

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860700

研究課題名(和文) 脂肪細胞の褐色化における亜鉛シグナルの役割解明

研究課題名(英文) The elucidation of the role of zinc signal in adipocyte browning

## 研究代表者

福中 彩子 (Fukunaka, Ayako)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：60586402

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)：Zip13-KOマウスの皮下脂肪組織でベージュ脂肪細胞が増加(脂肪細胞褐色化)することをこれまで観察していた。そこで、本研究ではZIP13が制御する褐色化誘導メカニズムを明らかにすることを目標とした。詳細な解析の結果、ZIP13は細胞・個体レベルで脂肪細胞褐色化を抑制すること、さらにZIP13の亜鉛輸送能が褐色化抑制に必要なことを見出した。今後ZIP13を介する亜鉛がどのように褐色化抑制を行うか、その分子機構の解明を行う。

研究成果の概要(英文)：Brown fat tissue in adult humans is composed mainly of beige-like adipocytes. The molecular circuits involved in beige adipocyte biogenesis and thermogenesis have not been fully elucidated. Here, we demonstrate that Zip13-KO preferentially promotes beige adipocyte biogenesis and energy expenditure, and ameliorates diet-induced obesity. Furthermore, ZIP13-mediated zinc transport is a prerequisite for inhibiting beige adipocyte differentiation. Our data reveal an unexpected association between zinc homeostasis and beige adipocyte biogenesis, which may contribute significantly to new therapies for obesity.

研究分野：代謝

キーワード：亜鉛トランスポーター 脂肪細胞褐色化 ベージュ脂肪細胞 亜鉛輸送 エネルギー消費

## 1. 研究開始当初の背景

欧米型の肥満を伴う 2 型糖尿病患者数は日本人においても増加の一途をたどっており、その病態の解明と、新規治療薬の開発は急務である。肥満の病態形成に重要な役割を果たす脂肪細胞は、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞に機能的に分けられる。白色脂肪細胞は余剰なエネルギーを中性脂肪として貯蔵するのに対し、褐色脂肪細胞はエネルギーを消費し熱を産生する機能を持つ。近年、白色脂肪細胞が存在する皮下脂肪組織中に褐色脂肪細胞様のベージュ脂肪細胞が存在することが報告され、ベージュ脂肪細胞は寒冷刺激などによって誘導・活性化され、エネルギーを消費することができる細胞であることがわかってきた。また、昨今のイメージング技術の発展によって、ヒト成人においても活発な褐色脂肪細胞が存在することが示され(Ouellet J. et al., *Cell Metab.* (2011))、それはマウスのベージュ脂肪細胞に特徴が似ていることが示されている(Shinoda K. et al., *Nat Med.* (2015))。さらに、2 型糖尿病患者においてベージュ脂肪細胞の活性化によって末梢組織のインスリン抵抗性が改善されることが報告され(Hanssen MJ. et al., *Nat Med.* (2015))、2 型糖尿病の治療の一つのとしてベージュ脂肪細胞活性化が有効であることが明らかにされつつある。このような背景から、ベージュ脂肪細胞の活性化機構や調節機構の解明が、肥満や糖尿病対策の観点から注目を集めている。

亜鉛は様々な生体機能に必要である。近年、亜鉛トランスポーターを介する亜鉛シグナルが生命活動に深く関わることを示されており、亜鉛シグナルの健康と病気への関与に注目が集まっている。一方で、糖尿病などの生活習慣病における亜鉛や亜鉛シグナルの役割やその分子メカニズムは明らかではなく、申請者

らはその解明に取り組んできた(Tamaki M, et al., *J Clin Invest.* (2013), Fujitani Y, et al., *Zinc signals in cellular functions and disorders* (2014))。

亜鉛トランスポーター *Zip13* のノックアウトマウス (*Zip13-K0* マウス)や変異型 ZIP13 を保持するエーラス・ダンロス症候群患者では脂肪萎縮症の存在が指摘されていたことから(Bin BH, et al., *EMBO MM* (2014))、脂肪組織における ZIP13 の役割に着目して解析を進めた。その結果、*Zip13-K0* マウスでは、皮下脂肪組織でベージュ脂肪細胞が顕著に増加(脂肪細胞褐色化)することを見出した。またベージュ脂肪細胞が増加することにより個体に及ぼす影響について調べたところ、*Zip13-K0* マウスではコントロールマウスに比べてエネルギー消費量が亢進することが判明した。さらに、野生型マウスでは高脂肪食下で飼育した場合、通常食で飼育したものと比較して体重が増加し肥満を呈する一方で、*Zip13-K0* マウスでは高脂肪食を負荷しても体重の増加は見られず肥満にならないことを見出した。これらの結果から *Zip13-K0* マウスではベージュ脂肪細胞が増加することにより、エネルギー消費量が増え、それにより肥満に抵抗性を示す可能性が考えられた。また、*Zip13-K0* マウスでのベージュ脂肪細胞の増加が脂肪細胞自律的におきていることを *ex vivo* 培養を実施し、確認した。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、*Zip13-K0* マウスの皮下脂肪組織でベージュ脂肪細胞が増加(脂肪細胞の褐色化)することが示唆される。そこで本研究では、ZIP13 が制御する脂肪細胞褐色化誘導メカニズムを明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 不死化前駆脂肪細胞の樹立

コントロールマウスと *Zip13*-KO マウスの鼠蹊部から前駆脂肪細胞を採取し、SV40T 抗原を発現するレトロウイルスに感染させ、前駆脂肪細胞を不死化した。不死化した細胞で分化誘導を行い褐色化の程度を褐色脂肪細胞マーカー遺伝子の発現を指標に定量した。

#### (2) 細胞質内亜鉛量測定

ZIP13(野生体もしくは ZIP13 の亜鉛輸送に重要だと考えられる膜貫通領域内のヒスチジン残基やアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異体)を発現するレトロウイルスを C3H10T1/2 細胞に感染させ、細胞質内の亜鉛量を MT1 (メタロチオネイン) の発現を指標に観察した。

#### (3) 免疫沈降

ZIP13 は 2 量体を形成し、亜鉛を輸送することが知られている。そこで(2)で同定した亜鉛輸送能欠失変異体(変異体)がホモフィリックな結合様式を示すか観察した。HEK293 細胞に HA タグと Myc タグをそれぞれ C 末に付加した ZIP13 (野生体もしくは変異体)を発現するプラスミドを導入し、その細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体で免疫沈降を行った。その後ウエスタンブロットを施行し、結合様式を観察した。

#### (3) 免疫染色

ZIP13 はゴルジ体に局在することが報告されていることから(2)で同定した変異体がゴルジ体に局在するか観察した。前駆脂肪細胞に ZIP13-HA(野生体もしくは変異体)を発現させた細胞を用いて、抗 HA 抗体と抗 GM130 抗体(ゴルジ体マーカー)で免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

*Zip13*-KO マウスで見られた褐色化亢進が、

細胞レベルで観察できるか検討した。間葉系幹細胞(C3H10T1/2 細胞)は褐色化の誘導を行うと、褐色脂肪細胞へと分化できることが知られている。そこで C3H10T1/2 細胞を用いて *Zip13* のノックダウンを行い、褐色化の誘導を行ったところ、コントロールの細胞に比べて褐色化の亢進が見られた。次に *Zip13*-KO マウスとコントロールマウスから前駆脂肪細胞を採取し、不死化細胞を樹立した。不死化した細胞においても *Zip13* を欠損させると褐色化が亢進すること、さらには *Zip13*-KO 細胞に ZIP13 を外因性に発現させると褐色化は抑制できることが判明した。これらの結果から、C3H10T1/2 細胞、不死化前駆脂肪細胞株共に、ZIP13 の機能解析を行う上で良いツールとなることがわかり、以降の実験ではこれらの細胞を用いて解析することにした。現在これらの細胞株を用いて、褐色化に重要な因子の発現変化を解析している。

続いて、ZIP13 の褐色化に必要な領域を同定することにした。ZIP13 は ZIP ファミリーに属し、そのファミリー間で保存された膜貫通領域内のヒスチジン残基は亜鉛の輸送に必要であることが示唆されている。そこで亜鉛の輸送が褐色化抑制に必要であるか調べることにした。ZIP13 の膜貫通領域内のヒスチジン残基をアラニンに置換した変異体を作成した。作成した変異体は細胞内局在やホモフィリックな結合は野生体と同様であるが、亜鉛輸送能は低下していることが判明した。また変異体を *Zip13*-KO 細胞に導入しても褐色化抑制が出来ないことから、ZIP13 の亜鉛輸送能が褐色化抑制に必要であることが明らかとなった(論文投稿中)。

(今後の課題)

従来から、脂肪細胞の機能における亜鉛の関与は想定されていたが、ベージュ脂肪細胞の

分化や活性化における亜鉛の役割は全く報告されていない。ZIP13 はゴルジ体から細胞質への亜鉛の輸送に関与することから、上記の結果は、ZIP13 を介したオルガネラから細胞質への亜鉛の流れが脂肪細胞の褐色化を制御するという全く新規のメカニズムがマウスおよびヒトにおいて保存されていることを意味する。ZIP13 による脂肪細胞褐色化抑制機構の解明は、これまでにない新しい抗肥満治療薬に繋がる可能性や、将来の臨床応用を見据えたトランスレーショナルリサーチに繋がる可能性を有しており、今後 ZIP13 を介する亜鉛がどのように褐色化抑制を行うか、その分子機構の解明を行う。

#### 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 2 件)

1. Shigihara N\*, Fukunaka A\*(equal contribution), Hara A, Komiyama K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y (Corresponding author), Watada H (Corresponding author). Human IAPP-induced pancreatic  $\beta$  cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest.* 2014 Aug;124(8):3634-44. PMID 25036706 査読有
2. Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y,

Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T (Corresponding author). Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med.* 2014 Jul 9;6(8):1028-42. PMID 25007800 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. Fukunaka A, Fujitani Y, Fukada T, Watada H, The 93<sup>rd</sup> annual meeting of the physiology society of Japan, Mar. 2016, Zinc transporter ZIP13 regulates adipocyte browning, (invited talk)
2. Fukunaka A, Fujitani Y, Fukada T, Kajimura S, Watada H, BMB2015 Dec. 2015, Kobe, Zinc transporter ZIP13 regulates adipocyte browning (invited talk)
3. 福中彩子 第 15 回 islet biology 研究会 2015 年 7 月 東京 2 型糖尿病における新たな治療標的 : IAPP と亜鉛シグナル (招待講演)
4. 福中彩子 第 10 回トランスポーター研究会 2015 年 6 月 東京 亜鉛トランスポーター ZIP13 による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)
5. 福中彩子 第 29 回肥満動物シンポジウム 2015 年 2 月 京都 エーラス・ダンロス症候群関連遺伝子 *Zip13* による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)

[図書] (計 4 件)

1. 福中彩子, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 ヒト IAPP が誘導する膵  $\beta$  細胞傷害とオートファジーによる制御 Diabetes update. 4(1):48(12-13). (2015)
2. 福中彩子, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 ヒト IAPP

が誘導する膵β細胞傷害とオートファジーによる制御 Diabetes

strategy. 5(1):47(28-29). (2015)

3. **福中彩子**、宮塚健、綿田裕孝 α細胞の発生・分化と可塑性 内分泌・糖尿病・代謝内科. 478(389-392) (2014)

4. Fujitani Y, Tamaki M, **Fukunaka A**, Watada H. Zinc and its role in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Zinc signals in cellular functions and disorders.** Springer, Tokyo 343(269-283) (2014)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福中 彩子 (Fukunaka, Ayako)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号：60586402