

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460077

研究課題名(和文) ヒト白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞への誘導(Browning)と脂肪滴変化の機構

研究課題名(英文) Mechanisms of remodeling of white adipocytes to brown-like adipocytes (browning) in human mesenchymal stem cells.

研究代表者

山口 智広(YAMAGUCHI, Tomohiro)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50347530

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)：ヒト由来脂肪細胞の褐色化(Browning)とそのメカニズムの解明を目指し、誘導因子の候補となる種々のシグナル分子について効果を解析した。各種脂肪酸、植物ポリフェノール、FGF21、Irisinなど、誘導因子のスクリーニングを行った。ドコサヘキサエン酸、Quercetin処理により、脂肪滴タンパク質Perilipinの組成に変化が認められ、脂肪蓄積が抑制されたが、BATマーカーUCP1の発現には変化はなかった。一方、細胞のIrisinおよびFGF21処理によりPerilipinの組成が変化し、さらにUCP1の発現上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：Appearance of brown-like adipocytes within white adipose tissue depots (browning) is supposed to be a new target in anti-obesity therapy. The aim of this study was to assess the browning effect of various compounds such as fatty acids, polyphenols, FGF21 and irisin in human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADSC). I found that irisin and FGF21 enhanced expression of BAT marker UCP1 and decreased levels of a lipid droplet-associated protein, perilipin1. In further, FGF21 induced levels of perilipin2, suggesting the remodeling from large lipid droplets to smaller droplets.

研究分野：生物化学

キーワード：脂質代謝 脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は白色(WAT)と褐色脂肪組織(BAT)により構成される。白色脂肪細胞は余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵し、必要時に動員することで、多臓器へエネルギーを供給する器官である。一方、褐色脂肪細胞はエネルギー消費器官として機能し、貯蔵された中性脂肪を基質として熱産生を行い、非ふるえ熱産生に参与する器官である。多量のミトコンドリアの存在により褐色を帯び、そこでBATのマーカーである脱共役タンパクUCP-1が機能している。げっ歯類などの小動物が肩甲骨間に明確なBATを持つのにに対し、ヒトでは胎児・新生児期にのみ存在し成人では失われるとされていたが、近年、ヒト成人にも機能的なBATの存在が確認された。成人ヒトBATは、げっ歯類に見られる“古典的”BATとは異なり、主にWAT内で散在的に分化するUCP-1陽性の誘導型褐色脂肪細胞、いわゆるベージュ(Beige)細胞で構成されていることが示唆された。そこで白色前駆細胞から褐色脂肪(ベージュ)細胞への分化転換(褐色化:Browning)が、エネルギー消費を促進させる新たな肥満治療の戦略として注目されている。

2. 研究の目的

白色脂肪細胞における脂肪滴タンパクの機能については、これまでその多くがマウス細胞株3T3-L1を用いて解析されてきた。申請者もその研究に注力し、脂肪滴における脂質代謝機構について成果を得てきた。しかしながら、WATとBATの関係に新知見が加わった現状で考えると、ヒト脂肪細胞においても3T3-L1細胞と同様の機構が働いているのであろうか、という疑問が残る。

ヒト白色脂肪細胞モデルとしては骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)や、脂肪由来幹細胞(hADSC)が有力である。我々は、hMSCを白色脂肪細胞に分化させ、脂肪滴タンパクの局在を検討したところ、脂肪滴局在タンパク質はマウスとヒトで異なることを見出している。3T3-L1細胞ではカテコールアミン刺激時に急激な脂肪分解(脂肪動員)が起こり、2時間ほどで小型の脂肪滴が多数出現するが、hMSC脂肪細胞においては形態変化の程度は弱く、かつ24-48時間必要であった。興味深いことに、hMSC白色脂肪細胞にカテコールアミン刺激を与えるとBATマーカーのUCP-1の発現が上昇した。この現象は前述した褐色化(Browning)の特徴の1つであり、hMSCが褐色脂肪(ベージュ)細胞に分化転換する可能性がある。この誘導が確認されれば、ヒト褐色化の*in vitro*モデル系として、将来薬剤として期待される誘導因子の探索や、下流で活性化するシグナル伝達経路の同定に有用であると考えられる。また、脂肪由来幹細胞(hADSC)はhMSCと同様の性質を持っており、ヒトWAT内の一定量を占めている。hADSCを褐色脂肪細胞に誘導することができれば、WAT内のエネルギー代謝を亢進させ、抗肥満、インスリン抵抗性改

善などの効果が期待できる。そこで本研究は、hMSC・hADSC由来ヒト脂肪細胞を用いて、褐色脂肪細胞への効果的な誘導因子の探索と、その作用のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) hADSC、hMSC由来白色脂肪の褐色化(Browning)を誘導する因子のスクリーニング

hADSC、hMSCの白色脂肪細胞への分化法は既定の方法で行う。増殖培地でコンフルエントまで培養した後、DEX、IBMX、indomethacin、insulin含有培地(誘導培地)で分化誘導を開始する。3日後、insulin含有培地(維持培地)に交換し1-2日培養する。これを1セットとして3セット培養する間に分化誘導が進行し、50-70%の細胞で分化が確認される。分化後、もしくは分化中に褐色化を誘導すると予想される因子を添加する。げっ歯類で効果が示唆されている以下のシグナル分子について影響を調べる。

- ・受容体作動薬 -- 特に β_3 受容体のアゴニスト(CL316243)の効果が期待される。
- ・FGF21 -- 飢餓シグナルにตอบสนองして肝臓より分泌されるFGFファミリーが褐色化に参与する可能性。
- ・魚油(DHA,EPA) -- UCP-1プロトンコンダクタンスの活性化作用がある。
- ・ナトリウム利尿ペプチド -- WATの褐色化やBATの熱産生誘導の効果が示唆されている。
- ・Irisin -- 運動により筋肉から分泌され、褐色化に参与することが報告されている。
- ・植物ポリフェノール類 -- 脂肪細胞分化に、抗酸化作用を持つ植物フラボノイド類が影響を与えることが知られている。

FGF21、Irisinは200ng/ml、他の薬剤は20 μ Mを脂肪細胞分化誘導開始時に培地に加え、3~5日ごとに培地を交換しながら、18~20日後に細胞を回収、または顕微鏡観察をした。褐色化はマーカーの検出と形態観察で判断する。マーカーであるUCP-1などの発現をWestern blottingおよびRT-qPCRで確認する。脂肪滴はLipidTOXで染色し、形態周囲のオルガネラとの相互作用を蛍光顕微鏡で観察した。

(2) 褐色化の誘導に伴う脂肪滴タンパク質の発現変化の解析

白色脂肪と誘導された褐色脂肪細胞において、どのような遺伝子に発現変化があるのか、Western blottingで解析し、その細胞内局在を蛍光抗体法により顕微鏡観察する。

(3) hMSC白色脂肪細胞の脂肪滴局在タンパクの解析

褐色脂肪化の検討と並行して、hMSCから分化した白色脂肪細胞の脂肪滴タンパク質を解析す

る。マウス 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪滴タンパクのプロテオミクス解析は行われており、Perilipinファミリーを中心とした機能タンパクが同定されているが、ヒト脂肪細胞の脂肪滴での解析は行われていない。hMSCを18日間脂肪細胞へ分化させ、脂肪滴をショ糖密度勾配遠心法で分画した。抽出したタンパク質を、トリプシンで断片化し、精製したサンプルをLC/MS/MS(ABSciex TripleTOF 5600 システム)で網羅的に解析する。

(4)hMSC 細胞のヒト脂肪細胞分化モデルとしての有用性の検討

hMSC を分化誘導して得られた細胞が、ヒト抹消脂肪細胞のモデルとして利用できるか、脂肪細胞分化への医薬品の影響を検討した。hMSC 脂肪細胞分化培地中に各種抗精神病薬を添加し、脂肪蓄積への影響を検討した。細胞数をCCK8、中性脂肪をOil Red O染色で測定した。脂肪蓄積の促進が見られたオランザピンについて、iTRAQ法とWestern blottingによりタンパク質発現量の変化を網羅的に探索した。また、オランザピンによる脂肪滴タンパク質の局在変化について、傾向抗体法で検討した。

4. 研究成果

- (1)hADSC 白色脂肪の褐色化を誘導する因子のスクリーニング
- (2)褐色化の誘導に伴う脂肪滴タンパク質の発現変化の解析

細胞にcAMPのアナログである8-bromo-cAMPを投与するとUCP-1の発現が上昇したことより、褐色化のシグナルはhADSC内で作動していると考えられる。

げっ歯類細胞では褐色化を引き起こすシグナル分子がいくつか報告されており、それらがhADSC脂肪細胞において効果を示すのか検討した。また、脂肪細胞分化に、抗酸化作用を持つ植物ポリフェノール類が影響を与えることがわかってきている。これらが白色脂肪細胞の褐色化へ効果を及ぼすことを期待し、各種フラボノイドのhADSC分化への影響を検討した。

CL316243、FGF21、Irisin、魚油(DHA、EPA)、ANPの影響を検討した結果、FGFファミリーのFGF21、およびマイオカインであるIrisinが、BATマーカーUCP1を増加させることを見出した。そこで、Control細胞と、IrisinまたはFGF21処理をした脂肪細胞におけるタンパク質の発現変化を、Western blottingで確認した。FGF21処理によりUCP1、Perilipin2が増加したのに対し、Perilipin1、3、4、5の発現に影響はなかった。また、脂肪細胞の主要なリパーゼであるHSLも発現に変化はなかった。Irisin処理では、UCP1、Perilipin2が増加したのに対し、

Perilipin1の発現が顕著に減少していた。脂肪滴の中性脂肪をLIPIDTox染色し、脂肪滴タンパク質の局在を蛍光抗体法で顕微鏡観察したところ、Irisin処理により、脂肪滴が小型化していることが確認された。Perilipin1とUCP1の局在部位に変化は見られなかった。Perilipin1は成熟脂肪細胞の肥大した脂肪滴に選択的に存在し、Perilipin2は小型の脂肪滴に存在することが知られている。FGF21やIrisinにより、WATの脂肪滴からBATに見られる多胞化した脂肪滴にリモデリングしていることが示唆される。

以上の結果より、FGF21やIrisinがhADSCのBrowningに関与していることが示唆される。

魚油の影響について、hADSC細胞へのドコサヘキサエン酸(DHA)処理により、強度の脂肪蓄積抑制作用が認められた。この時、Control細胞と比較して、Perilipin1の発現が明らかに抑制されており、これを相補する形でPerilipin2の発現が顕著に増加していた。しかし、UCP1の発現に変化は認められなかった。DHAはBrowningとは異なる機構で、脂肪細胞の分化を抑制していると考えられる。一方、EPA処理ではUCP1、Perilipin1の発現に影響はなかった。

植物ポリフェノールの影響について、rutin、quercetin、apigenin、chrysin、kaempferol、myricetin、nobietin、kaempferol、luteolin、hesperidin、resveratrolを検討したところ、quercetinとresveratrol処理により脂肪蓄積の顕著な抑制が認められた。中性脂肪をLIPIDToxで染色し顕微鏡観察することで、脂肪蓄積の低下を確認できた。

Control細胞と、quercetinおよびresveratrol処理をした脂肪細胞におけるタンパク質の発現変化を、Western blottingで確認した。quercetin、resveratrol処理により、成熟脂肪細胞に特有なPerilipin1、Perilipin4の発現が顕著に低下していた。しかし、UCP-1の発現には影響は認められなかった。

両ポリフェノールはBrowningではなく、別の機構でhADSC脂肪細胞の分化を抑制しているものと考えられる。

(3)hMSC 白色脂肪細胞の脂肪滴タンパクのプロテオミクス

hMSC白色脂肪細胞から、ショ糖密度勾配遠心法で脂肪滴を分画し、そのタンパク質組成をLC/MS/MSで網羅的に解析した。hMSC由来の脂肪細胞の脂肪滴分画には、PerilipinファミリーのPerilipin1、Perilipin4が存在した。また、FASなどの脂質代謝酵素や、Vimentin、Plectinなどの骨格系タンパク質などが検出された。これらは、脂肪滴が脂質代謝や分化に伴う形態変化に関わっていることを示している。検出された多くのタンパク質は3T3-L1細胞などの脂肪滴のプロテオミクス解析で報告され

たものと同様であった。hMSC 細胞がヒトの抹消脂肪細胞モデルとなる可能性を示している。

(4)hMSC 細胞のヒト脂肪細胞分化モデルとしての有用性 脂肪蓄積への抗精神病薬の影響

hMSC 細胞を利用して、ヒト脂肪細胞分化への薬剤の影響を検討した。第二世代抗精神病薬は、副作用として体重増加、肥満が報告されている。各種抗精神病薬の hMSC 脂肪細胞分化への影響を検討したところ、MALTA であるオランザピンとクロザピンで、有意な脂肪蓄積の促進が認められた。オランザピンによる hMSC 脂肪細胞分化の促進機構についてさらに解析を進めるため、iTRAQ 法や Western Blot 法によって Control 細胞とオランザピン処理細胞のタンパク発現を比較した。結果として、オランザピンは Perilipin2、Perilipin4 を増加させていることがわかり、これが脂肪滴の形成を促進させていると考えられる。この反応が、副作用である体重増加の原因を担っている可能性がある。また、この研究から、これまで機能未知であった Perilipin4 が、脂肪滴形成に関与することが示唆された。また、hMSC が医薬品の副作用を解析するヒト脂肪細胞モデルとして有用であることが示された。()

<引用文献>

Nimura, Yamaguchi et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015) **467**, 906-912

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yamaguchi T, Fujikawa N, Nimura S, Tokuoka Y, Tsuda S, Aiuchi T, Kato R, Obama T, Itabe H.

Characterization of lipid droplets in steroidogenic MLTC-1 Leydig cells: Protein profiles and the morphological change induced by hormone stimulation. *Biochim. Biophys. Acta.* (2015) **1851**, 1285-1295 査読有
doi: 10.1016/j.bbali.2015.06.007.

Nimura S, Yamaguchi T, Ueda K, Kadokura K, Aiuchi T, Kato R, Obama T, Itabe H.

Olanzapine promotes the accumulation of lipid droplets and the expression of multiple perilipins in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015) **467**, 906-912. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.045.

[学会発表](計1件)

山口 智広, 二村 哲美, 岩出 佳樹, 関根由吏, 高橋 江里奈, 藤崎 杏菜, 相内 敏弘,

笹部 直子, 加藤 里奈, 板部 洋之
第87回日本生化学会大会 2014年10月17日 [3P-250]ヒト脂肪由来幹細胞(ADSC)および間葉系幹細胞(hMSC)由来の脂肪細胞における脂肪滴の解析(国立京都国際会館(京都市))

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 智広 (YAMAGUCHI, Tomohiro)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 50347530

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし