

## 脂肪組織における時計遺伝子 *Nfil3* の新規生物作用の解明と 時計遺伝子を標的とする創薬に向けた基盤研究

研究代表者：平居貴生（医療生命薬学研究ユニット）

健康長寿社会の実現に向けて、国民の健康寿命の延伸が必要不可欠である。生物の生命活動は約24時間周期の体内リズム（体内時計）によって支配されており、そのリズムを制御しているのが時計遺伝子である。近年、肥満や糖尿病、高血圧症などの生活習慣病の発症に時計遺伝子が関与するという報告がある。また、時計遺伝子を標的とした化合物である合成 *Rev-erb* リガンドは、高脂血症や高血糖が改善され、代謝疾患の治療に有効である可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。しかしながら、①脂肪細胞分化制御における時計遺伝子の詳細な役割の解明、あるいは、②時計遺伝子を標的とした薬剤が明らかな薬理効果を確認するに至った研究報告はない。

本研究では、時計遺伝子による脂肪細胞分化制御機構の一端を明らかにする目的で、時計遺伝子 *Rev-erbs* によって制御される転写因子 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated (*Nfil3*) に焦点を絞って、概日リズムを制御する時計遺伝子 *Nfil3* の新規生物作用を明らかにすることによって、時計遺伝子を標的とした生活習慣病に対する新しい治療理論構築に向けた有用な情報基盤を蓄積することを目的とした。具体的には、(1) 脂肪組織における時計遺伝子 *Nfil3* の新規機能の解明と脂肪細胞の細胞分化制御における時計遺伝子の役割を明らかにする。また、(2) 時計遺伝子 *Rev-erb* の天然物由来新規アゴニストの探索を試みた。

### 1) 脂肪組織における時計遺伝子 *Nfil3* の新規機能

本研究では脂肪組織における時計遺伝子の機能的役割について検討するために、培養脂肪細胞、*Nfil3* 遺伝子欠損マウスを用いて、下記の研究を行った（担当：平居）。

- ① 白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞分化における時計遺伝子 *Nfil3* の機能解析
- ② *Nfil3* 遺伝子欠損マウスを用いた解析

脂肪組織は白色脂肪組織と褐色脂肪組織に大別されるが、白色脂肪組織は、アディポネクチンといった生理活性物質を分泌し、代謝等を制御する主要な内分泌臓器である。一方、褐色脂肪組織は熱産生を行い、体温の維持や代謝の制御に寄与する。よって、本研究では、白色脂肪細胞における時計遺伝子 *Nfil3* の機能解析のために、マウス胚細胞由来間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞、およびマウス鼠蹊部白色脂肪組織由来の白色脂肪前駆細胞を用いて、*Nfil3* の脂肪細胞分化への影響について解析した。C3H10T1/2 細胞に対して、siRNA 法を用いて *Nfil3* をノックダウンした後、Oil Red O 染色による脂肪蓄積能の測定および、定量的リアルタイム PCR 法による脂肪細胞関連遺伝子の変動を測定し、細胞分化へ影響について検討した。その結果、siRNA 法を用いて *Nfil3* をノックダウンした C3H10T1/2 細胞では、コントロール細胞に比して、アディポネクチン遺伝子 (*Adipoq*)、fatty acid binding protein 4 (*Fabp4*)、脂肪性トリグリセリドリパーゼ遺伝子 (*PNPLA2*)、脂肪酸合成酵素遺伝子 (*Lipe*) の有意な減少が確認された。同様に、マウス白色脂肪組織由来の白色脂肪前駆細胞を用いた解析において、*Nfil3* ノックアウトマウスから調整した白色脂肪前駆細胞では、対照細胞に比して脂肪蓄積の著名な減少が観察された。また、*Adipoq*、*Fabp4*、*PNPLA2*、あるいは *Lipe* 遺伝子の有意な減少が確認された。したがって、時計遺伝子 *Nfil3* は、白色脂肪細胞の細胞分化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

### 2) 脂肪細胞褐色化における時計遺伝子 *Nfil3* の機能解析

近年、寒冷刺激によって誘導される、熱産生を行う褐色脂肪細胞とは由来の異なる褐色脂肪様細胞「ベージュ脂肪細胞」が見出され、褐色脂肪細胞と同様に、肥満・生活習慣病の治療標的とし

て関心が高まっている。また、寒冷刺激はベージュ細胞数を増加するなど、脂肪前駆細胞からの脂肪細胞の分化、あるいは脂肪細胞新生は、生体における恒常性の維持にも重要な役割を果たす。すなわち、脂肪前駆細胞の細胞分化を制御する機構の理解は、肥満改善に向けた新たな治療理論の構築に重要である。よって、次に、C3H10T1/2細胞および、マウス白色脂肪組織由来の褐色脂肪様細胞分化を制御における時計遺伝子 *Nfil3* の役割について検討した。C3H10T1/2細胞に対して、siRNA法を用いて *Nfil3* をノックダウンした後、褐色脂肪細胞分化培地を用いて培養した。培養4日目の細胞から total RNA を回収し、定量的リアルタイム PCR 法による褐色脂肪細胞関連遺伝子を測定し、細胞分化へ影響について検討した。その結果、siRNA法を用いて *Nfil3* をノックダウンしたC3H10T1/2細胞では、コントロール細胞に比して、*Pparg1a*、*FGF21* の有意な増加が確認された。同様に、マウス鼠蹊部白色脂肪組織由来の褐色脂肪様細胞を用いた解析において、*Nfil3* ノックアウトマウスから調整した褐色脂肪様細胞では、対照細胞に比して *Ucp-1*、*Pparg1a*、*FGF21* の有意な増加が確認された。また、*Nfil3* の標的分子である *Bmp4* 遺伝子の有意な増加が、*Nfil3* ノックアウト由来褐色脂肪細胞において確認された。以上の結果から、時計遺伝子 *Nfil3* は褐色脂肪細胞の細胞分化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、*Nfil3* は白色脂肪細胞の細胞分化を正に制御するが、脂肪前駆細胞からの褐色脂肪細胞への分化を抑制する可能性が示唆され、これら制御機構には *Bmp4* が関与する可能性が示唆される。

以上の細胞レベルでの研究成果を基に、個体レベルでの解析、異なった視点からのより複合的なアプローチに発展させるため *Nfil3* 遺伝子欠損 (KO) マウスを中心に解析した。高脂肪食摂取肥満モデルマウスへの *Nfil3* KO の影響について検討した結果、高脂肪食摂取肥満モデルマウスにおいて観察された体重の増加、あるいは脂肪組織の重量の増加は、*Nfil3* KO では有意に抑制されることが明らかとなった。すなわち、*Nfil3* 発現低下による細胞分化抑制あるいは細胞脂肪褐色化が、こ

れら表現型に関与する可能性が示唆される。以上の結果から、時計遺伝子 *Nfil3* が脂肪細胞分化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、培養褐色脂肪細胞に対する核内受容体 *Rev-erb* の合成アゴニスト GSK4112 刺激によって、*Nfil3* の発現低下に伴う *Ucp-1*、*Pparg1a* の有意な発現増加を確認している。現在、漢方方剤常用生薬、薬用植物抽出エキスを用いたスクリーニングによって、時計遺伝子 *Nfil3* の発現に対して抑制的に作用するような新規 *Rev-erb* アゴニストの探索を試みることによって、時計遺伝子を標的とした肥満や糖尿病改善薬の創出の可能性について検討中である。さらに、生活習慣病だけでなく、各種疾患に対する新規 *Rev-erb* アゴニストの有効性を講座横断型研究や連携型研究を通じて検証するための基盤研究となることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) Solt, L.A., Wang, Y., Banerjee, S., Hughes, T., Kojetin, D.J., Lundasen, T., Shin, Y., Liu, J., Cameron, M.D., Noel, R., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., Butler, A.A., Kamenecka, T.M., Burris, T.P. *Nature*, **485**, 62-68 (2012).

#### 【謝辞】

愛知学院大学医療生命薬学研究所 医療生命薬学助成により、本研究を実施できましたことに感謝申し上げます。

#### 【研究成果発表】

##### 学会発表

1. 平居 貴生、高木 三千代、中島 健一、井上 誠：脂肪組織の褐色化に作用する天然物の探索とその制御機構の解析. 日本薬学会第138年会一般シンポジウム「体性幹細胞の機能制御による疾患治療の新たな展望」、2017年3月(石川)