

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08572

研究課題名(和文) セレノプロテインPの褐色脂肪細胞における発現制御機構と分化作用の解明

研究課題名(英文) Reguration of the brown adipocytes diffrenciation by selenoprotein P

研究代表者

高山 浩昭 (Takayama, Hiroaki)

金沢大学・総合技術部(医)・技術専門職員

研究者番号：90725227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では褐色脂肪組織局所でのセレノプロテインP (SeP) 発現制御機構およびSePがBAT分化に及ぼす作用を検討した。その結果以下のことを明らかにした(1) SeP遺伝子発現は分化誘導後急速に亢進し誘導後2日目にピークに達した後、分化完了時まで高いレベルを維持した(2) SeP欠損褐色脂肪細胞ではUCP1タンパク質発現は有意に低下していた(3) 褐色脂肪前駆細胞への抗酸化剤N-アセチルシステイン処置は褐色脂肪細胞への分化を抑制した。本研究課題全体を通して、抗酸化タンパク質SePの欠損も過剰な抗酸化剤投与も両方とも褐色脂肪細胞分化を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Reactive oxygen species (ROS) はその反応性の高さから様々な生体分子を損傷させる悪玉因子と考えられ、特に加齢、疾病に伴う酸化ストレスを抑制することが健康増進効果をもたらすと信じられてきた。一方で古くから低濃度ROSの生理的意義も指摘されており、過剰な抗酸化剤投与は還元ストレスを引き起こす。本研究の結果は、正常な脂肪細胞分化には、多すぎず少なすぎない”適度”な酸化ストレス負荷が刺激として必要であることを示唆する。今後は、脂肪細胞分化を促進/抑制する酸化ストレスの閾値が何処にあるのか探ることで、より詳細に脂肪細胞分化メカニズムが明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I investigated the expression mechanism of selenoprotein P (SeP) in brown adipocytes and the effect of SeP on brown adipocytes differentiation in this study. The current results revealed that: (1) SeP gene expression was rapidly up-regulated after differentiation induction and maintained a high level until the differentiation completed. (2) UCP1 protein levels were decreased in SeP-deficient brown adipocytes significantly. (3) Treatment of the antioxidant N-acetylcysteine to the brown adipocyte precursor cells suppressed their differentiation into brown adipocytes. The current study demonstrated that either the deficiency of the antioxidant protein SeP and the administration of excess antioxidants suppressed brown adipocyte differentiation.

研究分野：代謝学

キーワード：セレノプロテインP 褐色脂肪組織 還元ストレス

1. 研究開始当初の背景

Reactive oxygen species (ROS) はその反応性の高さから様々な生体分子を損傷させるいわゆる“悪玉因子”と考えられ、特に加齢、疾病に伴う酸化ストレスを抑制することが健康増進効果をもたらすと信じられてきた。一方で古くから生体内シグナル分子としての ROS の生理的意義も指摘されており、過剰な抗酸化剤投与による還元ストレスが提唱されるに至った。セレノプロテイン P (SeP; encoded by *SELENOP* in humans) は主に肝臓で合成され、微量元素セレンを全身の各臓器へ輸送する分泌タンパクとして知られていた。また SeP は GPX1 へのセレン供給ならびに自身のペルオキシデース活性によって抗酸化能を持つことも知られていた。申請者らはこれまでに、2 型糖尿病患者の肝臓で産生が増大した SeP が過剰な抗酸化能を介して様々な糖尿病関連疾患の発症に寄与している事を報告した (図 1)。

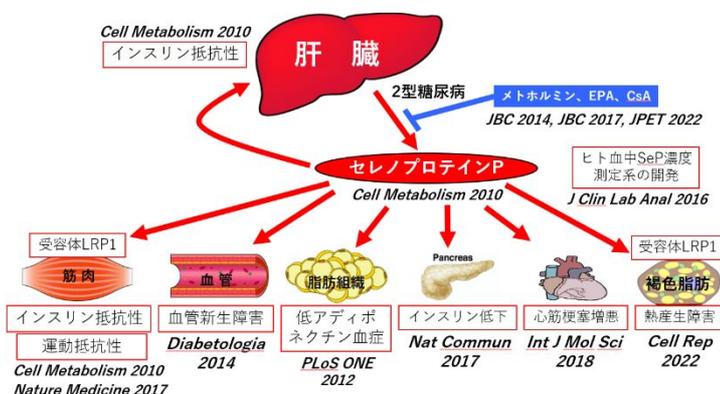


図 1. セレノプロテイン P の過剰分泌による糖尿病関連病態の発現

褐色脂肪組織 (BAT) は非震え熱産生の主要臓器であり慢性代謝疾患の治療標的として期待されている。最近、適切な酸化ストレスによる生理的な刺激が BAT の機能維持に重要な役割を果たしているとする報告が相次いでいる。そこで申請者は、糖尿病患者では増大した SeP による還元ストレスによって BAT 熱産生が障害されるのではないかと仮説を立てた。申請者は先行する検討により、褐色脂肪細胞で発現する SeP がノルアドレナリン (NA) 誘導性の ROS 産生を解除することで熱産生に抑制的に働くこと、褐色脂肪細胞分化過程で SeP 遺伝子発現が亢進することを見いだした。このことは、SeP が BAT レドックスバランス制御機構を司る分子であることを示唆する。

2. 研究の目的

SeP による BAT 熱産生制御機構の全容探求を目指して、褐色脂肪細胞での SeP 産生制御機構、SeP の褐色脂肪細胞分化に及ぼす作用を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 初代培養褐色脂肪細胞を用いて、褐色脂肪細胞分化過程における *Selenop* 発現様式を解明する。
- (2) 野生型および *Selenop* 欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞を用いて、セレノプロテイン P が褐色脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討する。
- (3) 初代培養褐色脂肪細胞を用いて、酸化ストレスが褐色脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

- (1) SeP が褐色脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討するため、初代培養褐色脂肪細胞を用いて、褐色脂肪細胞分化過程における *Selenop* 遺伝子発現を詳細に検討した。その結果、*Selenop* 遺伝子発現は分化誘導後急速に亢進し Day 2 にピークに達した後、分化完了まで高い発現レベルを維持した (図 1)。そこで不活化した初代培養褐色脂肪細胞を樹立しヒト *SELENOP* プロモーターレポーターベクターを導入することで、その発現制御機構のより詳細な解明を試みた。本研究では、ドキシサイクリン存在下でのみ SV40-T 抗原が発現する

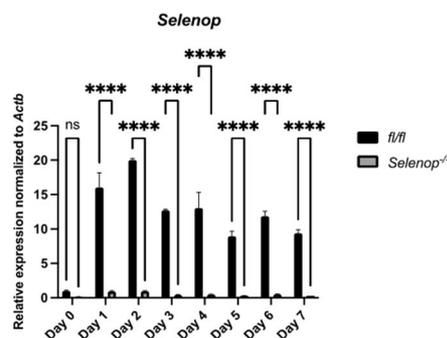


図 1

遺伝子を初代培養褐色脂肪細胞に導入し、不活化細胞の樹立に成功した。この不活化細胞では培養培地中からドキシサイクリンを除去することで増殖を停止させ、高効率に褐色脂

肪細胞へ分化させることが出来た。しかしながら不死化細胞の樹立に多くの時間を費やしたため、本研究期間中に不死化褐色脂肪細胞への *SELENOP* プロモーターレポーターベクターの導入まで進むことが出来なかった。褐色脂肪細胞における *Selenop* 発現制御機構の解明は今後の課題である。

- (2) SeP が褐色脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討するため、野生型ならびに *Selenop* 欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞を用いて、分化過程における各種マーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、*Selenop* 欠損褐色脂肪細胞では、分化過程に代表的な BAT マーカー遺伝子 *Ucp1*、*Ppargc1a* の発現が有意に低下した (図 2A)。加えて *Selenop* 欠損褐色脂肪細胞では、UCP1 タンパク質発現も低下していた (図 2B)。一方で *Selenop* 欠損マウスから単離した BAT における UCP1 発現は野生型マウスと変化無かったことから、*in vivo* では代償機構が存在することが示唆される。以上の結果は、SeP が褐色脂肪細胞分化において重要な働きをしていることを示す。

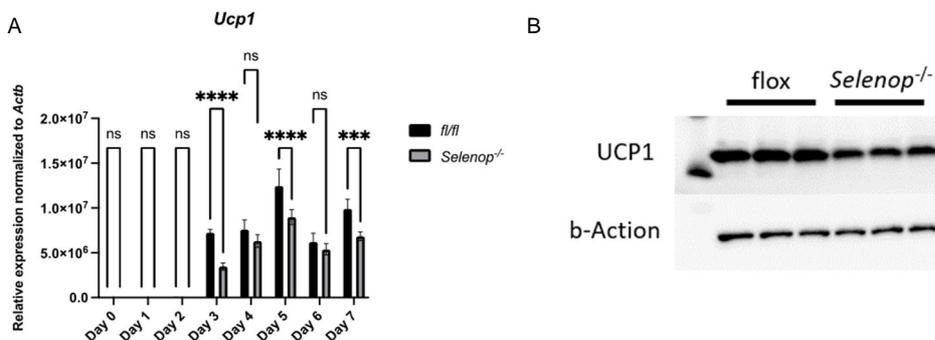


図 2

- (3) 酸化ストレスが褐色脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討するために、初代培養褐色脂肪細胞において分化誘導初期のみ、または全期間、抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) を処置した。その結果、全期間の NAC 処置により脂肪蓄積を指標とした褐色脂肪細胞分化は著明に低下した (図 3A)。またこの NAC の作用は褐色脂肪細胞のみならず初代培養 Beige 細胞、白色脂肪細胞でも観察された。このことは、分化初期段階での適切な酸化ストレス刺激は、脂肪細胞クラスによらず、脂肪細胞分化の促進に普遍的に必要であることを示唆する。またこの時、初代培養褐色脂肪細胞における *Ucp1*、*Pparg*、*Ppargc1* の各 mRNA 発現レベルは、全期間 NAC 処置でのみ著明に低下した (図 3B)。このことは、熱産生脂肪細胞としての機能の獲得のために分化後期段階の酸化ストレスが必須であることを示唆する。

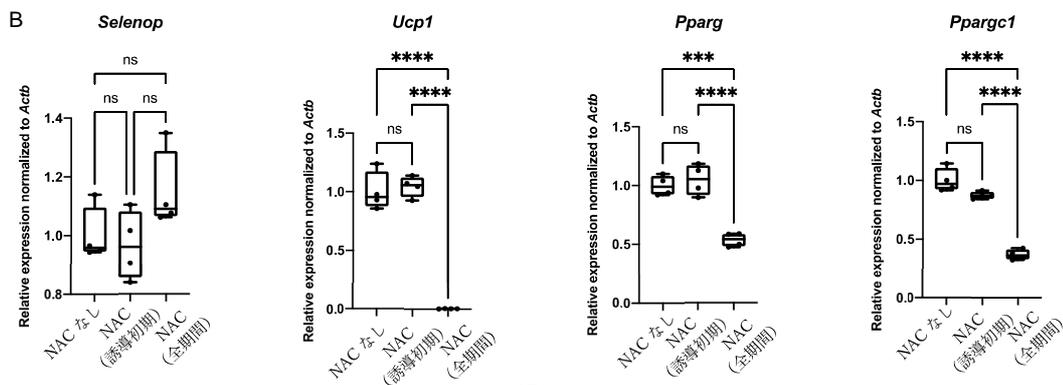


図 3

まとめ

本研究は、抗酸化タンパク質 SeP の欠損が脂肪細胞分化を抑制することを明らかにする一方、過剰な抗酸化能もまた脂肪細胞の分化を抑制し正常な機能の発現を抑制する事を示した。正常な脂肪細胞分化には、多すぎず少なすぎない “適度” な酸化ストレス刺激が必要なのであろう。マウス個体の BAT と培養褐色脂肪細胞の間で *Selenop* mRNA 欠損による表現型が一部異なっているため、臓器関連の視点からの検討も必要である。今後は、褐色脂肪細胞分化を促進/抑制する酸化ストレスの閾値が何処にあるのか探ることで、より詳細にレドックスによる褐色脂肪熱産生制御メカニズムが明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oo Swe Mar, Oo Hein Ko, Takayama Hiroaki, Ishii Kiyo-aki, Takeshita Yumie, Goto Hisanori, Nakano Yujiro, Kohno Susumu, Takahashi Chiaki, Nakamura Hiroyuki, Saito Yoshiro, Matsushita Mami, Okamatsu-Ogura Yuko, Saito Masayuki, Takamura Toshinari	4. 巻 38
2. 論文標題 Selenoprotein P-mediated reductive stress impairs cold-induced thermogenesis in brown fat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110566 ~ 110566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110566	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hein Ko Oo, 高山 浩昭, Swe Mar Oo, 石井 清朗, 篁 俊成
2. 発表標題 Selenoprotein P-mediated reductive stress impairs cold-induced UCP1 activation and thermogenesis in brown fat
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 馬場園哲也、金崎啓造、守屋達美、清水美保、能登洋、篠原雅巳、伴秀行、山脇健吾、渡辺忍、辻憲二、内藤正吉、菅野恵美、藤田浩樹、柴山大賀、高山浩昭、鳥居（後藤）綾、岡田清孝、光井崇	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 Medical Science Digest (2月号) Vol. 48, No. 2	

〔産業財産権〕

〔その他〕

熱産生を抑えるホルモンを発見 ～抗酸化が逆にストレス!? 還元ストレスを提唱～
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/103521>

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