の発現に寄与することを明らかにした (Awazawa M et al., Nat Med, 2017)。

2. 研究の目的

Eda 遺伝子座からは A1, A2 アイソフォームおよび miR-676 という 3 種類の遺伝子産物が生成されるが (右図)、現時点では miR-676 については、代謝においてのみならず皮膚の発生においてですら、その詳細な働きは明らかとなっていない。また EDA-A2 と同時に A1 アイソフォームも肥満で増加するが、その皮膚付属器の発生における役割が報告されている一方、これが成人、更には肥満状態においてどのような働きをしているのかは不明であった。本研究では、肥満において上昇するこれら因子の代謝における意義を解明し、“EDA システム”の全貌を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

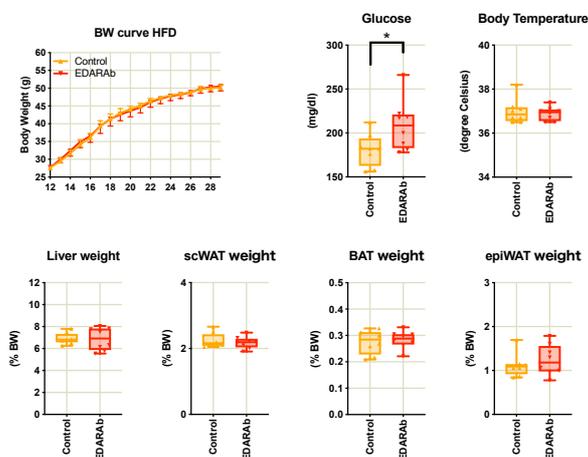
EDA-A1 はアイソフォーム特異的な受容体 EDAR に結合することで作用を発揮するが、共同研究先であるローザンヌ大学 (Pascal Schneider 教授) によって、EDAR の特異的な刺激型抗体が開発されている (Kowalczyk-Quintas C et al., J Biol Chem., 2014)。本抗体を用いて EDA-A1 アイソフォームの成体における意義を検討した。また、Adeno-associated virus (AAV) ベクターを用いて EDA-A1 を肝臓に強制発現し、代謝関連パラメーターの変化を検証した。

また、更に発見的課題として皮膚と代謝との関連をとらえるべく、皮膚の熱放散へのインターベンションが、エネルギー燃焼の変化、あるいは全身性の代謝異常に対する治療効果をもたらすか否かを検討した。更に皮膚が肥満状態において変化し、その病態生理に積極的な役割を果たしているか否かを網羅的に解析するため、痩せ型マウスおよび肥満モデルマウスの皮膚を採取、これを単一細胞化し、シングルセル RNA シークエンシング解析を行ない、肥満モデルマウスにおける皮膚の各種細胞での遺伝子変化を網羅的に検討した。

4. 研究成果

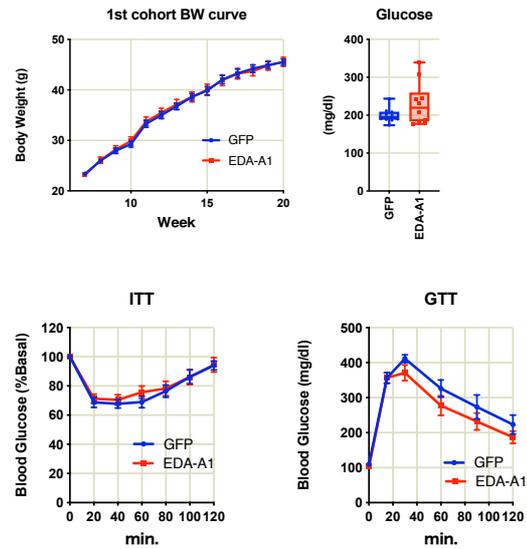
(1) EDAR 刺激抗体による EDA-A1 シグナル活性化とその代謝に対する影響の検討

6 週令より高脂肪食負荷を行なった肥満モデルマウスに対し、毎週 1 回 mAbEDAR1 あるいはコントロール抗体 (Aprily) 50ug/body の腹腔内投与を行なった (2mg/kgBW 25g BW)。EDA-A1 刺激抗体を 16 週間投与した後、マウスを屠殺し組織を採取、また体重、血糖、各組織重量の測定を行なった。この時、両群間で体重には有意差を認めず、また、体温や各臓器重量にも優位な変化を認めなかった。しかしながら mAbEDAR1 投与群においてはコントロール群と比して有意な血糖上昇を認めた。



(2) AAVによるEDA-A1 特異的な肝臓での過剰発現モデルの検証

(1)の結果を承けて、肝臓でのEDA-A1の上昇をより正確にmimicする系として、AAVによるEDA-A1 特異的な肝臓での過剰発現を行なった。C57BL6 マウスに対して7週令時点で高脂肪食負荷を開始するとともに、EDA-A1をTBGプロモーター下で過剰発現するAAVを投与、23週令時点まで観察した。EDA-A1過剰発現モデルマウスにおいてはコントロール群と比較して有意な体重変化を認めず、血糖は上昇傾向を示したものの有意な変化を認めなかった。またインスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験においても有意な変化を認めなかった。(1)の結果と併せて、EDA-A1経路の刺激によって、顕著な代謝系表現系の変化は認められないものと考えられた。



(3) マウス熱放散へのインターベンション

Iloprostを皮膚に塗布した場合、24時間以上にわたって皮膚の血管拡張反応及び皮膚温の上昇が認められた (Drury JK et al., 1985, 及び自験例)。

これを承けて、野生型マウス尾部にIloprostを隔日に塗布し、2週間の観察を行なった。Iloprostのマウス尾部塗布により、マウス尾部の皮膚温上昇がサーモグラフィにより確認され、このモデルではマウス尾部からの熱放散が亢進していることが示唆された。

この時興味深いことに、随時血糖の有意な低下と肝臓糖新生関連遺伝子の有意な発現変化が認められた。こうした変化は、寒冷刺激時に見られるものと非常に似通っており、実際に皮膚からの熱放散の変化が全身の代謝に影響を与えた可能性が示唆された。

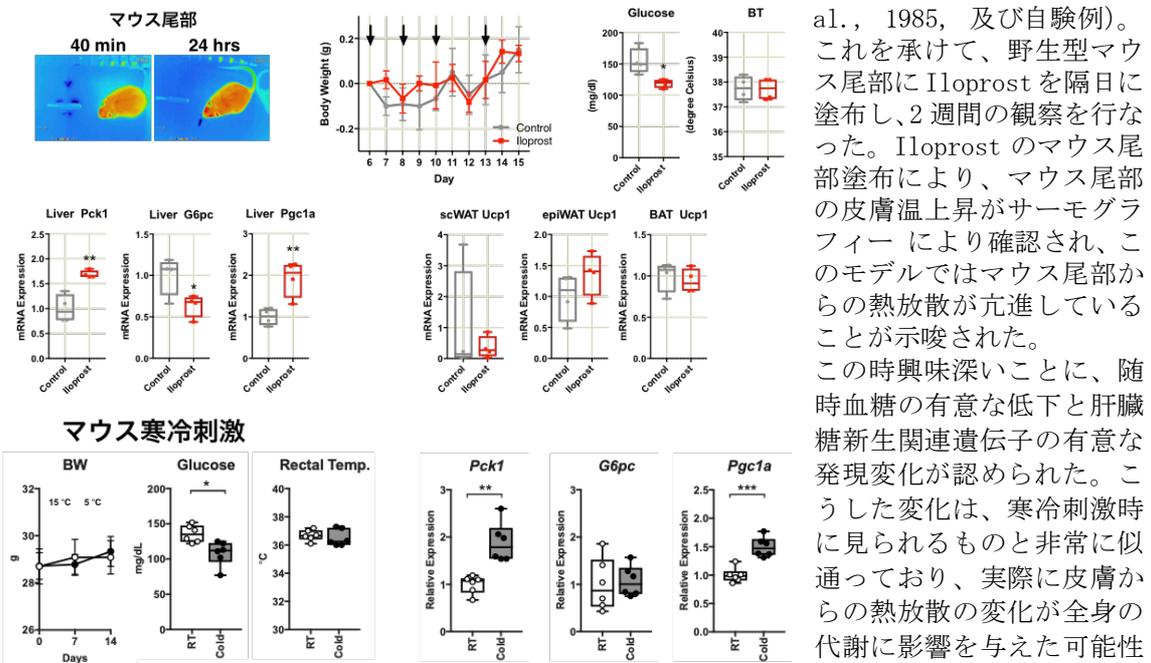
(4) 肥満モデルマウス皮膚のシングルセル遺伝子解析

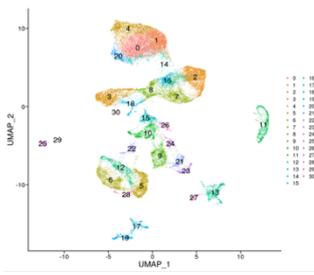
(3)の結果から、皮膚、特に皮膚からの熱放散と全身の代謝の間には、実際にこれまで想定されている以上の関わりがある可能性が示唆された。このことを受け、肥満モデルマウス皮膚では何らかの遺伝子発現の変化が生じ、これが肥満時に認められる代謝異常や全身性の合併症の発症に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。

そこで、より網羅的に肥満における皮膚の遺伝子発現変化を解析し、その一端として熱放散に関わりうる遺伝子発現の変化を確認できると考え、痩せ型マウスおよび肥満モデルマウスの皮膚についてシングルセルRNAシーケンシング解析を行うこととした。

① シングルセル解析概要

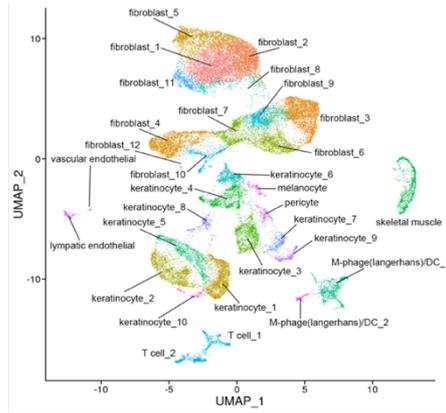
24週令の肥満モデルマウスおよびコントロールの同週令の痩せ型マウスの背部皮膚を剃毛後、1 x 2 cm程度の皮膚片を採取した。これを酵素消化によりシングルセル化した後、シングルセルRNAシーケンシング解析を行なった。





Pooled analyses: clustering
G1: NCD x 3
G2: HFD x 3

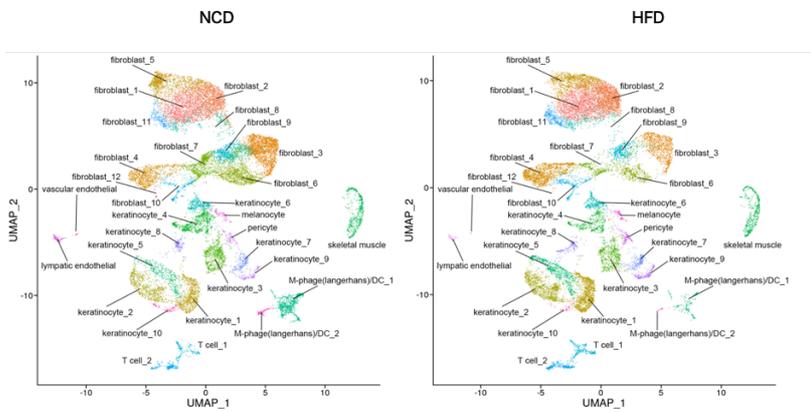
Fibroblast : 12 clusters
Keratinocytes : 10 clusters
Melanocyte
Pericyte
Skeletal muscle
M-phage/DC : 2 clusters
T cell : 2 clusters
Vascular endothelial
Lymphatic endothelial



シングルセルシーケンシングの結果、UMAPでは痩せ型・肥満型マウスの皮膚を合わせた解析により合計 30 クラスターの細胞群が良好に分離された。内訳として線維芽細胞が 12 クラスター、表皮細胞が 10 クラスターの他、メラノサイト、周皮細胞、筋細胞、各種免疫細胞が観察された (左図)。

この時、痩せ型マウス (NCD)、肥満モデルマウス (HFD) の皮膚をそれぞれ解したところ、高脂肪食負荷によって出現する様な新たな細胞群は観察されず、両者から得られるクラスターは非常に似通っており、細胞構成のロバストネスが示唆された。

この結果を受けて、各々の細胞クラスターにおいて、痩せ型マウスと肥満モデルマウスを比較し、遺伝子発現の変化を観察することとした。

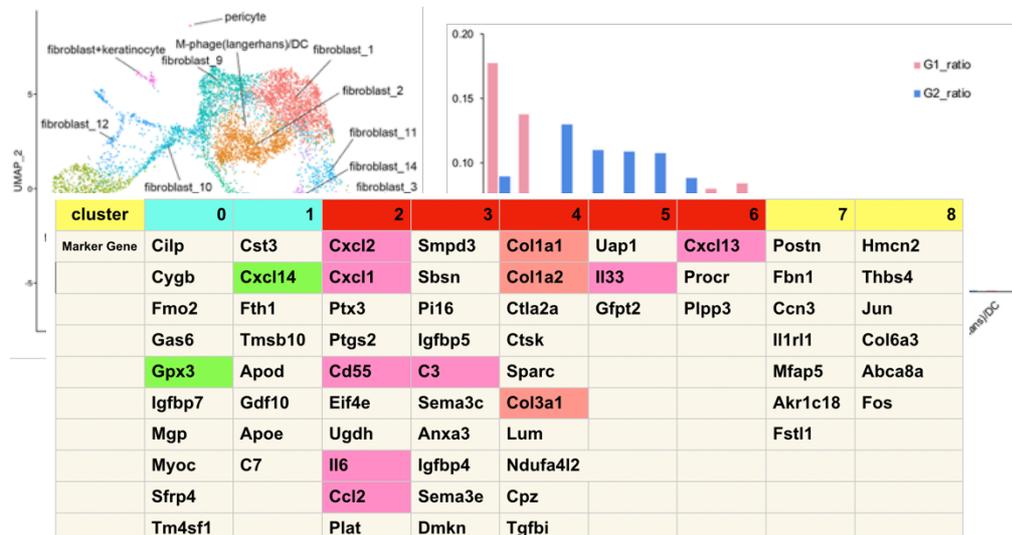


以下に主な変化につき概要を記載する。

② 各クラスターにおける遺伝子発現変化の解析

a) 線維芽細胞

線維芽細胞は全 10 クラスターに区分されたが、肥満モデルマウスにおいては痩せ型マウスに比して多くの細胞群で *I16*, *Nfkb1* など炎症関連マーカー遺伝子の発現上昇、および *Klf2*, *Klf4*, *Junb*, *Jund*, *Fos11*, *Fos12* などの細胞増殖関連遺伝子の上昇が認められた。こうした炎症の上昇は、線維芽細胞のみを対象にサブクラスタリングを施行した場合にも、炎症性プロファイルを有する細胞群の割合の増加として観察された (下図)。また興味深いことに、肥満モデルマウス皮膚線維芽細胞においては *Irs2*



遺伝子の発現上昇が認められた。これらに対し、肥満に伴って発現が減少した遺伝子として *Timp1* が目立った。皮膚における *Timp1* の発現は紫外線ダメージや老化に伴い低下し、皮膚リモデリング機構の障害に伴う皮膚の老化に関わることが知られており (Yokose U et. Al., J Invest Dermatol, 2012)、肥満と老化との関連を示唆する所見として興味深いものと考えられた。

b) 表皮細胞

表皮細胞は全 9 クラスターに分類されたが、肥満モデルマウスと痩せ型マウスを比較して、やはり各クラスターで共通して発現変化を示す遺伝子が目立った。中でも *Cc127a* は多くの表皮細胞のクラスターで発現が上昇していた。CCL-27a は表皮細胞、中でもおもに基底細胞に多く存在するケモカインであり、その受容体 CCR-10 と結合することで T 細胞誘導性の炎症を皮膚に惹起する (Homey B et al., Nat Med, 2002)。興味深いことに *Cc127a* の発現は IL-1b や TNF α といった炎症性サイトカインにより正に制御される。また近年、皮膚の炎症性疾患は肥満により増悪し、この変化は皮膚の T cell の character の変化を伴うことなどが報告されている (Bapet SP et al, Nature, 2022)。これらの所見からは、肥満における皮膚の炎症性の変化とその中で表皮細胞由来のケモカインの果たす役割が想定され、今後検証すべき課題と考えられる。

c) 筋細胞

ここで検出された筋細胞は遺伝子発現の性質としても骨格筋細胞であり、立毛筋や血管周囲の筋細胞などの平滑筋由来の細胞とは考えられないことから、*Panniculus carnosus muscle* に由来するものと推測された。筋細胞のクラスターにおいては、*Sarcolipin (Slp)* 遺伝子の著明な減少が観察された。サルコリピンは筋肉由来の非震え熱産生 non-shivering thermogenesis に重要な遺伝子として知られ、興味深いことに *Slp* 欠損マウスは高脂肪食下で肥満を呈することが報告されている (Bal NC et al., Nat Med, 2012)。一方肥満においては *Slp* の発現はむしろ上昇することが分かっており、皮膚での *Slp* の低下は少なくともマウスにおいてはエネルギー燃焼の低下を介し体重増加に寄与する可能性が想定され、今後の研究対象として興味深いものと考えられた。

(3) まとめ・今後の方針

以上我々は、皮膚における熱放散の変化が全身の代謝に対して影響を与えうること、また肥満においてはシングルセル遺伝子解析によって明らかとなった通り各種細胞群において遺伝子発現の変化が生じており、その一部は炎症や全身の熱産生などに関わりうることを見出した。

今後これらの遺伝子変化について、実際に病態に関わりうるものであるかどうかを検証する必要があり、現在モデルマウスの構築を行っている。

また、マウスにおける皮膚の変化として得られた知見が、そのままヒトの病態に外挿できるものであるか否かが不明であり、大きな課題と考えられる。このため、今後ヒトの皮膚を用いた単一細胞解析を行い、マウスで得られた知見と比較すること、さらにヒトとマウスで共通に発現変化が認められる遺伝子に関して細胞種特異的・皮膚特異的な遺伝子欠損マウスを作成し、当該遺伝子変化の病態における役割を検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗澤元晴
2. 発表標題 肝臓を中心とした臓器間クロストークによる代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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