

【要約】

Role of transcription factor *Tcf21* in adipocyte progenitor cells of
visceral fat

(内臓脂肪前駆細胞における転写因子 Tcf21 の役割)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手幸太郎教授)

南塚 拓也

【背景・目的】

内臓脂肪蓄積はインスリン抵抗性や2型糖尿病の基盤病態であり、脂肪前駆細胞の維持と分化の機序解明は重要な課題である。転写因子 Tcf21 は内臓脂肪で高発現するが、その他の白色脂肪や褐色脂肪には発現しない。Tcf21 は basic-helix-loop-helix (bHLH) 転写因子であり、心臓、肺、腎臓などの臓器発生に重要である。また Tcf21 は糖尿病性腎症の炎症などいくつかの病態において重要な役割を担うことが知られている。特に冠動脈においては、Tcf21 が冠動脈疾患のリスクアレルであることが GWAS 研究より報告され、動脈硬化性プラーク表面の線維性被膜形成とその安定化に重要であることが示されている。一方で、Tcf21 の脂肪細胞分化や脂肪組織の慢性炎症における役割は未解明である。

そこで我々は Tcf21 の内臓脂肪組織における役割について解明することを本研究の目的とした。

【方法】

雄マウスの精巢上体脂肪からコラゲナーゼを用いて stromal vascular fraction (SVF) を分離し、magnetic activated cell sorting (MACS) により Sca1 陽性、CD31 陰性、CD45 陰性の分画を単離することで、脂肪前駆細胞を得た。

ドキシサイクリン (DOX) 誘導性に Tcf21 を過剰発現する脂肪前駆細胞株の 3T3-L1 を作成し、脂肪分化並びに炎症性サイトカインの発現変化について検討した。

従来型の Tcf21 KO マウスは主要臓器に奇形が生じ出生直後に死亡に至るため、ROSA26-rtTA/tetO-Cre/Tcf21lox/LacZ の全てのアレルを有し、出生後 DOX 誘導性に Tcf21 を欠損させる inducible Tcf21 KO (iKO) マウスを作成した。出生直後と成熟個体において Tcf21 欠損を誘導することで、脂肪組織の発生ならびに慢性炎症における役割について検討した。

【結果】

1. Tcf21 の局在および制御因子の検討

Tcf21^{LacZ/+}マウスの脂肪を用いた X-gal 染色ならびに Sca1 を標識とした脂肪前駆細胞の単離実験により、Tcf21 は血管壁の脂肪前駆細胞に局在することが判明した。野生型マウスに高脂肪食を投与すると、Tcf21 の mRNA 発現は低下した。さらに、3T3-L1 細胞に脂肪分化を誘導すると Tcf21 の mRNA 発現が低下した。Tcf21 を制御する因子について検討するため、3T3-L1 細胞へ添加実験を行うと、インスリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メ

チルクサンチン、BMP-4、ロシグリタゾンの添加により Tcf21 の mRNA 発現は低下し、パルミチン酸、IL-1 β 、リポポリサッカライドの添加によりわずかに上昇した。これらの結果より、Tcf21 は血管壁の脂肪前駆細胞に局在し、脂肪分化により発現が低下すると考えられた。

2. Tcf21 過剰発現 3T3-L1 細胞の解析

3T3-L1 細胞において Tcf21 を過剰発現させると細胞増殖が抑制され、この知見は癌抑制遺伝子としての既報と合致していた。加えて、3T3-L1 細胞において脂肪分化誘導を行ったところ、Tcf21 の過剰発現により Oil red O 染色および Pparg および Cebpa の mRNA 発現で確認される脂肪分化が抑制されることが判明した。Tcf21 過剰発現を脂肪分化誘導初期 (day-2~3) および後期 (day7~12) に行ったところ、初期の過剰発現のみが脂肪分化抑制をもたらしており、Tcf21 は脂肪分化の初期に分化を抑制すると考えられた。

また、3T3-L1 細胞と、マウスのマクロファージ由来細胞株である RAW264 の共培養により誘導される Il1b, Nos2, Mcp1 といった炎症関連遺伝子の発現上昇は、Tcf21 過剰発現により完全に抑制された。同様の現象は 3T3-L1 細胞の培養上清を RAW264 脂肪へ添加、および RAW264 細胞の培養上清を 3T3-L1 細胞へ添加した際にも確認され、Tcf21 は炎症保護的に働き、この反応は液性因子を介すると考えられた。

3. Tcf21 ノックアウトマウスの解析

マウスにおいて 0~3 週齢に DOX により Tcf21KO を誘導し、脂肪組織の発生への影響を検討した。すると、Tcf21iKO 群では精巣上体脂肪重量が減少し、SVF を MACS でソート後の脂肪前駆細胞数も減少していた。体重、空腹時血糖、腹腔内ブドウ糖負荷試験におけるブドウ糖注射後の血糖、インスリン低血糖試験におけるインスリン投与後の血糖、血中インスリン値は Tcf21iKO 群で低値であった。

一方で、6 週齢以降の Tcf21iKO を誘導したところ、体重、精巣上体脂肪重量は不変であった。統計学的に有意差はないものの、空腹時血糖、血中インスリン値、マクロファージが壊死脂肪組織を取り囲む構造である crown like structure が Tcf21iKO 群で上昇傾向であった。また、精巣上体脂肪組織における Il6, Il1b, Cxcl10 など炎症関連遺伝子の mRNA 発現が Tcf21iKO 群で上昇しており、in vitro における Tcf21 の炎症抑制作用を裏付ける所見であった。

【考察】

本研究は転写因子 Tcf21 の内臓脂肪組織におけるメカニズムについて検討したものである。局在と制御因子について検討したところ、Tcf21 は血管壁の脂肪前駆細胞に局在し、脂肪分化誘導因子により発現が低下すると考えられた。Tcf21 過剰発現 3T3-L1 細胞を用いた検討から、Tcf21 は脂肪分化の初期に Cebpa と Pparg の mRNA 発現を低下させ脂肪分化を抑制することが判明した。マクロファージとの共培養実験では、Tcf21 が抗炎症作用を有することが明らかとなった。Tcf21iKO マウスを用いた検討からは、脂肪組織の発生において Tcf21 が脂肪前駆細胞数を制御すること、一方で成熟後の脂肪組織においては *in vitro* の解析と同様に炎症保護的に働いていることが判明した。

以上より、過食などの脂肪分化誘導刺激による Tcf21 の抑制が、脂肪分化のトリガーとなり内臓脂肪の蓄積をもたらし、また脂肪組織の慢性炎症を促進する可能性が考えられた。Tcf21 を維持する治療がメタボリックシンドロームの潜在的な治療標的として期待できると考えられた。