

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461362

研究課題名(和文) 一次繊毛機能を介したACAM/CLMPの脂肪細胞分化と肥満症における意義

研究課題名(英文) The impact of ACAM/CLMP on the adipocytes differentiation and obesity through the primary ciliary machinery

研究代表者

村上 和敏 (Murakami, Kazutoshi)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40620753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞は余剰エネルギーにより肥大化すると、アディポカイン分泌異常などにより代謝調節機能が障害されメタボリックシンドロームや糖尿病を発症する。我々は、肥満ラットの内臓脂肪組織からホモフィリックな細胞接着に関わる細胞接着分子ACAMを発見した。脂肪細胞でACAMを過剰発現したマウスを高脂肪高蔗糖食で飼育すると、肥満、糖尿病の発症が予防された。このマウスでは脂肪細胞同士がACAMにより接着し、その接着部位に表層アクチン(F-actin)を形成し、電子顕微鏡で同部位にzonula adherens形成を認めた。ACAMは細胞接着と表層アクチン形成により脂肪細胞肥大化を抑制し、肥満や糖尿病を予防する。

研究成果の概要(英文)：The excess of lipid accumulation and hypertrophy of adipocytes induces the abnormality of secretion of adipokines and hormones from adipocytes and causes metabolic syndrome and diabetes. We identified ACAM in 2005 from the visceral fat tissue of obese rats. It is a cell adhesion molecule responsible for the homophilic adhesion of the cells. In the transgenic mice overexpressing ACAM in adipocytes fed with a high fat and high sucrose diet were protected from the onset of obesity and diabetes. In transgenic mice, ACAM is abundantly expressed on plasma membrane of mature adipocytes and associated with formation of Phalloidin-positive polymerized form of cortical actin (F-actin). By electron microscopy, the structure of zonula adherens was formed at interphase of adipocytes. The adhesion of adipocytes and formation of cortical actin prevent the adipocyte hypertrophy and development of obesity and diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：脂肪細胞 膜蛋白 接着分子 アドヘレンスジャンクション アクチン

1. 研究開始当初の背景

近年、内臓脂肪組織は単なる脂質の蓄積臓器ではなく、アディポサイトカインなどの様々な生理活性物質を分泌することにより生体内のエネルギーバランスを調節する内分泌臓器として注目されている。

そこで、我々はメタボリックシンドロームの発症メカニズムを解明する目的で、内臓脂肪組織に着目し内臓脂肪蓄積型肥満や2型糖尿病を呈する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いて、subtractive suppression PCR により内臓脂肪組織において発現の上昇する遺伝子群を探索した (Hida K, *J Lipid Res* 41, 1616-1622, 2000)。その結果、CTX (cortical thymocyte marker in *Xenopus*) 遺伝子ファミリーに属する膜蛋白である ACAM/CLMP (adipocyte adhesion molecule/ coxsackie-and adenovirus receptor-like membrane protein: 以下 ACAM) を同定した (Eguchi J, *Biochemical J* 387, 343-353, 2005)。

2. 研究の目的

我々は ACAM を発見し、肥満動物の白色脂肪組織における発現や aP2 プロモーターを用いた ACAM transgenic (Tg) マウスの解析により以下の知見を得た。

(1) ACAM の白色脂肪組織での発現は肥満の形成に伴い増強する

ACAM mRNA の白色脂肪組織における発現は、OLETF ラット、db/db マウス、DIO (diet induced obesity) マウスの内臓脂肪組織と皮下脂肪組織で発現が増強し、ヒト皮下脂肪組織での発現は BMI と正の相関を認める (Eguchi J, *Biochemical J* 387, 343-353, 2005)。

(2) aP2 プロモーターによる ACAM Tg マウスは脂肪細胞の肥大化と体重増加が抑制される

aP2 プロモーターを用いて ACAM Tg マウ

スを作成した結果、高脂肪高蔗糖食 (HF/HS) 群で wild type (WT) マウスに比べ有意な体重増加抑制を認め、内臓脂肪組織における脂肪細胞の肥大化抑制と白色脂肪重量の増加抑制を認めた。加えて、耐糖能異常と脂質異常が是正されたことから、ACAM は脂肪細胞の分化増殖を制御することで全身のエネルギー代謝調節に関与していると推測された。

(3) ACAM は上皮細胞の primary cilia に発現している

ヒト白色脂肪細胞の分化過程において primary cilia が一過性に発現することが報告 (*PNAS* 10:1820-5, 2009) されている。さらに、我々は、ACAM が上皮細胞の primary cilia に発現していることを見出した。

これら(1)(2)(3)より、ACAM が脂肪細胞の primary cilia に発現し、脂肪細胞の分化増殖を制御することで肥満症の発症進展に関与するという仮説に達した。本研究では、ACAM が primary cilia の機能や細胞内シグナル制御を介して脂肪細胞の分化増殖に関与していると考え、この分子機構の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3T3-L1 細胞の primary cilia における ACAM の発現検討

3T3-L1 細胞の分化過程における primary cilia と ACAM 発現の時間経過を共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光抗体染色法により検討し、さらに 3T3-L1 細胞の各分化段階での ACAM の局在を免疫電子顕微鏡法により検討する。

(2) ACAM の細胞内相互作用分子の同定

脂肪細胞の分化に伴う形態変化には細胞間の相互作用が重要であり、細胞同士の接着分子として機能する ACAM が重要な役割を担っていると推測されることから、ACAM がどのような細胞内アダプター分子や細胞内

シグナル分子を介して、脂肪細胞の分化や形態変化に関わっているのかを探索する。すなわち、ACAM 全長 cDNA をアデノウイルスベクターにより 3T3-L1 細胞に発現させ、Interplay Mammalian TAP (tandem-affinity purification) system を用いて ACAM 相互作用蛋白を抽出し、LC-MS/MS 解析と MALDI-TOF/MS 解析を行うことで、ACAM と相互作用する細胞内分子を同定する。

4 . 研究成果

はじめに、3T3-L1 細胞と C57BL/6J マウス精巣周囲脂肪組織を用いて、primary cilia における ACAM の発現を共焦点顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて詳細な検討を行ったが、これらの細胞の primary cilia における ACAM の発現は確認できなかった。

次に、別途検討した 3T3-L1 細胞における ACAM の細胞内相互作用分子の同定実験により細胞骨格分子である γ -actin を同定した。さらに、ACAM は上皮系細胞では Tight junction における接着分子として機能しているとの報告から、ACAM は脂肪細胞においても細胞接着や γ -actin との相互作用により細胞骨格の変化をもたらす、脂肪細胞の肥大化を抑制していると仮説を立て引き続き検討を行った。すなわち、WT マウスと ACAM Tg マウスの白色脂肪組織を用いて Phalloidin (重合アクチン) と ACAM の 2 重染色を行ったところ、Phalloidin は ACAM Tg マウスでより強く染色され、ACAM との共染色が観察された。加えて、ACAM 抗体と γ -actin 抗体を用いた免疫電子顕微鏡による検討により、ACAM と γ -actin は共に ACAM Tg マウスの白色脂肪細胞間隙に強く発現し Adherens junction を形成していることが見いだされた。

これらの結果から、白色脂肪組織においても ACAM は接着分子として機能するとともに、

ACAM の細胞内相互作用分子であるアクチンが表層アクチンを形成することにより脂肪細胞の肥大化が抑制されるという分子機構が判明した。

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6件)

- (1) Murakami K, Eguchi J, Hida K, Nakatsuka A, Katayama A, Sakurai M, Choshi H, Furutani M, Ogawa D, Takei K, Otsuka F, Wada J. The anti-obesity action of ACAM by modulating the dynamics of cell adhesion and actin polymerization in adipocytes. **Diabetes**. 2016 May; 65(5):1255-67. 査読有 doi: 10.2337/db15-1304.
- (2) Nakatsuka A, Matsuyama M, Yamaguchi S, Katayama A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Ogawa D, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Watanabe E, Wada J. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. **Scientific Reports**. 2016 Feb 17;6:21721. 査読有 doi: 10.1038/srep21721.
- (3) Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Kanzaki M, Nunoue T, Hida K, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Yamamoto K, Kiyonari H, Makino H, Wada J. Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis. **Scientific Reports**. 2015 Nov 19;5:16920. 査読有 doi: 10.1038/srep16920.

- (4) Wang Y, Katayama A, Terami T, Han X, Nunoue T, Zhang D, Teshigawara S, Eguchi J, Nakatsuka A, Murakami K, Ogawa D, Furuta Y, Makino H, Wada J. Translocase of inner mitochondrial membrane 44 alters the mitochondrial fusion and fission dynamics and protects from type 2 diabetes. **Metabolism**. 2015 Jun;64(6):677-88. 査読有 doi: 10.1016/j.metabol.2015.02.004.
- (5) Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. Identification of Circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as Biomarkers for Type 2 Diabetes. **Metabolism**. 2015 Apr;64(4):489-97. 査読有 doi: 10.1016/j.metabol.2014.12.003.
- (6) Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. **PLoS One**. 2014 Mar 25;9(3):e92647. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone0092647. eCollection 2014.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 和田淳, 村上和敏, 江口潤, 中司敦子, ACAM を介した細胞接着と肥満の制御, 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2016/3/12, 大宮
- (2) Murakami K, Eguchi J, Nakatsuka A, Wada J, The anti-obesity action of ACAM by modulating the dynamics of

cell adhesion and actin polymerization in adipocytes. American Diabetes Association (ADA) 75th Annual Scientific Sessions, 2015, Boston, MA, USA

- (3) 村上和敏, 江口潤, 中司敦子, 和田淳, 脂肪細胞における接着とアクチン重合を介した ACAM の抗肥満作用, 第 35 回日本肥満学会総会, 2014/10/24, 宮崎
- (4) 村上和敏, 江口潤, 中司敦子, 和田淳, ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次繊毛機能を介した脂肪細胞分化と肥満症における意義, 第 57 回日本糖尿病学会総会, 2014/5/24, 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 和敏 (MURAKAMI KAZUTOSHI)

岡山大学医学部 客員研究員

研究者番号 : 40620753

(2)研究分担者 : なし

(3)連携研究者 : なし

(4)研究協力者

和田 淳 (WADA JUN)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

江口 潤 (EGUCHI JUN)

岡山大学大学病院 講師

中司 敦子 (NAKATSUKA ATSUKO)

岡山大学大学病院 助教