

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580095

研究課題名 (和文) 脂肪細胞の過剰分化・肥大化を制御する転写因子 FOXO の新規作用メカニズム

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of FOXO which control excess differentiation and enlargement of adipocyte

研究代表者

坂本 和一 (SAKAMOTO KAZUICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90235169

研究成果の概要 (和文)：

マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を誘導し、活性酸素(H2O2)またはポリフェノール類 (レスベラトロール、カテキン等) の刺激に応じた脂肪細胞の過剰分化・肥大化の生理的、生化学的変化を解析した。その結果、活性酸素は脂肪細胞の分化と脂肪蓄積を誘導したが、種々のポリフェノールは逆に脂肪細胞の分化と脂肪蓄積を抑制した。同時に、転写因子 FoxO の発現や活性が大きく変化したことから、脂肪細胞の過剰分化や肥大化には FoxO サブタイプが関与する可能性が示唆された。本研究により、脂肪細胞の過剰な分化や肥大化の分子メカニズムの一端が明らかになり、生活習慣病の予防や改善に向けた道筋を開くことができるようになった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we analyzed the physiological functions and mechanisms on the excess development and enlargement of adipocyte, by using mouse 3T3L1. Our results revealed that oxidative stress induced the adipocyte development and fat accumulation, whereas some polyphenols suppressed the excess adipogenesis. Simultaneously, the expression and activity of FoxO changed drastically, suggesting that FoxO possibly play an important role in the excess development and enlargement of adipocyte. These data in this study revealed the molecular mechanism of excess adipogenesis, leading to the development of applicative study for protection and treatment of life style-related diseases in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞応答

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は、脂肪の蓄積ばかりでなく、生体の機能維持に不可欠なアディポカインの分泌器官としての働きを持つ。一方で、脂肪細胞の過剰な形成や肥大化は、脂肪細胞のインスリン抵抗性の喪失、アディポカインの分泌低下、脂肪酸代謝異常などを招き、肥満を始めとして高脂血症、糖尿病など生活習慣病の主たる原因となる。脂肪細胞は、間葉系細胞から各前駆脂肪細胞を経て分化する。脂肪細胞の分化は、主として分化初期に働く C/EBP- $\beta$  と分化後期に作用する PPAR- $\gamma$  とにより誘導・制御されており、これが一般的な定説と考えられていた。これに対して申請者らは、C/EBP や PPAR を介した誘導経路とは別に、フォークヘッド型転写因子 FOXO が脂肪細胞の分化に深く関わる事実を明らかにしてきた。FOXO には 1、3a、4 のサブタイプがあり、各々異なる活性制御の下で脂肪細胞の分化に異なる生理作用を示すと考えられる。そこで、申請者は脂肪細胞の分化や肥大化およびそれらの制御には、従来の転写因子経路とは別に FOXO を介したシグナル経路が積極的に関与すると考えるに至った。現在までに、FOXO を介した脂肪細胞の分化や肥大化の分子機構はほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

老化・寿命の調節タンパク質として知られる転写因子 FOXO に着目し、酸化ストレス刺激下で FOXO が脂肪細胞の過分化・肥大化にどのように関わるのか、さらに植物ポリフェノール類が FOXO シグナル経路を介して脂肪細胞の過分化や肥大化をどのように制御するのか、それらの生理作用と作用メカニズムを解明す

る。特に FOXO の選択的な活性変化に焦点を絞り、刺激に応じてどの FOXO サブタイプが活性化/抑制化され、どのシグナル経路を経て脂肪細胞の過分化や肥大化に関わるのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

前駆脂肪細胞株(白色系:マウス 3T3-L1 と HW 培養細胞株、褐色系:マウス HB 培養細胞株)を用い、インシュリン/Dex/IBMX 刺激により脂肪細胞への分化を誘導し、以下の解析法により、FOXO シグナル経路を介した脂肪細胞の分化制御メカニズムを明らかにする。なお分化した脂肪細胞は、脂肪滴蓄積 (Oil-red O 染色)、グルコース輸送 (Glut4 活性)、脂肪酸取込み (FATP 解析)、脂肪合成 (GPDH 活性)、アディポカイン分泌、各種分化マーカーの発現などにより解析する。

(1) 脂肪細胞の分化・肥大化に伴う FOXO の発現変化(坂本・院生(2名)) (2) FOXO の RNA 阻害による脂肪細胞の分化・肥大化への影響(坂本・院生(2名)) (3) FOXO の過剰発現による脂肪細胞分化・肥大化への影響(坂本・院生(2名)) (4) 脂肪細胞の分化・肥大化に伴う FOXO 応答遺伝子の同定(坂本・院生(3名)) (5) H2O2 刺激に応じた脂肪細胞の分化・肥大化(坂本・院生(2名)) (6) H2O2 刺激に応じた FOXO サブタイプの発現変化(坂本・院生(2名)) (7) H2O2 刺激に応じた FOXO サブタイプの修飾と局在(坂本・院生(3名)) (8) H2O2 刺激に応じた FOXO サブタイプの機能変化(坂本・院生(1名)) (9) H2O2 刺激による分化・肥大化のシグナルネットワーク(坂本・院生(4名))

### 4. 研究成果

マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を誘

導し、活性酸素(H2O2)またはポリフェノール類の刺激に応じた脂肪細胞の過分化・肥大化の生理的、生化学的变化を解析した。同時に転写因子 FOXO の各サブタイプの発現、修飾、機能性の変化を解析した。分化した脂肪細胞は、脂肪滴蓄積(Oil-red 染色/トリグリセリド量)、グルコース輸送(Glut4 活性)、脂肪酸取込み(FATP 活性)、脂肪合成(GPDH 活性)、アディポカイン産生、各種分化マーカーの発現などにより解析した。

H20 年(1) 3T3-L1 細胞に H2O2 を刺激程度(濃度、時間)を変えて作用させたところ、H2O2 の濃度と時間に依存して、脂肪蓄積量の増加が認められた。3T3-L1 細胞に種々のポリフェノール類を作用させたところ、細胞内における脂肪蓄積量が減少した。(2) FOXO 各サブタイプの発現変化を解析したところ、H2O2 刺激によりサブタイプの発現に変化が認められた。FOXO タンパク質のリン酸化と局在の変化を解析したところ、H2O2 刺激により FoxO のリン酸化の変化と細胞質移行が認められた。(3) FOXO の転写因子活性の変化を解析したところ、H2O2 刺激により FoxO の転写因子活性が低下した。

H21 年(1) 脂肪細胞の過分化および肥大化がポリフェノールの濃度や作用時間に依存して顕著に抑制された。(2) ポリフェノール類の刺激により、FOXO サブタイプの発現が、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで抑制された。ポリフェノール類の刺激により、FOXO サブタイプのタンパク質のリン酸化が増加し、転写因子活性が抑制された。(3) ポリフェノール類の刺激により、FOXO および SREBP1c の転写因子活性が著しく抑制された。

H22 年(1) 脂肪細胞の過分化および肥大化がポリフェノール(の濃度や作用時間に依存して顕著に抑制された。これらは、特に初期

分化を抑制した。加えて、ヒドロキシステイラゾールは成熟脂肪細胞の脂肪分解も促進した。

(2) ポリフェノールは細胞周期の進行を遅らせ、細胞増殖を抑制した。(3) ポリフェノールにより、FOXO と SREBP-1c の転写因子活性が抑制された(4) ポリフェノールは、インシュリンシグナル経路を活性化し、MEK/ERK 経路を不活化した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) Kazuichi Sakamoto, Hyojun Kim, Megumi Kurosu, Keita Tsuchiya, Ako Hiraishi and Ran Zhao (2011) (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation by disturbing the cell cycle at the clonal expansion, *ICOS (The International Conference on O-CHA Culture and Science)*, 4, 1-4 (査読有)
- 2) Masayoshi Kamon, Ran Zhao, Kazuichi Sakamoto (2010) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate suppressed the differentiation of murine osteoblast MC3T3-E1, *Cell Biology International*, **34**, 109-116 (査読有)
- 3) Takayuki Kojima, Takanari Norose, Keita Tsuchiya, Kazuichi Sakamoto (2010) Mouse 3T3-L1 cells acquire resistance against oxidative stress as the adipocytes differentiate via the transcription factor FoxO, *Apoptosis*, **15**, 83-93 (査読有)
- 4) Toshihisa Nomura, Makoto Horikawa, Satoru Shimamura, Teppei Hashimoto and Kazuichi Sakamoto (2010) Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1, *Genes and Nutrition*, **5**, 17-27 (査読有)
- 5) Makoto Horikawa and Kazuichi Sakamoto (2010) Polyunsaturated fatty acids are involved in regulatory mechanism of fatty acid homeostasis via daf-2/insulin signaling in *Caenorhabditis elegans*, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **323**, 183-192 (査読有)
- 6) Hyojung Kim, Ako Hiraishi, Keita Tsuchiya and Kazuichi Sakamoto (2010) (-) Epigallocatechin gallate suppresses the differentiation of 3T3-L1

- preadipocytes through transcription factors FoxO1 and SREBP1c, *Cytotechnology*, **62**, 245-255 (査読有)
- 7) Kazuichi Sakamoto, Kim Hyo Jung, Riadh Drira and Kazuhiko Kurokawa (2010) Physiological effects of polyphenols on differentiation of adipocyte and bone-metabolic cells, *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Edition, Tunisia-Japan Symposium on Society, Sciences and Technology (TJASSST) 2009: El Kantaoui Forum (Kantaoui Forum 10<sup>th</sup>)*, vol.10, 1-2, (査読有)
  - 8) Yasuo Miyaguchi, Keita Tsuchiya, Kazuichi Sakamoto (2009) P53 negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress, *J Cell Biology International*, **33**, 853-860 (査読有)
  - 9) Keisuke Munekata and Kazuichi Sakamoto (2009) Forkhead type transcription factor FOXO1 is essential for adipocyte differentiation, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **45**, 642-651 (査読有)
  - 10) Masayuki Izumi, Takashi Seki, Koh Iwasaki, and Kazuichi Sakamoto (2009) Chinese herbal medicine Yi-Gan-San decreases the lipid accumulation in mouse 3T3-L1 adipocytes by modulating the activities of transcription factors SREBP-1c and FoxO1, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **219** (9), 53-62 (査読有)
  - 11) Makoto Horikawa and Kazuichi Sakamoto (2009) Fatty Acid Metabolism is Involved in Stress Resistance Mechanisms of *Caenorhabditis elegans*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **390**, 1402-1407 (査読有)
  - 12) Kazuichi Sakamoto, Masayoshi Kamon, Kim Hyo Jung, Riadh Drira, Shu Chen, Ako Hiraishi and Kazuhiko Kurokawa (2009) Physiological effects of polyphenols on differentiation of adipocyte and bone-metabolic cells, *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Edition, Tunisia-Japan Symposium on Society, Sciences and Technology (TJASSST) 2008: El Kantaoui Forum (Kantaoui Forum 9<sup>th</sup>)*, vol.9, 16-21 (査読有)
  - 13) Makoto Horikawa, Toshihisa Nomura, Teppei Hashimoto, Kazuichi Sakamoto (2008) Elongation and desaturation of fatty acids are critical in growth, lipid metabolism, and ontogeny of *Caenorhabditis elegans*, *J. Biochem.*, **144**, 149-158 (査読有)
  - 14) Kazuichi Sakamoto, Munekata K, Kurokawa K (2008) Forkhead Transcription Factor FOXO is Essential for Adipocyte Differentiation, *FEBS Journal*, **275**, 90-90, suppl.1 (査読有)
- [学会発表] (計 20 件)
- 1) Hisatsugu Uchiyama, Kazuhiko Kurokawa, Hyojung Kim, Kazuichi Sakamoto, Red grape polyphenol suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte, BMB2010、2010年12月8日、神戸国際会議場
  - 2) Ako Hiraishi, Kazuichi Sakamoto, Effects of hormonal secretion by differentiation and cell aging of mouse 3T3-L1 preadipocytes, BMB2010、2010年12月8日、神戸国際会議場
  - 3) Ran Zhao, Masayoshi Kamon, Kazuichi Sakamoto, (-)-Epigallocatechin gallate inhibited differentiation of osteoclast through the downregulation of RANK expression, BMB2010、2010年12月8日、神戸国際会議場
  - 4) Riadh Drira, Kazuichi Sakamoto, Hydroxytyrosol stimulated lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, BMB2010、2010年12月8日、神戸国際会議場
  - 5) Takayuki Kojima, Takanari Norose, Keita Tsuchiya, Kazuichi Sakamoto, Oxidative stress resistance increased along with differentiation of 3T3-L1 adipocytes through transcription factor FoxO, BMB2010、2010年12月8日、神戸国際会議場
  - 6) Kazuichi Sakamoto, Hyojun Kim, Keita Tsuchiya, Ako Hiraishi, Megumi Kurosu, Ran Zhao, (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation by disturbing the cell cycle at the clonal expansion, ICOS2010、2010年10月27日、グランシップ静岡
  - 7) 泉正之, 関隆志, 岩崎鋼, 八重樫伸生, 坂本和一、脂肪細胞 3T3-L1 における抑肝散 (漢方薬) の脂質代謝作用と作用メカニズムの解析、32 回日本分子生物学会、2009年12月10日、パシフィコ横浜
  - 8) 小島貴之、野呂瀬貴也、土谷恵太、坂本和一、マウス 3T3-L1 細胞は脂肪細胞への分化に伴いFoxOを介して酸化ストレスに対する耐性を獲得する、32 回日本分子生物学会、2009年12月10日、パシフィコ横浜
  - 9) Riadh DRIRA and Kazuichi SAKAMOTO, Oleuropein and Hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1

- cells, 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜
- 10) Ran Zhao, Masayoshi Kamon, Kazuichi Sakamoto, (-)-Epigallocatechin gallate inhibited differentiation of osteoclast through the downregulation of RANK expression, 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜
  - 11) 平石吾子、坂本和一、活性酸素による細胞の脂肪蓄積および肥大化の制御作用の解析、32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜
  - 12) 金孝貞、平石吾子、坂本和一、緑茶カテキンによる脂肪細胞 3T3-L1 の分化抑制作用の解析、32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜
  - 13) Kazuichi SAKAMOTO, Hyo Jung KIM, Riadh DRIRA and Kazuhiko KUROKAWA、Physiological effects of polyphenols on lipid accumulation and differentiation of adipocyte、TJASST2009、2009 年 11 月 12 日、チュニジア
  - 14) 坂本和一、加門正義、金孝貞、Riadh Drira、趙然、ポリフェノールによる細胞の代謝機能制御のメカニズム：骨代謝と脂質代謝、日本動物細胞工学会 2009、2009 年 7 月 25 日、つくば国際会議場
  - 15) Kim Hyo Jung, Ako Hiraishi, Kazuichi Sakamoto, Green tea polyphenol suppress the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, 日本動物細胞工学会 2009、2009 年 7 月 24 日、つくば国際会議場
  - 16) Riadh Drira, Kazuichi Sakamoto、Oleuropein and Hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場
  - 17) 加門正義、坂本和一、緑茶ポリフェノール EGCG はマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を抑制した、BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場
  - 18) 金孝貞、坂本和一、緑茶カテキンによる脂肪細胞 3T3-L1 の分化抑制作用の解析、BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場
  - 19) Keita Tsuchiya、Takayuki Kojima、Kazuichi SAKAMOTO、Regulation of transcriptional activity of FOXO by dose dependent oxidative stress、BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場
  - 20) Kazuichi Sakamoto, Kim Hyo Jung, Masayoshi Kamon, Kazuhiko Kurokawa、Physiological effects of tea

polyphenol on differentiation of adipocyte and osteoblast, TJASST2008、2008 年 11 月 10 日、チュニジア

〔図書〕(計 1 件)

坂本和一 (共著) (2010) 線虫を用いた抗肥満作用分子の選択・解析法-開発とその応用 -Application of *C. elegans* as model animal for screening and analysis of anti-obesity substances, 肥満症(第 2 版)、日本臨床社、2010 年 2 月、339-342 (査読有)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 和一 (SAKAMOTO KAZUICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90235169