

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659113

研究課題名(和文) ブラウンアディポカインによるエネルギー代謝調節

研究課題名(英文) The regulation of energy metabolism by brown-adipokine

研究代表者

檜井 栄一 (Hinoi, Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Growth differentiate factor 5 (GDF5)は骨格形成に関与する因子として知られているが、エネルギー代謝調節への関与に関しては全く報告がない。脂肪細胞特異的GDF5発現マウスを作製し、その表現型を解析した。同マウスはエネルギー代謝が亢進しており、高脂肪食性の肥満に対して抵抗性を示した。一方、ドミナントネガティブGDF5を発現するマウスでは、高脂肪食条件下でのエネルギー代謝維持が消失していた。以上の結果から、in vivoにおいて脂肪組織由来のGDF5が全身エネルギー代謝調節に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although the growth differentiate factor 5 (GDF5) has been implicated in skeletal development in mammal, little attention has been paid to the functionality in adipogenesis and energy homeostasis. Here, we show a critical role of the GDF5 in regulating both brown adipogenesis and whole-body energy expenditure. Transgenic mice overexpressing GDF5 in adipose tissues not only showed a lean phenotype but protection against high fat diet-induced obesity due to increased energy expenditure. On the contrary, mutant mice harboring dominant-negative form of GDF5 have impaired energy expenditure and thermogenesis on obesogenic condition. GDF5 activated brown adipogenesis through bone morphological protein receptor (BMP R) pathway. Taken together, these findings demonstrate that GDF5/BMP R pathway regulates brown adipogenesis and energy homeostasis and suggest that modulation of this pathway might be a plausible strategy for obesity and metabolic dysfunctions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：brown adipocyte obesity energy expenditure

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は、遺伝的および環境的要因によるカロリーの過剰な摂取の結果、脂肪の蓄積が増加した状態である。現在、日本では成人男性の約 30%、また成人女性の 20%が肥満者と判断されている。肥満に起因あるいは関連して、糖尿病、高脂血症、高血圧、冠動脈疾患あるいは脳梗塞など多くの疾患が発症する。抗肥満治療薬として、中枢性摂食制御薬の開発が行われているが、抗体産生などの問題により、その開発は難航している。また、末梢性抗肥満薬として、アドレナリン受容体作用薬などの応用が試みられてきたが、現在までにヒトで成功しておらず、現時点で「褐色脂肪細胞活性化による抗肥満治療」のゴールドスタンダードは確立されていない。このような事実を勘案すると、全く新しい観点からの肥満に対する効果的な治療法の確立および治療薬の開発は差し迫った社会的緊急課題である。

## 2. 研究の目的

白色脂肪組織は脂肪を貯め込む貯蔵庫であるのに対して、褐色脂肪組織は脂肪を分解してエネルギー産生を行う器官である。白色脂肪細胞については、従来からヒトにおける生理学的及び病態生理学的重要性が示されてきた。ヒトにおいて褐色脂肪組織は成長に伴い徐々に消失し、成人ではその機能はほとんどないと思われていた。しかしながら近年、複数のグループから、成人における褐色脂肪組織の存在とエネルギー代謝におけるその機能的役割が報告されており、抗肥満に対する標的として再び注目を浴びている。そこで我々は、これまでの網羅的分泌因子の探索と細胞の新規機能解明を行った経験を基盤として、褐色脂肪細胞の機能調節を行う因子の探索や同細胞から分泌される因子の探索を行い、同細胞の新規機能を明らかとすることを試みた。そして、二型糖尿病モデルマウス (*ob/ob* マウスや高脂肪食負荷マウス) の褐色脂肪組織においてのみ発現変動の認められる分泌型因子 (ブラウンアディポカイン) をいくつか同定した。本研究では、TGF $\beta$  スーパーファミリーのひとつである Growth Differentiation Factor 5 (GDF5) に着目し、各種遺伝子改変マウスを用いて GDF5 によるエネルギー代謝調節機構を個体レベルで明らかとし、その成果を褐色脂肪細胞を標的とした、ヒトにおける肥満に対する新規治療法や治療薬開発を指向するための研究基盤とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、GDF5 の機能が失われているマウス「Dominant negative(DN)型 GDF5 遺伝子改

変マウス」と、脂肪細胞で GDF5 が過剰発現しているマウス「Fabp4-GDF5 マウス」の 2 種類の遺伝子改変マウスを用いて表現型解析を行った。

(1) DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスの表現系解析：DN 型 GDF5 マウスと野生型マウスについて、経時的に体重、血糖値、体温測定を行った。また、一定期間飼育後の同マウスについて、グルコース耐性テスト(GTT)やインスリン感受性テスト(ITT)を行い、耐糖能およびインスリン抵抗性を野生型マウスと比較した。また、経時的に O<sub>2</sub> 消費量、CO<sub>2</sub> 産生量・呼吸商(VC<sub>O2</sub>/VO<sub>2</sub>)および消費カロリーを測定した。摂食量について測定を行った。また、同マウスに高脂肪食を負荷し、上述の各種代謝評価測定を行った。

(2) Fabp4-GDF5 マウスの作製とその表現系解析：Fabp4 プロモーター(5.4 kb)を用いて脂肪細胞特異的に GDF5 を過剰発現するマウスを作成した。そして「研究の方法(1)」で示した、DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスを用いて測定した種々の項目について解析した。同マウスについても高脂肪食を負荷し、各種代謝評価測定を行った。

(3) DN 型 GDF5 マウス、Fabp4-GDF5 マウスと野生型マウスから白色脂肪組織(内臓脂肪と皮下脂肪)と褐色脂肪組織を摘出し、Hematoxylin and Eosin 染色や uncoupling protein 1 (UCP1)抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的に比較検討した。

(4) DN 型 GDF5 マウス、Fabp4-GDF5 マウスと野生型マウスから白色脂肪組織(内臓脂肪と皮下脂肪)と褐色脂肪組織を摘出し、RNA 抽出後、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子(UCP1 と peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) など)について real-time PCR 法により比較検討した。

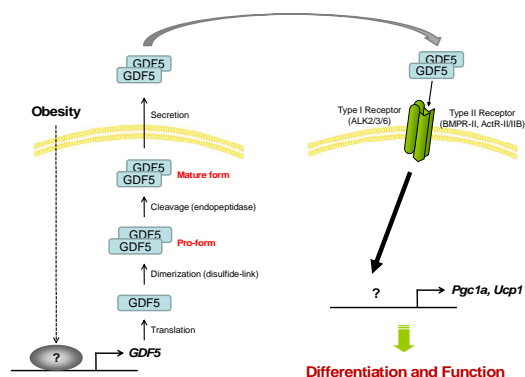
## 4. 研究成果

(1) GDF5 の機能を欠損した DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスを用いて、通常食負荷および高脂肪食負荷における表現型解析を行った。まず DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスについて、リアルタイム呼吸代謝計測システムを用いて酸素消費量を測定した。通常食負荷条件下における酸素消費量は、DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスと野生型マウスとで有意な差は認められなかった。一方、高脂肪食負荷条件下において、DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスの酸素消費量は、野生型マウスと比較して有意に低下した。さらに DN 型 GDF5 遺伝子改変マウスの脂肪組織における遺伝子発現を real-time PCR 法により検討したところ、PGC-1 $\alpha$  や UCP1

などの褐色脂肪細胞マーカー遺伝子の発現は、野生型と比較して有意に減少した。

(2) aP2 プロモーターを用いて脂肪細胞特異的 GDF5 過剰発現マウスの作製を行った。同マウスの脂肪細胞において、GDF5 が発現していることをウエスタンブロット法により確認した。したがって、次にこの脂肪細胞特異的 GDF5 過剰発現マウスを用いて、各種表現型解析を行った。まず、GDF5 過剰発現マウスを通常食下で飼育した場合、野生型マウスと比較して体重の減少および内臓脂肪蓄積量の減少が認められた。さらに、グルコース負荷試験により耐糖能の測定を行ったところ、GDF5 過剰発現マウスは野生型マウスと比較して、有意な耐糖能の改善が認められた。また、酸素消費量についても測定した。その結果、同マウスの酸素消費量は野生型マウスと比較して、著明に増加していることが明らかとなった。一方、高脂肪食下で飼育した場合においても、野生型マウスと比較して、体重増加および内臓脂肪蓄積増加の著明な抑制が認められた。また、同マウスの皮下脂肪組織を組織学的に観察したところ、UCP1 陽性を示す細胞が多数認められた。

(3) 以上の解析結果を考え合わせると、図に示すように、脂肪組織における GDF5 はオートクライン・パラクライン因子として、褐色



図：肥満により褐色脂肪細胞において GDF5 の発現が誘導される。その GDF5 がオートクライン・パラクライン因子として、褐色細胞自身や白色脂肪細胞に働く。そして、各細胞を活性化させることにより、全身エネルギー代謝を亢進させる。最終的に、高脂肪食負荷によって誘導される肥満に対して抵抗性を示す。

細胞の活性化および皮下脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を誘導し、全身エネルギー代謝を調節していることが明らかとなった。したがって、脂肪組織の GDF5 シグナル経路が、効果的な抗肥満治療薬の標的となる可能性が示唆される。

## 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3件)

Hinoi, E., Nakamura, Y., Takada, S., Fujita, H., Iezaki, T., Hashizume, S., Takahashi, S., Odaka, Y., Watanabe, T. and Yoneda Y. Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure. *Diabetes* 63:162-75, 2014. (査読有) doi: 10.2337/db13-0808.

Nakamura, Y\*., Hinoi, E\*., Iezaki, T., Takada, S., Hashizume, S., Takahata, Y., Tsuruta, E., Takahashi, S. and Yoneda, Y. Repression of adipogenesis through promotion of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by TIS7 up-regulated in adipocytes under hypoxia. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* 1832:1117-28, 2013 \*Equally contributed. (査読有)

doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.010.

Hinoi, E., Nakatani, E., Yamamoto, T., Iezaki, T., Takahata, Y., Fujita, H., Ishiura, R., Takamori, M. and Yoneda, Y. The transcription factor paired box-5 promotes osteoblastogenesis through direct induction of Osterix and Osteocalcin. *J. Bone Miner. Res.* 27:2526-34, 2012. (査読有)

doi: 10.1002/jbmr.1708.

〔学会発表〕(計1件)

檜井栄一、骨組織による糖代謝調節機構、第1回糖尿病と新しい合併症を考える会～糖尿病と骨～、2012年9月7日、京成ホテルミラマーレ(千葉県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜井 栄一 (HINOI Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

櫻井 武 (SAKURAI Takeshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60251055