

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11776

研究課題名(和文) 脂肪細胞の数・大きさ・アディポカイン産生における新規制御因子IRBITの機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of IRBIT, a novel regulator in the number, size, and adipokine production of adipocytes

研究代表者

濱田 浩一 (Koichi, Hamada)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00343070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、本研究期間内に以下のことを明らかにした。IRBIT KOマウスの体重低下・内蔵脂肪組織の減少・小型脂肪細胞の増加に加えて血中 TNF- α 濃度が低下していた。In vitro 脂肪細胞分化誘導システムである3T3-L1細胞を用いて、IRBIT ノックダウン(KD)を行ったところ、C/EBP α および PPAR γ の発現障害により、脂肪細胞分化が顕著に抑制されていた。IRBIT KD細胞では、脂肪分化初期に起こる細胞形態変化(F-アクチン再構成)が抑制されていた。新規IRBIT結合たんぱく質としてグアニンヌクレオチド交換因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における肥満人口は、2000万人を超えている。特に男性は、肥満の割合が増加しているだけでなく、肥満人口の約半数は、糖尿病・脂質異常症・高血圧症などを伴った生活習慣病を合併している。これらの生活習慣病発症の原因は、新しい脂肪細胞の増殖(過形成)と細胞サイズの増加(肥大)さらにアディポサイトカイン産生異常であることが報告されている。本研究ではこれまで報告されていなかったIRBITが脂肪組織量および脂肪細胞分化を調節する新規分子であることを明らかにした。今後さらなる分子メカニズムを詳細に検討することにより、新たな分子を分子をターゲットとした生活習慣病治療薬の開発につながるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The applicant clarified the following during the study period.

(1) In addition to weight loss, decrease in internal adipose tissue, and increase in small fat cells in IRBIT KO mice, TNF- α concentration in the blood was reduced.(2) IRBIT knockdown (KD) using 3T3-L1 cells, which are in vitro adipocyte differentiation induction systems, showed that adipocyte differentiation was significantly suppressed due to impaired expression of C/EBP α and PPAR γ .(3) In IRBIT KD cells, cell morphological changes (actin reorganization) that occur in the early stages of adipocyte differentiation were suppressed.(4) Guanine nucleotide exchange factor was identified as a novel IRBIT-binding protein.

研究分野：細胞分化

キーワード：脂肪細胞 細胞分化 IRBIT 細胞骨格 GEF

1. 研究開始当初の背景

食生活やライフスタイルの欧米化に伴い、日本における肥満人口は推計 2000 万人を超えている。さらに、このうちの約半数は糖尿病・高脂血症・高血圧症などの生活習慣病を合併している。これらの生活習慣病は、動脈硬化などの心疾患イベントのリスクを著しく増大させる状態であり、現在、このような状態は、腹部周囲径を考慮したものとして“メタボリックシンドローム”と定義している。メタボリックシンドローム発症の背景には、過栄養や運動不足による肥満、すなわち脂肪組織における脂肪細胞の増加と肥大化が原因であり、早急な脂肪細胞の増殖・分化の分子メカニズムやアディポカイン産生の発現調節機構を明らかにすることが重要となっている。

2. 研究の目的

肥満と生活習慣病の罹患率が高い相関関係を持つ。肥満は脂肪細胞が過剰に蓄積・肥大化した結果であるため脂肪細胞分化・成熟の分子メカニズムを明らかにすることで、生活習慣病を抑制できる可能性を示している。これまでに、① IRBIT ノックアウト (KO) マウスは、体重低下・脂肪組織の減少・小型の脂肪細胞数増加・大型の脂肪細胞数が減少していた。② IRBIT ノックダウン(KD) 脂肪前駆細胞は、分化誘導を行っても PPAR γ の発現上昇が起こらず、脂肪細胞分化が抑制されていた。③ IRBIT KO マウスは血中 TNF α 濃度が顕著に低下していたことを世界で初めて見出しており、「IRBIT による脂肪細胞分化・アディポカイン産生の新たな分子メカニズム」が示唆される(投稿準備中)。そこで、本研究では「脂肪細胞分化における IRBIT の役割」を明らかにすると共に、「IRBIT を新たな創薬ターゲットとして生活習慣病治療薬の開発」を目指す

3. 研究の方法

【① IRBIT KO マウスを用いた肥満の対する個体レベルでの検討】

IRBIT KO マウスでは、「体重低下・内臓脂肪組織の減少・個々の脂肪細胞の矮小化」を示していた。そこで皮下脂肪組織や褐色脂肪組織での重量測定、病理学的解析を行った。

【② 脂肪細胞分化制御因子の解析】

IRBIT KD 細胞では、PPAR γ および C/EBP α の発現上昇の障害により脂肪細胞分化が抑制されていた。そこで、PPAR γ 発現の制御分子である C/EBP β 、C/EBP δ のタンパク質量をウエスタンブロットにて解析を行った。

【③ 脂肪細胞増殖における分子メカニズムの解析】

IRBIT KD 3T3-L1 細胞では、脂肪細胞分化誘導後の細胞増殖 (Mitotic clonal expansion) が進行しているのかの検討を行った。また、細胞周期のどの時期で増殖障害が起こっているのかを検討するために、「Ki-67 による G1 期の頻度」の検討を行った。さらに細胞周期進行制御分子である p27 のタンパク質量を検討した。

【④ IRBIT による細胞サイズ制御機構の解析～細胞骨格系の検討】

近年アクチン骨格の動態が、脂肪細胞と骨芽細胞の分化スイッチに重要であることが報告されている。そこで、IRBIT KD 脂肪細胞では、アクチンフィラメント再構成の有無について検討を行った。

【⑤ IRBIT による新規結合タンパク質の探索】

IRBIT は、複数のタンパク質と相互作用する「ハブタンパク質」として働いていることが知られている。そこで、マスマスペクトロメトリー解析により新規 IRBIT 結合たんぱく質の解析を行った。

4. 研究成果

申請者は、本研究期間内に以下のことを明らかにした。

- ① IRBIT KO マウスの体重低下・内蔵脂肪組織の減少・小型脂肪細胞が統計的に有意に増加していた。
- ② In vitro 脂肪細胞分化誘導システムである 3T3-L1 細胞を用いて、IRBIT ノックダウン(KD)を行ったところ、分化に関与する早期転写因子である C/EBP β 、C/EBP δ には差はみられないものの、脂肪細胞分化マスター転写因子である C/EBP α および PPAR γ の発現障害により、脂肪細胞分化が顕著に抑制されていた。
- ③ IRBIT KD 細胞では脂肪細胞分化初期に起こる細胞増殖 (Mitotic clonal expansion) が優位に抑制されていた。さらに、細胞増殖のマーカーである Ki-67 の抗体による免疫染色を行ったところ IRBIT KD 細胞ではコントロールに比べて有意に低下していた。さらに IRBIT KD 細胞では、細胞周期進行に必要な p 27 の一過的な低下が抑制されていた。
- ④ IRBIT KD 脂肪細胞では、アクチンフィラメント再構成が障害されていた。また IRBIT KD 脂肪細胞における分化障害が、アクチンフィラメント再構成を促進する薬剤である Y27632 により回復できた。
- ⑤ 新規 IRBIT 結合たんぱく質としてグアニンヌクレオチド交換因子をマスマスペクトロ解析によりスクリーニングを行った。さらに、免疫沈降により IRBIT とこの新規 IRBIT 結合グアニンヌクレオチド交換因子の結合を解析したところ、グアニンヌクレオチド交換因子の活性中心である、DHドメインに結合していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Itoh Ryo, Hatano Naoya, Murakami Momoko, Mitsumori Kosuke, Kawasaki Satoko, Wakagi Tomoka, Kanzaki Yoshino, Kojima Hiroyuki, Kawaai Katsuhiko, Mikoshiba Katsuhiko, Hamada Koichi, Mizutani Akihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Both IRBIT and long-IRBIT bind to and coordinately regulate Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchanger AE2 activity through modulating the lysosomal degradation of AE2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85499-6	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 Hamada K, Maeda Y, Mizutani A, Okada S.	4. 巻 42
2. 論文標題 The Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 /PTEN Signaling Pathway Is Crucial for HIV-1 Entry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 130-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00801.	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 Fuchi Y, Sakuma M, Ohyama K, Hagihara R, Kohno M, Hamada K, Mizutani A, Karasawa S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Selective synthesis of substituted amino-quinoline derivatives by C-H activation and fluorescence evaluation of their lipophilicity-responsive properties.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53882-z	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 Fukumoto, Yuri Umeno, Tomohiro Kuramochi, Hina Hamada, Koichi Matsumoto, Shota Suzuki, Noriko Usui, Kazuteru Mizutani, Akihiro Karasawa, Satoru	4. 巻 20
2. 論文標題 Acid Responsiveness of Emissive Morpholino Aminoquinolines and Their Use for Cell Fluorescence Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 4342-4351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D20B00546H	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川端春奈、瀧田浩一、河野未菜希、上野慎一郎、下田紗弥、田端彩子、水谷顕洋
2. 発表標題 IRBITによる脂肪細胞分化制御機構の解析
3. 学会等名 第141回 日本薬学会 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本諒斗、瀧田浩一、久住加奈子、小野竜誠、高村浩美、水谷顕洋
2. 発表標題 IRBITによる脂肪細胞分化制御機構の解析
3. 学会等名 第142回 日本薬学会 年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高村浩美、瀧田浩一、久住加奈子、岩本諒斗、小野竜誠、大橋綾乃、伊藤優里香、後藤靖明、小島拓之、水谷顕洋
2. 発表標題 IRBITによる脂肪細胞分化制御機構の解析
3. 学会等名 第143回日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤靖明、長谷川尚美、瀧田浩一、水谷顕洋
2. 発表標題 NBCe1-CとSNX-27における相互作用の生理学的意義について
3. 学会等名 第143回日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本祥汰、梅野智大、白井一晃、瀧田浩一、水谷顕洋、唐澤悟
2. 発表標題 発光性イミダゾナフチリジン誘導体の自己集合化挙動と物性評価
3. 学会等名 第143回日本薬学会
4. 発表年 2023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