

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22873

研究課題名（和文）脂肪組織における多機能性分子Myoferlinの病態生理機能及び個体老化への関与

研究課題名（英文）Pathophysiological functions of a multifunctional molecule, myoferlin, in adipose tissue and its involvement in individual aging

研究代表者

野里 陽一（Nozato, Yoichi）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50880390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病に起因する肥満の病態には、慢性炎症とインスリン抵抗性が基盤にある。本研究では、細胞膜や細胞内小胞の融合、レセプター蛋白のエンドサイトーシスと再利用に関与するとの報告のあるMyoferlinが、マクロファージにおいてはリソソームの開口放出を介した炎症を惹起することで、一方、脂肪細胞においては脂肪細胞分化や肥大を介した糖代謝障害を惹起させることで、脂肪組織の慢性炎症・老化を促進させる可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMyoferlinは、筋細胞や各種癌細胞を中心として、細胞膜融合や細胞内小胞輸送、膜受容体のリサイクルリング等に関連する病態生理機能が明らかにされていた。一方、生活習慣病の病態への関与の報告はなかった。本研究では、Myoferlinが代謝性疾患及びそれに付随する個体老化へも関与することを明らかにした。このようにMyoferlinの様々な加齢性疾患の病態の基盤に関わる多様な機能を有し、更に個体老化や寿命にも関与する可能性があることを示せたことに学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic inflammation and insulin resistance underlie the pathogenesis of obesity caused by lifestyle-related diseases such as diabetes and dyslipidemia. In this study, we found that myoferlin, which has been reported to be involved in fusion of cell membranes and intracellular vesicles and in endocytosis and recycling of receptor proteins, may promote chronic inflammation and aging in adipose tissue by inducing inflammation in macrophages through lysosomal exocytosis and impaired glucose metabolism through differentiation and hypertrophy of adipocytes.

研究分野：動脈硬化 老化

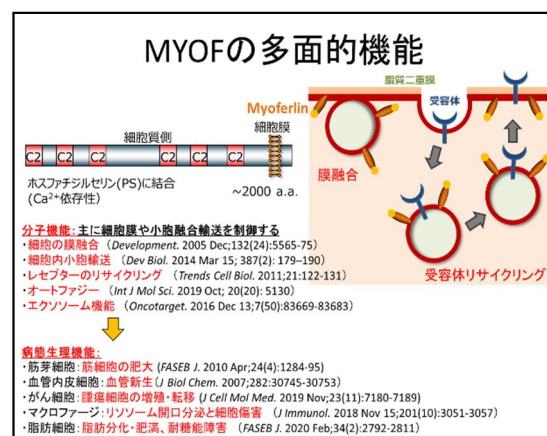
キーワード：インスリン抵抗性 肥満 慢性炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病に関連すると同時にこれらに起因する心血管疾患の危険因子であることから、肥満に対する新規治療標的分子の探索及び臨床応用は急務である。近年、肥満を背景とするメタボリック症候群の病態には、過剰のエネルギー摂取に伴う脂肪細胞の肥大と過形成に加え、マクロファージを中心とする免疫担当細胞の浸潤と炎症性サイトカイン分泌による慢性炎症が引き起こすインスリン抵抗性が基盤にあることが注目されている。一方で、内臓脂肪は単なる脂肪貯蔵臓器だけでなく、生体の恒常性維持に必要な様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが知られている。脂肪萎縮症では脂肪組織の減少に伴い、インスリン感受性に保護的に働くアディポカインであるアディポネクチンやレプチンの分泌障害からインスリン抵抗性を特徴とする糖尿病を発症する。したがって脂肪細胞を適切に分化成熟させ、脂肪組織を健全な状態に維持することは、肥満及び肥満に関連する諸疾患の予防、改善、治療のため重要な課題である。

II型膜蛋白質である Myoferlin (MYOF) は、右図に示す通り、細胞膜や細胞内小胞の融合、レセプター蛋白のエンドサイトーシスと再利用に関与しており、筋芽細胞の膜融合や肥大、腫瘍細胞の増殖転移における腫瘍細胞代謝など様々な病態生理機能が報告されている。我々は MYOF がマクロファージや脂肪前駆細胞に発現、マクロファージでは MYOF がリソソームと細胞膜の融合を促進し、リソソーム酵素の開口放出及び他者融解に関与していることや脂肪組織では正常な脂肪分化や代謝機能を司り、肥満病態においては脂肪炎症・老化を促進させ、糖代謝異常を悪化させることを報告している。レセプター蛋白のエンドサイトーシスの一つに筋芽細胞での Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 受容体があげられ、MYOF はそのリサイクリングに関与しているとの報告がある。IGF-1 は、インスリンと並び脂肪分化において重要な役割を担うことから、前述の代謝機能への関与から、MYOF が生体の恒常性維持に必要な内分泌臓器である脂肪機能を制御することで肥満病態を基軸とした全身の代謝系を制御している可能性が示唆された。



### 2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織に浸潤し慢性炎症を担うマクロファージと脂肪組織構成細胞である脂肪細胞に着目し、

肥満病態でのマクロファージの MYOF によるリソソームの開口放出の関連

脂肪細胞の MYOF について脂肪分化や肥満病態における insulin 及び IGF-1 レセプター  
の recycling への関与

脂肪組織における MYOF の老化への関与

を明らかにする。

### 3. 研究の方法

マウス腹腔膜マクロファージ、骨髄由来マクロファージ、高脂肪食負荷後マウス脂肪組織 (AT) Stromal vascular fraction (SVF) でのリソソーム酵素 (CathepsinB; CTSB) の発現を qPCR や WB にて、また培養上清中の CTSB 濃度を ELISA で測定した。

3T3L1 pre adipocyte を MINUTE Cellular Fractionation Kit を用い、細胞膜、細胞質分画における Insulin 受容体、IGF 受容体のタンパク発現を検討した。

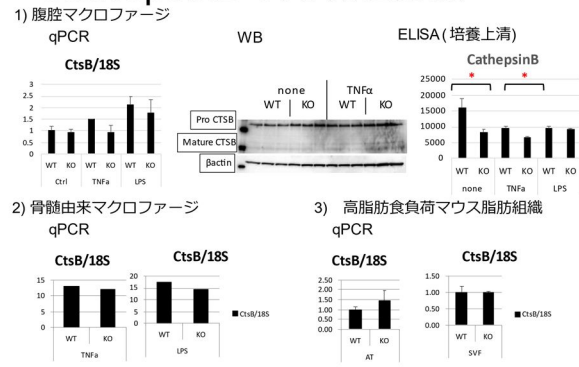
3T3L1 pre adipocyte での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷および 4 週間の高脂肪食負荷マウスの脂肪組織での老化関連マーカーの遺伝子発現を qPCR にて評価した

### 4. 研究成果

マクロファージでの検討: マウス腹腔膜マクロファージや骨髄由来マクロファージ、高脂肪食

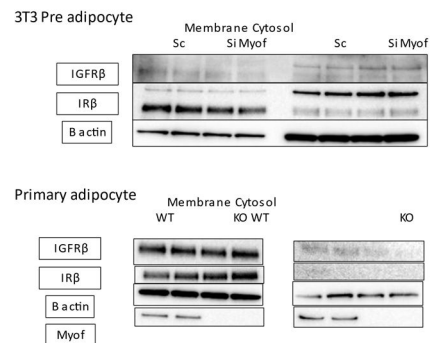
負荷肥満モデル脂肪組織由来の SVF において MYOF はリソソーム酵素 (Cathepsin B) の遺伝子・タンパク発現には関与していなかった。一方腹腔 M の培養上清中への Cathepsin B の放出は MYOF KO で減弱していた。また、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を利用し、MYOF-knockout RAW264.7 細胞を作成し、炎症性サイトカインの刺激下でのリソソーム放出を検討したが、細胞株間でのばらつきが大きく、オフターゲット効果が考えられた。

## CathepsinBの発現と分泌



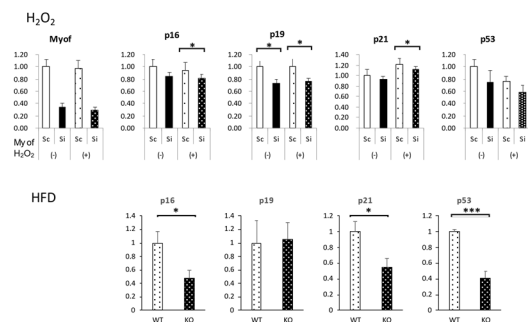
脂肪細胞での検討：既に報告の通り、弱齡非肥満マウス脂肪組織において、MYOF は insulin シグナルを正に制御していた。そこで IGF-1 レセプターもしくは insulin レセプターの recycling に着目したが、WT と KO で細胞膜及び細胞質におけるレセプタータンパクの発現量には差は認めなかった。3T3L1 細胞では SiRNA による MYOF Knockdown (KD) で insulin により誘導される脂肪分化が抑制されていたが、IGF-1 及び insulin レセプタータンパクの発現量には差は認めなかった。cycloheximide chase assay では MYOF タンパクの半減期が少なくとも 3-4 日以上と長く、SiRNA による一過性の KD では評価が困難であった。

## IGFR IRの発現



細胞老化モデル (3T3L1 pre adipocyte に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加) では、MYOF KD により老化関連遺伝子の発現が抑制された。高脂肪食負荷マウスの脂肪組織では、MYOF KO で同様に老化関連遺伝子の発現が抑制された。

## 老化関連マーカーの発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------