

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790258

研究課題名（和文）NADPH 酸化酵素による脂肪分化機構と生活習慣病への応用

研究課題名（英文） Signal transduction pathways regulating adipocyte differentiation and therapeutic strategy for metabolic syndrome

研究代表者

諫田 泰成（YASUNARI KANDA）

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号 70510387

研究成果の概要（和文）：本研究において、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化過程に活性酸素が関与しているのか検討した。間葉系幹細胞の分化に伴い細胞内に活性酸素が産生され、抗酸化剤処理により分化が抑制されたことから、脂肪分化に活性酸素が関与することが示唆された。次に、阻害剤及び RNA 干渉法による検討により、活性酸素の産生酵素として NADPH 酸化酵素 Nox4 を同定した。さらに、肥満モデル動物である高脂肪食負荷マウスに抗酸化剤を慢性投与したところ、脂肪の蓄積が抑制された。以上の結果から、活性酸素が脂肪分化と肥満に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Obesity is characterized by increased adipose tissue mass due to generation of new adipocytes or increase in the size of individual adipocytes. The formation of adipose tissue involves the commitment of mesenchymal stem cells (MSC) to the preadipocyte lineage and the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes. To investigate the molecular mechanisms that regulate the differentiation of adipocytes from MSC, we investigated the involvement of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte differentiation. We found that the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) blocks adipocyte differentiation. An H<sub>2</sub>DCF assay revealed that differentiation-inducing agents induced ROS generation. Next, we examined the source of ROS. Knockdown of NAD(P)H oxidase 4 (Nox4) by RNA interference inhibited ROS production and adipocyte differentiation by differentiation-inducing agents. Furthermore, we examined the role of ROS in vivo. Administering the NAC reduced the amount of fat in mice fed a high fat diet. These results identify ROS as a regulator of the adipogenesis and obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 22 年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：薬理学一般

科研費の分科・細目：

キーワード：NADPH 酸化酵素, 間葉系幹細胞, 脂肪分化, 生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は、生成される脂肪細胞の数と個々の脂肪細胞のサイズの増大によって進展する。脂肪細胞の分化モデルとして、従来、脂肪分化は脂肪前駆細胞株 3T3-L1 によって詳細に検討され、PPAR $\gamma$  や C/EBP などの転写カスケードが明らかになってきたが、より未分化な幹細胞の分化機構はあまり分かっていない。

そこで、ラット骨髄から間葉系幹細胞の単離培養法を確立し、間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制する低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、抗酸化剤 NAC が脂肪分化を抑制するという予備的な結果が得られた。脂肪分化によって産生される活性酸素が間葉系幹細胞の分化を制御するという分化機構が示唆され、さらに詳細な検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず *in vitro* の検討として、間葉系幹細胞を用いて、NADPH 酸化酵素に着目し、間葉系幹細胞において発現するサブタイプを明らかにする。次に、RNA 干渉法によって NADPH 酸化酵素の発現を抑制し、活性酸素の産生および脂肪分化に対する影響を観察し、分化に関与するサブタイプを同定する。また、NADPH 酸化酵素の下流で脂肪分化に関与する分子を検討し、NADPH 酸化酵素による脂肪分化機構を明らかにする。

次に、*in vivo* の検討として、生活習慣病の病態モデル動物を用いて病態における活性酸素の意義を検証する。高脂肪食負荷マウスを用いて、抗酸化剤の慢性投与が内臓脂肪の蓄積に対して改善効果があるのか検討する。

以上の検討により、活性酸素が生活習慣病の予防・治療薬の標的になりえるのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 間葉系幹細胞

細胞株として、C3H 由来の 10T1/2 間葉系細胞を用いた。また、Sprague-Dawley ラットの大腿骨からプレート法により単離した間葉系幹細胞も併せて使用した。

### (2) 脂肪分化

脂肪分化は、50  $\mu$ M indomethacin、5  $\mu$ g/ml insulin、0.1  $\mu$ M dexamethasone を含む培地で 1 週間培養することにより行った。形成された油滴は Oil-red O により染色した。

### (3) 活性酸素

活性酸素の産生は、蛍光プローブ H<sub>2</sub>DCF (2',7'-dichlorofluorescein) により測定した。

### (4) short-hairpin RNA

short-hairpin RNA は pSuper.retro.neo ベクタ

ーに標的配列を組み込んで作成した。

## (5) 動物

肥満モデル動物は ddY マウス (♂6 週令) に高脂肪食を投与して作成した。薬剤を含む飲水を慢性投与し、精巣上体の脂肪量および摂食量の変化を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 間葉系幹細胞の脂肪分化に対する抗酸化剤の影響

10T1/2 細胞の脂肪分化は、抗酸化剤 NAC の処理により抑制された (図 1)。ラット間葉系幹細胞も同様の結果が得られた。

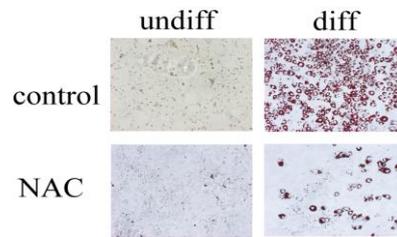


図 1 脂肪分化に対する抗酸化剤 NAC の影響

10T1/2 細胞を NAC 存在下あるいは非存在下で 1 週間分化誘導を行った。蓄積された油滴は Oil-red O により染色した。

### 2) 脂肪分化に伴う活性酸素の産生

脂肪分化誘導により活性酸素が産生されるのか検討した。分化誘導刺激により、H<sub>2</sub>DCF の蛍光強度の増加が認められた (図 2A)。また、この蛍光強度の増大は抗酸化剤 NAC により抑制された (図 2B)。

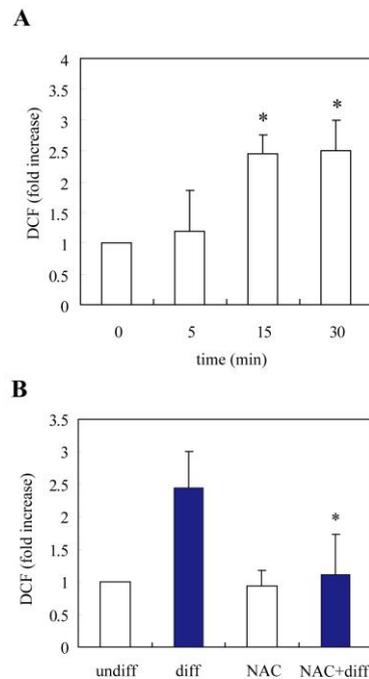


図 2 脂肪分化による活性酸素の産生

(A) 脂肪分化による H<sub>2</sub>DCF の蛍光強度の変化。

(B) H<sub>2</sub>DCF DCF の蛍光に対する NAC の影響。

### 3) 脂肪分化に対する活性酸素分解酵素の過剰発現の影響

さらに活性酸素の関与を確かめるため、活性酸素の分解酵素である Peroxiredoxin (Prx II) を過剰発現させて脂肪分化に対する影響を観察した。Prx II の発現は分化前後で特に影響はなかった (図 3A)。Prx II の過剰発現により、脂肪分化は抑制された (図 3B)。一方、細胞数には全く影響はなかった (図 3C)。

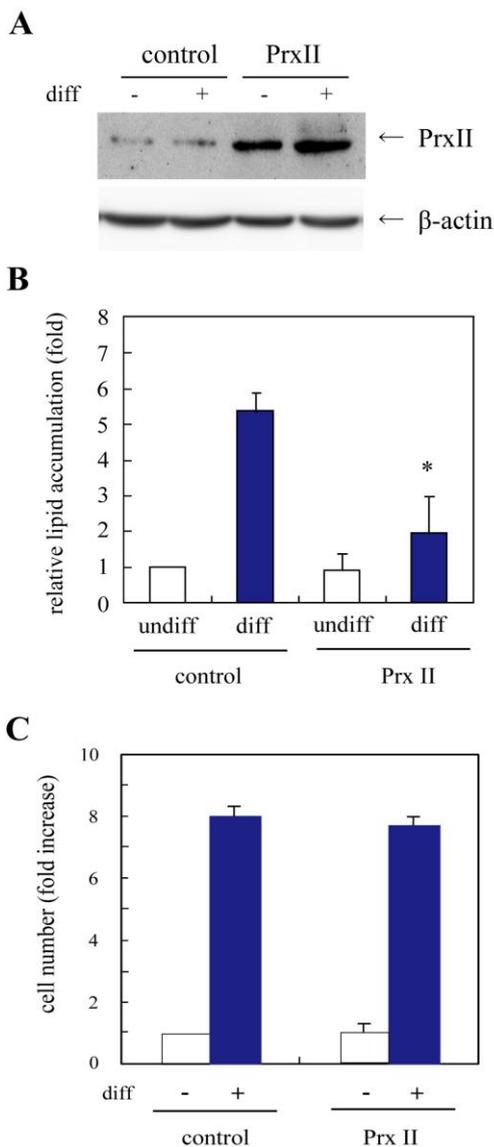


図 3 脂肪分化に対する Prx の影響

(A) 分化前後における PrxII の発現および過剰発現の確認。(B) 油滴の蓄積に対する PrxII 発現の影響。(C) 分化前後の細胞数に対する PrxII 発現の影響。

### (4) 脂肪分化に対する Nox4 ノックダウンの影響

種々の活性酸素の酵素阻害剤を検討した結果、NADPH 酸化酵素が分化に関与する可能性が示唆された。さらに間葉系幹細胞に発現して、分化に伴い発現が減少するサブタイプを調べた結果、Nox4 であった。そこで、Nox4 に対する shRNA を作成し(図 4A)、分化に対する影響を検討した。その結果、Nox4 に対する shRNA は脂肪分化を抑制した(図 4B)。また、Nox4 のノックダウンにより分化に伴う活性酸素産生も抑制された。

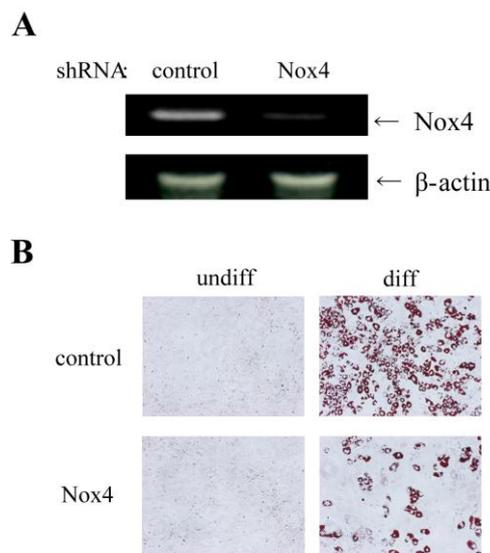
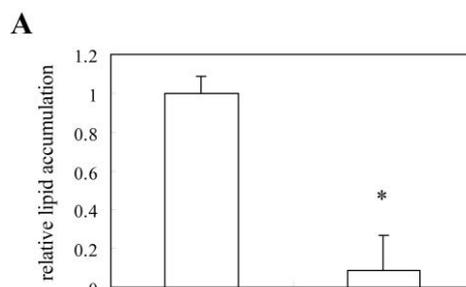


図 4 脂肪分化に対する Nox4 shRNA の影響

(A) Nox4 shRNA によるノックダウンの確認。(B) 油滴の蓄積に対する Nox4 shRNA の影響。

### (5) 活性酸素の下流シグナルの解析

活性酸素の下流で作用するシグナル分子として、CREB を検討した。CREB の欠失変異体の遺伝子導入により、脂肪分化は抑制された(図 5A)。また、脂肪分化誘導により CRE 転写活性化が誘導され、NAC あるいは NADPH 酸化酵素阻害剤 apocynin により抑制された(図 5B)。



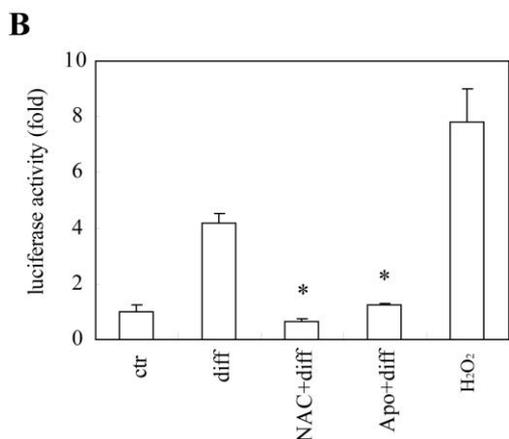


図5 脂肪分化に対する Prx の影響

(A)油滴の蓄積に対する CREB 欠失変異体の影響。  
(B) 分化誘導による CRE 転写活性化に対する抗酸化剤の影響。

#### (6) 病態モデルにおける抗酸化剤の影響

肥満の病態モデル動物として高脂肪食負荷マウスを作成し、抗酸化剤の慢性投与に影響を観察した。その結果、図6に示すように、高脂肪食負荷による精巣上体の脂肪蓄積は NAC により抑制された。一方、摂食カロリーはグループ間で変化が認められなかった。

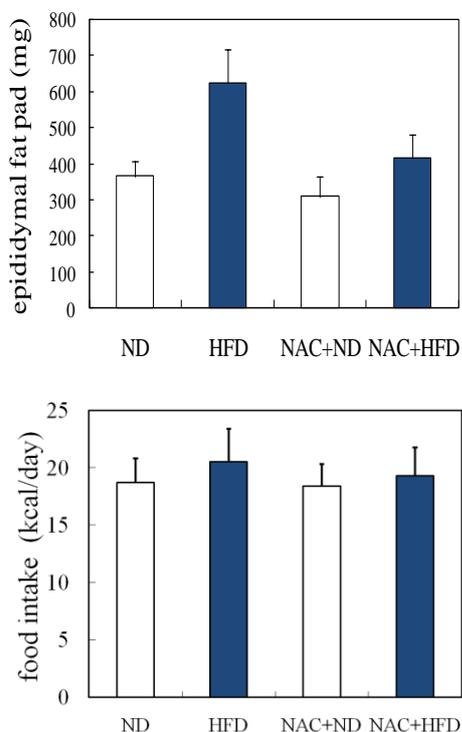


図6 高脂肪食負荷による脂肪形成に対する NAC の影響

(A)精巣上体における脂肪量に対する NAC の影響。(B) 通常食(ND)あるいは高脂肪食(HFD)による摂食カロリー。

本研究において、活性酸素が *in vitro* および *in vivo* における脂肪分化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

活性酸素は従来、細胞死などの毒性をもたらすことが報告されてきたが、少量の活性酸素はシグナル分子として分化に寄与することが示唆された。特に、Prx II の導入により、活性酸素は分化に関与するが増殖には関係しなかったことから、活性酸素は増殖・分化のスイッチの機能を果たしている可能性が考えられる。

活性酸素の産生酵素の中でも、Nox4 が脂肪分化に関与することを明らかにした。Nox4 は膜貫通部位を含む構造を有しており、間葉系幹細胞においても膜に局在することが想定され、局所での活性酸素の産生に寄与すると考えられる。最近 Nox4 ノックアウトマウスには特に大きな表現型が認められていないことが報告された。肥満など病態を模倣した条件における解析が待たれる。

Nox4 の下流で分化に関与するシグナルとして CREB を示した。既に多くの CREB の標的分子が明らかにされており、今後は間葉系幹細胞における CREB 標的分子を明らかにする必要がある。これにより脂肪分化機構がより一層明らかになることが期待される。

さらに、肥満の病態モデル動物として高脂肪食負荷マウスを用いた実験により、*in vivo* においても抗酸化剤が有用であることを示した。NADPH 酸化酵素阻害剤も同様の結果を得ており、Nox4 が新たな肥満治療薬の標的になることが考えられる。Nox4 サブタイプの選択的な阻害剤の開発が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) Naoya Hirata, Yuko Sekino, Yasunari Kanda. Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 403: 138–143 (2010).

〔学会発表〕(計6件)

- 1) Yasunari Kanda. Role of Nox4 in adipocyte differentiation from mesenchymal stem cells. Keystone Symposia (B4), Keystone, USA, 2010.02.17.
- 2) Yasunari Kanda. GPR30-mediated signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. XX World Congress of the ISHR, Kyoto, Japan, 2010.05.16.
- 3) Yasunari Kanda. Role of NADPH oxidase in adipocyte differentiation and obesity. EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine 2nd, Cavtat, Croatia, 2010.05.22.

- 4) Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Waka Lin, Yuko Sekino. TGF $\beta$ -induced stem cell phenotype in breast cancer cells. Keystone Symposia (A8), Vancouver, Canada, 2011.01.22.
- 5) 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：乳癌細胞に含まれる癌幹細胞の割合に対するニコチンの影響、第10回再生医療学会、東京、2011.03.01
- 6) 平田尚也、林和花、関野祐子、諫田泰成：MCF-7細胞における乳癌幹細胞に対するエストロゲンの影響、第84回日本薬理学会、2011.03. (誌上開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諫田 泰成 (YASUNARI KANDA)  
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部  
室長  
研究者番号：70510387

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし