

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790940

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞を標的とした新しい肥満および糖尿病治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of new targets for metabolic syndrome via brown adipocytes

研究代表者

岡村 将史 (Okamura, Masashi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60547397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、褐色脂肪細胞分化の培養細胞モデルを独自に入手し、これら分化過程をマイクロアレイにて詳細に解析することで新しい褐色脂肪特異的分化制御因子Aの抽出および同定に成功した。我々は、既にT37i成熟褐色脂肪細胞および3T3-L1成熟脂肪細胞にグルカゴンシグナル経路を模倣すると考えられているcAMPを用いて、cAMP添加、非添加を行い脂肪細胞活性化状態と非活性化状態を作成した。この状態の培養上清をそれぞれ回収し質量分析機を用いて網羅的に分泌タンパクの解析同定を行った。その結果、脂肪細胞活性化状態で強く分泌が促進される分泌蛋白Cyclophilin Aを同定した。

研究成果の概要(英文)：Fortunately, we could get two brown adipogenic cell lines and identify new pro-brown adipogenic gene A by microarray and knockdown analysis during brown adipocyte differentiation. To address the new secretory proteins in mature adipocytes, we performed secretory protein profiling in mature brown and white adipocytes in the presence or absence of cAMP, glucagon signaling mimetics. This protein profiling analysis showed that cyclophilin A were secreted from both brown and white adipocytes in response to glucagon mimetic signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：褐色脂肪細胞 分化制御因子 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪細胞は、主に過剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積することが知られていたが、近年ではレプチン、アディポネクチンなどの生理活性物質を分泌する内分泌組織としても認識されるようになった。白色脂肪細胞については、3T3-L1 細胞などの白色脂肪細胞分化の代表的な培養細胞モデルが 30 年以上前に確立され精力的な研究が行われ、受容体型転写因子 (核内受容体) peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) γ が白色脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであること、チアゾリジン誘導体が PPAR γ のアゴニストであることが明らかとなり、インスリン抵抗性改善薬の開発に繋がった。そのため、白色脂肪細胞分化の培養細胞モデルを用いた多くの研究が行われ、多くの転写因子およびシグナル経路など新しい治療標的分子が次々と明らかになった。

研究代表者は、東京大学先端科学技術研究センター (酒井寿郎教授) の特任研究員として、次世代高速シーケンサー (ChIP シーケンス法)、マイクロアレイ、レトロウイルスを用いた強制発現系、オリゴ siRNA を用いた RNA 干渉法、培養細胞モデルおよび肥満モデル動物を用いた実験系を融合させることで白色脂肪細胞分化を精力的に解析し、PPAR γ / RXR α 複合体が脂肪細胞分化促進と抑制に機能する 2 種類のヒストンメチル化酵素 (Setd8 および setdb1) を正および負に発現調節し、これまで知られていたジェネティックな制御に加えて、**クロマチン構造を変化させるエピジェネティックな制御**を行っていることを発見した。また、脂肪細胞の分化抑制に機能する分泌蛋白 Wnt が、核内受容体 COUP-TFII を介し、エピジェネティックな制御を行うこと、H3K9 の脱メチル化異常が肥満症を引き起こすことなどを発見し、

これらがヒストン修飾を変化させることで遺伝子配列を変化させることなく遺伝子の発現を制御する一連のエピゲノミクス機構を明らかにした (Organogenesis. 6:24-32. 2010, Genes Cells. 14:991-1001. 2009, Mol Cell Biol. 29:3544-3555. 2009, Proc Natl Acad Sci U S A. 106:5819-5824. 2009.)。

一方、褐色脂肪細胞は、ヒトにおける存在すら明らかでなく、さらには、褐色脂肪細胞分化の培養細胞が入手困難のため、これまでほとんど研究されてこなかった。しかしながら、近年ヒトを対象とした FDG-PET を用いた褐色脂肪組織に関する大規模な臨床研究が行われ、ヒトにおいても全身の代謝状態を十分に変化させるだけの褐色脂肪組織が存在していることが報告された (N Engl J Med. 2009.)。以上から、褐色脂肪細胞の機能または数を制御することは、肥満症の治療につながることを予想され、肥満症あるいは糖尿病の治療標的として褐色脂肪細胞が世界的に着目されるに至った。

これまで白色脂肪細胞の分化ならびに内分泌組織としての機能においては、核内受容体を含む多くの転写因子およびシグナル経路、ならびにレプチン、アディポネクチンなどが重要であることが明らかとなっていた。しかしながら、褐色脂肪細胞の分化制御因子ならびに内分泌組織としての機能はこれまで世界で報告がほとんどなされていない。

さらに近年、肥満症を主体としたメタボリックシンドロームならびに後継する動脈硬化性疾患が世界的に急増しているが、チアゾリジン誘導体以外に脂肪細胞を標的とした新しい治療薬は開発されておらず、褐色脂肪細胞を標的とした新しい治療薬の開発が待ち望まれている。

2. 研究の目的

以上から本研究においては、褐色脂肪細胞の分化および活性化制御の解析を行うことを目的とする。白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞の分化ならびに活性化過程をマイクロアレイおよび MS/MS を用いて比較解析し、褐色脂肪細胞の特性を明らかにし、褐色脂肪細胞特異的な分泌蛋白および転写因子のなかで褐色脂肪細胞分化を制御する因子を同定し、肥満症あるいは糖尿病の新規治療標的因子の同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

フランス・ビシャ病院の Marc Lombès 博士およびハーバード大学の梶村真吾博士との共同研究で褐色脂肪細胞分化のモデル細胞である T37i 細胞および iBAT を入手し、ほぼ 100% の分化が得られ、かつ成熟褐色脂肪細胞に特異的に発現している UCP1 遺伝子の顕著な発現誘導を RNA レベルで確認した。

(平成 24 年度)

褐色脂肪細胞分化の代表的なモデル細胞である T37i および iBAT ならびに 3T3-L1 細胞を培養し、分化刺激後 8 日目から Total RNA を回収し、全転写産物をほぼカバーしていると考えられる Affymetrix 社の M430A2 マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行い、統計学的に成熟褐色脂肪細胞特異的な転写因子群の抽出を研究協力者・東京大学代謝医学分野・酒井寿郎教授との共同研究で行う。また、T37i および iBAT 成熟褐色脂肪細胞ならびに 3T3-L1 成熟白色脂肪細胞に褐色脂肪細胞の活性化剤である dibutyryl cAMP を 0.5 mM あるいは Forskolin を 10 μ M の濃度で 4 時間培養し、その培養上清を回収する。その後、回

収した培養上清を用いて、研究協力者・東北大学・分子構造解析医工学研究分野・村山和隆准教授との共同研究で MS/MS を用いて解析する。

(平成 25 年度)

抽出した転写因子群および分泌蛋白群に関しては、レトロウイルスを用いた強制発現系、オリゴ siRNA による RNA 干渉法を用いたノックダウンシステムを用いて脂肪滴蓄積に与える影響をオイルレッド O 染色を用いて解析する。

脂肪滴蓄積に影響のあった因子に関して転写因子群および分泌蛋白群に関しては、コントロール褐色脂肪細胞および各因子の強制発現褐色脂肪細胞とを、褐色脂肪細胞分化のマーカー遺伝子 (PRDM16) を定量 PCR およびイムノブロット等で比較解析を行うことでその作用点を明らかにする。各因子の作用点が明らかとなれば、そのプロモーターに各因子が与える影響を、レポーターアッセイを用いて解析する。

4. 研究成果

脂肪細胞活性化状態で強く分泌が促進される分泌蛋白 Cyclophilin A を同定した。さらに、ヒト前駆脂肪細胞分化システムの立ち上げにも成功しており、よりヒト生体内に近い状態で、Cyclophilin A 分泌制御機構の解明を進める体制も確立した。平行して東北大学病院・腎・高血圧・内分泌科の外来患者から、動脈硬化進展予測因子となり得る生理活性物質の測定に関して、東北大学医学部倫理委員会での審査および認可を得た。その後、外来患者約 360 名から同意を得た後、血液および尿サンプルの回収を開始した。Cyclophilin A ならびに、すでに心血管系疾患の一つである糖尿病合併症の進展予測因子と知られている angiotensinogen な

どの測定に関しても ELISA 実験系の立ち上げにも成功している。動脈硬化進展予測に関して、コントロールとなる頸動脈エコーによる Max IMT の測定および PWV の測定も終了している。

褐色脂肪細胞分化の培養細胞モデル (T37i 細胞および immortalized BAT (iBAT)) を独自に入手し、これら分化過程をマイクロアレイにて詳細に解析することで新しい褐色脂肪特異的分化制御因子 A の抽出に成功した。遺伝子 A は、8 つの遺伝子がファミリーを形成しており、ホメオドメインをもつ転写因子であった。しかしながら、褐色脂肪細胞分化における機能は不明であった。この遺伝子を、2 つ以上の特異的な siRNA を用いて容量依存性にノックダウンすると、容量依存性に顕著に褐色脂肪細胞の分化を抑制することも見出していた。また、マウスの各種脂肪組織において免疫染色を行うと褐色脂肪組織特異的に染色されることも見出した。

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)

1. Identification of the Stages of Diabetic Nephropathy at Which Angiotensin II Receptor Blockers Most Effectively Suppress Albuminuria.
Ogawa S, Matsushima M, Mori T, Okamura M, Senda M, Sakamoto T, Nako K, Ito S.
Am J Hypertens. 2013, 9:1064-9. 査読有.
2. A Decline in Glomerular Filtration Rate Rather than Renal Arterial Stenotic Lesions, per se, Predicts Cardiovascular-Renal Events in Type 2 Diabetic Patients.

Ogawa S, Nako K, Okamura M, Senda M, Sakamoto T, Abe T, Ito S.

Circ J. 2013, 11:2816-22. 査読有.

3. Eicosapentaenoic acid improves glycemic control in elderly bedridden patients with type 2 diabetes.

Ogawa S, Abe T, Nako K, Okamura M, Senda M, Sakamoto T, Ito S; DIMS Study Group.

Tohoku J Exp Med. 2013;1:63-74. 査読有.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 糖尿病患者の血中 Cyclophilin A の新規バイオマーカーとしての有用性について
坂本拓矢、小川晋、奈古一宏、岡村将史、千田美穂、伊藤貞嘉
第 86 回日本内分泌学会総会。H25 年 4 月 27 日、仙台。
2. 糖尿病腎症における血中 Cyclophilin A の新規バイオマーカーとしての有用性について
坂本拓矢、小川晋、奈古一宏、岡村将史、千田美穂、伊藤貞嘉
第 56 回日本糖尿病学会総会。H25 年 4 月 27 日、仙台。
3. IDENTIFICATION OF NEW GENES RESPONSIBLE FOR BROWN ADIPOCYTE DIFFERENTIATION
Masashi Okamura, Takuya Sakamoto, Miho Senda, Kazuhiro Nako, Susumu Ogawa, Hideyasu Kiyomoto, Sadayoshi Ito
international symposium anatomical science for advance in health and clinical therapy. H25.8.27. Japan, Sendai.
4. 新規褐色脂肪細胞分化因子の同定
岡村将史、坂本拓矢、小川晋、伊藤貞嘉
第 27 回日本内分泌学会東北地方会。H25 年 10 月 19 日、盛岡。
5. 糖尿病患者における CKD 重症度別血中 Cyclophilin A 濃度の比較検討
坂本拓矢、小川晋、奈古一宏、岡村将史、千田美穂、伊藤貞嘉
第 51 回糖尿病学会東北地方会。H25 年 11 月 9 日、仙台。

〔その他〕
ホームページ等
http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/career_d mo.html

6．研究組織

(1)研究代表者

岡村 将史 (Okamura, Masashi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60547397