

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860041
研究課題名(和文) 未分化間葉系幹細胞の成熟脂肪細胞への分化過程で発現変動する遺伝子の機能解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanism to Maintain Adipose-derived Stem Cells in an Undifferentiated and quiescent State

研究代表者
山口 賢彦 (Yamaguchi, Masahiko)
静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00632639
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織には増殖して脂肪細胞へと分化する間葉系幹細胞(ADSC)が存在している。本研究では幹細胞性を維持する遺伝子の解明を目的とした。マウス脂肪組織からADSCを分取して網羅的遺伝子発現解析を行い、ADSCにて高発現する核内受容体Nr4a1/2/3を同定した。脂肪前駆細胞にNr4a1/2/3を強制発現させた結果、脂肪分化促進因子の発現が低下した。また、ADSCを播種してcAMPアナログを添加すると、Nr4a1/2/3の発現は増加し、脂肪分化促進因子の発現は低下した。以上の結果からNr4a1/2/3はcAMPによって発現が誘導され、脂肪分化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells (ADSCs) into mature adipocytes associate with development of obesity. Nutritional stimulation induces ADSCs proliferation and differentiation, but molecular mechanisms to maintain ADSCs in an undifferentiated and quiescent state are largely unknown. To identify genes essential for the mechanism, microarray analysis was performed using freshly isolated murine ADSCs and 4-day cultured ADSCs (preadipocytes). In ADSCs, 312 probes of transcriptional factors were up-regulated and we focused on nuclear receptor 4a subfamily (Nr4a1, Nr4a2, and Nr4a3), which play diverse roles including metabolic processes. We overexpressed each Nr4a receptor into ADSCs to evaluate the functions of differentiation. Nr4a over-expression decreased marker of adipogenic factors, which is altered by application of cAMP analogue. These data suggested that Nr4a1/2/3 inhibited cell proliferation and adipogenesis in a cAMP-dependent manner.

研究分野：生物系薬学

キーワード：組織幹細胞 脂肪組織 核内受容体 GPCR 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と慢性炎症、それによって引き起こされるインスリン抵抗性が糖尿病やメタボリック症候群の病態基盤にあることが明らかとなりつつある。肥満は既存の成熟脂肪細胞が中性脂肪を合成・貯蔵して肥大化するだけでなく、脂肪組織由来の間葉系幹細胞(以下、脂肪幹細胞と記述する)が増殖して成熟脂肪細胞に分化し肥大化することも一因であると示されている。従って脂肪幹細胞をターゲットとした新たな戦略による肥満治療が可能であるが、その確立には至っていない。その根本的な原因は、脂肪細胞研究は主に増殖・分化が進んだ培養細胞を用いて行われてきたため、生体内で脂肪幹細胞の数と性質がどのような分子機構によって制御されているか殆ど理解されていない点にある。

そこで申請者は細胞表面抗原を利用したフローサイトメトリー法によって、マウス脂肪組織から脂肪幹細胞(Sca-1+CD31-CD45-細胞)を直接的に単離する方法を確立した。単離した脂肪幹細胞はG0期・未分化性を維持している一方で、脂肪細胞研究でよく用いられる初代培養の脂肪前駆細胞や細胞株は増殖・分化が進行しており、両者の性質は明らかに異なっていた。そこで脂肪幹細胞と初代培養の脂肪前駆細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、脂肪前駆細胞よりも脂肪幹細胞で高発現している遺伝子群を同定した。同定した遺伝子群の中には受容体や転写因子、細胞遊走の調節因子など一般的に細胞の分化運命や動態を制御する因子が多数含まれており、脂肪幹細胞において何らかの機能的役割を担っていることを示唆していた。

2. 研究の目的

脂肪幹細胞は増殖して成熟脂肪細胞に分化するため、その制御機構の解明は肥満を根本的に改善する新たな治療法の確立に繋がる。そこで申請者は脂肪幹細胞において高発現する遺伝子群の中で、核内受容体であるNr4a1/2/3、Gタンパク質共役型受容体であるGpr3に着目した。本研究では脂肪幹細胞をターゲットとする新たな肥満治療法を確立するため、申請者が新規に同定したこれら遺伝子群の機能を明らかにし、脂肪幹細胞の増殖や分化/未分化を制御する分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

単離した脂肪幹細胞のcDNAを用いてNr4a1/2/3とGpr3の各遺伝子をクローニングし、レトロウイルスベクターに組み込んで強制発現系を構築した。次にNr4a1/2/3とGpr3の各遺伝子を脂肪前駆細胞に強制発現させ、増殖能に及ぼす影響はWST-1アッセイ法にて定量し、脂肪分化に対する作用はOil red O染色による細胞内脂肪滴の蓄積度、及び、脂肪細胞の分化マーカー(C/EBPα、

PPARγ)の発現量をqRT-PCR法と免疫染色法にて定量することで評価する。これらin vitroの実験から、Nr4a1/2/3とGpr3の中で脂肪幹細胞の増殖・分化を制御する遺伝子の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

Gpr3はリガンド非依存的に活性化するGタンパク質共役型受容体であり、細胞内cAMP/cGMP濃度を増加させることが報告されている。また、脂肪分化培地に含まれるインブチルメチルキサンチン(IBMX)はホスホジエステラーゼを阻害しcAMP/cGMP濃度を増加させることで脂肪分化を促進させる。Gpr3とIBMXの相反する分化調節作用を詳細に解析した結果、Gpr3はIBMXの存在下では脂肪分化を抑制し、IBMXの非存在下では促進することが明らかとなった。さらにGpr3の作用はcAMPアナログの添加により代替され、PKA阻害剤により抑制された。これらの結果から、Gpr3はcAMP/PKAシグナルを介して脂肪分化を調節することが示唆された。さらに、cAMPアナログはNr4a1/2/3の発現を上昇させ、脂肪分化を抑制した。Gpr3を発現させた脂肪前駆細胞ではNr4aの発現上昇が認められることから、Gpr3がcAMP/PKA経路を介してNr4a1/2/3の発現を誘導し、脂肪分化を調節している可能性が示された。

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8件)

1. Fujii N, Matsuo Y, Matsunaga T, Endo S, Sakai H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J, Ikari A.: Hypotonic Stress-Induced Down-Regulation of Claudin-1 and -2 Mediated by Dephosphorylation and Clathrin-Dependent Endocytosis in Renal Tubular Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 2016 Oct 12. pii: jbc.M116.728196.

2. 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, 137-50 (2016)

3. Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S.: Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Rep.*, 13, 302-314 (2015)

4. Yamaguchi M, Murakami S, Yoneda T, Nakamura M, Zhang L, Uezumi A, Fukuda S, Kokubo H, Tsujikawa K, Fukada S.: Evidence of Notch-Hesr-Nrf2 Axis in Muscle Stem Cells, but Absence of Nrf2 Has No Effect on Their Quiescent and Undifferentiated State. *Plos One.*, 10, e0138517 (2015)
5. Sonoki H, Sato T, Endo S, Matsunaga T, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J, Ikari A.: Quercetin Decreases Claudin-2 Expression Mediated by Up-Regulation of microRNA miR-16 in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Nutrients.*, 7, 4578-4592 (2015)
6. Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S: Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development*, 142, 51-61 (2015)
7. 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, 482-495 (2015)
8. 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).

[学会発表](計9件)

1. 山口賢彦、嘉山節子、内山 瑛美、須山 大輔、高橋 茉那、石村 裕樹、山崎 泰広、五十里 彰、菅谷 純子
脂肪組織由来間葉系幹細胞で高発現する Nr4a1/2/3 の機能解析
日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016-03-27
2. 嘉山節子、山口賢彦、山崎泰広、五十里 彰、菅谷純子
Nuclear receptor 4a family が関わる脂肪幹

細胞の細胞分化進行抑制機構の解析
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, 2015-12-01

3. 嘉山節子、山口賢彦、内山瑛美、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子
脂肪幹細胞において高発現する Nuclear receptor 4a family 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, 2015-05-23

4. 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.
6th International Conference on PLA2 and lipid mediators, 東京, 2015-02-10

5. 山口賢彦、嘉山節子、内山瑛美、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子
間葉系幹細胞の未分化状態維持に関わる分子機構の解析
第 37 回日本分子生物学会, 横浜, 2014-11-27

6. Masahiko Yamaguchi, Masakazu Matsui, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari and Junko Sugatani
Platelet-Activating Factor Receptor Deficiency Exacerbates Diet-induced Obesity and Glucose Metabolism Disorders.
The 2nd International Conference on Pharma and Food, 静岡, 2014-11-06

7. Emi Uchiyama, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari and Junko Sugatani
The role of G-protein-coupled receptors highly expressed in adipose-derived stem cells.
The 2nd International Conference on Pharma and Food, 静岡, 2014-11-06

8. 内山瑛美、山口賢彦、山崎泰広、五十里 彰、菅谷純子
未分化間葉系幹細胞機能維持に関わる分子機構の解析
第 60 回日本薬学会東海支部 総会・大会, 三重, 2014-07-05

9. 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, 2014-06-07

〔図書〕(計0件)

〔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
静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学分野 HP
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賢彦 (Yamaguchi Masahiko)
静岡県立大学・薬学部・助教
研究者番号：00632639

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()