

令和 2 年 6 月 4 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860019

氏 名 黒田美都

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： サンフランシスコ （国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

脂肪組織繊維化に着目した褐色様脂肪細胞分化・代謝の新規調節機構の解明

3. 派遣期間：平成 30 年 6 月 1 日 ～ 令和 2 年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Physiology, University of California San Francisco

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

〔研究目的〕

本研究では脂肪組織の繊維化に着目し、ベージュ脂肪細胞分化・代謝の新規調節機能を解明することを目的とした。

〔研究背景〕

細胞は、生体内においてコラーゲンなどの細胞外基質(以下 ECM)に囲まれて存在しており、ECM を構成する分子の種類や量、さらに構成分子の架橋により生じる ECM の硬さといった物理的な要因が様々な細胞外微小環境を作り出している。これら物理的な要因が細胞応答に影響を及ぼすことが分かっており、例えば多分化能をもつ幹細胞は生体内の組織に近い硬さの培養基板上で培養されたとき、それぞれの組織の細胞に分化しやすいことが明らかになった (Cell, 2006. **126** 677)。すなわち、脂肪組織のような軟らかい ECM 上で培養された場合は脂肪細胞へと分化しやすい。これまでの研究によって、細胞と ECM の接点である接着部位に存在する、タンパク質ビンキュリンが ECM の硬さに応じた脂肪細胞への分化を調節していること、またその分子機構を明らかになった。しかし、生体内で組織の硬さがどのような生理的現象に参与しているのはほとんど明らかではない。

健康な人の脂肪組織は全身のエネルギーと代謝の恒常性維持に働くが、肥満病態に陥った脂肪組織ではコラーゲンの過剰な分泌と架橋によって繊維化と慢性炎症が生じている。繊維化と炎症は恒常性維持の制御機構の破綻を引き起こし、インスリン抵抗性や糖尿病などの疾患につながる (図 1)。一方で、近年、脂肪組織由来幹細胞からアドレナリン刺激によって熱産生を行うベージュ脂肪細胞が分化誘導されることがわかった。この誘導型の熱産生ベージュ脂肪細胞の増加はインスリン抵抗性や糖尿病の改善につながることをわかっており、糖尿病治療の有力な標的として注目されている。サイトカインの放出により炎症がベージュ脂肪細胞分化や代謝調節機能を抑制することが知られているのに対し (Am. J. Physiol. Endo. Metab., 2016. **310** E676)、脂肪組織の繊維化がどのようにベージュ脂肪細胞への分化や機能に影響を及ぼすかは全く不明である。

そこで、脂肪組織を構成する細胞が繊維化を感知することによっても、ベージュ脂肪細胞への分化や機能の抑制に働くと予想した。さらに、これまでの研究から、ビンキュリンが ECM の硬さを感知するセンサーであることが明らかであるため、当分子をマウス個体から欠損することで脂肪組織の繊維化感知の影響を解析できると考えた。

〔研究進捗状況および成果〕

脂肪組織特異的ビンキュリン欠損マウスの作製

ビンキュリン全身欠損マウスは胎生致死であり、ビンキュリンの遺伝子領域の前後に Cre リコンビナーゼ認識配列をもつビンキュリン flox マウスはすでに作製されている (Mol. Cell Biol., 2007. **27**(21) 7522)。ビンキュリン flox マウスを、脂肪組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現するアディポネクチン-Cre マウスと交配することで、脂肪細胞特異的ビンキュリン欠損マウスを作製した。初めに、ビンキュリンの欠損についてウェスタンブロッティングにより確認をおこなった。肩甲骨間に存在する褐色脂肪組織に

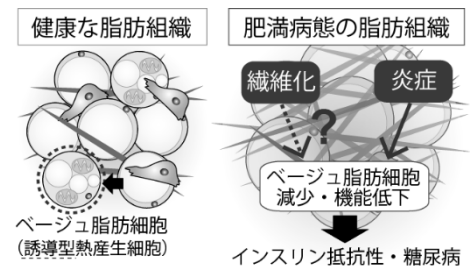


図 1. 脂肪組織による代謝恒常性維持

においては全組織を用いたサンプルにてビンキュリンの発現減少が確認できた。一方で鼠径部白色脂肪組織では顕著な発現抑制は見られなかった。アディポネクチンは成熟した脂肪細胞のみが発現するため、このシステムにおいては脂肪組織に存在する間質細胞におけるビンキュリンの発現は欠損されない。これは、上述のように間質細胞におけるビンキュリンの発現が非常に高いためであると考えられる。そこで白色脂肪組織を採取し、コラーゲナーゼ処理後に浮遊する、成熟脂肪細胞のみを単離し、ビンキュリンの発現確認を行った。その結果、確かにビンキュリンの発現が減少していることが確認できた。

脂肪組織特異的ビンキュリン欠損マウスの表現型解析

はじめにビンキュリン欠損マウスの熱産生能力について、寒冷刺激に応答した体温の測定により評価した。室温下にて飼育しているマウスを6℃に設定したコールドチャンバー内で飼育し、直腸温の測定を行った。その結果、ビンキュリン欠損マウス群では、野生型マウス群にくらべ、低温刺激開始の24時間および48時間後のマウス直腸温が有意に上昇していた(図2A)。さらに、肩甲骨間褐色脂肪組織における熱産生に關与するmRNA発現量について調べたところ、ビンキュリン欠損マウス群ではUCP1の発現量が高い傾向が見られた。一方で、マウス鼠径部脂肪組織においてはUCP1の発現量に差は見られなかった。ビンキュリンはアクチン結合タンパク質であり、アクチン細胞骨格による収縮力の発生が熱産生に關与することが報告されているため(Cell Met, 2018. 27 602)、ビンキュリンは寒冷刺激に應答した熱産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、代謝能についての評価を高脂肪食負荷試験により評価した。その結果、室温下において、ビンキュリン欠損マウス群は野生型マウス群に比べ体重が軽い傾向にあるものの、有意な差は見られなかった。一方で、興味深いことに、マウス体温に近い中温環境下(32℃)でマウスを飼育した場合には、ビンキュリン欠損マウスは野生型に比べ、有意に体重が減少した(図2B)。また糖負荷試験においても、耐糖能の改善が見られた。ビンキュリンを欠損により、代謝能の改善が見られることが明らかになった。マウスへの高脂肪食負荷試験により、体重増加と耐糖能の低下と同時に脂肪組織繊維化が進行することから、ビンキュリンが組織繊維化を感知してマウス代謝能を調節している可能性が示唆された。

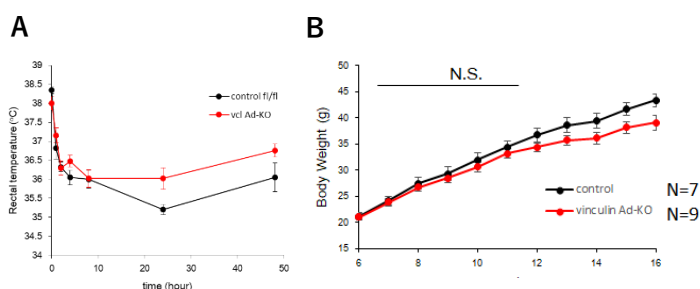


図2. 脂肪組織特異的ビンキュリン欠損マウスの表現型解析

脂肪組織の物理的性質の解析方法の確立

脂肪組織が繊維化すると、ECMの架橋増加により脂肪組織が硬くなることが考えられる。しかし、実際に定量的な物理的指標が変化するのは明らかではなかった。最近、脂肪組織は部位によってその硬さが異なることがShear Rheometerを用いた実験により明らかになった(Cell Met, 2018. 27 602)。そこで、この手法を用いて繊維化を評価できないかと考えた。まず、Shear

Rheometer (TA instrument AX2000)を用いて、野生型マウスの白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の貯蔵弾性率(Storage Modulus)を測定した(図3-A)。その結果、先行研究同様の測定結果が得られることが確認できた。次に、野生型のC57B6マウスに高脂肪食を負荷し、高脂肪食負荷4週間および12週間の実験条件において、褐色脂肪組織(BAT)

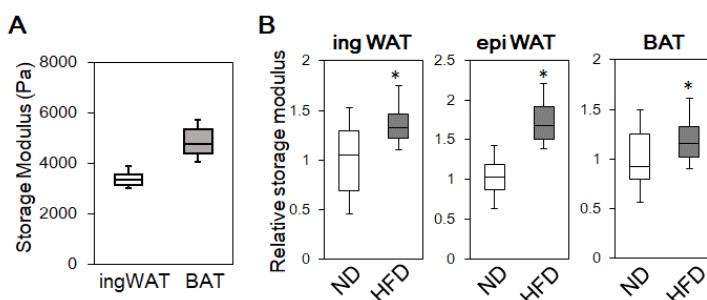


図3. 脂肪組織の貯蔵弾性率

および鼠径部皮下脂肪組織(inguinal WAT)、精巣上体内臓脂肪組織(epididymal WAT)の貯蔵弾性率を測定した(図 3-B)。高脂肪食負荷マウスの脂肪組織は、いずれの部位においても普通食負荷マウスの脂肪組織よりも貯蔵弾性率が増加していることが明らかになった。今後このような物理的な指標と肥満病態に何か関連があるのかさらに解析を進める予定である。

最近、断続的絶食(Intermittent fasting, EODF)といった食事制限により皮下脂肪組織に褐色脂肪細胞が増え、体重減少に有効であることが明らかになった(Cell Met. 2017 26 672)。そこで、今回確立した物理的指標によって脂肪組織の「質」が改善されたことを検出できるか試みた。8 回の絶食-食事サイクルの後、マウス脂肪組織の貯蔵弾性率を測定した(図 4)。これまでの結果と一致して、高脂肪食負荷により脂肪組織の硬さは増大したが、予想とは反して、EODF は ingWAT の硬さには影響を与えなかった。一方で epiWAT の硬さは有意に減少した。褐色脂肪細胞の増加はこの物理的指標によって計測することができなかったものの、この結果は脂肪組織の部位によって絶食効果が異なることを示唆していると考えている。高脂肪食負荷に応答した脂肪組織の繊維化については、C3H マウスと C57B6 マウスでは応答が異なることも報告されている(Cell Met. 2017 25 673)ことから、今後マウス系統の違いにも留意しながら、繊維化を物理的な指標でとらえ、生命現象を理解することにつなげたいと考えている。

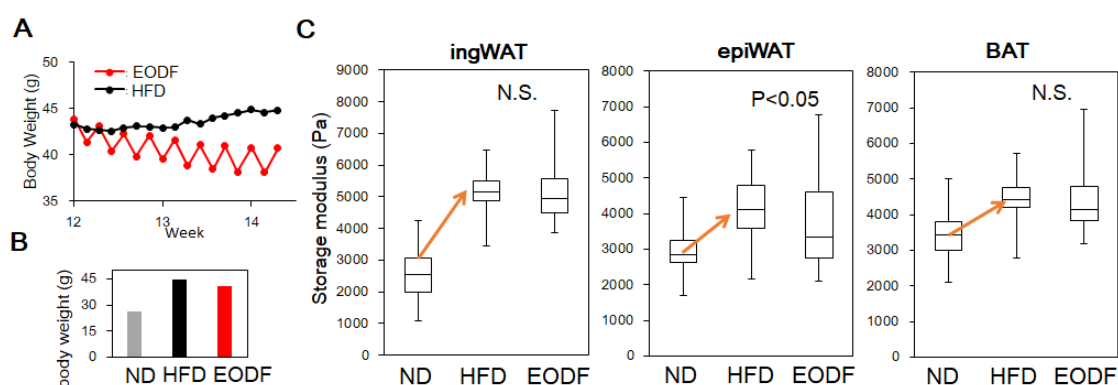


図 4. 食事制限が脂肪組織の貯蔵弾性率に与える影響

生体組織を模倣した細胞培養法の開発

繊維化した脂肪組織における詳細な細胞応答や分子機構が明らかになっていない原因として、有効な生体内環境を模倣した *in vitro* 実験系がないことが大きな障壁となっている。そこで、最近報告された Cell-derived Matrix(CDM)(Nat. Protocol, 2017. 12 2376)を用いた、新規脂肪細胞培養法の開発を目指した。まず、野生型 B6 マウスの皮下脂肪組織および内臓脂肪組織由来の初代培養幹細胞から、ECM 産生を誘導し、それらの細胞における ECM タンパク質の発現量および mRNA 発現量を調べた。さらに、界面活性剤処理によって細胞体を除いた ECM 画分(CDM)における ECM タンパク質の発現も調べた。その結果、内臓脂肪組織由来の CDM では皮下脂肪組織由来の CDM に比べてファイブロネクチンやコラーゲンの発現量が増加していることがわかった。次に、この CDM 上に播種した不死化脂肪組織由来幹細胞(iWAT-SV40 細胞)を褐色様脂肪細胞へと分化誘導し、脂肪細胞マーカーの mRNA 発現量を調べた。その結果、内臓脂肪組織由来の CDM 上で培養した iWAT-SV40 細胞は皮下脂肪組織由来の CDM 上で培養した場合に比べて、脂肪細胞マーカーの発現量が有意に減少した。このことから、脂肪組織に住む間質細胞が生み出す細胞外環境によって、ベージュ脂肪細胞分化が調節されていることが示唆された。

すでにピンキュリン欠損マウスより不死化脂肪組織由来幹細胞を樹立したので、今後はこの培養法によって細胞を培養することで、ピンキュリン欠損マウスにおいてみられた表現型のメカニズムが、ピンキュリンによる脂肪組織の繊維化に依存したものであるか解析を進めていきたいと考えている。