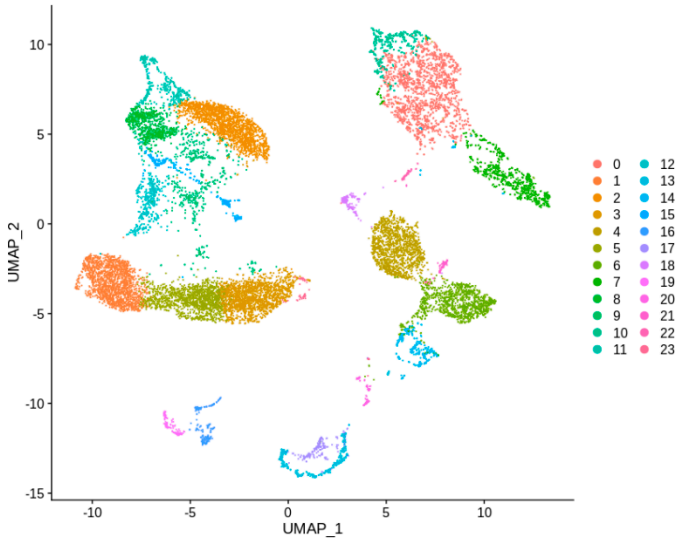
170　肥満によって生じるベージュ脂肪細胞の誘導抑制機構	池田　賢司

【目的】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、ましてや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、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。

【方法】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-seq 解析を行い、遺伝子プロファイルから細胞群を同定し脂肪前駆細胞のサブタイプを同定した。また肥満マウスに対して寒冷刺激を行いベージュ脂肪細胞が誘導されるか検討を行った。

【結果】脂肪組織のシングルセル解析を行ったところ、脂肪組織を構成する細胞である脂肪前駆細胞と各免疫細胞（B 細胞、T 細胞、マクロファージ）等が細胞集団として同定された。脂肪前駆細胞においては、想定されていた結果通り、複数の細胞集団が同定された。更に、それぞれの細胞集団に選択的に発現しているマーカー遺伝子を同定した。その結果、寒冷刺激によって特異的に出現する細胞集団を同定した。今後、肥満マウスから非肥満マウスと同様に脂肪組織間質細胞のシングルセル解析を行い、比較検討を行う。また同定した細胞群について詳細に検討する予定である。同定したマーカーを用いた細胞群の単離、転写因子の網羅的解析を行いベージュ脂肪細胞分化制御に関わる候補転写因子の同定を行う。

シングルセル RNA シークエンス解析による皮下脂肪組織の細胞集団の同定



170. 肥満によって生じるベージュ脂肪細胞の誘導抑制機構

池田　賢司

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

Key words：ベージュ脂肪細胞，肥満，脂肪細胞分化

緒　言

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［1］。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、ましてや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［2］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。

方法および結果

1. 脂肪組織のシングルセル調製

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［3］シングルセルに細胞調製を行った（図 1）。

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ったところ、脂肪組織を構成する細胞である脂肪前駆細胞と各免疫細胞（B 細胞、T 細胞、マクロファージ）等が細胞集団として同定された。更に、それぞれの集団に選択的に発現しているマーカー遺伝子を同定した。室温条件と寒冷刺激条件の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同定した（図 2）。脂肪前駆細胞においては、マーカーとして *Pdgfra* 遺伝子を発現する細胞集団が想定されていた結果通り、複数存在することが明らかとなった（図 3）。

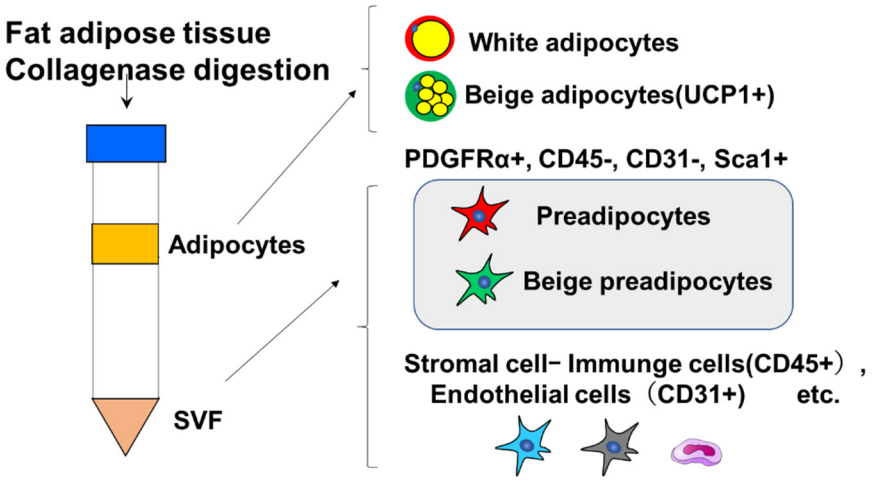


図 1. 脂肪組織のシングルセル調製

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製を行った。

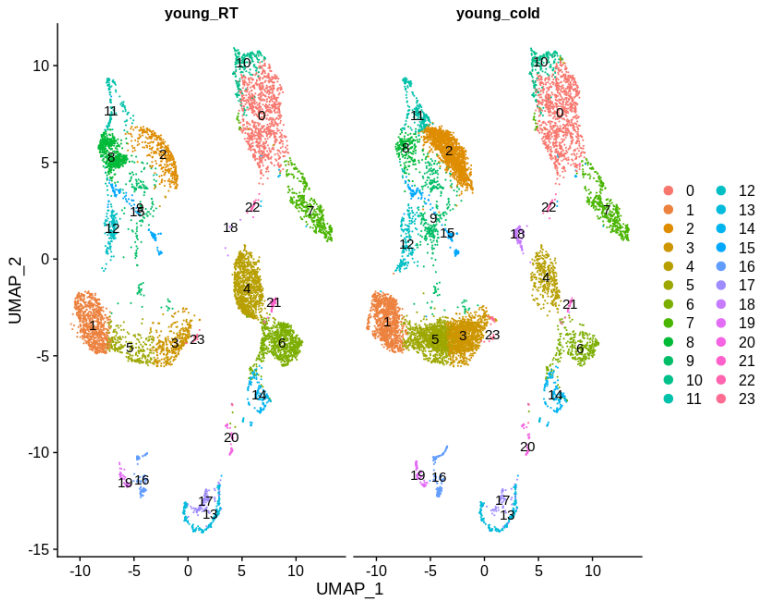


図 2. 寒冷刺激条件下で出現する細胞集団の同定

室温条件（左図）、寒冷刺激条件（右図）。クラスター9、18 が寒冷刺激条件下で出現する細胞集団である。

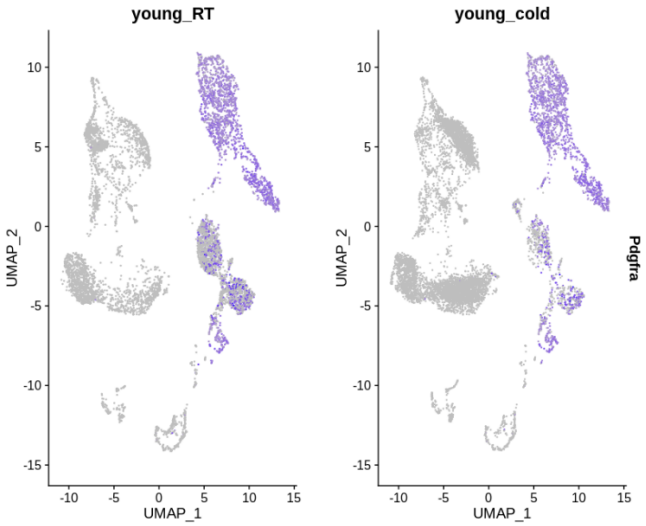


図 3. 脂肪前駆細胞の細胞集団の同定

室温条件（左図）、寒冷刺激条件（右図）脂肪組織細胞集団が多くの集団から構成されておりサブタイプが存在する。

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 4）。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。

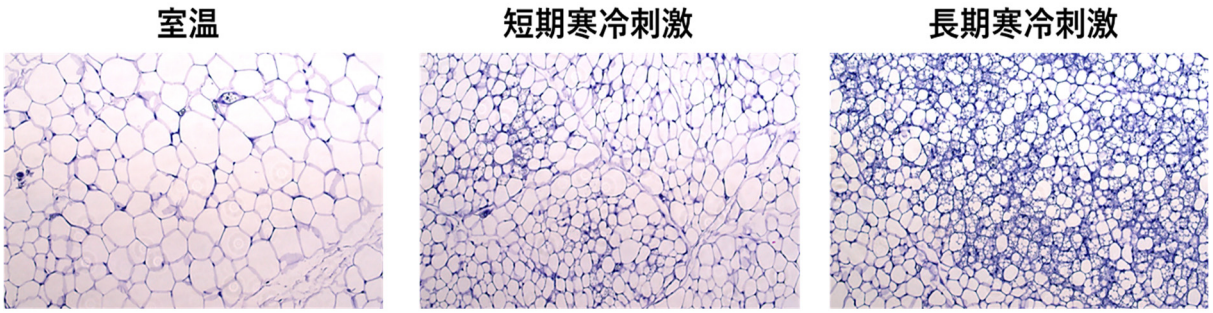


図 4. 肥満マウスにおけるベージュ脂肪細胞誘導の検討

室温条件（左図）、短期寒冷刺激（中央図）、長期寒冷刺激（右図）。肥満マウスではベージュ脂肪細胞は認められない。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。スケールバーは 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行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 の細胞調製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（70～100μm）ことである。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今後予定している。具体的には非肥満マウス、肥満マウスおよび寒冷刺激を行ったマウスについてそれぞれ細胞間相互作用を検討し、寒冷刺激によって誘導される細胞集団が具体的なシグナル（リガンドとレセプター）を特異的に発現しているのかを明らかにすることが可能と考えている。

1. ベージュ脂肪細胞誘導に重要な細胞集団の組み合わせ。
2. ベージュ脂肪細胞誘導に重要と考えられる細胞間シグナル（すなわち、リガンド発現細胞とレセプター発現細胞）。

を同定する。

同定したシグナルや細胞腫については FACS によるソーティング、共培養系を用いて細胞増殖、分化を詳細に検討する。シグナルについては、刺激薬、阻害薬およびレンチウイルスベクターを用いた遺伝子介入を行うことでベージュ脂肪細胞誘導へのシグナルの寄与度を検討する予定である。また ATAC-Seq によって同定した候補転写因子についての過剰発現及び遺伝子ノックダウンを行い、その役割を検証する予定である。

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。

共同研究者・謝辞

本研究の実施にあたり、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の山田哲也教授、多くの研究室員の方々の御支援を賜りました。深く御礼申し上げます。

文　献

1） Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. Trends Endocrinol Metab. 2018;29(3):191-200. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.001. PubMed PMID: 29366777; PubMed Central PMCID: PMCPMC5826798.

2） Chen Y, Ikeda K, Yoneshiro T, Scaramozza A, Tajima K, Wang Q, et al. Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state. Nature. 2019;565(7738):180-5. doi: 10.1038/s41586-018-0801-z. PubMed PMID: 30568302; PubMed Central PMCID: PMCPMC6328316.

3） Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. Nat Med. 2017;23(12):1454-65. doi: 10.1038/nm.4429. PubMed PMID: 29131158; PubMed Central PMCID: PMCPMC5727902.