

2022 年度

博士学位論文

CREG1 の褐色脂肪化促進と抗肥満作用に関する研究

Research on brown adipocyte formation and
anti-obesity effect of CREG1

中部大学大学院

生命健康科学研究科 生命医科学専攻

遠藤 優貴

目次

第一章 緒言	3
第二章 方法	6
第一節 細胞培養	
第二節 組換え mCREG1-MH タンパク質の発現及び精製	
第四節 実験動物	
第五節 腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)	
第六節 間接熱量測定 (Indirect calorimetry)	
第七節 ウェスタンブロット解析	
第八節 組織学的解析	
第九節 遺伝子発現解析	
第十節 脂質解析	
第十一節 初代細胞培養実験	
第十二節 統計解析	
第三章：実験結果	18
第一節：組換え CREG1 タンパク質の調製精製	
第二節：標準温度環境下における CREG1 の褐色脂肪化作用および抗肥満効果の検討	

第三節：初代培養細胞における CREG1 の褐色脂肪分化促進と UCP1 発現に対する効果
の検討

第四節：中立温度環境下における CREG1 の肥満抑制作用の検討

第五節：CREG1 の肥満抑制効果における UCP1 の必要性

第四章 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52

参考文献

謝辞

第一章 緒言

世界保健機構によると今日の世界の肥満率は 1975 年から約 3 倍に増加し、小児や若年層では 5 倍に増加しており、世界の肥満人口は 10 億人以上となっている [1]。肥満は、心血管疾患や糖尿病、悪性新生物などの原因となるだけでなく、最近では COVID-19 に感染した場合の重症化リスクを上昇させる要因の一つとされている [1]。このように、肥満は世界的な健康問題となっており対策が求められている。

肥満とは脂肪細胞に中性脂肪が過剰に蓄積された状態である。ヒトを含めた哺乳動物の脂肪細胞は大きく白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の 2 種類に分けられる [2] [3]。白色脂肪細胞は生体において白色脂肪組織 (white adipose tissue : WAT) を形成し、皮下や内臓周囲に存在する。白色脂肪細胞は体内の余剰エネルギーを中性脂肪の形で細胞内に蓄え、必要に応じて脂肪酸として全身に供給するエネルギー貯蔵庫の役割を持っている。一方で、褐色脂肪細胞は生体において褐色脂肪組織 (brown adipose tissue : BAT) を形成しており、肩甲骨間などに存在している。褐色脂肪細胞はそれ自身や白色脂肪細胞から放出された脂肪酸を分解し熱に変換する熱産生細胞としての働きを持っている。褐色脂肪細胞で行われる熱産生は「非ふるえ熱産生」と呼ばれ、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに特異的に存在する脱共役タンパク質 1 (uncoupling protein 1: UCP1) の働きに依存している [4]。

UCP1 は、電子伝達系によって生成されるプロトン勾配を消散させることによって基質の酸化を ATP 合成から分離し、熱放出をもたらす [2]。BAT の活性は基本的に

UCP1 の発現に依存している。齧歯類において UCP1 の発現は、寒冷暴露により増加し、体温調節のための熱産生が必要のない中立温度環境下では減衰する [5]。また UCP1 を欠損しているマウスは寒さに対する抵抗性が低く、若齢期では標準飼育環境下で肥満に耐性があるが [6]、高脂肪食下での飼育においては、加齢とともに肥満への感受性が高まる [7]。さらに、UCP1 欠損マウスを中立温度環境下で飼育したところ、標準的な固形飼料を与えられたマウスでも肥満を誘発し、高脂肪食食事下においては食事誘発性肥満(DIO)が大幅に増強された [8]。このように UCP1 は、寒冷刺激が入る環境下での体温維持や過剰なカロリー摂取時におけるエネルギー恒常性維持に対するメカニズムの重要な要素として機能している。

前記した 2 種類の脂肪細胞以外にもベージュ脂肪細胞といわれる細胞が存在することが明らかとなっている。この脂肪細胞は $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬投与や低温曝露などの条件下での交感神経活性化により、褐色脂肪化と呼ばれる現象を介して WAT に誘導される [9]。また、ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と同様に UCP1 による熱産生機能を有している。従って、褐色及びベージュ脂肪細胞を増加させることは熱産生によるエネルギー消費の増加につながるため、肥満問題に対する有効な対策として注目を集めている [4]。

褐色脂肪細胞の分化に関わる分子としては、古くからノルエピネフリンや甲状腺ホルモンが知られている。また近年、Bone morphogenetic protein 7 (BMP7)、Fibroblast growth factor 21 (FGF21)、Irisin などの生体分子が褐色脂肪細胞の分化を促進すること

が報告されている [10] [11]。我々の研究室においても、cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) が褐色脂肪細胞への分化促進機能を有することを培養細胞を用いて明らかにしてきた [12]。CREG1 はアデノウイルス E1A タンパク質による転写活性化と細胞形質転換活性に拮抗する新規タンパク質として同定された [13]。CREG1 は 220 アミノ酸の分泌型糖タンパク質であり、ヒトやマウスの生体内において遍在的に存在しており、肝臓において高発現が確認できる [14] [15]。CREG1 の生理的役割に関する研究としては、CREG1 の遺伝的除去は胚性致死をもたらすこと、心臓特異的な CREG1 過剰発現は心肥大及び心筋線維化を防ぐこと [16]、肝臓特異的な CREG1 過剰発現は脂肪肝を抑制すること [17]などが報告されている。しかし、生体内における CREG1 の褐色脂肪化促進作用は明らかになっていなかった。そこで本研究では、CREG1 の生体内における褐色脂肪細胞の分化に対する役割、および褐色脂肪化に伴う抗肥満作用について検討を行った。

第二章 方法

第一節 細胞培養

組換え CREG1 タンパク質を調製するための細胞として COS7 を使用した。ダルベッコウ改変イーグル培地 (DMEM、4.5 g/l グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム含有、和光純薬工業) に 1×P.S.ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (×100) と 10%牛胎仔血清 (FBS、biowest、lot : S12054S1780) を混合した増殖培地を用いて、5% CO₂、37°Cの条件下で COS7 を培養した。10 cm dish を使用し、COS7 を 3×10⁶ cells/10 ml/dish の細胞数を播種した。翌日、この細胞に CREG1 の遺伝子導入を行った。

第二節 組換え mCREG1-MH タンパク質の発現及び精製

C 末端側に Myc-tag と His-tag を融合して発現するように設計したマウス CREG1 タンパク質発現ベクター (pcDNA-mCREG1-MH: 24 µg/dish) と Polyethyleneimine (Polysciences) 72 µg/dish を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入の翌日に培地交換を行い、遺伝子導入後 3 日目、5 日目、7 日目の培養上清 (dish 1 枚から 30 ml) を回収した。1 回の培養実験において 30 枚の dish を用いた。培養上清中の CREG1-MH の精製は以下の手順により行なった。回収した培養上清に硫酸アンモニウム (和光純薬工業) が 40%の飽和濃度になるように氷上でゆっくり加え、その後氷上で 5 分間攪拌した。30 分間氷上に静置後に遠心 (10,000×g、15 分間) し、上清を回収した。回収した

上清 (40% 硫安濃度) に硫酸アンモニウムを 60% の濃度になるように氷上でゆっくり加え、その後 5 分間攪拌した。30 分間氷上に静置後に遠心 (10,000×g、15 分間) した。

上清を除き、沈殿物を PBS に溶かし硫安沈殿溶液を作製した。硫安沈殿溶液に等量の Wash Buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M NaCl、10 mM Imidazole) を加えた。輸液ポンプを用いて HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences) に Wash Buffer を流して平衡化を行った後、硫安沈殿溶液、Elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M NaCl、Imidazole (10 mM、50 mM、100 mM、200 mM、500 mM)) の順に流速を 1 ml/分で流した。100 mM および 200 mM Imidazole による溶出分画を回収し、Amicon Ultra -15 10K (Millipore, Bedford, MA) を用いて、~1 ml まで遠心濃縮 (26,000×g) した。次に、濃縮産物を AKTA-FPLC システムを用いてゲル濾過を行った。カラムは Hiload 16/60 superdex G-75 pg (GE Healthcare Life Sciences) を使用し、Buffer として PBS を用いた。流速は 0.5 ml/分とし、フラクションサイズは 1 ml として設定した。ゲル濾過後にピークが出現したフラクションを中心に SDS-PAGE と銀染色法 (Sil-Best Stain One : ナカライテスク) にて精製 mCREG1-MH タンパク質の存在と純度を確認した後、純度の高い溶出分画を回収し、Amicon Ultra -15 10K を用いて遠心濃縮を行なった。濃縮産物を精製 mCREG1-MH タンパク質とし、BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology) を用いてタンパク定量を行った。

第四節 実験動物

C57BL/6J マウスは、日本 SLC より購入した。C57BL/6J を遺伝的背景とする aP2-CREG1-Tg マウス (CREG1-Tg; Hashimoto et al., 2019) 及び Ucp1 ^{-/-} マウス (UCP1-KO; Enerbäck et al., 1997) を掛け合わせ CREG1-Tg/ Ucp1 ^{+/-} マウスを作製後、CREG1-Tg/ Ucp1 ^{+/-} マウスと UCP1-KO マウスを掛け合わせ CREG1-Tg/UCP1 ^{-/-} (Tg / KO) マウスを作製した。

実験 1 : 4 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを 23°C 環境下及び高脂肪食 (Research Diets, D12492: 60% kcal fat) 下にて 16 週間飼育し食事誘導性肥満を誘導した。その後、リン酸緩衝液 (PBS) または精製した mCREG1-MH (CREG1-MH: ~75 μ g/kg/day) をアルゼット浸透圧ポンプ (MODEL 1004, ALZET, Cupertino, CA, USA) に注入し、イソフルランを用いた吸入麻酔下にて、マウスの背中側に皮下移植した。さらに高脂肪食下にて 4 週間飼育後に解剖を行い、血液及び組織 (肩甲骨間褐色脂肪組織 : IBAT、鼠蹊部白色脂肪組織 : IWAT、副睾丸周囲白色脂肪組織 : EWAT、腸間膜白色脂肪組織 : MWAT、後腹膜白色脂肪組織 : RWAT、Liver) を採取した。マウスはポンプ埋込み後から個別飼育を行い、2~3 日毎に体重と摂食量を測定した。採取した組織は -80°C で保管または 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。また同様のプロトコルで食事誘導性肥満を誘導したマウスを用いて、アルゼット浸透圧ポンプの皮下移植後 20 日目及び 21~25 日目において腹腔内耐糖能試験 (IPGTT) と間接熱量測定 (Indirect calorimetry) を実施した。

実験 2：4 週齢の雄性 C57BL / 6J マウスを 30°C 環境下及び高脂肪食 (Research Diets、D12451：45% kcal fat) 下にて 12 週間飼育した。その後、PBS または精製した mCREG1-MH (CREG1-MH:~75 μ g/kg/day) をアルゼット浸透圧ポンプ (MODEL 1004, ALZET) に注入し、イソフルランを用いた吸入麻酔下にて、マウスの背中側に皮下移植した。さらに高脂肪食下にて 4 週間飼育後に解剖を行い、血液及び組織 (IBAT, IWAT, EWAT, RWAT, Liver) を採取した。採取した組織は-80°C で保管または 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。また、実験 1 と同じスケジュールで、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を高脂肪食の 20 日目に実施した。

実験 3：生後 4 か月の CREG1-Tg、UCP1-KO、および Tg / KO マウスに、30°C で 2 か月間高脂肪食 (Research Diets、D12451) を与えた後に解剖を行い、血液及び組織 (IBAT, IWAT, 卵巣周囲白色脂肪組織：GWAT, RWAT, Liver) を採取した。2~3 日毎にマウスの体重と摂食量を測定した。採取した組織は-80°C で保管または 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した。

本研究における動物実験は、中部大学動物実験委員会により審査され、承認された動物実験計画に沿って実施した (2710018, 2710024, 2810013, 2910013, 3010027, 202110004)。また、組み換え実験は中部大学組換え DNA 実験安全委員会により審査され、承認された実験計画に沿って実施した (10-04, 5-04, 17-10, 19-06)。

第五節 腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)

試験前日から 17 時間絶食を行った後、尾静脈より血糖値を測定し、これを 0 分値の血糖値とした。その後、腹腔内にブドウ糖を 1.5 mg glucose/g body weight となるように投与し、投与後 30 分、60 分、90 分、120 分の血糖値を測定した。血糖値測定にはワンタッチウルトラビュー (LifeScan Japan) 及び LFS クイックセンサー (LifeScan Japan) を使用した。

第六節 間接熱量測定(Indirect calorimetry)

CREG1 投与開始後 21-25 日目にマウスを OxyMax laboratory animal monitoring system (Columbus Instruments) の測定用チャンバーに収容し、24 時間順化させた後、各マウスの酸素消費量 (VO_2) と二酸化炭素産出量 (VCO_2) を 23°C の飼育条件下で 5 分毎に 24 時間測定した。その後、 $\beta 3$ アドレナリン受容体特異的作動薬 CL 316,243 (Sigma-Aldrich) を 1 mg/kg body weight になるように腹腔内に投与し、再度測定を行った。

第七節 ウェスタンブロット解析

凍結した組織に RIPA Buffer (25 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM EGTA、10 mM EDTA (pH7.4)、1% NP-40、10 mM Na_3VO_4 、100 mM NaF、Protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche Diagnostics)、2 mM PMSF) を加え、ホモジナイザーによ

り組織 (IBAT, IWAT,EWAT,RWAT) を破碎し、氷上で 30 分間静置した後、10000 rpm×10 分間遠心した。遠心後に下層を回収し、回収サンプルを BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology) を用いてタンパク定量を行った。定量したタンパク質または採取した血清に、BPB 及び 2-メルカプトエタノールを追加してウェスタンブロット (WB) 用サンプルとした。WB 用サンプルを SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミド自作ゲル及び 5-20% 電気泳動用既成ゲル (ATTO)) にかき、PVDF 膜 (Immobilon™,Millipore) に転写した。この膜をブロッキング溶液に浸漬し、室温で1時間インキュベートした後、一次抗体と一晚反応させた。UCP1 (ab10983、Abcam), CREG1 (C-17、sc-11728、Santa Cruz Biotechnology), Tubulin (#2148、Cell Signaling Technology) 反応後、適切な二次抗体と室温で1時間インキュベートし、イモビロンウェスタン化学発光 HRP 基質 (Immobilon™,Millipore) を使用して特定のシグナルを検出した。得られた画像は、NIH Image (バージョン 1.63) を使用して定量化した。

第八節 組織学的解析

ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色では、固定した組織 (IBAT, IWAT, EWAT, GWAT, RWAT, Liver) をパラフィン包埋し、6 μ m の厚さに薄切した。薄切標本をキシレンに浸漬して脱パラフィン化し、続いてエタノール濃度 100%、90%、70% の順に浸漬し親水化を行った。その後、マイヤーヘマトキシリン (富士フイルム和光純薬) およびエオシン Y (富士フイルム和光純薬) で染色した。

脂肪染色 (Oil Red O 染色) では、固定した組織 (Liver) を Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (サクラファインテックジャパン) に包埋し、厚さ 8 μm で薄切し、オイルレッド O (武藤化学) で染色した。

UCP1 染色では、厚さ 4 μm の連続切片を作成し、キシレンを用いて脱パラフィンし、エタノールを用いて親水化した。内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするために、3%過酸化水素/メタノールで 20 分間処理した後、抗原の賦活化のために、0.01 M クエン酸ナトリウム (pH 6.0) および LAB 溶液 (Polysciences) に室温で 10 分間浸水させた。ブロッキング溶液 (10% ロバ正常血清/PBS) に 60 分間浸水させた後、ブロッキング溶液で 1 : 200 に希釈したウサギポリクローナル抗 UCP1 一次抗体 (ab23841、Abcam) に浸漬させ 4° C で一晩インキュベートした。二次抗体として horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (414341, NICHIREI) を用いて室温で 1 時間反応させた。3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 基質キット (SK-4100、Vector Laboratories) で染色し光学顕微鏡 (BX43 : OLYMPUS) を用いて観察した。また、対比染色はマイヤーヘマトキシリンで行った。

脂肪細胞サイズ測定では、染色した白色脂肪組織について視野が重ならないように撮影した写真 (1 組織あたり 5~10 枚。1 視野あたりの組織の占める割合 : 約 7 割以上、倍率 : 200 倍) について、Image J ソフトの Cell Counter を使用して細胞数を測定した。手順としては、Polygon selections によって個々の細胞を囲み、測定した細胞の総面積を算出した (1.135pixels/ μm) 後、総細胞面積/総細胞数を算出して 1 細胞当たりの面積

とした。

第九節 遺伝子発現解析

全 RNA は、TRIzol 試薬 (Invitrogen) を使用して、製品のプロトコルに従って抽出した。mRNA の発現レベルを定量化するために、組織 (IBAT, IWAT, EWAT, GWAT, RWAT, Liver) から抽出した全 RNA を High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystems) を使用して逆転写し cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて *acyl CoA oxidase (Aco)*, *Cd137*, *cell death-inducing DFFA-like effector a (Cidea)*, *Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1 (Cited1)*, *carnitine palmitoyl transferase 1 (Cpt1)*, *Creg1*, *enolase 1 (Eno1)*, *Fgf21*, *lactate dehydrogenase B (Ldhb)*, *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta (Pdhb)*, *peroxisome proliferative activated receptor α (Ppar α)*, *Ppar γ coactivator 1- α (Pgc1 α)*, *PR domain containing (Prdm16)*, *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b (Serca2b)*, *T-box transcription factor 1 (Tbx1)*, *Ucp1* の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。リアルタイム RT-PCR は試薬として FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics)、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)、または KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を使用し、解析装置として Light-Cycler 480 (Roche Diagnostics) または CFX95 (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。すべての遺伝子の発現レベルは、*36B4* の発現レベルに対してノーマライズした。

使用したオリゴヌクレオチドプライマーセットを表 1 に示す。

表1 使用したオリゴヌクレオチドプライマーセット

遺伝子名	センス鎖	アンチセンス鎖
<i>36b4</i>	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA	CCCATTGATGATGGAGTGTGG
<i>Aco</i>	CAGCACTGGTCTCCGTCATG	CTCCGGACTACCATCCAAGATG
<i>Cd137</i>	GAGCTAACGAAGCAGGGTTG	GGGAGAGAAGCTCACCACAG
<i>Cidea</i>	ATCACAACCTGGCCTGGTTACG	TACTACCCGGTGTCCATTTCT
<i>Cited1</i>	ATGCCAACCCAGGAGATGAAC	AGGATGCAGGTTGAAGGATG
<i>Cpt1</i>	ACTCCTGGAAGAAGAAGTTCA	GTATCTTTGACAGCTGGGAC
<i>Creg1</i>	GACCTGCAGGAAAATCCAGA	AACAAACAGCGAATCCCTTG
<i>Eno1</i>	TGCGTCCACTGGCATCTAC	CAGAGCAGGCGCAATAGTTTTA
<i>Fgf21</i>	GTGTCAAAGCCTCTAGGTTTCTT	GGTACACATTGTAACCGTCCTC
<i>Ldhb</i>	CATTGCGTCCGTTGCAGATG	GGAGGAACAAGCTCCCGTG
<i>Pdhh</i>	CGGTGCAGTTGACAGTTCGT	TCTTCCCAAGCAGAAAACTTT
<i>Ppara</i>	GGGCAAGAGAATCCACGAAG	GTTGTTGCTGGTCTTTCCCG
<i>Pgc1α</i>	TAGGCCCCAGGTACGACAGC	GCTCTTTGCGGTATTCATCC
<i>Prdm16</i>	GACATTCCAATCCCACCAGA	CACCTCTGTATCCGTCAGCA
<i>Serca2b</i>	ACCTTTGCCGCTCATTTTCC	CACACACTCTTTACCGGGTTG
<i>Tbx1</i>	CGACAAGCTGAAACTGACCA	GTGACTGCAGTGAAGCGTGT
<i>Ucp1</i>	GTGAAGGTCAGAATGCAAGC	AGGGCCCCCTTCATGAGGTC

第十節 脂質解析

凍結保存した肝臓 (30 mg 前後) を 1 ml のヘキサン/2-Propanol (3 : 2) 中にてホモジナイズした後、 $26,000\times g$ で 10 分間遠心分離した。遠心後に上清を回収し、減圧乾燥機にて溶媒を飛ばして乾燥させ、500 μ l の 10% Triton 100/2-Propanol に懸濁した。これを肝臓の脂質解析用サンプルとした。脂質測定はトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業) 及びコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を使用し、製品のプロトコルに従い、血清及び肝臓の脂質レベルを iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した (λ : 595 nm)。

第十一節 初代細胞培養実験

3 週齢の C57BL/6J マウスから無菌的に採取した IBAT 又は IWAT を細切し、コラーゲナーゼ溶液 (0.9 mM CaCl₂、0.49 mM MgCl₂、0.2% collagenase (Sigma)、5 mM glucose、1.5% BSA (Sigma) in PBS) 中で 37°C、30 分間インキュベートした。次に、組織消化液を 70 μ m ナイロンフィルター (Falcon) に通し、遠心 ($130\times g$ 、3 分間) した。脂肪層を吸引除去した後、下層とペレットを懸濁し、40 μ m ナイロンフィルター (Falcon) に通した。ろ液を等量の 10% 子牛血清 (CS:Biowest) /DMEM と混合した後、遠心し ($170\times g$ 、6 分間)、間質血管面分を含む細胞ペレットを回収して初代培養細胞とした。細胞を 6 ウェルプレート (7×10^5 細胞/ウェル) に播種し、5% CO₂、37°C の条件下にて 10% CS/DMEM 中で培養した。コンフルエンス後に 10 μ g/ml insulin、1 μ M

dexamethasone、0.5 mM 3-isobutyl-1 methylxanthine、1 μ M pioglitazone、125 μ M indomethacin、3 nM 3,5,3'-L-triiodothyronine を含む 10% FBS/DMEM の分化培地にて 2 日間培養し、さらに insulin 及び T3 を含む 10% FBS/DMEM にて 4-6 日間培養し分化させた。また、CREG1 刺激では精製 CREG1-MH を 1 μ g/ml の濃度で培地交換毎に添加した。*Creg1* 遺伝子のノックダウンは *Creg1* の Stealth siRNA (#MSS243209) 及び negative control (#12935400) を Lipofectamine-RNAiMAX reagent (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションし遺伝子発現を抑制した。

第十二節 統計解析

データは平均±標準誤差として示した。統計解析は、Excel (Microsoft) および StatView (SAS Institute) を使用した。One-way analysis of variance (ANOVA) を使用して、3 つ以上のグループ間の有意差を評価した。体重増加と IPGTT については two-way repeated measures ANOVA により検定した後、Fisher の最小有意差法を適用して結果の統計的有意差を評価した。その他の解析は two-tailed Student's t-test を使用した。統計的有意性は $p < 0.05$ に設定した。

第三章：実験結果

第一節：組替え CREG1 タンパク質の調製精製

共同研究者の先行研究により *in vitro* では、CREG1 に褐色脂肪細胞の分化促進作用があることが明らかとなっている。しかし、*in vivo* における CREG1 の褐色脂肪細胞に対する作用は明らかになっていない。そこで、CREG1 投与の褐色脂肪細胞に対する作用及び CREG1 の抗肥満効果についてマウスを用いて検討するために、最初に組換えタンパク質の調製を行なった。COS7 細胞に pcDNA-mCREG1-MH を遺伝子導入後、培養上清中に分泌された CREG1 タンパク質 (CREG1-MH) を硫酸沈殿法、HisTrap HP アフィニティークロマトグラフィー、Superdex G75 ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製し、高純度の CREG1 タンパク質を取得した。各精製過程における精製度の確認を WB 及び銀染色によって確認した (Figs. 1-3)。硫酸沈殿では CREG1-MH は 40~60%の硫酸濃度で析出された (Figs. 1a-b)。アフィニティークロマトグラフィーでは CREG1-MH は 200 mM イミダゾール濃度で溶出された (Figs. 1a-b)。また、分子量 ~34 kD の CREG1-MH は PBS を溶媒とするゲル濾過クロマトグラフィーでは 2 量体として分画された (Figs. 2a-b)。精製 CREG1-MH の最終純度は ~93% であった。

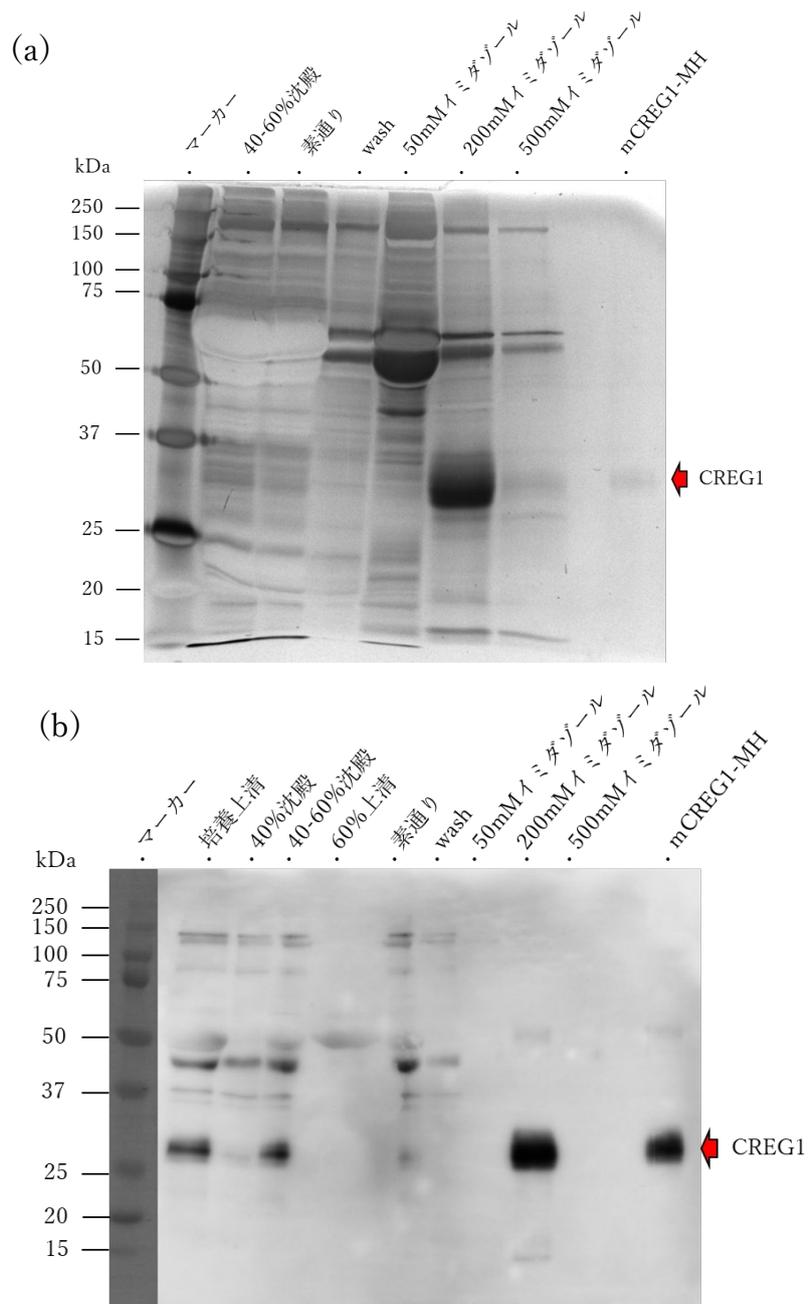


Fig. 1 組換え CREG1 の発現確認と硫酸沈殿及び HisTrap アフィニティークロマトグラフィーによる精製。(a) 銀染色と (b) ウェスタンブロットにより CREG1-MH の精製度を確認した。

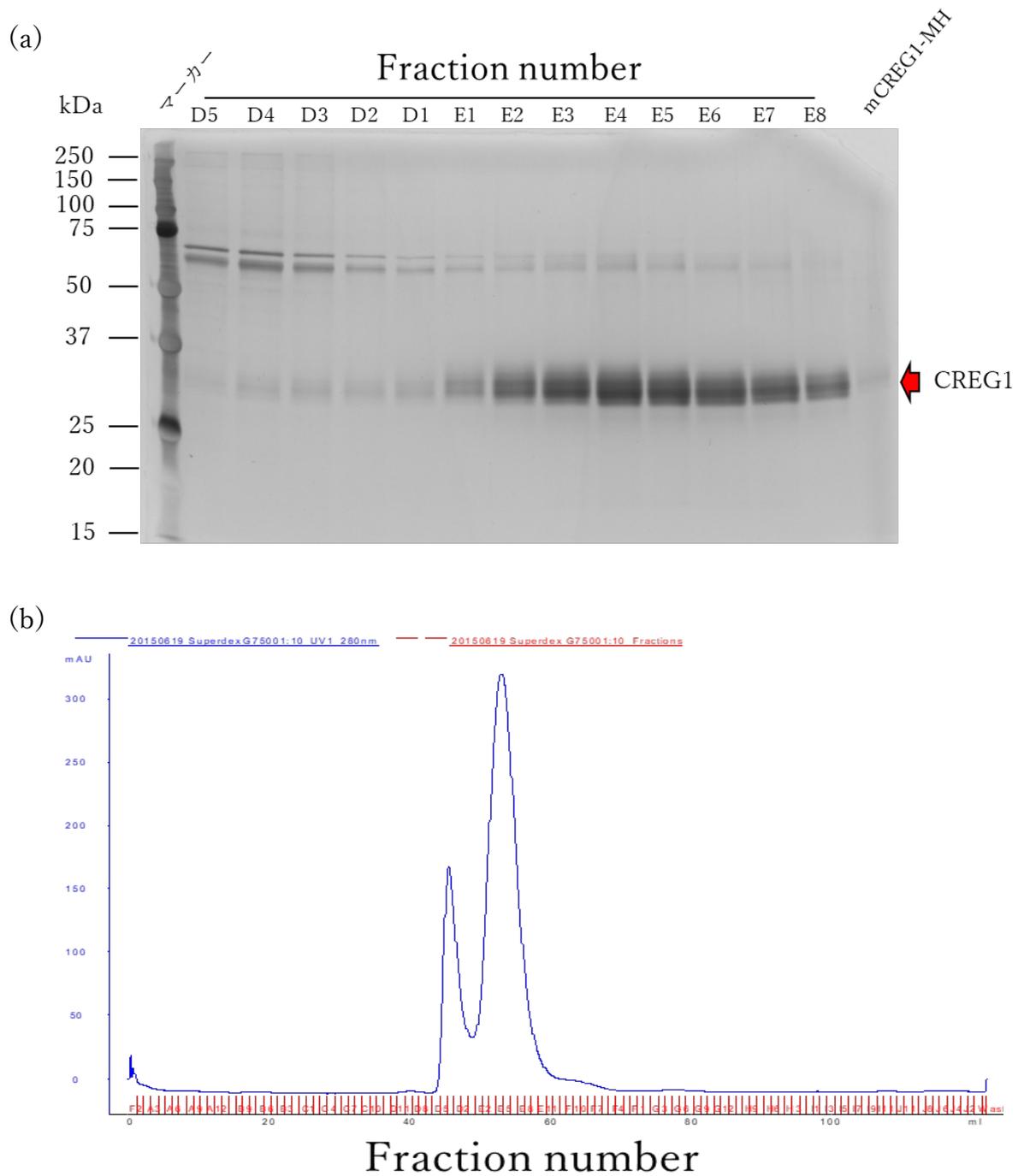


Fig. 2 組換え CREG1 のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製。(a) クロマト分画 D5~E8 の銀染色結果。(b) クロマトチャート。

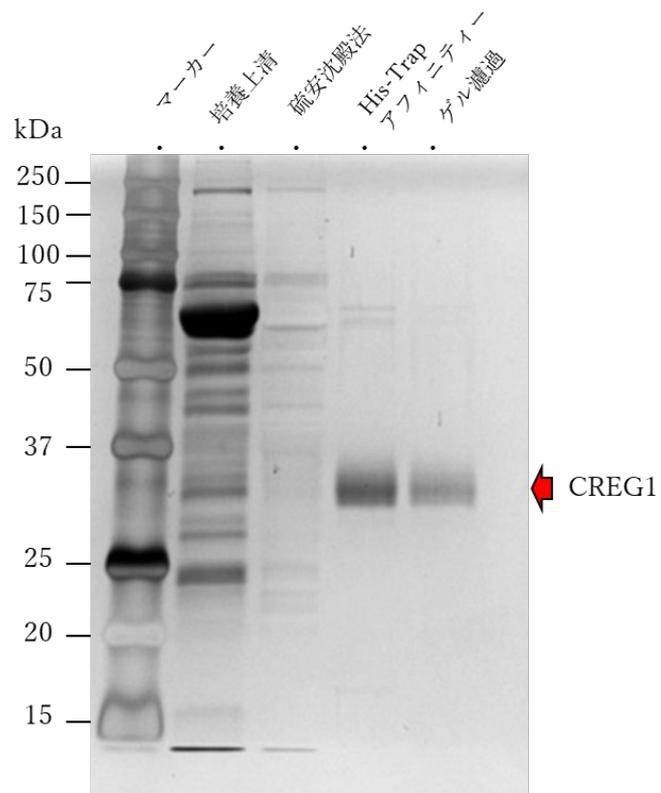


Fig. 3 組換え CREG1 の精製結果まとめ (銀染色)

第二節：標準温度環境下における CREG1 の褐色脂肪化作用および抗肥満効果の検討

実験 1 として、マウスにおける肥満および肥満関連病態に対する CREG1 投与の効果を検討した。4 週齢の C57BL6/J マウスを高脂肪食 (60% kcal fat) 下で 16 週齢まで飼育し、食事誘導性肥満 (Diet-induced obesity: DIO) マウスの作製を行った。その後、精製 CREG1-MH を注入した小型浸透圧ポンプを DIO マウスの皮下に埋め込み、標準飼育環境下 (23°C) にて CREG1 タンパク質の持続投与 ($\sim 75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) を 4 週間行った。対照として PBS の持続投与を行った。その結果、PBS 投与群と比較して CREG1 投与群では摂食量に違いは認められなかったが、体重増加量は有意に減少していた (Figs. 4a-b)。また、耐糖能においても CREG1 投与群で改善が認められた (Fig. 5)。酸素消費量を測定したところ、通常飼育時では 2 群間に差は認められなかったが、 $\beta 3$ -アドレナリン受容体作動薬 (CL 316,243) 投与による $\beta 3$ -アドレナリン受容体の刺激を行ったところ、CREG1 投与群で酸素消費量が顕著に増加しエネルギー消費の亢進が示唆された (Fig. 6)。随時血糖値は CREG1 投与群で低下傾向を示したが、血清中のトリグリセリドおよび総コレステロールレベルにおいては 2 群間で差は認められなかった (Figs. 7a-c)。各脂肪組織と肝臓の組織重量には 2 群間で差は認められなかった (Fig. 8)。一方、組織病理解析において CREG1 投与群では PBS 投与群に比べ、IBAT では褐色脂肪細胞特有の多房性の形態が維持されており、IWAT では褐色脂肪様細胞が観察された (Fig. 9)。EWAT の組織像は 2 群間で差はみられなかった (Fig. 9)。また、CREG1 投与群で肝臓への脂肪蓄積の減少が観察され、肝トリグリセリドも減少しており、脂肪肝の改善

が確認された (Figs. 10a-b)。

次に、CREG1 投与による褐色脂肪化への影響を確認するために、IBAT および IWAT における UCP1 発現を調べた。血清中の CREG1 タンパク質発現レベルは PBS 投与群と CREG1 投与群の間で差は認められなかったが (Fig. 11a)、UCP1 タンパク質発現レベルは PBS 投与群と比較して CREG1 投与群の IBAT で有意に高く、IWAT においても高い傾向が認められた (Fig. 11b)。これらの結果は、浸透圧ポンプを介して局所的に IBAT に送達された組換え CREG1 タンパク質が UCP1 の発現を刺激した可能性を示唆するものと考えられた。一方 mRNA 発現レベルの発現解析では、*Creg1* と *Ucp1* に加えて、褐色脂肪/ベージュ脂肪細胞関連遺伝子である *Cidea*, *Ppar α*, *Pgc1 α*, *Fgf21* の mRNA 発現レベルは IBAT において 2 群間で差は認められなかったが、褐色脂肪分化のマスターレギュレーターである *Prdm16* 遺伝子 [18] の mRNA 発現レベルは PBS 投与群と比較して CREG1 投与群で有意に高かった (Fig. 12a)。ベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子である *Tbx1*, *Cited1*, *Cd137* の mRNA 発現レベルも IBAT では 2 群間で差は認められなかった。IWAT では、*Creg1* mRNA 発現レベルは CREG1 投与群で PBS 投与群と比較して有意に低かったのに対し、褐色脂肪/ベージュ脂肪細胞関連遺伝子である *Fgf21* ($p < 0.05$) および *Cited1* ($p < 0.1$) の発現は PBS 投与群と比較して CREG1 投与群で増加傾向を示した (Fig. 12b)。加えて、白色脂肪細胞の褐色脂肪化促進因子である *Fgf21* [19] の mRNA 発現レベルは、PBS 投与群と比較して CREG1 投与群の IWAT で 3.9 倍高いことが明らかとなった (Fig. 12b)。

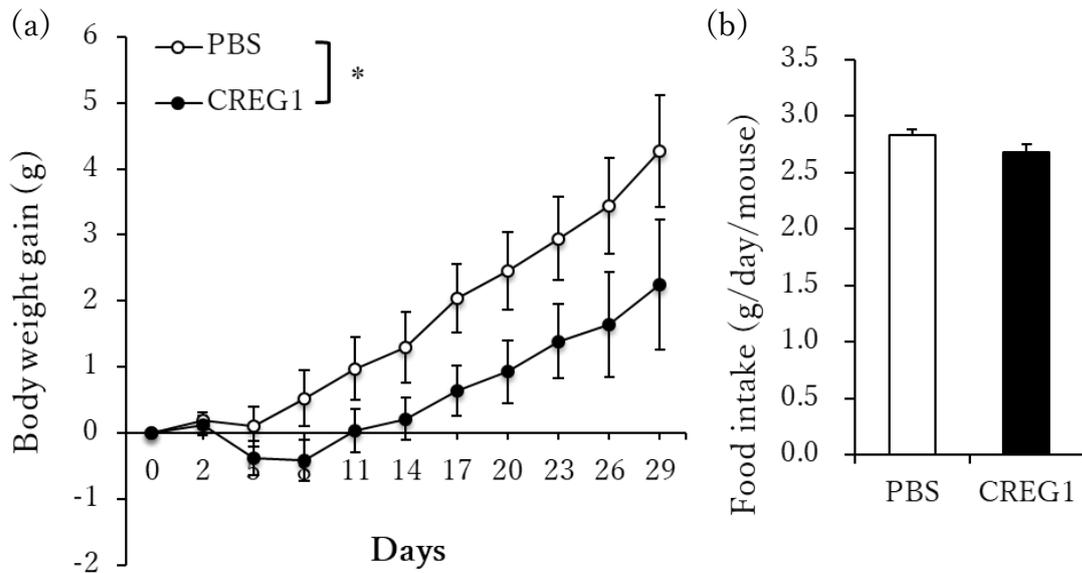


Fig. 4 CREG1 の抗肥満効果 (23°C環境下)。DIO-C57BL / 6J マウスに PBS または CREG1-MH を投与し体重と食事摂取量を経時的に測定した (n=7 per group)。 (a) 体重増加量。 (b) 平均摂食量。 Data are the mean \pm SEM. *p < 0.05 vs. PBS.

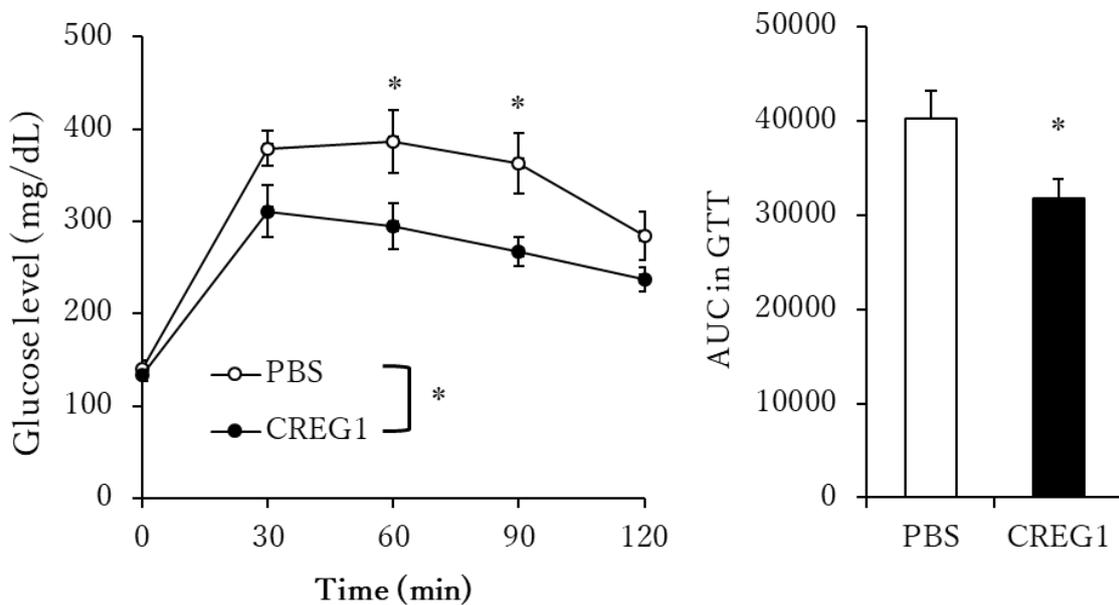


Fig. 5 耐糖能に対する CREG1 の効果 (23°C環境下)。PBS または CREG1-MH を投与した DIO-C57BL / 6J マウスの耐糖能試験 (PBS, n=7; CREG1, n=8)。 Data are the mean \pm SEM. *p < 0.05 vs. PBS.

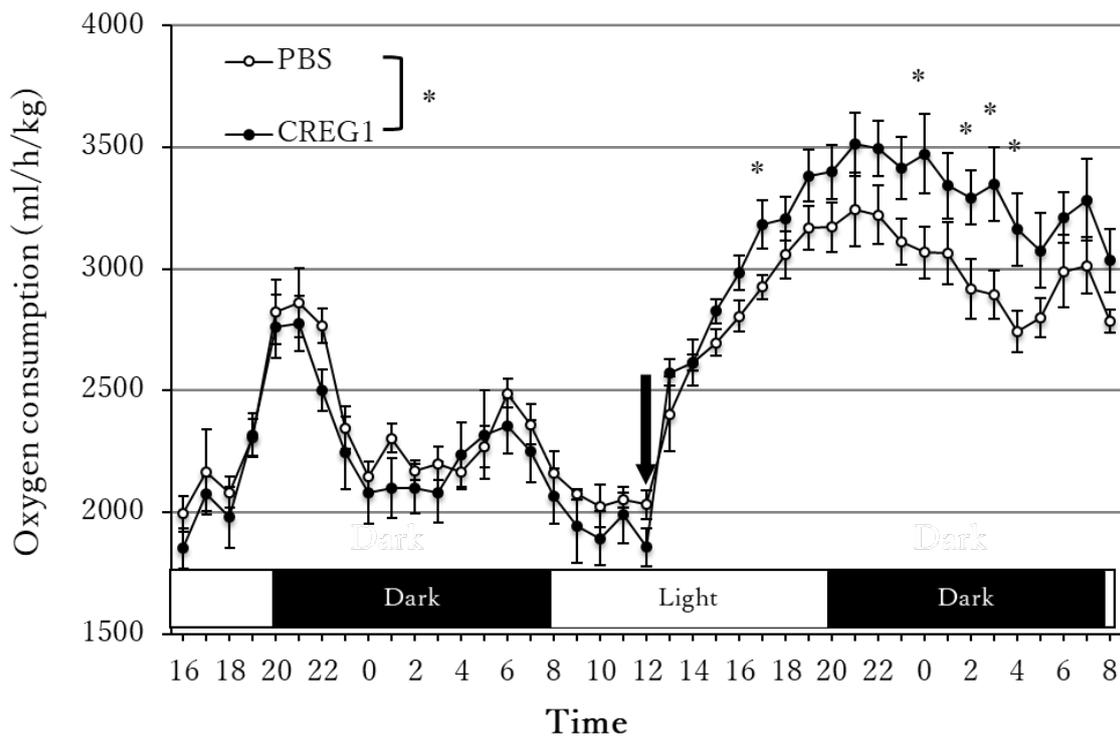


Fig. 6 エネルギー代謝に対する CREG1 の効果 (23°C環境下)。PBS または CREG1-MH を投与した DIO-C57BL / 6J マウスの酸素消費量を間接熱量計により測定した (n=5 per group)。矢印: β 3-アドレナリン受容体作動薬 (CL 316,243) を投与。Data are the mean \pm SEM. *p < 0.05 vs. PBS.

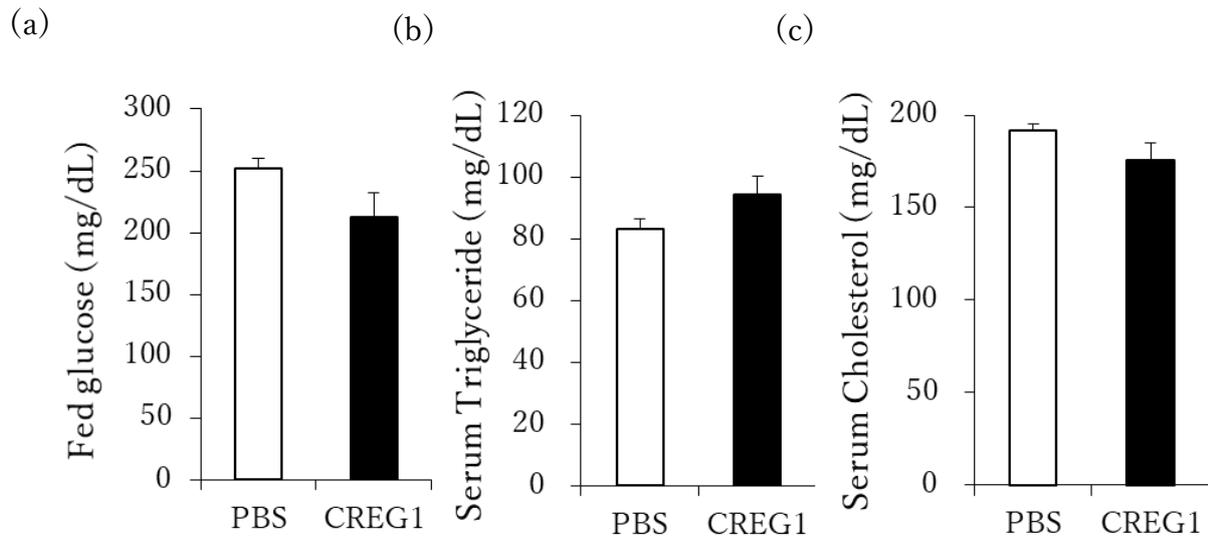


Fig. 7 血液生化学指標に対する CREG1 の効果 (23°C環境下)。PBS または CREG1-MH を投与した DIO-C57BL / 6J マウスのサンプリング時における随時血糖値 (a)、血清トリグリセリド (b) 及び総コレステロール濃度 (c)。Data are the mean \pm SEM.

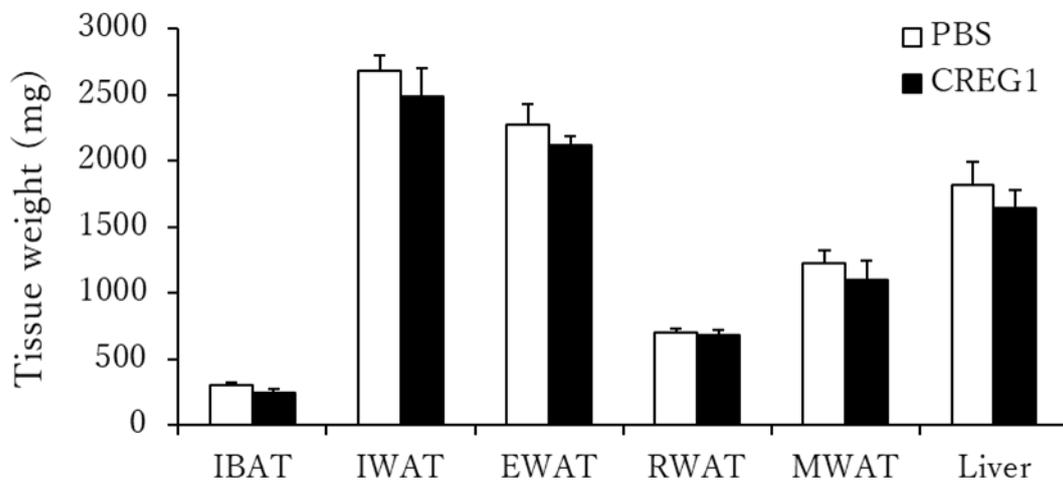


Fig. 8 23°C環境下における CREG1-MH 投与実験の各組織重量 (IBAT, IWAT, EWAT, RWAT, MWAT, Liver) (n=7 per group)。Data are the mean \pm SEM.

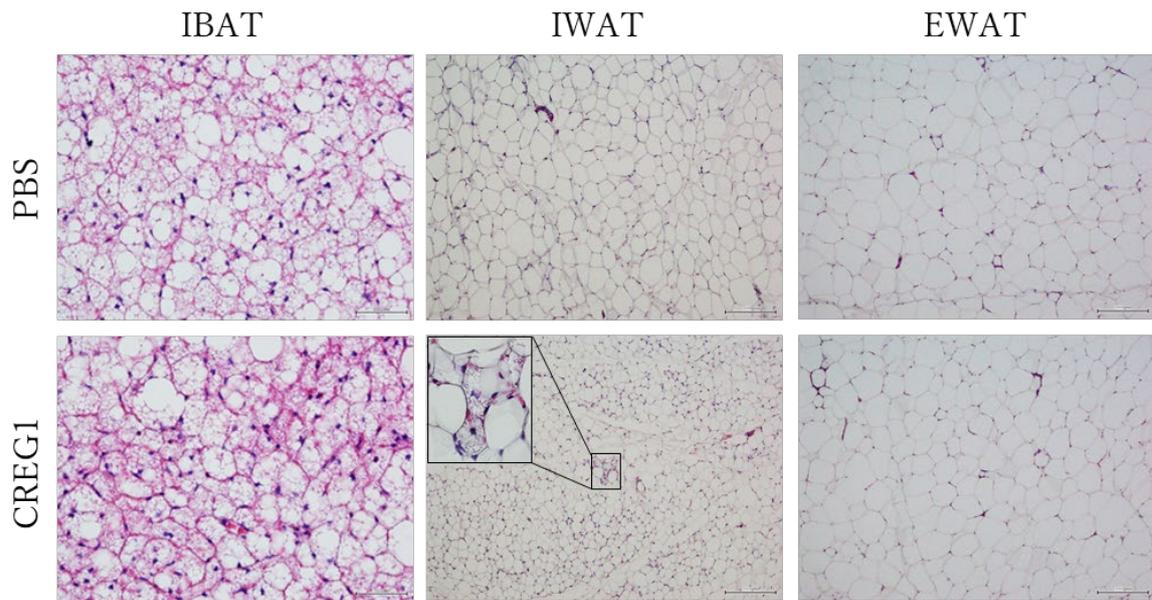


Fig. 9 23°C環境下における CREG1-MH 投与マウスの H&E 組織染色画像 (IBAT, IWAT, EWAT) (scale bar, 50 and 200 μ m for IBAT and WATs, respectively) (n=7 per group)。

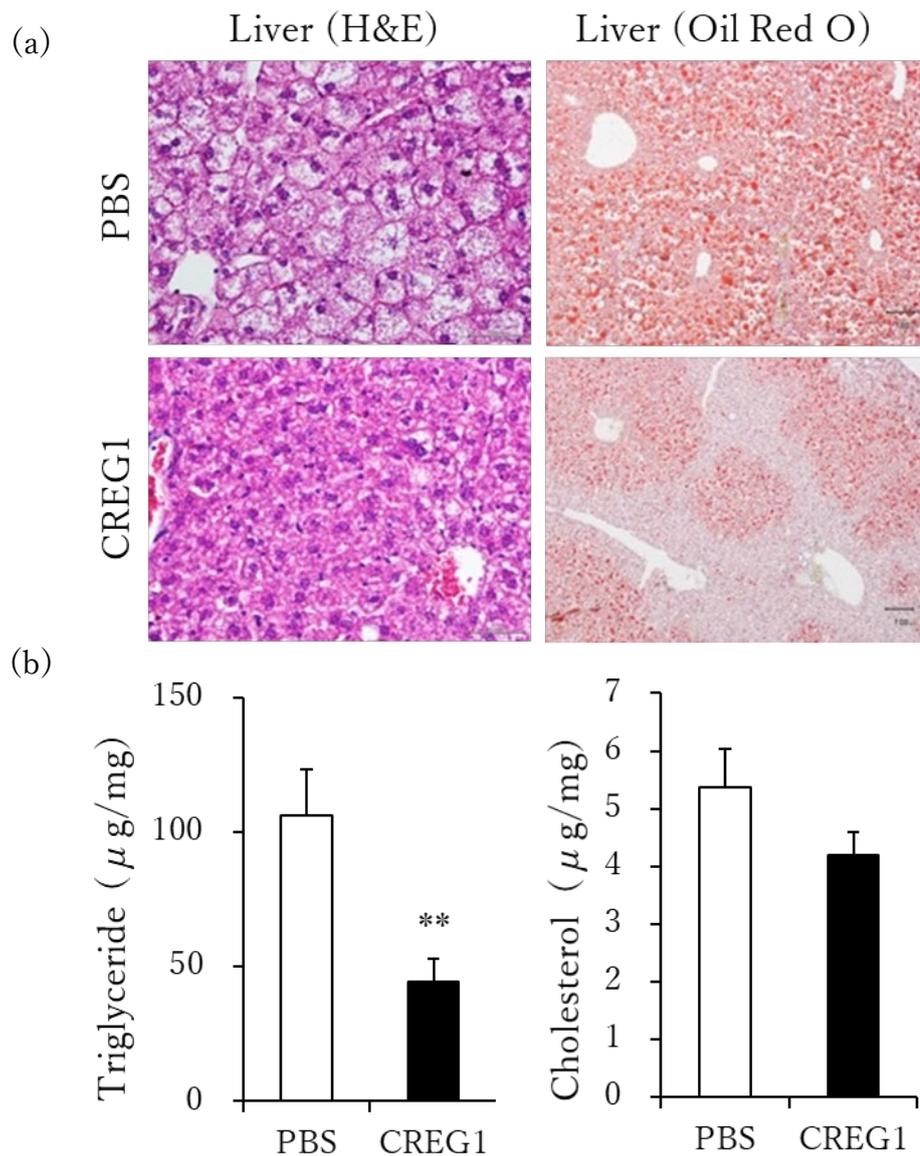


Fig. 10 脂肪肝に対する CREG1 の投与効果 (23°C環境下) (n=7 per group)。CREG1-MH 投与実験における肝臓の H&E 及び Oil Red O 組織染色 (scale bar, 50 and 100 μm for H&E and Oil Red O staining, respectively) (a) と肝中トリグリセリド及び総コレステロール含量 (b)。Data are mean \pm s.e.m. **p < 0.01 vs. PBS

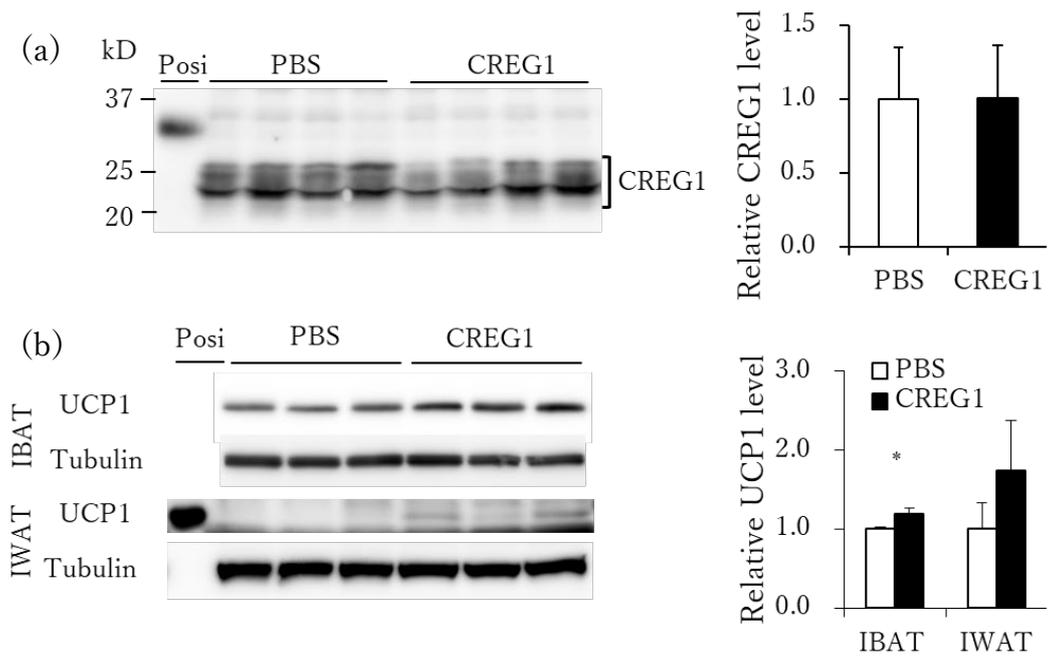


Fig. 11 血中 CREG1 レベル及び脂肪組織の UCP1 発現に対する CREG1 の効果 (23°C 環境下)。CREG1-MH 投与マウスの血清 CREG1 タンパク質レベル (n=6 per group) (a) と IBAT 及び IWAT の UCP1 発現レベル (n=6 per group) (b) をウエスタンブロットにより解析した。UCP1 発現レベルは Tubulin 発現レベルでノーマライズした。Data are mean \pm s.e.m. * p < 0.05 vs. PBS。Posi: ポジティブコントロールとして CREG1 では CREG1-MH、UCP1 では IBAT 抽出液を用いた。

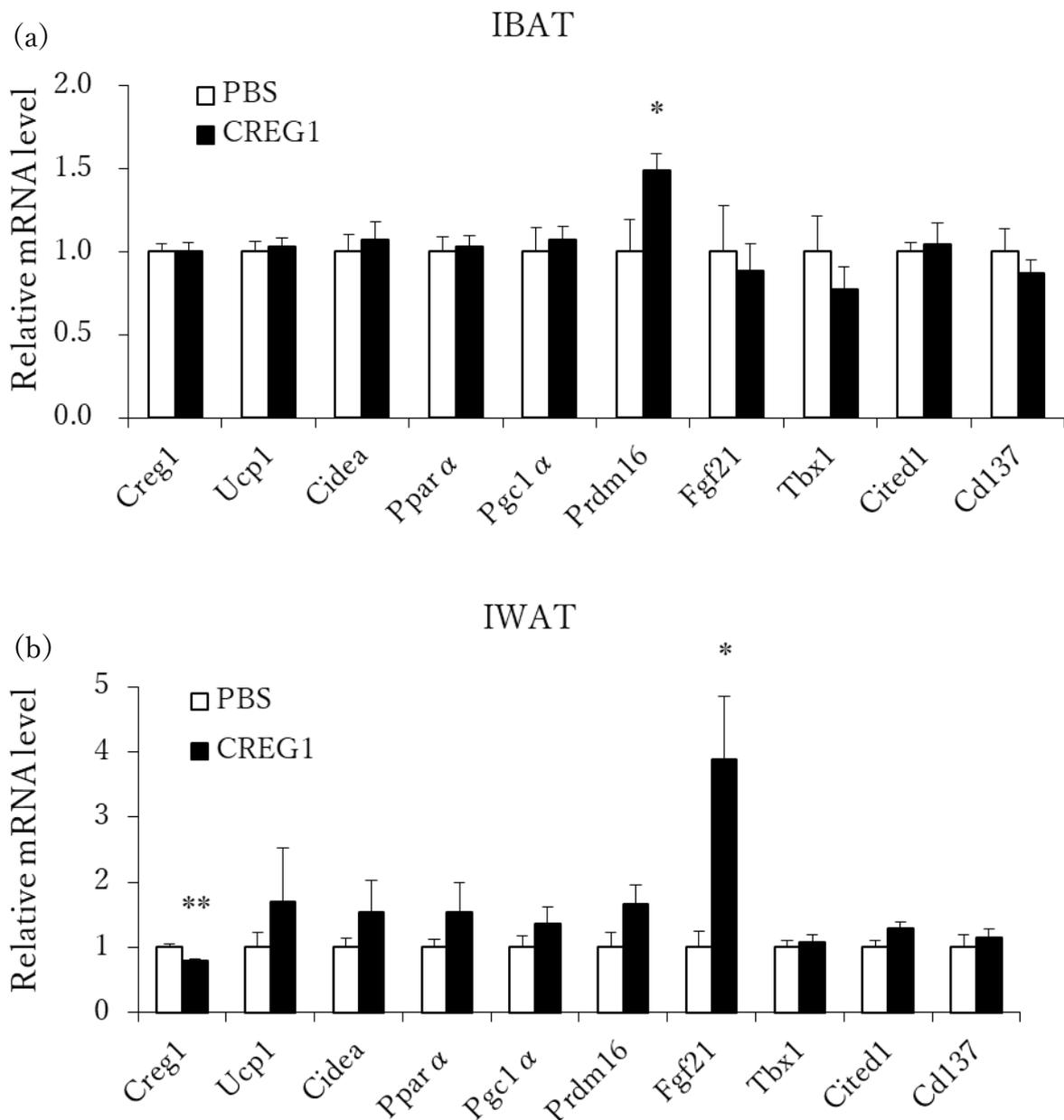


Fig. 12 遺伝子発現に対する CREG1 の投与効果 (23°C環境下)。CREG1-MH 投与実験の IBAT (a) 及び IWAT (b) における *Creg1*, *Ucp1*, *Cidea*, *Ppar α*, *Pgc1 α*, *Prdm16*, *Fgf21*, *Tbx1*, *Cited1*, *Cd137* 遺伝子の mRNA 発現レベルについて RT-qPCR により解析した (n=6 per group)。Data are mean \pm s.e.m. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. PBS

第三節：初代培養細胞における CREG1 の褐色脂肪分化促進と UCP1 発現に対する効果の検討

マウスにおける褐色脂肪およびベージュ脂肪細胞の形成に対する組換え CREG1 タンパク質の作用を確認するために、IBAT と IWAT の初代培養細胞を用いて CREG1-MH の脂肪細胞分化および UCP1 発現に対する効果を調べた。各脂肪組織から採取した未分化の脂肪前駆細胞を Creg1-siRNA で処理した後、通常分化誘導材±CREG1-MH の条件下で褐色脂肪/ベージュ脂肪細胞の分化を誘導した。その結果、IBAT および IWAT の初代培養における脂肪細胞の分化は、コントロール siRNA (SC) 群と比較して、内因性 CREG1 発現が阻害された Creg1-siRNA-CREG1 未添加群において部分的に抑制されたが、この分化抑制は CREG1-MH の添加により回復することが明らかとなった (Figs. 13a-b, 14a-d)。また、UCP1 タンパク質発現レベルを確認したところ、SC 群と比較して Creg1-siRNA-CREG1 未添加群では、IBAT 及び IWAT 初代培養細胞のどちらにおいても UCP1 タンパク質発現レベルが減少しており、分化抑制の結果と一致するものであった。しかし、この UCP1 タンパク質発現レベルの減少は、IBAT 初代培養細胞では CREG1-MH の添加により完全に回復した (Fig. 13b)。一方、IWAT 初代培養細胞においては SC 群と同等程度までは回復しなかった (Fig. 14d)。さらに CREG1 タンパク質を検出した結果、C 末端に Myc-His タグを持つ組換え CREG1 タンパク質は、細胞内では消化されて Myc-His タグが切断されることにより、内因性 CREG1 と同様に分子サイズが約 20 kD のタンパク質を生成したことが確認された (Figs. 14 a-b)。

IBAT primary

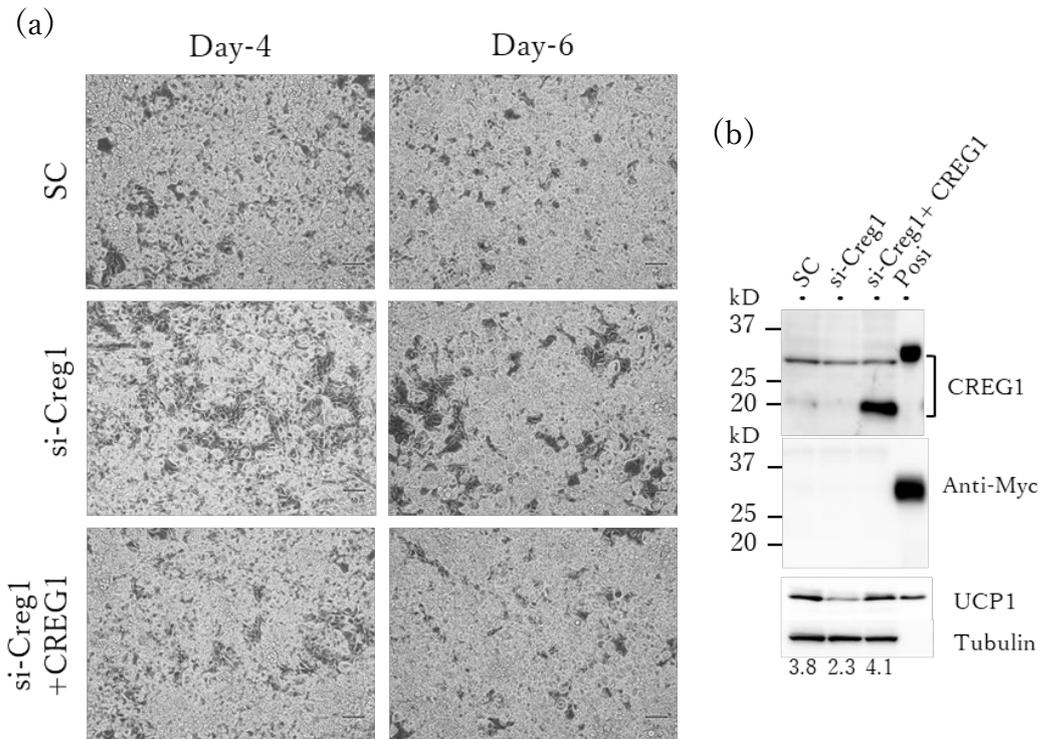


Fig. 13 褐色脂肪細胞の分化に対する CREG1 の効果。マウス IBAT 由来の初代培養細胞にコントロール siRNA (SC) または Creg1-siRNA (si-Creg1) を遺伝子導入し、mCREG1-MH(1 μ g/ml)の添加もしくは無添加の条件下で成熟脂肪細胞へ 6 日間分化させた。(a)分化 4 日目と 6 日目の細胞形態 (scale bar, 100 μ m)。(b)分化 6 日後の CREG1 及び UCP1 発現レベル。プロット下の数値は UCP1 発現レベルを Tubulin 発現レベルでノーマライズした相対値。Posi: ポジティブコントロールとして CREG1 では CREG1-MH、UCP1 では IBAT 抽出液を用いた。

IWAT primary

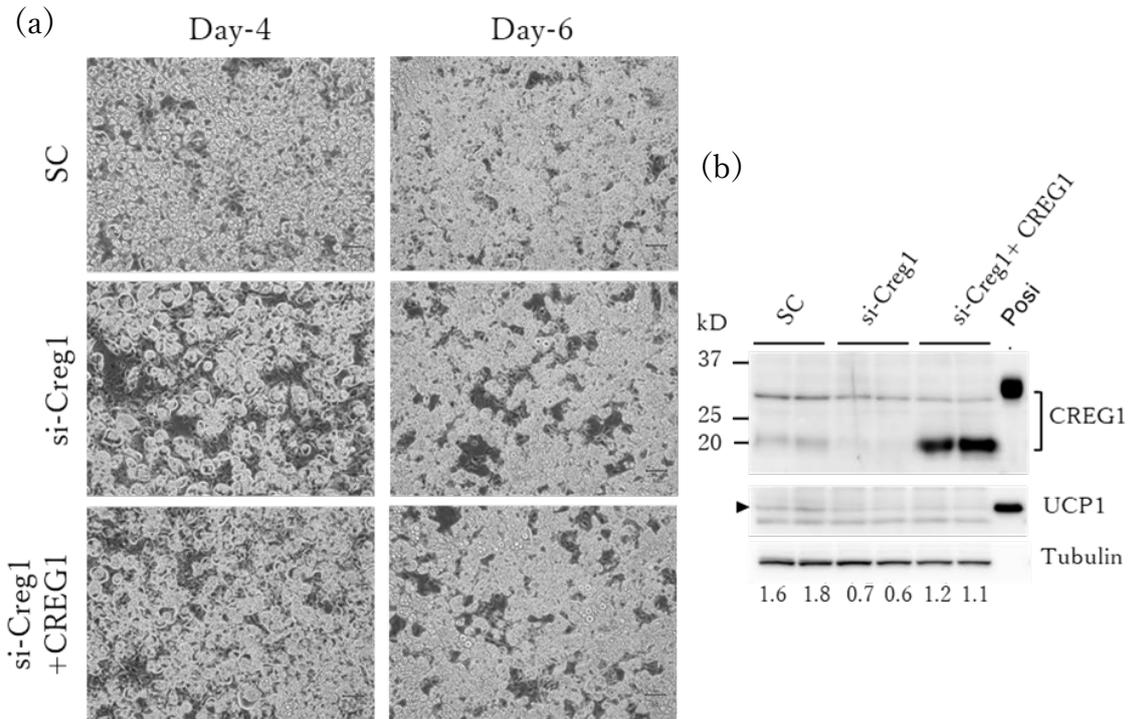


Fig. 14 ベージュ脂肪細胞の分化に対する CREG1 の効果。マウス IWAT 由来の初代培養細胞にコントロール siRNA (SC) または Creg1-siRNA (si-Creg1) を遺伝子導入し、mCREG1-MH (1 μ g/ml) の添加もしくは無添加の条件下で成熟脂肪細胞へ 6 日間分化させた。(a) 分化 4 日目と 6 日目の細胞形態 (scale bar, 100 μ m)。(b) 分化 6 日後の CREG1 及び UCP1 発現レベル。プロット下の数値は UCP1 発現レベルを Tubulin 発現レベルでノーマライズした相対値。Posi: ポジティブコントロールとして CREG1 では CREG1-MH、UCP1 では IBAT 抽出液を用いた。

第四節：中立温度環境下における CREG1 の肥満抑制作用の検討

ヒトやマウスなどの恒温動物には、体温を維持するための熱産生を必要としない中立温度域 (Thermoneutral temperature zone : 28~32°C) があり、この温度領域では IBAT の熱産生機能 (UCP1 発現) は大きく減弱し、形態的にも白色脂肪様の組織像を呈する。従って、一般的な 23°C の動物飼育環境下では寒冷刺激が入ることによって IBAT が活性化しているため、UCP1 の熱産生機能によるエネルギー消費が常に起こっている状態といえる。そこで、実験 2 として寒冷刺激が入らないため、体温調節のための UCP1 による熱産生を必要としない 30°C の中立温度環境下において CREG1 投与実験を行い、UCP1 の機能が低下している状況下における CREG1 の肥満抑制効果を検討した。

30°C の動物飼育室において、4 週齢の C57BL6/J マウスを高脂肪食 (45% kcal fat) 下で 16 週齢まで飼育し、DIO マウスの作製を行った。その後、実験 1 と同様に、精製 CREG1-MH を注入した小型浸透圧ポンプを DIO マウスの皮下に埋め込み、30°C 環境下にて CREG1 タンパク質の持続投与 (~75 μ g / kg / 日) を 4 週間行った。対照として PBS の持続投与を行った。PBS 投与群と比較して CREG1 投与群では摂食量に変化は認められなかったが、体重増加量は有意に減少していた (Figs. 15a-b)。PBS 投与群と比較して CREG1 投与による耐糖能の改善は認められなかった (Fig. 16)。血清インスリン、トリグリセリド、および総コレステロールレベルは 2 群間に差は認められなかった (Figs. 17a-c)。また 2 群間で、IBAT、IWAT、精巣上体白色脂肪組織 (EWAT)、および肝臓の組織重量に差は認められなかったが、CREG1 投与群の後腹膜白色脂肪組織

(RWAT) の組織重量は低い傾向が認められた (Fig. 18)。一方組織学的解析から、中立温度環境下での高脂肪食摂取による IBAT の白色脂肪化が CREG1 投与によって改善し、CREG1 投与群では多房性の形態が維持されていた (Fig. 19a)。また、脂肪細胞サイズについては IWAT では 2 群間に差はみられなかったが、EWAT と RWAT では PBS 投与群で認められる細胞肥大化が CREG1 投与群では有意に抑制されていることが明らかとなった (Figs. 19a-b)。肝組織の形態とトリグリセリドおよび総コロールステロール含有量には 2 群間で差は認められなかった (Figs. 19a, 20)。さらに、血中 CREG1 レベルと脂肪組織における UCP1 発現に対する CREG1 投与の効果を調べた。実験 1 と同様に血清 CREG1 レベルは 2 群間で違いは検出されなかったが (Fig. 21)、免疫組織化学的解析により、CREG1 投与群の IBAT では PBS 投与群と比較して UCP1 のシグナルが強いことが示された (Fig. 22)。また、IWAT、EWAT、及び RWAT の UCP1 シグナルは、CREG1 投与群の方が強い傾向が認められことから (Fig. 22)、これらの白色脂肪組織の褐色脂肪化が示唆された。WB 解析により、実際に PBS 投与群と比較して CREG1 投与群の脂肪組織における UCP1 タンパク質発現レベルの上昇が確認され、IBAT および RWAT では有意な違いが認められた (Fig. 23)。

次に脂肪組織の褐色化とエネルギー代謝に関連する遺伝子の発現について検討を行った。 *Creg1* と *Ucp1* に加えて、 *Tbx1*、 *Cited1*、 *Cd137* を含む 8 種類のベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子を調べた。これらの遺伝子の mRNA 発現レベルは IBAT、IWAT、EWAT、RWAT の 4 つの脂肪組織において 2 群間に差は認められなかった (Figs. 24a-

d)。しかしながら、代謝関連遺伝子の mRNA 発現レベルについては 2 群間に違いが認められた。すなわち、脂肪酸 β 酸化の触媒酵素をコードする acyl CoA oxidase (*Aco*)、carnitine palmitoyl transferase 1 (*Cpt1*)、糖分解に関わる enolase 1 (*Eno1*)、lactate dehydrogenase B (*Ldhb*) 及び pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta (*Pdhb*) の mRNA 発現レベルが CREG1 投与により IBAT で上昇していることが明らかとなった (Fig. 25a)。一方、白色脂肪組織ではこれらの mRNA 発現レベルは 2 群間で差は認められなかった (Figs. 25b-d)。また、カルシウムサイクリングを介した熱発生の調節因子である sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b (*Serca2b*) の mRNA 発現レベルについても測定したが、すべての脂肪組織で 2 群間に差は認められなかった (Figs. 25b-d)。以上の結果は、CREG1 投与により IBAT におけるエネルギー代謝が亢進されていることを示唆している。

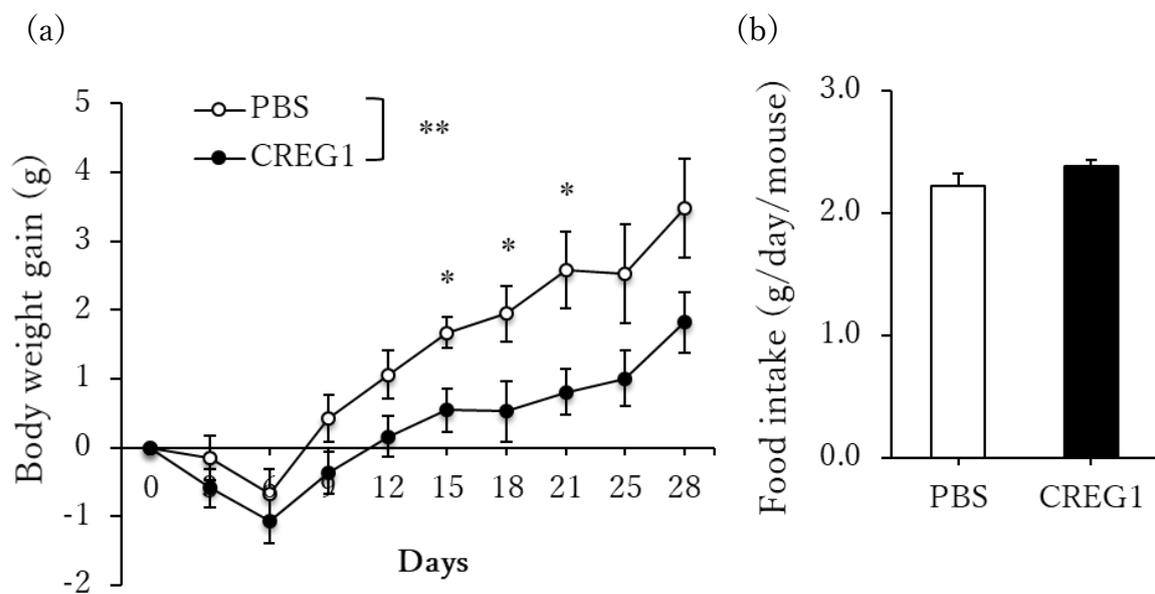


Fig. 15 CREG1 の抗肥満効果(30°C環境下)。DIO-C57BL / 6J マウスに PBS または CREG1-MH を投与し体重と食事摂取量を経時的に測定した (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。(a) 体重増加量。(b) 平均摂食量。Data are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. PBS.

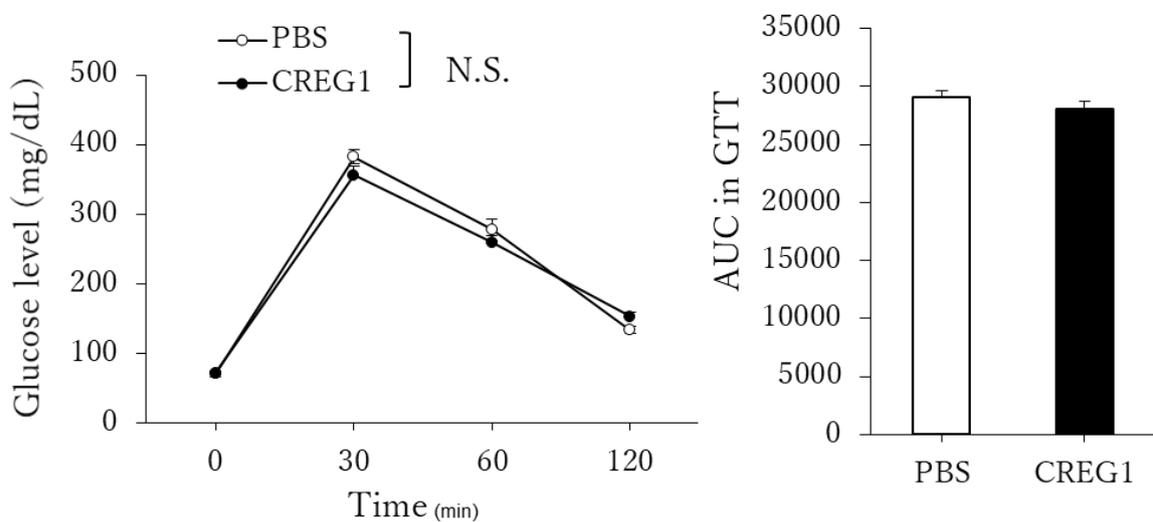


Fig. 16 耐糖能に対する CREG1 の効果 (30°C環境下)。PBS または CREG1-MH を投与した (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。DIO-C57BL / 6J マウスの耐糖能試験。Data are the mean \pm SEM.

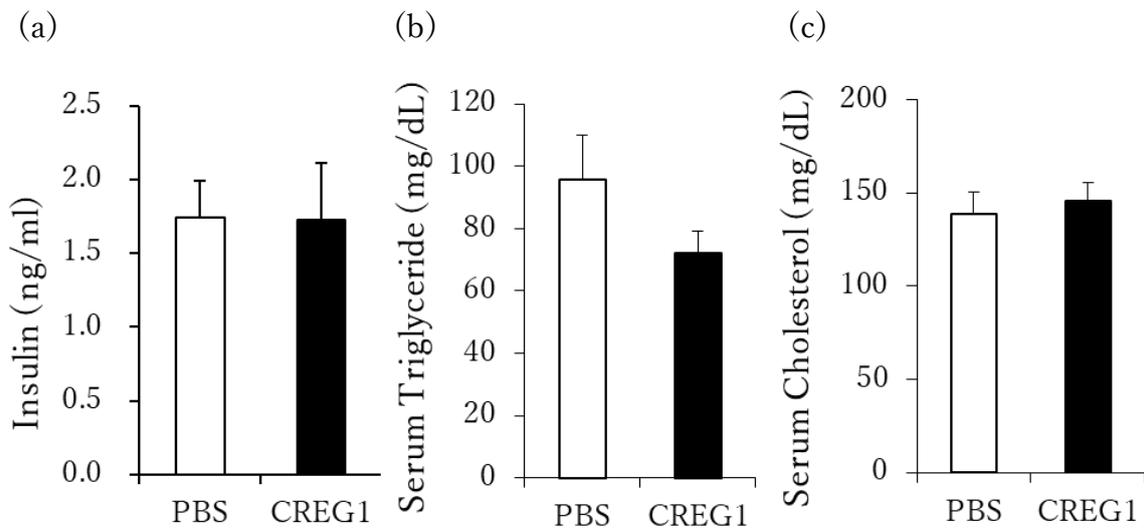


Fig. 17 血液生化学指標に対するCREG1の効果(30°C環境下)。PBSまたはCREG1-MHを投与したDIO-C57BL/6Jマウスのサンプリング時における随時血糖値(a)、血清トリグリセリド(b)及び総コレステロール濃度(c)。Data are the mean \pm SEM.

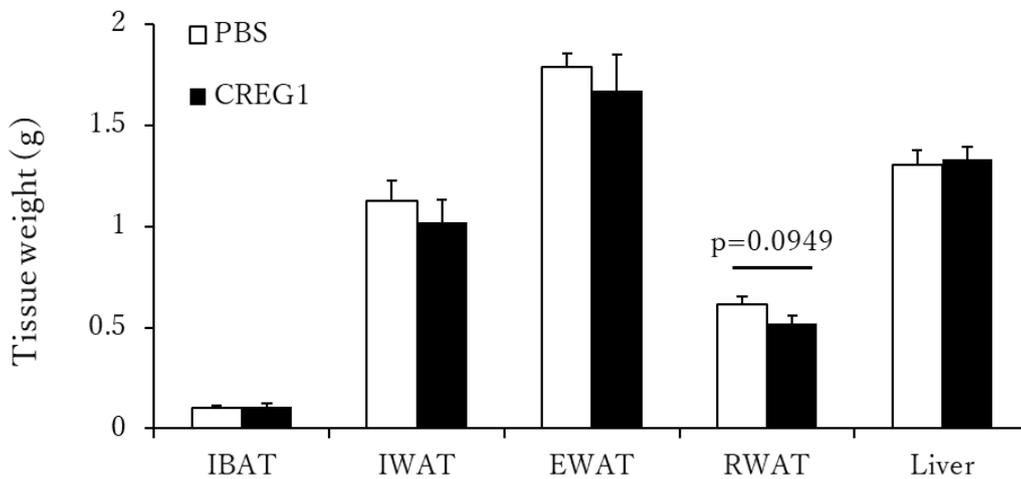


Fig. 18 30°C環境下におけるCREG1-MH投与マウスの各組織重量(IBAT, IWAT, EWAT, RWAT, Liver) (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。Data are the mean \pm SEM.

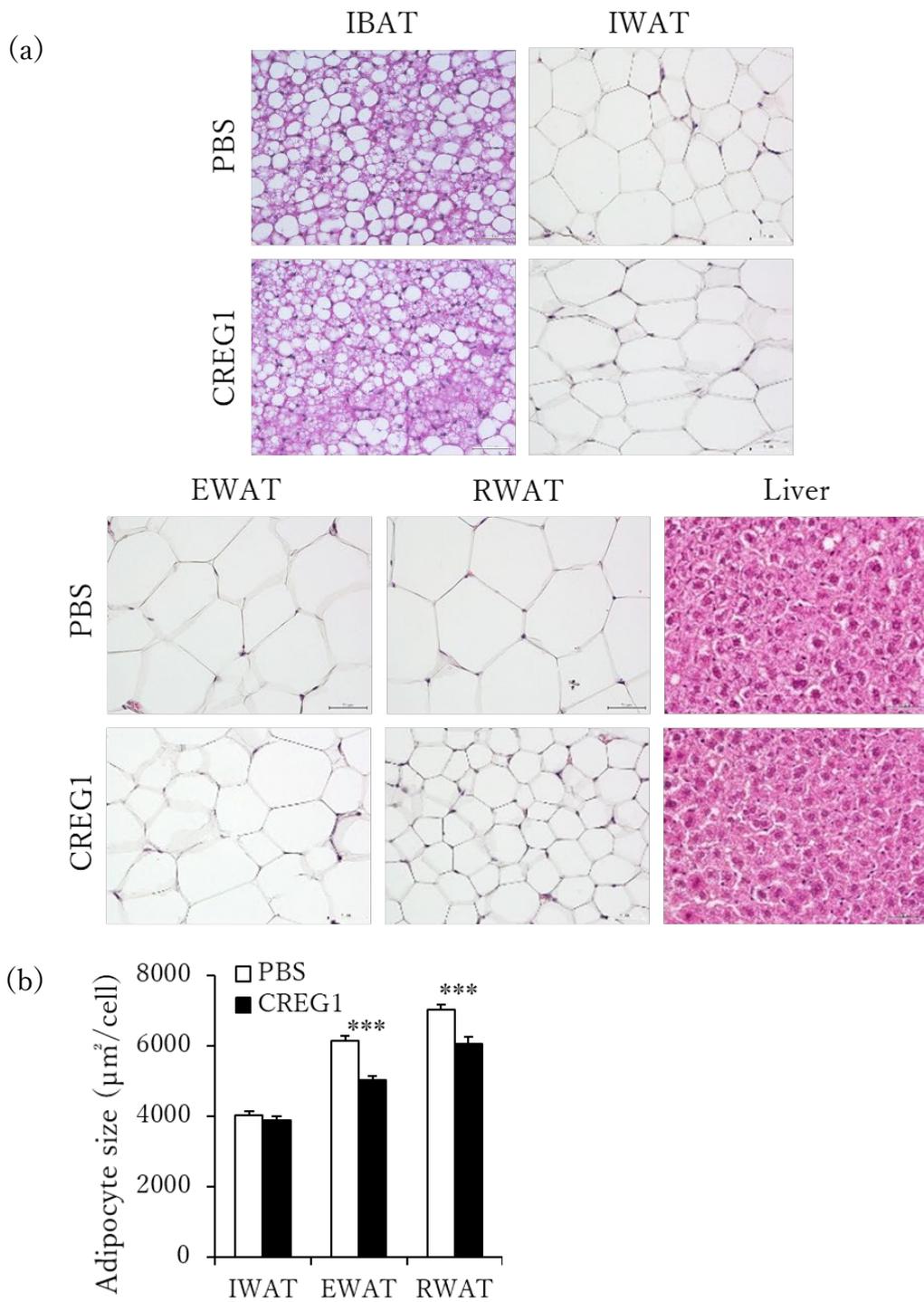


Fig. 19 30°C環境下における CREG1-MH 投与マウスの組織解析 (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。(a) H&E 染色 (IBAT、IWAT、EWAT、RWAT、Liver : scale bar, 50 μ m)。(b) 白色脂肪組織の脂肪細胞サイズ。Data are mean \pm s.e.m. ***p < .001 vs. PBS

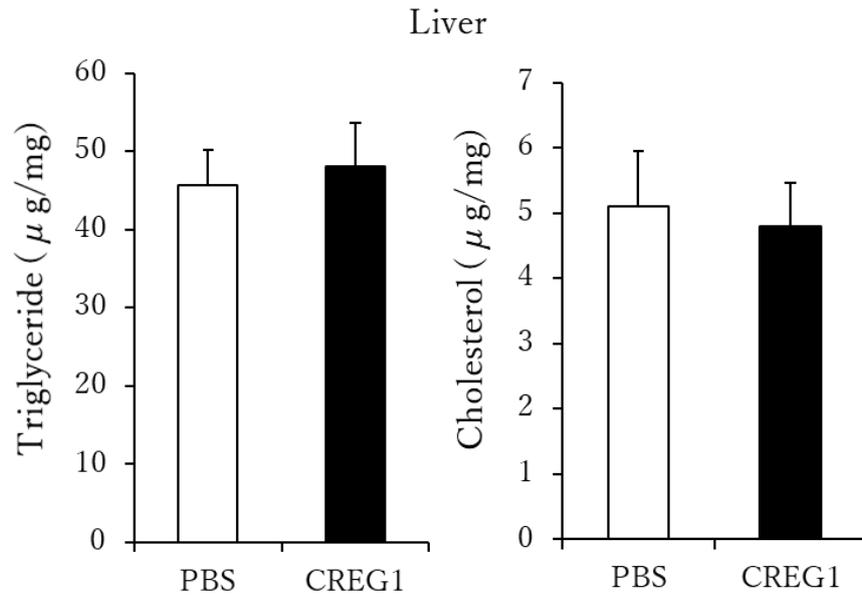


Fig. 20 30°C環境下における CREG1 投与マウスの肝中トリグリセリド及び総コレステロール含量 (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。Data are mean \pm s.e.m.

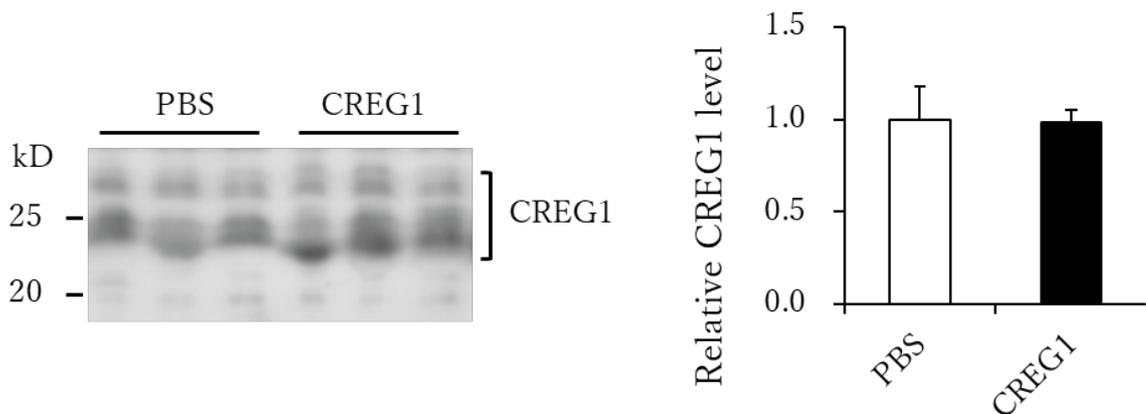


Fig. 21 30°C環境下における CREG1 投与マウスの血中 CREG1 レベル。マウス血清中の CREG1 レベルをウエスタンブロットにより解析した (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。Data are mean \pm s.e.m.

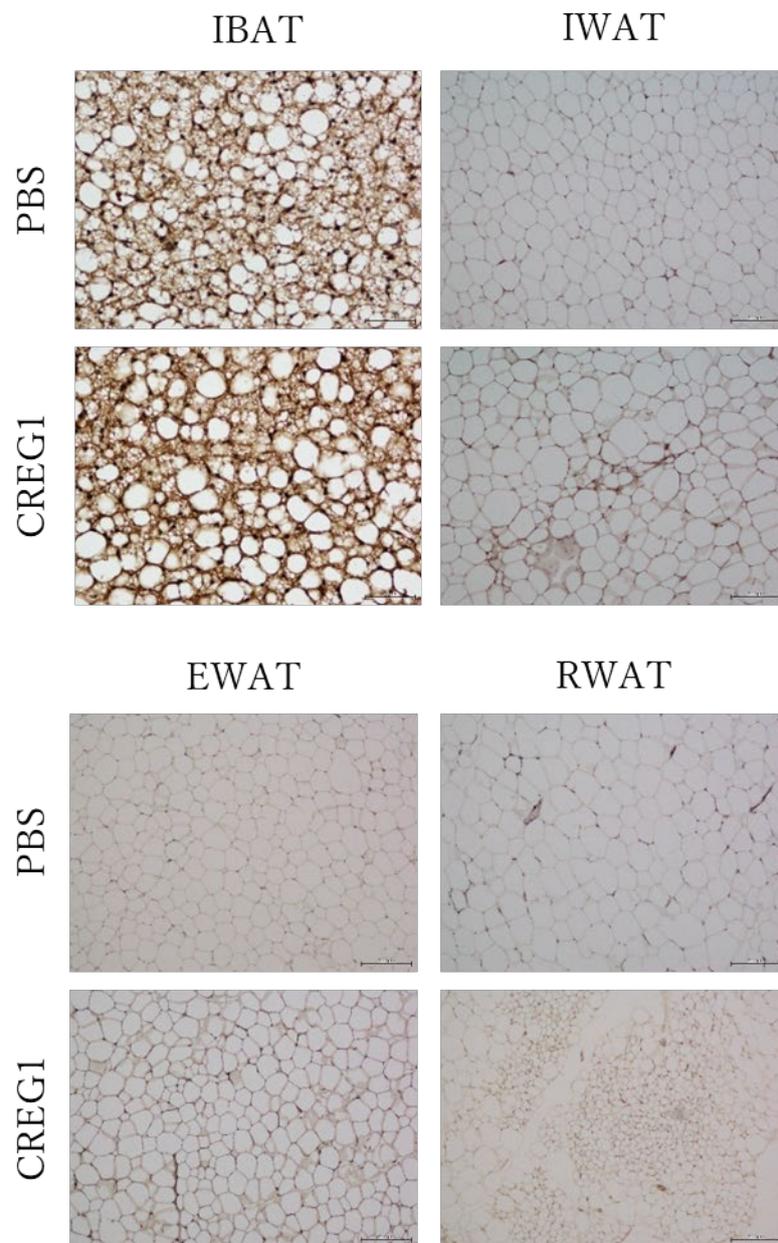


Fig. 22 30°C環境下における CREG1 投与マウスの脂肪組織における UCP1 発現の免疫組織化学解析 (scale bar, 200 μ m) (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。

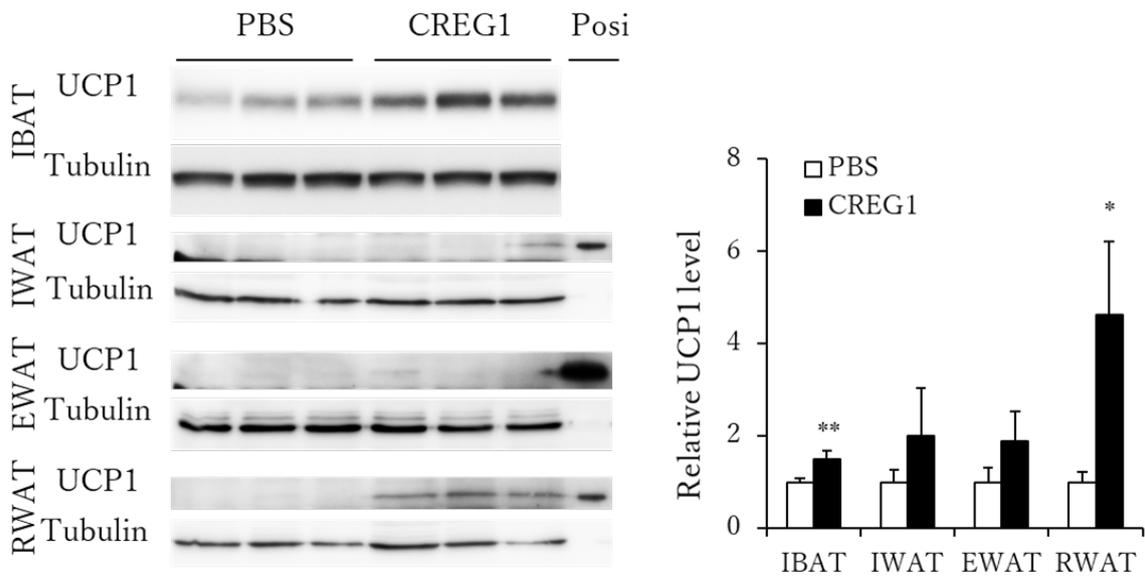


Fig. 23 脂肪組織の UCP1 発現に対する CREG1 の効果 (30°C環境下)。CREG1-MH 投与マウスの IBAT、IWAT、EWAT、及び RWAT の UCP1 発現レベルをウエスタンブロットにより解析した (n = 6 per group)。UCP1 発現レベルは Tubulin 発現レベルでノーマライズした。Data are mean \pm s.e.m. *p < 0.05, **p < .01 vs. PBS。Posi : ポジティブコントロールの IBAT 抽出液。

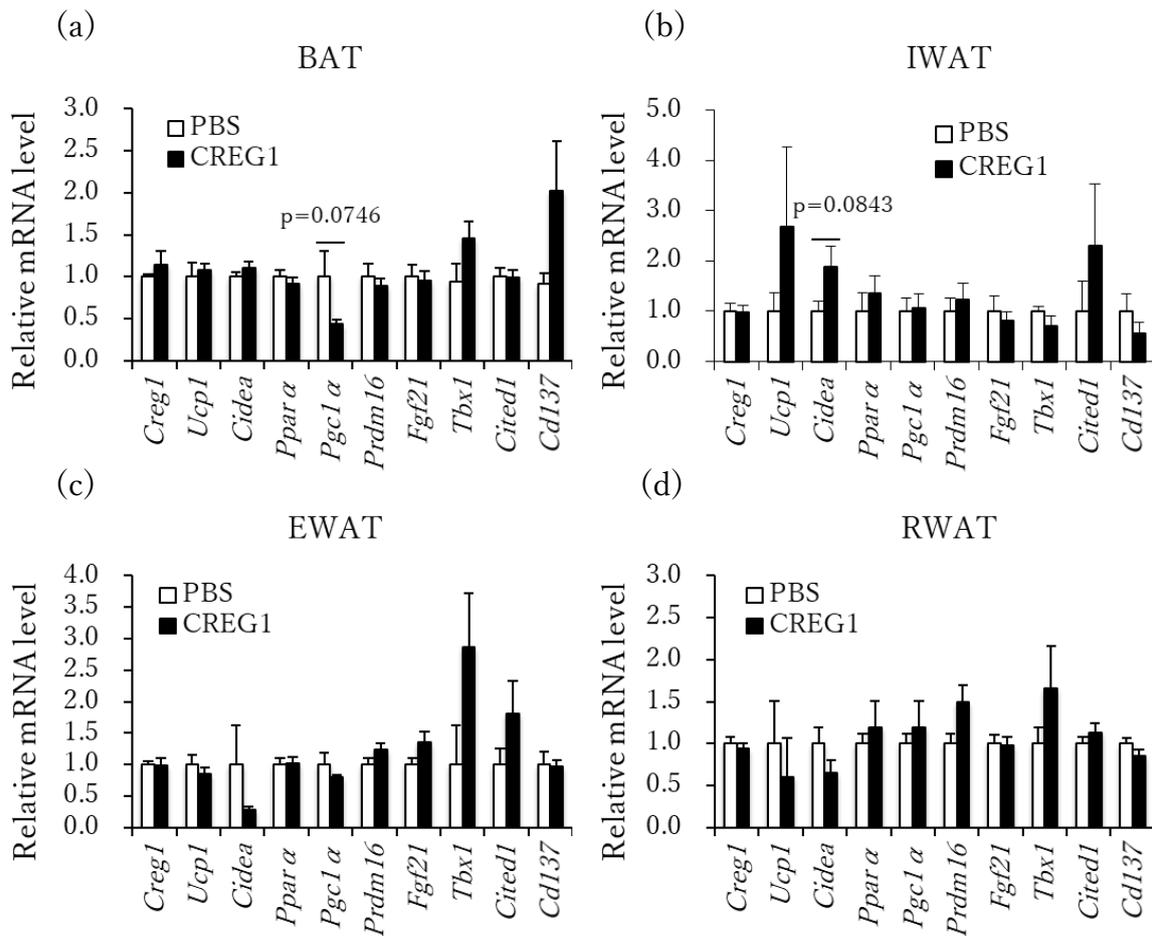


Fig. 24 遺伝子発現に対する CREG1 の投与効果 (30°C環境下)。CREG1-MH 投与マウスの IBAT (a)、IWAT (b)、EWAT (c) 及び RWAT (d)における *Creg1*, *Ucp1*, *Cidea*, *Ppar α*, *Pgc1 α*, *Prdm16*, *Fgf21*, *Tbx1*, *Cited1*, *Cd137* 遺伝子の mRNA レベルについて RT-qPCR により解析した (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。Data are mean \pm s.e.m.

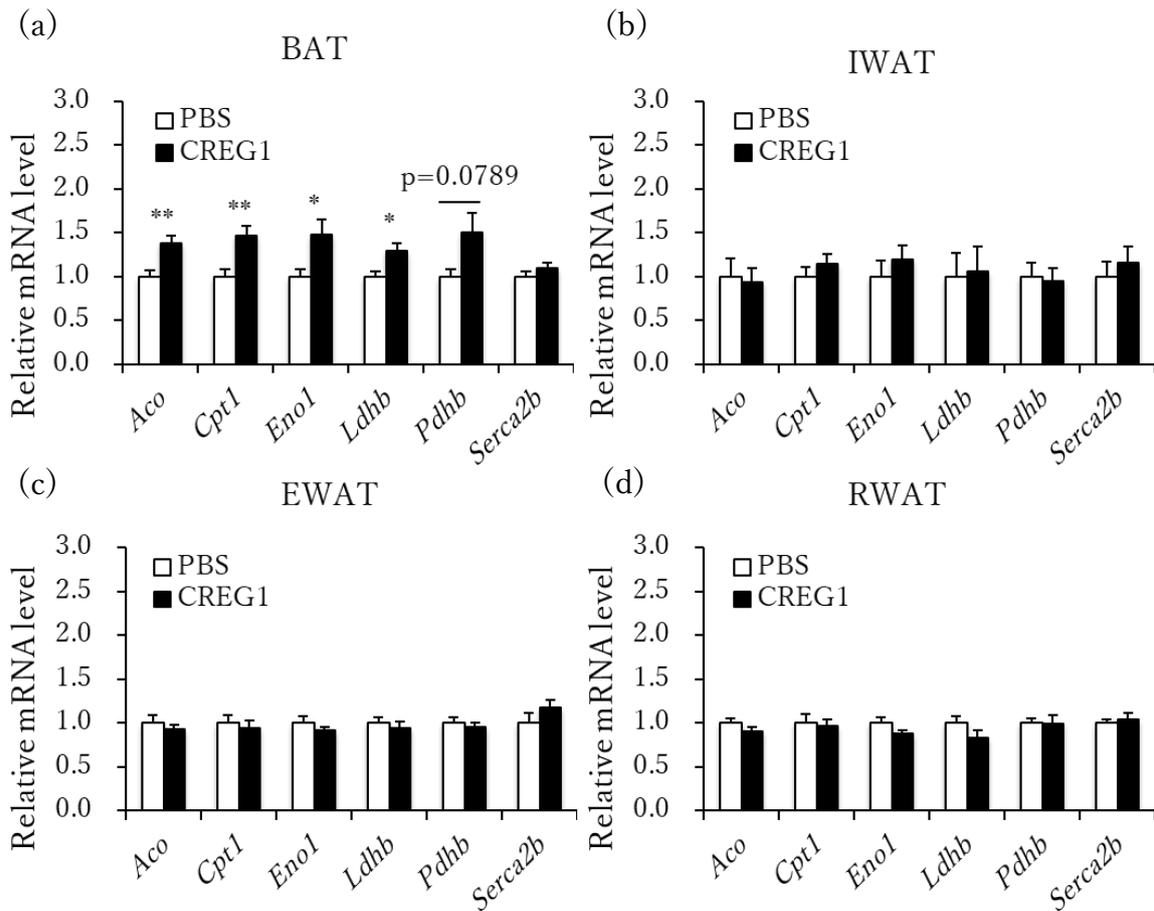


Fig. 25 遺伝子発現に対するCREG1の投与効果(30°C環境下)。CREG1-MH投与マウスのIBAT (a)、IWAT (b)、EWAT (c) 及びRWAT (d) における *Aco*, *Cpt1*, *Eno1*, *Ldhb*, *Pdhb*, *Serca2b* 遺伝子の mRNA レベルについて RT-qPCR により解析した (PBS: n = 6, CREG1: n = 7)。Data are mean \pm s.e.m. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. PBS

第五節：CREG1 の肥満抑制効果における UCP1 の必要性

上記の結果から、褐色脂肪化と UCP1 発現促進、ならびに肥満抑制に対する CREG1 投与の効果が個体レベルで明らかになった。しかし、CREG1 の抗肥満効果において UCP1 が必要かどうかは明らかではない。そこで次に、この疑問に答えるために UCP1-KO マウスを利用する実験3を実施した。すなわち、CREG1-Tg、UCP1-KO、および Tg / KO マウスを準備して実験を行い、中立温度環境下で 2 か月間高脂肪食を与えた。この実験では、UCP1-KO マウスの肥満表現型がオスよりもメスの方が顕著であるためメスマウスを使用した [7]。これら 3 種類の遺伝子型をもつマウスの肥満に対する表現型を検討したところ、3 群間で食事摂取量に差は認められなかったが、Tg / KO マウスの体重は UCP1-KO マウスと同様に CREG1-Tg マウスよりも有意に高いことが明らかとなった (Figs. 26a-b)。耐糖能においては CREG1-Tg マウスと UCP1-KO マウスに差はみられなかったが、Tg/KO マウスでは CREG1-Tg マウスに比べて悪化する傾向が観察された (Fig. 27)。血清インスリン、トリグリセリド、および総コレステロールレベルは 3 群間で有意な差は認められなかった (Figs. 28 a-c)。マウスの組織量は、UCP1-KO マウスの特徴である IBAT の肥大が Tg/KO マウスでも確認された (Fig. 29)。また、IWAT および RWAT は CREG1-Tg マウスに比べて Tg/KO マウスで大きい傾向があり、肝臓についても Tg / KO マウスでは UCP1-KO マウスと同様に大きくなっていった (Fig. 29)。

次に組織解析を行なった結果、H&E 染色では CREG1-Tg マウスと比較して、Tg /

KO および UCP1-KO マウスの IBAT で多房性形態の減少が観察されるとともに、Tg / KO マウスの IWAT、GWAT、RWAT で脂肪細胞サイズの肥大が観察された (Fig. 30)。肝臓についても Tg / KO および UCP1-KO マウスで脂質蓄積が増加している傾向が観察され (Fig. 30)、実際に肝脂質量は CREG1-Tg マウスよりも Tg / KO マウスで有意に高く、UCP1 の非存在下で肝臓における脂質沈着が増加していることが明らかとなった (Fig. 31)。また、遺伝子発現解析において、UCP1-KO マウスと比較して Creg1-Tg および Tg / KO マウスの IBAT、IWAT、および GWAT で Creg1 の mRNA 発現レベルが上昇していることが確認された (Fig. 32)。さらに、IBAT の UCP1 タンパク質解析により、Tg / KO および UCP1-KO マウスにおける UCP1 欠損が確認された (Fig. 33)。

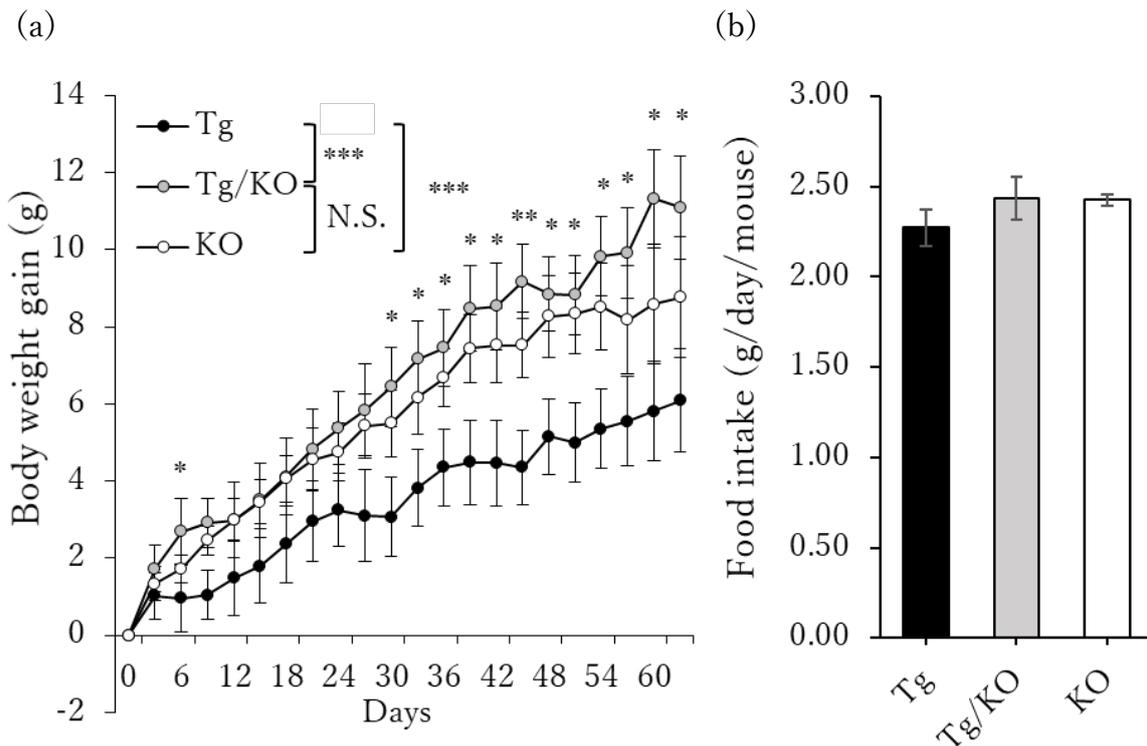


Fig. 26 UCP1 欠損下における CREG1 の抗肥満効果 (30°C環境下)。CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスに高脂肪食を与え体重と食事摂取量を経時的に測定した (n = 5 for each genotype)。 (a) 体重増加量。 (b) 平均摂食量。 Data are the mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. PBS.

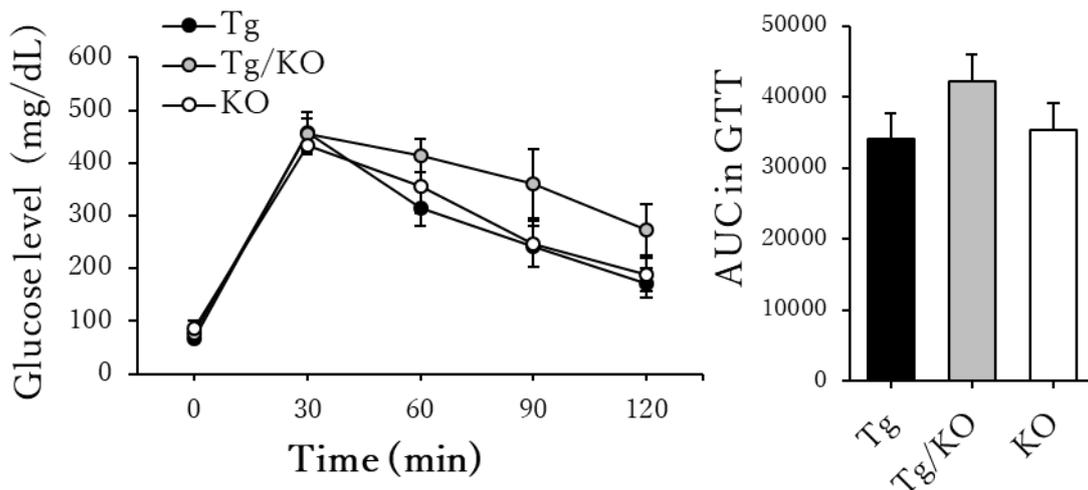


Fig. 27 UCP1 欠損下における耐糖能に対する CREG1 の効果 (30°C環境下)。2 か月間高脂肪食摂取した CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスの耐糖能試験 (n = 5 for each genotype)。 Data are the mean \pm SEM.

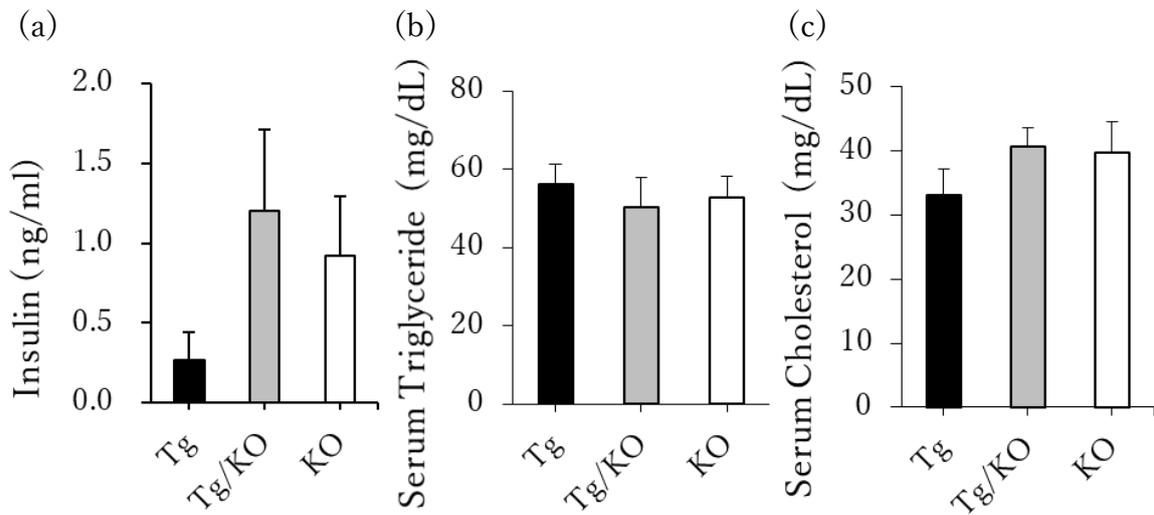


Fig. 28 血液生化学指標に対するUCP1欠損とCREG1の効果(30°C環境下)(n = 5 for each genotype)。2か月間高脂肪食摂取したCREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KOマウスのサンプリング時におけるインスリン値(a)、血清トリグリセリド(b)及び総コレステロール濃度(c)。Data are the mean \pm SEM.

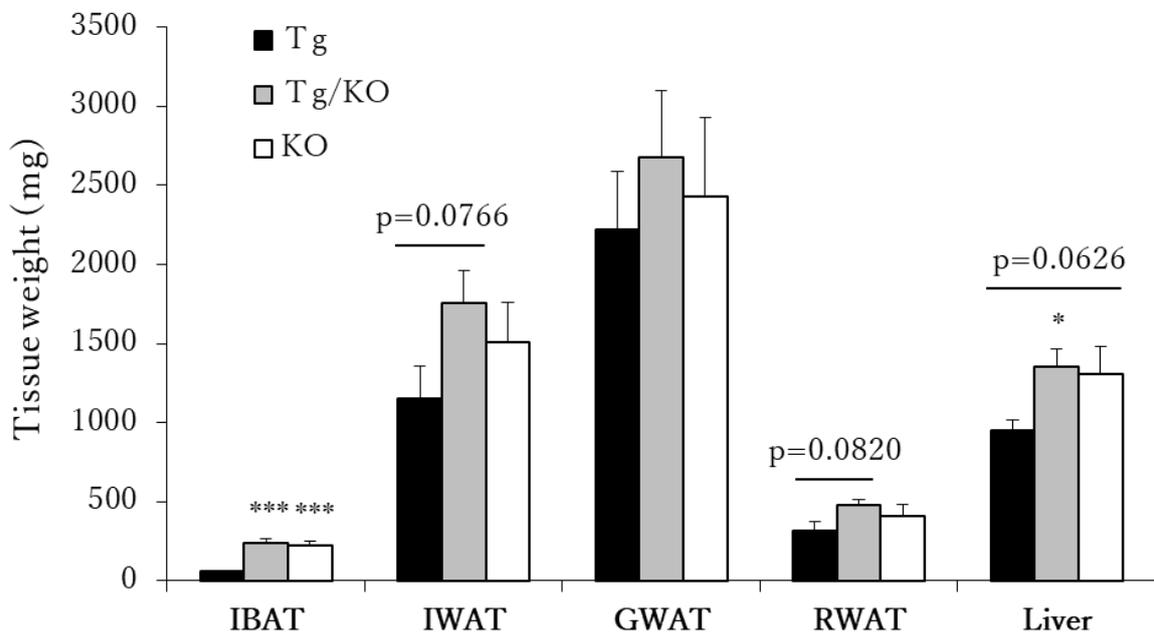


Fig. 29 CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KOマウスの各組織重量(IBAT, IWAT, EWAT, RWAT, Liver)(n = 5 for each genotype)。マウスは30°C環境下において高脂肪食を2か月間摂取した。Data are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Tg

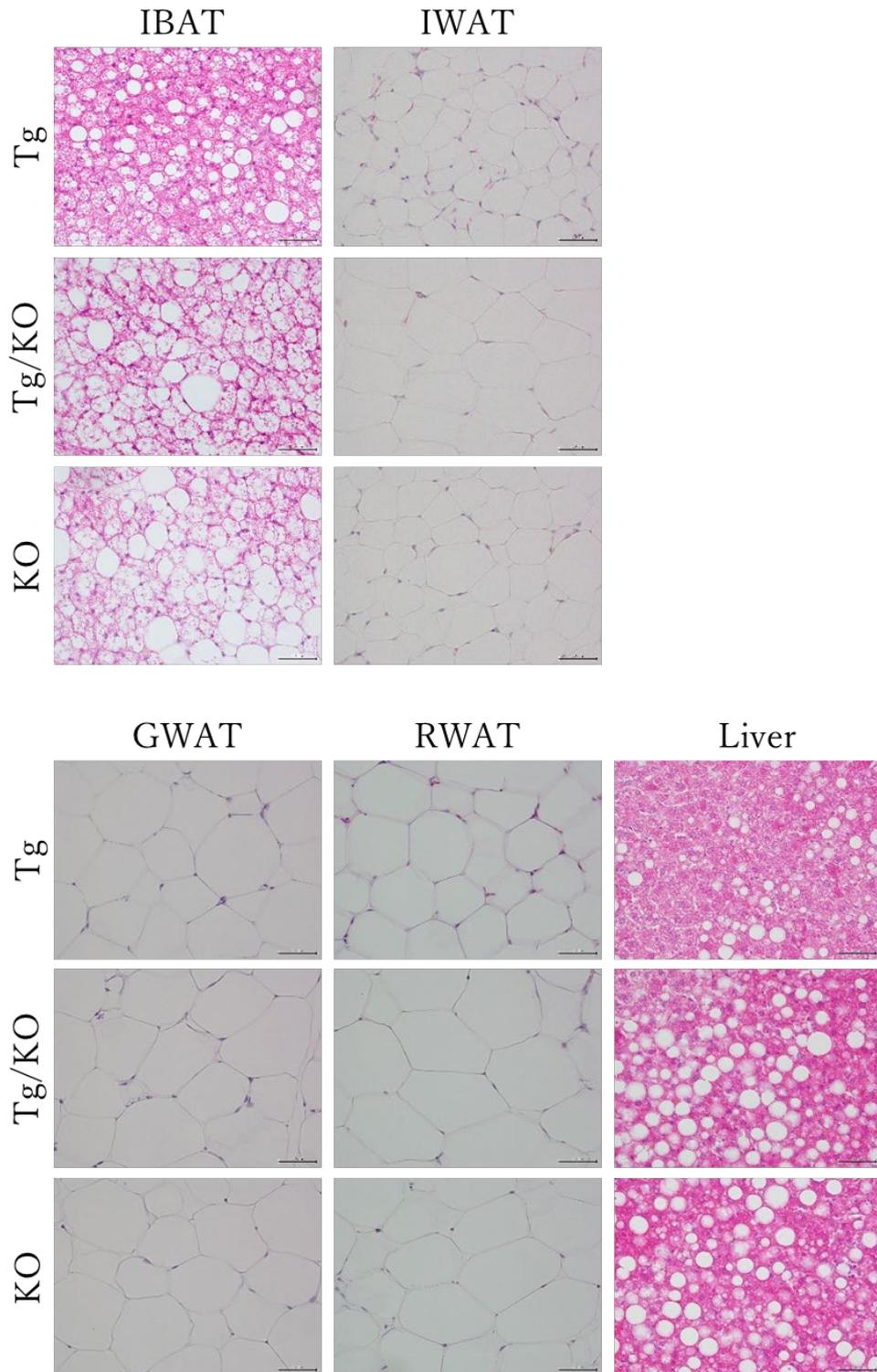


Fig. 30 CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスの IBAT、IWAT、GWAT、RWAT、Liver の H&E 組織染色画像 (scale bar, 50 μ m)。

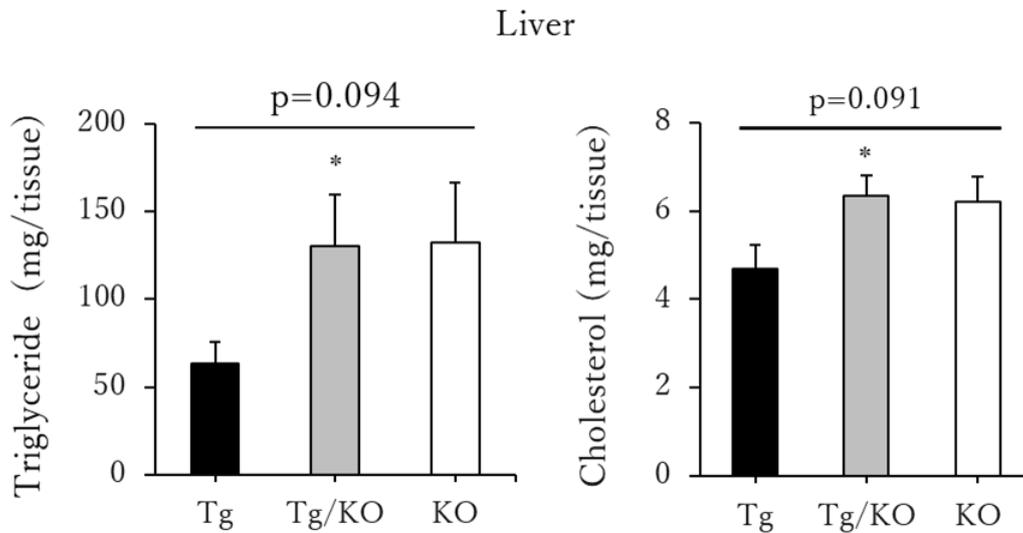


Fig. 31 CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスの肝中トリグリセリド及び総コレステロール含量 (n = 5 for each genotype)。Data are mean \pm s.e.m. *p < 0.05 vs. Tg

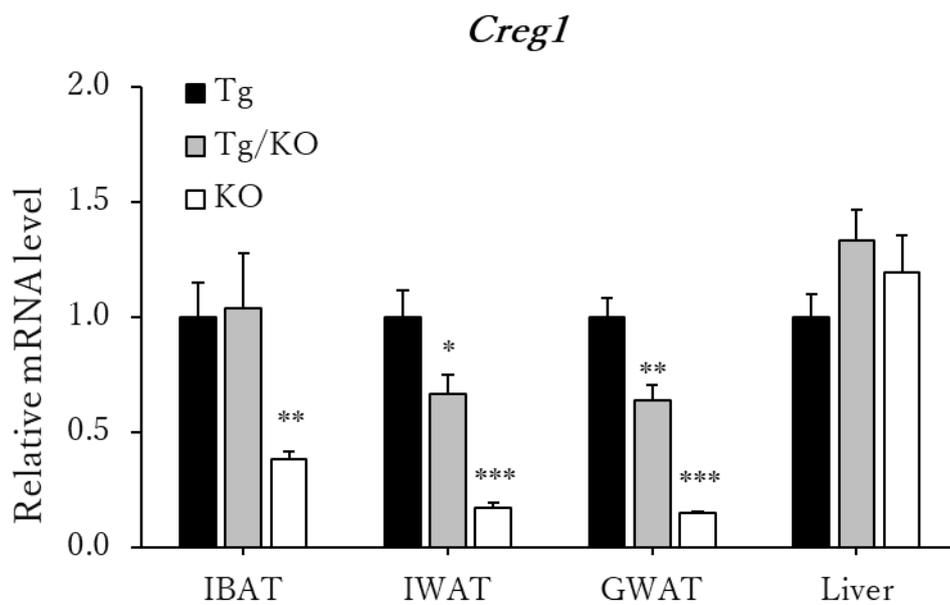


Fig. 32 CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスの脂肪組織と肝臓における *Creg1* 遺伝子発現レベル (n = 5 for each genotype)。Data are mean \pm s.e.m. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. Tg

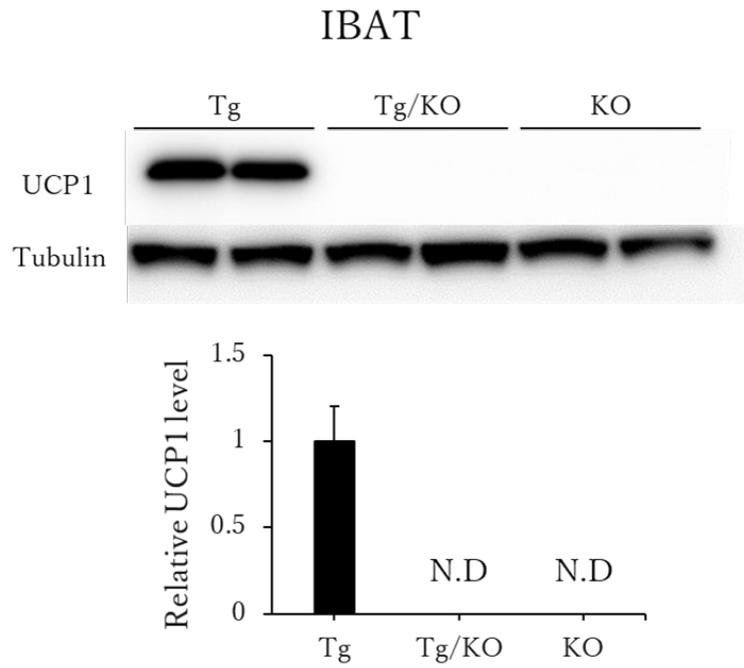


Fig. 33 CREG1-Tg、UCP1-KO、CREG1-Tg / UCP1-KO マウスの IBAT における UCP1 発現レベル (n = 5 for each genotype)。Data are mean \pm s.e.m. ND: not detected

第四章 考察

肥満は糖尿病や高脂血症などの代謝性疾患ばかりでなく、ガンや認知症などのリスクを高めることから、肥満の予防・改善は多くの生活習慣病を防ぐための重要な一歩となる。肥満の予防・改善法としては食事制限などによるエネルギー摂取を抑える方法と運動によりエネルギー消費を高める方法が考えられる。しかし、これらの方法の実施には生活習慣や年齢など様々な制約による個人差があり、結果として現在も肥満者が増え続けている。一方近年、肥満の成り立ちにおける脂肪細胞の役割において、中性脂肪を溜め込む白色脂肪細胞とは逆に、エネルギーを消費する熱産生脂肪細胞の抗肥満作用に大きな注目が集まってきた [4] [20]。熱産生脂肪細胞には常在性の褐色脂肪細胞と誘導性のベージュ脂肪細胞が存在するが、どちらの細胞も UCP1 を発現し中性脂肪や糖を燃焼することから、熱産生脂肪細胞の誘導や維持は肥満および代謝性疾患を防ぐために重要であると考えられている [21]。現在までに、我々の研究グループを含めて、褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞の分化に関与する内分泌因子や転写因子の役割など熱産生の分子メカニズムが明らかとなってきた [4] [12] [22] [20]。

本研究では、まず実験 1 として、DIO 及びその関連病態の改善に対する CREG1 の有効性についてマウス皮下への組換え CREG1 タンパク質投与により検証した。組換え CREG1 タンパク質の発現バンドをウエスタンブロットにより確認し、そのバンドを銀染色法により確認したところ組換え CREG1 タンパク質以外のバンドは確認されなかったことから高純度で CREG1 タンパク質は精製されたと考えられる。しかし、精製

CREG1 タンパク質の溶解度は低く、約 2 mg/ ml PBS までの濃縮が限界であった。マウス実験では 1 日あたり約 75 μ g/kg 体重の投与量を使用した。これは使用した浸透圧ポンプに充填して投与できる組換え CREG1 の最大用量であった。いずれにしても、実験 1 によって DIO マウスの肥満、耐糖能、および脂肪肝の改善に対する CREG1 投与の効果が確認された。また、間接熱量測定時において、 β 3 アドレナリン受容体作動薬を投与後に CREG1 投与群においてエネルギー代謝が亢進された。この薬剤は、脂肪細胞にある β 3 アドレナリン受容体に作用することにより、脂肪細胞に貯蔵されている中性脂肪を遊離脂肪酸として放出する。これと同時に褐色脂肪細胞においては、UCP1 を活性化させ熱産生を活発にする作用がある。この結果は CREG1 投与によって褐色脂肪細胞が増加したことを示唆しており、先述した DIO マウスの病態改善効果には BAT を介した熱産生が関与したと考えられる。その理由の 1 つとして、C3H10T1 / 2 細胞培養系において CREG1 の添加は褐色脂肪細胞の分化と UCP1 の発現を刺激することが明らかとなっている [12]。実験 1 では、血中 CREG1 タンパク質レベルの上昇は確認できなかったが、浸透圧ポンプを使用した CREG1 タンパク質の持続投与において背側皮下から浸出した CREG1 が近傍の IBAT へとパラクリンに作用した可能性が考えられる。しかし、白色脂肪組織の褐色化および UCP1 発現誘導に対する皮下 CREG1 投与の効果は、Creg1-Tg マウスを用いた先行研究 [23] よりも軽度であった。これは、今回使用した浸透圧ポンプでの CREG1 投与量や投与期間による限界を示唆しているかもしれない。CREG1 の用量を増やし、より長期的な投与により CREG1 血中レベルを上昇させるこ

とができれば、白色脂肪組織の褐色化および DIO の改善により高い効果が得られるのではないかと考えられる。

外因性 CREG1 の UCP1 発現を伴う脂肪細胞分化に対する効果は、Creg1 遺伝子を抑制した IBAT および IWAT 初代培養への CREG1 添加実験でも確認された。すなわち、添加した組換え CREG1 タンパク質 (~34 kD) が細胞に作用する過程において、そのシグナルペプチドと Myc-His-tag が除去されて取り込まれ、細胞内では最終的に脱グリコシル化された CREG1 [14]と同様のより小さなサイズの CREG1 (~20 kD) として存在することが明らかになった。CREG1 は糖鎖依存的に mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) に結合することが報告されている [24]。これらの結果は、マウスを用いた CREG1-MH の皮下ポンプ投与実験において、外因性の CREG1 がオートクリン/パラクリンメカニズムを介して褐色脂肪細胞及びベージュ脂肪細胞の分化と UCP1 発現の促進に作用し得ることを支持するものと考えられた。

実験 2 では、30°C の中立温度環境下においても CREG1 投与が IBAT を含む脂肪組織における UCP1 発現誘導と DIO に及ぼす影響を検討した。その結果、中立温度環境においても CREG1 が褐色脂肪組織や内臓白色脂肪組織における UCP1 発現を高め、肥満改善に効果的であることが明らかとなった。しかし、本実験においても CREG1 を投与したマウスの血清 CREG1 レベルの上昇を検出できなかったことから、実験 1 と同様に CREG1 投与量や投与期間の問題が残る。また、実験 1 で認められた耐糖能の改善は実験 2 では認められなかった。この理由としては、AUC データから分かるように実験 1

の DIO マウス (23°C、60% kcal 高脂肪食) の耐糖能の悪化は実験 2 の DIO マウス (30°C、45% kcal 高脂肪食) では軽度であったことと関連していると考えられる。一方、中立温度環境下においては BAT における UCP1 発現が劇的に減少する [5]ことを考えると、アドレナリン作動性熱産生が大幅に減衰する中立温度環境下においても CREG1 が IBAT 及び RWAT の UCP1 発現を刺激できることは興味深い。しかし、PBS 投与群と CREG1 投与群の間でこれらの脂肪組織の *Ucp1* mRNA レベルに差は認められなかった。この *Ucp1* 遺伝子発現調節における転写と翻訳の不一致を説明することはできないが、以前にも *Ucp1* の遺伝子発現について同様の所見が報告されている [25]。また、RWAT と異なり CREG1 投与群の EWAT では、PBS 投与群と比較して UCP1 発現の有意な増加は検出されなかった。この 2 つの内臓白色脂肪組織の間の UCP1 誘導の違いを説明することは難しいが、白色脂肪組織の部位により *Ucp1* mRNA 誘導のレベルが異なることが A/J および C57BL/6J 近交系マウスで知られている [9]。

また実験 2 では、CREG1 投与群の RWAT などの白色脂肪組織において UCP1 発現が増加しているにもかかわらず、遺伝子発現解析では *Tbx1* や *Cited1* などのベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子 [18] の有意な増加を検出できず、CREG1 による WAT 褐色化誘導作用が不十分であったことが示唆される。この理由は分からないが、中立温度環境下において WAT の褐色化が起こりにくいという同様の所見が Véniant らの FGF21 投与実験において報告されている [26]。一方、PBS 投与群と比較して CREG1 投与群の IBAT で代謝関連遺伝子 (*Aco*, *Cpt1*) の有意な発現上昇を見出したが、これは常在性の

褐色脂肪細胞のエネルギー代謝促進を示唆している。さらに、意外にも CREG1 投与により IBAT における 3 つの解糖系遺伝子 (*Eno1*, *Ldhb*, *Pdhb*) の mRNA レベルも増加した。これらの遺伝子は 15°C 環境下においてマウスの IWAT で誘導される糖利用型ベージュ脂肪細胞による適応性熱産生に関与していることから [27]、CREG1 を投与したマウスの IBAT における解糖活性の上昇が示唆される。乳児を含むヒトの鎖骨上窩領域の BAT は、*Tbx1* や *Cited1* などのベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子を高発現するため [28] [29]、BAT の可塑性を制御する未知のメカニズムが存在する可能性がある。このメカニズムに関して、Sidossis と Kajimura はホルモンや熱ストレスに応答して常在性 BAT における脂肪前駆細胞の階層が変化し、ベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子の発現が誘導されることを報告した [20]。実際に Song らは、環境温度の変化に応じて 2 つの褐色脂肪細胞亜集団が相互変換することを示した [30]。

実験 2 までの結果から、CREG1 が標準温度環境下及び中立温度環境下において DIO 改善効果を有することが明らかとなった。しかし、クレアチン依存性基質サイクリング [31] や Ca_2^+ サイクリング [32] のような UCP1 に依存しない熱産生メカニズムがベージュ脂肪細胞で発見されており、CREG1 の DIO 改善効果における UCP1 の重要性は不明なままであった。これらの UCP1 非依存性メカニズムは、中立温度環境下での白色脂肪組織の褐色化の抑制とともに減弱するらしい [33]。また、中立温度環境下で DIO を発症する UCP1-KO マウスの脂肪組織と肝臓で CREG1 は発現していることから [8]、CREG1 は UCP1 非存在下では DIO を改善できない可能性がある。この可能性を検証

するために脂肪組織で *Creg1* mRNA 発現レベルが著しく増加した aP2-CREG1-Tg マウス [23]と UCP1-KO マウスを利用して実験3を行なった。結果として、Tg / KO マウスは UCP1-KO マウスと同様の病理学的表現型を示し、*Creg1* を過剰発現させても UCP1 の非存在下では DIO を改善できないことから、CREG1 の DIO 改善効果には UCP1 が不可欠であることが明らかとなった。

以上のように、本研究は BAT の熱産生が正常に起こっている 23°Cの標準温度環境下及び、UCP1 発現を含む BAT 熱産生が大幅に減衰し肥満に対する感受性を高める 30°C の中立温度環境下において、CREG1 が生体内において UCP1 発現を促進し肥満を改善することを報告する。また、CREG1 の抗肥満効果は UCP1 の発現に依存することを併せて報告する。これは、過剰なエネルギーの散逸において UCP1 という熱産生タンパク質が重要な役割を担うと共に、CREG1 が肥満や代謝性疾患の改善の一助となる可能性を示す。また、ヒトの BAT は年齢とともに減少し、肥満度と逆相関を示すことが明らかとなっている [34]。その意味において、今後は CREG1 の作用をヒトの脂肪細胞で確認することが重要であり、肥満や糖尿病などのメタボリック症候群の予防・改善を目指して CREG1 研究のさらなる発展が期待される。

参考文献

- [1] World Health Organization, “World Obesity Day 2022 – Accelerating action to stop obesity,”<https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity>.
- [2] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359.
- [3] Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 Jul;73(1):9-15.
- [4] Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013 Oct;19(10):1252-63.
- [5] Yamashita H, Wang Z, Wang Y, Segawa M, Kusudo T, Kontani Y. Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 12;377(2):632-635.
- [6] Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):90-4.
- [7] Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell.* 2005 Jun;4(3):147-55.

- [8] Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009 Feb;9(2):203-9.
- [9] Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998 Jul 15;102(2):412-20.
- [10] Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):1000-4.
- [11] Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GQ, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, Celi FS. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):302-9.
- [12] Kusudo T, Hashimoto M, Kataoka N, Li Y, Nozaki A, Yamashita H. CREG1 promotes uncoupling protein 1 expression and brown adipogenesis in vitro. *J Biochem.* 2019 Jan 1;165(1):47-55.
- [13] Veal E, Eisenstein M, Tseng ZH, Gill G. A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol.* 1998 Sep;18(9):5032-41.

- [14] Veal E, Groisman R, Eisenstein M, Gill G. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*. 2000 Apr 20;19(17):2120-8.
- [15] Liu J, Qi Y, Chao J, Sathuvalli P, Y Lee L, Li S. CREG1 promotes lysosomal biogenesis and function. *Autophagy*. 2021 Dec;17(12):4249-4265.
- [16] Bian Z, Cai J, Shen DF, Chen L, Yan L, Tang Q, Li H. Cellular repressor of E1A-stimulated genes attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2009 Jul;13(7):1302-13.
- [17] Zhang QY, Zhao LP, Tian XX, Yan CH, Li Y, Liu YX, Wang PX, Zhang XJ, Han YL. The novel intracellular protein CREG inhibits hepatic steatosis, obesity, and insulin resistance. *Hepatology*. 2017 Sep;66(3):834-854.
- [18] Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Nov;17(11):691-702.
- [19] Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitononkov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):271-81.
- [20] Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2015 Feb;125(2):478-86.
- [21] Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ, Eljalby M, Marx SJ, Wibmer AG, Butler SD, Jiang

- CS, Vaughan R, Schöder H, Mark A, Cohen P. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat Med.* 2021 Jan;27(1):58-65.
- [22] Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jun;9(6):465-82.
- [23] Hashimoto M, Kusudo T, Takeuchi T, Kataoka N, Mukai T, Yamashita H. CREG1 stimulates brown adipocyte formation and ameliorates diet-induced obesity in mice. *FASEB J.* 2019 Jul;33(7):8069-8082.
- [24] Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene.* 2003 Aug 21;22(35):5436-45.
- [25] Yamashita H, Yamamoto M, Ookawara T, Sato Y, Ueno N, Ohno H. Discordance between thermogenic activity and expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of old rats. *J Gerontol.* 1994 Mar;49(2):B54-9.
- [26] Véniant MM, Sivits G, Helmering J, Komorowski R, Lee J, Fan W, Moyer C, Lloyd DJ. Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the "Browning" of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2015 May 5;21(5):731-8.
- [27] Chen Y, Ikeda K, Yoneshiro T, Scaramozza A, Tajima K, Wang Q, Kim K, Shinoda K, Sponton CH, Brown Z, Brack A, Kajimura S. Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state. *Nature.* 2019 Jan;565(7738):180-185.

- [28] Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P, Virtanen KA, Beuschlein F, Persson A, Borga M, Enerbäck S. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013 May;19(5):631-4.
- [29] Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2):366-76.
- [30] Song A, Dai W, Jang MJ, Medrano L, Li Z, Zhao H, Shao M, Tan J, Li A, Ning T, Miller MM, Armstrong B, Huss JM, Zhu Y, Liu Y, Gradinaru V, Wu X, Jiang L, Scherer PE, Wang QA. Low- and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue. *J Clin Invest.* 2020 Jan 2;130(1):247-257.
- [31] Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, Shinoda K, Chen Y, Lu X, Maretich P, Tajima K, Ajuwon KM, Soga T, Kajimura S. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017 Dec;23(12):1454-1465.
- [32] Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, Vetrivelan R, Lu GZ, Laznik-Bogoslavski D, Hasenfuss SC, Kajimura S, Gygi SP, Spiegelman BM. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige

fat. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):643-55.

- [33] Kataoka N, Takeuchi T, Kusudo T, Li Y, Endo Y, Yamashita H. Lack of UCP1 stimulates fatty liver but mediates UCP1-independent action of beige fat to improve hyperlipidemia in Apoe knockout mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Jul 1;1866(7):165762.
- [34] Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509-17.

謝辞

本研究の遂行と論文執筆にあたり、終始多大なご指導をいただきました中部大学 大学院生命健康科学研究科 山下均教授に心より厚く御礼申し上げます。また、ご多忙な中、中部大学大学院生命健康科学研究科 喬善楼教授、川本善之准教授には、本論文の審査をしていただきまして、深く感謝申し上げます。また、本研究を進めるにあたり共同研究頂きました帝塚山学院大学 人間科学部 楠堂達也准教授、旭川医科大学 医学部 医学科 先端医科学講座 橋本理尋助教、医療創生大学 地域連携センター 岡田只土特任講師、中部大学生命健康科学部 生命医科学科 竹内環講師、後藤亜由美助手に深く感謝申し上げます。最後に本研究にご協力いただきました中部大学 生命健康科学部 山下研究室の皆様心から御礼申し上げます。なお、本研究の一部は中部大学特別研究費 (30M07R, 19M05R) により実施した

2022 年 9 月

中部大学大学院 生命健康科学研究科 生命医科学専攻

遠藤優貴