

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670457

研究課題名(和文) ベージュ細胞の分化の新たな経路～脂肪細胞特異的EID1過剰発現マウスの解析

研究課題名(英文) A novel pathway of the differentiation of Beige cells - analysis of adipocyte specific EID1-overexpressed mice

研究代表者

鯉淵 典之 (Koibuchi, Noriyuki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80234681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：EID1のin vivoにおける機能を解析するため、脂肪細胞特異的にEID1を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを樹立した。このマウスを用いてEID1の脂質代謝における機能を解析するため、環境刺激及びPPAR アゴニストによる影響を検討した。野生型およびEID1 Tgを幾つかの条件で刺激し、脂肪組織を摘出しEID1蛋白の発現をWestern blot法により解析している。また、室温と寒冷刺激後の褐色脂肪組織におけるグルコース動態を18-Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET)により解析中である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the function of EID1 in the adipogenesis in vivo, we generated mice overexpressed EID1 only adipose tissues (subcutaneous, visceral and brown adipose tissues). We confirmed a successful integration of the expression vector into the genome of mice by PCR. However, we could not furthermore confirm the protein expression of EID1 in adipose tissues by western blot analysis. We are currently trying a variety of approaches to protein expression of EID1 in the transgenic mice, including cold exposure, intake of high-fat diet and administration of PPAR agonist such as Rosiglitazone. Moreover, we are analyzing the glucose kinetics in brown adipose tissue of EID1 transgenic mice after cold exposure by 18-Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET).

研究分野：内分泌生理学

キーワード：褐色脂肪 EID1 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ は核内ホルモン受容体(NR)スーパーファミリーの 1 つでリガンド依存性の転写因子として白色及び褐色脂肪細胞の発生・分化に重要な働きをする。元来、白色及び褐色脂肪細胞は起源の異なる細胞と考えられてきたが、近年、白色脂肪組織(white adipose tissue:WAT)の中から何らかの刺激により褐色脂肪細胞様の機能を持つベージュ細胞が分化し(browning)、エネルギー代謝やインスリン感受性を改善することが分かってきた。PPAR γ は pRB とともに脂肪細胞の発生において重要な役割を果たす。pRB の発現が抑制されている線維芽細胞または ES 細胞では高度なミトコンドリア発現と UCP1、PGC-1 α ミトコンドリア遺伝子の高い発現を示す褐色脂肪表現型を示す。

興味深いことに、pRB は直接 PGC-1 α プロモーターに結合して、その転写を抑制することが報告されている。筋細胞分化における抑制因子である EP300 interacting inhibitor of differentiation 1 (EID1) の過剰発現により前脂肪細胞(3T3-L1 細胞)におけるトリグリセリド貯蔵を減少させることが報告された(Lizcano F and Vargus D, 2010)。(EID1 は p300 のヒストン acetylase 活動を阻害することによって筋細胞分化を抑制し、MyoD の転写を減弱させることが知られる。)この機序は EID1 が脂肪細胞分化の開始期に pRB と結合して、PGC-1 α プロモーターに結合できる pRB レベルを低下させるためであることが示唆された。また、3T3-L1 細胞における EID1 の過剰発現により、褐色脂肪組織における UCP1 と PGC-1 α (その両方はカロリー消費と熱発生に関与している)との発現増加が引き起こされる。

2. 研究の目的

本研究では、近年我々が樹立した脂肪細胞特異的に EID1 を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを用いて EID1 の脂質代謝における機能の解明と環境刺激及び胎生早期の環境化学物質による影響を検討することを目的とする。

本研究の意義: 本研究から白色脂肪組織における browning の新たな機序が存在することが明らかとなり、肥満や代謝症候群、糖尿病の新たな創薬のターゲットとなることが期待された。さらに、環境刺激による影響を解析することにより EID1 の環境感受性についても解析する。寒冷曝露や運動刺激など TH の分泌刺激と共通であり、申請者が従来研究してきた TH の知見も導入して、エネルギー代謝における位置づけを解明するとともに、本研究から運動処方

方法や減量薬の開発が進むなど、肥満対策に与える影響は大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、脂肪細胞特異的に発現する aP2 のプロモーター領域に融合させたトランスジェンを用いて、脂肪組織特異的に EID1 を発現する Tg マウスを樹立した。

(2) このマウスを用いて、EID1 の生体における機能を解析することを目的としている。本マウスを維持しつつ、本マウスの解析をまず行う。ついで、環境刺激や刺激物質による影響を解析する。タンパク発現を Western blot 法を用いて、褐色脂肪組織におけるグルコース動態を 18-Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET)により解析している。

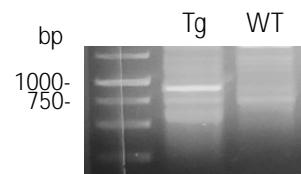
4. 研究成果

(1) EID1 トランスジェニックマウスの作成と維持

ヒト EID1 の cDNA の上流に脂肪組織における発現プロモーターである aP2 プロモーターを、下流に WPRE 配列を組み込んだ EID1 発現ベクターを構築した(下図参照)。



そのベクターを 240 個の受精卵に導入し 8 匹の雌の子宮に移植した。誕生した 25 匹の F₀ マウスから 2 系統の EID1 トランスジェニックマウス (Tg) を得た。野生型 (WT) と Tg の選別は PCR による genotyping により行っている(下図参照; Tg の場合、800 bp の PCR 産物が出現する)。平成 28 年 4 月時点で、第 5 世代の EID1 Tg を維持している。

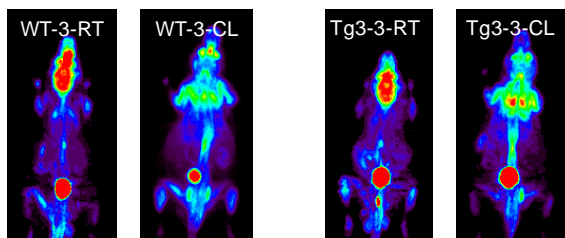


(2) EID1 トランスジェニックマウスの解析

野生型および EID1 トランスジェニックマウスの皮下脂肪、内臓脂肪、褐色脂肪組織を摘出し EID1 タンパク質の発現を Western blot 法によって解析した。全ての組織において野生型および EID1 トランスジェニックマウスで発現に有意な差はなかった。そこで現在、寒冷曝露や高脂肪食の摂取、PPAR γ に対する特異的なアゴニストである Rosiglitazone の投与など様々な手法を用いて導入した EID1 の発現を刺激することを試みている。

さらに、WT と Tg における室温 (RT) と寒冷刺激後 (60 分, 4 °C; CL) の褐色脂肪組織

におけるグルコース動態を FDG-PET により解析中である (以下に解析画像の一部を示す)



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 10 件)

1. Vargas D, Shimokawa N, Kaneko R, Rosales W, Parra A, Castellanos Á, Koibuchi N, Lizcano F. Regulation of human subcutaneous adipocyte differentiation by EID1. *Journal Molecular Endocrinology* 査読有 56, 113-122, 2016. DOI: 10.1530/JME-15-0148.
2. Tsunoda D, Iizuka H, Ichinose T, Iizuka Y, Mieda T, Shimokawa N, Takagishi K, Koibuchi N. The Trk family of neurotrophin receptors is downregulated in the lumbar spines of rats with congenital kyphoscoliosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 査読有 412, 11-18, 2016. DOI: 10.1007/s11010-015-2603-z.
3. Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, Shimokawa N, Chin WW, Koibuchi N. Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* 査読有 156, 1565-1576, 2015. DOI: 10.1210/en.2014-1079.
4. Shimokawa N, Koibuchi N. Downregulation of receptor tyrosine kinases through ubiquitination: analysis by immunodetection. *Methods in Molecular Biology* 査読有 1233, 121-133, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-1789-1_12.
5. Shimokawa N. Significance of CIN85 analysis in nutritional study. *Journal of Nutritional Biology* 査読有 1, 1-6, 2015.
6. 角田大介, 下川哲昭, 飯塚伯, 鯉淵典之, 高岸憲二. 先天性脊柱側弯症モデルラットにおける遺伝子発現の網羅的解析. *Journal of Spine Research* 査読有 6, 157-160, 2015.
7. Lesmana R, Shimokawa N, Takatsuru Y, Iwasaki T, Koibuchi N. Lactational exposure to OH-PCB 106 causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environmental Toxicology* 査読有 29, 876-883, 2014. DOI: 10.1002/tox.21815.
8. Ichinose T, Lesmana R, Yamamoto A, Kobayashi T, Shitara F, Shimoyama D, Yusuke Takatsuru Y, Iwasaki T, Shimokawa N, Takagishi K, Koibuchi N. Possible involvement of IGF-1 signaling on compensatory growth of the infraspinatus muscle induced by the supraspinatus tendon detachment of rat shoulder. *Physiological Report* 査読有 2, e00197, 2014. DOI: 10.1002/phy2.197.
9. Shimokawa N, Yousefi B, Morioka S, Yamaguchi S, Ohsawa A, Hayashi H, Azuma A, Mizuno H, Furudate S, Haijima A, Takatsuru Y, Iwasaki T, Umezumi M, Koibuchi N. Altered cerebellum development and dopamine distribution in a rat genetic model with congenital hypothyroidism. *Journal of Neuroendocrinology* 査読有 26, 164-175, 2014. DOI: 10.1111/jne.12135.
10. Toya S, Takatsuru Y, Amano I, Shimokawa N, Koibuchi N. Early-life-stress affects the homeostasis of glutamatergic synapses. *European Journal of Neuroscience* 査読有 40, 3627-3634, 2014. DOI: 10.1111/ejn.12728.

[学会発表](計 14 件)

1. 佐藤友彦, 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之. EID1 は UCP-1 の発現を介して脂肪の蓄積を抑制する. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日-24 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
2. 下川哲昭, 板倉るい, 菅井郁美, 寺島星歌, 保角萌咲, 宮崎格心, 鯉淵典之. EID1 は褐色脂肪細胞のマーカーである PGC-1 α の発現増加を介して脂肪産生を抑制する. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日-24 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
3. Ariyani Winda, 岩崎俊晴, ウロ, 天野出月, 宮崎航, 高鶴裕介, 鯉淵典之. Augmentation of thyroid hormone

- receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced cerebellar morphogenesis by genistein and daidzein. 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日-24 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
4. Koibuchi N. Multiple actions of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone-mediated brain development. The 8th Congress Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. Nov. 22-25, 2015. Bangkok, Thailand.
 5. 岩崎俊晴, 鯉淵典之 脳発達期に発現するコファクターの解析 第 58 回日本甲状腺学会学術集会 2015 年 11 月 5-7 日 福島県文化センター (福島県・福島市)
 6. Iwasaki T, Yu L, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, Shimokawa N, Koibuchi N. Role of thyroid hormone in cerebellar development ~ analysis of transgenic mice expressing dominant negative thyroid hormone receptor in Purkinje Cells. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, June 21-24, 2014 Chicago
 7. Koibuchi N. Hormone and cerebellar development. 7th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum. May 8-10, 2015, Brussels, Belgium (Invited Speaker).
 8. Lesmana R, Iwasaki T, Iizuka Y, Shimokawa N, Koibuchi N. Aerobic training increases responsiveness of Na⁺/K⁺ ATPaseB1 gene to thyroid hormone in rat skeletal muscle. The Endocrine Society 97th Annual Meeting and Expo, Mar. 5-8, 2015, San Diego, CA, USA.
 9. 飯塚祐基, 栗原光累, 岩崎俊晴, Ronny Lesmana, 下川哲昭, 鯉淵典之 有酸素運動によるラット骨格筋における Na⁺/K⁺-ATPase 発現の増強 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集・第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日(月) 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)
 10. 岩崎俊晴, 于璐, 下川哲昭, 鯉淵典之 プルキンエ細胞におけるドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体の小脳発達に対する影響 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集・第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日(月) 神戸 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集・第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)
 11. 岩崎俊晴, Winda Ariyani, 早坂香保里, 栗原光累, 飯塚祐基, Ronny Lesmana, 下川哲昭, 鯉淵典之 天然植物イソフラボンのステロイド生体異物受容体(SXR)とシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ 3A4(CYP3A4)を介する薬物代謝機構 環境ホルモン学会第 17 回研究発表会 2014 年 12 月 9-10 日 東京大学山上会館 (東京都)
 12. Koibuchi N. In vivo imaging of neuronal circuit regeneration using multi-photon confocal microscope. International Brain Research Organization (IBRO) Advanced School. Sept 30 – Oct 3, 2014, Sunway, Malaysia (Invited Speaker)
 13. Koibuchi N, Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Shimokawa N. Disruption of postnatal cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in purkinje cells. 9th Federation of European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience. July 5-9, 2014. Milan, Italy
 14. 鯉淵典之, Ronny Lesmana, 岩崎俊晴 有酸素運動によるラット骨格筋における甲状腺ホルモン感受性の変化 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 22-24 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
- 〔図書〕(計 4 件)
1. 岡野栄之, 鯉淵典之, 植村慶一 (監訳) (全 874 ページ)2016 オックスフォード生理学 丸善出版

2. 鯉淵典之,栗原敏(監訳)(全629ページ)
2014 リップンコットイラストレイテッド生理学 丸善出版
3. 鯉淵典之 甲状腺 2014 In: ギャノン
グ生理学 原書24版 (岡田泰伸 監
訳)(全860ページ)丸善出版 pp. 385-400.
4. 鯉淵典之 内分泌・栄養・代謝系 2014
In: カラーイラストで学ぶ 集中講義
生理学 改訂2版 (岡田隆夫編集)(全
347ページ)メジカルビュー社 pp.
290-317.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://nori3.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鯉淵 典之 (KOIBUCHI, Noriyuki)
群馬大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：80234681

(2)研究分担者

岩崎 俊晴 (IWASAKI, Toshiharu)
神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・
人間総合・専門基礎担当・教授
研究者番号：80375576

下川 哲昭 (SHIMOKAWA, Noriaki)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・健康栄

養学科・教授

研究者番号：90235680

(3)連携研究者

()

研究者番号：