

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670809

研究課題名(和文) 脂肪細胞の分化と脱分化制御の分子基盤解明研究

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms in differentiation and dedifferentiation of adipocytes.

研究代表者

兼松 隆 (Kanematsu, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10264053

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)：我々は、PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) 遺伝子欠損マウスを作製した。PRIPの遺伝子欠損マウスが痩せた表現型を示すことから、本研究では、PRIPが関与する脂肪分化と脱分化制御について解析した。PRIPが欠損すると、Prip-KO脂肪細胞の分化が著しく阻害されていた。一方、脂肪細胞からの脱分化脂肪細胞への転換には影響は無かった。本研究からPRIPは脂肪細胞の分化・肥大化を制御することが明らかとなり、PRIPを介した肥満の制御が新しい治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We produced PLC-related catalytically inactive protein-knockout (Prip-KO) mice. Prip-KO mice showed a lean phenotype. In this study, we examined whether PRIP is involved in adipocyte differentiation and/or dedifferentiation. Adipocyte differentiation was significantly inhibited in Prip-KO mice compared with wild-type mice. However, a feature of adipocyte dedifferentiation was similar between the two genotypes. This study demonstrated that PRIP regulates the process of adipocyte differentiation and hypertrophy. These findings are inspiring a novel therapeutic strategy for obese patients.

研究分野：薬理学、細胞生物学

キーワード：脂肪細胞 分化 脱分化 エネルギー代謝 脂肪代謝

1. 研究開始当初の背景

再生医療研究の目覚ましい進歩により、ヒト全臓器の再生はにわかに実現性が帯びてきた。この様な中、より安全な多分化能を有する再生医療用ドナー細胞の開発研究が盛んに進められている。胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、ドナー細胞の代表格であるが、倫理的な観点、樹立の困難さ、移植細胞の腫瘍化の問題などヒトへの応用には課題が多い。

最近、成熟脂肪細胞を体外で脱分化させて得られた脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) は、間葉系幹細胞と同等の多分化能を有することが明らかとなった。DFAT は成熟脂肪細胞を天井培養という簡便な方法で脱分化させ大量に調整でき、適切な分化誘導培地で培養すると、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、筋線維芽細胞などに分化転換することが明らかにされた。よって、再生医療用ドナー細胞として有用であると考えられている。

我々は、PRIP 遺伝子の欠損 (*Prip*-KO) マウスを解析する中、このマウスの脂肪細胞は、野生型に比べて外見上小さく、機能的にも様々な異常が見られる事をつきとめた。そこで、前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の PRIP 遺伝子を siRNA 法で knockdown し、脂肪細胞分化誘導実験を行ったところ、脂肪細胞分化が著しく阻害された。

先の *in-vitro* の脂肪細胞分化実験で著しく脂肪細胞分化が抑制されたにもかかわらず、*Prip*-KO マウスでは組織学上小さくはあるが白色脂肪細胞が出来る。また、申請時の予備的な実験において、*Prip*-KO 白色脂肪細胞を脱分化させ DFAT 作製を試みたところ野生型と比べて脱分化過程が異なる可能性を示唆する結果を得ていた。

そこで、PRIP を介した脂肪細胞の分化機構と成熟脂肪細胞の脱分化制御の分子基盤を解明する目的で研究を提案した。

2. 研究の目的

PRIP を介した脂肪細胞分化や脱分化の分子機構を解析して、脂肪代謝や生体のエネルギー代謝機構の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 野生型と *Prip*-KO マウスより調整した mouse embryonic fibroblast (MEF) や 3T3-L1 細胞に対して脂肪細胞分化誘導を行い、脂肪細胞分化制御の転写遺伝子群の発現変化を real-time PCR 法や western blot 法で解析した。

(2) 白色脂肪細胞を天井培養し、脱分化脂肪細胞 (DFAT) に分化させ、遺伝子発現変化を野生型 MEF と *Prip*-KO MEF を用いて解析した。

(3) 野生型 MEF と *Prip*-KO MEF から得た DFAT を再度分化誘導をおこない、脂肪細胞分化への PRIP 分子の関与を検討した。

(4) 高脂肪食をマウス個体に与えることで、新たに脂肪細胞を分化・肥大化させることが出来る。そこで、野生型と *Prip*-KO マウスを用いて高脂肪食負荷実験を行い各種解析を行った。

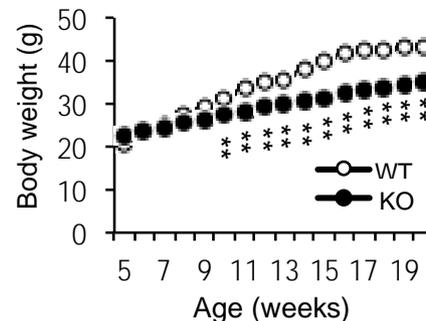
4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化誘導を行った MEF や 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化制御の転写遺伝子群の発現は低下しており、Oil Red O 染色で脂肪滴形成が抑制されていることを確認した。また、3T3-L1 細胞 (PRIP1 と PRIP2 の発現あり)あるいは、野生型 MEF における PRIP 遺伝子発現は、脂肪細胞分化とともに増加した。この結果は、PRIP 欠損により、脂肪細胞分化が抑制されることを示唆していた。

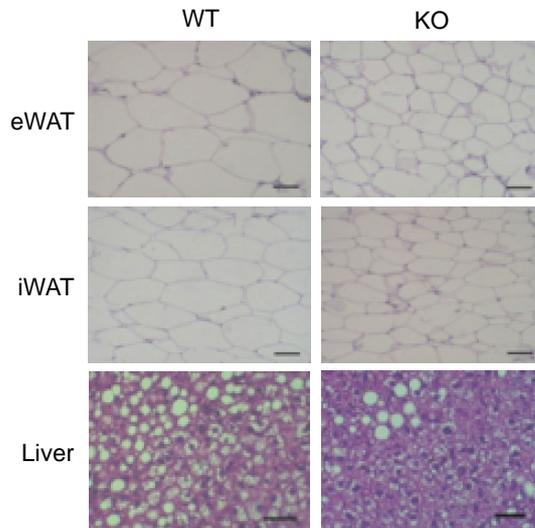
(2) 野生型 MEF と *Prip*-KO MEF の DFAT への脱分化誘導実験の結果、形態的な違いは両遺伝子間では観察されなかった。

(3) 野生型 MEF と *Prip*-KO MEF の DFAT を脂肪細胞に分化誘導をおこなった結果、野生型 DFAT の脂肪細胞分化を観察した一方で、*Prip*-KO DFAT では再分化は顕著に抑制されており、PRIP 分子の機能として脂肪細胞分化に関与することが明らかとなった。以上より、PRIP は脂肪細胞から多分化能細胞ソースを生み出すための制御分子の標的であるより、脂肪細胞への分化制御を担う分子であることが分かった。

(4) 通常食実験においても高脂肪食負荷実験においても、*Prip*-KO マウスは野生型マウスに比べて脂肪の肥大化が著しく抑制されていた。通常食実験から、PRIP 遺伝子欠損により、恒常的に脂肪分解が亢進していることが明らかとなった。その分子基盤としては、リパーゼの恒常的な活性化が原因であることを明らかにした (PLOS ONE, 2014)。一方、高脂肪食負荷実験の解析から、痩せ型表現型は様々な要因が複合して起こることが明らかとなった。1つの要因として、白色脂肪細胞における脂肪代謝亢進があるが、分解による遊離脂肪酸の異所蓄積も抑制されることから、他の要因に褐色脂肪細胞におけるエネルギー代謝亢進が関わることを明らかにした (J Biol Chem, 2016)。



高脂肪食負荷実験における野生型と *Prip*-KO マウスの体重変化 (J Biol Chem, 2016 より改変)



高脂肪食負荷実験における野生型と *Prip*-KO マウスの脂肪細胞 (eWAT, iWAT) と肝臓における病理像

(J Biol Chem, 2016 より改変)

次に寒冷刺激における幹細胞からベージュ脂肪細胞への分化における PRIP の役割を検討した。個体を用いた観察で *Prip*-KO マウスは野生型マウスに比べて分化に対する表現型に違いを示すようである。

本研究を通して、生体の脂肪代謝における PRIP 分子の役割の一端が明らかとなった。国内の学会や国際学会においてシンポジウム講演を行いこうした成果を発表しインパクトを与えることが出来た。また、国際的なジャーナルに掲載され新しい脂肪代謝の制御メカニズムとして高い評価を受けた。白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の起源となる細胞群が何かは未だ不明なことも多く、今後明らかにすべき点であるが、本研究を通して、PRIP 分子がこうした幹細胞のいずれかの段階に重要な働きを担う分子であることが示唆されたので、PRIP を介した脂肪細胞の分化制御の分子基盤を引き続き明らかにして行く。

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7件)

脂肪細胞における PRIP 機能解析論文

1. Oue K, Zhang J, Harada-Hada K, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takaka T, Irifune M, Kanematsu T. Phospholipase C-related Catalytically Inactive Protein Is a New Modulator of Thermogenesis Promoted by β -Adrenergic Receptors in Brown Adipocytes. J Biol Chem. 2016;291(8):4185–4196. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M115.705723.

2. 大植香奈、原田佳枝、兼松隆. 脱リン酸化制御による脂肪分解の新たな分子基盤. 日本薬理学会誌. 146, 93-97, 2015. 査読有. doi: <http://doi.org/10.1254/fpj.146.93>.

3. Okumura T, Harada K, Oue K, Zhang J, Asano S, Hayashiuchi M, Mizokami A, Tanaka H, Irifune M, Kamata N, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) regulates lipolysis in adipose tissue by modulating the phosphorylation of hormone-sensitive lipase. PLoS one 9 (6), e100559, 2014. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0100559.

関連論文 PRIP 機能解析

4. Toyoda H, Saito M, Sato H, Kawano T, Kawakami S, Yatani H, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced lateral inhibition in the barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 in mice. Pflugers Arch. 2015;467(7):1445-1456. 査読有. doi: 10.1007/s00424-014-1592-1.

5. Toyoda H, Saito M, Sato H, Tanaka T, Ogawa T, Yatani H, Kawano T, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced desensitization followed by unusual resensitization in GABA_A receptors in phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 double-knockout mice. Pflugers Arch. 2015;467(2):267-284. 査読有. doi: 10.1007/s00424-014-1511-5.

6. Asano S, Nemoto T, Kitayama T, Harada K, Zhang J, Harada K, Tanida I, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion. Biology Open. 8:3(6): 463-474, 2014. 査読有. doi: 10.1242/bio.20147591.

7. Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. PLoS one 9 (5), e98285, 2014. 査読有. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098285>

[学会発表](計10件)

1. 大植香菜, 入船正浩, 兼松隆 :

Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates beta-adrenergic receptor-mediated thermogenesis in brown adipocytes: 第 48 回広島大学歯学会総会 (広島), 6月 27 日 2015.

2. 兼松隆, 大植香菜 .PRIP は褐色脂肪細胞における非ふるえ熱産生を調節している: 第 127 回日本薬理学会近畿部会(岐阜), 6月 26 日 2015

3. Kanematsu T, Oue K, PRIP regulates feeding behavior and energy metabolism. The International Symposium on Neuroscience in Orofacial sensory-motor functions (ISNO2015) (Osaka), 10-11 May 2015. (国際シンポジウム講演)

4. 兼松隆: *Prip* 欠損マウスにおける耐肥満性とエネルギー消費亢進の分子メカニズム: 大植香菜, 入船正浩, 2015 年度 食と健康セミナー, (広島), 2月 14 日 2015.

5. 兼松隆: エネルギー代謝機構や摂食調節機構に関わる新規分子の機能解明: FIRST シンポジウム「科学技術が拓く 2030 年」へのシナリオ (東京), 2月 14 日 2015.

6. 兼松隆: 脂肪細胞における脂肪代謝とエネルギー調節: 第 2 回口腔科学研究会 (盛岡), 12月 13 日 2014.

7. 脂肪分解やインスリン分泌を調節する新たな分子の役割解明 楽して痩せられるのか: 兼松隆: 昭和大学セミナー (東京), 7月 31 日 2014.

8. 兼松隆: PRIP-regulated GABA signaling involved in regulation of feeding behavior. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡), 9月 25-27 日 2014. サテライトシンポジウム講演

9. 兼松隆: PRIP が調節する GABA シグナリンと摂食調節: 第 1 回口腔科学研究会 (大阪), 9月 7 日 2014.

10. 大植香菜, 入船正浩, 兼松隆: Mice lacking phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) are protected from high-fat diet-induced obesity: 第 47 回広島大学歯学会総会 (広島), 6月 21 日 2014.

[図書] (計 4 件)

1. 兼松隆: PRIP 研究の新展開: 内藤記念科学振興財団 時報 95 号, pp39, 2015.

2. 原田佳奈, 原田佳枝, 兼松隆: オートファジー系を介した黄色ブドウ球菌排除機構における PRIP の役割解明: Japanese Society for Proteases in Pathophysiology News Letter, No.35, pp22-23, JAN. 2015.

3. Harada-Hada K, Kanematsu T: Molecular basis involved in autophagy-mediated clearance of intracellular pathogens: Proc. 6th

Hiroshima Conf. Educ. Sci. Dent., 2015, pp. 99~101, 2015.

4. 兼松隆: エネルギー代謝機構や摂食調節機構に関わる新規分子の機能解明: 最先端研究開発支援プログラム「科学技術が拓く 2030 年」へのシナリオ, pp63, 2014.

[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
細胞分子薬理学 HP
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shiyaku/>

「研究最前線」より生体のエネルギー代謝や脂肪分解を制御する新たな分子
http://s-ja.hiroshima-u.jp/upload_files/download_files/BHS_NEWS_8_Kanematsu_0.pdf

広島大学歯学部案内
<http://hiroshima-u.jp/dent/brochure/information>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 10264053

(2) 研究分担者

浅野 智志 (ASANO SATOSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 30570535

原田 佳枝 (HARADA KAE)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助

教

研究者番号： 6 0 4 3 2 6 6 3

山脇 洋輔 (YAMAWAKI YOSUKE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助

教

研究者番号： 9 0 5 8 4 0 6 1

(3)研究協力者

大植 香菜 (OUE KANA)

広島大学病院・歯科診療医