

氏名（本籍）	田口皓一郎（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第1136号
学位授与日付	令和2年4月15日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Role of Small Proliferative Adipocytes: Possible Beige Cell Progenitors
審査委員	（主査）教授 國貞 隆弘 （副査）教授 清水 雅仁 教授 大沢 匡毅

論文内容の要旨

脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が知られている。近年、白色脂肪組織中に、寒冷刺激や β 3-adrenergic receptor (ADRB3) 刺激により褐色脂肪細胞様形態に分化し、Uncoupling protein 1 (UCP1)を高発現し、熱産生を起こす beige 細胞が発見された。本研究では、脂肪組織内に beige 細胞の前駆細胞の特徴を有する細胞が存在することを見出し、これらの細胞を small proliferative adipocytes (SPA)と名付け、その細胞の性状の解析を行った。

【対象と方法】

C57/BL マウスの傍精巣脂肪と鼠径脂肪をコラゲナーゼ処理後、遠心分離にて 226 g 3分 で浮遊する mature white adipocytes (MWA)と 8 g 1秒 で沈降する stromal vascular cells (SVC), 8 g 1秒 で浮遊し 226 g 3分 で沈降する Fraction B に分画した。それぞれの細胞画分について、遺伝子やタンパク質の発現様式を、マイクロアレイ、real time PCR、イムノブロット、免疫染色、フローサイトメトリー (FCM)により解析した。C57/BL マウス腹腔内に ADRB3 作動薬 (CL316243)を 7日間投与することによって傍精巣脂肪組織や鼠径脂肪組織において beige 細胞を誘導し、それによって発現量が増加する遺伝子やタンパク質を検索した。

【結果】

Fraction B の細胞は、小型円形や紡錘形、線形を示し、しばしばクラスターを形成していた。培養後には、Fraction B の細胞の 85-95%について adiponectin (ADIPOQ)や leptin の発現が認められた。一方、SVC を培養した場合は、これらの遺伝子を発現する細胞は全体の 10%以下であった。ADIPOQ を発現した細胞はチミジンアナログの EdU の取り込むことより、これらの細胞が盛んに増殖していることが確認された。以上のことより、Fraction B を SPA と考え、以下の検討を行った。

FCM では、SPA の大きさは 3-18 μ m と広く分布する不均一な細胞群であった。また、マイクロアレイ解析により各細胞画分の遺伝子発現パターンを調べたところ、SPA では SVC と比較して *Adipoq* などの脂肪細胞特異的遺伝子や fatty acid binding protein 4 (*Fabp4*)などの白色脂肪細胞に多く発現する遺伝子の他、synuclein γ (*Sncg*), GABA receptor γ 2 (*Gabrg2*)などの神経細胞遺伝子が多く発現していた。また増殖因子とされる proliferin (*Plif*)が SPA で多く発現していた。MWA と SPA を比較すると、脂肪細胞遺伝子や神経細胞遺伝子のいくつかは前者で多く発現していた。Real time PCR の定量的解析で、脂肪細胞遺伝子や神経細胞遺伝子の発現強度は SVC < SPA < MWA で、*Plif*は SPA のみ発現していた。脂肪前駆細胞に発現する *Dlk-1*や *Pdgfra*, 褐色脂肪前駆細胞に発現する *Zic1*や *Myf5*は SPA と SVC で同等に発現する一方で、beige 細胞の前駆細胞のマーカーである *Cd137*や *Tbx1*

は SPA で多く発現していた。

SPA は分化刺激により脂肪滴を含む白色脂肪細胞に分化し、*Adipoq* や *Sncg*, *Plf* などの発現も増加した。一方、SVC では同様な分化刺激により白色脂肪細胞に分化するが、分化途中で *Plf* を発現することはなかった。また、SVC は骨芽細胞への分化刺激で骨芽細胞様細胞に分化したが、SPA には骨芽細胞への分化が起らなかった。傍精巣脂肪組織と鼠径脂肪組織由来の SPA を比較すると、内臓脂肪細胞の前駆細胞マーカーの *Wt1* は傍精巣脂肪組織由来の SPA でのみ発現していることが分かった。白色脂肪細胞への分化能を調べたところ、傍精巣脂肪組織由来の SPA でより脂肪滴形成が認められ、SPA から分化した白色脂肪細胞では熱産生に関連する *Ucp1* や *Pgc1a*, *Ppara*, *Adrb3* が分化前より発現上昇していた。一方、SVC を同様に分化誘導した場合にはこのような遺伝子発現上昇が認められなかった。

次に、SPA の beige 細胞への分化を検討した。Pioglitazone (Pio) と CL316243 の共刺激によって、傍精巣脂肪組織に由来する SPA は beige 細胞様形態となり *Ucp1* を発現したが、SVC は beige 細胞様の細胞への分化が認められなかった。一方で、鼠径脂肪組織由来の SPA は共刺激によってより強く *Ucp1* を発現し、SVC でも *Ucp1* を発現していた。また、C57/BL マウスに CL316243 を腹腔内投与すると、傍精巣脂肪組織と鼠径脂肪組織において *Plf* を発現する beige 細胞の出現が観察されたが、*Ucp1* 発現細胞は鼠径脂肪組織でより多く認められた。また、傍精巣脂肪組織組織では *Plf* と *Ucp1* が共発現するが、鼠径脂肪組織では *Ucp1* 発現細胞の中に *Plf* の発現が認められない細胞も存在した。

【考察】

SPA は脂肪細胞遺伝子を発現しつつ増殖能を持つ細胞として同定された。これは、従来の「脂肪前駆細胞は増殖停止後に脂肪細胞遺伝子を発現し、最終分化に至る」という考えと異なる細胞である。本研究によって SPA は白色脂肪細胞と beige 細胞の双方への分化能を持つ前駆細胞であることが示され、骨芽細胞への多分化能を失った成熟脂肪細胞への分化途中の細胞と考えられた。

Plf は SPA でのみ顕著に発現し、SPA のマーカーと考えられた。また、SPA を白色脂肪細胞に分化誘導させた場合には *Plf* の発現が認められたが、SVC の白色脂肪細胞への分化過程では *Plf* の発現が認められないことから、脂肪細胞の分化過程は SVC と SPA で異なっていることが示唆された。傍精巣脂肪組織と鼠径脂肪組織由来の SPA を比較すると、前者では *Wt1* を特異的に発現し白色脂肪細胞への分化能はより高いが、beige 細胞への分化能は後者でより高いと考えられた。また、CL316243 刺激下では、鼠径脂肪組織由来 SVC にも beige 細胞の出現が観察されたことから、*Plf* 陰性の鼠径脂肪組織由来の SVC も beige 細胞への分化能を有することが示唆された。

【結論】

SPA は脂肪細胞の分化過程にある細胞で、内臓脂肪と皮下脂肪で起源や分化能力が異なり、*Plf* を特徴的に発現する beige 細胞の前駆細胞と考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 田口皓一郎 は脂肪組織内の small proliferative adipocytes (SPA) に着目し、その遺伝子発現と白色脂肪細胞や beige 細胞への分化能について検討し、proliferin (*Plf*) を特徴的に発現する SPA は白色脂肪細胞と beige 細胞のいずれにも分化し得る前駆細胞であることを見出した。この知見は脂肪細胞の分化や増殖に関する理解に新たな展開をもたらすものであり、肥満研究の推進に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Koichiro Taguchi, Kazuo Kajita, Yoshihiko Kitada, Masayuki Fuwa, Motochika Asano, Takahide Ikeda, Toshiko Kajita, Tatsuo Ishizuka, Itaru Kojima, Hiroyuki Morita: Role of Small Proliferative Adipocytes: Possible Beige Cell Progenitors.

Journal of Endocrinology 245, 65-78 (2020). doi: 10. 1530/JOE-19-0503.