

令和元年6月13日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08545

研究課題名(和文) AM-RAMP2系による、脂肪細胞の細胞骨格とエネルギー代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cytoskeleton and energy metabolism in adipocytes by adrenomedullin-RAMP2 system

研究代表者

神吉 昭子 (KAMIYOSHI, Akiko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10397309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アドレノメデュリン(AM)は、血管拡張作用など多彩な生理活性を有するペプチドであり、AMと受容体活性調節タンパクRAMP2は脂肪細胞でも高発現が認められる。本研究では、脂肪細胞特異的RAMP2ノックアウトマウスを用いて、AM-RAMP2系のエネルギー代謝調節や褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の分化制御における細胞骨格構造の役割を解析した。AM-RAMP2系は、褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の細胞骨格構造を制御し、エネルギー代謝制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMはペプチドで血中半減期が短いため、それ自体を慢性疾患の治療薬として利用することは難しい。そこで、AMの受容体側に着目し、その受容体活性調節タンパクであるRAMP2を標的とした治療法の開発を検討している。RAMP2は1回膜貫通型タンパクであり、比較的単純な構造のため治療標的分子となる可能性が高いと考えられ、本研究の成果により、RAMP2を標的としたメタボリックシンドロームの治療法開発に展開することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a vasodilatory peptide, which possess various bioactivities. AM and receptor activity-modifying protein 2 (RAMP2) are highly expressed in adipose tissues. In this study, to clarify the regulation of cytoskeleton and energy metabolism in adipocytes by AM-RAMP2 system, we analyzed adipocyte-specific RAMP2 knockout mice. We showed that AM-RAMP2 system regulates cytoskeleton of inguinal white adipose tissue and brown adipose tissue, and participates in adipocyte differentiation and energy metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード：アドレノメデュリン 脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張作用をはじめ多彩な生理活性を有するペプチドであり、血管、心臓、腎臓など様々な臓器で産生・分泌される。AM は脂肪組織からも分泌され、循環血液中の AM の 30% が脂肪細胞に由来する。また、AM 受容体 CLR と受容体活性調節タンパク RAMP2 も脂肪細胞において高発現が認められることから、AM-RAMP2 系が脂肪細胞の分化や代謝制御に関与する可能性が考えられる。

(2) これまでに、RAMP2 ホモノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) は胎生致死となることから、RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) を用いて、高脂肪食投与による肥満誘導モデルの検討を行った。RAMP2^{+/-} は野生型マウスと比較して、脂肪細胞の肥大と脂肪組織への炎症細胞浸潤の亢進、脂肪肝の悪化やインスリン抵抗性などを示すことを明らかにした。RAMP2^{+/-} の脂肪細胞の肥大化は、脂肪組織の慢性炎症状態を惹起し、体内の各臓器の機能障害の原因となる。そこで、脂肪細胞に着目し、脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) を樹立し解析を行っている。A-RAMP2^{-/-} は野生型マウスと比較して、若年期での著明な体重増加と脂肪組織の増加、脂肪細胞の肥大と脂肪組織への炎症細胞浸潤の亢進、エネルギー代謝の低下などを示すことを明らかにしている。

(3) 脂肪細胞は、脂肪の貯蔵庫である白色脂肪細胞、エネルギー産生場である褐色脂肪細胞、褐色脂肪細胞に機能が類似したベージュ脂肪細胞の 3 種類に分類される。ミトコンドリア数の多い褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の形態維持や機能制御には脂肪細胞内の細胞骨格が関与することも報告されている。しかし、脂肪細胞における AM-RAMP2 系がこれらの脂肪細胞の形態維持と、ミトコンドリアによるエネルギー代謝制御に関与しているかはまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々は、脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) を用いて、脂肪細胞における AM-RAMP2 系の脂質代謝およびエネルギー代謝調節機構や、褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の分化制御における細胞骨格構造の役割、ミトコンドリアによるエネルギー代謝制御メカニズムを解明することにより、脂肪細胞の AM-RAMP2 系がメタボリックシンドロームの新たな治療標的となりうるか検討した。

3. 研究の方法

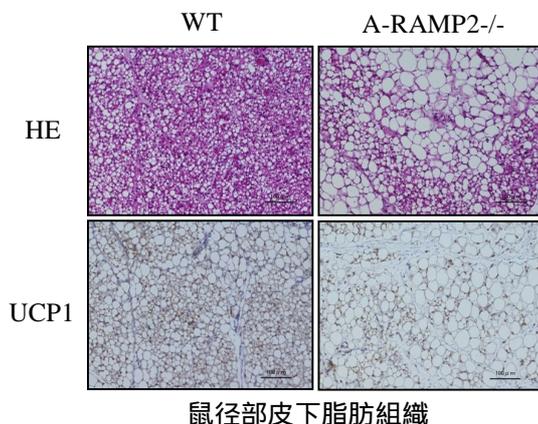
脂肪細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する aP2Cre トランスジェニックマウスと RAMP2 floxed マウスを交配して作成した、脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) を使用した。

普通食投与下の 5 週齢の雄マウスの褐色脂肪組織および鼠径部皮下脂肪組織を採取し、HE 染色および UCP1 免疫染色を行った。また、3D-Gene マイクロアレイ解析 (東レ) およびリアルタイム PCR による遺伝子発現解析 (ミトコンドリア関連遺伝子、細胞骨格関連遺伝子) を行った。

鼠径部皮下脂肪組織および褐色脂肪組織より前駆脂肪細胞を採取し、それぞれ褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞に分化誘導させ、リアルタイム PCR により遺伝子発現解析 (ミトコンドリア関連遺伝子) を行った。

4. 研究成果

マウスの鼠径部皮下脂肪組織は、若年期においてベージュ脂肪細胞を多く含む白色脂肪組織であるが、加齢とともにベージュ脂肪細胞が減少することが報告されている。A-RAMP2^{-/-} の体重増加が認められるのは、若年期の 5 週齢付近であることから、5 週齢の若年期の雄マウスの鼠径部皮下脂肪組織の解析を行った。その結果、HE 染色より、A-RAMP2^{-/-} は野生型マウス (WT) と比較してベージュ脂肪細胞が少なく、UCP1 免疫染色よりミトコンドリアの脱共役タンパク質である UCP1 の低下が見られた (下図)。



また、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析より、A-RAMP2^{-/-}の鼠径部皮下脂肪組織は野生型マウスと比較して、細胞骨格関連遺伝子であるアクチン、ミオシン、トロポニンの発現の低下が確認された。

褐色脂肪組織においてもリアルタイム PCR による遺伝子発現解析より、ミトコンドリア関連遺伝子である ATP synthase、COX IV、UCP1、細胞骨格関連遺伝子であるアクチン、ミオシン、トロポニンの発現低下が見られた。

次に、細胞骨格関連遺伝子の発現についてより詳細な遺伝子解析を行うため、3D-Gene マイクロアレイ解析（東レ）を行った。5 週齢の若年期の雄マウスの褐色脂肪組織および鼠径部皮下脂肪組織における細胞骨格関連遺伝子の発現を解析した。その結果、鼠径部皮下脂肪組織では、アクチン (Actc1、Acta1)、ミオシン (My11、My1pf)、トロポニン (Tnni1、Tnnt3) の発現が、A-RAMP2^{-/-}で野生型マウスと比較して顕著に低下していた。また、褐色脂肪組織では、アクチン (Actc1)、ミオシン (My11、My1pf)、トロポニン (Tncc1、Tnni1、Tnnt3) の発現が顕著に低下していた。これらの結果から、脂肪細胞の AM-RAMP2 系が細胞骨格構造の制御に関与することが示唆された。

さらに、脂肪細胞の分化における AM-RAMP2 系の関与を検討するため、褐色脂肪組織および鼠径部皮下脂肪組織より前駆脂肪細胞を採取し、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞にそれぞれ分化誘導後、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、分化させた褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞ともに、A-RAMP2^{-/-}で野生型マウスと比較して、ミトコンドリア関連遺伝子である UCP1、Cidea などの発現が低下していた。

以上の結果より、脂肪細胞の AM-RAMP2 系は褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の細胞骨格制御に関与し、脂肪細胞の分化やミトコンドリア機能を制御することにより、エネルギー代謝制御に関与することが示唆された。

本研究により、脂肪細胞の AM-RAMP2 系がミトコンドリアによるエネルギー代謝制御の視点から、メタボリックシンドロームの新たな治療標的となる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

Hirabayashi K, Tanaka M, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Dai K, Cui N, Wei Y, Nakamura K, Iida S, Matsui S, Yamauchi A, Murata T, Shindo T. Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Am J Pathol*, 189(2):449-466, 2019, 査読有, DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.10.021.

Sakurai T, Kamiyoshi A, Ohtsuka M, Gurumurthy CB, Sato M, Shindo T. Isolation and analysis of a genome-edited single-hepatocyte from a Cas9 transgenic mouse line. *Methods Mol Biol*, 1874:257-271, 2019, 査読有, DOI:10.1007/978-1-4939-8831-0_15.

Shindo T, Tanaka M, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Sakurai T. Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system. *Peptides*, 111:55-61, 2019, 査読有, DOI:10.1016/j.peptides.2018.04.004.

Liu T, Kamiyoshi A, Tanaka M, Iida S, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanaka M, Wei Y, Nakamura K, Matsui S, Yamauchi A, Shindo T. RAMP3 deficiency enhances postmenopausal obesity and metabolic disorders. *Peptides*, 110:10-18, 2018, 査読有, DOI:10.1016/j.peptides.2018.10.006.

Zhai L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Xian X, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanimura K, Liu T, Wei Y, Tanaka M, Tomiyama H, Yamauchi A, Igarashi K, Shindo T. Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline. *J Hypertens*, 36(4):876-891, 2018, 査読有, DOI:10.1097/HJH.0000000000001649.

Yamauchi A, Kamiyoshi A, Koyama T, Iinuma N, Yamaguchi S, Miyazaki H, Hirano E, Kaku T, Shindo T. Placental extract ameliorates non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by exerting protective effects on endothelial cells. *Heliyon*, 3(9):e00416, 2017, 査読有, DOI:10.1016/j.heliyon.2017.e00416.

Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Tanaka M, Koyama T, Kawate H, Yang L, Liu T, Imam A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Igarashi K, Yamauchi A, Shindo T. Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells. *Endocrinology*, 158(5): 1359-1372, 2017, 査読有, DOI:10.1210/en.2016-1531.

Liu T, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yang L, Tanaka M, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Igarashi K, Yamauchi A, Shindo T. Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice. *Endocrinology*, 158(5):1194-1206, 2017, 査読有, DOI:10.1210/en.2016-1510.

Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Hirabayashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Liu T, Xian X, Zhai L, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Yamauchi A, Murata T, Shindo T. Adrenomedullin suppresses vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability and inflammation in retinopathy. *Am J pathol*, 187(5):999-1015, 2017, 査読有, DOI:10.1016/j.ajpath.2017.01.014.

Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Owa S, Yamauchi A, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T. The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumor metastasis. *Cardiovasc Res*, 111(4):398-409, 2016, 査読有, DOI:10.1093/cvr/cvw166.

〔学会発表〕(計6件)

神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、平林一貴、戴昆、崔南奇、魏陽璇、田中正明、松井周平、中村啓成、飯田紫帆、山内啓弘、新藤隆行 RAMP3 deficiency enhances postmenopausal obesity and metabolic disorders 第83回日本循環器学会、2019

神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、田中愛、平林一貴、戴昆、崔南奇、田中正明、魏陽璇、劉騰、富山遥、中村啓成、飯田紫帆、松井周平、山内啓弘、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系による脂肪細胞の細胞骨格とエネルギー代謝制御機構 第39回日本肥満学会、2018

Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Tanimura K, Liu T, Tomiyama H, Matsui S, Yamauchi A, Shindo T. Regulation of cytoskeleton and energy metabolism of adipocytes by adrenomedullin-RAMP2 system 第82回日本循環器学会、2018

神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、翟留玉、平林一貴、田中正明、劉騰、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系による脂肪細胞の細胞骨格およびエネルギー代謝制御機構 第21回日本心血管内分泌代謝学会、2017

神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、田中愛、羨鮮、翟留玉、平林一貴、戴昆、崔南奇、田中正明、谷村圭哉、劉騰、富山遥、魏陽璇、山内啓弘、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系は褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の分化を制御する 第38回日本肥満学会、2017

神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、翟留玉、平林一貴、大和慎治、戴昆、崔南奇、劉騰、五十嵐恭子、山内啓弘、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系は褐色脂肪細胞の細胞分化とエネルギー代謝を制御する 第89回日本内分泌学会、2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。