

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670032

研究課題名(和文)肥満抑制機能解明に繋がるUCP1高発現褐色脂肪細胞への効率的分化誘導手法の開発

研究課題名(英文)Development of in vitro and in vivo assay systems to elucidate molecular mechanism suppressing obesity

研究代表者

菅谷 純子(SUGATANI, JUNKO)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：30098131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満と密接な関わりを示す慢性炎症の発症・増悪化におけるPAFの作用を解析した。高度に肥満を誘導したPAF受容体欠損マウスにおいても野生型マウスと比較して精巣上体白色脂肪の重量が有意に増加し、慢性炎症の増悪化を示すTNF- $\alpha$  mRNAの発現上昇と糖代謝異常が認められ、インスリン抵抗性糖尿病発症との関わりを示唆する結果が得られた。全身性のPAF受容体欠損マウスにおける熱産生低下の機序を解明するために、前駆脂肪細胞株を用いたin vitro実験系を開発するとともに、細胞選択的なPAF受容体欠損マウスを作製し、原因細胞をin vivoで特定するための実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We investigated how PAF/PAF receptor signaling suppresses energy expenditure in vitro and in vivo. In cell lines differentiated to brown adipocytes, the effect of PAF to expression of UCP1 was rather low. In PAF receptor-knockout (PAFR-KO) mice, body and epididymal WAT weights were higher in PAFR-KO mice fed a high-fat diet (HFD) than in wild-type (WT) mice. TNF- $\alpha$  mRNA expression levels in epididymal WAT and the infiltration of CD11c-positive macrophages into epididymal WAT, which led to chronic inflammation, were also elevated in HFD-fed PAFR-KO mice. HFD-fed PAFR-KO mice had higher levels of fasting serum glucose than HFD-fed WT mice as well as impaired glucose tolerance. We also generated PAFR-floxed mice and crossed them with Adiponectin-Cre or Ucp1-Cre mice to generate white or brown adipocyte specific PAFR-KO mice, respectively. These knockout mice could be useful for studying PAF/PAF receptor dependent energy expenditure in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PAF PAF受容体 PAF受容体欠損マウス PAF受容体フロックスマウス 肥満 褐色脂肪細胞 UCP1 UCP1クレマウス

## 1. 研究開始当初の背景

血小板活性化因子 (PAF; platelet-activating factor) は生理活性を有するリゾリン脂質であり、アレルギー反応や細菌感染等に対する免疫応答時に生合成・放出されると理解されている。しかし PAF の受容体は免疫系の細胞だけではなく脳や腎臓など多くの組織に発現していることから、アレルギー反応・免疫応答以外にも多彩な生理作用を持っていると推察される。これまでに申請者は、PAF 受容体を欠損したマウスでは中長期に飼育した全ての個体が肥満を呈し、その原因を検討したところ褐色脂肪の熱エネルギー産生能が低いことを明らかにした。この結果は PAF が褐色脂肪の熱産生を制御する新規因子として機能していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

過剰に蓄積した内臓脂肪組織ではマクロファージ等の炎症性細胞が浸潤することにより慢性炎症が惹起され、炎症部位から分泌された TNF- $\alpha$  や IL-6 がインスリン抵抗性や動脈硬化性疾患を誘発することが近年明らかとなった。PAF はアレルギーや免疫応答を促進する脂質メディエーターとして古くから知られており、かつ、申請者は白色脂肪組織においても PAF 受容体と PAF 合成酵素が高発現していることを見出した。そこで PAF 受容体の欠損が内臓脂肪の蓄積による慢性炎症に及ぼす作用を明らかにするため、高脂肪食投与実験を行った。

さらに肥満の原因細胞の一つとして考えている褐色脂肪細胞に着目し、単一細胞由来の前駆脂肪細胞株を樹立し、PAF を介した UCP1 発現調節機構の解明を目指したが、単一細胞を用いた実験系では有意な上昇が認められなかった。全身性の PAF 受容体欠損マウスを用いたこれまでの知見からは PAF がどの細胞から産生され、どの細胞に作用して熱産生に至ったかについては不明であるため、細胞選択的な PAF 受容体欠損マウスを作製し、PAF が褐色脂肪の熱産生を促進する分子メカニズムについて細胞レベルで詳細に解明する実験系の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 高脂肪食摂餌により惹起された脂肪炎症に対する PAF の機能解析

8 週齢の野生型および PAF 受容体欠損マウスに高脂肪食もしくは通常食を 12 週間摂餌させた。摂餌期間中は経時的に体重を測定し、摂餌期間終了後に解剖して組織を摘出して白色脂肪組織重量を測定した。摘出した精巢上体白色脂肪組織から RNA 抽出して炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6)の遺伝子発現量を RT-qPCR 法にて定量した。また、摘出した精巢上体白色脂肪組織を酵素処理法によって細胞を分散させた後、炎症促進性マクロファージが浸潤した割合をフローサイトメトリー法によって定量した。摂餌期間終了後、絶食時の血清グルコース濃度を測定した。また、グルコースを腹腔内投与して血糖値を経時的に測定し、耐糖能に及ぼす影響を検討した。

### (2) 不死化した褐色脂肪細胞の作製による PAF 受容体シグナルの解明

p53 欠損マウスの肩甲骨間褐色脂肪組織から血管間質画分を調製し、限界希釈法によりクローニングを行うことで脂肪分化能が高い細胞を選別した。選別した細胞に $\beta$ 3-adrenergic receptor アゴニストもしくは PAF 刺激を行い、 $\beta$ 3-adrenergic receptor と Ucp1 遺伝子の発現量を RT-qPCR 法にて定量した。

### (3) PAF 依存的な熱産生機構の解明に向けた PAF 受容体コンディショナル欠損マウスを作製

コンディショナルノックアウトマウスを作製するために必要な PAF 受容体遺伝子の組換え ES 細胞は International Knockout Mouse Consortium (project ID; CSD25997) から入手した。この組換え ES 細胞では PAF 受容体遺伝子の exon 1 の途中から終わりまでが loxP 配列で挟まれた構造となっている。組換え ES 細胞からキメラマウスを作製し、C57BL/6 マウスと交配することで germline transmission の確認を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高脂肪食摂餌により惹起された脂肪炎症に対する PAF の機能解析

摂餌期間終了後に各群のマウスの体重を測定した結果、高脂肪食群において PAF 受容体欠損マウスの体重は野生型マウスと比較して有意に増加していた。さらに高脂肪食群の

PAF 受容体欠損マウスでは精巣上体白色脂肪の組織重量が有意に増加していたことから、脂肪組織が増大することで肥満が重篤化したことが明らかとなった (Figure 1)。

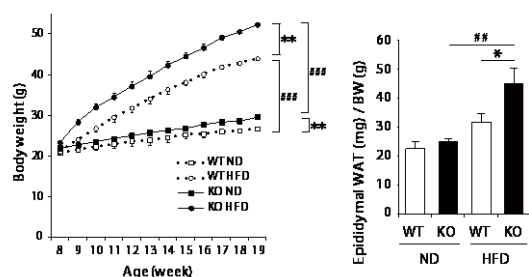


Figure 1. Increased body and white adipose tissue weights were observed in HFD-fed PAFR-KO mice.

高脂肪食群の PAF 受容体欠損マウスにおいて慢性炎症が増悪しているか否か検討するため、精巣上体白色脂肪組織の TNF- $\alpha$  と IL-6 の遺伝子発現を定量し、炎症レベルを比較した。その結果、IL-6 遺伝子の発現量は通常食と高脂肪食群、そして野生型と PAF 受容体欠損マウス間で差は認められなかった。しかし、TNF- $\alpha$  遺伝子は高脂肪食の摂餌によってその発現が上昇し、さらに野生型マウスよりも PAF 受容体欠損マウスにおいて有意に高発現していた。さらに脂肪組織において TNF- $\alpha$  を分泌する CD11c 陽性マクロファージと、マクロファージの動態を制御する CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の割合についても Flow cytometry 法にて定量した。その結果、高脂肪食の摂餌によって野生型マウスと PAF 受容体欠損マウスのいずれにおいても CD11c 陽性マクロファージの割合は増加していたが、PAF 受容体欠損マウスの方が有意に増加していた (Figure 2)。また、高脂肪食の摂餌によって野生型マウスと PAF 受容体欠損マウスのいずれにおいても CD4 陽性 T 細胞の割合は減少し、CD8 陽性 T 細胞の割合は増加する傾向がみられたが、野生型マウスと PAF 受容体欠損マウス間で有意な差は認められなかった。

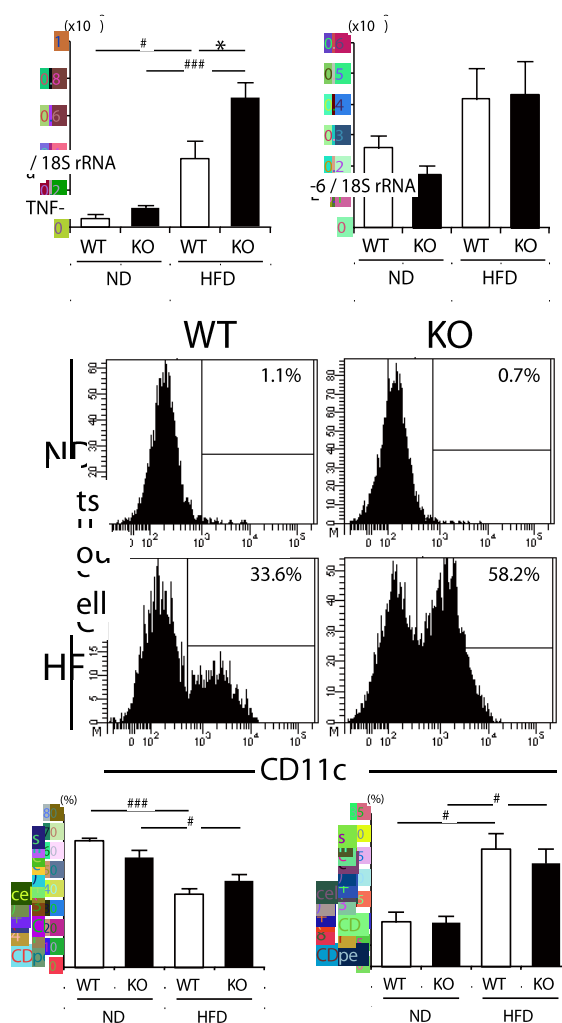


Figure 2. Expression of inflammatory cytokine mRNAs and evaluation of adipose-derived macrophages in the epididymal WAT of WT and PAFR-KO mice.

高脂肪食群の PAF 受容体欠損マウスでは内臓脂肪の蓄積が増加し、炎症性サイトカインの発現上昇、浸潤した CD11c 陽性マクロファージの増加が認められた。従って PAF 受容体欠損マウスでは慢性炎症が増悪していることが明らかとなった。そこで慢性炎症がグルコース代謝に及ぼす影響を調べるため、各 4 群の絶食時のマウスから血清を調製しグルコース濃度を測定した。その結果、血清グルコース濃度は通常食よりも高脂肪食を摂餌したマウス群で有意に高く、さらに、高脂肪食群では野生型マウスよりも PAF 受容体欠損マウスで有意に高かった (Figure 3)。

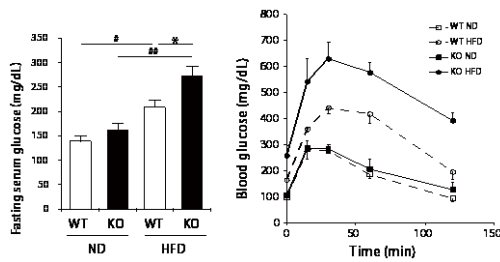


Figure 3. The up-regulation of fasting serum glucose and impaired glucose tolerance were observed in HFD-fed PAFR-KO mice.

### (2) 不死化した褐色脂肪細胞の作製による PAF 受容体シグナルの解明

p53 欠損マウスの褐色脂肪組織から調製した血管間質画分をクローニングし、脂肪細胞への分化能に優れた細胞クローンを 1 1 株得た。次に、 $\beta$ 3-adrenergic receptor アゴニストを添加して Ucp1 の発現量が顕著に上昇したものを選別することでクローンを 1 1 株から 2 株に絞り込んだ。選別した 2 株の細胞クローンを PAF 刺激を行ったが、初代培養の褐色脂肪細胞とは異なり、 $\beta$ 3-adrenergic receptor の発現量は抑制されなかった。

### (3) PAF 依存的な熱産生機構の解明に向けた PAF 受容体コンディショナル欠損マウスの作製

組換え ES 細胞を用いてキメラマウスの作製を行ったところ計 28 匹を獲得することができた。次に獲得したキメラマウスと C57BL/6N マウスを交配したところ計 12 匹の仔が germline transmission を確認でき、PAF 受容体 floxed マウスの作製に成功した (Figure 4)。これまでの知見から PAF 受容体による熱産生調節が肥満制御に最も重要であると考えられるため、*Adiponectin*-Cre マウスおよび *Ucp1*-Cre マウスと PAF 受容体 floxed マウスを交配し、体重増加への影響を解析中である。

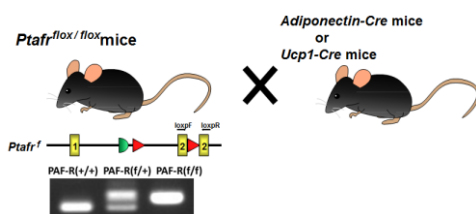


Figure 4. Conditional inactivation of *PAFR* gene. The targeting construct and representative genotyping PCR results of *PAFR*(+/+), *PAFR*(flox/+), and *PAFR*(flox/flox) mice were shown above.

## 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 8 件)

1. Sugatani J, Sadamitsu S, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Higa R, Hattori Y, Uchida T, Ikari A, Sugiyama W, Watanabe T, Ishii S, Miwa M, Shimizu T: Antiobese function of platelet-activating factor: increased adiposity in platelet-activating factor receptor-deficient mice with age. *FASEB J.*, **28**, 440-452 (2014) 査読有 doi:10.1096/fj.13-233262.
2. Ikari A, Tonegawa C, Sanada A, Kimura T, Sakai H, Hayashi H, Hasegawa H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J: Tight junctional localization of claudin-16 is regulated by syntaxin 8 in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem.*, **289**, 13112-13123 (2014) 査読有 doi:10.1074/jbc.M113.541193.
3. Ikari A, Watanabe R, Sato T, Taga S, Shimobaba S, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J: Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1843**, 2079-2088 (2014) 査読有 doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.017.
4. Sugatani J, Hattori Y, Noguchi Y, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Ikari A: Threonine-290 regulates nuclear translocation of the human pregnane X receptor through its phosphorylation/dephosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein phosphatase 1. *Drug Metab Dispos.*, **42**, 1708-1718 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.bcp.2014.12.022.
5. Yamaguchi M, Matsui M, Higa R, Yamazaki Y, Ikari A, Miyake M, Miwa M, Ishii S, Sugatani J, Shimizu T: A platelet-activating factor (PAF) receptor deficiency exacerbates diet-induced obesity but PAF/PAF receptor signaling does not contribute to the development of obesity-induced chronic inflammation. *Biochem Pharmacol.*, **93**(4), 482-495 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.bcp.2014.12.022.
6. Ikari A, Fujii N, Hahakabe S, Hayashi H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J: Hyperosmolarity-Induced Down-Regulation of Claudin-2 Mediated by Decrease in PKC $\beta$ -Dependent GATA-2 in MDCK Cells. *J Cell Physiol.*, **230**, 2776-2787 (2015) 査読有 doi: 10.1002/jcp.25004.

7. Yamazaki Y, Yasui K, Hashizume T, Suto A, Mori A, Murata Y, Yamaguchi M, Ikari A, Sugatani J.: Involvement of a cyclic adenosine monophosphate-dependent signal in the diet-induced canalicular trafficking of adenosine triphosphate-binding cassette transporter g5/g8. *Hepatology.*, **62**, 1215-1226 (2015) 査読有 doi: 10.1002/hep.27914.
8. Sugatani J, Noguchi Y, Hattori Y, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Ikari A.: Threonine-408 Regulates the Stability of the Human Pregnane X Receptor Through its Phosphorylation and the CHIP/Chaperone-Autophagy Pathway. *Drug Metab Dispos.*, **44**, 137-150 (2016) 査読有 doi: 10.1124/dmd.115.066308.

[学会発表] (計 8 件)

1. Junko Sugatani, Yoshiki Hattori, Yuji Noguchi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari: Signal-mediated regulation of nuclear receptor PXR function. 20<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MOD) (Stuttgart, Germany), Abstract, p. 55, 2014 年 5 月 21 日
2. 山口賢彦, 比嘉涼子, 山崎泰広, 五十里彰, 石井聡, 三輪匡男, 清水孝雄, 菅谷純子: 脂肪組織の慢性炎症化過程に関わる血小板活性化因子の機能解析 第 56 回日本脂質生化学会 (大阪)、講演要旨集, pp.204-205, 2014 年 6 月 7 日
3. 菅谷純子: UGT1A1 遺伝子発現制御異常に起因するグルクロン酸抱合体排泄機能障害に基づく疾患について 第 87 回日本生化学会大会 (京都) プログラム, p. 42, 2014 年 10 月 16 日
4. Masahiko Yamaguchi, Masakazu Matsui, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, Junko Sugatani: Platelet-activating factor receptor deficiency exacerbates diet-induced obesity and glucose metabolism disorders. The 2nd International Conference on Pharma and Food (Shizuoka), Abstract, p. 108, 2014 年 11 月 6 日
5. Masahiko Yamaguchi, Masakazu Matsui, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, Masao Miwa, Satoshi Ishii, Takao Shimizu, Junko Sugatani: A platelet-activating factor (PAF) receptor deficiency exacerbates diet-induced obesity and PAF/PAF receptor signaling up-regulates an energy expenditure inducer in adipocytes. 6<sup>th</sup> international conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators (Tokyo), Abstract, p. 134, 2015 年 2 月 11 日
6. 松井雅和, 山口賢彦, 須山大輔, 宮武将之, 山崎泰広, 五十里彰, 菅谷純子: 肥

満誘発マウスの慢性炎症における血小板活性化因子の機能解明 第 79 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (松本) プログラム, p.70, 2015 年 5 月 23 日

7. Junko Sugatani, Yuji Noguchi, Yoshiki Hattori, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari: Threonine-408 regulates the stability of the human pregnane X receptor through its phosphorylation and the CHIP/chaperone- autophagy pathway. 20<sup>th</sup> North American ISSX Meeting (Orland, USA), Abstract, p.147-p.148, 2015 年 10 月 19-21 日
8. 松井雅和, 山口賢彦, 須山大輔, 宮武将之, 山崎泰広, 五十里彰, 菅谷純子: 血小板活性化因子受容体欠損で誘発された肥満マウスの慢性炎症反応とその制御機構の解析 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)、プログラム, p.288, 2015 年 12 月 2 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~rinsho/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菅谷 純子 (SUGATANI JUNKO)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号: 3 0 0 9 8 1 3 1

##### (2) 研究分担者

山口 賢彦 (YAMAGUCHI MASAHIKO)  
静岡県立大学・薬学部・助教  
研究者番号: 0 0 6 3 2 6 3 9