

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22790078

研究課題名（和文） TGF β による脂肪滴蓄積能の変化と治療薬開発に向けた
新規制御因子の同定研究課題名（英文） Downregulation of lipid droplets formation in adipocyte
by TGF β and identification of its regulator

研究代表者

伊藤 友香 (Yuka Itoh)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：40454326

研究成果の概要（和文）：本研究では白色脂肪細胞の形態変化と各種遺伝子発現に対する TGF β の役割について検討し、TGF β による大型脂肪滴減少の制御機構について検討した。マウス白色脂肪細胞由来 HW11 細胞株を成熟脂肪細胞へ分化させた後 TGF β で刺激をすると、大型脂肪滴が激減することを見出した。このとき脂肪滴に局在する PAT ファミリータンパク質であるペリリピン1の発現が顕著に低下した。ペリリピン1の発現制御に関与する脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR γ 遺伝子の発現も TGF β 刺激により低下した。また、Smad3 欠損マウス MEF において、TGF β による PPAR γ 遺伝子発現の抑制は部分的に回復した。以上の結果から、TGF- β は PPAR γ 発現を抑制することでペリリピン1の発現を抑制し、脂肪滴蓄積を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of a typical immunoregulatory cytokine, transforming growth factor β (TGF β) on the accumulation of lipid droplets and the expression of genes involved in their formation in adipocytes.

TGF β induced the remarkable morphological change and impaired the accumulation of lipid droplets in mature white adipocytes (differentiated HW11 cells). In differentiated HW11 cells TGF β dramatically reduced the expression of perilipin. Perilipin, one of the lipid droplet-associated proteins, is a regulator of lipid storage and is also known to a PPAR γ target gene. TGF β also reduced gene expression of PPAR γ but not the activity of PPAR γ . TGF β partially reduced PPAR γ mRNA expression in Smad3 deficient MEFs. These findings suggest that TGF β induces the morphological change and impairs the accumulation of lipid droplets by negatively regulating the expression level of perilipin through downregulation of the PPAR γ expression in mature white adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シグナル伝達、発現制御

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪の蓄積は、メタボリックシンドロームの診断基準の一つである。生体内において脂肪組織は白色脂肪組織と褐色脂肪組織が存在することが知られている。白色脂肪組織はエネルギー貯蔵組織として機能し、褐色脂肪組織は熱産生組織として機能する。脂質の過剰摂取、運動不足という現在の生活習慣は内臓脂肪の過剰な蓄積を引き起こし、白色脂肪組織では脂肪細胞の増加と肥大化が観察される。すなわち、脂肪細胞数の増加と肥大化による脂肪蓄積の増大はメタボリックシンドロームの最も重要な病変であり、白色脂肪細胞の減少と肥大化の抑制はメタボリックシンドロームの治療標的となると期待されている。

前駆脂肪細胞株あるいはノックアウトマウスを用いた研究から、脂肪を蓄積する成熟脂肪細胞への分化に対して PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ) および C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) ファミリーの転写因子が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。特に分化初期に誘導される PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターと呼ばれ、この転写因子の機能制御が成熟脂肪細胞分化の進行には不可欠である。

一方、空腹時や運動時などエネルギーが不足すると、脂肪細胞に蓄積されていた脂肪は ATGL (adipose triglyceride lipase) 及び HSL (hormone-sensitive lipase) を介した加水分解により脂肪酸とグリセロールとなって血中に放出される。この過程を脂肪分解 (lipolysis) と言う。最近、アドレナリンやノルアドレナリンによる脂肪の加水分解機構が明らかになってきているが、その他の生体内物質による影響はほとんど報告されていない。

抗炎症性サイトカインの TGF β (transforming growth factor β) が脂肪細胞の分化誘導を抑制することが報告されていたが、分化した成熟脂肪細胞に対する TGF β の影響は未解明である。また最近、持続的な運動によりラット脳脊髄液中 TGF β 濃度が上昇し、脂肪酸酸化が増加する、線虫において TGF β シグナルは満腹感を制御するなど、脂肪蓄積において TGF β が何らかの関わりを持つことが示唆されるが、成熟脂肪細胞に対する TGF β の影響は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では脂肪を蓄積した成熟脂肪細胞における形態変化に対する TGF β の影響とその制御機構について明らかにし、抗肥満作用を持つ新規治療薬の候補分子の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

HW11 細胞 (マウス白色脂肪細胞株) あるいは HB2 細胞 (マウス褐色脂肪細胞株) は齊藤昌之教授 (天使大学) より御供与頂いた。また、Smad3 欠損マウスは今村健志教授 (愛媛大学) より御供与頂いた。HW11 細胞および HB2 細胞の脂肪細胞への分化は以下のように行った。各細胞をコンフルエントになるまで培養した後 (day 0)、分化誘導培地 (10% 非働化 FBS を含む DMEM に 100 units/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、1 μ M デキサメタゾンを加えたもの) で培養した。2 日後維持培地 (10% 非働化 FBS を含む DMEM に 100 units/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、10 μ g/ml インスリンを加えたもの) で 2 日間培養し、その後は 2 日ごとに維持培地で培地交換を行った。Smad3 欠損マウス MEF の脂肪細胞への分化は以下のように行った。MEF をコンフルエントになるまで培養した後 (day 0)、MEF 用分化誘導培地 (10% 非働化 FBS を含む α MEM に 100 units/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、1 μ M デキサメタゾン、5 μ g/ml インスリンを加えたもの) で培養した。その後 2 日ごとに MEF 用分化誘導培地で培地交換を行った。

脂肪細胞への分化は Oil Red O による脂肪滴の染色により確認した。

各遺伝子の発現に関しては SYBR Green を用いた定量的 PCR 法により検討した。総 RNA を抽出し、標準のプロトコールにより逆転写反応を行い、cDNA 溶液を作製して PCR 反応の鋳型とした。

ペリリピン 1 タンパク質の発現はウェスタンブロット法により解析した。細胞を細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1% Triton-X、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10 μ g/ml leupeptin、50 μ g/ml aprotinin) で溶解し、細胞内のタンパク質を抽出した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後 PVDF 膜に転写し、抗ペリリピン抗体、HRP を結合させた抗ウサギ IgG 抗体を用いて化学発光により検出した。

プロモーター活性の変化は、各種プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつなげたレポータープラスミドを細胞に導入し、レポーターアッセイにより評価した。遺伝子導入効率を β -galactosidase 活性により補正した。

4. 研究成果

(1) TGF β 刺激による成熟脂肪細胞の形態変化

前駆白色脂肪細胞株 HW11 あるいは前駆褐色脂肪細胞株 HB2 を脂肪細胞へ分化誘導後 7 日目に TGFβ 刺激を行い、成熟脂肪細胞の形態変化を観察した。白色脂肪細胞株 HW11 では TGFβ 刺激 4 日後から大型脂肪滴の減少が観察され、TGFβ 刺激 8 日後ではほぼ完全に消失した。一方、褐色脂肪細胞株 HB2 では TGFβ 刺激による形態変化はほとんど見られなかった。それぞれの細胞を用いて TGFβ の応答性を TGFβ シグナル伝達分子 Smad3 の転写活性化を指標に検討したところ、HB2 と比較して HW11 では TGFβ 刺激による Smad3 活性上昇の程度が大きかった。このことから、TGFβ に対する感受性の違いにより、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞で TGFβ が形態変化に与える影響が異なったのではないかと推察された。

(2) TGFβ 刺激による遺伝子発現変化

次に、この白色脂肪細胞で観察された TGFβ による大型脂肪滴減少に関与する因子を同定するため、TGFβ 刺激による成熟白色脂肪細胞における遺伝子発現変化を検討した。HW11 を脂肪細胞へ分化誘導後 7 日目に TGFβ 刺激を行い、2 日ごとに細胞を回収し、脂肪細胞分化マーカー (C/EBPα、PPARγ)、大型脂肪滴に局在するペリリピン 1、S3-12、小型脂肪滴に局在する ADRP、TIP47、脂肪分解酵素 (ATGL、HSL) の発現を解析した。TGFβ 刺激 2 日後に ADRP を除くすべての遺伝子の発現抑制が観察された。TGFβ 刺激 8 日後には無刺激と比較して S3-12、ADRP、TIP47、ATGL、HSL の発現が上昇する傾向が認められたが、C/EBPα、PPARγ、perilipin の発現は低下したままであった。

HW11 を分化誘導後 PPARγ アンタゴニストである GW9662 処理を行い、同様に遺伝子発現変化を検討したところ、GW9662 処理 2 日後はペリリピン 1 遺伝子発現に変化はなかったが、4 日後に発現の低下が見られた。また、このペリリピン 1 の発現変化は PPARγ の発現変化と同様であった。

次に、脂肪滴の形成と維持に重要なタンパク質であり、TGFβ により劇的に発現が低下したペリリピンに注目し、TGFβ による発現制御機構について詳細に検討した。

(3) TGFβ による脂肪滴局在タンパク質ペリリピン 1 の発現制御

TGFβ 刺激によりペリリピン 1 遺伝子の発現が低下したことから、ペリリピン 1 プロモーターに対する TGFβ の影響について検討した。ペリリピン 1 は PPARγ によりその発現が制御されていることが知られている。まず、PPARγ の転写活性化能に対する TGFβ の影響を検討したところ、HW11 において TGFβ は PPARγ の活性に影響を与えなかった。ペリ

リピン 1 プロモーターに対する TGFβ の影響についてレポーターアッセイを行ったが、今回使用したプロモーター領域において、TGFβ はプロモーター活性に影響を与えなかったことから、今後さらなる検討が必要だと考えられる。

ペリリピン 1 のタンパク質発現について検討した。HW11 を分化誘導後 7 日目に低濃度の TGFβ 刺激 (1.5 ng/ml) を行ったところ、TGFβ 刺激 4 日後からペリリピン 1 タンパク質の発現低下が認められた。高濃度の TGFβ 刺激 (15 ng/ml) を行った場合、TGFβ 刺激 2 日後からペリリピン 1 タンパク質発現の低下が認められ、TGFβ 刺激 8 日後にその発現は完全に消失した。次に TGFβ によるペリリピン 1 タンパク質の安定性についてプロテアソーム阻害剤である MG132 を用いて検討を行ったが、TGFβ はペリリピン 1 タンパク質の不安定化を誘導しなかった。

(4) Smad3 欠損マウス MEF を用いた脂肪細胞への分化誘導における遺伝子発現変化

細胞外に分泌された TGFβ は細胞膜の受容体に結合した後、細胞内シグナル伝達分子である Smad2 あるいは Smad3 をリン酸化し、様々な遺伝子発現の制御を行う。また一方で、Smad を介さず生理作用を発揮する経路があることが知られている。TGFβ による PPARγ 発現抑制における Smad3 の関与について、Smad3 欠損マウス MEF を用いて検討した。野生型 MEF を TGFβ 存在下で脂肪細胞へ分化させると、PPARγ 遺伝子の発現は完全に抑制された。一方、Smad3 欠損マウス MEF では TGFβ により PPARγ 発現は部分的に抑制された。このことから、TGFβ による PPARγ 発現の抑制には Smad3 を介する経路と介さない経路が関与することが示唆された。

以上の結果から TGFβ は成熟白色脂肪細胞に対して分化マーカー遺伝子 PPARγ の発現を抑制し、脂肪滴に形成、維持に関与する脂肪滴局在タンパク質、ペリリピン 1 の発現を減少させることで、大型脂肪滴を減少させるというメカニズムが存在する可能性が示唆された。また、この TGFβ による PPARγ 発現の抑制は Smad3 を介する経路と介さない経路が関与することが明らかになった。

白色脂肪組織は脂肪貯蔵組織であると同時に、内分泌組織でもあることが近年の研究により明らかになってきた。肥大化した脂肪細胞からはレジスチンや TNFα、遊離脂肪酸が分泌されインスリン抵抗性や高血圧を引き起こす。一方、小型脂肪細胞からは、アディポネクチン等の抗動脈硬化作用を持つ物質が分泌される。TGFβ は成熟脂肪細胞において大型脂肪滴を減少させることから、脂肪細胞の小型化を誘導できると考えられる。本研究に

より、TGFβによるPPARγ発現抑制を介したペリリピン1発現の低下が大型脂肪滴の減少を引き起こす可能性が示唆された。TGFβは全身に作用するが、今後さらに分子機構を解明することで、大型脂肪滴の形成を阻害し脂肪細胞の肥大化を抑制する治療標的分子の決定が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Xu J, Itoh Y, Hayashi H, Takii T, Miyazawa K, Onozaki K.

Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1α or tumor necrosis factor α-induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor-κB activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line.

Biol. Pharm. Bull.,34, (2011) 1724-1730, 査読有

[学会発表] (計3件)

① 楽 怡、伊藤友香、井上靖道、小野寄菊夫、斉藤昌之、林 秀敏

TGFβによるペリリピン1遺伝子発現抑制と脂肪滴形成の制御。日本薬学会第132年会、2012年3月29日(札幌)；29E13-pm15

② 楽 怡、岡山敦子、野口祐美子、井上靖道、伊藤友香、小野寄菊夫、斉藤昌之、林 秀敏
TGFβによる白色脂肪細胞における脂肪滴蓄積の制御。第84回日本生化学会大会、2011年9月24日(京都)；4P-0580

③ Yi Yue, Mayumi Inoue, Yumiko Noguchi, Yuka Itoh, Satoshi Sakai, Kikuo Onozaki, Masahiko Saito and Hidetoshi Hayashi
TGF-β inhibits differentiation and accumulation of lipid droplets in white and brown adipocytes. KEYSTONE SYMPOSIA、2011年1月14日(アメリカ合衆国)；217

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 友香 (Yuka Itoh)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：40454326

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：