

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08549

研究課題名(和文)血管リモデリングが誘導する脂肪幹細胞制御因子の同定による新規肥満病態改善法の創出

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of adipose stem cells associated with vascular remodeling in obesity

研究代表者

和田 努 (Wada, Tsutomu)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・講師

研究者番号：00419334

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)：内臓脂肪の肥大化に関わる脂肪細胞数を規定する脂肪幹細胞の増殖や分化の制御機構は不明な点が多く、その解明が重要である。マウスにおいて血管周囲に局在するペリサイト(PCs)は肥満に伴い血管から脱離する。脂肪幹細胞も血管周囲の微小環境により維持されることからPCs脱離が契機になり脂肪幹細胞が増殖、分化するとの仮説を立てた。PCsが脱離しないPDGFRb欠損マウスでは高脂肪食負荷8週において脂肪幹細胞数の増殖活性が低下し、その数も少なかった。さらにPCsは分泌因子を介して脂肪分化を抑制した。よってPCs脱離による脂肪幹細胞ニッチの破綻が脂肪幹細胞の増殖と脂肪細胞への分化に重要であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内臓脂肪幹細胞ニッチの制御機構を明らかにした本研究成果は、肥満病態の理解を促進させると考えられる。さらに、代謝的に健全な肥満状態による代謝疾患予防戦略を確立するための開発基盤の強化に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Increase of visceral fat is crucial in the progression of obesity; however, the underlying mechanism that controls the proliferation and differentiation of adipose stem cells remains unclear. Since adipose stem cells are maintained in the perivascular microenvironment, we hypothesized that obesity-induced detachment of pericytes may trigger the proliferation and differentiation of adipose stem cells. In the visceral adipose tissue of PDGFRb deficient mice fed a high fat diet for 8 weeks, pericytes did not detach from adipose vessels, the proliferative activity of adipose stem cells decreased, and the number of adipose stem cells decreased. In addition, pericytes suppressed adipogenic differentiation through their secreted factors. Therefore, disruption of the adipose stem cell niche by pericyte detachment appears to be important for adipose stem cell proliferation and differentiation into adipocytes in obese adipose tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：ペリサイト 脂肪幹細胞 肥満 脂肪組織血管 慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪組織の肥大化はインスリン感受性の低下により糖脂質代謝障害を誘導するだけでなく、癌、心血管疾患、認知症などの発症や予後に関わる。その一方で、脂肪細胞サイズが保たれ代謝に異常を生じない“健康的肥満”状態も存在する。脂肪組織体積は、①脂肪細胞数、すなわち脂肪幹細胞 (APCs) からの脂肪細胞分化、②個々の脂肪細胞体積、③脂肪組織内の血管新生により規定される。脂肪細胞数を増加させる一方で個々の脂肪細胞サイズの増大を抑制できれば、健康的脂肪組織の維持により肥満関連疾患を抑えられる可能性が考えられる。しかし、新たな脂肪細胞の起源となる脂肪幹細胞の増殖、分化、維持機構の詳細は不明である。

マウスの内臓脂肪において APCs は過剰な栄養摂取に反応して短期間だけ増殖し、少なくとも雄ではその後は増殖せずに脂肪細胞へと分化し、脂肪細胞のサイズ増大に伴い肥満進展に寄与すると考えられている。一方でヒトの APCs は肥満に伴い思春期頃までは増加するが、その後は体重増減に関わらず一定とされている。しかし、中年以降に肥満を発症した場合、脂肪細胞サイズだけでなく脂肪細胞数も増加することが報告された。このことは慢性的な肥満病態においても APCs が増殖する未知の機構の存在を示唆する。

申請者はこれまで、脂肪組織血管周囲に存在するペリサイト(PCs) に着目し、脂肪組織の肥大化には PCs の Platelet derived growth factor (PDGF) シグナルにより血管から PCs が脱離することが肥満に伴う内臓脂肪組織の血管新生の起点となることを明らかにしてきた。APCs は血管周囲に限局して局在する。また、骨髄やがん組織において血管周囲の微小環境 (ニッチ) は、様々な幹細胞の形質維持に寄与することが知られている。したがって、肥満に伴う血管からの PCs 脱離は APCs を取り巻く微小環境に大きく影響する可能性が想定される。

## 2. 研究の目的

成熟脂肪血管は血管内皮の増殖を抑制する PCs に被覆されているが、肥満状態では脂肪組織に浸潤するマクロファージが産生する血管新生因子 PDGF-B により血管から PCs が脱離し、血管新生とその後の脂肪組織肥大化が促進される。これらの研究成果から着想を得て、ペリサイト脱離による脂肪血管微小環境変化が APCs の増殖の契機となる可能性を想定した。PDGF receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) はほぼ PCs に限局して発現が認められる。我々が研究に用いてきた PDGFR $\beta$  欠損マウス(KO) は肥満に伴う血管からの PCs 脱離が認められないことから、APCs を取り巻くニッチへの影響が少ないと想定される。そこで本マウスを用いて、肥満に伴う脂肪血管からの PCs 脱離による血管リモデリングが ASCs の増殖および分化に及ぼす可能性が考えられた。

PCs は様々な分泌物を産生することで組織再生や免疫応答機能を示すことが近年示されている。そこで本研究では、KO を用いた肥満マウスにおける APCs を解析し、またその制御機構の解析を *in vitro* において PCs の分泌物が ASCs の増殖・分化に及ぼす影響、ならびに免疫応答に及ぼす影響を解析することで検証した。これらの検討により、肥満病態進展における PCs の病態生理学的意義を探索し、その分子機構を明らかにすることを本研究目的とした。同時に、脂肪組織に対し肥満病態でも代謝障害をきたさない、健全な肥満を誘導する方法を探索した。

## 3. 研究の方法

### 実験1: 肥満マウスにおける内臓脂肪 APCs の解析

コントロール(FL) および PDGFR $\beta$  欠損マウス(KO) に高脂肪食(HFD) を 0, 1, 4, 8, 12, および 16 週間負荷し、内臓脂肪組織における遺伝子発現を real-time PCR で検討した。また任意の負荷期間のマウス内臓脂肪組織の whole mount 免疫染色により、脂肪組織血管の形態とペリサイト接着率を解析した。つぎに ASCs を Lineage<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells と定義し、フローサイトメトリーにより APCs 数の HFD 負荷に伴う変化、ならびに flow sort した APCs における遺伝子発現を解析

した。さらに、細胞増殖マーカーである BrdU をマウスに 1 週間投与することで、FL および KO において HFD 負荷早期ならびに 7-8 週目の APCs 増殖をフローサイトメトリーで解析した。

#### 実験 2: PCs 分泌物が脂肪細胞におよぼす影響

初代培養 PCs は細胞増殖が極めて遅かった。より効率的に実験を行うために、実験には PCs 培養株を用いた。培養 PCs に対し PDGF-B 刺激を 1 時間行い、細胞を洗浄後に 24 時間培養した培養液を conditioned medium (CM) として採取した。PCs が産生するエクソソームの寄与を検討する実験ではエクソソーム生成阻害剤 GW4869 を共処置して CM を回収した。これらの CM を、ASCs を含むマウス脂肪組織間質細胞(ASCs) および 3T3-L1 preadipocytes に処置し、増殖および分化に及ぼす影響を解析した。さらに、LPS および PDGF-B で刺激して回収した PCs の CM のサイトカインアレイにより、CM に含まれる生理活性物質を探索した。

#### 実験 3: PCs 分泌物が免疫細胞におよぼす影響

実験 2 で得られた PCs 分泌物には多くのケモカインが含まれていた。敗血症において PCs がミクログリアの免疫応答を媒介することが報告されていることから、PCs 分泌物がマクロファージの炎症活性におよぼす影響を解析した。さらに、HFD 負荷 4 週の KO を用いて視床下部ペリサイト PDGFR $\beta$ シグナルがエネルギー恒常性維持に及ぼす影響を小動物代謝計測システムによるエネルギー消費量測定、視床下部の免疫染色、遺伝子発現を real-time PCR により検証した。

#### 実験 4: 健全な脂肪組織を誘導するビタミン D アナログの効果の検討

HFD 負荷マウスは内臓脂肪組織の肥大化に伴い糖代謝の障害を示す。内臓脂肪組織を糖代謝的に健全な脂肪組織に導く因子を探索するため肥満マウスにビタミン D アナログ MC903 を投与し、糖代謝と内臓脂肪組織を含む代謝臓器の解析を行った。

## 4. 研究成果

C57BL/6 マウスにおいて、内臓脂肪は HFD 負荷期間に伴い肥大化を示した。HFD 負荷 8 週以降で *Pdgfb* の mRNA 発現が増加するのとは一致し、脂肪血管からの PCs の脱離は HFD 負荷 8 週以降で顕著であった。FL と KO の比較では、KO は HFD 負荷 4 週以降で体重および内臓脂肪重量が抑制され、HFD 負荷 8 週以降では ASCs 数が低下した。既報に一致して ASCs の増殖活性は Chow 給餌マウスに比べ HFD 負荷 1 週目で有意に亢進し、その程度は FL と KO で同等であった。興味深いことに HFD 負荷 8 週時点での増殖活性は FL では亢進した。しかし KO ではそのような増殖活性の亢進は認められなかった。

*in vitro* において、PCs の CM は 3T3-L1 前駆脂肪細胞および ASCs の脂肪分化を抑制した。しかしエクソソーム阻害剤を処理して回収した CM は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化抑制に影響しなかった。一方、CM は ASCs の増殖を促進する傾向を示した。ペリサイト CM に含まれる分泌物をサイトカインアレイで解析した結果、PCs は PDGF および LPS 刺激により CXCL5、PDGFA、B、IL5、CCL17、CCL2 などの分泌の上昇を示した。ASCs に関する研究成果は追試験を加えて今後論文として発表予定である。

脂肪組織の血管新生は個体のエネルギー代謝と関連することが知られている。また肥満に伴いエネルギー代謝の中核である視床下部では慢性炎症が惹起され、その制御が障害される。脳は最も PCs による血管の被覆が多い臓器であることから、KO マウスを用いて視床下部 PCs の代謝

制御に及ぼす影響を解析した。その結果、HFD 負荷 4 週以内の早期において KO は FL に比較し炎症が抑制され、POMC ニューロンの活性が維持され、エネルギー代謝の低下から保護されていた。その機序として、視床下部 PCs は炎症刺激と PDGF シグナルに応答して分泌因子を介してミクログリアの慢性炎症を惹起することを突き止め、論文として報告した。

さらに HFD 負荷肥満マウスへのビタミン D アナログ MC903 の投与が内臓脂肪の脂肪細胞サイズを縮小し脂肪蓄積を減少させることも見出した。本作用のメカニズムは主に骨格筋における筋線維肥大化に伴う結果であることが明らかになり、これらの知見を論文として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wada T, Miyazawa Y, Ikurumi M, Fuse K, Okekawa A, Onogi Y, Saito S, Tsuneki H, Sasaoka T.	4. 巻 20
2. 論文標題 A transdermal treatment with MC903 ameliorates diet-induced obesity by reducing visceral fat and increasing myofiber thickness and energy consumption in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutr Metab (Lond)	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12986-023-00732-5	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 Okekawa A, Wada T, Onogi Y, Takeda Y, Miyazawa Y, Sasahara M, Tsuneki H, Sasaoka T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Platelet-derived growth factor signaling in pericytes promotes hypothalamic inflammation and obesity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mol Med	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10020-024-00793-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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桶川晃, 和田努, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態進展におけるペリサイトPDGF作用によるエネルギー代謝調節機構の解析
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田努, 桶川晃, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態進展における脂肪組織および視床下部ペリサイトの重要性
3. 学会等名 第96回日本糖尿病学会中部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹岡利安、恒枝宏史、和田努
2. 発表標題 炎症細胞による脂肪組織リモデリング
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桶川晃、和田努、北村楓花、小野木康弘、渡邊愛理、富田淳也、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 ペリサイトPDGFシグナルを介した視床下部慢性炎症とエネルギー代謝制御機構
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村楓花、和田努、桶川晃、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 内臓脂肪組織におけるペリサイトの脱離を介した脂肪幹細胞の増殖・分化メカニズム
3. 学会等名 2021年度薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桶川晃、和田努、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態エネルギー代謝調節機構に対するペリサイトPDGFシグナルの重要性
3. 学会等名 2021年度薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田努
2. 発表標題 肥満病態下での内臓脂肪肥大化に関わる血管新生の新機構の解明
3. 学会等名 予防薬理学研究所 シンポジウム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022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
研究分担者	笹岡 利安  (Toshiyasu Sasaoka)  (00272906)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授    (13201)	

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