



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	褐色脂肪細胞の新規増殖機構とその組織形成における役割
Author(s)	深野, 圭伍
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12620号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12620
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68636
Type	doctoral thesis
File Information	Keigo_Fukano.pdf



褐色脂肪細胞の新規増殖機構とその組織形成における役割

2017 年

深野 圭伍

[目次]

目次	1
略語一覧	3
緒言	4

第一章：寒冷刺激による $\beta 3$ アドレナリン受容体を介した褐色脂肪細胞の増殖

1. 序文	7
2. 材料と方法	
2.1 実験動物	8
2.2 成熟脂肪細胞と間質細胞の単離	8
2.3 ウエスタンブロット解析	9
2.4 褐色脂肪組織の蛍光免疫組織化学染色	9
2.5 EdU 染色	10
2.6 DNA 含量	10
2.7 統計解析	10
3. 結果	
3.1 褐色脂肪細胞と間質細胞の識別	12
3.2 褐色脂肪組織中で増殖する細胞種の識別	13
3.3 寒冷刺激が褐色脂肪細胞の増殖に与える影響	15
3.4 β アドレナリン受容体の阻害が寒冷刺激による褐色脂肪細胞の増殖に与える影響	19
3.5 $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激が褐色脂肪細胞の増殖に与える影響	21
4. 考察	23
5. 小括	25

第二章：脂肪細胞の増殖の抑制が脂肪組織形成に与える影響

1. 序文	26
2. 材料と方法	
2.1 実験動物	28
2.2 体温と組織温度の測定	28
2.3 ウエスタンブロット解析	29

2.4	マウス胎仔由来線維芽細胞の調製および細胞培養	29
2.5	褐色脂肪組織の免疫組織化学染色	30
2.6	マウス胎仔由来線維芽細胞の蛍光免疫染色	30
2.7	real-time PCR 法による mRNA 発現量の定量	30
2.8	DNA 含量	31
2.9	統計解析	31
3.	結果	
3.1	脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が脂肪組織に与える影響	34
3.2	脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞の熱産生機能に 与える影響	36
3.3	脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞の増殖に 与える影響	38
3.4	脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が脂肪細胞の分化に 与える影響	39
3.5	脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激による 褐色脂肪細胞の増殖に与える影響	42
4.	考察	44
5.	小括	46
	総括	48
	謝辞	50
	引用文献	51
	英文抄録	57

[略語一覽]

BAT: brown adipose tissue
BSA: bovine serum albumin
CDK: cyclin dependent kinase
CL: CL316,243
COX IV: cytochrome c oxidase subunit IV
CREB: cAMP responsive element-binding protein
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
Dex: dexamethasone
Dio2: iodothyronine deiodinase 2
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
FCS: fetal calf serum
GFP: green fluorescent protein
HRP: horseradish peroxidase
IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine
KRBH: Krebs-Ringer HEPES buffer
MCT1: monocarboxylate transporter 1
MEF: murine embryonic fibroblast
Myf5: myogenic factor 5
PBS: phosphate buffered saline
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PDGFR α : platelet-derived growth factor α
PGC-1 α : PPAR γ coactivator-1 α
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ
pRb: retinoblastoma protein
PRDM16: PR domain containing 16
T3: triiodothyronine
Tro: troglitazone
UCP1: uncoupling protein 1
WAT: white adipose tissue

[緒言]

日本をはじめとした先進諸国において、心臓病や動脈硬化症は死因の上位を占めており、近年その増加が大きな社会問題となっている。その原因となる肥満、高血糖、高血圧、脂質異常症のうち肥満を含めた複数の危険因子を持つ状態はメタボリックシンドロームとして定義され、その最大のリスクファクターである肥満の病態解析と対策が求められている。エネルギー消費の側面からの肥満対策のターゲットとして注目を集めているのが褐色脂肪である。

ヒトを含めて哺乳動物には白色と褐色の2種類の脂肪組織がある[1, 2]。両者は存在部位や形態が異なり、白色脂肪は皮下や内臓周囲に存在し、余剰のエネルギーを中性脂肪として細胞内に蓄え、必要に応じて脂肪酸として全身に供給するエネルギーの貯蔵と放出の部位である。褐色脂肪は肩甲骨間などに存在し、脂肪酸をそれ自身で酸化分解して熱を産生するエネルギーの消費と散逸の部位である。このような両脂肪細胞の相反する機能分担は、それぞれの脂肪細胞の遺伝子発現や代謝パターン、血管や神経支配の違いなどによって具現化されている。その中でも特に重要なのが、褐色脂肪に特異的に発現し、熱産生を担う脱共役タンパク質 1(uncoupling protein 1; UCP1)である[3, 4]。

UCP1 は褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に存在し、プロトンチャネルとしての機能を有する。ミトコンドリアでは呼吸鎖によって作られるプロトンの濃度勾配を利用して ATP が合成されているが、UCP1 が活性化すると ATP 合成を伴わずにプロトン濃度勾配が解消され、結果的にエネルギーは熱として散逸する。UCP1 のプロトンチャネル活性は、通常は ADP などのプリンヌクレオチドによって抑制されているが、褐色脂肪に密に投射する交感神経が活性化すると抑制が解除される。すなわち、交感神経終末から分泌されるノルエピネフリンが褐色脂肪細胞膜上の β アドレナリン受容体に作用すると、細胞内ではホルモン感受性リパーゼが活性化され、細胞内中性脂肪が分解されて脂肪酸が遊離する。この脂肪酸は熱産生基質となると同時に、UCP1 に直接作用してプロトンチャネル機能を活性化する[5]。従って、交感神経活動が亢進するような生理的条件下では褐色脂肪-UCP1 系による熱産生(エネルギー消費)が増えることになる。

このように、UCP1 の活性化には交感神経性の刺激が必須であるが、ノルエピネフリンの持続的な刺激は、UCP1 の発現も増加させる。UCP1 遺伝子のプロモーター領域には、褐色脂肪細胞特異的にノルエピネフリンで活性化されるエン

ハンサー領域が存在し[6]、転写因子 cAMP responsive element-binding protein (CREB)、核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)、甲状腺ホルモン受容体などの結合領域が含まれる。 β 受容体が刺激されると、アデニル酸シクラーゼやプロテインキナーゼ A といった酵素が活性化し、リン酸化された CREB が転写因子として機能する。CREB は直接 UCP1 遺伝子プロモーターに結合するだけでなく、さらに様々な遺伝子発現を介して間接的に UCP1 発現を増加させると考えられているが、その一つに PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α)がある[7]。PGC-1 α はコアクチベーターとして PPAR γ や甲状腺ホルモン受容体と複合体を形成することで UCP1 遺伝子発現を誘導し、別の転写因子である nuclear respiratory factor と結合し、ミトコンドリアの増生を促して褐色脂肪細胞の熱産生能を高める。

このようにノルエピネフリンの刺激は、UCP1 を活性化すると同時に、UCP1 の発現量を増加させることで褐色脂肪細胞の熱産生能を増加させる。褐色脂肪を活性化する最も強力でかつ生理的な刺激が寒冷刺激である。寒冷環境での体温維持にこの経路の活性化が必須であることは、ノルエピネフリンやエピネフリンを産生できないドーパミン β ヒドロキシラーゼ欠損マウス[8]や β アドレナリン受容体の全てのサブタイプ(β 1, β 2, β 3)を欠損させた β -less マウス[9, 10]、そして UCP1 欠損マウス[11, 12]が寒冷不耐性であることから明らかである。また、この経路は冬眠動物が覚醒する際の体温上昇にも必須であることが分かっている[1]。

褐色脂肪は熱産生の基質として脂肪エネルギーを消費するので、褐色脂肪を活性化すると肥満を予防または解消できることが動物実験により証明されてきた。ヒトの場合、褐色脂肪は幼少期までは豊富に存在するが、成長に伴い退縮し、成人には褐色脂肪が存在しないとされてきたが、近年、成人にも機能的な褐色脂肪が存在することが報告された[13]。痩せ型の人には褐色脂肪が多く存在し、体脂肪量と褐色脂肪量は逆相関を示すことから、成人においても褐色脂肪が体脂肪量の調節に関わると推察される。一方で、加齢に伴い褐色脂肪の検出頻度は減少し、反対に肥満のリスクは加齢に伴い増加するため、ヒト褐色脂肪をエネルギー消費の側面からの肥満対策のターゲットとするためには、活性化する方法に加えて、褐色脂肪を増やす方法を考える必要がある。

寒冷刺激を継続すると UCP1 の発現量が増加するとともに褐色脂肪細胞そのものの数が増加し、組織が増生することが知られている。褐色脂肪細胞の増加

に加えて、寒冷刺激により血管内皮細胞の増殖も活発化して血管新生が誘導され、褐色脂肪細胞が産生する熱を効率よく全身に散逸させる[14]。一般に、脂肪細胞の数は前駆細胞の増殖とそれらの分化、アポトーシスによる細胞死の3つの過程のバランスにより規定されると考えられている。そのため、寒冷刺激による褐色脂肪細胞数の増加は前駆褐色脂肪細胞の増殖と分化が誘導されるためと考えられているが、直接的な証明はこれまでに報告がなく、分化した褐色脂肪細胞そのものの増殖に関しては議論が進んでいない。そこで、本研究の第一章では、寒冷刺激誘導性の褐色脂肪組織増生において、どのような種類の細胞が増殖するのかを調べ、分化した褐色脂肪細胞が増殖する可能性を見出した。そこで、第二章では分化した脂肪細胞の増殖を抑制したマウスを用いて、脂肪細胞の増殖が組織形成においてどのような影響を与えているか検討した。

なお、これらの研究成果の一部は、以下の原著論文として公表した。

Fukano, K., Okamatsu-Ogura, Y., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., Kimura, K. (2016). Cold exposure induces proliferation of mature brown adipocyte in a β 3-adrenergic receptor-mediated pathway. *PLoS One*. 11(11): e0166579.

[第一章] 寒冷刺激による $\beta 3$ アドレナリン受容体を介した褐色脂肪細胞の増殖

1. 序文

動物が寒冷環境にさらされると、褐色脂肪では UCP1 が活性化して熱を産生する。寒冷刺激が長期に渡ると、UCP1 発現量が増加するとともに褐色脂肪細胞の数が増加し、褐色脂肪組織が増生することが知られており、全身の熱産生能を高めて体温を維持するための適応反応と考えられている[12, 14, 15]。褐色脂肪組織は UCP1 を発現する褐色脂肪細胞に加え、前駆脂肪細胞および血管内皮細胞などの UCP1 を持たない間質細胞で構成されるが、寒冷刺激による褐色脂肪細胞数の増加に前駆脂肪細胞の増殖と分化が関わることを示されている[15]。例えば、ラットに放射性同位体でラベルしたチミジンを投与し寒冷刺激を与えると、細胞分裂に先立って DNA にチミジンを取り込んだ細胞の割合が増加する[14, 15]。電子顕微鏡での観察に基づき細胞種を判別すると、チミジン取り込みは褐色脂肪細胞へと分化する前駆細胞と想定される間葉系細胞に認められ、寒冷刺激の日数を追うごとに、少量の脂肪滴を含む未熟な褐色脂肪細胞、そして成熟褐色脂肪細胞の順で増加することが報告されている[14]。

褐色脂肪組織の増生は交感神経-ノルエピネフリンの経路を介している。褐色脂肪組織を支配する交感神経を切除すると、寒冷刺激によりチミジンを取り込む褐色脂肪細胞の数が減少し、ノルエピネフリンの投与により回復する[16, 17]。また、初代培養したマウス前駆褐色脂肪細胞においてもノルエピネフリン刺激による DNA 量の増加は見られる [18]。アドレナリン受容体のうち、前駆褐色脂肪細胞には $\beta 1$ 受容体が発現しており、分化に伴い $\beta 3$ 受容体が発現するので[19]、ノルエピネフリンが $\beta 1$ アドレナリン受容体を介して前駆細胞の増殖を誘導すると考えられる。しかし、褐色脂肪細胞にも $\beta 1$ 受容体は発現しており、褐色脂肪組織の増生に関わっている可能性があるが、分化した褐色脂肪細胞の増殖やその制御機構に関してはこれまでにあまり議論されていない。

そこで本章では、寒冷刺激によって分化した褐色脂肪細胞が分裂するか否か、さらに褐色脂肪組織の増生に関わっているかを調べるため、組織学的な解析を行った。

2. 材料と方法

2.1 実験動物

C57BL/6J マウスは 23°C、昼夜 12 時間サイクル（明期：07:00-19:00）環境下でプラスチックケージにて自由摂食及び自由飲水で飼育した。実験には 10 週齢から 12 週齢の雄マウスを使用した。寒冷刺激実験では、マウスをプラスチックケージに 1 匹ずつ入れ、室温 10°C で 1-5 日間単独飼育した。5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)取り込み実験では EdU (50 mg/kg, 1 日 2 回; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を 19:00 と 7:00 に皮下投与し、1 回目の投与直後から室温 10°C で 24 時間単独飼育した。 β 3 アドレナリン受容体作動薬投与実験では CL316,243 (CL : 0.1 mg/kg, 1 日 1 回; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 1-5 日間、10:00 に皮下投与した。 β アドレナリン受容体阻害剤投与実験では、 β 1 アドレナリン受容体阻害剤であるメトプロロール (5 mg/kg, 1 日 2 回; Sigma-Aldrich) もしくは β 3 アドレナリン受容体阻害剤である SR59230A (1 mg/kg, 1 日 2 回; Sigma-Aldrich) を 19:00 と 7:00 に皮下投与し、1 回目の投与直後から室温 10°C で 24 時間単独飼育した。マウスを炭酸ガスで安楽死させ、肩甲骨間褐色脂肪組織と生殖器周囲白色脂肪組織を採取し、重量を測定した。組織の一部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫組織化学染色に用いた。残りの組織は速やかに液体窒素中で凍結し、ウェスタンブロット解析や DNA 含量の測定に用いた。一部の実験では、採取した組織を成熟脂肪細胞と間質細胞の単離に用いた。実験手技ならびに動物の取扱いは、全て北海道大学の実験動物委員会の承認下（承認番号 13-0218）で実施した。

2.2 成熟脂肪細胞と間質細胞の単離

マウスから採材した肩甲骨間褐色脂肪組織と生殖器周囲白色脂肪組織を細切し、遊離脂肪酸を含まないウシ血清アルブミン (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich) と 2.5 mM グルコース、コラゲナーゼ (1 mg/ml, WAKO Pure Chemicals, 大阪) を加えた Krebs-Ringer bicarbonate HEPES 緩衝液 (KRBH, pH 7.4) 中で 1 時間、37°C のインキュベーターで 90 cycle/min で振盪しながら消化した。消化した細胞の懸濁液を 200 μ m のナイロンフィルターに通し、200 $\times$ g で 2 分間、室温にて遠心分離した。浮遊した細胞を成熟脂肪細胞として回収した。ペレットを懸濁した後に 25 μ m のナイロンフィルターに通し、200 $\times$ g で 2 分間、室温にて遠心分離した。得られたペレットを間質細胞として回収した。成熟脂肪細胞と間質細胞

はコラゲナーゼと BSA を取り除くために KRBH で 3 回洗浄した。回収した両細胞はウエスタンブロット解析に用いた。

2.3 ウエスタンブロット解析

凍結した組織に Tris-EDTA バッファー (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) を加え、ポッター型ホモゲナイザーにより十分に均質化した。これを遠心分離 (800×g、20 分、4°C) し、未破碎組織や核を含むペレットと上層の脂肪層を含まないよう中間層を回収した。単離した細胞は、RIPA バッファー(ナカライテスク、京都)を加えてピペッティングにより溶解し、氷上に 30 分間置いた後、遠心分離(15,000×g、15 分、4°C)して上清を回収した。一定量のタンパク質 (褐色脂肪は 2.5 µg、白色脂肪は 30 µg) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE、13.5 %ポリアクリルアミド)により分画し、PVDF 膜 (Immobilon™, Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。この膜をブロッキング溶液 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 に 0.1 % Tween20 と 5 %スキムミルクを含む) で一晚ブロッキングし、ブロッキング溶液にて希釈した一次抗体と 1 時間反応させた。使用した抗体と希釈倍率は表 1 に示した。その後、ブロッキング溶液にて 5,000 倍に希釈した Horseradish peroxidase (HRP)標識二次抗体(Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA)と 1 時間反応させ、化学発光基質 (Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) と反応させて Image Quant LAS 500 (GE ヘルスケア, Fairfield, CT, USA) で検出した。検出したバンドは Image J を用いて定量した。

2.4 褐色脂肪組織の蛍光免疫組織化学染色

パラフィン包埋した褐色脂肪組織を 5µm に薄切した。薄切標本を 100%キシレンに浸して脱パラフィンし、100、90、80、70%エタノール、蒸留水の順に浸して親水化を行った。PBS で 5 分間 3 回洗浄を行った後、2.5% Triton X-100 に 30 分間浸して浸透化を行った。PBS で 5 分間 3 回洗浄した。Ki67 を染色する場合には浸透化後、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸してオートクレーブ(105°C、15 分)して、抗原の賦活化処理を行った。PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、10%ヤギ正常血清と 1 時間反応させて非特異反応阻害を行い、表 1 に示す倍率で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩、反応させた。多重染色の際は、2 種の抗体の混合液を用いた。PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、200 倍希釈した Alexa Fluor 488 または 594 で蛍光標識された抗ウサギ二次抗体(Life Technologies, Gaithersburg, MD,

USA)または抗ニワトリ二次抗体(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)と室温で 2 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、ジァミジノフェニルインドール (DAPI) 含有の封入剤 (ProLong Gold Antifade with DAPI, Life Technologies) を用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。また、各標本から撮影した写真を無作為に複数枚選択して観察し、褐色脂肪細胞と間質細胞を区別して数え、この計測値の平均から各個体の Ki67 陽性細胞の割合を算出した。

2.5 EdU 染色

EdU 染色は Click-iT EdU Imaging Kits (Invitrogen)を用いて行った。浸透化処理までは 2.4 と同じ方法で行った。0.05 w/v % Trypsin-EDTA で室温にて 20 分間賦活化処理をした後、キットのプロトコールに従って染色を行った。

2.6 DNA 含量

DNA 含量は bisbenzimidazole (Hoechst no.33258) を用いた蛍光定量法により測定した。凍結した組織に Tris-EDTA バッファーを加え、ポッター型ホモゲナイザーにより十分に均質化した後に、2 M NaCl と 2 mM EDTA を含む 50 mM リン酸バッファー中で bisbenzimidazole と反応させた。マイクロプレート蛍光光度計 (Fluoroskan Ascent; Thermo Fisher Scientific) を用いて 360 nm の励起フィルターと 460 nm の吸収フィルターを用いて蛍光強度を測定した。各サンプルの DNA 含量はサケ精子の DNA から得られた検量線を用いて算出した。

2.7 統計解析

実験データを平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。平均値間の有意差検定は一元配置分散分析法により行い、事後検定には Scheffe's post hoc-test を用いた。

表 1. ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色に用いた一次抗体と希釈倍率

抗体	希釈倍率
抗 UCP1 ウサギ血清 (京都大学河田照雄教授より供与)	WB: 5,000 倍 IHC: 300 倍
p44/p42 MAPK (ERK) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)	WB: 5,000 倍
phospho-ERK (Cell Signaling Technology)	WB: 5,000 倍
phospho-Histone H3 (Cell Signaling Technology)	WB: 1,000 倍
proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA)	WB: 5,000 倍
Actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	WB: 5,000 倍
Ki67 (Abcam, Cambridge, MA, USA)	IHC: 200 倍
monocarboxylate transporter 1 (MCT1) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)	IHC: 200 倍

(WB: ウェスタンブロット; IHC: 蛍光免疫染色)

3. 結果

3.1 褐色脂肪細胞と間質細胞の識別

褐色脂肪組織の組織切片上で褐色脂肪細胞と、それ以外の間質細胞を識別するために、褐色脂肪細胞のミトコンドリア特異的に存在する UCP1 と褐色脂肪細胞の細胞膜に高発現するモノカルボン酸輸送体 1 (monocarboxylate transporter 1: MCT1) [20]に対する抗体を用いて免疫染色を行った(図 1)。MCT1 で染色された細胞膜をもつ細胞(図 1 a, c, d 矢印)は、広い細胞質領域をもち、DAPI で染色された円形で大きい核が細胞膜から離れて存在するという特徴が認められた。細胞質領域に UCP1 が検出されることから、これらの細胞を褐色脂肪細胞と定義した。一方、MCT1 陽性細胞の間隙に存在する細胞(図 1 a, b 矢頭)は、細胞質領域がせまく、扁平な核を持つという特徴があった。UCP1 を発現していないことから、これらの細胞を間質細胞と定義した。

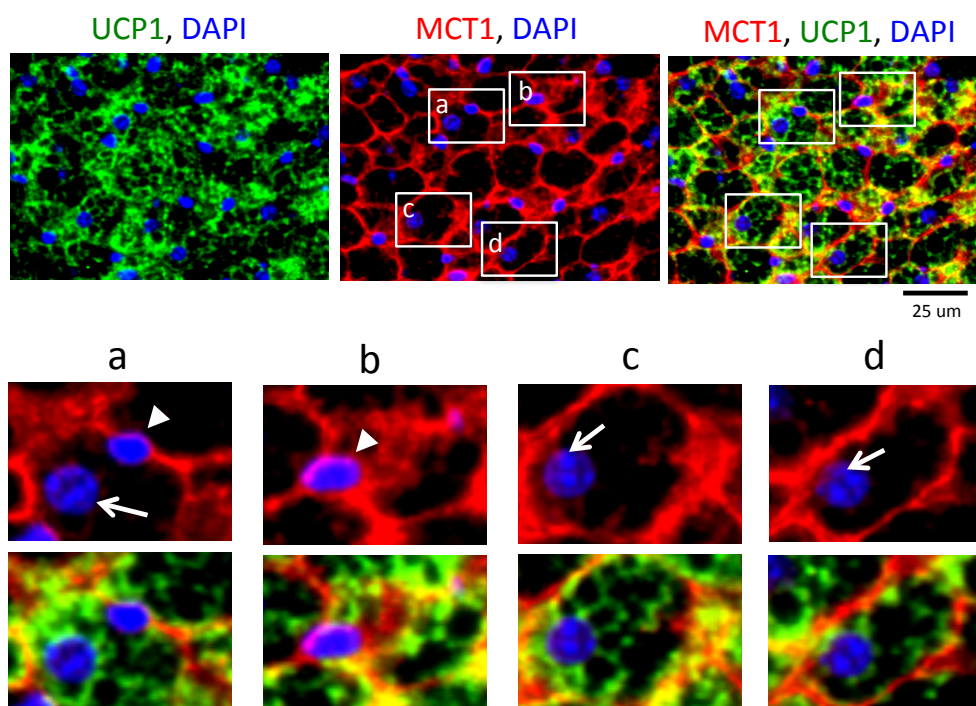


図 1 褐色脂肪細胞と間質細胞の識別

マウスから採材した褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、UCP1 (緑:上段左)と MCT1 (赤:上段中央)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI (青)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を上段右に示す。MCT1 陽性の細胞膜で覆われた大きな UCP1 陽性の細胞質領域を持ち、円形の核(矢印:a, c, d)を持つ細胞を褐色脂肪細胞と定義し、MCT1 陽性の細胞膜の間隙に存在する UCP1 陰性で扁平な核を持つ細胞(矢頭:a, b)を間質細胞と定義した。

3.2 褐色脂肪組織中で増殖する細胞種の識別

褐色脂肪組織中でどのような細胞が増殖するかを調べるために、細胞増殖マーカーである Ki67 を蛍光免疫染色法により染色した。室温 23℃ の環境で飼育したマウスの褐色脂肪組織では、幾つかの Ki67 陽性細胞が認められた(図 2 左)。細胞種を識別するために MCT1 との共染色を行うと、ほとんどの細胞が図 1 で定義した褐色脂肪細胞であることがわかった(図 2 右)。褐色脂肪細胞での増殖マーカーの発現を確認するため、褐色脂肪組織を脂肪細胞と間質細胞に分離してウェスタンブロット解析を行った。UCP1 は脂肪細胞画分において発現していたが間質細胞画分では検出されず、両細胞が正確に分画できていることが確認された(図 3)。増殖マーカーである Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は脂肪細胞画分と間質細胞画分の両方で検出された。脂肪細胞画分で検出された PCNA 量は間質細胞画分での検出量より多く、脂肪細胞画分への間質細胞の混入による可能性は低いと考えられた。褐色脂肪組織とは対照的に、生殖器周囲の白色脂肪組織では、PCNA は間質細胞画分でのみ検出された。

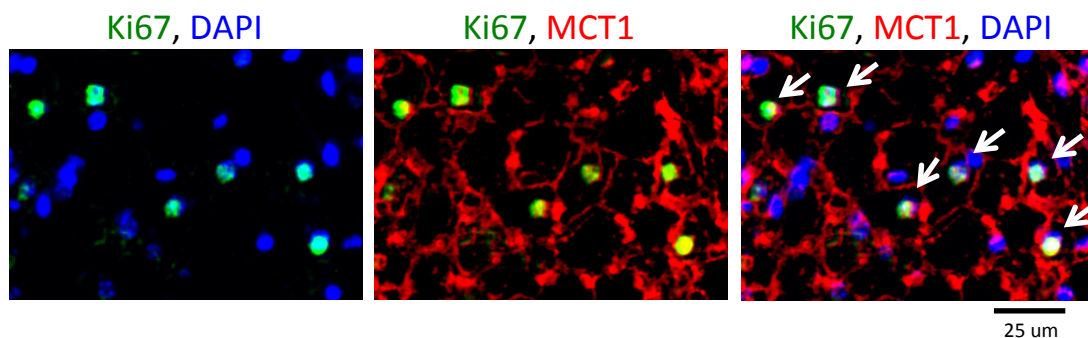


図 2 Ki67 陽性細胞の検出

マウスから採材した褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、Ki67 (緑:左)と MCT1 (赤:中央)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI (青)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を右に示す。矢印は Ki67 陽性の褐色脂肪細胞を示す。

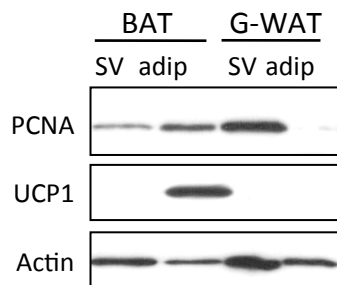


図 3 脂肪細胞および間質細胞における増殖マーカーの発現

マウスから褐色脂肪組織(BAT)と生殖器周囲白色脂肪組織(G-WAT)を採取し、コラゲナーゼ法により細胞を単離して、間質細胞画分(SV)と脂肪細胞画分(adipo)に分離した。それぞれの画分における PCNA と UCP1、Actin のタンパク質発現をウエスタンブロット法により調べた。

3.3 寒冷刺激が褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

持続的な寒冷刺激は、細胞数の増加を伴う褐色脂肪組織の増生を引き起こす。これを確認するため、マウスに寒冷刺激(10℃)を与え、1, 3, 5 日飼育した。室温 23℃で飼育した対照マウスの褐色脂肪組織では、褐色脂肪細胞中の多房性脂肪滴のサイズは寒冷刺激開始から 3 日目まで減少する傾向があり、3 日目と 5 日目では同程度であった(図 4 A)。組織重量は脂肪滴の減少に一致して寒冷刺激 3 日目まで徐々に減少する傾向が認められ、5 日目には対照と同程度まで回復した(図 4 B)。細胞数の指標として褐色脂肪組織中の DNA 含量を測定すると、寒冷刺激を開始して 1 日目から有意に増加し、5 日目まで徐々に増加していく傾向が認められた(図 4 C)。UCP1 タンパク質の発現量は寒冷刺激の日数に依存して増加した。増殖マーカーである PCNA や、細胞周期の M 期に特異的に検出されるリン酸化ヒストン H3、細胞の生存や増殖に関わるシグナル伝達経路の ERK のリン酸化フォームのタンパク質発現量はいずれも寒冷刺激 1 日目に増加した(図 4 D)。これらの結果から、寒冷刺激 1 日目には細胞増殖が誘導されることがわかった。

抗 Ki67 抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、Ki67 陽性細胞は対照でも認められたが(約 10%)、寒冷刺激 1 日目には劇的に増加し(約 27%)、5 日目においても対照よりも多かった(約 26%) (図 5 A)。図 1 と同様の定義により Ki67 陽性細胞を褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して定量化した。褐色脂肪細胞のうち Ki67 陽性細胞の割合は、対照では $7.2\% \pm 0.4\%$ であったのに対し、寒冷刺激 1 日目では $25.6\% \pm 1.8\%$ に増加した(図 5 B)。その後、若干減少する傾向が認められたものの、寒冷刺激 5 日目まで対照に比べ有意に高かった($21.8\% \pm 1.7\%$)。一方、間質細胞のうち Ki67 陽性細胞の割合は、対照では $19.6\% \pm 2.3\%$ であったのが、寒冷刺激 1 日目から徐々に増加し、寒冷刺激 5 日目で最も高く、 $42.1\% \pm 8.3\%$ となった。

これらの結果から、寒冷刺激は褐色脂肪細胞と間質細胞の両方の増殖を促進するが、褐色脂肪細胞では刺激後速やかに増殖が誘導され、間質細胞では徐々に増加していくことがわかった。

Ki67 は細胞周期の広い範囲で発現する増殖マーカーである。寒冷刺激により褐色脂肪細胞が DNA 合成期(S 期)に進行したものを調べるため、チミジンの類似体である EdU の DNA への取り込みを調べた。マウスに EdU (50 mg/kg、1 日 2 回)を皮下投与して寒冷刺激を 1 日与えたところ、図 6 A に示すように EdU を

取り込んだ細胞が確認された。その数は Ki67 陽性細胞の数より少なかったものの、EdU の取り込みは褐色脂肪細胞(図 6 B 矢印)と間質細胞(図 6 B 矢頭)の両方で確認された。

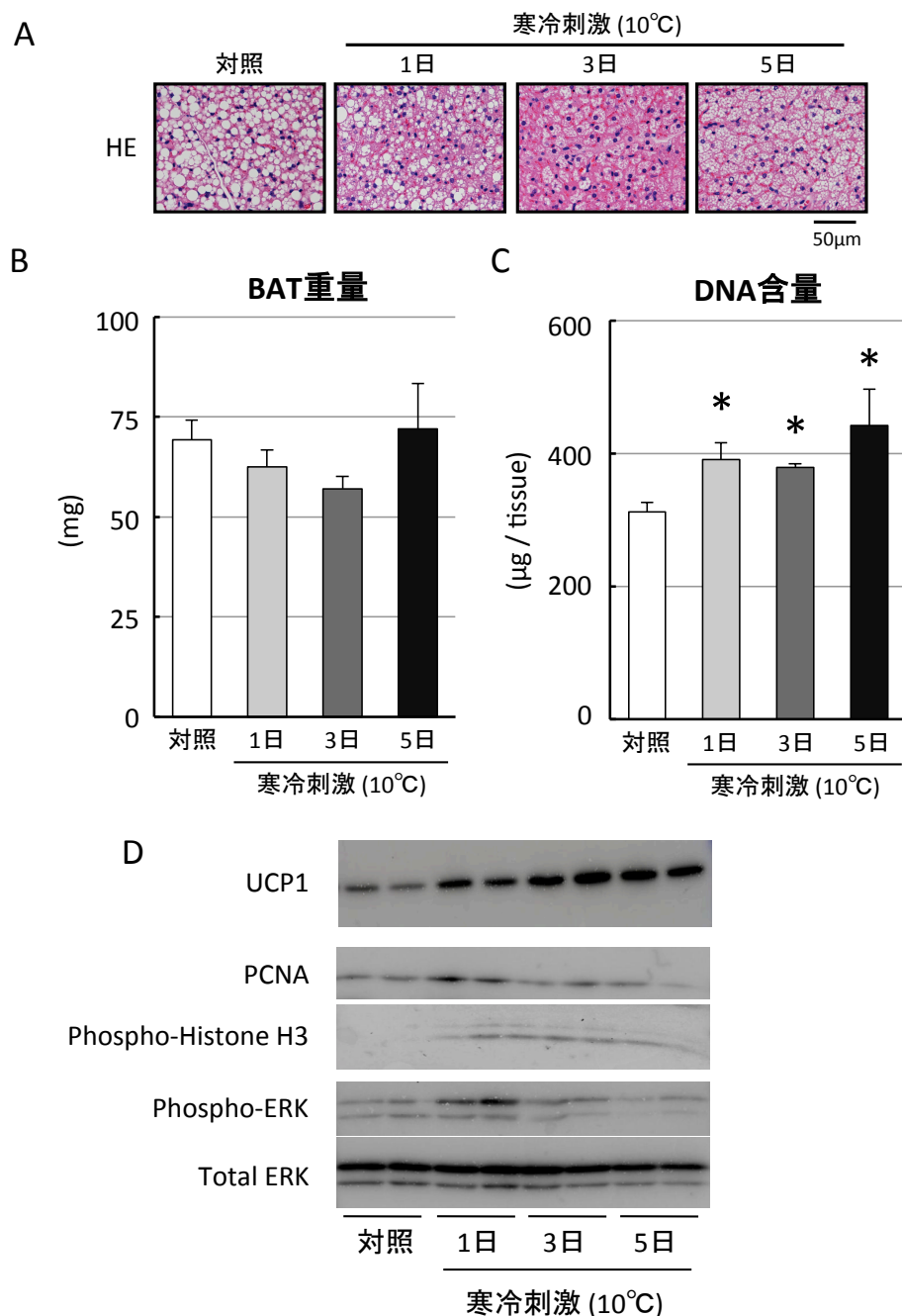


図 4 寒冷刺激による褐色脂肪組織の変化

マウスを室温 23°C(対照)もしくは 寒冷刺激(10°C:1 日、3 日、5 日)を与えて飼育した。褐色脂肪組織(BAT)の HE 染色像(A)、重量(B)および DNA 含量(C)を調べた。褐色脂肪組織マーカーである UCP1 および増殖関連タンパク質の発現量をウエスタンブロット法により調べた (D)。値は 4 例の平均値±標準誤差を示す。*は対照との間に有意な差 ($p<0.05$)があることを示す。

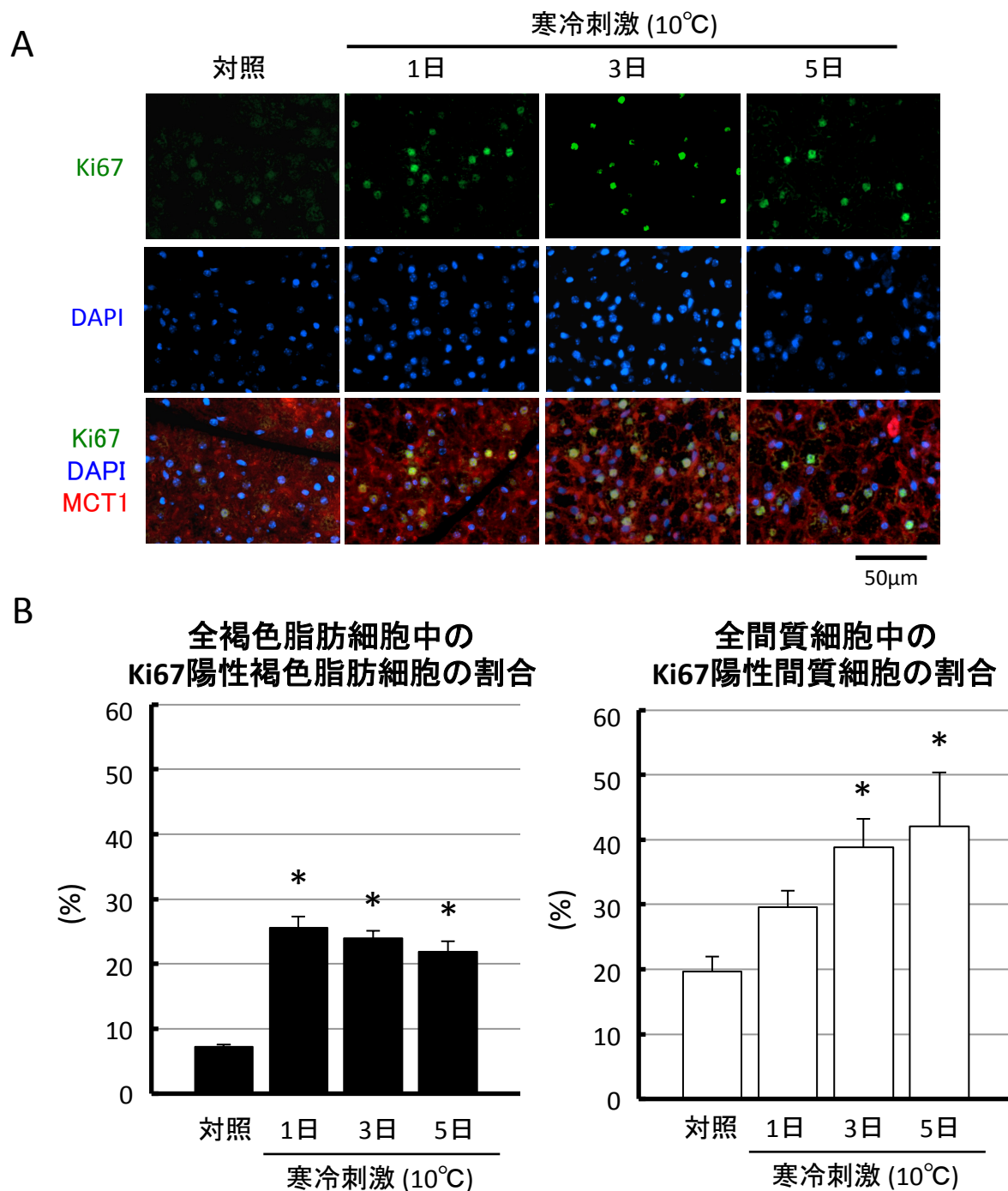


図5 寒冷刺激による Ki67 陽性細胞の増加

マウスを無刺激(23°C: 対照)もしくは 寒冷刺激(10°C:1 日、3 日、5 日)を与えて飼育した。褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、Ki67(緑:上段)と MCT1(赤:下段)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI(青:中央)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を下段に示す(A)。染色した細胞を図1で定義した方法に従い褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数え、それぞれの Ki67 陽性細胞の割合を算出した(B)。値は4例の平均値±標準誤差を示す。*は対照との間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。

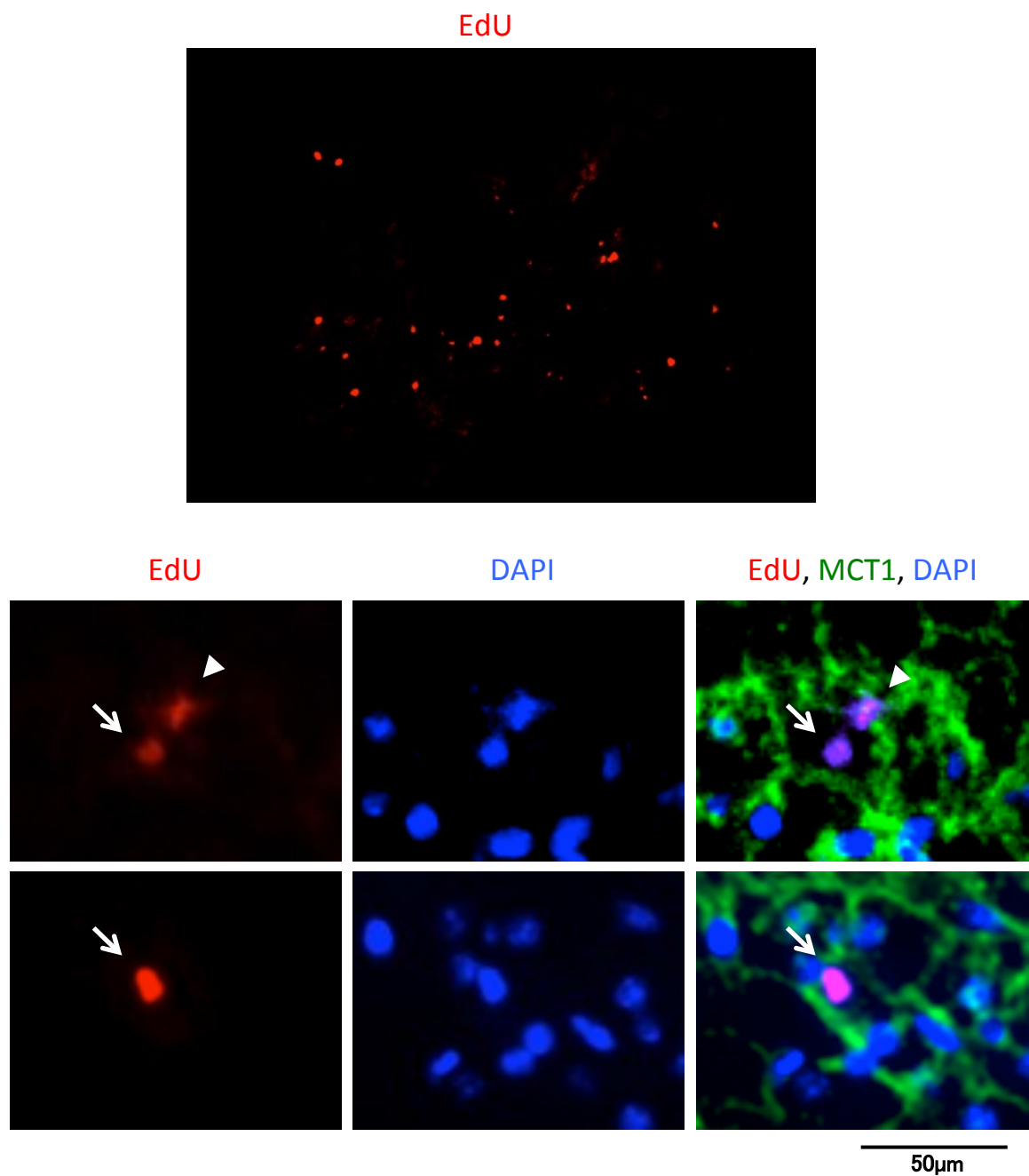


図 6 寒冷刺激による褐色脂肪組織における EdU 取り込み

マウスに EdU(50 mg/kg、1 日 2 回)を皮下投与し、寒冷刺激(10℃)を 1 日与えた。褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、EdU (赤:下段左)と MCT1 (緑:下段右)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI (青:下段中央)で染色した。EdU の染色の全体像を示す(上段)。EdU を取り込んだ褐色脂肪細胞(矢印)と間質細胞(矢頭)を示す。全ての色を重ね合わせた染色像を下段右に示す。

3.4 β アドレナリン受容体の阻害が寒冷刺激による褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

寒冷刺激による褐色脂肪細胞の増殖に、 β アドレナリン受容体がどの程度関わるかを調べるために、マウスに $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤(メトプロロール: 5 mg/kg)または $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤(SR59230A: 1 mg/kg)を 1 日 2 回皮下投与して、寒冷環境(10°C)で 1 日飼育した。生食投与および $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激により褐色脂肪細胞中の脂肪滴のサイズは小さくなったが、 $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激による変化は認められなかった(図 7 A)。このことから $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤は寒冷刺激による脂肪分解、ひいては熱産生を阻害すると考えられた。

抗 Ki67 抗体を用いて褐色脂肪組織を蛍光免疫染色したところ、寒冷刺激により生食投与では Ki67 陽性細胞が増加したが、 $\beta 1$ および $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤投与では陽性細胞数が少ない傾向が認められた(図 7 B)。そこで、褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数えると、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞数は、生食投与および $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激により有意に増加したが、 $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激による増加は認められず、対照と同程度だった (図 7 C)。一方で、Ki67 陽性の間質細胞数は、生食投与および $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激により有意に増加したが、 $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤投与では寒冷刺激による変化が見られなかった。

これらの結果から、寒冷刺激による褐色脂肪細胞の増殖は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して、間質細胞の増殖は $\beta 1$ アドレナリン受容体を介して起きていることがわかった。

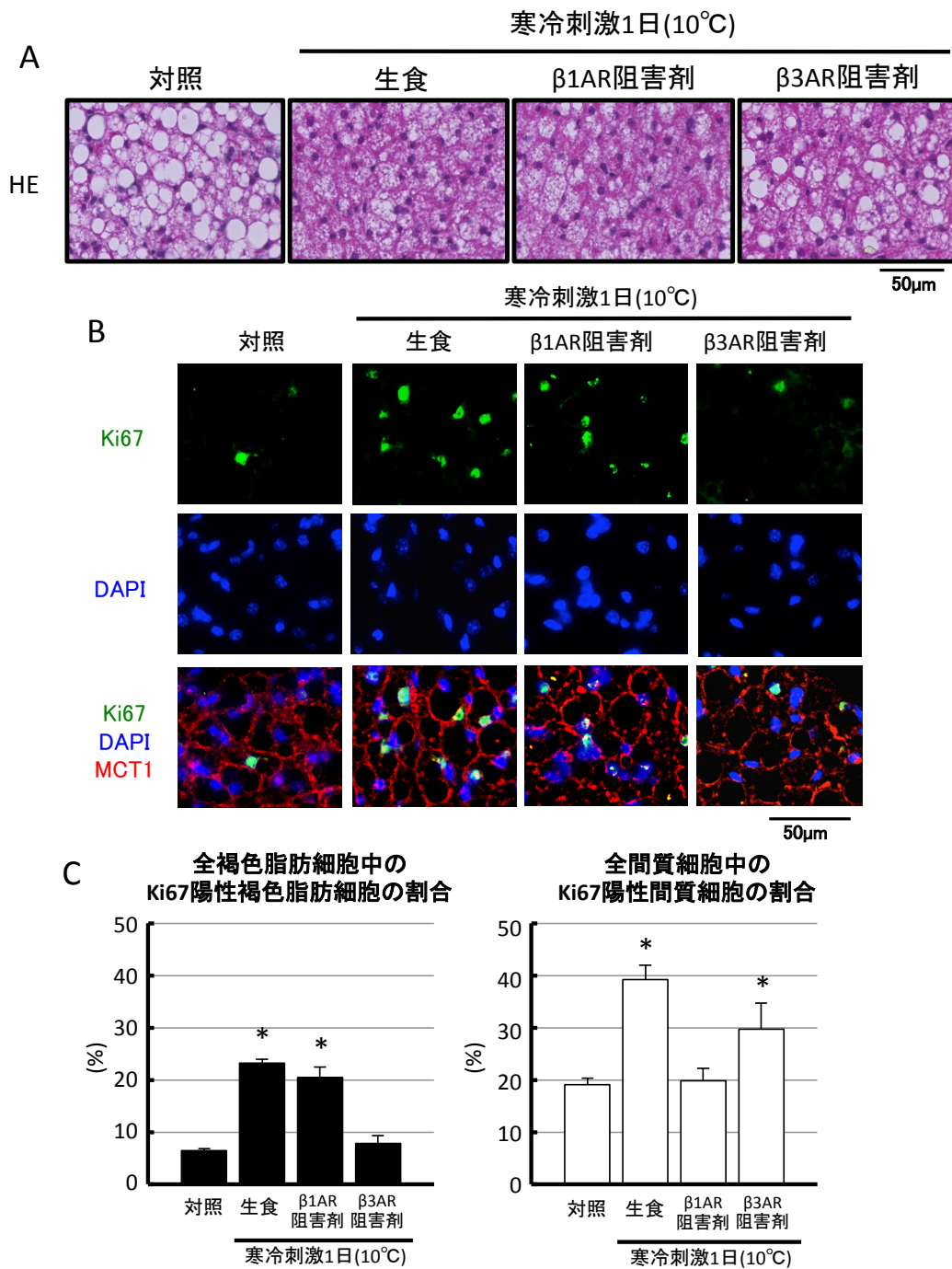


図7 $\beta 1$ および $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤の投与による寒冷刺激時の褐色脂肪組織の変化

マウスに生理食塩水(生食)もしくは $\beta 1$ アドレナリン受容体($\beta 1AR$)阻害剤(5 mg/kg、1 日 2 回)、 $\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3AR$)阻害剤(1 mg/kg、1 日 2 回)を皮下投与し、寒冷刺激(10°C)を与えて 1 日飼育した。無刺激(23°C)で生食投与したマウスを対照とした。褐色脂肪組織の HE 染色像を示す(A)。褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、Ki67(緑: 上段)と MCT1(赤: 下段)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI(青: 中央)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を下段に示す(B)。染色した細胞を図 1 で定義した方法に従い褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数え、それぞれの Ki67 陽性細胞の割合を算出した(C)。値は 4 例の平均値±標準誤差を示す。*は対照との間に有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

3.5 $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激が褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

褐色脂肪細胞の増殖に $\beta 3$ アドレナリン受容体が関わっていることを確認するために、 $\beta 3$ アドレナリン受容体特異的なアゴニストである CL316,243 (CL; 0.1 mg/kg/day) を 1, 3, 5 日間、皮下投与した。CL を投与すると 1 日目から褐色脂肪細胞内の脂肪滴のサイズが小さくなり (図 8 A)、CL 投与により褐色脂肪組織の脂肪分解と熱産生が活性化したと考えられた。また、これに付随して褐色脂肪組織の重量も減少したが、5 日目には生食投与と同程度まで回復した (図 8 B)。

抗 Ki67 抗体を用いて褐色脂肪組織を蛍光免疫染色したところ、生食投与では Ki67 陽性細胞はほとんど見られなかったのに対し、CL 投与では 1 日目から劇的に Ki67 陽性細胞の数が増加した (図 8 C)。褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数えると、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は生食投与の $6.5\% \pm 1.2\%$ に比べ、CL 投与 1 日目では $24.4\% \pm 1.1\%$ と有意に高い値を示し、CL 投与 5 日目まで高い値を維持した ($27.6\% \pm 2.2\%$) (図 8 D)。一方で、Ki67 陽性の間質細胞の割合に変動はなかった (生食投与: $17.7\% \pm 2.5\%$ 、CL 投与 1 日目: $16.9\% \pm 1.8\%$ 、3 日目: $17.2\% \pm 1.6\%$ 、5 日目: $14.6 \pm 1.2\%$)。

これらの結果から、 $\beta 3$ アドレナリン受容体を特異的に刺激すると、褐色脂肪細胞の増殖が誘導されること、間質細胞の増殖は誘導されないことがわかった。

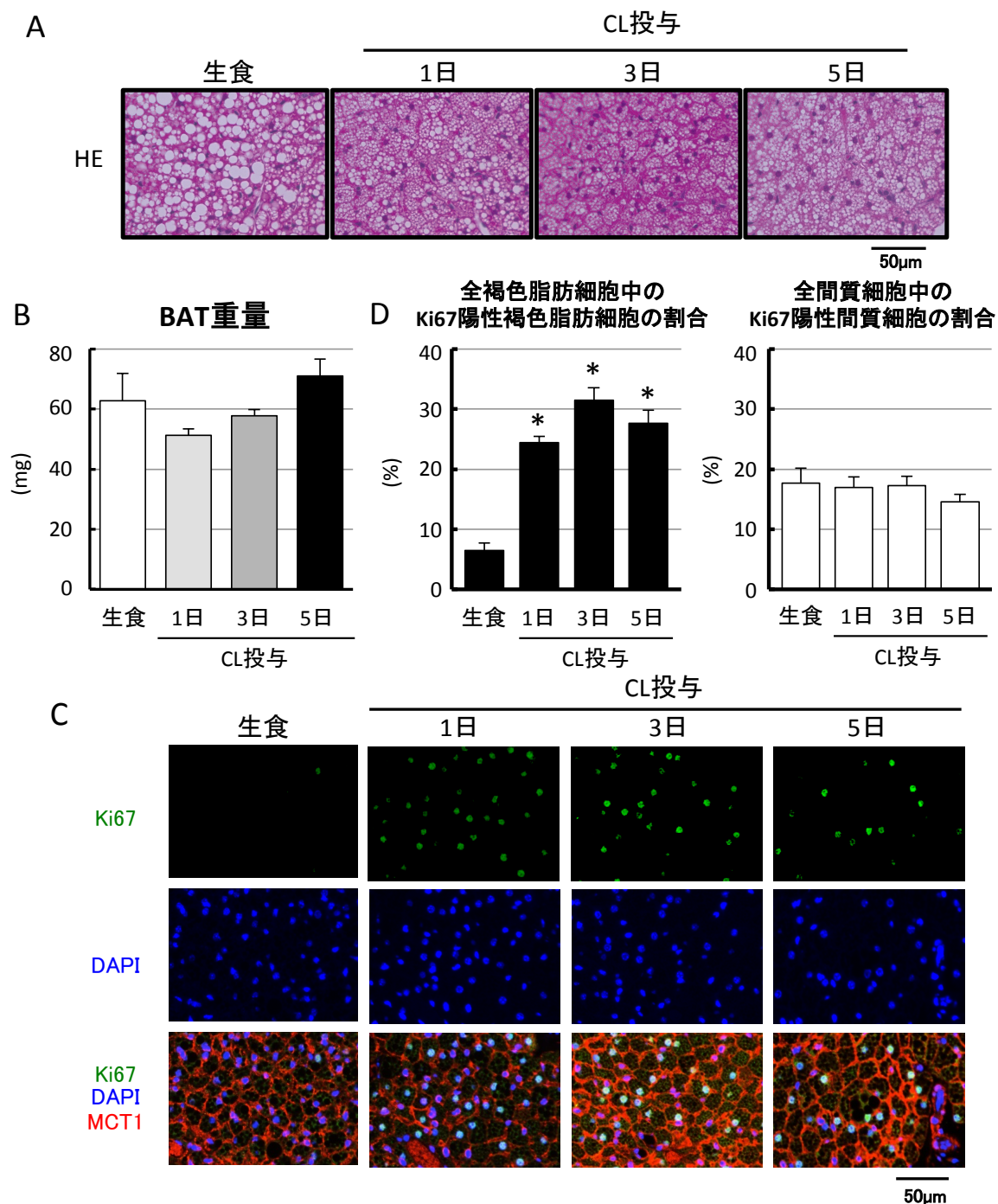


図 8 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬 CL316, 243 投与による褐色脂肪組織の変化
マウスに生理食塩水(生食)もしくは CL316,243(CL: 0.1mg/kg/day)を 1, 3, 5 日間皮下投与した。褐色脂肪組織(BAT)の HE 染色像(A)、重量(B) を調べた。褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、Ki67 (緑:上段)と MCT1 (赤:下段)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI (青:中央)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を下段に示す(C)。染色した細胞を図 1 で定義した方法に従い褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数え、それぞれの Ki67 陽性細胞の割合を算出した(D)。値は 4 例の平均値±標準誤差を示す。*は生食投与群との間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。

4. 考察

本章では、分化した褐色脂肪細胞が分裂能を持つか否かを調べるために、組織学的解析を行い、UCP1 を発現する褐色脂肪細胞の一部が増殖マーカーKi67 を発現しており、陽性細胞の数は寒冷刺激により増加することを示した。この寒冷刺激による Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の増加は $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤投与により抑制され、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬投与でも増加することから、褐色脂肪細胞は $\beta 3$ アドレナリン受容体の刺激により増殖することが明らかになった。

これまで、寒冷刺激による褐色脂肪細胞の数の増加は前駆脂肪細胞の増殖と分化によると考えられてきたが、本研究では分化した褐色脂肪細胞も増殖することを初めて明らかにした。褐色脂肪細胞の増殖機構は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介する点で間質細胞とは全く異なっていた。間質細胞の増殖が $\beta 1$ 受容体を介するという結果は、これまでに報告されている *in vitro*[21]および *in vivo*[22]の知見と一致した。また、褐色脂肪細胞と間質細胞では寒冷刺激により細胞増殖が誘導される時期に違いが認められた。すなわち Ki67 陽性細胞数は褐色脂肪細胞では寒冷刺激 1 日目から有意に増加し、5 日目まで維持されたのに対し、間質細胞では徐々に増加し、3 日目以降で有意な増加となった。このような違いが生じた理由は不明だが、褐色脂肪細胞ではノルエピネフリンによる $\beta 3$ アドレナリン受容体の刺激により、細胞増殖が直接誘導されるのに対し、間質細胞の増殖はノルエピネフリンの刺激により間接的に誘導される可能性がある。寒冷刺激により褐色脂肪組織では Insulin-like growth factor 1 [22, 23]や Vascular endothelial growth factor A [24-26]、Nerve growth factor [27, 28]、Fibroblast growth factor 2 [29, 30]などいくつかの増殖因子の発現量が上昇することが知られており、これらの因子は *in vitro* において前駆脂肪細胞や血管内皮細胞を含む間質細胞の増殖を誘導する[31]。ノルエピネフリンによる間質細胞の増殖の誘導がこれらの因子の発現を介しているため、細胞増殖の誘導に数日間を要した可能性が考えられる。それぞれの細胞でどのような因子が増殖を誘導しているかについては今後も研究が必要である。

本研究では、増殖マーカーKi67 の発現を指標に細胞の増殖を評価した。寒冷刺激により間質細胞のうち約 40%の細胞が、褐色脂肪細胞のうち 20%以上の細胞が Ki67 陽性を示したが、細胞数の指標となる DNA 含量は約 1.4 倍だった。Ki67 は細胞分裂周期に入ってから終わるまで全ての過程で発現するマーカーで

ある。DNA 合成期(S 期)に進行した細胞数を確認するため、EdU を用いて検討した。寒冷刺激により、褐色脂肪組織において EdU を取り込んだ細胞は一定数認められたものの、その数は Ki67 陽性細胞数より少なかった。また、寒冷刺激により細胞分裂期(M 期)特異的に発現するリン酸化ヒストン H3 のタンパク質発現量も増加しており、M 期に進行した細胞数が増加したと考えられる。これらの結果から、寒冷刺激により細胞分裂周期に進行して一部は実際に分裂して細胞数の増加に寄与したと考えられる。

褐色脂肪細胞と間質細胞のそれぞれが寒冷刺激誘導性の褐色脂肪組織増生にどの程度寄与するかは不明である。これを明らかにするためには組織内に存在する褐色脂肪細胞と間質細胞の割合を算出しなければならない。本研究では、組織切片中の褐色脂肪細胞の割合は対照群では $76.9\% \pm 0.6\%$ であった。しかし、褐色脂肪細胞のサイズは間質細胞よりも著しく大きく、またそれぞれの処置による脂肪滴含量の変動に伴い大きく変化するため、組織切片に存在する褐色脂肪細胞の割合は実際の組織中の割合を反映しているとは考え難い。Géloën らは血管内皮細胞、褐色脂肪細胞、間葉系幹細胞、前駆脂肪細胞の割合をそれぞれ 46.5%, 44%, 9%, 0.5% と概算している[16]。この割合を参考に、本研究の結果から得られた寒冷刺激時の Ki67 陽性の褐色脂肪細胞および間質細胞の割合を掛けると、褐色脂肪組織に存在する全細胞のうち、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞および間質細胞の割合はそれぞれ約 11% と約 22% となる。間質細胞のうち、増殖した前駆脂肪細胞は褐色脂肪細胞へと分化し、その結果、褐色脂肪細胞の数の増加と組織全体としての熱産生機能の亢進をもたらす。一方で、寒冷刺激は間質細胞のうちの血管内皮細胞の増殖も促進する。血管は褐色脂肪組織への酸素の運搬と全身への熱の運搬に重要であり、血管新生もまた褐色脂肪組織の機能亢進に寄与している[32]。今後はそれぞれの細胞がどのように褐色脂肪組織の増生に寄与しているかを明らかにしていく必要がある。

まとめると、本章では褐色脂肪細胞には分化後であっても細胞分裂するという新規の増殖機構を見出した。寒冷刺激は交感神経-ノルエピネフリン- $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して褐色脂肪細胞の増殖を誘導し、この増殖機構が寒冷刺激誘導性の褐色脂肪組織増生に寄与していると考えられた。

5. 小括

動物を長期間寒冷刺激すると、UCP1 発現量が増加するとともに褐色脂肪細胞の数が増加し、褐色脂肪組織が増生することが知られている。褐色脂肪組織を構成するどの種類の細胞が組織の増生に寄与しているかを調べるため、6 週齢の C57BL/6J マウスを 23°C(対照)もしくは 10°C(寒冷刺激)で 5 日間飼育し、蛍光免疫染色法により褐色脂肪組織中の細胞増殖マーカーである Ki67 の発現を解析した。興味深いことに、対照群で Ki67 を発現する UCP1 陽性の褐色脂肪細胞が見られ(全褐色脂肪細胞中の $7.2\% \pm 0.4\%$)、同様に UCP1 陰性の前駆脂肪細胞を含む間質細胞にも Ki67 を発現するものが見られた(全間質細胞中の $19.6\% \pm 2.3\%$)。Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は、寒冷刺激 1 日目から急激に増加し($25.6\% \pm 1.8\%$)、5 日目まで対照群と比べ有意に高い値を示した($21.8\% \pm 1.7\%$)。一方で、Ki67 陽性の間質細胞は寒冷刺激により徐々に増加し、5 日目で一番高値を示した($42.1\% \pm 8.3\%$)。β3 アドレナリン受容体阻害剤特異的に、寒冷刺激による Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の増加が抑制され、β1 アドレナリン受容体阻害剤特異的に寒冷刺激による Ki67 陽性の間質細胞数の増加が抑制された。さらに、β3 アドレナリン受容体作動薬を 5 日間投与すると、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞が投与 1 日目から 5 日目まで対照群と比べ有意に増加したが、Ki67 陽性の間質細胞の割合には変化がなかった。

これらの結果から、褐色脂肪細胞は寒冷刺激に応じて β3 アドレナリン受容体を介して増殖することがわかった。前駆脂肪細胞の増殖と同様に、褐色脂肪細胞の増殖も寒冷刺激による交感神経依存性の褐色脂肪組織の増生に寄与していると考えられる。

[第二章] 脂肪細胞の増殖の抑制が脂肪組織形成に与える影響

1. 序文

哺乳類には褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の二種類の脂肪細胞が存在し、それぞれエネルギーの貯蔵と消費という正反対の生理的役割を持つ[1, 33]。従って、両脂肪細胞の数の制御機構を理解することは、エネルギー代謝調節やその破綻による肥満症、メタボリックシンドローム対策を考える上で重要である。両脂肪細胞の数は、生理的状況により劇的に変化する[34, 35]。これまでに述べたように、寒冷環境に暴露されると褐色脂肪組織では細胞分裂が促進されて組織の増生が起こる[14, 15, 36]。一方、白色脂肪細胞の数は成熟期以降変わらないとされていたが、肥満動物では白色脂肪細胞のサイズが大きくなるとともに脂肪細胞数も増加することで白色脂肪組織の容積が増大することが明らかになっている[37-40]。

一般に、脂肪細胞の数は、前駆脂肪細胞の増殖、それらの成熟・分化、そして成熟脂肪細胞のアポトーシスによる細胞死の 3 つの過程のバランスにより規定され则认为られている。脂肪組織には複数の細胞種への分化能を持つ幹細胞が存在し[41, 42]、前駆脂肪細胞を供給している。褐色および白色脂肪細胞はともに脂肪を蓄える脂肪細胞として共通の機能を持つものの、それぞれ異なる前駆脂肪細胞から分化するとされている。すなわち、発生の過程で *myogenic factor-5* (*Myf5*) 遺伝子を発現する間葉系細胞は筋細胞へ分化することが知られているが、*Myf5* 陽性細胞は転写調節因子 *PR domain containing 16* (*PRDM16*) の制御を受けて褐色脂肪細胞へと分化する[43, 44]。一方、白色脂肪細胞は *Myf5* 陰性細胞に由来する。このように、褐色脂肪細胞は白色脂肪細胞とは異なる細胞起源を持っている。一方で、脂肪組織中に存在する血小板由来増殖因子 α 受容体 (*PDGFR α*) を発現する間質細胞は、褐色と白色の両方の脂肪細胞に分化する共通の前駆脂肪細胞である可能性も示唆されている [45]。マウスに寒冷刺激を与えると褐色脂肪組織において *PDGFR α* 陽性細胞が褐色脂肪細胞へと分化し[46]、高脂肪食を与えると白色脂肪組織に存在する *PDGFR α* 陽性細胞が白色脂肪細胞へと分化することで[47]、白色と褐色脂肪組織の増生に寄与する。このように、2 種類の脂肪細胞の起源には不明点が多いものの、前駆脂肪細胞の分裂とそれらの分化は褐色および白色脂肪組織の増生に寄与していると考えられる。

一方、第一章において、分化した褐色脂肪細胞が分裂能を持ち、寒冷刺激に

よる組織増生に関わることを見出した。また、分化した白色脂肪細胞も分裂能を持つ可能性がいくつかの報告により示唆されている。例えば、ラットにおいて、高脂肪食給餌により白色脂肪組織が増生する際に、放射線同位体で標識したチミジンの DNA への取り込みは間質細胞層だけでなく分化した白色脂肪細胞層でも確認される[48-50]。また、初代培養により *in vitro* で分化させた白色脂肪細胞の分裂像が、形態学的観察やタイムラプス撮影による継時的な観察により示されている[51, 52]。このように、成熟脂肪細胞もまた分裂能を持ち、組織形成や生理的な刺激により誘導される脂肪組織の増生に関わる可能性があるが、どの程度寄与するかは不明である。

サイクリンは真核生物の細胞において、細胞周期を移行させるためのエンジンとして働くタンパク質の一つである。細胞は G1 (Gap1)期、S (synthesis)期、G2 (Gap2)期、M (mitosis and cytokinesis)期の 4 期からなる細胞周期を順に進行させることで増殖するが、サイクリン及びサイクリン依存性キナーゼ(CDK)が複合体を形成して細胞周期を進行させる。CDK 相互作用タンパク質/キナーゼ阻害タンパク質(Cip/Kip)ファミリーに属する CDK 阻害物質 1B(p27; 別名 p27^{Kip1} もしくは Kip1)は内在性の CDK 阻害物質であり、サイクリン E-CDK2 もしくはサイクリン D-CDK4 複合体と結合することで活性を阻害し、結果的に細胞周期の G1 期から S 期への移行を抑制する[53-55]。p27 の過剰発現は様々な細胞で細胞分裂を抑制し[56-59]、p27 を欠損したマウスは野生型(WT)マウスと比べ体格が大きく、白色脂肪組織のサイズも増大する[60, 61]。したがって p27 は脂肪細胞を含む様々な細胞において、細胞分裂の制御において生理的に重要な役割を持つと考えられる。

本章では分化した脂肪細胞の分裂が脂肪細胞の数の制御にどの程度関わっているかを調べるために、分化した脂肪細胞特異的に発現する aP2 のプロモーターの下流で p27 を過剰発現させた、脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスを用いて検討をおこなった。

2. 材料と方法

2.1 実験動物

aP2-p27 過剰発現 (Tg) マウスは、徳島大学 阪上教授より供与いただき使用した。本マウスは、5.4-kb のマウス aP2 プロモーターの下流にウサギ β -globlin のイントロンのエンハンサー領域を組み込み、その下流にマウス p27 cDNA (GenBank; NM_009875.4) とヒト成長ホルモンのポリ A 配列を組み込んだ DNA をマイクロインジェクション法により受精した C57BL/6J マウスの卵母細胞に導入して得られた系統である。ヘテロ接合体マウスとして維持し、同腹の野生型(WT) マウスを対照として使用した。マウスは 23°C、昼夜 12 時間サイクル (明期: 07:00 ~19:00) 環境下でプラスチックケージにて自由摂食及び自由飲水で飼育した。一部のマウスには β 3 アドレナリン受容体作動薬である CL316,243 (CL : 0.1 mg/kg; Sigma-Aldrich) を 10:00 に皮下投与し、24 時間後にサンプリングを行った。マウスを炭酸ガスで安楽死させ、様々な脂肪組織 (肩甲骨間褐色脂肪組織と鼠径部、生殖器周囲、腎周囲、後腹膜、腸間膜白色脂肪組織) を採取し、重量を測定した。組織の一部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫組織化学染色に用いた。組織の一部を RNA later (Invitrogen) 中に保存し、トータル RNA の抽出に用いた。残りの組織は、速やかに液体窒素中で凍結し、ウェスタンブロット解析や DNA 含量の測定に用いた。実験手技ならびに動物の取扱いは、全て北海道大学の実験動物委員会の承認下 (承認番号 09-0039 および 13-0218) で実施した。

2.2 体温と組織温度の測定

体温は VitalView Data Acquisition System (Mini Mitter Co., Sunriver, OR, USA) を用いて覚醒下でマウスを拘束せずに測定した。始めに、ケタミン 75 mg/kg とメデトミジン 1 mg/kg 麻酔下でトランスミッター (PDT-4000) (Mini Mitter Co.) を腹腔内に埋め込んだ。埋め込みの 7 日後に、マウスの体重が回復したことを確認し、次の通り測定を行った。プラスチックケージに 1 匹のマウスを移動させ、ケージの下に配置したレシーバー (ER-4000) (Mini Mitter Co.) によりトランスミッターからのシグナルを受信した。室温にて 1 時間体温を測定した後、ケージを 4°C の部屋に移して 1 時間体温を測定した。

組織温度の測定は、マウスにウレタン (1 g/kg) を腹腔内投与し、麻酔下で肩甲骨上部の皮膚を 5 mm 程度切開した。脈管構造と神経線維を傷つけないように、

褐色脂肪組織とその下部の筋肉の間に、プラスチックコートされた直径 1mm のサーミスターを設置した。直腸内にもサーミスターを設置した。マウスを 37℃ に温めたホットプレート上に乗せ、直腸の温度が 37℃ 付近で安定した後に、CL316,243 (0.1 mg/kg) もしくは生理食塩水を腹腔内投与し、30 分間の温度変化を測定した。

2.3 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析を第一章と同じ方法により行った。使用した一次抗体と希釈倍率を表 2 に示す。

2.4 マウス胎仔由来線維芽細胞の調製および細胞培養

マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) は胎生 16.5 日齢の胎仔から調製した。胎仔を断頭により安楽殺させた後、腹腔内の臓器を除去した。トリプシン-EDTA (0.25 %) 中で細切し、15 分毎にピペッティングしながら 45 分間 37℃ でインキュベートした。培養培地[10% Fetal calf serum (FCS, Trace Scientific Ltd., Melbourne, Australia) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-high glucose (Wako Pure Chemicals,大阪)]を加えてピペッティングにより細胞を懸濁し、200 μ m のナイロンフィルターに通した濾液を 200×g で 5 分間、室温にて遠心分離した。ペレットを溶血バッファー (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH7.4) で懸濁した後、25 μ m のナイロンフィルターに通した濾液を 200×g で 5 分間、室温にて遠心分離した。得られたペレットを MEF とした。MEF はコラーゲンコートディッシュ上で培養培地を用いて培養し、細胞密度が 100% になったところで培養培地に 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich) と 1 μ M dexamethasone (Dex, Sigma-Aldrich)を加えた分化誘導培地で 2 日間培養した。その後に、培養培地に 10 μ g/ml insulin (Sigma-Aldrich)と 50 nM 3,3',5 triiodothyronine (T3, Sigma-Aldrich)、10 μ M troglitazone (Tro, Sigma-Aldrich)を加えた分化維持培地で 2 日毎に培地を変えながら 6 日間培養して脂肪細胞へと分化させた。

前駆褐色脂肪細胞株である HB2 細胞は培養培地で維持し、細胞密度が 100% になったところで、培地に FCS を含まない DMEM-high glucose 培地に交換し、Green fluorescent protein (GFP)もしくは p27 を発現するアデノウイルス (AD-GFP と AD-p27) を 100 MOI の力価で感染させた。感染後、培養培地に 10

mg/ml insulin と 50 nM T3 を添加した培地で 2 日毎に培地を変えながら 6 日間培養して脂肪細胞へと分化させた。

2.5 褐色脂肪組織の免疫組織化学染色

褐色脂肪組織の蛍光免疫染色は第一章と同様の方法で行った。免疫組織化学染色では、一次抗体反応まで第一章と同様に行った。一次抗体と 4℃で一晩反応させた後、PBS で 5 分間 3 回洗浄し、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体（ニチレイ、東京）と室温にて 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄し、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ（ニチレイ）と室温下で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、ジアミノベンジジン液 100 ml [Tris バッファー (pH 7.6) に DAB タブレット (Wako Pure Chemicals) 1 錠混合し、1%過酸化水素を 1/1000 量混和したもの] と 10 分間反応させ、抗原局在部位を可視化した。その後、ヘマトキシレンで 10 秒間染色し、流水で 10 分間洗浄した。70、80、90、95、100%エタノールで順に洗浄、脱水を行い、100%キシレンで透徹した。EUKITT (O. Kindler, GmbH, Freiburg, Germany) で封入し、光学顕微鏡で観察した。また、各標本から撮影した写真を無作為に複数枚選択して観察し、褐色脂肪細胞と間質細胞を区別して数え、この計測値の平均から各個体の Ki67 陽性細胞の割合を算出した。

2.6 マウス胎仔由来線維芽細胞の蛍光免疫染色

WT および Tg マウスより調整した MEF をチャンバースライドで培養し、脂肪細胞へと分化させた。分化後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、10%ホルマリン-PBS を加え 20 分間室温にて固定した。PBS で 3 回洗浄し、5%グリシン-PBS と 5 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、5%酢酸を添加したエタノールに浸して 10 分間、-20℃で反応させて膜透過処理を行った。PBS で 3 回洗浄し、室温にて 8%BSA を含む PBS と 1 時間反応させ、800 倍に希釈した抗 UCP1 血清を加えて 4℃で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄し、200 倍に希釈した Alexa Fluor488 標識二次抗体と室温にて一時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄した後に DAPI で染色し、ProLong Gold Antifade (Life Technologies) を用いて封入して蛍光顕微鏡で観察した。

2.7 real-time PCR 法による mRNA 発現量の定量

RNA later 中に保存した組織を用いて mRNA 発現量の定量化を行った。トータル RNA の抽出は Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて行った。2 μ g のトータル RNA をオリゴ(dT)15-アダプタープライマーと M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) にて逆転写し、生成した cDNA と表 3 に示したプライマーおよび SYBR Green (Fast Start Essential DNA Green Master, Roche Diagnostics)を用いて、real-time PCR 法 (LightCycler system, Roche Diagnostics)により発現量を定量した。それぞれの発現量を β -actin の発現量にて補正した。

2.8 DNA 含量

DNA 含量を第一章と同じ方法により測定した。

2.9 統計解析

実験データを平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。平均値間の有意差検定は一元配置分散分析法により行い、事後検定には Scheffe's post hoc-test を用いた。2 群の平均値間の有意差検定には Student's *t*-test を用いた。

表 2. ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色に用いた一次抗体と希釈倍率

抗体	希釈倍率
抗 UCP1 ウサギ血清 (京都大学河田照雄教授より供与)	WB: 5,000 倍 IHC: 800 倍
aP2 (Cell Signalling Technology)	WB: 5,000 倍
caspase9 (Cell Signalling Technology)	WB: 5,000 倍
phospho-pRb (Cell Signalling Technology)	WB: 5,000 倍
Actin (Sigma-Aldrich)	WB: 5,000 倍
p57 (Sigma-Aldrich)	WB: 5,000 倍
p27 (BD Biosciences)	WB: 5,000 倍
pRb (BD Biosciences)	WB: 5,000 倍
PCNA (Santa Cruz Biotechnology)	WB: 5,000 倍 IHC: 300 倍
Ki67 (Abcam)	IHC: 200 倍
monocarboxylate transporter 1 (MCT1) (Merck Millipore)	IHC: 200 倍

(WB: ウェスタンブロット; IHC: 蛍光免疫染色)

表 3. real-time PCR に用いたプライマー

gene name (gene symbol) : gene bank 登録番号, 増幅サイズ
Forward プライマー配列
Reverse プライマー配列
<i>Ucp1</i> : NM_009463.3, 197 bp
For: 5'- GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC -3'
Rev: 5'- AGG GCC CCC TTC ATG AGG TC -3'
<i>Cox IV</i> : NM_009941.3, 252 bp
For: 5'- TGA GCC TGA TTG GCA AGA GA-3'
Rev: 5'- CGA AGC TCT CGT TAA ACT GG-3'
<i>Cidea</i> : NM_007702.2, 222 bp
For: 5'- CTT ATC AGC AAG ACT CTG GAT G-3'
Rev: 5'- GAA GGT GAC TCT GGC TAT TC-3'
<i>Pgc1a</i> : NM_008904.2, 214 bp
For: 5'-GTG TGG AAC TCT CTG GAA CT -3'
Rev: 5'- GCG TAC AAC TCA GAT TGC TC-3'
<i>Dio2</i> : NM_010050.3, 130 bp
For: 5'- CAG TGT GGT GCA CGT CTC CAA TC -3'
Rev: 5'- TGA ACC AAA GTT GAC CAC CAG -3'
<i>Prdm16</i> : NM_001291029.1, 183 bp
For: 5'- GAC ATT CCA ATC CCA CCA GA -3'
Rev: 5'- CAC CTC TGT ATC CGT CAG CA -3'
<i>b-actin</i> : NM_007393.5, 174 bp
For: 5'- AAG TGT GAC GTT GAC ATC CG-3'
Rev: 5'- GAT CCA CAC AGA GTA CTT GC-3'
<i>ap2</i> : NM_024406.2, 280 bp
For: 5'- AAG ACA GCT CCT CCT CGA AGG TT-3'
Rev: 5'- TGA CCA AAT CCC CAT TTA CGC-3'
<i>p27</i> : NM_009875.4, 156 bp
For: 5'- TCT CAG GCA AAC TCT GAG GA -3'
Rev: 5'- TTC TTC TGT TCT GTT GGC CC-3'

3. 結果

3.1 脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が脂肪組織に与える影響

脂肪細胞の増殖の抑制が脂肪組織にどのような影響を与えるかを調べるため、細胞周期の進行を抑制する p27 を脂肪細胞特異的に過剰発現させたマウス(脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウス: Tg マウス)の性状を解析した。12 週齢の時点で、WT および Tg マウスの体長は 8.7 ± 0.1 cm と 8.6 ± 0.0 cm、体重は 23.2 ± 0.6 g と 20.6 ± 0.7 g であり、両マウスの間に違いはなかった(図 9 A, B)。

脂肪組織を調べると、褐色脂肪組織は Tg マウスでサイズが小さく (図 9 C)、組織重量は WT マウスの約 5 分の 1 だった(図 9 D)。鼠径部および生殖器周囲の白色脂肪組織では肉眼像(図 9 C)および重量(図 9 D)に両群に違いが見られなかった。褐色脂肪組織と鼠径部および生殖器周囲白色脂肪組織の HE 染色像を比較すると、いずれの脂肪組織においても脂肪滴および脂肪細胞の大きさは WT と Tg マウスの間に違いはなく、形態学的な違いは認められなかった(図 9 E)。p27 のタンパク質量をウェスタンブロット法により解析すると、Tg マウスの鼠径部および生殖器周囲の白色脂肪組織では WT マウスの 2.7 倍および 2.1 倍、褐色脂肪組織では 5.4 倍に増加した(図 9 F)。また、同じ Cip/Kip ファミリーに属する p57 の発現量は両マウスで同程度であり、代償的な発現の変動は認められなかった。

以上の結果から、脂肪細胞における p27 の過剰発現は、白色脂肪組織には影響を与えずに褐色脂肪組織の形成を阻害することがわかった。

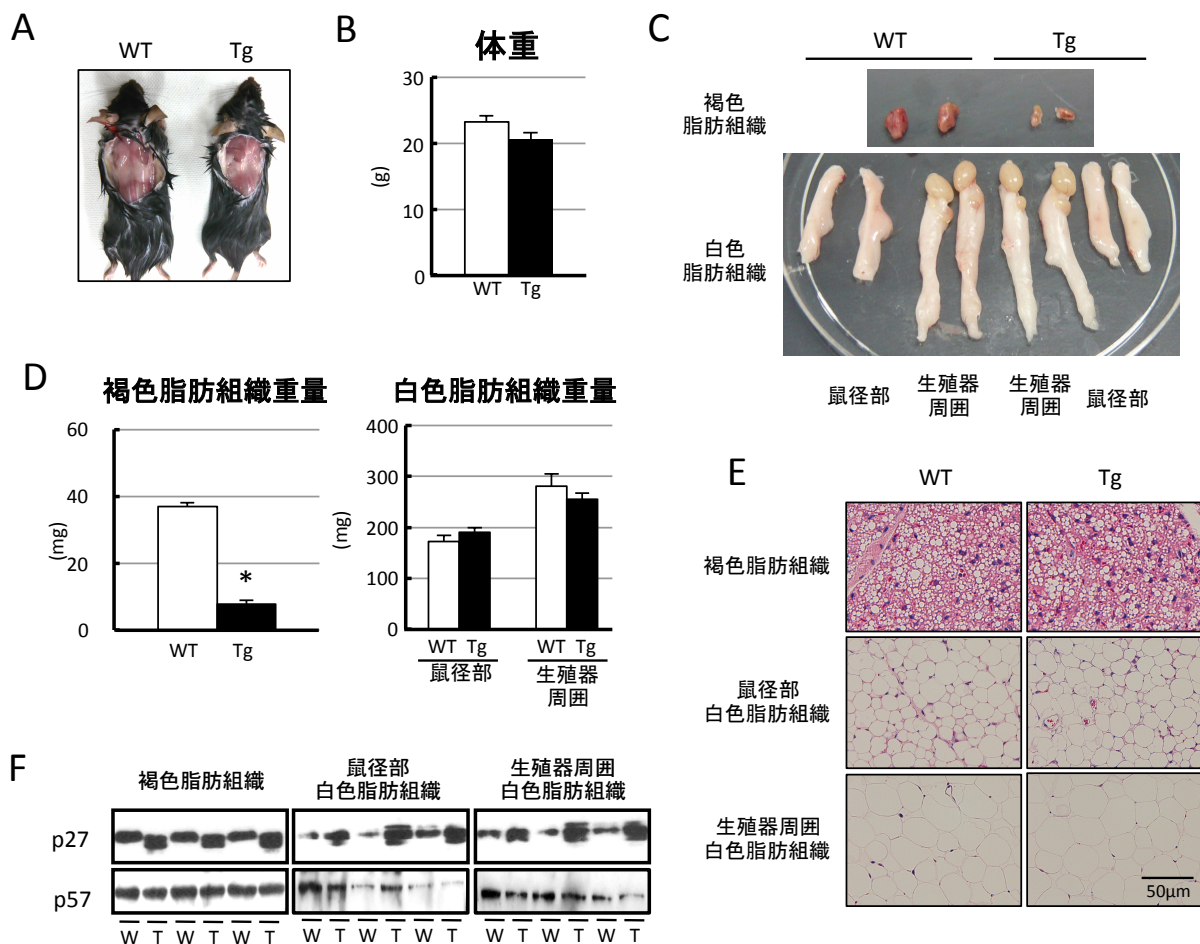


図 9 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスの脂肪組織の性状

野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスの性状を比較した。WT と Tg マウスの肉眼像(A)と体重(B)を示す。採材した褐色脂肪組織と鼠径部および生殖器周囲白色脂肪組織の肉眼像(C)と重量(D)、HE 染色像(E)を示す。褐色脂肪組織と鼠径部および生殖器周囲白色脂肪組織中に発現する p27 と p57 のタンパク質量をウェスタンブロット法により調べた (F)。値は 5 例の平均値±標準誤差を示す。*は WT マウスとの間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。

3.2 脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞の熱産生機能に与える影響

褐色脂肪組織の熱産生に関わる因子の mRNA の発現量を測定した。熱産生を担う UCP1 や、その遺伝子発現を促進する PGC-1 α 、甲状腺ホルモンの活性化に関わる iodothyronine deiodinase 2 (Dio2)、ミトコンドリアの呼吸鎖の構成因子である Cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV) および UCP1 と相互作用することが報告されている Cide-A の遺伝子発現には、WT と Tg マウスの間に違いは見られなかったが、前駆脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化制御に関わる PRDM16 の発現量は WT マウスに比べ Tg マウスで低かった(図 10 A)。mRNA 発現量と一致して、一定タンパク質量あたりの UCP1 量も WT と Tg マウスの間に違いはなかった(図 10 B 左)。しかし、組織全体に含まれる UCP1 含量は Tg マウスでは WT マウスの 27.5% だった(図 10 B 右)。細胞数の指標として組織中の DNA 含量を測定したところ、組織重量に一致して Tg マウスでは約 5 分の 1 に減少していた(図 10 C)。

これらの結果から、Tg マウスにおける褐色脂肪組織の減少は、褐色脂肪細胞の分化過程への影響ではなく、細胞数の減少によると考えられた。

そこで、Tg マウスにおける褐色脂肪組織の機能を調べるため、室温 4°C の寒冷環境での体温の変化を調べた。寒冷刺激前の体温は、WT マウスでは 37.6°C $\pm$ 0.3°C、Tg マウスでは 37.5°C $\pm$ 0.3°C であり、両マウスで違いはなかった(図 11 A)。寒冷刺激を与えると、WT マウスでは体温に変化はなく、60 分間ほぼ一定に維持されたが、Tg マウスでは寒冷刺激後すみやかに体温が低下していき、60 分後には 1.0°C $\pm$ 0.2°C の減少となった。次に β 3 アドレナリン受容体作動薬 CL (0.1 mg/kg) を皮下投与して褐色脂肪組織の熱産生能を活性化した際の体温および褐色脂肪組織の温度を測定した。体温と組織温度はいずれのマウスにおいても CL 投与後すみやかに上昇した(図 11 B)。WT マウスに比べて、Tg マウスの方が上昇は緩やかだったものの、Tg マウスの褐色脂肪組織が熱産生能を持つことがわかった。

これらの結果から、Tg マウスでは褐色脂肪細胞の数の減少により組織低形成を示し、WT マウスに比べて全身レベルでは褐色脂肪組織の熱産生機能が低下しているものの、残存する褐色脂肪細胞は正常な機能を持つと考えられた。

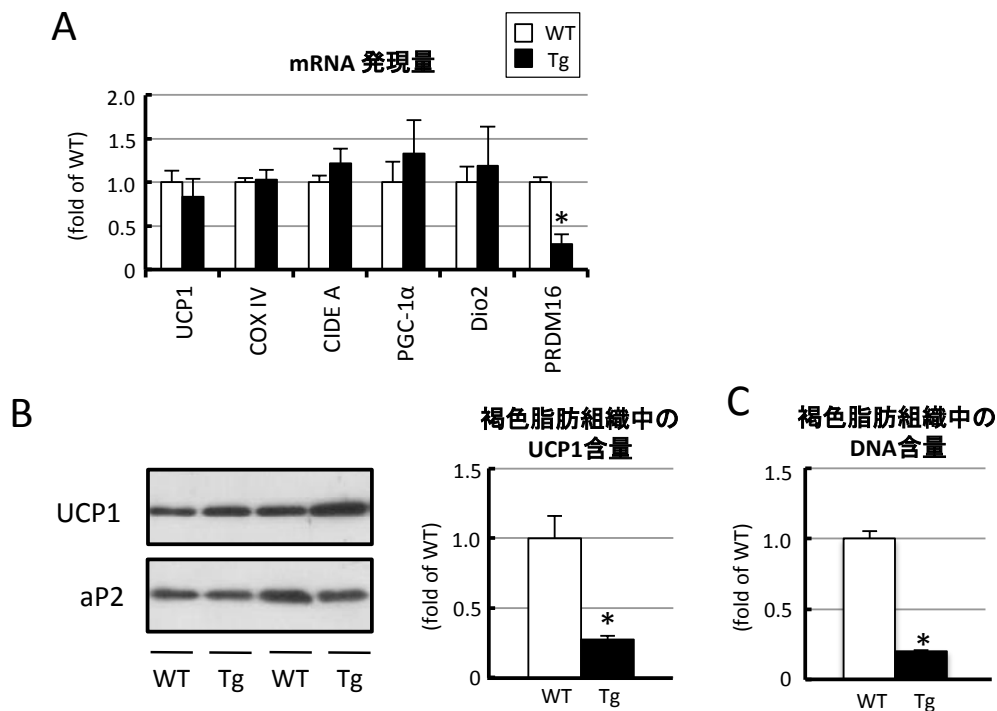


図 10 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスの褐色脂肪組織の性状

野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスの褐色脂肪組織の性状を比較した。WT と Tg マウスから採材した褐色脂肪組織中の褐色脂肪細胞の機能に関連する遺伝子の mRNA 発現量(A)および組織中の UCP1 タンパク質含量 (B)、DNA 含量(C)を調べた。値は 5 例の平均値±標準誤差を示す。*は WT マウスとの間に有意な差 ($p<0.05$)があることを示す。

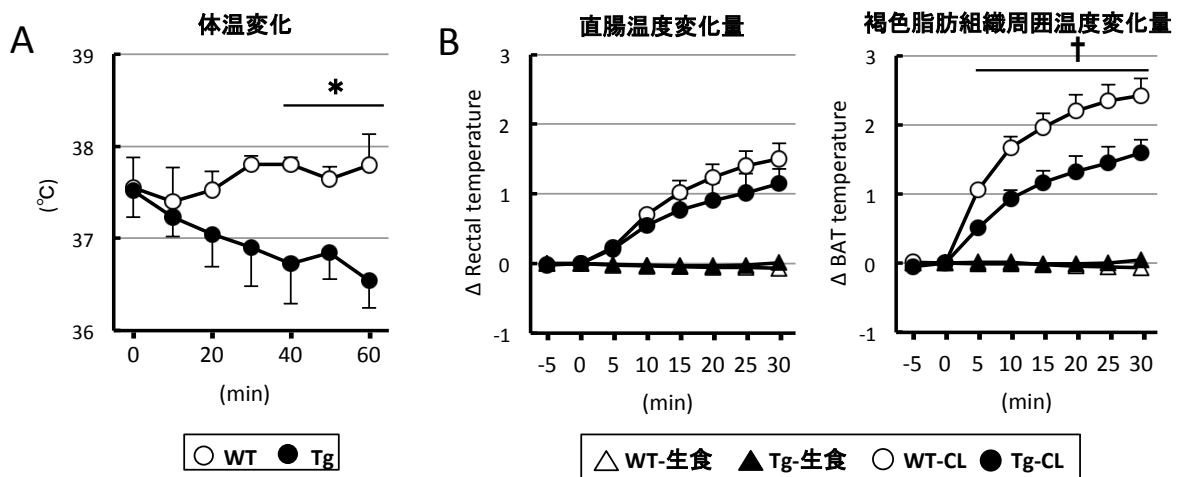


図 11 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスの褐色脂肪組織の機能

野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスの褐色脂肪組織の熱産生機能を比較した。WT と Tg マウスを寒冷環境(4°C)におき、1 時間の体温変化を測定した(A)。WT と Tg マウスに生理食塩水(生食)もしくは $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬 CL316,243(CL: 0.1 mg/kg)を麻酔下で腹腔内投与し、30 分の直腸温度と褐色脂肪組織の温度変化を測定した(B)。値は 5 例(A)および 4 例(B)の平均値±標準誤差を示す。*は WT マウスとの間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。† は WT-CL vs Tg-CL の間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。

3.3 脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

p27 の過剰発現が褐色脂肪組織における細胞増殖にどの程度影響を与えているかを調べるために、WT および Tg マウスの褐色脂肪組織の薄切切片を作製し、増殖マーカーである PCNA と Ki67 の発現を免疫染色法により調べた(図 12 A)。PCNA および Ki67 陽性細胞は WT と Tg の両マウスにおいても検出されたが、その数は Tg マウスで少なかった。全細胞に対する PCNA 陽性の細胞の割合を調べると、Tg マウスの褐色脂肪組織では WT マウスの約 3 分の 1 に低下していた(図 12 B)。ウェスタンブロットにおいても、PCNA の発現量は WT マウスに比べて Tg マウスでは著しく低かった(図 12 C)。また、癌抑制遺伝子であり、細胞増殖抑制性の網膜芽細胞腫タンパク質(pRb)は WT と Tg マウスの両方で同程度発現していたが、不活性型のリン酸化 pRb は WT マウスでのみ検出された。一方、アポトーシス関連タンパク質として知られている caspase9 は WT マウスに比べ Tg マウスでは発現量が低い傾向が認められたので、少なくとも Tg マウスにおいてアポトーシスが進行しているとは考えられなかった。これらの結果から、p27-Tg マウスにおける褐色脂肪組織の低形成はアポトーシスによるものではなく、細胞増殖の抑制によると考えられた。

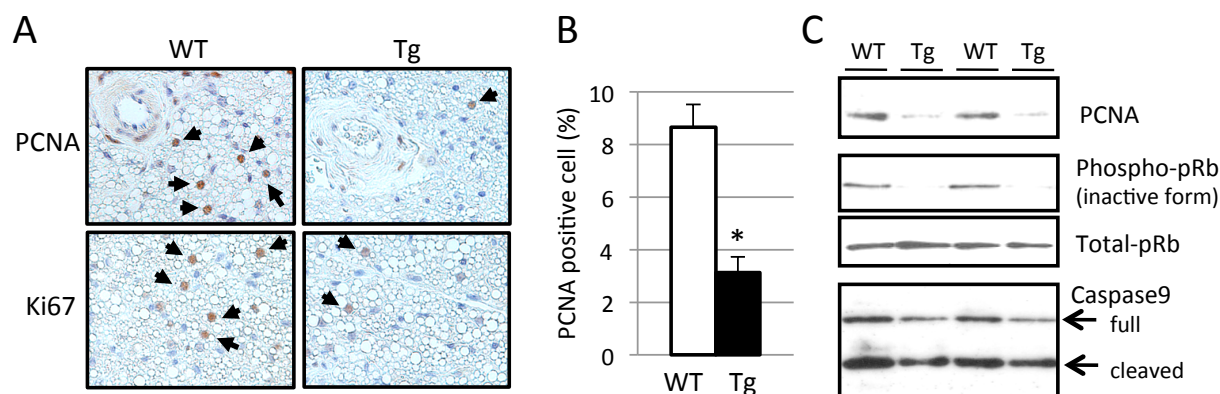


図 12 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスにおける褐色脂肪組織中の増殖細胞数の変化

免疫染色により野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスの褐色脂肪組織中に発現する細胞増殖マーカーPCNA および Ki67 の発現を免疫染色法により調べた(A)。褐色脂肪組織中の全細胞に対する PCNA 陽性細胞の割合を算出した(B)。褐色脂肪組織中の PCNA と網膜芽細胞腫タンパク質(pRb)、アポトーシス関連タンパク質の発現量をウェスタンブロット法により調べた(C)。値は4例の平均値±標準誤差を示す。
*は WT マウスとの間に有意な差($p<0.05$)があることを示す。

3.4 脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が脂肪細胞への分化に与える影響

p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞への分化に影響を与えているか否かを調べるため、WT と Tg マウスから胎仔線維芽細胞(MEF)を調整し、*in vitro* での脂肪細胞への分化能を調べた。WT および Tg の MEF のいずれにおいても分化誘導後 4 日目から脂肪細胞分化マーカーである aP2 の発現が認められた(図 13 A)。p27 タンパク質は、WT の MEF では分化前後のいずれにおいても発現が認められなかったが、Tg の MEF では aP2 の発現が確認された分化誘導開始後 4 日目以降で p27 が検出された。分化誘導開始後 8 日目に MEF がどの程度の脂肪滴を蓄えているかを Oil red-O 染色により調べたところ、両群ともに同程度に染色されたため、脂肪含量に違いはないと考えられた(図 13 B)。aP2 およびミトコンドリア数の指標である COX4 の mRNA 量は両群間で違いはなかったが、UCP1 および PRDM16 の mRNA 発現量は WT の MEF に比べ Tg の MEF で低かった (図 13 C)。UCP1 タンパク質の発現を蛍光免疫染色により調べると、Tg の MEF では UCP1 陽性の細胞数が少なかった (図 13 D)。

p27 の過剰発現が褐色脂肪細胞の分化にどの程度影響を与えるかをより詳しく調べるため、アデノウイルスを用いて GFP (AD-GFP)もしくは p27 (AD-p27)を前駆褐色脂肪細胞株(HB2) で過剰発現させた。両細胞の分化過程における脂肪含量を Oil red-O 染色により調べると、分化誘導前(0 日)から 6 日目まで同程度に染色され、p27 の発現は脂肪含量に影響しないことがわかった(図 14 A)。p27 の mRNA 発現量は GFP 発現細胞では分化誘導前と同程度であり、p27 過剰発現細胞で約 5 倍に増加していた(図 14 B)。aP2 と UCP1 の mRNA 発現量は GFP 過剰発現細胞と p27 過剰発現細胞ともに分化に伴い増加し、分化後の両細胞で違いはなかった。

これらの結果から、p27 を過剰発現させても脂肪細胞への分化には影響しないと結論づけた。

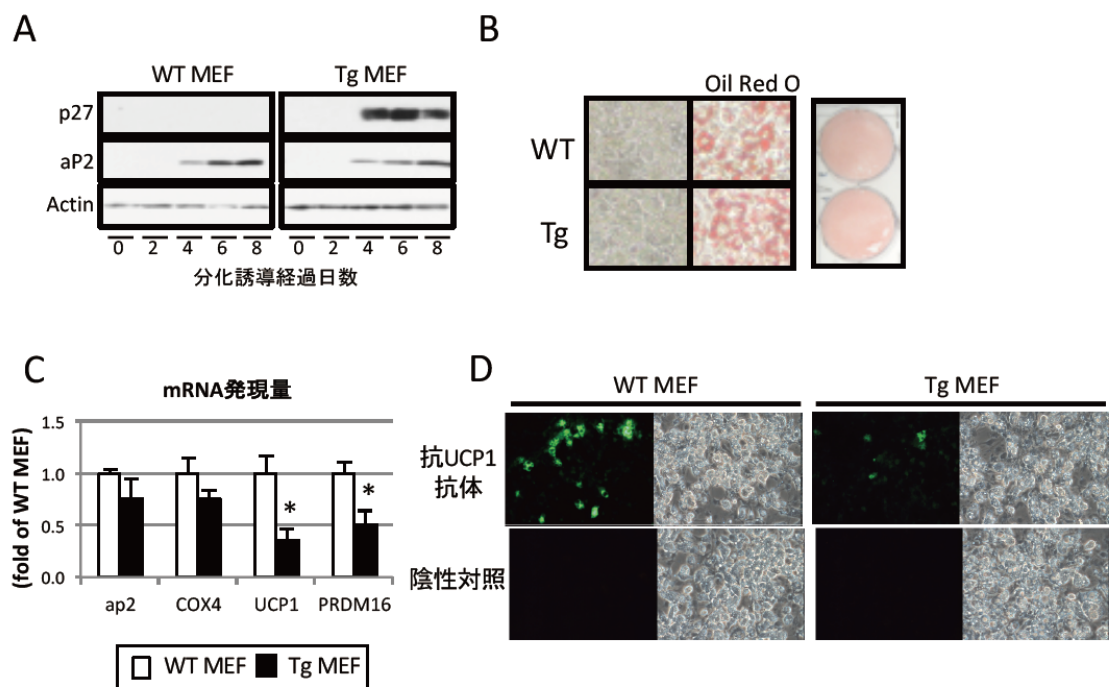


図 13 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現が胎仔線維芽細胞の脂肪細胞への分化に与える影響

胎齢 16.5 日の野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスから胎仔線維芽細胞(MEF)を調整して培養した。10% FCS 含有 DMEM-high glucose (培養培地)で培養し、細胞密度が 100%になった時点で培養培地に 0.5 mM IBMX と 1 μ M Dex を加えた分化誘導培地で 2 日間培養した。その後、培養培地に 10 μ g/ml insulin と 50 nM T3、10 μ M Tro を加えた分化培地で 2 日毎に培地を交換しながら 6 日間培養し、脂肪細胞への分化を誘導した。分化誘導経過日数毎(0、2、4、6、8 日)の p27 と aP2 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により調べた(A)。分化誘導開始後 8 日の細胞を用いて、脂肪滴含量を Oil red O 染色法により (B)、aP2、COX4、UCP1、PRDM16 の mRNA 発現量を real-time PCR 法により(C)、UCP1 タンパク質発現を蛍光免疫染色法により(D)解析した。値は 4 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。*は WT MEF との間に有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

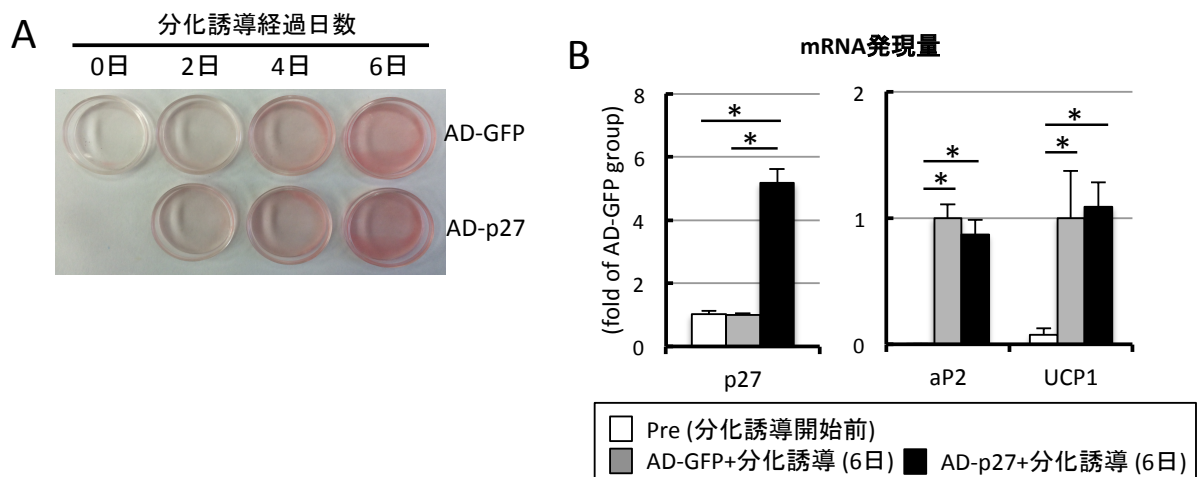


図 14 p27 過剰発現が前駆褐色脂肪細胞株 HB2 細胞の分化に与える影響

HB2 細胞にアデノウイルスを用いて GFP(AD-GFP)もしくは p27(AD-p27)を過剰発現させた。感染力価を 100 MOI としたアデノウイルスを含む FCS 不含 DMEM-high glucose で 6 時間培養したのちに、10 μ g/ml insulin と 50 nM T3、10 μ M Tro を加えた分化培地で 2 日毎に培地を変えながら 6 日間培養し、褐色脂肪細胞への分化を誘導した。分化誘導経過日数ごとの脂肪滴含量を Oil red O 染色法により調べた(A)。分化誘導開始後 6 日目における p27、aP2、UCP1 の mRNA 発現量を real-time PCR 法により調べた(B)。値は 3 例(Pre)および 5 例(AD-GFP および AD-p27)の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。*は群間に有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

3.5 脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現が $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激による褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

ここまでの結果から、脂肪細胞特異的に p27 を過剰発現させたマウスでは褐色脂肪組織の形成が阻害されることがわかった。したがって、褐色脂肪細胞の増殖は組織形成に一定の寄与をしていると考えられた。寒冷刺激に応じた組織増生にも関与するか否かを明らかにしたいと考えたが、Tg マウスは寒冷不耐性であることから(図 11 A)、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬(CL: 0.1 mg/kg)への応答を検討した。

マウスに CL を投与すると、すみやかに体温を上昇させ(図 11 B)、1 日後には WT および Tg マウスの褐色脂肪細胞中の脂肪滴のサイズは小さくなり(図 15 A)、Tg マウスの褐色脂肪細胞は $\beta 3$ アドレナリン受容体の刺激に対して正常に応答することが確認できた。抗 Ki67 抗体を用いて褐色脂肪組織を蛍光免疫染色すると、WT マウスにおいて生食投与では陽性細胞はほとんど見られなかったのに対し、CL 投与では劇的に Ki67 陽性細胞の数が増加した(図 15 B)。一方、Tg マウスにおいては生食投与と CL 投与の両群で陽性細胞はほとんど見られなかった。Ki67 陽性細胞を褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数えたところ、WT マウスにおいて Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は生食投与の $9.0\% \pm 0.7\%$ に比べ、CL 投与群では $21.7\% \pm 0.7\%$ と有意に高い値を示した(図 15 C)。Tg マウスにおいて Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は生食投与の $1.6\% \pm 0.1\%$ に比べ、CL 投与では $0.9\% \pm 0.2\%$ と変化がみられなかった。一方で、何のマウスにおいても Ki67 陽性の間質細胞の割合に変動はなかった(WT 生食投与: $18.4\% \pm 1.3\%$ 、WT CL 投与: $19.0\% \pm 1.5\%$ 、Tg 生食投与: $17.3\% \pm 0.8\%$ 、Tg CL 投与: $17.6 \pm 1.0\%$)。

これらの結果から、脂肪細胞特異的な p27 の過剰発現は $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激による褐色脂肪細胞の増殖を阻害することがわかった。

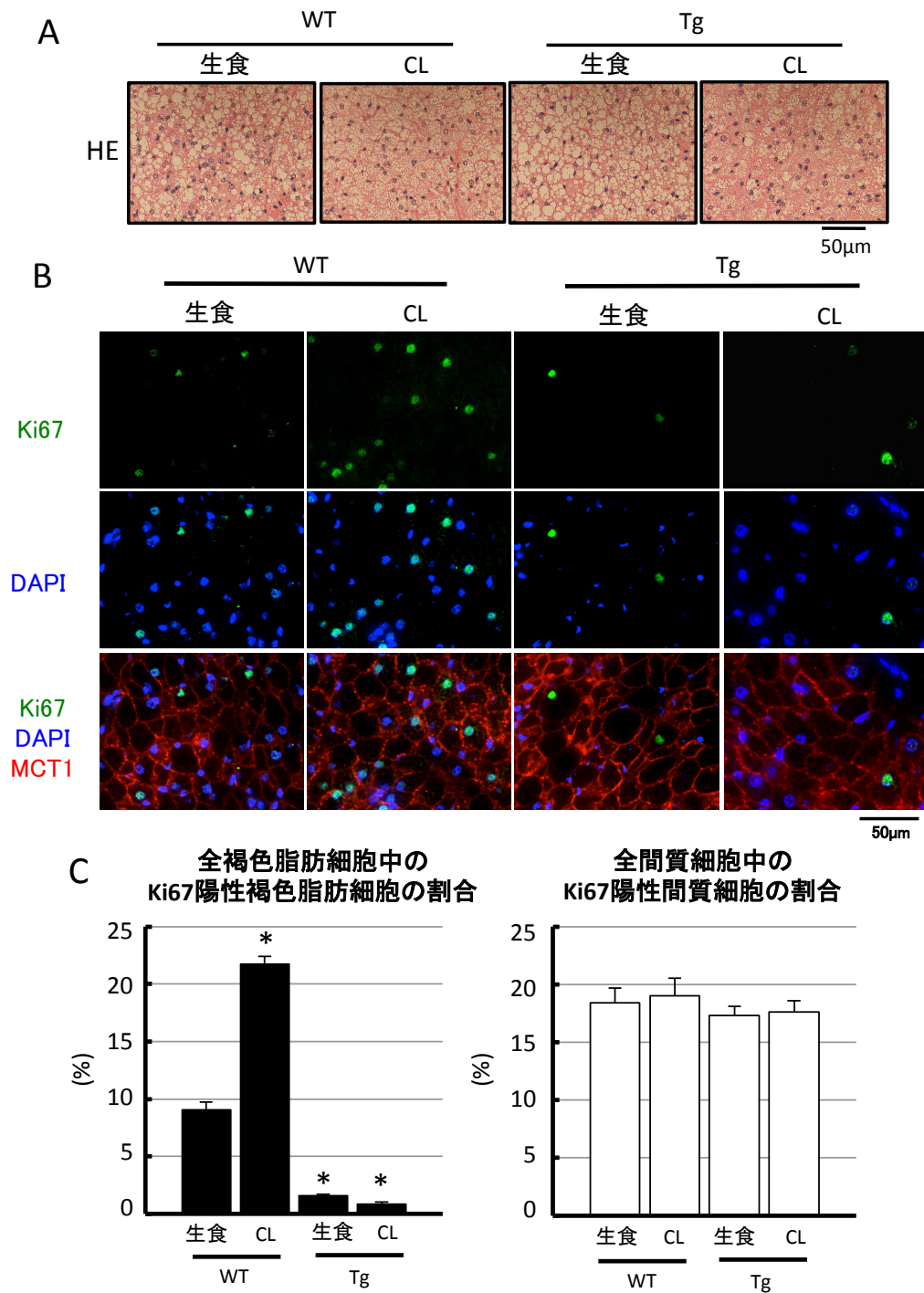


図 15 脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスにおける $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬 CL316, 243 誘導性の褐色脂肪細胞の増殖に与える影響

野生型(WT)マウスと脂肪細胞特異的 p27 過剰発現(Tg)マウスに生理食塩水(生食)もしくは CL316,243 (CL: 0.1mg/kg/day)を 1 回皮下投与した。24 時間後に採材した褐色脂肪組織から薄切標本を作製し、HE 染色像(A)を調べた。次いで Ki67 (緑:上段)と MCT1 (赤:下段)を蛍光免疫染色により染色した。核を DAPI (青:中央)で染色した。全ての色を重ね合わせた染色像を下段に示す(B)。染色した細胞を図 1 で定義した方法に従い褐色脂肪細胞と間質細胞に区別して数え、それぞれの Ki67 陽性細胞の割合を算出した(C)。値は 4 例の平均値±標準誤差を示す。*は WT 生食投与との間に有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

4. 考察

第一章では、マウスに寒冷刺激を与えると褐色脂肪組織において間質細胞に加えて分化した褐色脂肪細胞の分裂が誘導されることが明らかとなった。これらは寒冷刺激誘導性の組織増生に関わると考えられる。さらに本章では、分化した脂肪細胞の増殖が組織形成に寄与するかを明らかにするために、細胞分裂を抑制する p27 を分化した脂肪細胞特異的に過剰発現させたマウス(Tg マウス)を解析した。

Tg マウスは褐色脂肪組織の著しい低形成を示した。Tg マウスの褐色脂肪組織では増殖マーカーの発現が低下しており、DNA 含量も減少していたことから、p27 により褐色脂肪細胞の増殖が抑制され、細胞数の減少により組織サイズが小さくなったと考えられた。一方で、組織中の褐色脂肪細胞の形態には WT マウスとの間に違いは認められず、UCP1 の発現も正常だった。β3 アドレナリン受容体作動薬に応答した熱産生の増加と脂肪滴含量の低下も確認されたため、細胞数の減少により組織は小さくなったものの、残存する褐色脂肪細胞は正常であると考えられた。これらの結果から、第一章で見出した褐色脂肪細胞の分裂という新規増殖経路は、褐色脂肪組織の形成にも寄与していると考えられた。

組織形成に加えて、寒冷刺激による組織増生への寄与を明らかにしようと試みたが、Tg マウスは褐色脂肪細胞数の減少により寒冷環境下で体温を維持できず寒冷不耐性であったため、寒冷刺激の影響を調べるができなかった。第一章において、褐色脂肪細胞の増殖は β3 アドレナリン受容体刺激によって誘導されることが明らかになったので、Tg マウスに β3 受容体作動薬を用いて褐色脂肪細胞の増殖への影響を調べた。WT マウスで見られる β3 作動薬投与による Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の増加が Tg マウスでは消失したことから、Tg マウスでは β3 受容体を介した褐色脂肪細胞の増殖が完全に阻害されていることがわかった。これらの結果により、β3 受容体の刺激により褐色脂肪細胞の細胞周期が進行して分裂増殖することが強く支持された。

本 Tg マウスでは、分化した脂肪細胞で発現する aP2 の下流で p27 を発現させており、実際 Tg の MEF を用いた解析において aP2 の発現に伴い p27 が発現することが確認できたため、p27 の発現が褐色脂肪細胞の脂肪細胞分化に影響した可能性は低いと考えられる。確認のために WT および Tg マウスから調整した MEF を *in vitro* で褐色脂肪細胞へと分化させると、同程度の脂肪含量および aP2 発現量を示し、脂肪細胞への分化に違いは認められなかった。褐色脂肪細胞特

異的 UCP1 の mRNA 発現量は Tg の MEF で低く、UCP1 発現細胞の数も WT の MEF に比べて Tg の MEF で少ないことがわかった。一方で、Tg の MEF では PRDM16 の mRNA が減少していた。PRDM16 は褐色脂肪細胞の分化や UCP1 発現の誘導に関わる因子の一つであり [62]、Tg マウスの MEF で見られた UCP1 陽性細胞の数の減少が p27 による褐色脂肪細胞分化過程の阻害による可能性も考えられた。そこで、分化への影響を直接調べるために褐色脂肪細胞株 HB2 に p27 を発現させて検討を行ったが、UCP1 mRNA 発現量に影響は認められなかったため、p27 の発現は褐色脂肪細胞の分化に影響を与えないと結論づけた。しかし、*in vivo* においても Tg マウスの褐色脂肪組織での PRDM16 の mRNA 発現量の低下が認められるため、Tg マウスの褐色脂肪の低形成に何らかの関わりがある可能性がある。この点については、今後の検討が必要だと考えられる。

Tg マウスでは褐色脂肪組織の形成が阻害されたものの、白色脂肪組織に異常は見られなかった。高脂肪食給餌による肥満モデルマウスでは、白色脂肪細胞のサイズに加えて数が増加して組織の増生が起こる。この増生には前駆脂肪細胞の増殖に関わると考えられている一方で、分化した白色脂肪細胞も増殖する可能性が示唆されてきた [48-50]。Tg マウスの白色脂肪組織のサイズや重量、白色脂肪細胞のサイズに、WT マウスと違いは認められなかったため、白色脂肪細胞にも分化後の分裂機構が存在するとしても、白色脂肪組織の形成には関わっていないことがわかった。この結果は、第一章において白色脂肪組織中の PCNA の発現が間質細胞層でのみ検出され、脂肪細胞層では認められなかった結果に一致している。分化後の増殖の抑制が組織形成に与える影響が、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞で異なる理由については不明であるが、両脂肪細胞が Myf5 陰性および陽性細胞という異なる起源細胞に由来することに関係がある可能性が考えられる[43, 44]。肥満に伴う組織の増生への関与については、今後検討していく予定である。

現在、肥満対策のターゲットとしての褐色脂肪の研究は、褐色脂肪細胞の機能を活性化する方法や、前駆脂肪細胞の増殖や分化を促進する方法についての研究が主体となっている。本研究で見出した褐色脂肪細胞の新規増殖経路について、活性化する因子やメカニズムが明らかになれば、既存の褐色脂肪機能の活性化因子による肥満対策法との組み合わせにより、相乗的な効果を期待できる肥満対策法の開発につながる可能性がある。さらなる研究が期待される。

5. 小括

分化した脂肪細胞の増殖が脂肪組織の形成や増生にどの程度寄与するかを明らかにするため、細胞周期を停止させる p27 を脂肪細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを解析した。Tg マウスにおいて、白色脂肪組織は WT マウスとの間に明確な違いは認められなかったが、褐色脂肪組織は細胞数の減少を伴う低形成を示した。Tg マウスの褐色脂肪組織には WT マウスと同程度に脂肪滴を蓄える正常な形態を持つ褐色脂肪細胞が存在しており、UCP1 発現量にも WT マウスと変化はなかったが、組織全体の細胞数が減少したため組織当たりの UCP1 含量は WT マウスに比べて著しく減少していた。この結果に一致して、寒冷刺激を与えると WT マウスは体温を維持するのに対して Tg マウスの体温は徐々に低下し、寒冷不耐性を示した。一方で、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬に応答して組織温度が上昇したため、Tg マウスに残存する褐色脂肪組織は熱産生能を持つことが確認できた。以上の結果から、Tg マウスでは褐色脂肪細胞の数が減少したことにより組織が小さくなったが、存在している褐色脂肪細胞は機能的であることがわかった。

p27 が褐色脂肪細胞の分化に影響を与えているか検討するため、WT と Tg マウスから調整した MEF を褐色脂肪細胞へと分化させた。Tg の MEF では UCP1 発現量が低下したものの、分化した脂肪細胞で発現する aP2 およびミトコンドリア量の指標となる COX IV の mRNA 発現量や脂肪含量に差は見られなかった。褐色脂肪細胞株である HB2 細胞にアデノウイルスを用いて p27 もしくは GFP を過剰発現させ、両細胞の分化過程を比較した結果、aP2 および UCP1 の mRNA 発現量や脂肪含量に差はなかった。これらの結果から、p27 は褐色脂肪細胞の分化に影響を与えないと結論づけた。

最後に、第一章で見出された寒冷誘導性の $\beta 3$ アドレナリン受容体を介した褐色脂肪細胞の増殖が Tg マウスで抑制されるか検討した。Tg マウスが寒冷不耐性を示すため、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬 (CL; CL316,243) を投与して、Ki67 発現細胞の変化を調べた。両マウスとも CL 投与により褐色脂肪細胞に含まれる脂肪滴のサイズが減少し、 $\beta 3$ アドレナリン受容体の刺激に応答することが確認できた。生食投与した Tg マウスに発現する Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の割合は生食投与した WT マウスに比べ有意に低下していた。WT マウスで見られた CL 投与による Ki67 陽性の褐色脂肪細胞数の増加が Tg マウスでは見られなかった。また、Ki67 陽性の間質細胞の割合は CL 投与の有無に関わらず変化はなかった。

これらの結果から、分化した褐色脂肪細胞の増殖は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して起きていることがわかった。

以上の結果から、褐色脂肪細胞の分化後の増殖機構は組織形成に大きく寄与することがわかった。

[総括]

哺乳動物には白色脂肪と褐色脂肪の2種類の脂肪組織が存在する。白色脂肪はエネルギーを貯蔵し、必要に応じて脂肪酸として全身にエネルギーを供給するのに対し、褐色脂肪は脂肪酸を自身で酸化分解し熱へと転換する。褐色脂肪の熱産生はミトコンドリア内膜に特異的に発現する脱共役タンパク質 UCP1 が担っている。UCP1 の機能は、交感神経由来のノルエピネフリンの β 作用により活性化され、酸化的リン酸化を脱共役させることでエネルギーを熱に変換する。動物が寒冷環境に暴露されると交感神経-褐色脂肪経路が活性化して体温が維持される。寒冷環境下におかれた動物の褐色脂肪組織は UCP1 発現量の増加とともに細胞数の増加を伴って増生することが知られている。しかし、寒冷刺激誘導性の組織増生において、どのような細胞が増えているかは不明である。一般的に、間質細胞に含まれる前駆脂肪細胞が増殖し、それらの分化により褐色脂肪細胞の数を増やすと考えられているが、分化した褐色脂肪細胞の増殖に関してはあまり議論されていない。そこで、本研究では分化した褐色脂肪細胞が増殖能を持つか否か、また、その生理学的意義を明らかにするために実験を行った。

第一章では寒冷刺激により褐色脂肪組織が増生する際にどのような細胞が増殖しているかを解析した。褐色脂肪細胞の細胞膜に高発現する MCT1 と UCP1 を共染色すると MCT1 陽性の細胞膜で覆われた大きな UCP1 陽性の細胞質領域を持ち、円形の核を持つ褐色脂肪細胞と MCT1 陽性の細胞膜の間隙に存在する UCP1 陰性で扁平な核を持つ間質細胞を区別し定義することができた。この定義に従い、寒冷刺激を与えたマウスの褐色脂肪組織をみると、寒冷刺激1日目から増殖マーカーKi67を発現する褐色脂肪細胞の数が増加し、遅れて Ki67 陽性の間質細胞数が徐々に増加した。この寒冷刺激による Ki67 陽性細胞数の増加は、褐色脂肪細胞においては $\beta 3$ アドレナリン受容体阻害剤により抑制され、間質細胞においては $\beta 1$ アドレナリン受容体阻害剤により抑制された。さらに、 $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬を投与すると、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞数が増加し、Ki67 陽性間質細胞には影響しなかった。これらの結果から、寒冷刺激を与えると間質細胞に加えて、 $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して褐色脂肪細胞の増殖が誘導されることが新たに明らかになった。

第二章では分化した脂肪細胞の増殖の生理学的意義を明らかにするために、細胞周期の進行を抑制する p27 を脂肪細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを用いて、白色と褐色脂肪細胞の増殖について検討した。Tg マウスの性状を詳しく解析すると、白色脂肪組織には変化が見られなかったのにも関わらず、褐色脂肪組織は WT に比べ細胞数の低下とともに組織低形成を示した。Tg マウスの褐色脂肪細胞は形態学的にも機能的にも WT の褐色脂肪細胞と差はなかった。Tg マウスの MEF および p27 を過剰発現させた HB2 細胞のいずれも対照群と同程度に褐色脂肪細胞へ分化した。p27 の過剰発現が脂肪細胞への分化に影響を与えなかったことから、分化した褐色脂肪細胞の増殖は組織形成に寄与していると結論した。さらに、Tg マウスに $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬を投与すると、脂肪含量が低下するにも関わらず、Ki67 陽性の褐色脂肪細胞の増加がみられなかったことから、分化した褐色脂肪細胞の増殖は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して起きていることがわかった。

本研究により、褐色脂肪細胞は分化後にも分裂するという、これまで想定されていなかった独特な増殖経路を持っていることがわかった。この増殖経路は $\beta 3$ アドレナリン受容体を介しており、寒冷刺激誘導性の組織増生や組織形成に寄与していることがわかった。

[謝辞]

本論文の作成にあたり、終始御指導を賜りました北海道大学 獣医学研究科 比較形態機能学講座 生化学教室 木村和弘教授、岡松優子講師に厚く感謝致しますとともに、本論文をご校閲頂いた北海道大学 獣医学研究科 比較形態機能学講座 生理学教室 葉原芳昭教授ならびに北海道大学 獣医学研究科 環境獣医科学講座 放射線学教室 稲波修教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、脂肪細胞特異的 p27 過剰発現マウスを快く御提供頂いた徳島大学 阪上浩教授、抗 UCP1 抗体を分与頂いた京都大学 河田照雄教授に感謝致します。また、本研究を進めるにあたり、多くの御助言、御協力をいただきました北海道大学 斉藤昌之名誉教授ならびに北海道大学 医学研究科 解剖学講座 組織細胞学分野 小林純子助教、北海道大学 獣医学研究科 比較形態機能学講座 生化学教室の皆様にご礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行する上で、尊い犠牲となった動物たちに心より感謝し、冥福を祈ります。

[引用文献]

- [1] Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.*, 84, 277-359.
- [2] Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73, 9-15.
- [3] Lowell, B.B., Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404, 652-660.
- [4] Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 82-106.
- [5] Garlid, K.D., Jaburek, M., Jezek, P. (1988). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.*, 438, 10-14
- [6] Cassard-Doulcier, A.M., Gelly, C., Fox, N., Schrementi, J., Raimbault, S., Klaus, S., Forest, C., Bouillaud, F., Ricquier, D. (1993). Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol. Endocrinol.*, 7, 497-506
- [7] Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-839.
- [8] Thomas, S.A., Palmiter, R.D. (1997). Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature*, 387, 94-97.
- [9] Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., Lowell, B.B. (2002). Beta-AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, 297, 843-845.
- [10] Jimenez, M., Leger, B., Canola, K., Lehr, L., Arboit, P., Seydoux, J., Russell, A.P., Giacobino, J.P., Muzzin, P., Preitner, F. (2002). Beta(1)/beta(2)/beta(3)-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS Lett.*, 530, 37-40.
- [11] Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 387, 90-94.
- [12] Liu, X., Rossmeisl, M., McClaine, J., Riachi, M., Harper, M.E., Kozak, L.P.

- (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 111, 399-407.
- [13] Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58, 1526-1531.
- [14] Bukowiecki, L.J., G  lo  n, A., Collet, A.J. (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am. J. Physiol.*, 250, C880-C887.
- [15] Bukowiecki, L., Collet, A.J., Follea, N., Guay, G., Jahjah, L. (1982). Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am. J. Physiol.*, 242, E353-E359.
- [16] G  lo  n, A., Collet, A.J., Bukowiecki, L.J. (1992). Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. *Am. J. Physiol.*, 263, R1176-R1181.
- [17] G  lo  n, A., Collet, A.J., Guay, G., Bukowiecki, L.J. (1988). Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation. *Am. J. Physiol.*, 254, C175-C182.
- [18] Bronnikov, G., Houst  k, J., Nedergaard, J. (1992). Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J. Biol. Chem.*, 267, 2006-2013.
- [19] Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J. (1999). β 1 to β 3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation. *Endocrinology*, 140, 4185-4197.
- [20] Iwanaga, T., Kuchiiwa, T., Saito, M. (2009). Histochemical demonstration of monocarboxylate transporters in mouse brown adipose tissue. *Biomed. Res.*, 30, 217-225.
- [21] Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, E., Taatjes, D.J., Lang, S.S., Waters, B.L., Claus, T.H. (1994). Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am. J. Physiol.*, 266, R1371-R1382.

- [22] Duchamp, C., Burton, K.A., G  lo  n, A., Dauncey, M.J. (1997). Transient upregulation of IGF-I gene expression in brown adipose tissue of cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.*, 272, E453-E460.
- [23] Yamashita, H., Kizaki, T., Ookawara, T., Sato, Y., Yamamoto, M., Ohira, Y., Ohno, H. (1994). Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sci.*, 55, 141-148.
- [24] Asano, A., Morimatsu, M., Nikami, H., Yoshida, T., Saito, M. (1997). Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem. J.*, 328, 179-183.
- [25] Sun, K., Kusminski, C.M., Luby-Phelps, K., Spurgin, S.B., An, Y.A., Wang, Q.A., Holland, W.L., Scherer, P.E. (2014). Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Mol. Metab.*, 3, 474-483.
- [26] Bagchi, M., Kim, L.A., Boucher, J., Walshe, T.E., Kahn, C.R., D'Amore, P.A. (2013). Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB J.*, 27, 3257-3271.
- [27] N  chad, M., Ruka, E., Thibault, J. (1994). Production of nerve growth factor by brown fat in culture: relation with the in vivo developmental stage of the tissue. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, 107, 381-388.
- [28] Nisoli, E., Tonello, C., Benarese, M., Liberini, P., Carruba, M.O. (1996). Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology.*, 137, 495-503.
- [29] Asano, A., Kimura, K., Saito, M. (1999). Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 403-409.
- [30] Yamashita, H., Sato, N., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Segawa, M., Saitoh, D., Ohira, Y., Ohno, H. (1995). Norepinephrine stimulates the expression of fibroblast growth factor 2 in rat brown adipocyte primary culture. *Cell Growth Differ.*, 6, 1457-1462.
- [31] García, B., Obreg  n, M.J. (1997). Norepinephrine potentiates the mitogenic effect of growth factors in quiescent brown preadipocytes: relationship with uncoupling protein messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology.*, 138, 4227-4233.
- [32] Xue, Y., Petrovic, N., Cao, R., Larsson, O., Lim, S., Chen, S., Feldmann, H.M., Liang, Z., Zhu, Z., Nedergaard, J., Cannon, B., Cao, Y. (2009). Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell*

Metab., 9, 99-109.

- [33] Kajimura, S., Saito, M. (2014). A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*, 76, 225-249.
- [34] Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.*, 2, 239-254.
- [35] Cousin, B., Bascands-Viguerie, N., Kassis, N., Nibbelink, M., Ambid, L., Casteilla, L., Pénicaud, L. (1996). Cellular changes during cold acclimatation in adipose tissues. *J. Cell Physiol.*, 167, 285-289.
- [36] Ricquier, D., Mory, G., Bouillaud, F., Combes-George, M., Thibault, J. (1985). Factors controlling brown adipose tissue development. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25, 175-181.
- [37] Klyde, B.J., Hirsch, J. (1979). Increased cellular proliferation in adipose tissue of adult rats fed a high-fat diet. *J. Lipid Res.*, 20, 705-715.
- [38] Sun, K., Kusminski, C.M., Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Invest.*, 121, 2094-2101.
- [39] Faust, I.M., Johnson, P.R., Stern, J.S., Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.*, 235, E279-E286.
- [40] Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A.E., Cushman, S.W., Periwé, V. (2009). Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.*, 5, e1000324.
- [41] Błogowski, W., Ratajczak, M.Z., Zyżniewska-Banaszak, E., Dołęgowska, B., Starzyńska, T. (2012). Adipose tissue as a potential source of hematopoietic stem/progenitor cells. *Obesity (Silver Spring)*, 20, 923-931.
- [42] Park, K.W., Halperin, D.S., Tontonoz, P. (2008). Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab.*, 8, 454-457.
- [43] Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R., Spiegelman, B.M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454, 961-967.
- [44] Seale, P., Kajimura, S., Spiegelman B.M. (2009) Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev.*,

23, 788-797.

- [45] Berry, R., Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.*, 15, 302-308.
- [46] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Konkar, A.A., Granneman, J.G. (2015). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J.*, 29, 286-299.
- [47] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.*, 15, 480-491.
- [48] Gaben-Cogneville, A.M., Swierczewski, E. (1979). Studies on cell proliferation in inguinal adipose tissue during early development in the rat. *Lipids*, 14, 669-675.
- [49] Klyde, B.J., Hirsch, J. (1979). Isotopic labeling of DNA in rat adipose tissue: evidence for proliferating cells associated with mature adipocytes. *J. Lipid Res.*, 20, 691-704.
- [50] Kajita, K., Mori, I., Kitada, Y., Taguchi, K., Kajita, T., Hanamoto, T., Ikeda, T., Fujioka, K., Yamauchi, M., Okada, H., Usui, T., Uno, Y., Morita, H., Ishizuka, T. (2013). Small proliferative adipocytes: identification of proliferative cells expressing adipocyte markers. *Endocr. J.*, 60, 931-939.
- [51] Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S., Toda, S. (1987). Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J. Lipid Res.*, 28, 1038-1045.
- [52] Nagayama, M., Uchida, T., Gohara, K. (2007). Temporal and spatial variations of lipid droplets during adipocyte division and differentiation. *J. Lipid Res.*, 48, 9-18.
- [53] Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massagué, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78, 59-66.
- [54] Toyoshima, H., Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78, 67-74.
- [55] Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, 9, 1149-1163.
- [56] Chen, D., Krasinski, K., Sylvester, A., Chen, J., Nisen, P.D., Andrés, V. (1997). Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J. Clin. Invest.*, 99, 2334-2341.
- [57] Tanner, F.C., Boehm, M., Akyürek, L.M., San, H., Yang, Z.Y., Tashiro, J., Nabel,

- G.J., Nabel, E.G. (2000). Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1), p21(Cip1), and p16(Ink4) on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 101, 2022-2025.
- [58] Drexler, H.C., Pebler, S. (2003). Inducible p27(Kip1) expression inhibits proliferation of K562 cells and protects against apoptosis induction by proteasome inhibitors. *Cell Death Differ.*, 10, 290-301.
- [59] Goukassian, D., Díez-Juan, A., Asahara, T., Schratzberger, P., Silver, M., Murayama, T., Isner, J.M., Andrés, V. (2001). Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *FASEB J.*, 15, 1877-1885.
- [60] Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85, 707-720.
- [61] Naaz, A., Holsberger, D.R., Iwamoto, G.A., Nelson, A., Kiyokawa, H., Cooke, P.S. (2004). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitors produces adipocyte hyperplasia and obesity. *FASEB J.*, 18, 1925-1927.
- [62] Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe1, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R., Spiegelman, B.M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454, 961-967.

[英文抄録]

Cellular proliferative potential of differentiated brown adipocyte plays a role in histogenesis of brown adipose tissue

Keigo FUKANO

Laboratory of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

There are two types of adipose tissue in mammals. One is white adipose tissue (WAT) that accumulates large amounts of triglyceride for storage of excess energy and liberates fatty acids into the circulation when necessary. The other is brown adipose tissue (BAT) specified for metabolic heat production. This BAT thermogenesis is important for maintaining body temperature in cold circumstances, particularly in small rodents, and activated by the sympathetic nerve system (SNS): norepinephrine (NE) released from nerve endings activates the β -adrenergic receptor (β -AR) on brown adipocytes to induce lipolysis. Liberated fatty acids activate uncoupling protein 1 (UCP1) which exclusively exists in BAT and uncouples oxidative phosphorylation in mitochondria to dissipate the electrochemical gradient as heat. Fatty acids from BAT are also used as substrates for the thermogenesis.

In both humans and rodents, cold exposure induces the hyperplasia of BAT and increases the whole-body thermogenic capacity. BAT is composed of several types of cells, including UCP1-expressing differentiated mature brown adipocytes and stromal-vascular (SV) cells consisting chiefly of preadipocytes, interstitial cells, and vascular endothelial cells. Among these, preadipocytes are suggested to be responsible cells for BAT hyperplasia, because undifferentiated preadipocytes are able to grow and differentiate mature adipocytes *in vitro*. In contrast, differentiated mature adipocytes are precluded any possibility of contribution, although a few days of cold stimulation increases thymidine incorporation into both adipocytes and SV cells. Thus, to elucidate the possibility that mature brown adipocytes proliferate upon cold exposure and contribute to BAT hyperplasia, I examined the cell proliferation of UCP1-expressing differentiated brown adipocyte from mice given cold exposure.

In the chapter 1, immunohistochemical analysis using a cell proliferative marker Ki67 was performed on the BAT from 6-week-old C57BL/6J mice housed at 23°C (control) or 10°C (cold) for 5 days. Interestingly, in the control group, Ki67 signal was detected in the nuclei of UCP1-positive mature brown adipocytes ($7.2\% \pm 0.4\%$ of total number of brown adipocytes), as well as in SV cells ($19.6\% \pm 2.3\%$ of total number of SV cells) including preadipocytes. The percentage of Ki67-positive brown adipocytes increased to $25.6\% \pm 1.8\%$ at Day 1 after cold exposure and was significantly higher than the non-cold acclimated control until Day 5 ($21.8\% \pm 1.7\%$). On the other hand, the percentage of Ki67-positive SV cells gradually increased by a cold exposure and peaked to $42.1\% \pm 8.3\%$ at Day 5. In addition, the $\beta 3$ -AR antagonist, but not $\beta 1$ -AR antagonist, attenuated the cold exposure-induced increase in the number of Ki67-positive brown adipocytes. Injection of a $\beta 3$ -AR agonist for continuous 5 days increased the number of Ki67-positive brown adipocytes even at Day 1, but not that of SV cells. These results suggest that differentiated brown adipocytes proliferate immediately after cold exposure in a $\beta 3$ -AR-mediated pathway. As BAT hyperplasia is suppressed by the denervation of sympathetic fibers to BAT and is reproduced by an injection of NE, taken together, it is the most probably proliferation of mature brown adipocytes as well as preadipocytes in SV cells contribute to SNS-mediated BAT hyperplasia.

In the chapter 2, I examined the role of cellular proliferative potential of differentiated brown adipocytes in the histogenesis by analyzing aP2 promoter-driven mature adipocyte-specific cell-cycle arrested mice (aP2-p27 transgenic mice; Tg mice). In the Tg mice, p27 protein is expressed in differentiated adipocyte, not in preadipocyte, and acts as a cyclin-dependent kinase inhibitor, resulting in preventing cell cycle progression only in the mature adipocyte. There were no apparent differences in WAT between wild-type (WT) and Tg mice. However, BAT in Tg mice was much smaller than that in WT mice, although it in Tg mice showed normal cellular morphology and UCP1 expression. The DNA content of the BAT in Tg mice was significantly lower than that in WT mice, suggesting that the smaller size of BAT in Tg mice might be due to reduced number of adipocytes. Furthermore, the effects of over-expression of p27 were also examined *in vitro*. Cultured mouse embryonic fibroblasts prepared from both WT and Tg mice were differentiated into adipocytes with comparable amounts of lipid droplets and expression of aP2 and Cox4, an index of the mitochondrial number. In

addition, pre-brown adipocyte HB2 cell line infected with adenovirus carrying the p27 gene was differentiated to adipocytes and expressed aP2 and UCP1 in a similar fashion to those infected with control adenovirus. Thus, it was unlikely p27 expression affected the differentiation process of adipocyte. Cell proliferation markers were detected on UCP1-positive brown adipocytes as aforementioned, but the number of proliferating brown adipocyte significantly decreased in Tg mice. Moreover, injection of a β 3-AR agonist for 1 day increased the number of Ki67-positive brown adipocytes in WT mice but not in Tg mice. These results suggest that differentiated mature brown adipocytes retain their proliferative potential especially in WT mice and the characteristic feature contributes in the BAT histogenesis.

In conclusion, we demonstrate that brown adipocytes retain their proliferative ability even after differentiation and that this unique feature of brown adipocyte is involved in BAT hyperplasia induced by cold exposure and histogenesis. Because BAT contributes to the regulation of body fat through its energy-dissipating activity and is a therapeutic target for the treatment of obesity, my findings may provide new insights into the development of agents that control BAT amount.