

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461336

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞と炎症細胞のNotchシグナル制御による肥満治療、幹細胞治療の開発

研究課題名(英文) Regulation of Notch signal pathway in adipogenesis

研究代表者

竹下 享典 (Takeshita, Kyosuke)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70444403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：発生の臓器形成における多面的作用で知られるNotchシグナルであるが、生活習慣病における役割は不明であった。そこでNotch1ヘテロ欠損マウス(N1)を通常食、高脂肪食のもと飼育したところ体重、脂肪沈着に変化を認めた。N1の白色脂肪において増殖因子および脂肪の分化における転写因子の発現に変化が見られた。3T3-L1細胞にNotchシグナル阻害薬およびNotch1siRNAでノックダウンしたところ脂肪分化効率に変化が生じた。N1の脂肪幹細胞を単離して分化誘導をかけたところ同様の傾向を認めた(以上投稿準備中)。以上よりNotch1シグナルの減少は脂肪分化に影響を与えられられる。

研究成果の概要(英文)：Among four homologous Notch receptors, Notch1 plays critical roles in organogenesis but its role in adipogenesis is unknown. Body weight gain and adipose deposition were altered in Notch1 heterozygous deficient mice (N1+/-) compared to wild-type mice (WT) with the same intake. The inguinal white adipose tissue (WAT) from N1+/- showed changes in expression levels of growth factors and transcription factors which are involved in adipogenesis. Pharmacological Notch signal inhibition with LY411,575 and siRNA-mediated Notch1 knockdown altered adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes (on submission). Taken together, Notch1 would be involved in adipogenesis to regulate diet-induced obesity.

研究分野：代謝学

キーワード：Notchシグナル 脂肪組織 分化増殖

1. 研究開始当初の背景

肥満は耐糖能異常、軽症高血圧、高脂血症を合併するメタボリックシンドロームの根幹をなす病態である。その病態は脂肪細胞の増加とサイズの増大による脂肪組織の増大、さらに肥大した脂肪細胞の融解に伴う、遊離脂肪酸による Toll-like 受容体の活性化に端を発する、慢性炎症の増悪に分けられる。我々は、これまでストレスと加齢が惹起する脂肪組織の慢性炎症の病態と、それに続発する plasminogen activator inhibitor-1 の過剰産生による向血栓傾向について報告してきた (Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, Cardiovasc Res. 2005, Thromb Res. 2009, Int J Hematol. 2009, Diabetes 2012)。

Notch シグナルの細胞分化制御と増殖に関する多面的作用は心血管病のさまざまな病態に関与している

Notch 受容体は線虫からヒトに至るまで種を超えて保存された 1 回膜貫通型受容体である。Notch シグナルの生理的作用は発生期において、細胞間相互作用を介して、細胞運命の決定を行い、殊に神経、体節形成に必須である。最近では幹細胞、がん細胞における Notch シグナルの検討が進められている。申請者は心血管系における作用に目を向け、血管内皮細胞の Notch1 受容体が、血管リモデリング、細胞生存を制御し、発生期の血管新生に必須であることを初めて示した (Circulation 2005)。さらに発生期のみならず成体の心血管病変における Notch シグナルの重要性に着目して研究を進めてきた。成体の虚血病変における血管新生においても、VEGF シグナルとの crosstalk を介した血管内皮 Notch1 受容体の活性化が重要であることを示した (Circ Res 2007)。虚血病変における血管新生の促進には高脂血症治療薬スタチンが有効であるが、この機序にも血管の Notch シグナルの活性化が重要であることを示した (Lab Invest. 2011)。Notch シグナルは動脈硬化病変においても重要な役割を果たしており、血管平滑筋 Notch1 受容体が動脈硬化初期病変に相当する新生内膜増殖に関与することを示した (Circulation 2009)。そして動脈

硬化動物モデルである Apolipoprotein E 欠損マウスに Notch シグナルの阻害作用のある gamma-secretase 阻害薬を投与したところ、炎症細胞の Notch シグナル活性が抑制された結果、炎症反応の低下、動脈硬化巣の進展も抑制された (Biochem Biophys Res Commun. 2009)。また、同モデルマウスについて Notch シグナルの活性低下は血管内皮前駆細胞の分化を促進し、障害血管の再内皮化を促進することも示し、血管内皮前駆細胞の維持にも重要であることを示した (Circulation 2010)。

「Notch シグナルの多面的作用は肥満の病態に関与するのか？」

このように Notch シグナルは炎症細胞、血管細胞などの多様な細胞において幹細胞維持、増殖、活性化と多面的な生理作用があるため、肥満の病態にも大きく関与しており、また薬剤によりこれを制御する事ができると考える。脂肪幹細胞の分化、増殖、脂肪細胞の肥大、そして組織の慢性炎症という、これまで示された肥満の病態のすべては、Notch シグナルの生理活性とそれぞれ一致する。我々は、Notch シグナルの細胞分化制御、増殖、活性化への多面的作用が脂肪組織に大きな役割を果たすと仮定した。

2. 研究の目的

- (1) 生体内の脂肪細胞の増殖・肥大、脂肪組織炎症における Notch 受容体の役割を明らかにする。
- (2) 脂肪幹細胞の増殖、分化誘導における Notch シグナルの役割を明らかにする。

「脂肪増殖・肥大、脂肪組織炎症における Notch 受容体の役割の解明」

脂肪細胞は多くのシグナル伝達を介して分化・成熟あるいは増殖状態へと移行する。然るに多くの臓器の発生、分化に重要な役割を果たす Notch シグナルの脂肪の分化における役割について、in vivo における検討はない上、in vitro についての検討でも議論が分かれるところであった。

我々の Notch 受容体遺伝子改変マウスの実験モデルを用いた豊富な観察と経験から、Notch1 ヘテロ欠損マウスが食餌量の変化がないにもかかわらず、体重に違いがあること、Notch シグナルの抑制が炎症を抑制すること (Biochem Biophys Res Commun. 2009) がわかっている。

これらの結果を踏まえて次の事が予想された。炎症細胞の Notch シグナル活性化は脂肪組織の慢性炎症を促進させ、インスリン感受性と脂肪細胞の肥大に影響を与える。脂肪細胞の Notch シグナルは脂肪幹細胞の維持・分化を制御して結果、体重増加に影響する。

「脂肪幹細胞の増殖、分化誘導における Notch シグナルの役割の解明」

本研究の目的は、Notch シグナルの肥満の病態における役割、特に脂肪組織の慢性炎症、脂肪幹細胞の増殖、分化における役割を解明することである。

3 . 研究の方法

Notch 受容体ミュータントマウスの肥満モデルの作製と解析

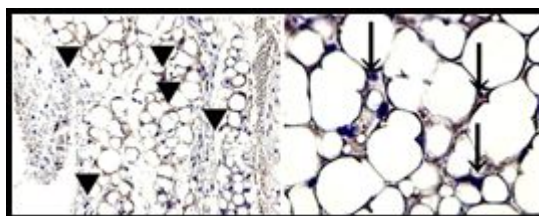
対照の野生種マウスに 4 週齢より高脂肪食を負荷し、体重計測を行った。負荷 8 週後、12 週後を観察ポイントとして、脂肪組織の炎症細胞浸潤、脂肪細胞の形態、Notch シグナル関連分子の発現を検討した。この結果に応じて、対照マウスおよび Notch1 受容体遺伝子欠損マウスにおける内臓脂肪細胞の増殖について評価することとした。

野生種マウス、Notch 1 ヘテロ欠損マウスについて生後 4 週齢より通常食餌および高脂肪食負荷を行い、食餌量、体重の変化について計測した。通常食餌より負荷後、8 週と 12 週後に OGTT、ITT をおこなってインスリン感受性、耐糖能、血清コレステロール、中性脂肪など生化学的パラメータの測定をおこなった。脂肪、肝臓、骨格筋における、Notch 受容体 (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) そのリガンド (Jagged-1, DLL-4) の発現の変化と、その下流の転写因子 (Hes-1, HESR-1, HESR-2) の発現を RT-PCR 法、免疫組織染色で検討した。

それぞれのマウスより摘出した白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞は重量、細胞径を計測した。脂肪組織、肝臓、骨格筋より RNA を抽出しエネルギー代謝、脂肪の分化に関する転写因子と分化マーカー (PREF-1, SOX9, PPAR-alpha, PPAR-gamma, aP2, C/EBP-alpha など) の発現について RT-PCR 法、一部は Western blot 法で定量する。増殖にかかわる転写因子とマーカー (CyclinD, Ki67, PCNA) の発現、BrdU 取り込みについても検討した。脂肪組織の慢性炎症の評価は、単球などの炎症細胞浸潤を CD11b 染色、単球マーカーの発現 (CD68, F4/80)、adipokine の発現 (TNF-alpha, IL-6, MCP-1, adiponectin) の比較で行った。

4 . 研究成果

対照マウスに 4 週齢より高脂肪食を付加したところ 8 週から 12 週にかけて急激に体重が増加した。そこで高脂肪食を付加して 8 週後に対照マウスの内臓脂肪において Notch シグナル関連因子の発現を検討した。Notch1 と下流の転写因子 Hes-1 の発現増加を認め、Notch2, 3, 4 の発現に大きな変化を認めなかった。肥満個体の脂肪組織では、活性化 Notch1 の発現が大型脂肪細胞と炎症細胞で増加していた。



上図 : cleaved Notch1 (活性化した Notch1 受容体) 染色 ; 炎症細胞と大型脂肪細胞で Notch1 受容体が活性化している (左図矢頭 : 大型化した脂肪細胞 ; 右図矢印 : 炎症細胞 unpublished data)

このため対照マウスおよび Notch1 受容体遺伝子欠損マウスにおける内臓脂肪沈着の変化について観察した。4 週齢より高脂肪食を負荷し、体重計測を行ったところ、8 週間以降で急激な変化を認め、対照マウスと Notch1 受容体遺伝子欠損マウスの間に有意差が生じた。高脂肪食負荷後 12 週間で内臓脂肪沈

着を MRI で検討したところ体重増加を裏付ける結果であった。生化学検査については、脂質代謝プロファイル、肝臓逸脱酵素に両群間に差は認められなかった。両群の白色脂肪において、脂肪細胞系、adipogenic cell(CD34+)、Crown like structure の発現に両群に有意差を認めた。Notch1 ヘテロ欠損マウスにおいて Notch1 の発現は高脂肪食の後でも発現は対照マウスの 40-50% であり、その下流の Notch シグナル関連分子 (Hes-1 など) もこれに従って減少していた。一方、脂肪分化マーカー (PREF-1, SOX9, PPAR-alpha, PPAR-gamma, aP2, C/EBP-alpha) の発現にも変化を生じていた。Notch1 シグナルは脂肪の分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

両群間で OGTT について有意差は認められなかった。ITT については有意さを認めた。これは脂肪沈着の差がインスリン感受性に影響していると考えられた。

対照マウスと Notch1 受容体遺伝子欠損マウスの間に高脂肪食負荷 8 週後、12 週後を観察ポイントにおいて、脂肪組織の炎症細胞浸潤に差があるか比較検討を行った。単球の浸潤を CD11b 染色、単球マーカーの発現 (CD68, F4/80) を検討したが、同等であった。炎症性サイトカインの発現 (TNF-alpha, IL-6, MCP-1, adiponectin) について比較したが発現はやはり同等であった。これについては通常食においても確認したが、やはり同等であった。

(以上投稿準備中)

以上より Notch1 シグナルは脂肪炎症より、脂肪分化に影響を与える可能性があると考えられた。

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 19 件)

1. Hayashi M, Takeshita K(6 名中 2 番目 Corresponding Author), Murohara T (6 名中 6 番目). "Angiotensin receptor blocker improves a stress-induced prothrombotic state in a murine model." *Blood Coagul*

Fibrinolysis. 2016 27(3):358-60. **査読有**

2. Uchida Y, Takeshita K (12 名中 6 番目), Murohara T (12 名中 12 番目). Impact of Admission Anemia on Coronary Microcirculation and Clinical Outcomes in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary. *Int Heart J*. 2015;56(4):381-8. **査読有**

3. Li X, Cheng XW (16 名中 2 番目), Takeshita K (16 名中 13 番目), Murohara T (他 13 名中 16 番目). Cathepsin S activity controls ischemia-induced neovascularization in mice. *Int J Cardiol*. 2015; 183:198-208. **査読有**

4. Takeshita K (3 名中 1 番目 Corresponding Author), Murohara T (3 名中 3 番目). Asymptomatic left atrial thrombus in a dialysis-dependent patient free of thrombogenic abnormalities. *Ther Apher Dial*. 2015; 19(1):93-4. **査読有**

5. Hayashi M, Takeshita K(他 9 名, 2 番目 Corresponding Author). Angiotensin II receptor blocker ameliorates stress-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *PLoS One*. 2014;9(12):e116163. **査読有**

6. Wu H, Cheng XW (9 名中 2 番目), Takeshita K (9 名中 6 番目), Murohara T (9 名中 9 番目). Renin inhibition reduces atherosclerotic plaque neovessel formation and regresses advanced atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):739-47. **査読有**

7. Yamamoto K, Takeshita K (3 名中 2 番目). Plasminogen activator inhibitor-1 in aging. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(6):652-9. **査読有**

8. Yoshikawa D, Takeshita K (11 名中 4 番目) Murohara T (11 名中 11 番目). Plasma indoxyl sulfate and estimated glomerular filtration rate. *Circ J*. 2014;78(10):2477-82. **査読有**

9. Yuasa D, Takeshita K (18 名中 4 番目), Murohara T (18 名中 18 番目). Association of

circulating C1q/TNF-related protein 1 levels with coronary artery disease in men. *PLoS One*. 2014 Jun 19;9(6):e99846. **査読有**

10. Jiang H, Cheng XW (19 名中 2 番目), Takeshita K (19 名中 8 番目), Murohara T (19 名中 19 番目). Cathepsin K-mediated Notch1 activation contributes to neovascularization in response to hypoxia. *Nat Commun*. 2014 Jun 4;5:3838. 査読有

11. Takeshita K(Corresponding Author), Murohara T. Does angiotensin receptor blockade ameliorate the prothrombotic tendency in hypertensive patients with atrial fibrillation? Breaking the vicious cycle. *Hypertens Res*. 2014;37(6):490-1. **査読有**

12. Inaba H, Takeshita K(11 名中 2 番目 Corresponding Author), Murohara T (11 名中 11 番目). Recovery of flow-mediated vasodilatation after repetitive measurements is involved in early vascular impairment: comparison with indices of vascular tone. *PLoS One*. 2014;9(1):e83977. **査読有**

13. Hayashi M, Takeshita K (10 名中 6 番目), Murohara T (10 名中 10 番目). Efficacy and safety of radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation in chronic hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):160-7. **査読有**

14. Hirashiki A, Takeshita K (12 名中 8 番目), Murohara T (12 名中 12 番目). Cardiopulmonary exercise testing to evaluate the exercise capacity of patients with inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: an endothelin receptor antagonist improves the peak PETCO₂. *Life Sci*. 2014;118(2):397-403. **査読有**

15. Nishiwaki S, Takeshita K (19 名中 14 番目). Dexamethasone palmitate ameliorates macrophages-rich graft-versus-host disease by inhibiting

macrophage functions. *PLoS One*. 2014 ;9(5):e96252. 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. Takeshita K, Yisireyili M, Murohara T. Dipeptidyl peptidase-4 Inhibitor Ameliorates Stress-induced Glucose Metabolism Disorder and Prothrombotic State. American Heart Association Scientific Sessions. 2015 November 9 2015, Orlando, Florida United States.

2. Hongxian WU, Xian Wu Cheng, Lina Hu, Chang-Ning Hao, Mutsuharu Hayashi, Takeshita K, Mohammad Shoaib Hamrah, Guo-Ping Shi, Masafumi Kuzuya, and Toyoaki Murohara Renin Inhibition Reduces Atherosclerotic Plaque Neovessel Formation and Regresses Advanced Atherosclerotic Plaques. American Heart Association Scientific Sessions. 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹下 享典 (TAKESHITA, Kyosuke)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70444403

(2)研究分担者

成 憲武 (SEI, Kenbu)
名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授
研究者番号：30378228

(3)連携研究者

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90299503