

ベージュ脂肪細胞の誘導機構及び肥満による影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野

池田 賢司

はじめに

近年の研究から、ヒトと齧歯類では褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の少なくとも2種類の熱産生脂肪が存在することが明らかとなった。熱産生脂肪の増加はエネルギー消費量を増加させることから肥満・2型糖尿病に対する治療ターゲットとして期待されている。特にベージュ脂肪細胞はヒトにおいても長期の寒冷暴露や運動等によって誘導されるため、患者数が増加の一途をたどっている肥満・2型糖尿病の治療のターゲットとして期待された。しかし、肥満によってベージュ脂肪細胞の誘導が低下することが明らかになり、ベージュ脂肪細胞をターゲットとした肥満治療開発にむけて大きな障壁となっている。そもそも、ベージュ脂肪細胞の分化制御については未だ不明な点が多く、肥満がベージュ脂肪細胞の誘導機構に及ぼす影響は、ほとんど明らかになっていない。本研究は、ベージュ脂肪細胞がヘテロな細胞集団であることを発見した独自の知見をもとに、シングルセル RNA シークエンス解析を用いて皮下脂肪組織構成細胞の評価を行い、細胞集団の同定を行った。本研究ではこれまでにない新たな切り口で、肥満・2型糖尿病におけるベージュ脂肪細胞の誘導低下のメカニズムを解明し肥満病態下でもベージュ脂肪細胞を誘導することを可能とする標的分子の同定を目的としている。

なお、本研究は新型コロナウイルス感染拡大の影響のためマウス実験計画の一部に遅延を認めたこと、肥満マウスの脂肪細胞は大型化していることからシングルセル解析を行うために予備検討を要したことから、ベージュ脂肪細胞誘導が抑制される別のマウスモデルである老化マウスを用いた検討を行った。

方法及び結果

1. 脂肪組織のシングルセル調整

室温条件下、寒冷刺激を行った非肥満マウスの皮下脂肪組織をシングルセルに単離し、シングルセル RNA シークエンス解析を行い、遺伝子プロファイルから細胞群を同定し細胞のサブタイプを同定した。脂肪組織はコラゲナーゼによる酵素処理を行いシングルセルに細胞調整を行った。

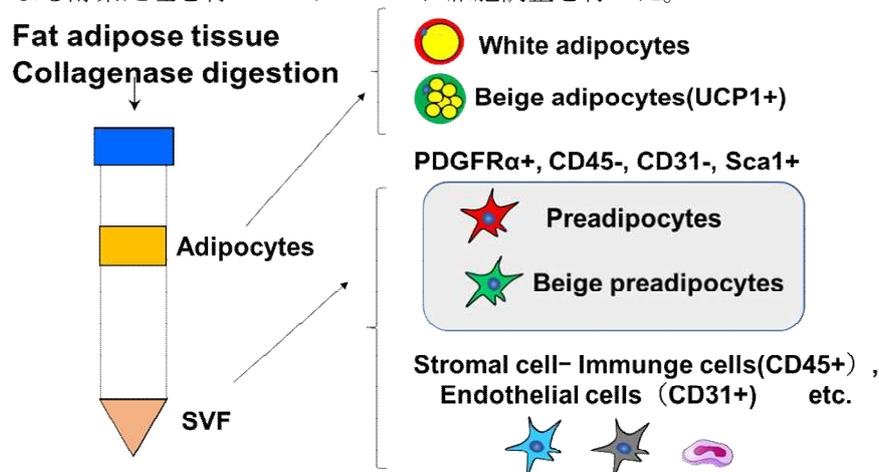


図 1. 脂肪組織のシングルセル調整

脂肪組織には脂肪細胞を始め間質に多くの細胞が存在する。脂肪組織をコラゲナーゼによる酵素処理を行い、シングルセルに細胞調整を行った。

2. シングルセル RNA シークエンス及び細胞集団の同定

シングルセルに単離した細胞に対して 10xGenomics プラットフォームを用いてシングルセル RNA シークエンスを行った。Seurat を用いて uniform manifold approximation and projection(UMAP)による細胞集団の同定を行った。

皮下脂肪組織構成細胞についてシングルセル解析を行い、若齢マウス及び老齢マウスについて室温条件と寒冷刺激条件のそれぞれについて細胞集団の比較を行った。結果、寒冷刺激によって特異的に出現する細胞集団を複数同定した(図2)。

脂肪前駆細胞 (Pdgfra+)

免疫細胞

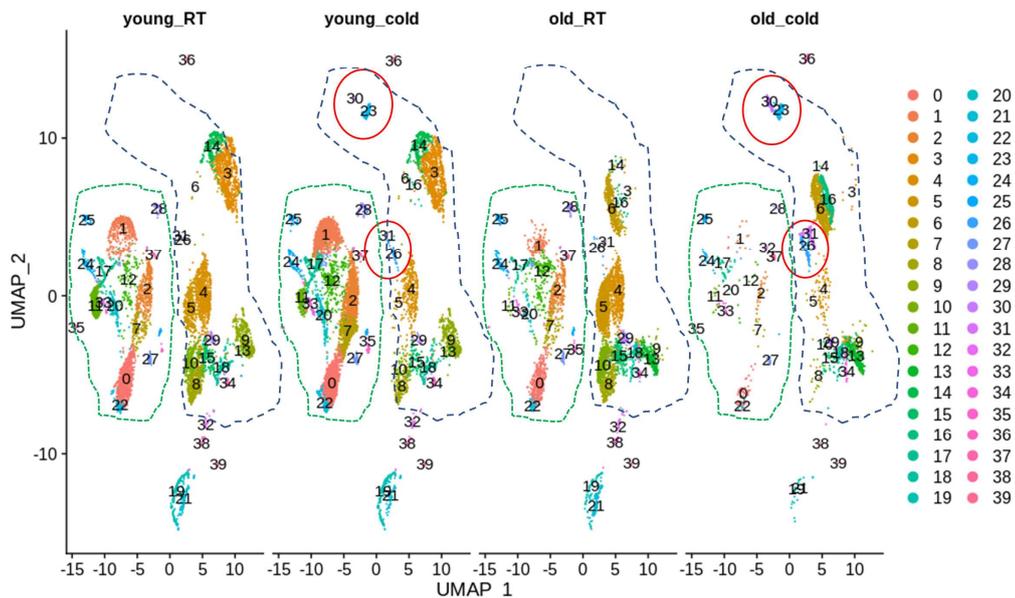


図2. 寒冷刺激条件下で出現する細胞集団の同定

クラスター23, 26, 30, 31 が寒冷刺激条件下で出現する細胞集団である。

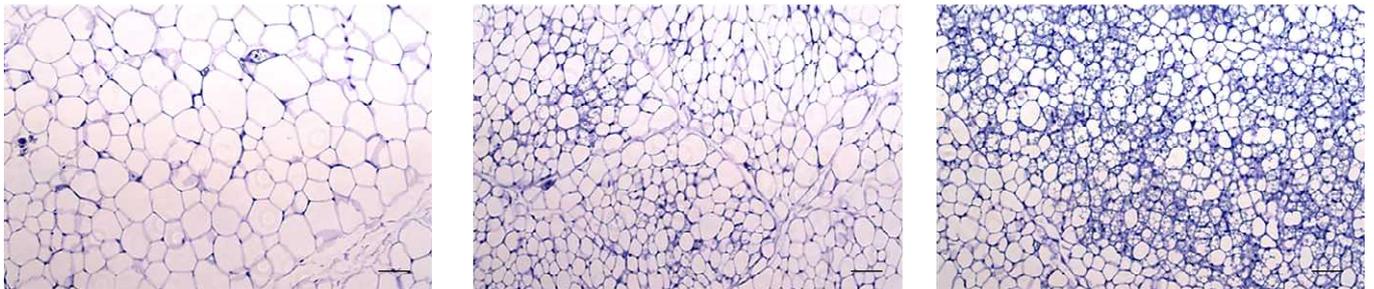
3. 肥満マウスにおけるベージュ脂肪細胞誘導の検討

野生型マウスに対して高脂肪食を負荷し肥満を誘導し皮下脂肪組織の観察を行った。肥満マウスではベージュ脂肪細胞は認められない。そこで、肥満マウスに寒冷刺激を負荷しベージュ脂肪細胞の誘導を検討したところ短期の寒冷刺激ではベージュ脂肪細胞の誘導はほとんど認められないが、長期の寒冷刺激を行うとベージュ脂肪細胞が皮下脂肪組織において誘導された(図3)。この結果から肥満マウスにおいても条件によってはベージュ脂肪細胞が誘導されるものと考えられた。

室温

短期寒冷刺激

長期寒冷刺激



ベージュ脂肪細胞は認められない。そこで、肥満マウスに寒冷刺激を負荷しベージュ脂肪細胞の誘導を検討したところ短期の寒冷刺激ではベージュ脂肪細胞の誘導はほとんど認められないが、長期の寒冷刺激を行うとベージュ脂肪細胞が皮下脂肪組織において誘導された(図3)。この結果から肥満マウスにおいても条件によってはベージュ脂肪細胞が誘導されるものと考えられた。

図3. 肥満マウスにおけるベージュ脂肪細胞誘導の検討

室温条件(左図)、短期寒冷刺激(中央図)、長期寒冷刺激(右図)

短期の寒冷刺激ではベージュ脂肪細胞誘導はほとんど認められないが、長期の寒冷刺激では肥満マウスにおいてもベージュ脂肪細胞誘導を認める。スケールバー50 μ m

考察

本実験ではシングルセル RNA シークエンスを用いて脂肪組織の構成細胞の細胞集団の同定を行った。室温条件と寒冷刺激条件で比較したところ、寒冷刺激条件によって増加及び新規に出現する細胞集団を同定した。同定した細胞集団の一部は脂肪前駆細胞マーカーを発現していることが明らかとなった。この新たに同定した細胞集団は、寒冷刺激によって出現することからベージュ脂肪細胞の前駆細胞である可能性が高いと考えられる。現在のところ、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞は未だ完全に同定されていないため、非常に重要な知見であると思われる。ベージュ脂肪細胞の誘導については肥満、老化によってその誘導が低下することが知られている。したがって、ベージュ脂肪細胞の誘導機構を明らかにするためには、今後肥満や老化マウスの脂肪組織のシングルセル解析をおこなうことで脂肪前駆細胞及びベージュ脂肪前駆細胞の変化や遺伝子プロファイルを明らかにすることが重要になると考えられる。大変興味深いことに、本実験の検討において肥満マウスであっても寒冷刺激条件によってはベージュ脂肪細胞が誘導されることを見出している。

非肥満で誘導されるベージュ脂肪細胞と肥満状態においても誘導されるベージュ脂肪細胞の誘導機構や、その前駆細胞種に差異はあるのかといった問題を解決することで肥満状態におけるベージュ脂肪細胞誘導機構を明らかにすることができると考えている。具体的には、ベージュ脂肪細胞にサブタイプが存在することを考慮すると今回の研究成果もその一部をやはり裏付けており、次の重要な課題として

- ① **肥満の影響を受けて誘導が抑制されるベージュ脂肪前駆細胞のサブタイプ（感受性サブタイプ）、及び誘導が抑制されないサブタイプ（抵抗性サブタイプ）の同定。**
- ② **感受性サブタイプと抵抗性サブタイプの分化制御の分子メカニズムの差異の解明。**

が挙げられる。

これらの課題を解決するためには、当初の計画で予定していたベージュ脂肪前駆細胞のレポーターマウスを用いた解析が有効と考えられる。本研究期間では、COVID-19 の影響を受けたためマウスの繁殖計画に遅延が生じた。そのため、当初の実験計画を一部変更して今回研究を行った。脂肪前駆細胞集団及び、寒冷刺激によって誘導される脂肪前駆細胞集団は今回の研究成果を踏まえると複数存在することから、ベージュ脂肪前駆細胞及びベージュ脂肪細胞のヘテロジニアスの形成に寄与しているものと考えられる。脂肪細胞は脂肪前駆細胞から分化することから、シングルセル解析を用いて検討する必要があると考えており、その際にレポーターマウスを用いた細胞系譜解析が必須と考えられる。現在のところ、マウスが順調に増加しているため予定通り実験を行うことが可能と考えられる。

脂肪前駆細胞の分化機構の検討については、ATAC-Seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing) を用いたオープンクロマチンの評価を行い、転写因子の網羅的解析による候補分子の絞り込みが可能と考えている。現在 ATAC-Seq の細胞調整及び予備検討を行っており本実験施行予定である。続いて、本研究計画を達成するためには脂肪細胞についてもシングルセル解析を行う必要がある。現在のところ、脂肪細胞からのシングルセル解析は脂肪細胞から安定して RNA を抽出する方法が困難であるなど技術的な問題点が多い。特に FACS を用いた脂肪細胞のソーティングは脂肪細胞自体へのダメージが少なくなく、抽出された RNA のクオリティーが著しく低下するなどといった問題点が挙げられる。一因として、脂肪細胞は細胞径が脂肪前駆細胞や間質の細胞と比較すると大型の細胞であることある (70–100 μ m)。実際、大型の細胞はシングルセル解析を行う際の弊害となることが知られている。したがって、大型の脂肪細胞に対するシングルセル解析を行うための解決策として脂肪細胞から核を単離しシングルセル解析が施行可能かどうか予備検討を行っている。

以上の検討は細胞自律性のメカニズムや分子制御を想定としているが、実際のところは細胞間相互作用も広く知られている。SingleCellSignalR を用いた細胞間相互作用の検討を行う。

以上の解析を通じて肥満においてもベージュ脂肪細胞誘導を可能とすることで、肥満・2 型糖尿病に対する新規治療開発の基盤を構築したいと考えている。