

脱分化脂肪細胞の誘導及び維持における 1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の効果

水島優介^{1,2)}, 石澤通康¹⁾, 風間智彦³⁾, 松本太郎³⁾, 池田和正²⁾, 横島 誠¹⁾

Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on induction and maintenance of mouse dedifferentiated fat cells

Yusuke MIZUSHIMA^{1,2)}, Michiyasu ISHIZAWA¹⁾, Tomohiko KAZAMA³⁾,
Taro MATSUMOTO³⁾, Kazumasa IKEDA²⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

要旨

ビタミンDシグナルは、カルシウム代謝の他、細胞の増殖・分化、代謝、免疫など様々な生理機能に関与する。ビタミンD受容体(VDR)の欠損マウスやVDRリガンドを用いた研究によって、ビタミンDシグナルが脂肪細胞の分化に関与することが示されている。本研究において、脱分化脂肪細胞(DFAT)の誘導及び維持におけるビタミンDシグナルの影響を検討した。VDRリガンドとして機能する活性型ビタミンD₃(1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃)は、マウス皮下脂肪細胞のDFATへの誘導及びDFATの増殖を抑制し、未分化細胞マーカーであるNanog及び山中4因子の発現にも影響を与えた。本研究結果はDFATの脱分化メカニズムの解明に有用な情報であり、高効率なDFATへの脱分化手法の開発に役立てることができる。

1. 背景

核内受容体スーパーファミリーは、ステロイドホルモン、レチノイン酸、活性型ビタミンD₃などの受容体の一群であり、ヒトにおいて48種類存在し、種々の細胞機能調節に関わっている¹⁾。核内受容体とinduced pluripotent stem (iPS)細胞との関連性について、iPS細胞誘導において核内受容体LRH-1が山中4因子の一つOct4の代わりになること、LRH-1とレチノイン酸受容体RAR γ の導入はiPS細胞誘導の期間を短縮すること、核内受容体ERR β が山中4因子のうちOct4とSox2と相互作用することが報告されている²⁻⁴⁾。脂肪細胞の発生・分化に関して、レチノイン酸が抑制的に働き、活性型ビタミンD₃が促進的に働くことが報告されている^{5,6)}。

脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell; DFAT)は、脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養によって脱分化させた多分化能細胞である⁷⁾。脂肪細胞への分化やiPSの誘導などに比較し、DFATの誘導及び維持メカニズムには不明な点が多い。本研究では、DFATの誘導及び脱分化後の維持に対する

ビタミンDシグナルの影響を検討した。

2. 結果

DFATへの脱分化は、10週齢から12週齢のオスC57BL/6Jマウスより皮下脂肪を採取、コラゲナーゼ処理によって成熟脂肪細胞(mature adipocyte; MA)を単離し、培養フラスコ内にて天井培養を行うことで誘導した⁷⁾。MAは播種から1週間後までに天井に接着し、分裂を始める。このとき、MAから非対称分裂によって増殖する線維芽細胞様の形態の細胞がDFATである。天井培養開始の際に100nM活性型ビタミンD₃(1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃; 1,25(OH)₂D₃)を添加したMAでは、総数に違いはみられなかったものの、DFATに脱分化する細胞数が少なかった(図1)。1週間後の細胞よりRNA抽出を行い、リアルタイムPCR法にて脂肪細胞のマーカー分子、山中因子、Nanogの発現変化を評価した。脂肪細胞のマーカー分子であるperoxisome proliferator activated receptor γ 2 (Ppar γ 2), CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α), C/EBP β のmRNAレベ

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 日本大学生物資源科学部応用生命科学科

3) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

横島 誠: makishima.makoto@nihon-u.ac.jp

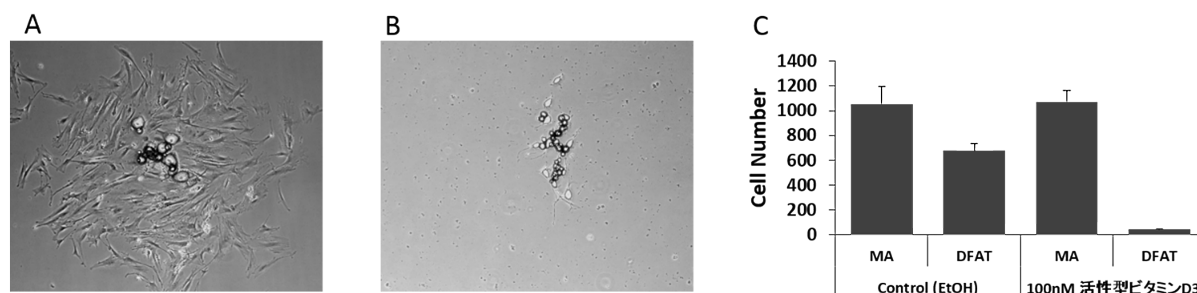


図1 天井培養から1週間後の天井培養細胞の形態及び細胞数
マウス皮下脂肪より成熟脂肪細胞 (MA) を単離し, (A) 溶媒コントロール添加培地又は (B) 100nM 活性型ビタミンD₃添加培地にて天井培養を行い, 1週間後の細胞形態を撮影し, (C) 細胞数を測定した。

ルは, MAで高発現しており, DFATへの脱分化過程で減少したが, 1,25(OH)₂D₃添加培地では発現減少が軽微であった。興味深いことに山中4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 及びNanogのmRNAレベルはいずれもDFATへの脱分化過程で発現が減少し, 活性型ビタミンD₃添加培地では減少が軽微, 又はMAよりも発現増加が認められた。

天井培養から2週間が過ぎると, DFATは通常培養が可能になる。DFATに対して100nM 1,25(OH)₂D₃処理を行い, 生細胞数をMTT assayにて評価した。溶媒コントロール, 薬剤処理いずれにおいても0日目に比べて生細胞数は増加するものの, 3日目までに活性型ビタミンD₃処理によって生細胞数の増加量の減少が認められ, 細胞増殖能が抑制されることが示唆された。活性型ビタミンD₃処理による脂肪分化マーカー分子, 山中因子, Nanogに対する影響を評価したところ, 1,25(OH)₂D₃処理24時間, 48時間ではPpar γ 2レベルに影響はなく, C/EBP α , C/EBP β はDFATへの脱分化過程と同様に発現増加が認められた。山中因子であるOct3/4, Sox2, c-Mycは薬剤処理24時間後でのみ発現増加が認められ, Klf4はむしろ発現が減少した。Nanogの発現には変化は認められなかった。

3. 考 察

本研究より, 1,25(OH)₂D₃は, DFATの誘導及び維持に, 抑制的に作用した。興味深いことに, 山中4因子及びNanogの発現レベルに対して影響を与えたが, 脱分化の形態変化と一致しない変化であり, その生物学的意義については今後の課題である。我々の研究室では, VDRアンタゴニストの開発を

行っているが⁸⁾, DFATの誘導や維持を促進させる効果が期待できる。VDR以外の核内受容体リガンドによるDFAT誘導・維持への影響も検討中である。

文 献

- 1) Makishima M (2005) Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* 97: 177-183.
- 2) Heng J-CD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, et al. (2010) The Nuclear Receptor Nr5a2 Can Replace Oct4 in the Reprogramming of Murine Somatic Cells to Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 6: 167-174.
- 3) Wang W, Yang J, Liu H, Lu D, Chen X, et al. (2011) Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18283-18288.
- 4) Festuccia N, Osorno R, Halbritter F, Karwacki-Neisius V, Navarro P, et al. (2012) Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene that Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 11: 477-490.
- 5) Berry DC, Noy N (2009) All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor β and Retinoic Acid Receptor. *Mol Cell Biol* 29: 3286-3296.
- 6) Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ (2012) 25-hydroxyvitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS ONE* 7: e52171.
- 7) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 215: 210-222.
- 8) Inaba Y, Yamamoto K, Yoshimoto N, Matsunawa M, Uno S, et al. (2007) Vitamin D₃ derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. *Mol Pharmacol* 71: 1298-1311.