



Title	Study on the Regulation of Adipocyte Differentiation and Maturation by Ser/Thr Phosphatase PPM1D [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宇野, 早映
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第16359号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95133
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	UNO_Sae_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(理学) 氏名 宇野 早映

学位論文題名

Study on the Regulation of Adipocyte Differentiation and Maturation by Ser/Thr Phosphatase PPM1D
(Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D による脂肪細胞の分化および成熟に関する研究)

脂肪細胞は、エネルギー恒常性の維持および代謝調節において重要な役割を担っている。白色脂肪細胞は大きな脂肪滴を有し、エネルギーの貯蔵と放出を行う。肥満は、余剰なエネルギーを貯蔵するために分化が活性化し白色脂肪細胞数が増加する過形成および脂肪滴の過剰な形成による白色脂肪細胞の肥大化が原因である。Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、免疫応答や精子形成など多様な生体内機能に関与する。*Ppm1d* ノックアウトマウスにおいて体重減少や脂肪蓄積の抑制が報告され、PPM1D が代謝に関与することが示唆されている。当研究室では、PPM1D の阻害により白色脂肪細胞分化が抑制され、PPM1D が脂肪細胞分化に関与することを報告している。脂肪細胞の分化や機能異常は肥満や肥満が原因となる様々な疾患を引き起こすため、疾患の治療法開発のためにもシングルセルレベルで脂肪細胞の分化および成熟状態を識別し、分化および成熟を制御する分子機構を解明することが強く求められている。蛍光プローブは波長や化学的性質の異なる複数の種類の試薬により同時に染色し検出することができるため、生細胞のダイナミックな変化を解析するうえで非常に有効である。バイオサイエンスの画像解析において大きな注目を集める deep learning は、大量のデータから特徴やパターンを抽出できるが、細胞染色画像から細胞の特徴を抽出し細胞識別を可能にするより精度の高い手法の開発が必要である。

本研究は、PPM1D による脂肪細胞の分化および成熟の制御機構を明らかにするため、脂肪細胞における PPM1D の機能解明、および新規 1,3a,6a-triazapentalene (TAP) 誘導体を用いた multiplex staining と deep learning によるシングルセルレベルの細胞識別手法の開発を実施した。

本学位論文は、全 4 章により構成されている。第 1 章では総括的な序論として、本研究の背景および目的を述べている。脂肪細胞や脂肪滴形成、PPM1D の機能、TAP 誘導体について概説した。

第 2 章では、PPM1D による脂肪細胞の分化および成熟の制御機構について述べている。まず、脂肪細胞分化モデル細胞 3T3-L1 を用いた白色脂肪細胞分化誘導時における PPM1D knockdown により、分化初期において分化マーカーの mRNA 発現量が減少することを示した。白色脂肪細胞分化における時期特異的な PPM1D の機能を明らかにするため、白色脂肪細胞分化時に SL-176 により PPM1D を阻害した。その結果、分化初期の PPM1D 阻害により、脂肪細胞分化を制御する転写因子の発現および脂肪滴形成が顕著に抑制された。一方、分化中期および後期の PPM1D 阻害においては、転写因子の発現量は変化しないものの脂肪滴形成が抑制されることが示された。以上より、PPM1D は分化初期において脂肪細胞分化を制御する転写因子の発現誘導を介して分化を制御し、脂肪細胞分化中期および後期においては細胞分化とは独立して脂肪滴形成を制御することが明らかになった。さらに、成熟白色脂肪細胞における PPM1D 阻害により、脂肪滴量を維持しながら多房性脂肪滴のサイズ減少が誘導され、PPM1D が脂肪滴の融合に関与することが示された。脂肪滴表面に局在し脂肪滴形成を正に制御する perilipin 1 に対する Phosphatase assay および perilipin 1 変異体を用いた解析により、PPM1D が perilipin 1 Ser511 の脱リン酸化を介して脂肪滴形成を制御することが示された。これらの結果より、PPM1D が白色脂肪細胞分化および脂肪滴形成を正に制御することを明らかとした。さらに、成熟白色脂肪細胞における

PPM1D の阻害が、ベージュ脂肪細胞の分化マーカーの発現量は変化しない一方で、ミトコンドリア活性の著しい上昇を誘導することを見出した。この結果は、PPM1D が典型的なベージュ脂肪細胞と異なる新規サブタイプの分化を制御していることを示唆した。

第 3 章では、TAP 誘導体を用いたシングルセルレベルでの細胞識別手法の開発について述べている。脂肪細胞の分化および成熟を制御する分子メカニズムの解析において、細胞の分化および成熟状態をシングルセルレベルで識別することが求められる。TAP 誘導体は、置換基による蛍光特性の制御が可能であり非常に低い細胞毒性であるため、細胞蛍光染色において極めて有用な蛍光小分子である。本研究では、細胞の多様な状態をイメージングするため、側鎖にアミノブチル基を有する新規 TAP 化合物 ab-TAP-4PH をデザインおよび合成した。ab-TAP-4PH は極性溶媒および酸性領域で強い蛍光を示し、細胞内では ER およびリソソームにおいて蛍光強度が高いことを示した。一方、側鎖に 3-シアノ安息香酸を有する TAP-2CY4E1 は疎水性度の高い環境で強い蛍光を示し、細胞内で ER および脂肪滴において高い蛍光強度を示した。ab-TAP-4PH と TAP-2CY4E1 の異なる細胞内領域選択性により、細胞の状態を反映した蛍光パターンを示すことが示唆された。これら 2 種の TAP 誘導体は細胞毒性が非常に低く、簡便に wash out できるため、生細胞イメージングに非常に有効であることが示された。さらに、癌抑制タンパク質 p53 の status の異なる肺癌由来の 2 種の細胞を混合培養し ab-TAP-4PH と TAP-2CY4E1 で multiplex staining を実施した。得られた蛍光顕微鏡画像に対して、当研究室で開発された新規 deep learning モデルを用いて解析した結果、シングルセルレベルで細胞種を高精度に識別することが示された。本手法は、成熟白色脂肪細胞における PPM1D の阻害により誘導された脂肪細胞サブタイプの集団を識別できることを示した。以上より、2 種の TAP 誘導体を用いた multiplex staining により、個々の細胞の状態を検出し、deep learning モデルを用いて細胞を識別する手法を開発した。

第 4 章では、本研究の総括的な結論を述べている。本研究では、PPM1D による脂肪細胞分化および成熟の制御機構の解明を実施し、PPM1D は分化に重要な転写因子の発現誘導を介して脂肪細胞分化を正に制御すること、分化非依存的に脂肪滴形成を制御することを明らかにした。加えて、PPM1D が成熟白色脂肪細胞のサブタイプ分化に関与することが示唆された。さらに、TAP 誘導体 ab-TAP-4PH と TAP-2CY4E1 を用いた multiplex staining によるシングルセルレベルの細胞識別手法を開発した。本手法は、個々の生細胞の状態を高精度で認識できるため、脂肪細胞の分化や成熟、サブタイプを検出する有用な新規手法となると考えられる。本研究の成果は、PPM1D を標的とした新規な抗肥満治療法の研究へと展開されることが期待される。