

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660291

研究課題名(和文) 脂肪細胞の褐色化を調節する新規メカニズムの探索と解明

研究課題名(英文) Exploring a novel mechanism regulating differentiation into beige adipocytes

研究代表者

木岡 紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90234179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギーを脂肪として貯める白色脂肪細胞が、脂肪を熱に変えるベージュ脂肪細胞に変換することがわかってきた。本研究では細胞外マトリックスの硬さがベージュ化に与える影響について検討した。非常に硬い培養基板であるシャーレ上に比べ、軟らかい培養基板であるゲル基板上でベージュ脂肪細胞分化の効率が高かった。このことから細胞外マトリックスの硬さが脂肪細胞のベージュ化に影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been revealed that white adipocytes can transdifferentiate into beige adipocytes, which consume lipids and generate heat. Stiffness of extracellular matrix affects cell fate and behaviors. In this research, we examined the effect of stiffness on the differentiation into beige adipocytes. We found that after induction of the differentiation, white adipocytes on gel substrates (soft) expressed more UCP1 mRNA, beige adipocyte maker, than those on plastic dishes (very rigid). This supports the hypothesis that stiffness affects the differentiation of white adipocytes into beige adipocytes.

研究分野：応用細胞生物化学

キーワード：脂肪細胞 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

現在中高年男性の三人に一人が肥満で、肥満が代謝異常症の原因となることから、大きな問題となっている。脂肪組織にある細胞のうち、エネルギーを脂肪として蓄積する細胞は白色脂肪細胞である。一方、貯めこんだ脂肪を燃焼させて熱に変換する細胞(褐色脂肪細胞)もある。褐色脂肪細胞はヒト乳児には存在するものの成人には存在しないとされてきた。しかし成人においても寒冷暴露等により白色脂肪細胞が褐色様脂肪細胞(ベージュ脂肪細胞)に変換する仕組みがあることがわかってきた。重要なことに、ベージュ脂肪細胞の量と肥満度は負に相関する。現在、肥満問題の解消をめざし、ベージュ脂肪細胞を活性化/増加させる仕組みの解明が世界中で精力的に進められている。

脂肪細胞の運命/機能は、細胞を取り囲むコラーゲンなどの細胞外マトリックスによって大きな影響を受ける。最近、細胞外マトリックスの種類だけでなく、その物理的な「硬さ」が重要であることがわかってきた。例えば間葉系幹細胞は適度な硬さの細胞外マトリックス上で脂肪細胞によく分化するが、硬すぎても柔らかすぎても別の細胞(神経や骨芽細胞)へ分化傾向を示す。

我々はこれまで細胞と細胞外マトリックスとの接着装置である接着斑に着目し、そこに局在するタンパク質ピンキュリンとピネキシンについて研究を進めてきた。特にこの2つの分子の相互作用が細胞外マトリックスの「硬さ」を感知するセンサーであることを繊維芽細胞を用いて最近明らかにした。さらに、我々は白色脂肪細胞の分化の際にもこのピンキュリンが細胞外マトリックスの「硬さ」のセンサーとして働き、分化を調節していることを明らかとつづける。

2. 研究の目的

肥満は、脂肪組織の増大だけでなく脂肪組織に炎症を引き起こす。この炎症が代謝異常、動脈硬化などの疾病につながるとともに、白色脂肪細胞のベージュ脂肪細胞化を抑えることが知られている。炎症応答は同時に細胞外マトリックスの分泌と架橋化を促進し、脂肪組織を「硬く」する。しかし、細胞外マトリックスの「硬さ」が脂肪細胞のベージュ脂肪細胞化を抑制しているのか、あるいは促進しているのか、といった情報については全くわかっていない。そこで本研究では細胞外マトリックスの硬さが白色脂肪細胞のベージュ脂肪細胞化に与える影響を検討した。

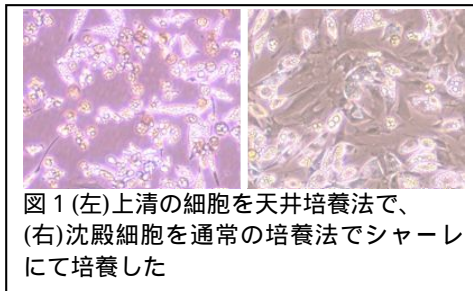
3. 研究の方法

細胞は、マウス間葉系幹細胞株 10T1/2 細胞を用いた。この細胞をデキサメタゾン、インスリン、IBMX で2日間刺激し、その後インスリン含有培地で4~8日間培養することで白色脂肪細胞に分化させた。この細胞を様々な硬さのゲル培養基板上に播種し、アドレナリン受容体アゴニストであるイソプレテレノールで処理し、白色脂肪細胞のベージュ化を誘導した。硬さの異なるゲル培養基板は、Yip らによって報告([doi: 10.1016/j.bpj.2012.11.3805](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3805))されているアクリアミドと N-acryloyl-6-aminocaproic acid を用いる手法によって作成した。硬さのレンジは、2kPa ~ 30.1kPa とした。ベージュ化の効率にはベージュ脂肪細胞や褐色脂肪細胞に特異的に発現し、ミトコンドリアで熱産生を担うタンパク質 UCP1(uncoupling protein 1) の mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて評価した。

4. 研究成果

10T1/2 細胞を白色脂肪細胞に分化誘導後、コラーゲナーゼによって脂肪細胞をシャー

レから剥がし、遠心分離した。非常によく分化し特に多量の脂肪滴を蓄えた白色脂肪細胞は遠心分離により上清に浮いたので、これも集めて天井培養法にてシャーレ、あるいはゲルに接着させて培養した(図1)。しかしこの細胞画分は脂肪含量が多いため、RNAの単離、抽出が困難であることがわかった。そこで以下の実験では、遠心により沈殿した白色脂肪細胞を用いた。まず遠心



により得られた白色脂肪細胞を、様々な硬さを持つゲル培養基板上およびシャーレ上に播種した。翌日、培養液にイソプレテレンールを添加し、ベージュ脂肪細胞化を刺激した。これらの細胞からRNAを抽出し、ベージュ脂肪細胞で発現するUCP1遺伝

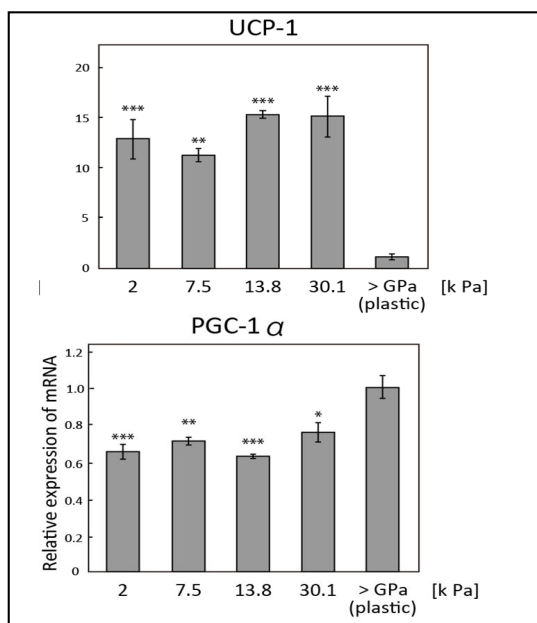


図2
プラスチックシャーレまたは2、7.5、13.8、30.1 kPaのゲル上で細胞をイソプロテレンール刺激し、UCP-1、PGC-1αのmRNA発現量をqRT-PCRによって定量した。発現量は内在性コントロール(36B4)によって補正し、プラスチック上での発現を1として表示した。エラーバーは±S.E.M。(N=3) *、**、***プラスチックに対して有意確率 $p < 0.05, 0.01, 0.001$ であることを示す。

子をベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子として、発現量を調べた(図2)。その結果、非常に硬い培養基盤であるシャーレ上に比べ、ゲル培養基板上でUCP1の発現量が高いことが分かった。興味深いことに、ゲル培養基板上では、硬さによるUCP1の発現量に差は認められなかった。このことから、比較的「硬さ」の違いが小さい環境では硬さは脂肪細胞のベージュ化に影響を与えないが、「硬さ」の違いが大きければベージュ化に影響することが示唆された。ただしシャーレ上とゲル培養基板上では硬さ以外の条件、たとえば基底面側からの栄養素の供給なども異なっている可能性も考えられるので、さらに詳細な解析が必要である。また、UCP1の発現促進に働くとされているPGC1の発現も同様に調べたが、PGC1の発現はシャーレ上に比べゲル培養基板上で低下していた。予想とは異なり、PGC1がUCP1の発現と逆の挙動を示したことは、ゲル培養基板上でのUCP1の発現調節の仕組みが、通常のシャーレ上でのUCP1発現制御の仕組みと異なることを示している可能性もある。これについても今後解析をする必要がある。

また、細胞外マトリックスの硬さの感知に関わるタンパク質ピンキュリンとビネキシンのベージュ脂肪細胞分化に与える効果についても検討した。レンチウイルスを用いて、ピンキュリンとビネキシンの発現を抑制した前駆脂肪細胞株を作成し、この細胞をこれまでの実験と同様に白色脂肪細胞に分化させた。アドレナリン刺激によりベージュ化を誘導した後にUCP1mRNA量を調べたが、ピンキュリン、ビネキシンの発現抑制はUCP1mRNA量に顕著な効果を示さなかった。今後、別の条件下において、ピンキュリン、ビネキシンの発現抑制がUCP1mRNA量に与える効果を調べていく必要がある。

以上、今回の研究により、シャーレ上とゲル培養基板上で脂肪細胞のベージュ化効率が異なることを明らかにし、細胞外マトリックスの硬さがベージュ化の制御に関与する可能性を示すことができた。今後さらに実験を行うことで、細胞外マトリックスの硬さがベージュ化を調節しているという仮説を検証し、ベージュ化促進を介した肥満問題の解決につながることを期待される。

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)

1. Tomiyama, L., T. Sezaki, M. Matsuo, K. Ueda, N. Kioka Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. *Oncogene*. **34** 1141. 2015.

2 Yamashita, H., T. Ichikawa, D. Matsuyama, Y. Kimura, K. Ueda, S.W. Craig, I. Harada, N. Kioka The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin alpha in sensing the stiffness of the extracellular matrix. *J Cell Sci*. **127** 1875. 2014.

3 Chiba, T., T. Sakurada, R. Watanabe, K. Yamaguchi, Y. Kimura, N. Kioka, H. Kawagishi, M. Matsuo, K. Ueda Fomiroid A, a Novel Compound from the Mushroom *Fomitopsis nigra*, Inhibits NPC1L1-Mediated Cholesterol Uptake via a Mode of Action Distinct from That of Ezetimibe. *PLOS One*. **9** e116162. 2014.

[学会発表](計 39 件)

2014/6/13 黒田美都、和田洋樹、植田和光、木岡紀幸 第 66 回日本細胞生物学会 奈良

2014/8/23 黒田美都、和田洋樹、植田和光、木岡紀幸 接着斑タンパク質ピンキュリンは間葉系幹細胞の ECM の硬さ依存的な脂肪細胞分化に必要である 第 19 回日本肥満学会 アディポサイエンスシンポジウム 大阪

Takafumi Ichikawa, Masahiro Kita, Takuhito Sezaki, Shian-Huey Chiang, Alan R. Saltiel, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka Comparison of the effect of the vinexin family proteins on vinculin-mediated mechanosensing

2014 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology Philadelphia, Pennsylvania, USA

2015/9/23-26 Mito Kuroda, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka Vinculin regulates the ECM-stiffness dependent adipogenesis and the nuclear localization of YAP/TAZ. iCeMS International Symposium "Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter" 京都

2015/12/1-4 黒田 美都, 植田 和光, 木岡 紀幸 接着斑タンパク質ピンキュリンが制御する ECM の硬さに依存した脂肪細胞への分化には転写因子 YAP が関与する 第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会合同大会 神戸

2016/3/27-3/30 今井まり子、市川(長里)彩花、植田和光、木岡紀幸 細胞外基質の硬さに応じた乳腺上皮細胞の嚢胞・管腔形成に与えるピンキュリンの効果 2016 年(平成 28 年度)日本農芸化学会大会 札幌

2016/3/27-30 黒田 美都, 植田 和光, 木岡 紀幸 接着斑タンパク質ピンキュリンは細胞外マトリックスの硬さに応じた転写因子 YAP の挙動を制御する 2016 年(平成 28 年度)日本農芸化学会大会 札幌

(招待)

Noriyuki Kioka, Takafumi Ichikawa, Hiroshi Yamashita, Ayaka Nagasato, Mito Kuroda ピンキュリン-ピネキシン 相互作用は細胞外マトリックスの硬さを感じするメカノセンサーである 平成 26 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム 東京

Noriyuki Kioka 細胞外基質の硬さを感じするメカノセンサー Mechanosensor for sensing stiffness of extracellular matrix 日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム

2015/8/22-2015/8/23 Noriyuki Kioka Interaction of the vinculin with vinexin in ECM-stiffness directed cell differentiation and migration The Second International Meeting for Epithelial Tubulology 札幌

2015/6/30-2015/7/2 木岡 紀幸 Membrane microdomain and mechanosensor for stiffness of extracellular matrix(ECM) Membrane microdomain and mechanosensor for stiffness of extracellular matrix(ECM) 第 67 回日本細胞

生物学会大会シンポジウム 東京

〔その他〕

ホームページ等

京都大学農学研究科

応用生命科学専攻細胞生化学分野

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

木岡 紀幸 (KIOKA, Noriyuki)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90234179