

博 士 論 文

白色脂肪組織特異的 amphiregulin 過剰発現マウスの作製、  
および形質の解析

平成 30 年 3 月

広島大学大学院 生物圏科学研究科

楊 波

博 士 論 文

白色脂肪組織特異的 amphiregulin 過剰発現マウスの作製、  
および形質の解析

平成 30 年 3 月

広島大学大学院 生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

楊 波

## 目 次

目 次	1
略 号	2
緒 言	5
本研究の目的、および構成	11
第一章 肥満白色脂肪組織において発現量が増加する AREG 遺伝子の単離	
1-1 序論	12
1-2 研究材料、および実験方法	15
1-3 実験結果	23
1-4 考察	25
1-5 図表	28
第二章 白色脂肪組織特異的 AREG 過剰発現マウスの作製、および形質の解析	
2-1 序論	35
2-2 研究材料、および実験方法	40
2-3 実験結果	55
2-4 考察	60
2-5 図表	64
総合考察	87
引用文献	89
謝 辞	100

## 略号 (Non-standard Abbreviation and Acronyms)

以下に本論文に記載する略号を示す

ACE, angiotensin converting enzyme

APS, ammonium peroxodisulfate

APs, adipocyte progenitors

AREG/Areg, amphiregulin

AREG-Tg, Areg transgenic

ATF, activating transcription factor 2

BAT, brown adipose tissue

BMI, body mass index

BMPs, bone morphogenic proteins

BPB, bromophenol blue

BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine

Brown like adipocyte (Brite adipocyte)

cAMP, cyclic adenosine monophosphate

CCR2, C-C chemokine receptor type 2

cDNA, complementary deoxy ribonucleic acid

DAI, disease activity index

dH<sub>2</sub>O, distilled water

DMEM, dulbecco's modified eagle medium

dNTP, deoxynucleotide triphosphate

DSS, dextran sulfate sodium

DTT, dithiothreitol

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

EGF, epidermal growth factor

EGFR, epidermal growth factor receptor

Egr, early growth response protein

Emr-1, EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1

EtOH, ethanol

eWAT, epididymal white adipose tissue

FBS, fetal bovine serum

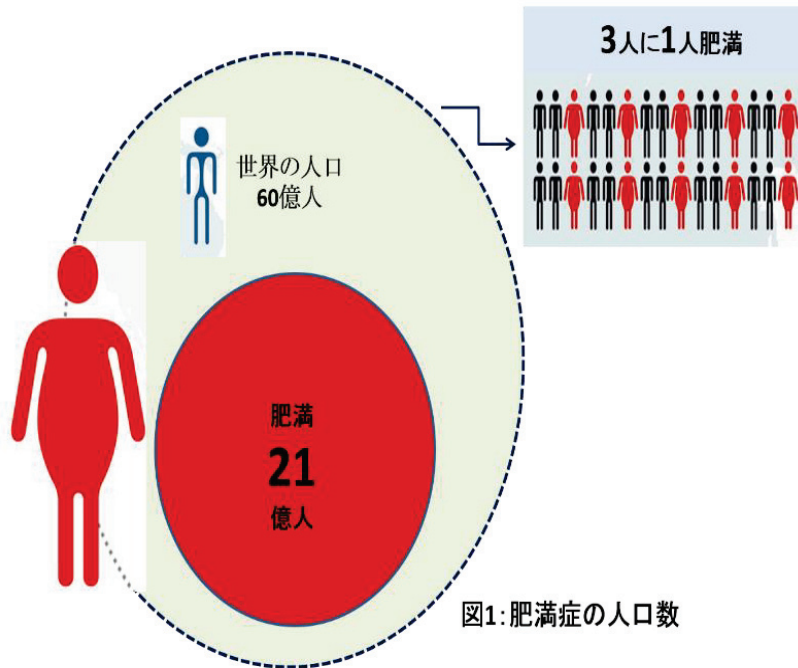
FFA, free fatty acid  
FGF, fibroblast growth factor  
GTT, glucose tolerance test  
HFD, high fat diet  
IBD, inflammatory bowel disease  
IGF-1, insulin like factor 1  
IL, interleukin  
IL-6, interleukin-6  
INF- $\gamma$ , interferon gamma  
LPS, lipopolysaccharide  
MAPK, mitogen activated protein kinases  
MCP-1, monocyte chemotactic protein 1  
MEFs, mouse embryonic fibroblasts  
MMLV-RT, moloney murine leukemia virus reverse transcriptase  
MSC, mesenchymal stem cells  
Msr-1, macrophage scavenger receptor 1  
ND, normal diet  
PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1  
PBS, phosphate buffered saline  
PCR, polymerase chain reaction  
PDGF, platelet derived growth factor  
PGC1- $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$   
PGE2, prostaglandin E2  
PPAR, peroxisome proliferator activated receptor  
PRDM16, PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16  
PTX3, pentraxin 3  
RT, reverse transcription  
SC, subcutaneous fat  
SDS, sodium chloride/sodium citrate (buffer)  
STAT, signal transducer and activator of transcription  
SVF, stromal vascular fraction

TACE/ADAM17, TNF- $\alpha$  converting enzyme  
TBE, Tris borate EDTA buffer  
TEMED, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine  
TG, triacylglycerol  
TGF, transforming growth factor  
TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta  
TJ, tight junction  
TLR, Toll-like receptor  
TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$   
TR, thyroid hormone receptor  
Tris, Tris (hydroxymethyl) aminomethane  
Tween 20, polyoxyethylenesorbitan monolaurate 20  
UC, ulcerative colitis  
UCP1, uncoupling protein 1  
VF, perirenal visceral  
WAT, white adipose tissue  
WT, wild type

## 緒 言

### メタボリックシンドローム

生活習慣の欧米化に伴い、高血圧、高脂血症、肥満、糖尿病などに代表される生活習慣病の罹患数の増加が進んでいる。特に先進国は飽食の時代を迎え、肥満症の人口は急激に増加しており、その数は世界中で 20 億人に達するとされている[1]。これらに共



通する病態因子として、内臓脂肪の増大を特徴としたメタボリックシンドロームに関する概念が1987年に提唱された[2]。近年では、内臓脂肪型肥満がメタボリックシンドローム発症の基礎疾患であることが示され、メタボリックシンドロームの診断にはウ

エスト周囲径の測定による内臓脂肪量の評価が行われている。一方、Body Mass Index (BMI) は肥満度を表す指標として国際的に用いられているものの、実際にはメタボリックシンドロームの診断基準としては用いられていない。しかし、BMI が高値の人の中にメタボリックシンドローム予備軍が潜在的に含まれている可能性も示唆されており、日頃から BMI を把握することは健康維持のために重要である。一方、メタボリックシンドロームの発症リスクに関する人種差も報告されており、特にアジア人は飢餓に強い遺伝的体質のため、摂取したエネルギーを蓄積しやすく、高カロリー食による代謝異常を起こしやすいことが明らかにされている[3]。カロリーの持続的な過剰摂取により、皮下および内臓周囲の白色脂肪組織重量が増大し、特に内臓脂肪が増大することはメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患や、それに伴う様々な疾病リスクの上昇も誘導することから、大きな社会的問題となっている[4]。

## 脂肪組織の分類

肥満はエネルギー消費と比較して、過剰のエネルギー摂取によって体内に脂肪組織が過剰に蓄積した状態である。肥満発症は摂取カロリー過多による脂肪細胞の肥大化、および前駆脂肪細胞が分化し、さらに脂肪細胞数が増えることに基づく。肥満白色脂肪組織の分類では脂肪組織の分布によって皮下脂肪型と内臓脂肪型の二つに分けられるが、脂肪組織は個体間においてサイズの差異が最も大きい組織である。皮膚下部にある皮下組織に脂肪組織が過剰蓄積するタイプの肥満は皮下脂肪型肥満であり、身体の形状が下半身よりになる傾向を示し、一般的に「洋ナシ型肥満」と呼ばれるが、皮下脂肪が過剰蓄積した場合には縮小しづらい特徴がある。一方、内臓脂肪が過剰蓄積した肥満は内臓脂肪型肥満と呼ばれ、糖尿病、高血圧や脂肪代謝異常症、さらに動脈硬化のリスクが高まる。白色脂肪組織は形成される部位によって性質が大きく異なることも報告されており、内臓脂肪には心臓周囲、腸間膜、および腎臓周囲脂肪組織などが含まれ、それぞれ血流量、細胞増殖能、さらに神経支配密度など大きく異なる[5]。近年の研究では、これら脂肪組織の他臓器へ与える生理機能も大きく異なり、疾病発症への影響の差異に関しても研究の焦点が当てられている[6]。

一方で脂肪組織は、白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) と褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) とに分類される。上述のように白色脂肪組織は余剰なエネルギーを中性脂肪として取り込み、細胞内にはエネルギーを貯蔵する単一の脂肪滴が存在するが、脂肪細胞自身が生理活性物質を分泌し、生体の恒常性維持を担う内分泌臓器でもある。また、絶食時にはグルカゴンなどのホルモンの血中濃度が上昇することによって中性脂肪を脂肪酸とグリセロールに分解し、エネルギー供給において重要な役割を果たしている。褐色脂肪組織は主に肩甲骨周辺、心臓や肝臓の周囲などの特定部位に少量存在しており、ヒト成人において褐色脂肪組織は 40-50 g 存在していると考えられている[7]。また、単一の脂肪滴を含む白色脂肪細胞とは異なり、褐色脂肪細胞内には多房性の脂肪滴を含み、多くのミトコンドリアが存在している。主な生理機能は体熱を産生することであり、寒冷刺激により分泌されたノルアドレナリンによって褐色脂肪組織の血管が拡張し、中性脂肪を分解することで、熱を生成し、体温維持に貢献する[8,9]。すなわち、褐色脂肪はエネルギーを燃焼し、体脂肪の蓄積を防ぐ働きを持つことが明らかにされており、肥満発症にも抑制的に関与すると考えられている。エネルギー消費量の低下が肥満発症の要因の一つであり、最近の研究では、特定の食品成分の摂取により褐色脂肪組織を活性化し、エネルギー消費を亢進させることが報告されている[10]。一



方、白色脂肪組織においても寒冷刺激など様々な条件によって、褐色脂肪組織様の形質を獲得できることが報告され、ベージュ化と呼ばれている[11]。白色脂肪組織のベージュ化によって本来発現していない **mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1)** の発現が誘導され、エネルギー消費を増加させるため、肥満マウスの体重減少やインスリン抵抗性の改善など有用な生理作用が報告されている。白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞は異なる前駆脂肪細胞に由来しているものの、寒冷刺激などによって脂肪細胞の形質が大きく変化することが示されており[12]、現在では、白色脂肪組織のベージュ化を誘導する食品成分の開発や生体内のベージュ化の制御因子の探索、さらに褐色型脂肪細胞への形質転換の機構の解明を介して肥満の予防や改善に有効な手段が見出されつつある。

### **肥満白色脂肪組織における脂肪細胞について**

肥満白色脂肪組織は体積の 90%以上を脂肪細胞が占めるが、他の細胞種も豊富に存在する。つまり、脂肪組織では成熟脂肪細胞や前駆脂肪細胞のみならず、血管内皮細胞などの血管構成細胞やマクロファージなどの免疫系細胞を含む非成熟脂肪細胞画分 (**stromal vascular fraction, SVF**) が存在しており、肥満状態への推移に伴って脂肪組織の細胞構成が大きく変化する。一方、脂肪細胞は、カロリー摂取量の増加に基づく余剰エネルギーを中性脂肪として蓄積するが、肥満に伴って白色脂肪細胞は、細胞サイズの増大 (肥大化、**hypertrophy**) のみならず、細胞数の増加 (過形成、**hyperplasia**) が起こると考えられている[13]。ヒトの白色脂肪組織の脂肪細胞の平均直径は約 60~90  $\mu\text{m}$  ほどであり、肥満状態では脂肪細胞の直径は最大で 140~150  $\mu\text{m}$  にまで肥大化するとされ、さらに肥満の病態が進行した場合においても、それ以上の大きさ (直径) の脂肪細胞は観察されないことが報告されている[14]。成人の白色脂肪細胞数は通常約 300 億個と推定されているが、これまで脂肪細胞数は幼少期のみが増加し、出生早期に細胞数が決定されていると考えられていたが、近年の研究で成人への成長後も脂肪細胞数が増加することが明らかにされた。また、ヒトの白色脂肪細胞の細胞寿命は 9~10 年であり、一年間で全脂肪細胞の 10%が置換されているという興味深い報告もなされた[15]。以上の研究結果から、細胞数の増加は、限界のある脂肪細胞の肥大化を補填することでエネルギー貯蔵に関連すると考えられており、脂肪細胞数の維持機構の解明が極めて重要である。

## 肥満白色脂肪組織へのマクロファージ細胞の浸潤と細胞極性

マクロファージ細胞は血液中の白血球の 5%を占める単球由来白血球から分化し、生体内に遊走性の食細胞として循環し、損傷した細胞、あるいは死細胞や変性した代謝産物などを捕食する重要な役割を担っている[16]。また、マクロファージ細胞は細胞増殖が可能であり、細胞寿命が 10 時間～数日と短い好中球細胞と異なり、寿命は数ヶ月とされる[17]。ヒトやマウスでは肥満に伴う白色脂肪組織へのマクロファージ細胞の浸潤量の増加が報告されており、近年、白色脂肪組織内に浸潤した活性化マクロファージ細胞と脂肪細胞の相互作用に基づく慢性炎症が注目されている。マウスの肥満白色脂肪組織における免疫学的な解析によって、マクロファージ細胞のマーカー分子である F4/80 陽性細胞数の増加が体重増加に相関し、インスリン抵抗性に関連することが明らかにされた[18]。主要なケモカインである monocyte chemotactic protein-1 (Mcp-1/CCL2) は単球・マクロファージ細胞の遊走に関与し[19,20]、肥満白色脂肪組織における Mcp-1 の産生とその受容体である C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) の発現量の増加が報告されている[21]。産生された MCP-1 は CCR2 を介して白色脂肪組織へのマクロファージ細胞の浸潤を誘導し、アディポサイトカイン産生のバランスの破綻などによって慢性炎症が引き起こされ、インスリン抵抗性などの全身性の糖代謝異常の誘導に関与すると考えられている[19,22]。一方、*Mcp-1* または *Ccr2* 遺伝子の欠損マウスを用いて高脂肪食負荷により肥満を誘導させた際には、野生型と比較して白色脂肪組織内のマクロファージ細胞の浸潤量は有意に減少し、interleukin-6 (IL-6) や tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) など炎症性因子の発現量も低下することで、インスリン抵抗性が改善されることが示されている[22]。以上の報告により、肥満白色脂肪組織へのマクロファージ細胞浸潤量の増加は炎症性因子群の分泌を介して、白色脂肪組織における慢性炎症の発症やインスリン抵抗性の誘導に深く関わると考えられる。さらに、マクロファージ細胞は大きく分けて 2 種類存在し、一般に細胞極性と捉えられている。一つは interferon gamma (INF- $\gamma$ ) や lipopolysaccharide (LPS) などの Th1 サイトカインによる活性化によって誘導された M1 マクロファージ細胞 (活性型、炎症型) であり、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌することで炎症を惹起し、強力な免疫反応を引き起こすことで、病態増悪に関与する。もう一方は、interleukin-4 (IL-4) や interleukin-13 (IL-13) などの Th2 サイトカインによる活性化によって誘導された M2 マクロファージ細胞 (非活性型、抗炎症型) であり、IL-10 などの抗炎症性のサイトカインを分泌することで炎症を鎮静化させる生理作用を有する[23,24]。一方、肥満

の発症に伴って脂肪組織内ではマクロファージ細胞数が有意に増加しており[25]、肥満によって引き起こされた慢性炎症の白色脂肪組織において M1 マクロファージ細胞数が増加すると考えられている。また、M1 マクロファージ細胞の蓄積はインスリン抵抗性の発症などに深く関与することが示されている[26]。近年では、M1 マクロファージ細胞が IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性因子の産生を介して脂肪細胞に作用してインスリン抵抗性を悪化させ、これにより白色脂肪組織から遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) や炎症性サイトカインの分泌を引き起こすなど、アディポサイトカイン産生調節の破綻に関連する[27,28]。M1 マクロファージ細胞、および M2 マクロファージ細胞の極性を制御するメカニズムは未だ明らかにされていないが、最近、インスリン感受性の改善効果を示す adiponectin が M2 マクロファージ細胞への極性化に関する生理機能を有することが報告された[29]。実際に、マウスは *adiponectin* 遺伝子欠損によって白色脂肪組織における M2 マクロファージ細胞数の減少や TNF- $\alpha$ 、および IL-6 などの炎症性サイトカインの発現量の増加、およびインスリン抵抗性などが引き起こされ、これらは、adiponectin の投与により改善することが示された。

肥満白色脂肪組織の慢性炎症が背景となり、肥満症患者においては糖尿病や動脈硬化、脳疾患などの疾病の発病リスクが上昇することが知られる一方で、近年では、肥満と発癌リスクとの関連性について着目した研究が盛んに行われている。疫学的調査によって肥満度 (BMI) と大腸癌、肝癌や膵臓癌などの発症率には正の相関が認められており、肥満と発癌との関係の分子メカニズムに関する議論がなされている[30]。しかし、癌組織の種類に基づく形質の差異や、肥満による運動不足や他の生活習慣病などの間接的な要因なども考慮する必要もあり、その関連性についての詳細は未解明である。

### アディポサイトカインの発見、および代謝調節

一般にサイトカインとは細胞から分泌されるタンパク質類の総称であり、特に、免疫機構や炎症反応、および細胞増殖、細胞分化や細胞死などに関与する重要な生体内因子である。上述のように、脂肪細胞も多様な生理活性物質の分泌を通して生体調節を制御し、糖代謝やエネルギー代謝において重要な生理機能を担っていることも明らかにされ、これら脂肪細胞から分泌される生理活性物質はアディポサイトカイン (adipocytokine) と総称される[31]。代表的なアディポサイトカインとして leptin、adiponectin、TNF- $\alpha$ 、FFA、plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) や MCP-1 などが含まれ、メタボリックシンドロームの発症において重要な役割を果たしている。leptin は 1994 年に遺伝

性肥満 *ob/ob* マウスの病因遺伝子として同定され、脂肪細胞より分泌されるアディポサイトカインとして発見された[32]。脳視床下部の *leptin* 受容体を介して、強力な満腹感を伝達し、摂食行動をコントロールすることで中性脂肪蓄積量を調節していることが明らかにされた[33,34,35]。また、血中の *leptin* 濃度には日内変動があり、飢餓あるいは絶食時に低値を示すが、食事摂取後に上昇し、食後の血糖値の上昇と同様に短期的な満腹感を与える因子として働く可能性が示されている[36]。さらに上述の  $\text{TNF-}\alpha$  はマウスに移植した腫瘍に対して壊死を誘導させる因子として 1975 年に単離され、主にマクロファージ細胞や T 細胞など免疫細胞から分泌される生理活性物質であり、関節リウマチなどの炎症性疾患の発症に関与する炎症サイトカインとして知られている[37]。肥満発症の白色脂肪組織では、 $\text{TNF-}\alpha$  の産生量、および血中濃度の増加が明らかとなった[38,39]。その後、*adiponectin* が同定され、善玉アディポサイトカインとしての生理的役割が注目されるなど、白色脂肪組織は生理活性物質の分泌を通して積極的に全身の代謝調節に関与する内分泌臓器として考えられるに至っている。

以上のように、白色脂肪組織においてはアディポサイトカインの産生を通じて生体調節に寄与する重要な生理機能が考えられているが、現在まで未同定のアディポサイトカインも多く存在している。肥満発症と発癌のリスクに関与する分子機構には不明な点が多く、その分子機序の解明においては機能未知のアディポサイトカインの探索が必要である。

## 本研究の目的、および構成

### 1. 本研究の目的

本研究では、肥満白色脂肪組織で高発現している amphiregulin (以下、AREG) が増殖因子として前駆脂肪細胞の増殖や血管新生などに対して重要な調節機能を有する可能性を想定するとともに、白色脂肪組織の慢性炎症と細胞増殖に関連した新規アディポサイトカインとしての役割に注目した。白色脂肪組織特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (以下 AREG-Tg マウス) を作出することで、白色脂肪細胞増殖の制御の分子メカニズムの解明、および肥満白色脂肪組織と発癌のリスクとの関係に介在する新規アディポサイトカインとして着目し、その生理機能の探索を研究目的とした。

### 2. 本研究の構成

◆ 第一章では、当研究室において以前に実施された遺伝性肥満モデル (*db/db*) マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現の網羅的な解析結果を参照することで、肥満発症や病態の進行に伴って発現上昇する遺伝子群から細胞増殖に関与する候補因子として *amphiregulin* (以下、*Areg*) を単離した。

◆ 第二章では、肥満白色脂肪組織で高発現している AREG が増殖因子として前駆脂肪細胞の増殖や血管新生などに対して重要な調節機能を有する可能性を想定するとともに、白色脂肪組織の慢性炎症と細胞増殖との機能的連携を司る液性因子としての役割を想定し、白色脂肪組織特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (AREG-Tg マウス) の樹立を試みた。特に、AREG-Tg マウスの形質の解析においては肥満白色脂肪組織の形成における AREG の高発現の生理的意義の解明を目指した。さらに、*Areg* 遺伝子を高発現する遺伝型肥満 *db/db* マウスを新たに作出し、AREG が遺伝型肥満モデルの肥満発症に与える影響について解析した。また、AREG-Tg マウスにおいて血中濃度が上昇した AREG が増殖因子として大腸粘膜上皮細胞を増殖させ、腸管の恒常性を維持する働きを有するとの仮説を立て、腸管粘膜上皮細胞層に障害を引き起こす dextran sulfate sodium (DSS) の経口投与によって AREG-Tg マウスに DSS 大腸炎を発症させ、AREG の大腸炎発症に与える影響の解明を研究目標とした。

# 第一章 肥満白色脂肪組織において発現量が増加する *Areg* 遺伝子の単離

## 1-1. 序論

内臓脂肪性肥満がメタボリックシンドローム発症の基礎疾患であることが示されているが、特に近年、高血圧、高血糖や脂質代謝異常さらに組み合わせられるメタボリックシンドロームを引き起こす。最終的に、冠動脈疾患や脳血管障害などの疾患のリスクを高めることとなり、今日の高齢化社会において極めて重要な社会問題である。肥満発症の病因や進展の分子機序については、未解明の部分が多いのが現状であるが、近年の分子生物学的研究方法の発展に伴い、肥満白色脂肪組織を構成する脂肪細胞の分化・増殖の制御機構、さらには生活習慣病発症に深く関わるアディポサイトカインの単離などの興味深い新知見が見出されている。

緒言で述べたように、アディポサイトカインは全身の代謝調節に重要な役割を担っている。摂食活動に関与する *leptin* の発見に端を発し[40]、最近では、脂肪細胞が肥大化することで *adiponectin* の分泌量が低下するとともに、*adiponectin* は肥満症に関連するインスリン抵抗性や動脈硬化の防御因子として注目されている。さらに、脂肪細胞から *TNF- $\alpha$*  や *IL-6* などに代表される炎症性サイトカインの産生が亢進し、メタボリックシンドロームに合併するインスリン抵抗性や炎症性疾患に関連することが示されている[41,42,43]。以上のように、肥満状態の白色脂肪組織における悪性のアディポサイトカインの産生については、全身の代謝恒常性の破綻のみならず、新規アディポサイトカインの分泌が、*endocrine* 的な作用によって細胞増殖や血管新生、さらに慢性炎症などを介して様々な腫瘍形成と関連し、発癌リスクを上昇や癌進展に関与する可能性が示唆されている。近年の研究において、肥満症の発症に伴う *TNF- $\alpha$*  分泌量の増加や *adiponectin* 分泌の低下などによって、高インスリン血症を発症することは肥満関連の発癌リスク上昇の一因として考えられていた。インスリンは *insulin-like factor 1* (*IGF-1*) 受容体の活性化による情報伝達により、大腸癌モデルマウスにおいて大腸粘膜上皮細胞の増殖やアポトーシスの抑制に関与していることが示されている[44-46]。一方、肥満度を示す *BMI* と大腸癌の発症リスクが相関することが以前から知られているが、最近、肥満状態の内臓脂肪組織や肥大化した脂肪細胞における *adiponectin* の分泌量が低下することによって大腸癌の発症リスクが上昇することも指摘されている。さらに、肥満患者において異所性の内臓脂肪蓄積である脂肪肝、さらに病態が進行した非

アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) などの合併症が増加するが、adiponectin 量が低下することによって肝の脂肪蓄積のみならず、肝繊維化を引き起こし、肝硬変や肝癌の発症に関与していることが示唆されている[47]。しかし、アディポサイトカインと発癌のメカニズムなどについては未解明な部分が多く、肥満発症によって白色脂肪組織でのアディポサイトカインの分泌異常が発癌における重要なメカニズムとして予想される点においても、新規アディポサイトカインのスクリーニングは極めて重要である。

また他方で、肥満白色脂肪組織における細胞増殖の観点からは、肥満症の発症に伴って白色脂肪組織内での環境が変化し、白色脂肪組織の大部分を構成する白色脂肪細胞の肥大化のみならず、脂肪細胞数の増加も重要であると考えられている[48]。一般に、ヒト成人正常体重者の脂肪細胞直径は 60-90  $\mu\text{m}$  であるが、肥満状態では約 140  $\mu\text{m}$  が直径の限界であると考えられている。つまり、軽度の肥満時には脂肪細胞の肥大化によって中性脂肪の貯蔵に対応できるが、脂肪細胞の肥大化が限界点に達すると、脂肪細胞が分裂により数が増加することで[49,50]、過剰なエネルギー摂取などに応じて貯蓄容量の増加に対応可能であると予想されている。以上の仮説においては、肥満脂肪組織の肥大化と白色脂肪細胞数の双方のコントロールが肥満の発症に対する極めて重要な方策であると考えられる。また、脂肪細胞の分化、および成立においては、間葉系幹細胞が前駆脂肪細胞へと分化した後、成熟脂肪細胞を形成すると考えられている。白色脂肪細胞の増加においては、現段階では大きな脂肪滴を含有する肥大化した成熟脂肪細胞が自ら分裂する可能性については未だ不明であり、白色脂肪組織内に存在する間葉系幹細胞、あるいは前駆脂肪細胞の増殖が大きく関与すると考えられている[51]。白色脂肪組織における間葉系幹細胞や脂肪前駆細胞は、細胞周期が停止した状態で成熟した脂肪細胞の間隙に存在していると考えられており、寿命をむかえた成熟脂肪細胞がアポトーシス、あるいは壊死により排除される動きと連携して、細胞周期を再開し、前駆脂肪細胞から脂肪細胞へと分化することにより白色脂肪組織の恒常性が保たれているとされる。近年、肥満発症過程における白色脂肪細胞の増殖の検証については様々な検討がなされている。15 週齢のシベリアンハムスターに 5-bromo 2'-deoxyuridine (BrdU) を 6 日間皮下投与することにより白色脂肪組織内において成熟脂肪細胞の間隙に存在する BrdU 陽性細胞が検出され、脂肪組織内における増殖性細胞の存在が明らかとなった[52]。一方、adiponectin promoter を利用して成熟脂肪細胞特異的な doxycycline により制御を受けた  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに doxycycline を

投与することで一過性に成熟脂肪細胞を  $\beta$ -galactosidase で標識し、高脂肪食負荷によって白色脂肪組織内での  $\beta$ -galactosidase 陽性の分化した成熟脂肪細胞の新生が確認されている[53]。これらの研究報告のように、脂肪細胞の増殖が *in vivo* で確認され、脂肪細胞の増殖様式が徐々に明らかにされつつあるが、白色脂肪細胞数の制御、特に肥満白色脂肪細胞組織における数の増加の分子メカニズムは未解明の部分が多いのが現状である。

本研究では、肥満発症と細胞増殖と深く関わる癌発症や脂肪細胞の増殖機構に深く関わるアディポサイトカインの存在を想定した。以前、当研究室において遺伝性肥満モデル (*db/db*) マウスの白色脂肪組織において発現量が変動する遺伝子群の網羅的な解析が行われており、肥満病態の進行によって発現上昇する遺伝子群の中から細胞増殖に関与する遺伝子の単離を試みた。



## 1-2. 研究材料、および実験方法

本研究で行う遺伝子組換え実験、および動物実験については、広島大学における教育訓練を受け、従業者として登録を行った上で実施した。また、本研究の動物実験は、広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について承諾を得ており、また、遺伝子組換え実験においては、関連する法令等を遵守しながら遂行した。動物実験に関しては、広島大学承諾番号 C16-16-2 において承諾済みであり、遺伝子組換え生物使用実験に関しては広島大学承諾番号 29-282 において承諾済みである。

### 1-2-1. 試薬の調製、および実験材料

#### 1-2-1-1. 一般試薬

一般試薬には、主に Nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて実験を行い、制限酵素はタカラバイオ社製または東洋紡社製のものを使用した。本論文においては一部の試薬名を簡略化して記載した。

#### 1-2-1-2. Polyacrylamide gel 電気泳動用の試薬の調製

##### 30% acrylamide の作製

29.0% acrylamide

1.0% N, N'-methylenebisacrylamide

上記の試薬をミリ Q 水で調製した後、0.45  $\mu\text{m}$  filter (Millipore 社製) で吸引濾過した。

##### 10×TBE の調製

0.89 M Tris

0.89 M Boric acid

0.02 M EDTA

上記の終濃度となるように、試薬の調製は蒸留水で行った。

##### Polyacrylamide gel の作製

5.0% acrylamide

1×TBE

0.1% APS

0.01% TEMED

上記の終濃度となるようにミリ Q 水で調製した。

#### DNA 用 loading dye

50% glycerol

1 mM EDTA

0.2% BPB

上記の終濃度となるように試薬の調製は蒸留水で行った。

#### **1-2-1-3. オリゴ DNA マイクロアレイ解析に用いた試薬**

T7 promoter primer

5×First Strand buffer

0.1 M DTT

10 mM dNTPmix.

MMLV-RT

RNase OUT

4×Transcription buffer

NTPmix.

50% PEG

Inorganic pyrophosphatase

T7 RNA polymerase

Cyanine3

Cyanine5

上記の試薬は全て Agilent Technologies 社推奨の試薬を用いた。

#### **1-2-1-4. 培養細胞用実験試薬、および器具**

Fetal bovine serum (FBS) (BIOLOGICAL INDUSTRIES)

10,000 units/ml Penicillin - 10,000 µg/ml Streptomycin (SP) (Invitrogen)

Minimum Essential Medium (MEM)

PBS(-)粉末 (COSMO BIO)を、蒸留水 1L に溶解させ、オートクレーブ滅菌したものを培養細胞用 PBS(-)として使用した。

trypsin-EDTA (TE) (Invitrogen)

100 mm×20 mm cell culture dish (CORNING)

60 mm×20 mm cell culture dish (CORNING)

35 mm×10 mm cell culture dish (CORNING)

6 well cell culture plate (BD Falcon)

12 well cell culture plate (BD Falcon)

#### 1-2-1-5. 実験食に用いた飼料

実験動物用固体飼料（オリエンタル酵母）、AIN-93G（オリエンタル酵母）、および HFD-60（オリエンタル酵母）を用いた。

#### 1-2-2. 動物飼育

##### 1-2-2-1. *db/db* マウスの飼育

9 週齢の *db/db* (+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウス、およびコントロールとして *db* ヘテロマウスである *db/+* (+Dock7<sup>m</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウスを清水実験材料株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル（8:00～21:00 は明、21:00～8:00 は暗）、恒温（24±1℃）で飼育を行った。馴化期間として、購入後 1 週間は水と固形飼料を自由摂取させ、実験に用いた。

##### 1-2-2-2. 高脂肪食負荷（HFD）マウスの飼育

5 週齢の ICR 雄性マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル（8:00～21:00 は明、21:00～8:00 は暗）、恒温（24±1℃）で飼育を行った。馴化期間として、購入後 1 週間は水と固形飼料を自由摂取させ、体重を記録した。2 週目以降は実験食として脂肪分 60%（カロリー比）を含む高脂肪飼料 HFD-60（オリエンタル酵母社製）を与え、コントロール（ND）マウスは AIN-93G（オリエンタル酵母社製）食を自由摂取させた。

#### 1-2-3. 実験方法

##### 1-2-3-1. 白色脂肪組織の摘出、および total RNA の抽出

朝から絶食 6 時間後にマウス精巣周囲の白色脂肪組織を摘出し、脂肪組織重量を測定し、15 ml 容チューブに分注した QIAZOL reagent (Qiagen 社製) 2 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破碎し、30 分間室温で静置した後、total RNA の調製まで-80℃で

保存した。精巢周囲白色脂肪組織からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて行った。その手順を以下に記す。上記の $-80^{\circ}\text{C}$  に保存していたホモジナイズ溶液を解凍し、chloroform を  $500\ \mu\text{l}$  ずつ各サンプルに加え、15 秒間 vortex して良く混合した。3 分間室温にて静置し、遠心 ( $4,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 分間) した後、上清を新しい  $1.5\ \text{ml}$  容チューブに回収した。回収した上清と等量の 70% エタノールを添加して転倒混合した後、カラムに添加し、遠心 ( $12,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) した。遠心後、フロースルー画分をデカントにて除去し、カラムに RW buffer を  $700\ \mu\text{l}$  ずつ添加し、遠心 ( $12,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) した後、フロースルーを同様に除去した。続いて、あらかじめエタノールを添加した RPE buffer をカラムに  $500\ \mu\text{l}$  ずつ添加して遠心 ( $12,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) し、フロースルーを除去し、洗浄を行った。その後、再度遠心 ( $12,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、2 分間) し、カラム内の total RNA を乾燥させた。カラムを新しい  $1.5\ \text{ml}$  容チューブにセットし、添付の RNase free water を  $100\ \mu\text{l}$  ずつ滴下して遠心 ( $12,000\ \text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1 分間) し、total RNA を回収した。エタノール沈殿を行った後 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 1-2-3-2. 逆転写反応による cDNA の合成

RevaTra Ace RT (TOYOBO 社製) を用いて cDNA 合成を行った。Total RNA 溶液と RNase free distilled water を混合し、 $10.5\ \mu\text{l}$  (total RNA は  $500\ \text{ng}$  から  $1\ \mu\text{g}$  までの一定量に調製した) に合わせた。Random Primers ( $3\ \text{pmol}/\mu\text{l}$  invitrogen 社製)  $2\ \mu\text{l}$  を加え、 $65^{\circ}\text{C}$  で 5 分間熱処理し、氷上で 1 分間静置した。その後、1 サンプルあたり以下の cDNA 合成用の反応液を加え、穏やかにピペッティングを行い均一にした。

RevaTra Ace RT (TOYOBO 社製)	$1.0\ \mu\text{l}$
5×First-Strand buffer	$4.0\ \mu\text{l}$
10 mM dNTP mix (TOYOBO 社製)	$2.0\ \mu\text{l}$
Recombinant RNase inhibitor (Takara Bio 社製)	$0.5\ \mu\text{l}$

反応液を  $30^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベートした後、 $42^{\circ}\text{C}$  で 60 分間インキュベートし、 $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間熱処理し、反応を停止させた。1 サンプルにつき  $100\ \mu\text{l}$  の  $\text{dH}_2\text{O}$  水を加え、cDNA 溶液として用いた。

### 1-2-3-3. RT-PCR による遺伝子の発現解析

合成した cDNA を用いて Go-Taq DNA polymerase (Promega 社製)、あるいは

Quick-Taq DNA polymerase (Takara Bio 社製) による PCR 反応を行った。Go-Taq DNA polymerase、および Quick-Taq DNA polymerase には mater mix 試薬にそれぞれ調製された dye が含まれており、5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動 バッファーを用い、200V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide 溶液に 15 分間浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。スピンドウンした後、PCR 用 8 連チューブに下記の反応液を均一に加えた。

#### GoTaq Green master mix (20 µl scale)

Green master mix	10.0 µl
Nuclease free water	8.0 µl
cDNA	1.0 µl
sense primer	0.5 µl
antisense primer	0.5 µl

#### QuickTaq master mix (20 µl scale)

QuickTaq master mix	10.0 µl
Nuclease free water	8.0 µl
cDNA	1.0 µl
sense primer	0.5 µl
antisense primer	0.5 µl

反応液を 95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間 → 58°C 40 秒間 → 72°C 1 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

本研究で使用した合成 primer は全て 100 µM で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

mouse *Areg*

sense primer 5'-GGAGGTGGTGACATGCAAT-3'

antisense primer 5'-GTCCCGTTTCTTGTCGAAG -3'

mouse *Mcp-1/CCL2*

sense primer 5'-GGTCCCTGTCATGCTTCTGG-3'

antisense primer 5'-CCTTCTTGGGGTCAGCACAG-3'

mouse *Msr1*

sense primer 5'-TCAAACCTCAAAGCCGACCT-3'

antisense primer 5'-ACGTGCGCTTGTTCTTCTTT-3'

mouse *Emr1*

sense primer 5'-ATTGTGGAAGCATCCGAGAC-3'

antisense primer 5'-GTAGGAATCCCGCAATGATG-3'

mouse *adiponectin*

sense primer 5'-TGGAGATGCTCACTTTGACG-3'

antisense primer 5'-AGAGCTGCACATTGGTGATG-3'

mouse *Fgf-13*

sense primer 5'-CTCGGAACATTTACACCTG-3'

antisense primer 5'-GGTTTGGGCAGAAAATGTGC-3'

mouse *Fgf-21*

sense primer 5'- TGGGGGTCTACCAAGCATAAC-3'

antisense primer 5'-CCCAGGATTTGAATGACCCC-3'

*β-actin* (mouse, human)

sense primer 5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC-3'

antisense primer 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'

#### mouse L-19

sense primer                      5'-GGCATAGGGAAGAGGAAGG-3'

antisense primer                5'-GGATGTGCTCCATGAGGATGC-3'

#### 1-2-3-4. Real-time PCR 法による遺伝子の発現解析

Real-time PCR 反応には THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社製) を使用した。Primer と鋳型 cDNA は上記の項と同様のものを使用した。Primer は sense、antisense の両方を含む、終濃度 5 μM の primer set (5 μM primer set) を使用した。

Nuclease free water	6.6 μl
5 μM primer set	2.0 μl
ROX	0.4 μl
THUNDERBIRDTM SYBR® qPCR Mix	10.0 μl
cDNA	1.0 μl

上記組成の反応溶液を丁寧に混合し、鋳型 cDNA を反応溶液に加え、ピペッティングは行わずスピンドアウンを行い、気泡が混入していないことを確認した。StepOne リアルタイム PCR システム (Applied biosystems 社製) にセットし、95°C で 2 分間の熱変性後、95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間を 1 サイクルとし 40 サイクル行った。後に、65°C から 90°C までの melting curve を作製した。

#### 1-2-3-5. マウス大腿骨からの骨髄単核球の回収

C57BL マウスの大腿骨を摘出し、大腿骨の両端を切断した後、骨髄液をマウス M-CSF を含む DMEM 培地に注射器を用いて押し出した。culture dish に培地ごと播種し、24 時間後に浮遊細胞を回収した。3 日後に培地を交換し、7 日目のものを単球・マクロファージ様細胞として使用した。その後、M1 様マクロファージ細胞に分化させるものには培地中にマウス IFN-γ を 20 ng/ml、および lipopolysaccharide (LPS) を 100 ng/ml となるように添加し、M2 様マクロファージ細胞に分化させるものはマウス IL-4 を 10 ng/ml となるよう培地中に添加し、24 時間後細胞を回収した。

#### 1-2-3-6. 酵素分散法による脂肪細胞と SVF の分離

##### collagenase type I 溶液の調製

collagenase type I (Worthington 社製) を 1 mg/ml となるように PBS (-) で調整し、collagenase type I 溶液として使用した。

### 成熟脂肪細胞画分と SVF の分離

*db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織 0.5 g を 60 mm の dish に入れ、ハサミと手術用メスで細切後 50 ml 容チューブに入れ、あらかじめ調製した 1 mg/ml の collagenase type I 溶液 15 ml に浸した後、37°C で 1 時間振とうした (stroke 88/min)。その後、cell strainer 100  $\mu$ m (BD Falcon 社製) でファルトレートし、不純物を除去した後、遠心 (300 g、10 分間) を行った。上清の細胞層を 100  $\mu$ l 回収し、成熟脂肪細胞画分とした。その後上清を除去し、1×PBS を 100  $\mu$ l 加えて懸濁した後、再度遠心し (300 g、5 分間)、その沈殿物を間質・血管系画分 (stromal vascular fraction, SVF) とした。QIAzol Reagent を成熟脂肪細胞画分には 500  $\mu$ l、SVF には 900  $\mu$ l 加えて 30 分室温にて静置した後、total RNA の調製まで -80°C で保存した。

### total RNA の調製、

分離した成熟脂肪細胞と SVF からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて行った。成熟脂肪細胞層には、chloroform を 200  $\mu$ l、SVF には 100  $\mu$ l 加えて、1-2-3-1 の項と同様に total RNA の調製を行った。Nano drop 2000 (Thermo 社製) を用いて total RNA の濃度を測定し、成熟脂肪細胞層と SVF が 100 ng 相当の total RNA 溶液を用いた。

### cDNA の合成

1-2-3-2 の項に示す逆転写反応を行い、cDNA を作製した。



## 1-3. 実験結果

### 1-3-1. 肥満白色脂肪組織における *Areg* の発現解析

#### 1-3-1-1. *dbl/db* 遺伝性肥満マウスの精巣周囲白色脂肪組織において発現変動する増殖因子の単離

*dbl/db* (+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウス、およびコントロールとして *db* ヘテロマウスである *dbl/+* (+Dock7<sup>m</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウスの精巣周囲白色脂肪組織の total RNA を用いた DNA microarray 解析の結果を参照し、*Areg*、*Fgf13*、*Fgf21* を発現上昇する増殖因子群として候補化した。さらに、8 週間の高脂肪食 (HFD) 飼育を行った食餌誘導肥満マウスの精巣周囲白色脂肪組織由来の total RNA を用いた real-time PCR 法による発現解析を行ったところ、*Areg* は約 10 倍の発現上昇が認められた [Fig. 1]。さらに、*dbl/db* マウス、および *dbl/+* マウスにおける *Areg* の発現量を解析したところ、*dbl/+* マウスと比較して *dbl/db* マウスの精巣周囲脂肪組織において *Areg* mRNA の発現量は約 80 倍上昇していた [Fig. 2]。以上の結果から、肥満白色脂肪組織での *Areg* mRNA 発現解析を継続した。

#### 1-3-1-2. 高脂肪食負荷 (HFD) マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現解析

肥満形成過程における *Areg* mRNA の発現量を検討するため、高脂肪食負荷 1 週、3 週、5 週、9 週後のマウスの体重を測定し、各時期マウスの精巣周囲白色脂肪組織を摘出し、cDNA を調製した。real-time PCR 法により発現解析を行った結果、*Areg* mRNA の発現量は高脂肪食群において発現上昇する傾向が認められ、興味深いことに *Areg* mRNA の発現量と高脂肪食負荷したマウスの体重、および精巣周囲白色脂肪組織重量は正に相関していた [Fig. 3]。

また、各マウス個体における *Areg* mRNA の発現量とマクロファージ細胞マーカーである *Emr-1* や *Msr-1*、およびケモカインである *Mcp-1* の mRNA 発現量を比較したところ、正に相関していた [Fig. 4,5]。マクロファージ細胞の浸潤量の増加が、*Areg* の発現量にも関連しているものと考えられた。

### 1-3-1-3. 骨髄由来単核球から誘導した M1、および M2 様マクロファージ細胞の *Areg* の発現解析

マウス的大腿骨から骨髄単核球を回収し、M-CSF を含む培地において 24 時間培養した後、浮遊細胞を回収し、同様の培地で 1 週間培養し、マクロファージ様細胞へと分化させた。その後、LPS および IFN- $\gamma$  を培地中に添加し、M1 様マクロファージ細胞に分化させた M1 細胞群、および IL-4 を添加して M2 様マクロファージ細胞に分化させる M2 細胞群へ分化誘導を行った【Fig. 6A】。分化誘導を行った 24 時間後に細胞から total RNA を回収し、cDNA を調製した後、RT-PCR 法により *Areg* mRNA の発現解析を行った。その結果、M1 様マクロファージ細胞のみで *Areg* の mRNA 発現が認められ、誘導前のマクロファージ様細胞、および M2 様マクロファージにおいては発現が認められなかった【Fig. 6B】。

高脂肪食負荷 (HFD) マウスにおける *Areg* mRNA の発現量とマクロファージ細胞マーカー、およびケモカインの発現量に正の相関が認められたことに加え、M1 様マクロファージ細胞において *Areg* mRNA の発現が確認されたことから、*Areg* mRNA の発現量とマクロファージ細胞浸潤量との関連性、特に、炎症性の M1 マクロファージ細胞自身における *Areg* mRNA の発現が示唆された。

### 1-3-1-4. 単離した成熟脂肪細胞、および SVF における増殖因子群の発現解析

酵素分散法による *db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織から分画した成熟脂肪細胞画分 (adipocytes)、および SVF 画分由来の各 cDNA を用いて *Areg*、*Fgf13* や *Fgf21*、および *adiponectin* の mRNA の発現解析を行った。その結果、成熟脂肪細胞においてのみ *adiponectin* と *Areg* の mRNA 発現は確認されたが、*Fgf13* と *Fgf21* の発現は SVF においてのみ mRNA 発現が認められた。また、EGF ファミリーの受容体として EGFR が SVF 画分において強く発現された【Fig. 7】。以上の結果から、*Areg* は M1 様マクロファージ細胞における mRNA 発現のみならず、M1 様マクロファージ細胞の浸潤に関連して成熟脂肪細胞においても産生する新規アディポサイトカインである可能性が示唆された。

#### 1-4. 考察

内臓脂肪型肥満における白色脂肪組織の肥大過程においては、脂肪前駆細胞の増殖が関与し、また肥満と発癌リスク上昇との関連性が示唆されていることから、本章では肥満の進行に伴って発現上昇する遺伝子群から、AREG や FGF21、および FGF13 などの増殖因子を見出した。AREG は上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor, EGF) ファミリーの一つであり、細胞表面に存在する上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) の活性化によって細胞増殖や血管新生などに関与することが知られている。1993年に Hauner らの報告では、ヒト白色脂肪組織から間質幹細胞を単離し、0.01-100ng/ml の EGF により刺激した際に、脂肪細胞数が EGF の容量、および時間依存的に増加することが示され、さらに EGF 活性を特異的に阻害した場合には、脂肪細胞数が有意に減少し、EGF が脂肪細胞の増殖に関与することが示唆されている [54]。さらに、EGF は STAT シグナル経路を介してヒト脂肪組織由来の脂肪間質幹細胞の増殖を促進することも報告されており [55,56]、以上のことから、EGF ファミリーが脂肪細胞の増殖に関与することが示唆されている。一方、FGF ファミリーについても細胞増殖や細胞分化などの多彩な細胞間シグナルを担う液性因子であり、広範な種類の細胞に対して増殖作用を有することが知られている [57]。本研究で単離された FGF21 と代謝調節に関する研究報告では、FGF21 のヒトへの投与によって血糖値、および血中中性脂質濃度の低下 [58]、脂肪肝の改善効果、心血管病変のリスクファクターとなるマーカーの発現量が低下する効果が示されている [59,60]。マウスに投与した際には、褐色脂肪組織における脂肪酸分解に関与する  $\beta$  酸化因子群や *Ucp-1* などの発現量が増加するとともに、皮下型である鼠径部白色脂肪組織において褐色化白色脂肪細胞であるベージュ細胞が出現し [61]、さらに、*Pgc-1 $\alpha$*  mRNA 発現を増加させることでエネルギー消費を亢進することが報告された [62]。また一方、3T3-L1 細胞に FGF21 の投与した際には、GLUT1 タンパク質の発現量を増加させることによってインスリン非依存性グルコースの取り込みを調節することも報告され [63]、遺伝性肥満 *ob/ob* マウスに投与した際には、FGF21 の投与量に依存して血糖値、および血中中性脂質濃度を低下させ、インスリン感受性の改善することも示されている。さらに、FGF21 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、コントロールマウスに比較して血中グルコース濃度の低下や高脂肪食、および高炭水化物食摂取による体重増加や脂肪蓄積に耐性を示す [63,64]。一方、FGF13 は FGF21 と同様に肥満患者、および遺伝性肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織での発現や血中濃度が著しく増加していることが報告されているが、そ

の生理機能に関する報告例は未だない。以上のように、特に FGF21 が肥満症に関連した代謝異常に抑制的な新規なアディポサイトカインとしても考えられており [65,66]、肥満やII型糖尿病の治療における標的因子としての可能性が示されている [61,67]。一方、肥満の病態発症や進行に伴って著しく高発現する AREG の生理機能については全く報告されていない。本研究では、白色脂肪組織における AREG の発現量と肥満マウス個体の体重や精巣周囲白色脂肪組織重量が正に相関することが示され、肥満発症や白色脂肪組織の慢性炎症に関与することが強く示唆された。

以前の Xuyounian らの報告では、肺胞マクロファージ細胞や腹腔内マクロファージ細胞の *iv vitro* 培養した際の DNA マイクロアレイ解析により、*Areg* が M1 様マクロファージ細胞において高発現し、M2 様マクロファージ細胞においては極めて発現量は低いことを示されている [68]。本研究においてもマクロファージ細胞における *Areg* の発現上昇を検証するため、マウス骨髄由来単球細胞の初代培養によって *Areg* mRNA の発現量を解析した結果、*Areg* は未分化の骨髄由来単球細胞において発現は認められなかったが、炎症性の M1 様マクロファージ細胞に誘導した場合のみ高発現していた。以上の結果は、肥満白色脂肪組織においても M1 様マクロファージ細胞が AREG を産生する可能性が示唆され、さらに、AREG が新規の M1 様マクロファージ細胞マーカーとしても考えられた。M1 様マクロファージ細胞における *Areg* の発現は TNF- $\alpha$  の産生、および分泌に関与することが示唆されている [69]。一方で、TLR4 シグナル経路はマクロファージ細胞の M1 型への極性化に関与することが知られており [70]、最近の研究では、TLR4 や MAPK 経路の阻害によって、M1 様マクロファージ細胞における *Areg*、*IL-1 $\beta$*  および *Tnf- $\alpha$*  などの遺伝子発現を有意に低下させることが示された [71]。以上の結果は、白色脂肪組織内に浸潤、および蓄積する単球・マクロファージ細胞由来マーカー遺伝子の発現量と *Areg* の発現量に正に相関したことから、マクロファージ細胞の白色脂肪組織への浸潤量の増加が *Areg* の発現上昇に深く関わる可能性を示唆するものである。AREG は関節炎などの異常な免疫反応と関連していると報告されており [72]、最近、AREG が IL-6、IL-8 および、GM-CSF などを含むいくつかの炎症性サイトカインの産生を介して炎症を促進することが報告されている [73,74,75]。

AREG と細胞増殖に関しては、気管支喘息の発症においては気管支に浸潤したマクロファージ細胞が AREG を産生し、粘液産生を担う杯細胞を増殖させることで病態の進展に関与することが示唆されている [76]。さらに、AREG は乳腺の発育において重要な役割を果たすとともに、近年の研究では AREG が乳腺癌において ERK や AKT など

細胞内情報伝達経路の活性化によって乳腺細胞の増殖を促進することが報告された [77]。また、AREG は肺癌細胞や乳癌細胞に対する増殖因子として発症に関与することが報告されている [78,79]。一方、白色脂肪組織における前駆脂肪細胞の増殖因子としての可能性については、本研究においてマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞株において AREG を培養中に添加したところ、細胞増殖の指標である BrdU の取り込みに変化は認められなかった。しかしながら、白色脂肪組織由来の間質幹細胞は、脂肪細胞前駆細胞の他にも、血管内皮細胞などに分化し、増殖することで栄養や酸素供給において重要な血管新生役割を担うと考えられていることから、今後は白色脂肪組織由来の間質細胞を用いて、血管内皮細胞の増殖因子としての AREG の可能性について検証する必要がある。肥満白色脂肪組織中には、上述のように血管内皮細胞の活発な増殖に基づく血管新生だけではなく [80]、白色脂肪組織に存在するマクロファージ細胞についても肥満の形成過程で増殖する可能性が示されており [81]、マクロファージ細胞や T 細胞を含めた免疫細胞群に対して AREG が増殖因子として機能している可能性も考えられる。今後もマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞や骨髄由来マクロファージ細胞を用いて、AREG 刺激における細胞増殖などの応答性の解析なども必要である。一方、肥大化した成熟脂肪細胞が自ら分裂する可能性については不明であるが、AREG が肥満白色脂肪組織の成熟白色脂肪細胞に対しての増殖活性を有するかについての検証も興味深いと考えられる。

1-5. 図表

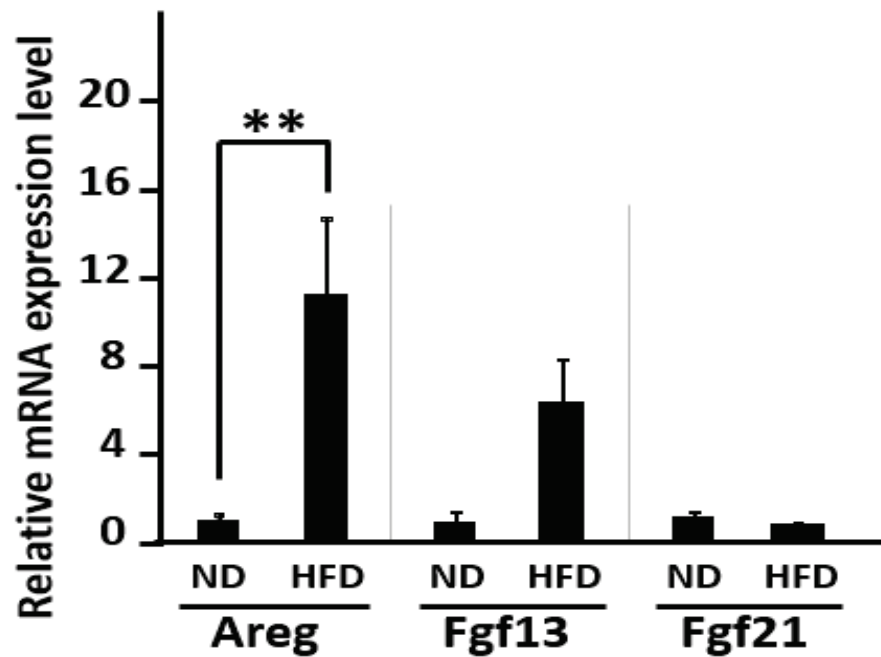


Fig.1 高脂肪食負荷による食餌性肥満マウスの白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現解析

高脂肪食負荷性肥満(HFD)マウス、およびコントロール(ND)マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg*、*Fgf13*、および *Fgf21* の mRNA 発現量を real-time PCR 法により解析した(n=4)。HFD マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現量は有意に増加した。(\*\*,  $P < 0.01$ )

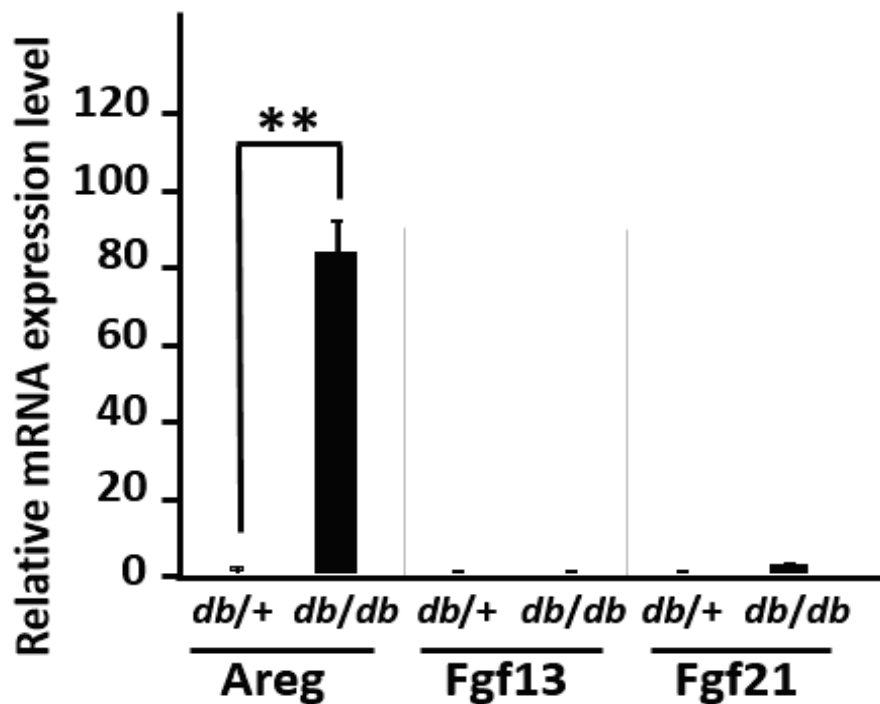
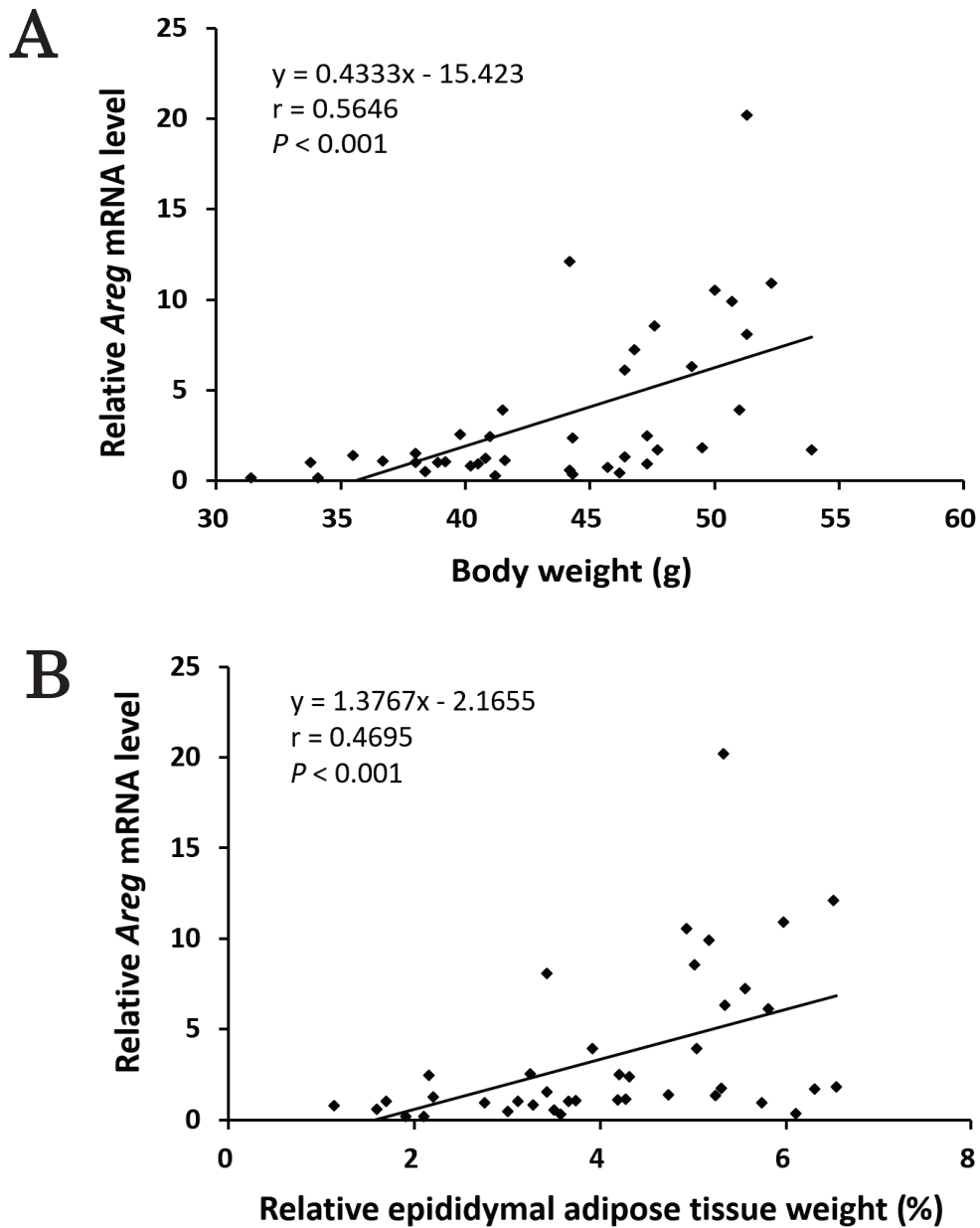


Fig.2 *db/db* マウスの白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現解析

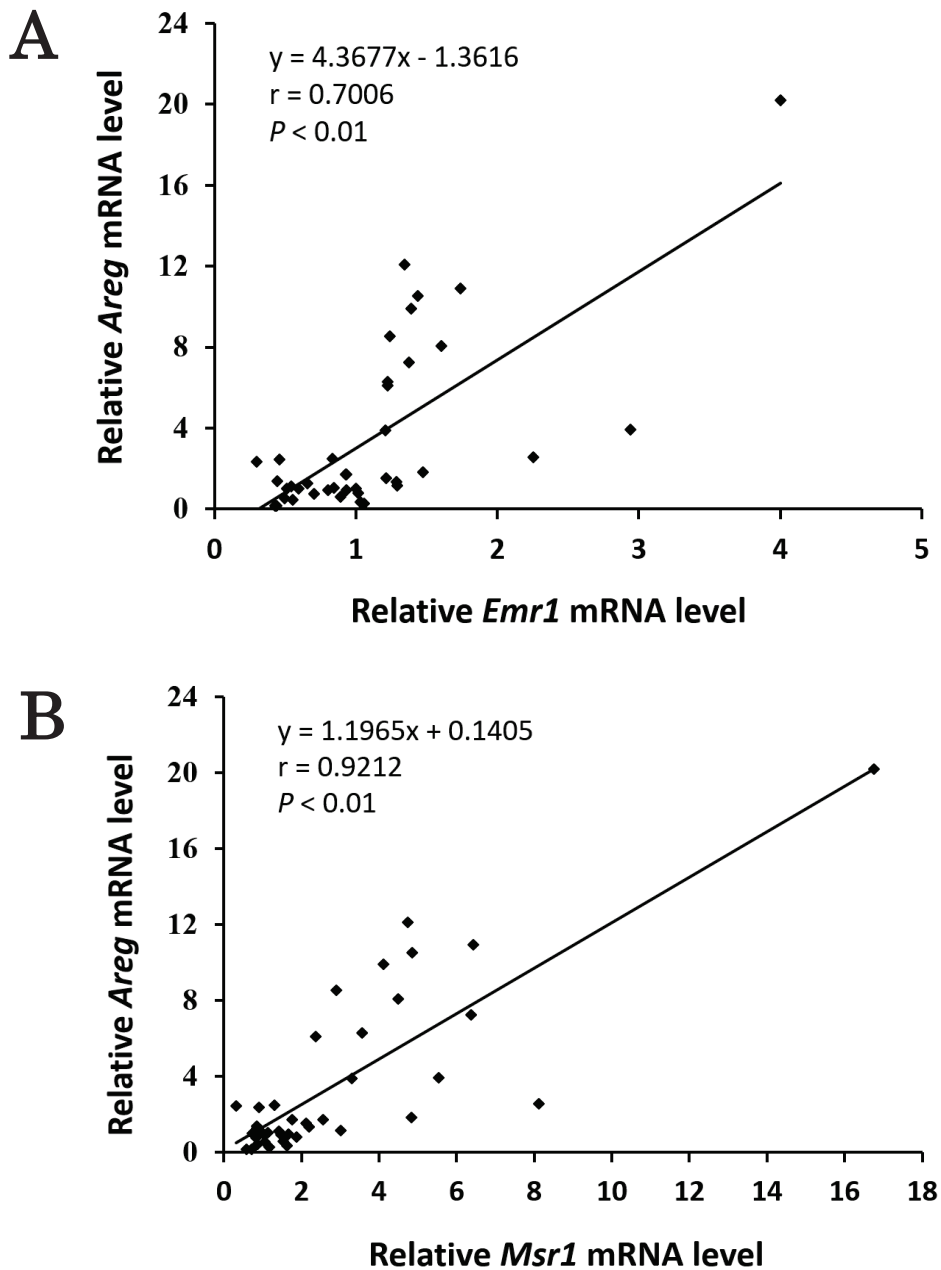
遺伝性肥満 (*db/db*) マウス、およびコントロールとして *db/+* マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg*、*Fgf13*、および *Fgf21* の mRNA 発現量を real-time PCR 法により解析した (n=3)。その結果、*db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現量は有意に増加した。 (\*\*,  $P < 0.01$ )



**Fig.3** 高脂肪食負荷による食餌性肥満マウスにおける *Areg* mRNA の発現量と体重、および精巣周囲白色脂肪組織重量との比較解析

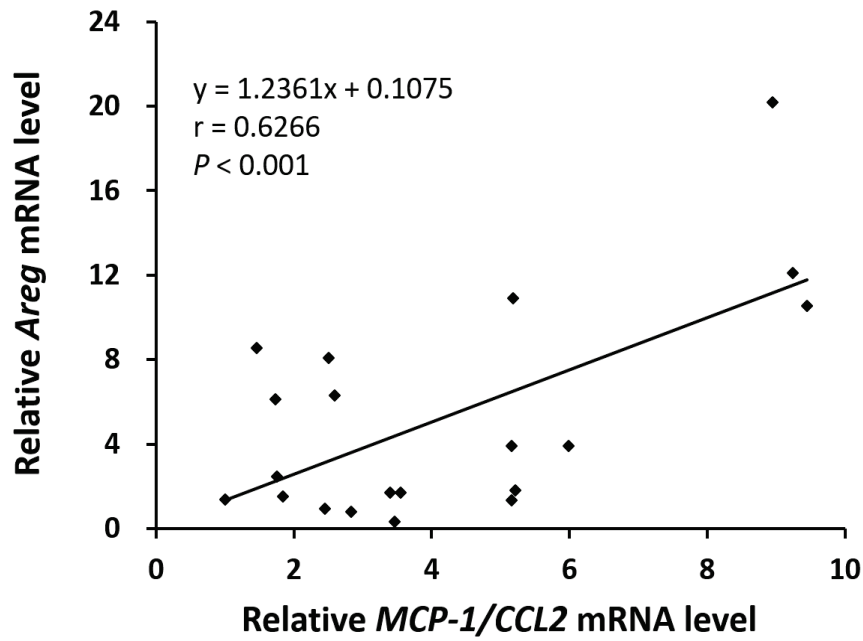
精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現量とマウス各体重、および精巣周囲白色脂肪組織重量を比較した結果、*Areg* mRNA の発現量と体重、および精巣周囲白色脂肪組織重量は正の相関を示した。





**Fig.4** 高脂肪食負荷による食餌性肥満マウスの精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA 発現量とマクロファージ細胞のマーカー遺伝子の発現量に関する解析

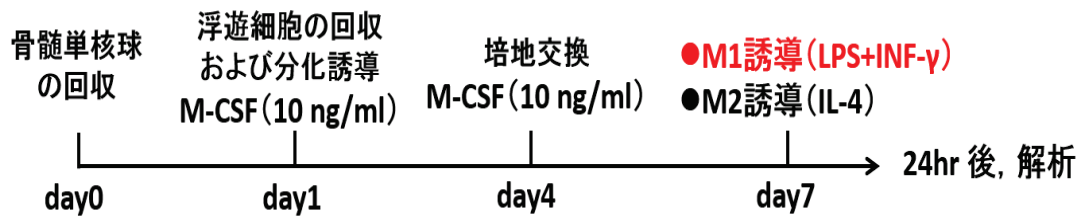
各マウス個体の精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* の発現量とマクロファージ細胞マーカーである *Emr-1*、および *Msr-1* の mRNA 発現量を比較解析した。その結果、*Areg* mRNA 発現量とマクロファージ細胞マーカーの発現量は正の相関を示した。



**Fig.5 精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* mRNA と *Mcp-1/CCL2* mRNA の発現量に関する解析**

高脂肪食負荷した食餌性肥満マウス各個体由来の精巣周囲白色脂肪組織の *Areg* mRNA の発現量とケモカインとして *Mcp-1/CCL2* mRNA の発現量を比較解析した。その結果、*Areg* mRNA 発現量と *Mcp-1/CCL2* mRNA の発現量は正の相関を示した。

A



B

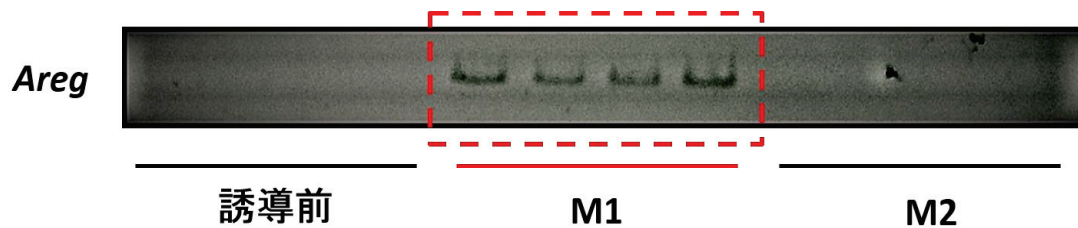
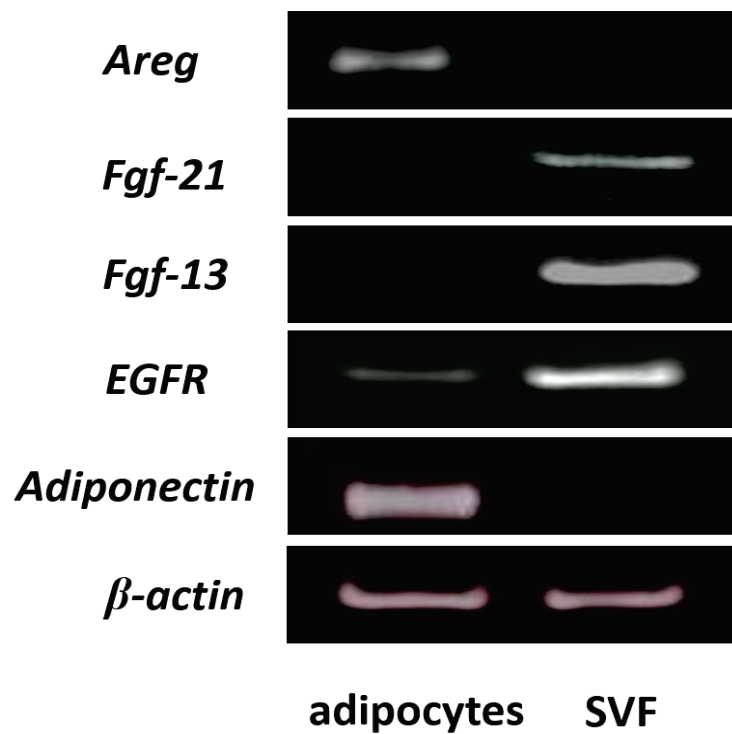


Fig.6 骨髄由来単核球の M1、および M2 マクロファージへの分化と *Areg* mRNA の発現解析

(A) 上記に従って、マウス骨髄由来細胞を M1 様マクロファージ細胞、および M2 様マクロファージ細胞に分化誘導し、24 時間後に total RNA を調製し、*Areg* mRNA の発現解析に供した。RT-PCR 法によって発現量の解析を行った結果、M1 様マクロファージ細胞にのみ *Areg* mRNA の発現が認められた (B)。



**Fig.7 成熟脂肪細胞画分、および SVF における発現解析**

遺伝性肥満 (*db/db*) マウスの白色脂肪組織を酵素分散法により成熟脂肪細胞画分、および SVF (stromal vascular fraction) に分画し、RT-PCR 法によって *Areg*、*Fgf13*、*Fgf21* および *EGFR* mRNA の発現を解析した。成熟脂肪細胞特異的な分子マーカーとして *adiponectin* 遺伝子を用いた。*Areg* は、*adiponectin* と同様の発現パターンを示し、成熟脂肪細胞画分での発現を確認した。

## 第二章 白色脂肪組織特異的 AREG 過剰発現マウスの作製、および形質の解析

### 2-1. 序論

メタボリックシンドロームとは内臓脂肪型肥満を背景としてインスリン抵抗性を発症し、2型糖尿病や高血圧症および高脂血症のリスクが上昇する基盤病態である[82]。近年、肥満内臓脂肪組織における病態誘導のメカニズムの解明や制御因子の確立が強く求められているが、現在までに、肥満の進行に伴って肥大化した白色脂肪組織からの合成、分泌量が上昇する TNF- $\alpha$ 、IL-6 や遊離脂肪酸 (free fatty acid、FFA) などのアディポサイトカインによってインスリン抵抗性を誘導することや、angiotensinogen や PAI-1 などによって血管障害が引き起こされる可能性が示されている。第一章では、肥満発症に伴って白色脂肪組織で発現量が変動する遺伝子群の中から細胞増殖に関わる因子として AREG を単離し、白色脂肪組織における発現解析と行うことで、肥満白色脂肪組織の慢性炎症との関連性を明らかにした。本章では、肥満形成における病態的役割を解明することを研究目的として AREG の生理機能の解明をさらに継続した。

AREG は上皮成長因子 (EGF) ファミリーに属する。EGF ファミリーには、EGF

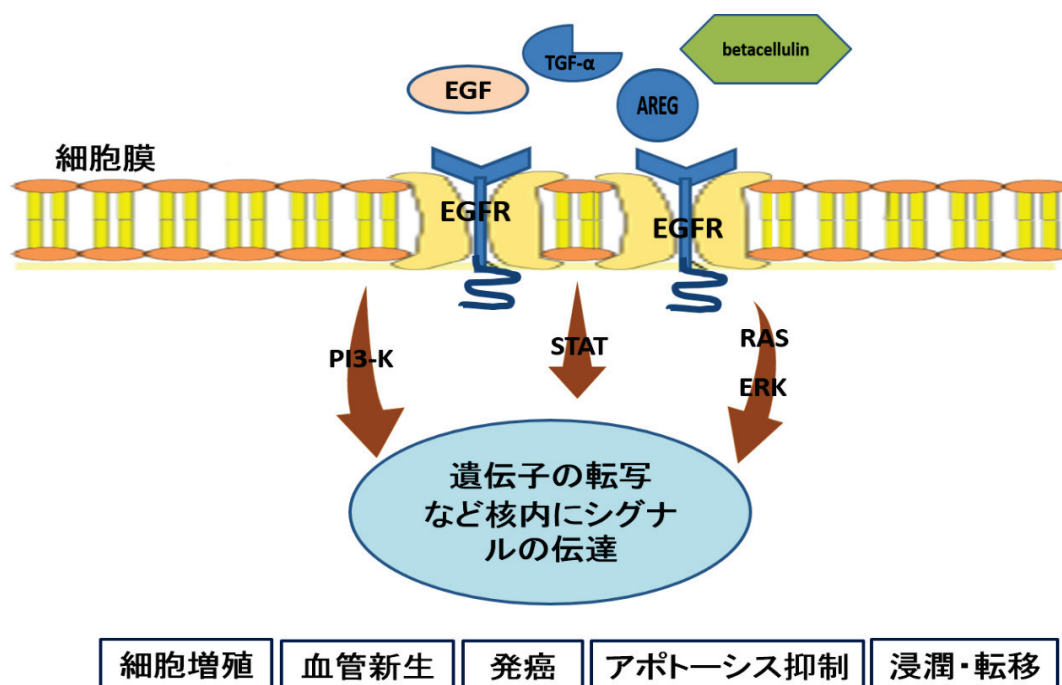


図2. EGFファミリーの生理作用

や AREG 以外にも、ヘパリン結合 EGF 様成長因子(Heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)、betacellulin や neuregulin などが含まれており、細胞表面に存在する上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合することによって様々な転写因子を活性化し [83]、細胞増殖などの調節機構に重要な役割を果たしている。AREG はヒト乳がん細胞株 MCF-7 の培養上清に由来する増殖因子として単離、同定された。他の EGF ファミリーと異なり受容体との親和性が低いものの、神経発生や神経可塑性、イオンチャネルの制御など、細胞内情報伝達系において広範な生理作用を有することが報告されている。AREG は生体中の様々な組織で発現しており、生殖組織 (乳腺、子宮、卵巣など)、循環系 (血管) や骨髄、血球系細胞、リンパ球、呼吸器、さらに消化管などで広く発現している [84]。また、生体中の様々な組織において、prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) や interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、および TNF- $\alpha$  などの炎症反応に関わるサイトカインなどの刺激によって *Areg* mRNA の合成が誘導される [85, 86][Table.1]。

AREG の生理作用に関しては、AREG 遺伝子欠損 (knockout, KO) マウスの解析が行われている。AREG KO マウスは出生可能であるとともに、繁殖能も有しており、生体内での AREG の生理機能は他の EGFR リガンドによって代償されることが示唆されている。しかしながら、雌性の AREG KO マウスでは乳腺発達の障害が生じ、産仔のマウスでは栄養失調によって死亡する例が報告され、一方、乳線組織における AREG の過剰発現は、乳線細胞の異常増殖と関係することと考えられている。また、AREG は前立腺や腎臓、および肺組織の毛細血管の形成や分枝などの発達に関与することも明らかにされている [87, 88]。

上述のように、AREG は様々な細胞増殖および分化に関与し、主に上皮系細胞の増殖因子としてだけでなく、線維芽細胞などの様々な細胞の増殖因子として作用することが報告されている [89, 90]。その中でも特に癌組織における過剰発現が報告され、癌細胞の増殖因子として重要な役割を担うことが示唆されている。肝癌細胞や肺癌細胞株を無血清下で培養した場合、癌細胞における AREG の産生、および分泌量の増加が確認されており、癌細胞の増殖因子としてだけでなく、抗アポトーシス作用として重要な役割を果たしていると考えられている [91, 92]。さらに、無血清培地において AREG 特異的抗体の投与により、AREG の生理作用を中和した際には、肝癌細胞や肺癌細胞、および結腸癌細胞の増殖が抑制されることが報告され [93]、AREG を過剰発現させた際には、autocrine あるいは paracrine 的な生理作用によって細胞増殖能の亢進も示されている [94]。乳癌細胞において AREG を過剰発現させると p53 や p21 タンパク質の発

現量の低下、およびアポトーシス阻害因子 Bcl-2 の発現量を上昇させるなど、抗アポトーシス的な特徴を示した[95]。一方、AREG は血液中においても検出可能であり、全身性の内分泌因子としても考えられている。AREG や EGF などの血中濃度に関する研究では、健常者と比較した際には、肺癌患者における血清中の AREG 濃度が有意に増加していることが示されている[96]。さらに、正常なヒトの結腸粘膜の 2-7% のみに *Areg* mRNA の発現が認められるが、原発性、あるいは転移性の結腸癌組織においては 60-70% の高頻度での *Areg* の mRNA 発現が確認されている[97]。以上の研究結果からも、増殖因子である AREG は細胞増殖や血管新生、癌細胞の浸潤と転移、およびアポトーシスに対する抵抗性などの多彩な生理作用を有する点において、癌研究の分野において注目される因子である[98, 99]。

本章では、肥満白色脂肪組織で高発現している AREG が増殖因子として前駆脂肪細胞の増殖や血管新生などに対して重要な調節機能を有する可能性を想定し、白色脂肪組織の慢性炎症の誘導と細胞増殖との機能的連携を司るサイトカインとしての役割を着想した。白色脂肪組織特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (AREG-Tg マウス) を樹立し、肥満白色脂肪組織の形成における AREG の高発現の生理意義の解明を目指した。本章ではさらに、*Areg* 遺伝子を有する遺伝型肥満 *db/db* マウスを新たに作出することで、AREG が遺伝型肥満モデルの肥満発症に与える影響の解明も目指した。

一方、AREG が増殖因子として大腸粘膜上皮細胞の増殖に関わると考えられており、

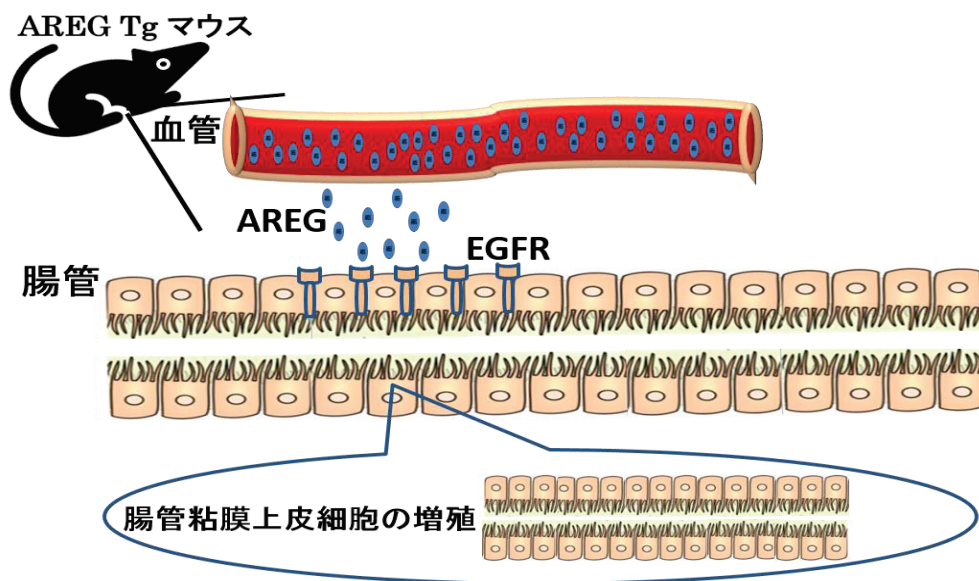


図3: AREGの血中濃度の増加と慢性炎症性腸疾患との関連性

大腸炎を含む慢性炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) の病態との関連性が想定されている。炎症性腸疾患は発症メカニズムが極めて複雑な慢性炎症性疾患であるが、病態進行とともに潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) を発症する。潰瘍性大腸炎は食生活に大きく関係し、その罹患者数は著しく増加しているが、発症のメカニズムの解明は進んでおらず、大腸への抗炎症薬の局所投与などの対処療法では寛解後の再発を完全に防ぐことができない。腸管粘膜上皮細胞層はタイトジャンクション (TJ) 構造を有し、栄養や水分の吸収に関与すると同時に、多くの腸内細菌や腸内細菌由来の代謝産物、食事由来抗原の生体内への侵入を防ぐため腸管の組織を保護し、腸内細菌に対する過剰な免疫応答を回避するための粘膜バリアを構築している。一方、大腸炎患者では粘膜バリアの損傷によって膜透過性が上昇し、外来細菌や微生物などが侵入することで炎症が引き起こされることが報告されている [100]。一方、動物モデルとしての dextran sulfate sodium (DSS) 誘導性大腸炎において TJ の変性によって腸管上皮細胞が毒性物質の感受性が強くなることが示されている [101, 102]。TJ 構造を保護することによる腸管恒常性の維持は大腸炎発症を防ぐことにおいて重要であり、TJ 構造の保全のためには、腸管粘膜上皮細胞の増殖、および修復は必須である。これら背景において、AREG が増殖因子として腸管粘膜上皮細胞の増殖やアポトーシスを制御することで、腸管保護メディエーターとして機能すると考えられている。過去の研究例においても、EGF ファミリーによる EGFR の活性化は腸管粘膜上皮細胞層の修復、および恒常性の維持において重要な役割を果たしていることが示され [103, 104]、AREG についても腸管粘膜上皮細胞の修復に関与する可能性が示唆されている [105]。事実、最近の研究では、Toll-様受容体 (TLR4) の刺激によって AREG の発現量が増加し、EGFR を活性化することで腸管粘膜上皮細胞の増殖が誘導され、腸管粘膜上皮細胞層の恒常性を維持することで、粘膜修復および腫瘍形成の予防法となりえる可能性が示唆されている [106, 107]。以上は、AREG が腸管粘膜上皮細胞の増殖、および腸管粘膜上皮構造の形成に関与し、腸炎発症の抑制や発症後の腸管粘膜上皮細胞層の修復に関与することを示唆するものであるが、AREG の血中濃度の増加が腸炎発症や腸管粘膜上皮細胞層の防御についての生理的役割については未だ解明されていない。

そこで本章後半では、AREG-Tg マウスの血中濃度が増加した AREG が大腸粘膜上皮細胞の増殖や修復を促進することで腸管の恒常性維持へ関与するとの仮説を立てた。腸管粘膜上皮細胞層に障害を引き起こす DSS の経口投与によって誘発させた DSS 大腸



炎を AREG-Tg マウスを用いて発症させ、AREG の大腸炎発症における生理的意義の解明を研究目標とした。

## 2-2. 研究材料および、実験方法

### 2-2-1. 試薬の調製、および実験材料

#### 2-2-1-1. 一般試薬

一般試薬には、主に Nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて実験を行い、制限酵素はタカラバイオ社製または東洋紡社製のものを使用した。本論文においては一部の試薬名を簡略化して記載した。

#### 2-2-1-2. Polyacrylamide gel 電気泳動用の試薬の調製

1-2-1-2 の項に準じて行った。

#### 2-2-1-3. ウェスタンブロット関連試薬の調製

##### SDS-PAGE 泳動バッファー

Tris	26.6 g
Glycine	130 g
SDS	4.5 g

蒸留水で 1 L に fill up し、5 × 電気泳動バッファーとした。使用時は、5 倍希釈した。

##### 分離ゲル(10%)

30% アクリルアミド	6.6 ml
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	6.67 ml
10% SDS	200 μl
10×APS	200 μl
TEMED	40 μl
Milli Q	6.3 ml

##### 濃縮ゲル

30% アクリルアミド	625 μl
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	50 μl
10×APS	50 μl
TEMED	5 μl

Milli Q 3 ml

ブロッキング用バッファー

Tris 12.1 g

Glycine 14.4 g

蒸留水により 1 L に fill up し、使用前に 5% (w/v) のメタノールを加えて使用した。

ブロッキング溶液 (4% スキムミルク-PBS 溶液)

スキムミルク 2 g

1×PBS 50 ml

スキムミルクを十分に溶解させて使用した。

1×PBS-T

10×PBS を蒸留水で 10 倍希釈して 1 L にし、TWEEN 20 (Sigma 社製) を 1 ml 添加した。

**2-2-1-4. DNA 抽出用試薬**

50 mM NaOH

1 M Tris-HCL (pH 8.0)

**2-2-1-5. 1.5% (dextran sulfate sodium) DSS 溶液の調製**

dextran sulfate sodium salt M.W.=36,000-50,000 (MP Biomedicals, LLC)

DSS を 1.5 mg/ml となるように水道水で希釈した。

**2-2-1-6. 実験食に用いた飼料**

実験動物用固体飼料 (オリエンタル酵母)、AIN-93G (オリエンタル酵母)、および HFD-60 (オリエンタル酵母) を用いた。

**2-2-2. 動物飼育**

**2-2-2-1. マウス受精卵に遺伝子挿入後誕生したマウスの飼育**

12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼

育を行った。生後 4 週を離乳の目安とし、水と固形飼料を自由摂取させて、トランスジェニックマウスの検定に用いた。

#### 2-2-2-2. AREG-Tg マウスの繁殖、および飼育

当研究で、脂肪組織に特異的である *aP2* (*Fabp4*) 遺伝子 promoter の下流にマウス由来の *Areg* cDNA を連結させたコンストラクトを作出し、マイクロインジェクション法を用いて、遺伝子導入した (AREG-Tg マウス)。日本チャールス・リバー株式会社より購入した雌性 C57BL マウス (10 週齢) を交配に利用した。当研究では、尾から調製したゲノム DNA を用いた transgene の検定によって遺伝子導入が確認された AREG-Tg マウスと購入した C57BL マウスを交配させ、得られた F1 マウス以降を実験に供した。生後 4 週を離乳の目安とし、マウスは水と固形飼料を自由摂取させ、12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。

#### 2-2-2-3. AREG 遺伝子を有する遺伝性肥満 *db/db* マウスの作出

*db/+* (*Dock/+Lepr*) 雌性マウス (清水実験材料株式会社) と、*aP2* promoter 領域の下流に *Areg* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を有するトランスジェニックマウス (AREG-Tg マウス) を交配させた。繁殖させたマウスの中で *Areg* 遺伝子を有する *db* ヘテロマウスを得た。さらに、*db* ヘテロマウスを交配させ、*Areg* 遺伝子を有する *db/db* (AREG-*db/db*) マウスを作出した。試験期間中は体重を毎週記録した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。

#### 2-2-2-4. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作出、および飼育

2-2-2-2. AREG-Tg マウスの繁殖の項と同様の方法で得られた F1 マウス由来の尾のゲノム DNA を抽出し、同様に transgene の検定を行った。判定された AREG-Tg マウス (8 週齢)、および同腹の野生型 (WT) マウスを本実験に供した。雄性和雌性両方を用いて、AREG-Tg マウスと同週齢の WT マウスが 2 群に分けて、DSS 誘導性大腸炎モデルを作製した。大腸炎発症には DSS を 1.5% で含む水道水を 7 日間で自由飲水させた。その後、5 日間で水道水を自由飲水させ、回復期として実験に用いた。試験期間中は体重と便性および飲水量を毎日記録した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。

### 2-2-3. 実験方法

#### 2-2-3-1. トランスジェニック (AREG-Tg マウス) マウスの作製、および検出

##### aP2 promoter を連結させた AREG 発現ベクターの構築

*aP2* (*Fabp4*) 遺伝子 promoter を組み込んだ pcDNA3.1 を亀井康富博士 (京都府立大学) より御供与頂いた。*aP2* promoter の下流に *Areg* 遺伝子を連結することで、白色脂肪組織特異的に AREG を発現させることができるコンストラクトを作製した。マウス小腸より total RNA を調製し、作製した cDNA を用いて PCR 法により、*Areg* の全長 cDNA の増幅を行った。cDNA の両端に *Xho* I 配列を付加した primer を作製し。RT-PCR によって両端に *Xho* I 配列を持つ *Areg* cDNA を作製し、DNA 精製を行った。また、*Xho* I 処理した発現ベクターを同様にして精製し。セルフライゲーションを防ぐため BAP 処理を行った。この二つの DNA 断片をライゲーションし、大腸菌にトランスフォーメーション後、plasmid の抽出を行った。インサート方向の確認のため、*aP2* の配列を持つセンス primer と AREG 配列をもつアンチセンス primer を用いて RT-PCR を行い、バンドが認められた plasmid を使用した。

使用した primer の配列を下記に示す。

AREG- <i>aP2</i> -direct-S-primer	5'-TTCAGAGGCTCATAGCACCC -3'
AREG-AS-primer	5'-GTCCCGTTTCTTGTCGAAG -3'

AREG の全配列を確認した後、*Bam*H1+*Eco*RV によってベクターを切断し、コンストラクトを回収した後、外丸祐介博士 (広島大学 自然科学研究支援開発センター) により、マイクロインジェクション法によって C57BL マウス由来の受精卵に遺伝子導入を行った。

##### トランスジェニックマウスのゲノム DNA の抽出、および検出

上記の方法によって誕生したマウスの尾の先端約 3 mm を切断し、1.5 ml のチューブに移し、300  $\mu$ l の 50 mM NaOH を添加し、ボルテックスで 3 秒間混合した後、95°C で 10 分間インキュベートした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 33  $\mu$ l を加え、室温で 3 回転倒混合した後、12,000 rpm、10 分間、4°C で遠心し、その上層液 100  $\mu$ l を新しいチューブに移し、ゲノム DNA 溶液として用いた。Transgene の確認には GoTaq Green master mix を用い、primer は下記に示したものを使用した。

AREG-Tg-check-S                    5'-AATGCCTTCTGGCAGTGAAGTCTCCAC -3'  
 AREG-Tg-check-AS                5'- CGATGTATCTGCATTGCGCCATGAATGC-3'

反応液の組成、および反応条件は以下に示す。

GoTaq Green master mix (20 µl scale)

Green master mix	10.0 µl
Nuclease free water	8.0 µl
DNA 抽出液	1.0 µl
sense primer	0.5 µl
antisense primer	0.5 µl

反応液を 95°C で 2 分間熱処理し、95°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 40 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った。後に、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。反応終了後、アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動バッファーを用い、200 V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、ゲルを ethidium bromide 溶液に 15 分間浸し、UV 照射により約 300bp の DNA 断片の増幅が認められたマウス個体はトランスジェニックマウスであると判定した。

**2-2-3-2. 白色脂肪組織の抽出、および total RNA の抽出**

朝から絶食 5 時間後にマウス精巣周囲白色脂肪組織、腎臓周囲白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、肝臓、腎臓や大腿筋、および腓腹筋を抽出して湿重量を測定した。その後、それぞれの白色脂肪組織は 15 ml 容チューブに分注した QIAzol reagent (Qiagen 社製) 2 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破碎し、30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで -80°C で保存した。白色脂肪組織からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて **1-2-3-1. total RNA の抽出** の項に準じて行った。

**2-2-3-3. 逆転写反応による cDNA の合成**

各サンプルから抽出した total RNA 溶液と RNase free distilled water を混合し、

total RNA は 500 ng から 1 µg までの一定量に調製し、RevaTra Ace RT (TOYOBO 社製) を用いて **1-2-3-2. cDNA の合成**の項に準じて cDNA 合成を行った。合成した cDNA は -20°C に保存した。

#### 2-2-3-4. RT-PCR 法による白色脂肪組織において遺伝子の発現解析

マウスの精巣周囲白色脂肪組織から合成した cDNA を用いて Go-Taq DNA polymerase (Promega 社製) による PCR 反応を行った。各サンプルは 5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動バッファーを用い、200 V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide 溶液に 15 分間浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。スピンドウンした後、PCR 用 8 連チューブに下記の反応液を均一に加えた。

#### GoTaq Green master mix (20 µl scale)

Green master mix	7.5 µl
Nuclease free water	6.1 µl
cDNA	1.0 µl
sense primer	0.2 µl
antisense primer	0.2 µl

反応液を 95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間 → 58°C 40 秒間 → 72°C 1 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

#### 2-2-3-5. Real-time PCR 法による遺伝子の発現解析

real-time PCR 反応には THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社製) を用いて **1-2-3-4. Real-time PCR 法による発現解析**の項に準じて行った。Primer と鋳型 cDNA は上記の項と同様のものを使用した。また、Primer は sense、antisense の両方を含む、終濃度 5 µM の primer set (5 µM primer set) を使用した。

### 2-2-3-6. DNA microarray 解析

AREG-Tg マウス、およびその野生型 (WT) マウスの精巣周囲白色脂肪組織群由来の total RNA を解析に供した。-80°C でエタノール沈殿させた total RNA を遠心 (12,000 rpm、4°C、15 分間) した後、上清を除去し、300 µl の 70% エタノールで洗浄して減圧乾燥させた。50 µl の RNase-free water (Distilled water DNase RNase free, Invitrogen) を加え、65°C で 3 分間熱処理して total RNA 溶液とした。Nano drop 2000 を用いて各サンプルの total RNA 濃度を算出した。200 ng 相当の total RNA に T7 promoter primer 1 µl と RNase-free water を加え、総量 7.7 µl とし、65°C で 10 分間熱処理し、氷上で 5 分間静置した。DNA microarray のハイブリダイゼーション用のプローブとして、825 ng 相当の Cyanine 3、および Cyanine 5 ラベル標識した cRNA 溶液を使用した。ハイブリダイゼーションはオリゴ DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションプロトコール (Agilent Technologies) に従い、4×44k マルチパックフォーマットの Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies 社製) を用いて行った。

下記に cRNA 標識プローブ作製における cDNA、および cRNA 標識プローブの合成方法を記す。

#### cDNA の合成

1 サンプルあたり下記の cDNA 合成用の反応液を加え、穏やかに混合した。

5×First strand buffer	2.7 µl
0.1 M DTT	1.3 µl
10 mM dNTP mix	0.7 µl
MMLV-RT	0.7 µl
RNase OUT	0.3 µl

反応液を 40°C で 2 時間インキュベートし、65°C で 15 分間熱処理して反応を停止させた後、氷上で 5 分間静置し cDNA を合成した。

#### cRNA 標識プローブの合成

合成した cDNA と下記の cRNA 標識プローブ合成用の反応液を混合した。

RNase free distilled water (Invitrogen)	10.2 µl
4×Transcription buffer	13.3 µl



0.1 M DTT	4.0 $\mu$ l
NTP mix	5.3 $\mu$ l
50% PEG	4.3 $\mu$ l
RNase OUT	0.3 $\mu$ l
Inorganic pyrophosphatase	0.4 $\mu$ l
T7 RNA polymerase	0.5 $\mu$ l

サンプルを加えたチューブを遮光して、さらに Cyanine3-CTP、あるいは Cyanine5-CTP を 1 サンプルあたり 1.6  $\mu$ l ずつ加え、穏やかに混合した後、40°C で 2 時間、遮光下でインキュベートした。

### 2-2-3-7. Western blot 法による AREG タンパク質の発現解析

#### サンプルタンパク質の調製

AREG-Tg マウス、および野生型 (WT) マウスより摘出した精巣周囲白色脂肪組織はタンパク質分解酵素を含む RIPA バッファー 1.5 ml とともに、ホモジナイザーにより破砕した。ホモジネート溶液を 1 ml のエッペンドルフチューブに移した後、12,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、上清液 200  $\mu$ l を新しいチューブに移しサンプルとして用いた。

#### タンパク質濃度の測定、および定量

サンプルに含まれるタンパク質の定量には Bio-Rad Detergent compatible (DC) Protein Assay Kit (Bio-rad Laboratories 社製) を用いた。0.1、0.5、1.0 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を準備し、Reagent A 500  $\mu$ l と Reagent S 20  $\mu$ l で A' を調製し、Reagent A' を 25  $\mu$ l ずつ新しいチューブに分注した。さらに、サンプルおよび BSA (Bovine serum albumin、Sigma 社製) 溶液を 5  $\mu$ l ずつ分注して混合した後、Reagent B を 200  $\mu$ l ずつ加え、ピペッティングにより十分混合した。これを室温で 15 分間静置した後、OD<sub>750</sub> の吸光度を測定した。吸光度計には V-530UV/UIS Spectrophotometer (JASCO 社製) を用いた。BSA の OD<sub>750</sub> の値を基に検量線を作製し、各サンプルのタンパク質濃度を計算した。

#### SDS - PAGE

第 2 章材料と方法に記載してある分離ゲルおよび濃縮ゲルを調製し、SDS - PAGE 用のゲルとした。前に計算したサンプルのタンパク質濃度より、それぞれのサンプルタ

ンパク質を同量ずつ新しいチューブに分注し、dH<sub>2</sub>O で 11  $\mu$ l にメスアップした。これにサンプルバッファーを 5  $\mu$ l 加えてピペッティング後、95°C で 3 分間熱処理し、スピンドアウン後、ゲル上にアプライした。電気泳動は 24 mA の定電流で 90 分間行った。

### ブロッティング

電気泳動終了後、直ちにゲル板を泳動装置から取り出し、分離ゲルの大きさに合わせてメンブレンとろ紙を用意し、メンブレンとろ紙は 100% メタノール 5 ml とブロティングバッファー 95 ml 混合した溶液に浸して使用した。メンブレンとゲルを密着させ、その両方はろ紙で挟んで、ブロティング装置にセットした。40 V、メンブレンの面積 (cm<sup>2</sup>)  $\times$  2 mA の定電流で 120 分間転写を行った。

### ブロッキング

ブロティング終了後、4% スキムミルクを含む PBS にメンブレンを浸し、室温で 2-3 時間振とうさせながらブロッキングを行った。

### シグナルの検出

ブロッキング終了後、メンブレンと Can Get Signal<sup>®</sup> Solution I (TOYOBO 社製) にて 1 $\times$ PBS で 500 倍希釈した抗マウス血清をハイブリパックに入れて、気泡を抜いて、液が十分浸るようにポリシーラーで密封した。4°C で一晩、一次抗体の反応を行った。翌日、PBS - T 溶液で 5 分間、10 分間、10 分間三回洗浄した。Can Get Signal<sup>®</sup> Solution I (TOYOBO 社製) にて 1000 倍希釈した抗マウス抗体とメンブレンをハイブリパックに入れ、気泡を抜いた後、ポリシーラーで密封した。これを室温で 1 時間振動させ、2 次抗体反応を行った。抗体反応終了後、PBS - T 溶液で 5 分間、10 分間、10 分間三回洗浄した。目的タンパク質の検出には Western Lightning<sup>®</sup> plus-ECL (TOYOBO 社製) を用いた。Detection reagent 1、および Detection reagent 2 を 1 : 1 の割合で混合し、メンブレンと共にハイブリパックに入れ、気泡を抜いた後、ポリシーラーで密封した。その後、暗室で化学発光シグナルを X 線フィルムによって検出した。

## **2-2-3-8. パラフィン組織切片の作製、および H&E 染色**

### パラフィン組織切片の作製

白色脂肪組織を 10% ホルマリン中性緩衝液 (Nacalai Tesque) に浸して室温で 24

時間固定した。組織を水道水で一晩洗浄し、70% エタノールに浸した。この組織を 70% エタノール、80% エタノール、90% エタノールに順に室温で 5 時間浸し、続いて 95% エタノール、99% エタノール、100% エタノールに順に室温で 3 時間浸した。さらにキシレン (Nacalai Tesque) に室温で 30 分間ずつ 3 回浸し、さらにパラフィンに 65°C で 1 時間ずつ 3 回浸した後、パラフィン包埋した。これをマイクロトームで 10  $\mu\text{m}$  の厚さの組織切片を作製し、APS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業社製) に載せた。

### パラフィン組織切片の H&E 染色

パラフィン組織切片は、そのまま水系の染色液に入れて染色することはできない。そのため、染色前には簿切片のパラフィンを溶出することが必要である。組織切片を 100% キシレン、再び 100% キシレン、100% エタノール、再び 100% エタノール、70% エタノール、1×PBS に順に 5 分間ずつ浸し、脱パラフィン処理を行った。その後、ヘマトキシリン溶液に 1 分間浸し、水道水で反応を停止させ、ヘマトキシリン染色を行った。続けて、エオジン溶液に 1 分間浸し、水道水で反応を停止させ、エオジン染色を行った。その後、80% エタノール、95% エタノール、100% エタノール、再び 100% エタノール、100% キシレン、再び 100% キシレンに順に 2 分間ずつ浸し、脱水を行った。最後に組織切片を標本封入剤 NEW M・X (封入用ものは標本用封入剤 MX : xylene=1:1 を調製した、松浪硝子工業社製) で封入し、顕微鏡で観察した。

### 脂肪細胞面積の計測

H&E 染色後の脂肪組織切片を観察し、顕微鏡の像はデジタルカメラにより撮影した。記録した画像はパソコンの画面上に表示し、LabVIEW 2016 soft により脂肪細胞の面積を測定した。計測した数値は 2  $\mu\text{m}$  に換算した。

## **2-2-3-9. ELISA 法による血中に AREG 濃度の測定**

### マウスからの採血、および血清の分離

絶食 6 時間後、マウスを麻酔下で開腹した後、1 ml シリンジ (TERUMO 社製)、および 25G 針 (TERUMO 社製) を用いて、腹部大静脈から採血を行った。その後、氷上に 1 時間静置し、遠心 (4000 rpm、4°C、30 分間) することで血清を分離し、回収した。血清の保存は -80°C に保存した。

### 血清中 AREG 濃度の測定

血清からの AREG の定量は、Amphiregulin Mouse ELISA Kit (abcam 社製) を用いた。96-well plate に血清および mouse AREG 標準液を 100  $\mu$ l 加えた。測定方法は ELISA kit の記載の方法に準じて行い、OD<sub>450</sub> の計測により濃度を算出した。

### 2-2-3-10. 血中 glucose 濃度の測定

#### マウスからの採血、および血清の分離

採血前に 125 mg/ml のグルコース溶液を作製し、体重を測定した。朝から 6 時間絶食させた後、1 ml シリンジ (TERUMO 社製)、および 22G 針 (TERUMO 社製) を用いて 2 g/kg (BW) のグルコースをマウスに腹腔内に投与した。毛細ガラス管 (TERUMO 社製) を用いて 0、15、30、60、および 120 min 時に尾静脈から採血を行った。その後、氷上に 1 時間静置し、遠心 (3500 rpm、4°C、10 分間) することで、血清を分離し、回収した。測定するまで血清は -20°C で保存した。

#### 血清中 glucose 濃度の測定

回収した血清を溶かし、3500 rpm、4°C、3 分間で遠心した後サンプルとして使用した。グルコース CII-テストワコー (Wako 社製) を用いて添付文書に記載のプロトコールに準じて血清グルコース濃度の測定を行った。

その手順を以下に示す。

検体として 2 ml 容チューブに血清 5  $\mu$ l を入れ、続いてグルコースの発色試液を 1 ml 添加した。標準試液として 2 ml 容チューブにブドウ糖標準液 I または II を 5  $\mu$ l 入れ、盲検試液として 2 ml 容チューブに発色試液を 1 ml 入れた。ボルテックスで 5 秒間混合し、37°C で恒温水槽にインキュベーションして室温に戻した後、1 時間以内に分光光度計を用いて OD<sub>505</sub> の吸光度を測定した。盲検試液と標準試液の吸光度によって検量線を作成し、検体のグルコース濃度を算出した。

### 2-2-3-11. AREG-Tg マウスのゲノム DNA の抽出、および *dbl/dbl*-AREG の検出

遺伝子導入の確認には、マウスのシッポを 3 mm 採取し、1.5 ml 容チューブに移し、300  $\mu$ l の 50 mM の NaOH を添加し、ボルテックスで 5 秒間混合した後、95°C で 10 分間インキュベートした。5 分間静置した後、1 M Tris-HCl (PH 8.0) 溶液を 33  $\mu$ l 加

え、3秒間でボルテックスした後、遠心し（12,000 rpm、4°C、10分間）、その上層液 100 µl を新しいチューブに回収し、ゲノム DNA 溶液として用いた。抽出したゲノム DNA を鋳型に、特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い検討した。

Primer 配列と PCR 条件は下記に示したものを使用した。

<i>Areg</i> -check	S	5' - AATGCCTTCTGGCAGTGAACCTCTCCAC - 3'
<i>Areg</i> -check	AS	5' - CGATGTATCTGCATTCGCCATGAATGC - 3'
<i>leptin</i> R	S	5' - GGTTAGAGATCTTTCATC - 3'
<i>leptin</i> R	AS	5' - CCATAGTTTAGGTTTGTTC - 3'
mutant <i>leptin</i> R	AS	5' - CCATAGTTTAGGTTTGTTTA - 3'

#### PCR 反応液の調製

Go taq green master mix	7.5 µl
Nuclease free water	6.1 µl
Sense primer	0.2 µl
Antisense primer	0.2 µl
DNA	1.0 µl

上記の反応溶液を混合し、サーマルサイクラー（Perkin Elmer）を用いて PCR 反応を行った。反応液を 95°C で 2 分間熱処理し、95°C、30 秒間 → 58°C、30 秒間 → 72°C、40 秒間という条件下で計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。PCR 反応終了後、30% アクリルアミドを用いて電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動バッファーを用い、200 V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、ゲルを ethidium bromide 溶液に 15 分間浸し、UV 照射により mutant *leptin* R AS プライマーを用いた PCR 反応においてのみ DNA 断片の増幅が認められたマウス個体を *dbl/db* マウスとして実験に用いた。*leptin* R AS プライマーを用いた PCR 反応と mutant *leptin* AS プライマーを用いた PCR 反応両方で PCR 断片の増幅が認められたマウス個体を *dbl*+マウスとしてコントロール群とした。同様な方法で、約 300bp の DNA 断片の増幅が認められたマウス個体はトランスジェニックマウスであると判定した。

### 2-2-3-12. *dbl/db*-AREG マウスの白色脂肪組織のパラフィン組織切片の作製、および染色

*dbl/db*-AREG マウスの精巣周囲白色脂肪組織、および腎臓周囲白色脂肪組織を摘出し、白色脂肪組織を 10% ホルマリン中性緩衝液 (nacalai tesque) に浸して室温で 24 時間固定した。その後、2-2-3-8. パラフィン組織切片の作製、H&E 染色、および脂肪細胞面積計測の項に準じて実験を行った。

### 2-2-3-13. DSS 誘導性大腸炎モデルマウス各組織の摘出、および大腸組織から total RNA 調製

朝から絶食 6 時間後に AREG-Tg マウス、および WT マウスの静脈より採血し、腎臓周囲の白色脂肪組織、肝臓、脾臓および骨格筋を摘出した。摘出した各組織重量を測定し、大腸組織は 15 ml 容チューブに分注した QIAzol reagent (Qiagen 社製) 1 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破砕して 30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。回収した血液は氷上に 2 時間静置し、4,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ 、20 分間で遠心して血清を回収した後、生化学分析まで $-65^{\circ}\text{C}$  で保存した。

大腸組織からの total RNA の調製は、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて行った。その手順を以下に記す。total RNA の調製の前に、RLT buffer 1 ml に対して  $\beta$ -mercaptoethanol を 10  $\mu\text{l}$  添加した。摘出した大腸組織重量を測定し、15 ml 容チューブに分注した RLT buffer 800  $\mu\text{l}$  に加え、ホモジナイズで完全に破砕し、total RNA の調製まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。上記の $-80^{\circ}\text{C}$  に保存していたホモジナイズ溶液を解凍し、遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、5 分間) した後、上清を新しい 1.5 ml 容チューブに回収した。回収した上清と等量の 70% エタノールを添加して転倒混合した後、カラムに添加し、遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) した。遠心後、フロースルー画分をデカントにて除去し、カラムに RW buffer を 700  $\mu\text{l}$  ずつ添加して遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) した後、フロースルーを同様に除去した。続いて、カラムにあらかじめエタノールを添加した RPE buffer を 500  $\mu\text{l}$  ずつ添加して遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 秒間) し、フロースルーを除去し、洗浄を行った。その後、再度遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、2 分間) し、カラム内の total RNA を乾燥させた。カラムを新しい 1.5 ml 容チューブにセットし、添付の RNase free water を 50  $\mu\text{l}$  ずつ滴下して遠心 (13,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1 分間) し、total RNA を回収した。回収した total RNA は濃度を測定した後、逆転写反応に利用した。total RNA 溶液には核酸溶液の 10 分の 1 容量の 3 M 酢酸ナトリウム、2.5 倍容量の特

級エタノールを加え、転倒混合により全体を均一にした後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 2-2-3-14. 逆転写反応による cDNA の合成

各サンプルからの cDNA 合成は、抽出した total RNA を 500 ng から 1  $\mu\text{g}$  までの一定量に調製し、RevaTra Ace RT (TOYOBO 社製) を用いて **1-2-3-2**. cDNA 合成の項に準じて行った。

本研究で使用した合成 primer は全て 100  $\mu\text{M}$  で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

##### mouse *Areg*

sense primer 5'- GGAGGTGGTGACATGCAAT -3'

antisense primer 5'- GTCCCGTTTCTTGTCGAAG -3'

##### mouse *Tnf- $\alpha$*

sense primer 5'- CCGATGGGTTGTACCTTGTC -3'

antisense primer 5'- CGGACTCCGCAAAGTCTAAG -3'

##### mouse *Pgc1- $\alpha$*

sense primer 5'- ATGTGTCGCCTTCTTGCTC -3'

antisense primer 5'- TGTCTGTAGTGGCTTGATTC -3'

##### mouse *leptin*

sense primer 5'- GAGACCCCTGTGTCGGTTC -3'

antisense primer 5'- CTGCGTGTGTGAAATGTCAT -3'

##### mouse *EGFR*

sense primer 5'- CCCAAGGACCACTTCACAGT -3'

antisense primer 5'- ACACTGCTGGTGTGCTGAC -3'

mouse *Egr1*

sense primer

5'- TAACTTCAGTCGTTAGTGACC -3'

antisense primer

5'- TAGCCACTGGGGATGGGTAA -3'

mouse *Egr2*

sense primer

5'- TTGGAGTGACAGTCAACTCC -3'

antisense primer

5'- TGTGCGGTAACAGCGCCATT -3'

mouse *IL-6*

sense primer

5'- CTGATGCTGGTGACAACCAC -3'

antisense primer

5'- TCCACGATTTCCCAGAGAAC -3'

mouse *L-19*

sense primer

5'- GGCATAGGGAAGAGGAAGG -3'

antisense primer

5'- GGATGTGCTCCATGAGGATGC -3'



## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. 白色脂肪組織特異的 AREG 過剰発現マウス (AREG-Tg マウス) の作製、および形質の解析

#### 2-3-1-1. AREG-Tg マウスの樹立

白色脂肪組織において特異的に発現する *aP2* (*Fabp4*) 遺伝子 promoter の下流に、マウス小腸から単離した AREG の全長 cDNA を連結させたコンストラクトを作製し [Fig. 8A]、マイクロインジェクション用に DNA 断片を精製した。マイクロインジェクション法により、C57BL マウス受精卵に遺伝子導入を行った。遺伝子導入されて誕生した 39 系統の F0 マウスの各尾よりゲノム DNA を調製し、ゲノム PCR により遺伝子挿入の確認を行ったところ、2 系統がトランスジェニックマウスであることが明らかとなった [Fig. 8B]。

#### 2-3-1-2. AREG-Tg マウスの白色脂肪組織における AREG の発現解析

AREG-Tg マウス、および WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織から総タンパク質を調製し、ウェスタンブロット法により AREG タンパク質の発現解析を行ったところ、AREG-Tg マウスにおいて AREG タンパク質量が増加していることが確認された [Fig. 9A]。また、精巣周囲白色脂肪組織から total RNA を抽出し、cDNA を調製した後、real-time PCR 法を用いて *Areg* mRNA の発現量を検討した結果、*Areg* mRNA 量の有意な発現上昇が認められた [Fig. 9B]。AREG-Tg マウスの白色脂肪組織における *Areg* mRNA の著しい発現上昇、および AREG タンパク質の検出により、導入された *Areg* 遺伝子が生理機能を有するものと考えられた。

#### 2-3-1-3. AREG-Tg マウスの各組織における *Areg* mRNA の発現解析

AREG-Tg マウスでの *Areg* mRNA 発現の組織特異性を確認するために、8 週齢の AREG-Tg マウス、および WT マウスの心臓、腎臓、肝臓、骨格筋 (大腿筋)、大腸、および精巣周囲白色脂肪組織から total RNA を抽出し、cDNA を調製した後、real-time PCR 法を用いて各組織における *Areg* mRNA の発現量の比較解析を行った。その結果、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織において *Areg* mRNA は強く発現していることが明らかとなった [Fig. 10]。この結果から、AREG-Tg マウスにおいて *Areg* が白色脂肪組織に特異的発現していることが確認された。

#### 2-3-1-4. 成熟脂肪細胞における *Areg* の発現解析、および血中 AREG 濃度の分析

酵素分散法によって AREG-Tg マウス、および WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織から分画した成熟脂肪細胞画分の cDNA を用いて、RT-PCR 法によって *Areg* mRNA の発現を解析した。その結果、成熟脂肪細胞において *Areg* mRNA の高発現を確認した [Fig. 11]。以上の結果から、AREG-Tg マウスでは白色脂肪組織の成熟脂肪細胞において AREG が産生し、分泌されることが示唆された。10 週齢の AREG-Tg マウス、および WT マウスの血清を採取し、ELISA 法を用いて血中の AREG 濃度の測定を行った。その結果、AREG-Tg マウスの血中から平均約 168 pg/ml の濃度の AREG が検出された [Fig.12A]。

#### 2-3-1-5. AREG-Tg マウスの白色脂肪組織重量の測定、および精巣周囲白色脂肪組織の脂肪細胞面積の計測

通常食によって飼育した 8 週齢の AREG-Tg マウス、および同腹の WT マウスを解剖し、白色脂肪組織を摘出した後、湿重量を測定した。その結果、精巣周囲白色脂肪組織重量は有意に低下していた [Fig. 12B]。精巣周囲白色脂肪の組織重量の減少を組織化学的に解析するために、精巣周囲白色脂肪組織の脂肪細胞サイズを検討した。8 週齢の AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織を 10% ホルマリン緩衝液で固定した後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した [Fig. 13A]。H&E 染色した後、同一面積上に存在する脂肪細胞数を計測した結果、脂肪細胞数は AREG-Tg マウスにおいて有意に増加しており、平均脂肪細胞直径は WT と比較して 6.3% 縮小していることが明らかとなった [Fig. 13B,C]。

#### 2-3-1-6. AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織における遺伝子発現解析

上記の 8 週齢の AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織から cDNA を調製し、real-time PCR 法によって遺伝子発現解析を行った。その結果、AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織において、*Tnf- $\alpha$*  や *Pgc1- $\alpha$*  の mRNA の発現上昇が認められ [Fig. 14A]、*leptin* mRNA においては WT と比較して 60% の発現減少が認められた [Fig. 14B]。*leptin* mRNA 量の低下に関しては、精巣周囲白色脂肪組織重量が有意に減少し、白色脂肪細胞の縮小に関連していると考えられた。さらに、DNA microarray 解析を行うことで発現変動する遺伝子群の網羅的な探索を行った。その結果、AREG-Tg マウスの精

巣周囲白色脂肪組織では、上記の遺伝子のみならず、中性脂質の生合成に関わる diacylglycerol O-acyltransferase 2 (*Dgat2*) や monoacylglycerol O-acyltransferase 2 (*Mogat2*) 遺伝子の発現量の低下が示され、また、EGF ファミリーなどの増殖因子に対して応答する early growth response protein 1 (*Egr1*)、および early growth response protein 2 (*Egr2*) などの mRNA 発現量の増加が見出された[Table. 2]。

### 2-3-1-7. AREG-Tg マウスの血中 glucose 濃度の測定 (GTT)

通常食によって飼育した 8 週齢の AREG-Tg マウス、および同腹の WT マウスを 6 時間絶食させた後、2 g/kg (glucose/body weight) の glucose 溶液を腹腔内に投与し、尾静脈から継時的に採血した。その結果、glucose 投与後の血中 glucose 濃度の有意な差は認められなかった[Fig. 15]。

### 2-3-2. AREG 遺伝子を高発現する *dbl/db* マウスの樹立、および形質の解析

#### 2-3-2-1. *dbl/db*-AREG マウスの樹立

実験方法の記載の手順に従って、*dbl/db*-AREG マウスを樹立した[Fig. 16]。遺伝子導入されて誕生したマウスの各尾よりゲノム DNA を調製し、ゲノム PCR により *Areg* 遺伝子挿入、および *dbl/db* 形質を確認した。また、*dbl/db*-AREG マウス、および *dbl/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織から total RNA 調製し、real-time PCR 法による発現解析を行った結果、*Areg* mRNA の高発現を確認し、*dbl/db*-AREG マウスにおける白色脂肪組織特異的な *Areg* の過剰発現が確認された[Fig. 17]。

#### 2-3-2-2. *dbl/db*-AREG-マウスの体重、および白色脂肪組織重量の検討

通常食によって飼育した *dbl/db* AREG マウス、および同腹のコントロールとして *dbl/db* マウスの体重を測定した結果、*dbl/db*-AREG マウスの体重が有意に減少した[Fig. 18]。また、*dbl/db*-AREG マウスの精巣周囲白色脂肪組織、腎臓周囲白色脂肪組織、および皮下脂肪組織重量は *dbl/db* マウスと比較して有意に減少していた[Fig. 19]。

#### 2-3-2-3. *dbl/db*-AREG マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現解析

*dbl/db*-AREG マウスの精巣周囲白色脂肪組織、および腎臓周囲白色脂肪組織を摘出し、cDNA を調製した後、RT-PCR 法を用いて *Areg* mRNA の発現量を検討した。その結果、*leptin* や *Tnf- $\alpha$*  など mRNA の発現量の有意な差は認められなかった[Fig. 20]。

#### 2-3-2-4. *dbl/db*-AREG マウスの白色脂肪組織パラフィン切片の作製、および H&E 染色

白色脂肪組織重量の減少を組織化学的に解析するために、精巣周囲白色脂肪組織、および腎臓周囲白色脂肪組織の脂肪細胞サイズの変化を検討した。*dbl/db* AREG マウスの精巣周囲白色脂肪組織、および腎臓周囲白色脂肪組織を 10%ホルマリン緩衝液で固定した後、パラフィン包埋し、組織のパラフィン切片を作製し、H&E 染色を行った。その結果、白色脂肪細胞面積の縮小が認められた[Fig. 21]。

#### 2-3-2-5. Glucose tolerance test(GTT)による糖代謝の検討

通常食によって飼育した 14 週齢の *dbl/db*-AREG マウス、および同腹の *dbl/db* マウスは 6 時間絶食した後、2 g/kg (glucose/body weight) の glucose 溶液は腹腔内に投与し、尾静脈から継時的に採血した。その結果、glucose 投与後 *dbl/db*-AREG マウスの血中 glucose 濃度の低下傾向が認められた[Fig. 22]。

#### 2-3-3. AREG-Tg マウスを用いた DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作製、および形質の解析

##### 2-3-3-1. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作製、および体重の測定

白色脂肪組織において分泌された AREG が大腸組織の機能に影響を与える可能性を考え、DSS 大腸炎の発症に及ぼす影響を検討した。実験方法の記載の手順に従って、DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを作製した[Fig. 23]。1.5% DSS 飲水投与によって AREG-Tg マウスの大腸炎を誘導した。その結果、大腸炎発症 7 日において、AREG-Tg マウスはコントロール (WT) マウスと比較して体重の有意な差は認められなかった。しかし、DSS 投与から水道水に戻した回復期において AREG-Tg マウスの体重に有意な減少は認められた[Fig. 24]。

##### 2-3-3-2. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの各組織重量の測定

AREG-Tg マウス、および WT マウスの各組織を摘出し、湿重量を測定した結果、腎臓周囲と精巣周囲白色組織重量は有意に減少していたが、肝臓、および大腿筋など組織の重量に有意な変化は認められなかった[Fig. 25]。

### 2-3-3-3. 大腸長の測定、および DAI スコアによる DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの評価

1.5% DSS の飲水投与から水道水に戻した回復期 5 日目に、AREG-Tg マウス、および WT マウスの大腸組織を摘出し、大腸長を測定した結果、有意な差は認められなかった[Fig. 26A]。さらに、便の粘性、出血量および体重を記録し、大腸炎の指標として Disease Activity Index (DAI) スコアを算出した。その結果、AREG-Tg マウスの DAI スコアは有意な減少が認められなかった[Fig. 26B]。

### 2-3-3-4. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの大腸組織における炎症因子の発現解析

AREG-Tg マウス、および WT マウスの大腸組織から total RNA を調製し、real-time PCR 法により炎症性因子である *IL-6* mRNA、および *Tnf- $\alpha$*  mRNA の発現量を解析した。その結果、AREG-Tg マウスにおいて *IL-6* mRNA、および *Tnf- $\alpha$*  mRNA の発現量に有意な差は認められなかった[Fig. 27]。

## 2-4. 考察

本章では、第一章で単離した AREG が新規のアディポサイトカインとして肥満の発症・進展に関わっていることを想定し、白色脂肪組織特異的 AREG 過剰発現マウス (AREG-Tg マウス) を作製することで、肥満における AREG 高発現の生理的、および病態的意義についての解明を試みた。AREG-Tg マウスの形質の解析においては、AREG による脂肪細胞の増殖や血管内皮細胞の増殖に伴う血管新生の亢進などにより肥満が亢進すると予想したが、それに反して通常食を与えた 8 週齢の AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織重量が WT マウスと比較して減少し、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織の組織切片を観察したところ、脂肪細胞サイズが有意に縮小しており、白色脂肪組織における AREG の高発現による白色脂肪細胞の肥大化の抑制が示唆された。一方、leptin は絶食や飢餓による脂肪組織重量の低下に応答して発現量は低下し、脂肪組織重量の増加に鋭敏に発現量が応答する液性因子として知られている[108]。AREG-Tg マウスの白色脂肪組織での *leptin* mRNA の発現量の低下は、白色脂肪組織重量の低下、および脂肪細胞サイズの縮小を裏付ける結果として捉えられる。また一方、白色脂肪組織の縮小においては、アポトーシスとの関連性も考えられた。特に、TNF- $\alpha$  は脂肪分解の促進や脂肪合成の抑制作用などだけではなく、アポトーシスの重要な調節因子であることが示されており、ヒト白色脂肪細胞やマウス 3T3-L1 細胞に TNF- $\alpha$  を投与した際には、アポトーシスを促進することも示されている。今後は、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織を用いて TUNEL 染色などによるアポトーシスの解析が必要である。さらに、*Areg* 遺伝子を高発現する遺伝型肥満 *db/db* マウスを新たに作出することで、AREG が遺伝型肥満モデルマウスの白色脂肪組織重量の低下や脂肪細胞面積を減少させ、AREG が白色脂肪組織の増大に対して負に制御する可能性が強く示された。

AREG の過剰発現による白色脂肪細胞の縮小化は細胞内脂肪滴に蓄積した triacylglycerol (TG) 量の減少によると推察されることから、*peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1a* (*Pgc-1a*) の発現量を解析したところ、AREG-Tg マウスにおいて発現量は有意に増加していた。PGC-1 $\alpha$  は脂肪細胞のエネルギー代謝の制御に関与する PPAR- $\gamma$  の co-activator として見出され[109]、骨格筋や褐色脂肪細胞において高発現し、ミトコンドリア合成やエネルギーの消費に関与することが知られている[110]。*Pgc-1a* が発現上昇することによって、脂肪酸の分解やエネルギーの消費が促進し、TG の分解が引き起こされた可能性が考えられ、脂肪分解やエネルギー消費を促進することによって白色脂肪組織の形成に負に制御した可能性が示唆さ

れた。興味深いことに、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織において *Tnf- $\alpha$*  の発現量も有意に増加していたが、TNF- $\alpha$  はラットやヒトの初代脂肪細胞培養細胞における脂肪分解を促進することが報告されている[111,112]。また、白色脂肪細胞の縮小と炎症性サイトカインの発現量の増加の関連性が指摘されており、AREG の過剰発現によって、白色脂肪細胞が縮小する際に遊離脂肪酸を放出し、放出された遊離脂肪酸が toll-like receptor 4 (TLR4) を介して炎症を誘導している可能性が考えられ[113]、今後、血中の遊離脂肪酸や glycerol 濃度などの解析が必要であると考えられた。白色脂肪組織の縮小に伴い、*Pgc-1 $\alpha$*  や *Tnf- $\alpha$*  などの遺伝子発現の変動などの興味深い形質が得られたことから、さらに DNA microarray 法により AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織において発現変動する遺伝子を網羅的に探索した[table.2]。AREG-Tg マウスにおいて、TG 合成経路において重要な役割を担う *diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2)* や *monoacylglycerol O-acyltransferase 2 (Mogat2)* の遺伝子発現が低下していることが明らかになった。特に、DGAT2 は acyl-CoA の acyl 基を diacylglycerol に付加することで TG 合成を担う律速酵素であり、DGAT2 欠損マウスでは TG 合成の障害を伴って出生後に死に至る[114]。また、早期発症型肥満症の原因遺伝子に関する positional cloning の結果、chromosomal 11q13 に map された DGAT2 の変異が報告され、臨床、肥満病態との関連性も指摘されている[115]。さらに加えて、DGAT2 は leptin による TG 生合成の調節に介在する酵素としても注目されており[116]、*Dgat2* の発現量が低下することで白色脂肪細胞の脂肪蓄積に障害が生じている可能性が示唆されたものの、これら因子群が AREG-Tg マウスの形質に関与した可能性については今後解析を行う必要がある。

AREG-Tg マウスの作出は、遺伝性肥満 *db/db* マウスや高脂肪食負荷 (HFD) マウスの肥満発症、および進展に関与する因子として AREG に着目した経緯があり、以上の結果は AREG が肥満に対して抑制性に働くことは一見矛盾する結果である。しかしながら、当研究室における *db/db* マウス由来の白色脂肪組織の網羅的な遺伝子発現解析の結果からは、エネルギー消費に関する *Ucp-1* の著しい発現上昇や慢性炎症に関連した単球・マクロファージ細胞の極性に関しても抗炎症性 M2 型マーカーである *arginase-1* や *IL-10* などに関しても著しい発現上昇を確認しており、肥満の進展過程における AREG の発現誘導も counter-regulation の一つとして捉えられるかもしれない。DNA microarray 解析の結果、AREG の過剰発現による白色脂肪組織における *Egr-1* や *Egr-2* の高発現も確認された[117]。最近、Chandra らによりマウス間葉系幹細胞に EGF

を作用させた場合に、*Egr-1*や*Egr-2*が発現誘導することで細胞増殖を促進させることが報告されており[118]、高発現させた AREG は白色脂肪組織において autocrine、あるいは paracrine 的に機能している可能性を示すものであるが、今後はどの細胞群が AREG に応答したかについて検証することが必須であろう。脂肪細胞の増殖と脂肪細胞分化の綿密なバランス調整の観点からも、脂肪細胞の増殖の促進が単純に脂肪組織重量の増加を引き起こさないとも考えられるが、今後は、AREG-Tg マウスを用いて長期の BrdU 投与を行うなど、白色脂肪組織における増殖性細胞の観察を行うことが急務であると考えられるとともに、培養白色脂肪細胞に AREG を添加した場合の細胞増殖、および細胞の形質変化を解析することも必須であろう。いずれにしても、AREG-Tg マウスを利用することで、白色脂肪組織における上皮系増殖因子 (EGF) の生理機能を探索することはその新規性も含め、極めて意義は大きいものと考えられる。

本研究では、AREG-Tg マウスにおいて AREG の血中濃度が上昇していることから、白色脂肪組織から分泌された AREG が増殖因子として大腸粘膜上皮細胞の増殖に関与すると考え、慢性大腸炎の発症や大腸上皮細胞層の損傷後の回復に関連するアディポサイトカインとしての可能性を想定した。DSS 経口投与によって AREG-Tg マウスを用いて大腸炎モデルを作出した。DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの炎症評価においては、摂食量の低下、体重減少、糞便の粘性や血便の混入の程度などを指標として算出される DAI スコア、TNF- $\alpha$  や IL-8 など炎症性サイトカインの血中濃度や大腸長、および大腸粘膜の損傷を組織化学的に解析が利用されている。本研究において、AREG-Tg マウスの大腸長や大腸炎発症の DAI スコアは WT マウスと比較したところ差異が認められなかったから、大腸の炎症状態に影響は与えていないと考えられた。近年の研究で、炎症性腸病患者や炎症性腸疾患動物モデルの腸管において活性化した抗原提示細胞が T 細胞活性化を引き起こすことで TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 および IL-17 などの炎症性サイトカインを過剰に発現させることが報告されているが[119,120,121]、特に、大腸炎症の発症に伴う TNF- $\alpha$  濃度の増加は大腸粘膜組織の損傷と関連し[122,123]、TNF- $\alpha$  の中和抗体が炎症性腸管疾患の治療において利用されている。しかし、本研究における AREG-Tg マウスの大腸組織において TNF- $\alpha$  や IL-6 の mRNA 発現量においては有意な差が認められず、大腸の炎症状態に差はないものと考えられた。一方、AREG-Tg マウスの血中 AREG 濃度の上昇が認められているが、約 168 pg/ml の血清濃度であり、腸管粘膜上皮細胞の増殖などの生理作用としては低濃度である可能性が考えられた。一方で、興味深いことに、血中の AREG 濃度の増加は大腸炎の発症に対して影響を与え



なかったが、回復期における AREG-Tg マウスの体重増加を有意に遅延させ、AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織や腎臓周囲白色脂肪組織重量は有意に減少しており、白色脂肪組織の形成における負の制御因子としての可能性が強く考えられた。

また、Nam らの報告では、ヒト由来大腸癌細胞株に組換え AREG タンパク質を投与すると糖輸送に関する遺伝子 glucose transporter type 1 (*GLUT1*) や sodium /glucose cotransporter 1 (*SGLT1*) の発現が増加させ、細胞の糖の取り込みや嫌氣的な乳酸合成に関与することが示されている。AREG が嫌氣的解糖系を促進することでワールブルグ効果に関与する可能性から大腸癌腫瘍形成への関与が示唆されており [124]、AREG-Tg マウスを用いて azoxymethane の皮下投与などの大腸癌モデルを作製することで前癌病変の発生頻度や発癌などに与える影響を検証することも興味深いと考えられる。

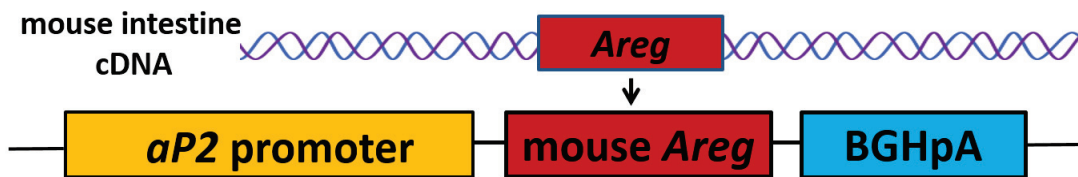
2-5. 図表

Endogenous and exogenous stimuli leading to AREG synthesis	
Endogenous stimuli	Studied cell line/tissue
D3 vitamin	Mammary carcinoma
IL-1 $\alpha$ and TNF- $\alpha$	Cervix epith. and carcinoma
TGF- $\beta$	Lung adenocarcinoma A549
Androgens	Prostate carcinoma
Progesterone	Murine uterus
	Hamster uterus
Insulin	Prostate carcinoma
Hypoxia	Intestinal epithelial cells
Oxidative stress	Rat gastric epithelial cells
Exogenous stimuli	Studied cell line/tissue
Particulate matter	Epithelial cells
Dioxine	Mouse ureter
Tobacco smoke	Oral epithelial cells
	Lung epithelial cells

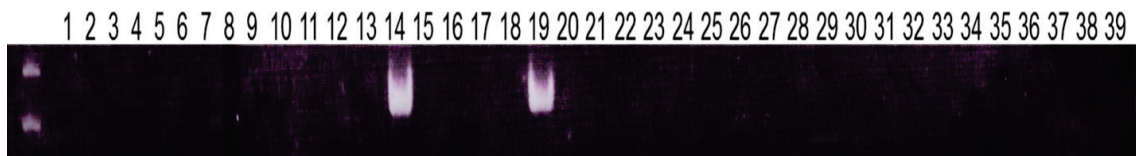
Table.1 AREG の発現誘導に関する刺激

上記に示すように、AREG は様々な刺激によって発現が誘導される。

A



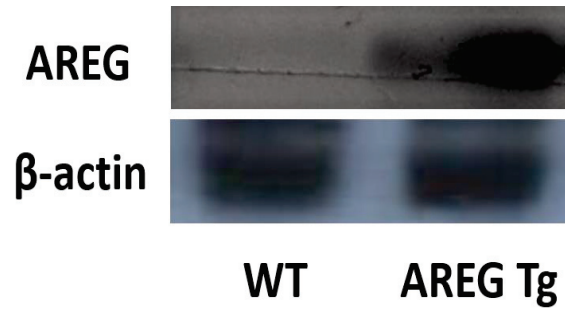
B



**Fig.8** トランスジェニックマウス作製のコンストラクト、およびトランスジェニックマウスのPCR法による確認

白色脂肪組織特異的 *aP2* プロモーターの下流にマウス由来の *Areg* cDNA を連結させたコンストラクトを作製した (A)。マイクロインジェクション法によりマウス受精卵に遺伝子挿入して誕生した F0 マウス 39 系統に対してゲノム PCR 法を用いて遺伝子解析を行った。その結果、2 個体に transgene の挿入を確認した (B)。

A



B

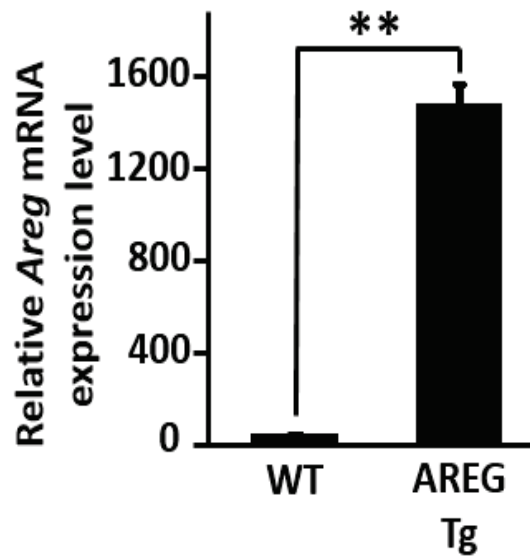
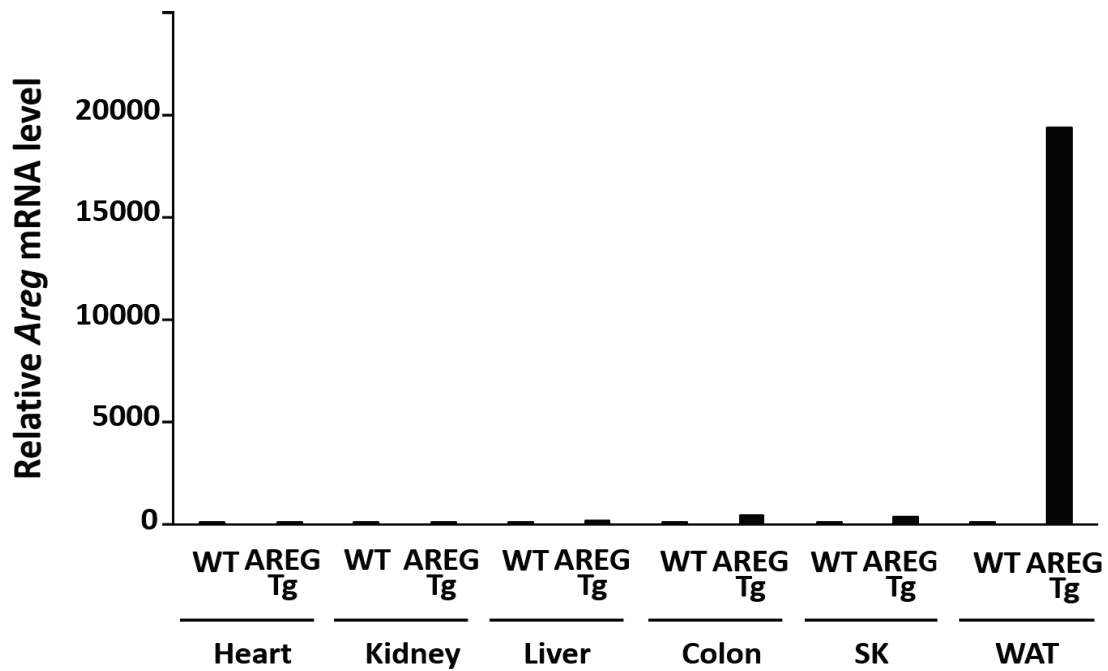


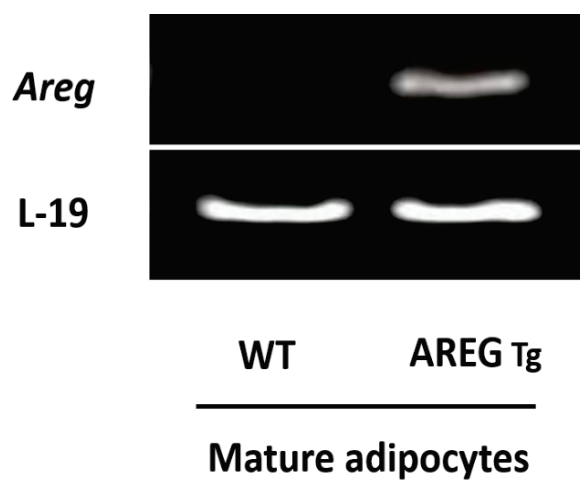
Fig.9 精巣周囲白色脂肪組織における *Areg* 遺伝子の発現解析

AREG-Tg マウス、および(wild type) WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織からタンパク質を抽出し、Western blot 法により AREG タンパク質を検出した(A)。また、total RNA を抽出し、*Areg* 遺伝子の発現量を real-time PCR 法によって解析した(B)。その結果、AREG-Tg マウスにおいて AREG タンパク質や *Areg* mRNA の発現を確認した。(\*\*,  $P < 0.01$ )



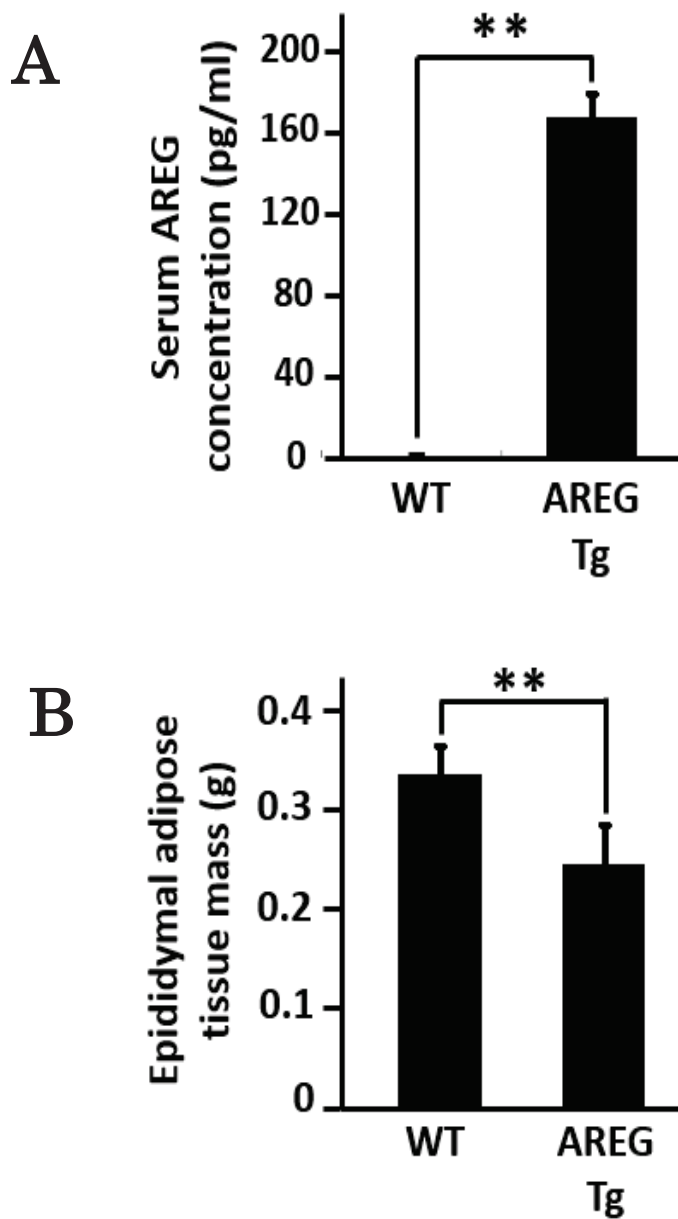
**Fig.10 AREG-Tg マウスの各組織における *Areg* mRNA の発現量の解析**

AREG-Tg マウス、および WT マウスから心臓(Heart)、腎臓(Kidney)、肝臓(Liver)、大腸(Colon)、骨格筋(Skeletal muscle, SK)、および白色脂肪組織(White adipose tissue, WAT)を摘出し、total RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を調製した。real-time PCR 法により *Areg* mRNA の発現量を解析した結果、白色脂肪組織において有意に増加した。



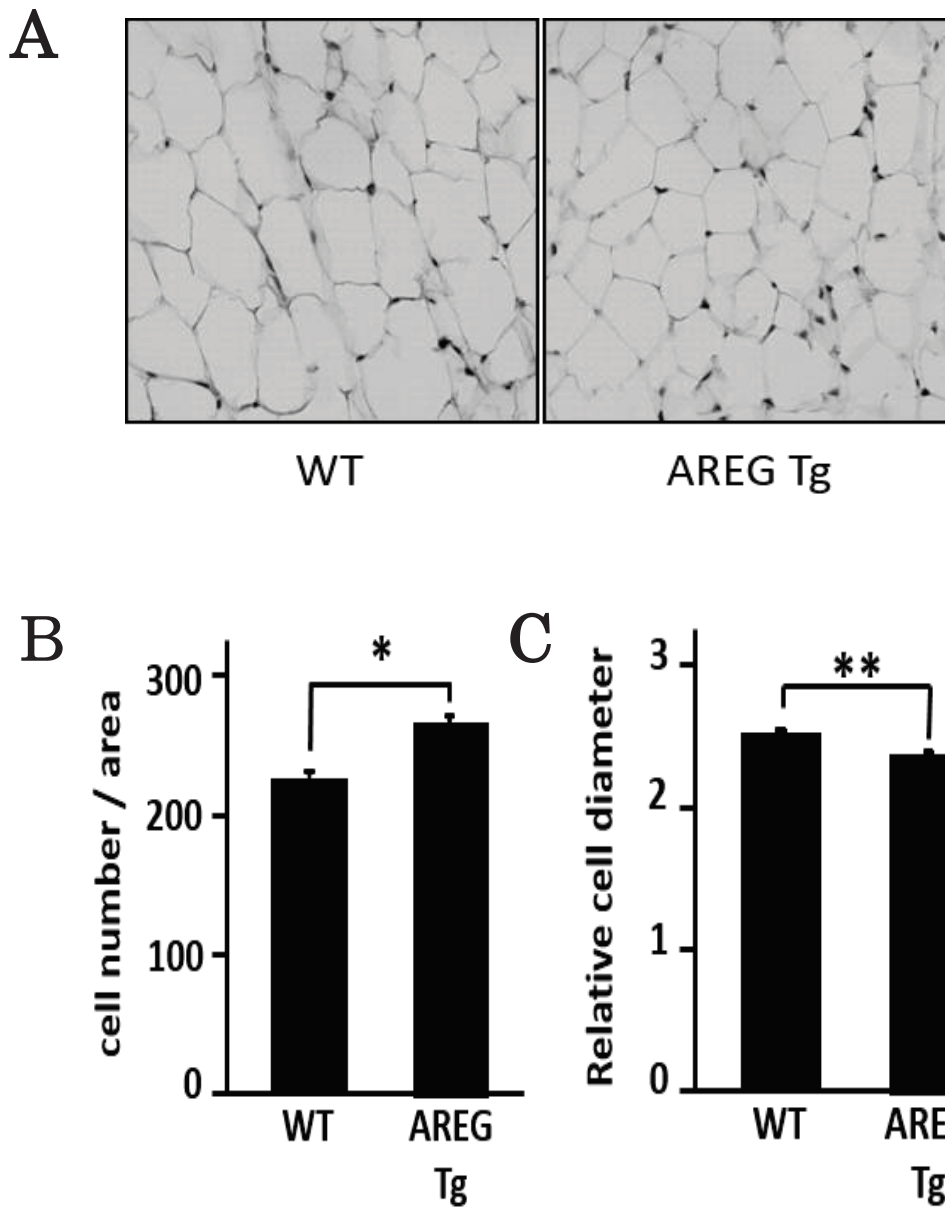
**Fig.11** 白色脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞における *Areg* mRNA の発現解析

酵素分散法を用いて AREG-Tg マウス、および WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織から成熟脂肪細胞を分画し、RT-PCR 法によって *Areg* mRNA の発現を解析した結果、AREG-Tg マウスの成熟脂肪細胞画分に *Areg* mRNA が検出された。



**Fig.12 AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織重量、および血中 AREG 濃度の検討**

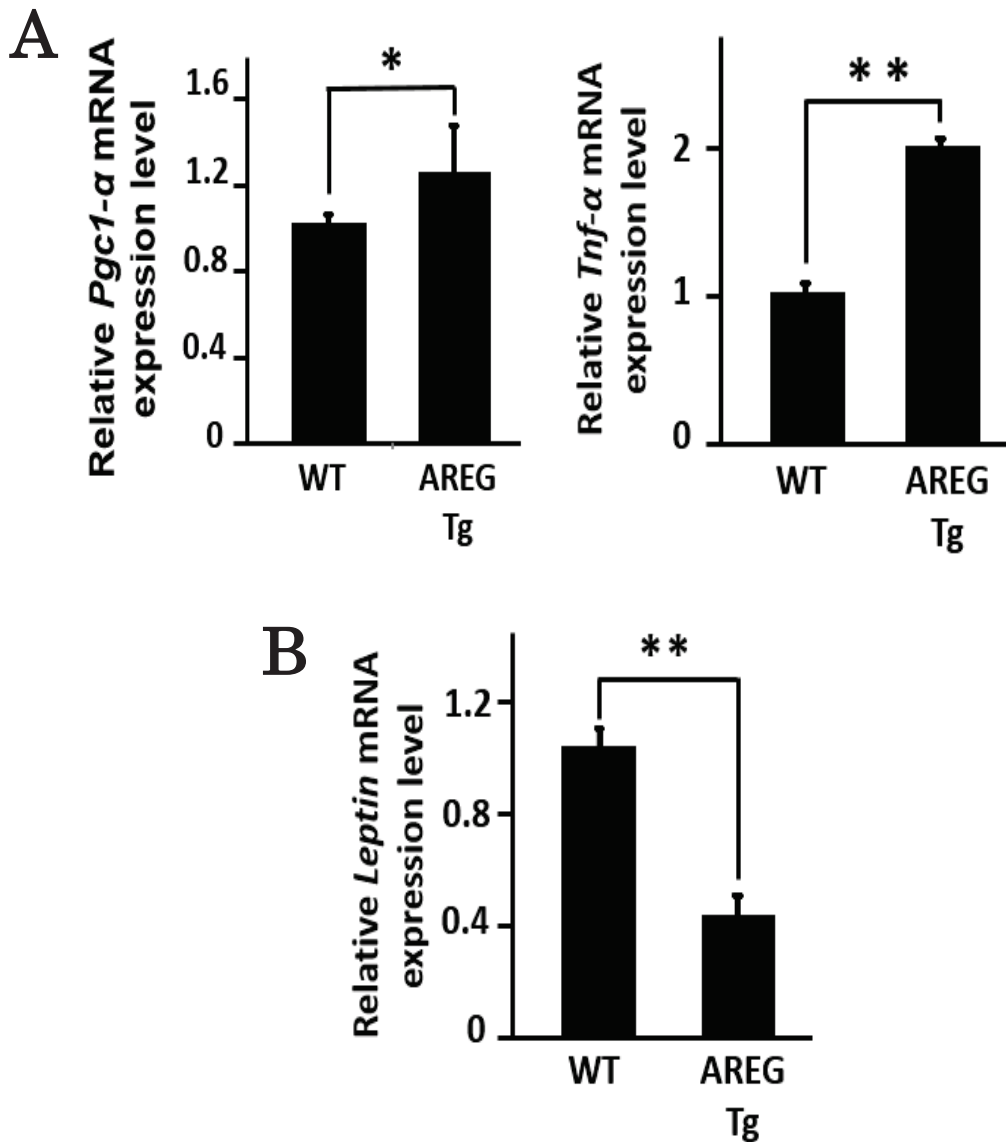
ELISA 法による血中の AREG 濃度を定量した結果、AREG-Tg マウスの血清において約 168 pg/ml の AREG タンパク質が検出された (A)。また、AREG-Tg マウス、および同腹の WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織を摘出し、湿重量を測定した結果、AREG-Tg マウスにおいて有意に減少していた (B)。(\*\*,  $P < 0.01$ )



**Fig.13 精巣周囲白色脂肪組織における単位面積当たりの細胞数、および脂肪細胞の平均直径の解析**

8週齢の AREG-Tg マウス、および WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織のパラフィン切片を作製し、H&E 染色を行った (A)。作製した白色脂肪組織由来の標本面積当たりの細胞数と脂肪細胞の平均直径を算出したところ、細胞数は AREG-Tg マウスにおいて有意に増加しており (B)、細胞直径は AREG-Tg マウスにおいて有意に減少していたことから (C)、脂肪細胞サイズが縮小したことが示唆された。(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )





**Fig.14 AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織における遺伝子発現解析**

AREG-Tg マウス、および WT マウスの精巣周囲白色脂肪組織より total RNA を調製し、real-time PCR 法により発現解析を行った。*Pgc1-α* や *Tnf-α*、および *leptin* mRNA の発現量を解析した結果、AREG-Tg マウスにおいて *Pgc1-α* および *Tnf-α* の有意な発現量の増加が認められ (A)、また、*leptin* mRNA の発現量が減少していた (B)。

(\* ,  $P < 0.05$ ; \*\* ,  $P < 0.01$ )

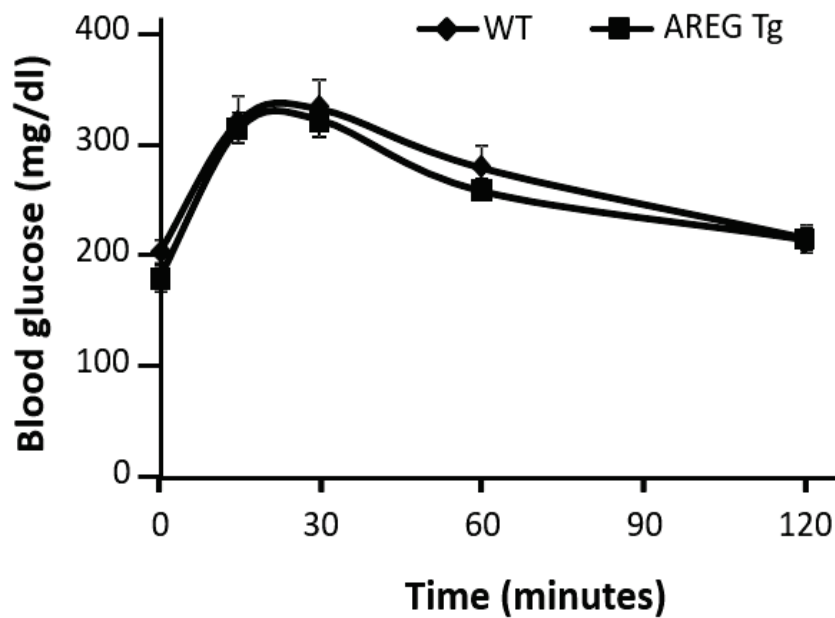


Fig.15 Glucose tolerance test(GTT)による糖代謝に関する検討

glucose を 2 g/kg 体重になるように腹腔内投与をした後、尾静脈より採血を行った。血中 glucose 濃度の測定を行った結果、有意な差は認められなかった。

Gene ID	Gene symbol	Gene description	Fold change	P value
<b>Growth factors</b>				
NM_009505	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2.06	0.000
NM_010512	IGF1	insulin-like growth factor 1	1.57	0.004
NM_010197	FGF1	fibroblast growth factor 1	-0.48	0.000
NM_013518	FGF9	fibroblast growth factor 9	-0.43	0.000
NM_010200	FGF13	fibroblast growth factor 13	-0.35	0.000
NM_008005	FGF18	fibroblast growth factor 18	-0.18	0.000
<b>Apolipoproteins</b>				
NM_009692	ApoA1	apolipoprotein A 1	3.41	0.000
NM_013474	ApoA2	apolipoprotein A 2	5.53	0.000
NM_007469	ApoC1	apolipoprotein C 1	1.69	0.000
NM_007470	ApoD	apolipoprotein D	2.11	0.000
NM_013475	ApoH	apolipoprotein H	5.85	0.000
NM_018816	ApoM	apolipoprotein M	2.46	0.003
NM_029419	ApoL3	apolipoprotein L 3	-0.17	0.000
<b>Inflammation and cytokines</b>				
NM_009398	Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6	1.89	0.000
NM_007913	Egr1	early growth response 1	5.87	0.000
NM_010118	Egr2	early growth response 2	3.88	0.000
NM_133775	IL-33	interleukin 33	-0.47	0.000
<b>Lipid and glucose metabolisms</b>				
NM_017399	Fabp1	fatty acid binding protein 1	7.99	0.000
NM_146187	Ffar2	free fatty acid receptor 2	1.57	0.003
NM_007988	FAS	fatty acid synthase	-0.57	0.001
NM_026384	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	-0.62	0.007
NM_177448	MOGAT2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	-0.34	0.000
NM_145572	Gys2	glycogen synthase 2	-0.39	0.000
NM_008493	Leptin	leptin	-0.41	0.000

**Table.2 AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織において発現変動する遺伝子群の解析**

DNA microarray 法を用いて AREG-Tg マウスの精巣周囲白色脂肪組織にける遺伝子発現の網羅的な解析を行った。

### Areg遺伝子を有するdb/dbマウスの作製

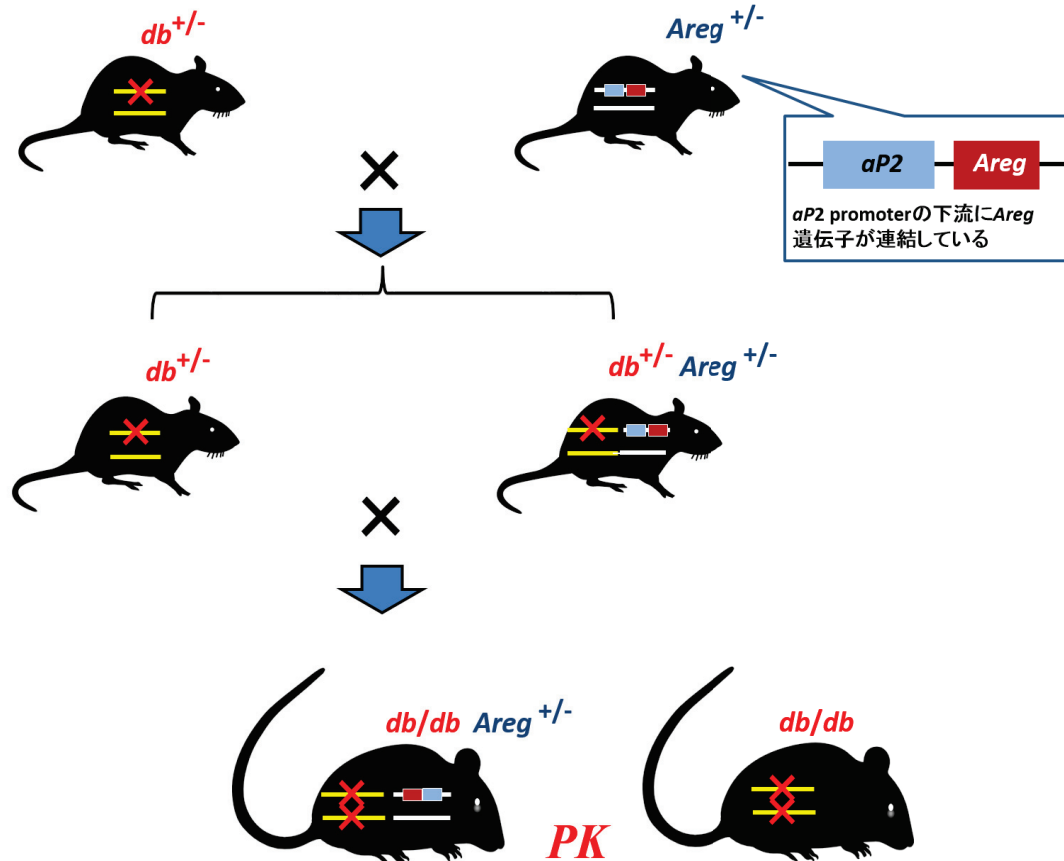
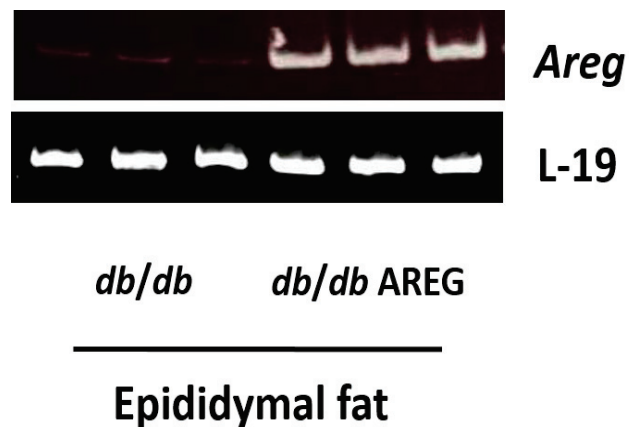
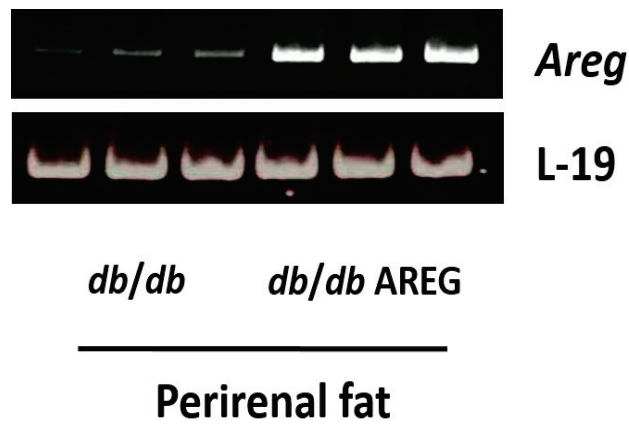


Fig.16 *Areg* 遺伝子を高発現する遺伝性肥満 *db/db* マウスの作製

上記の手順に従って、*db*<sup>+</sup>(*Dock*<sup>+/+</sup>*Lepr*)マウスと *Areg*-Tg マウスを交配させた。*Areg* 遺伝子を有する *db* ヘテロ (*db*<sup>+</sup>) マウスを得た後、*db* ヘテロマウスを再度交配させ、*Areg* 遺伝子を有する *db/db* (*db/db*-*Areg*) マウスを作出した。



**Fig.17 *db/db*-AREG マウスの白色脂肪組織における *Areg* mRNA の発現解析**

*db/db*-AREG マウス、および *db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織において *Areg* mRNA の発現量を解析した結果、*db/db*-AREG マウスにおいて *Areg* mRNA は有意な増加が認められた。(L-19 は内在性コントロールとして使用された。)

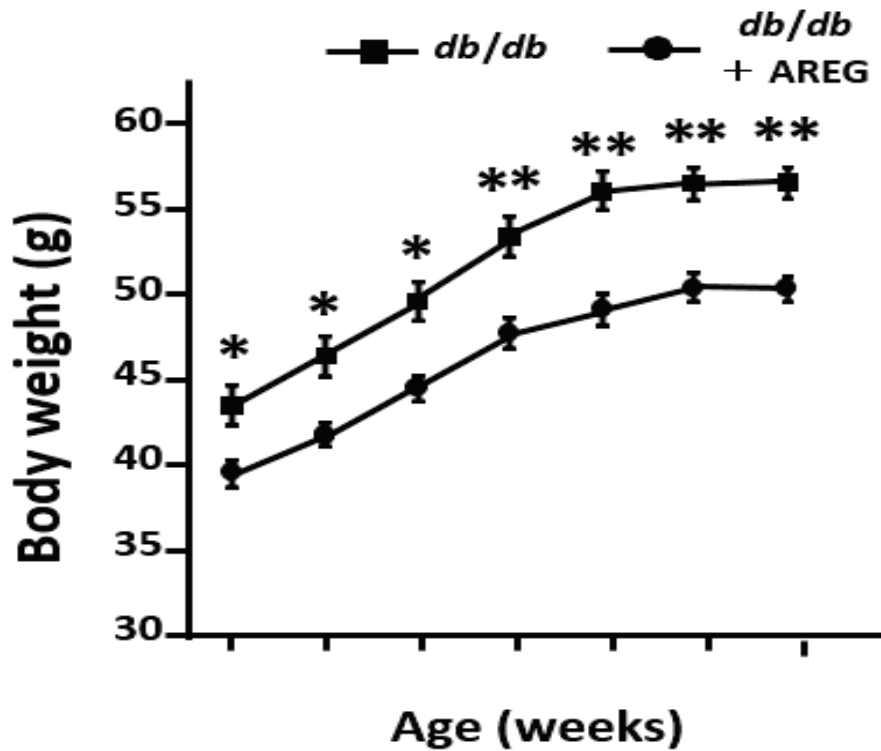


Fig.18 *db/db*-AREG マウスと *db/db* マウスの体重の比較解析

*Areg* 遺伝子を高発現する遺伝性肥満モデル (*db/db*-AREG) マウス、および通常の遺伝子肥満モデル *db/db* マウスを自由摂食させ、体重を測定した。その結果、*db/db*-AREG マウスの体重は有意に低下した。(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

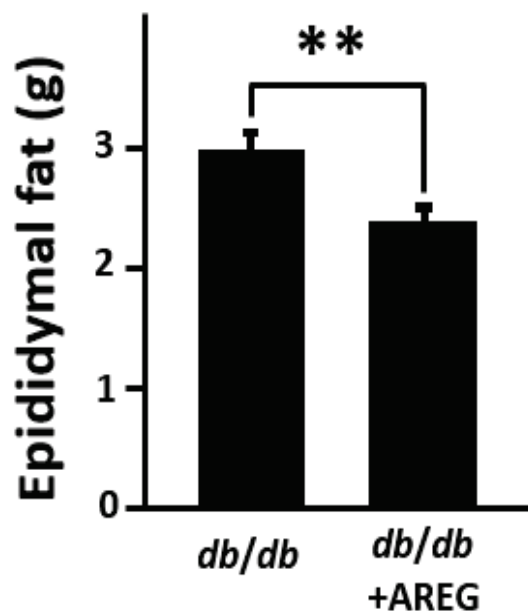
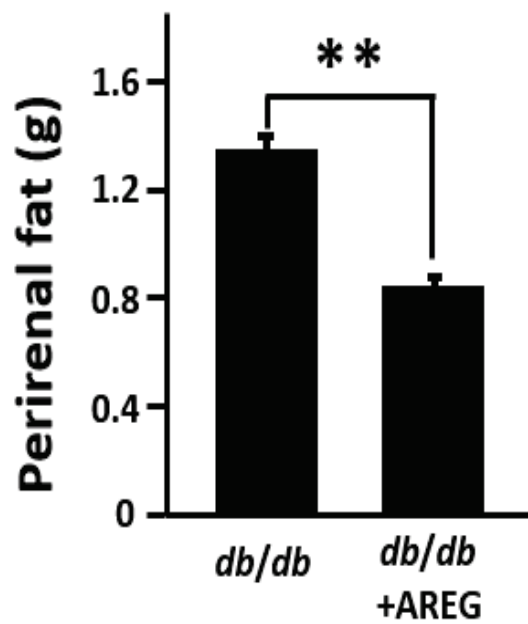
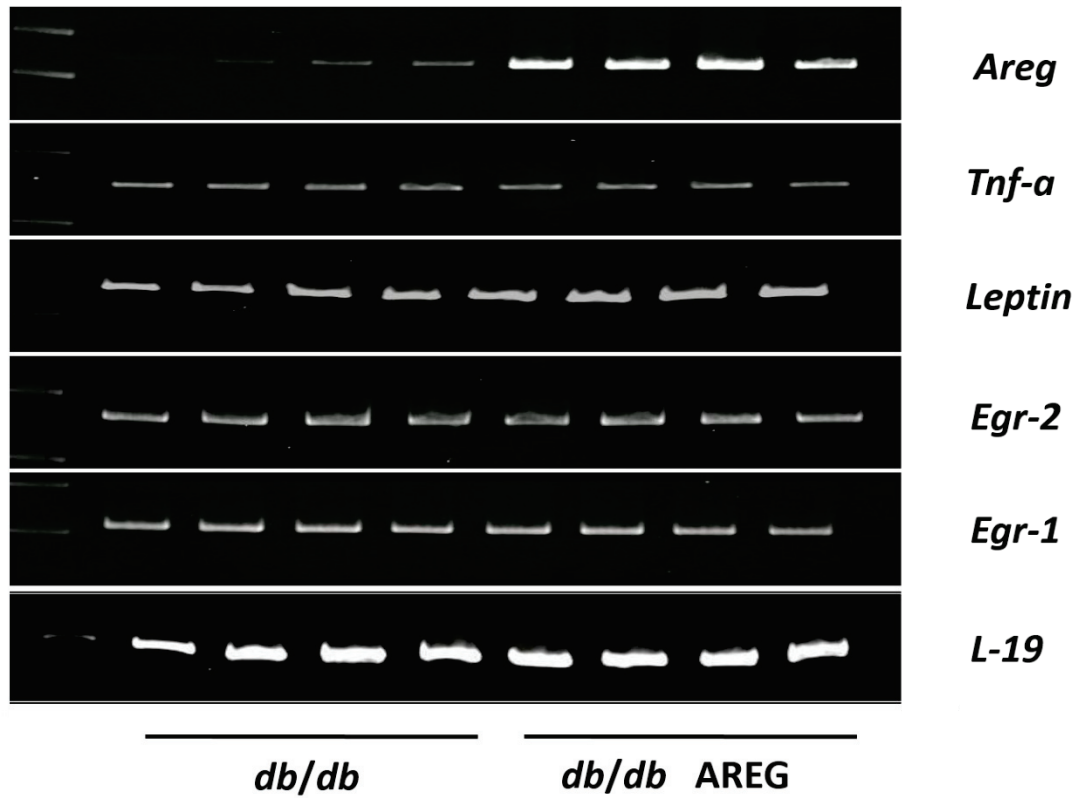


Fig.19 *db/db*-AREG マウスの白色脂肪組織重量の検討

*db/db*-AREG マウス、および同腹の *db/db* マウスの腎臓周囲、および精巣周囲白色脂肪組織を摘出し、湿重量を測定した結果、腎臓周囲と精巣周囲白色組織重量は有意に低下していた。(\*\*,  $P < 0.01$ )

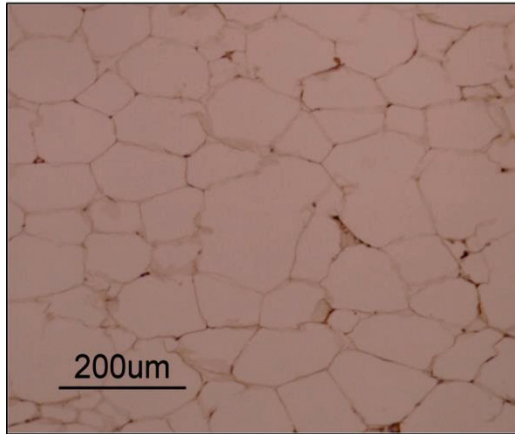


**Fig.20 *db/db*-AREG マウスの精巣周囲白色脂肪組織における遺伝子発現解析**

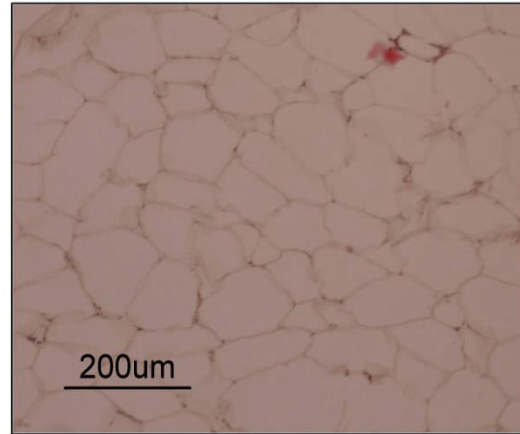
*db/db*-AREG マウス、および *db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織の total RNA を用いて *leptin* mRNA、および *Tnf-a* mRNA などの発現量を解析した結果、有意な差は認められなかった。



### Perinephric fat

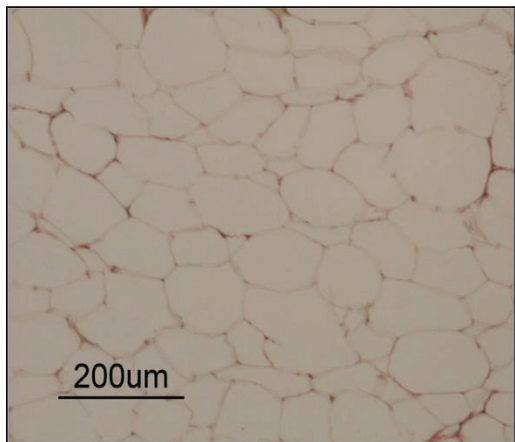


*db/db*

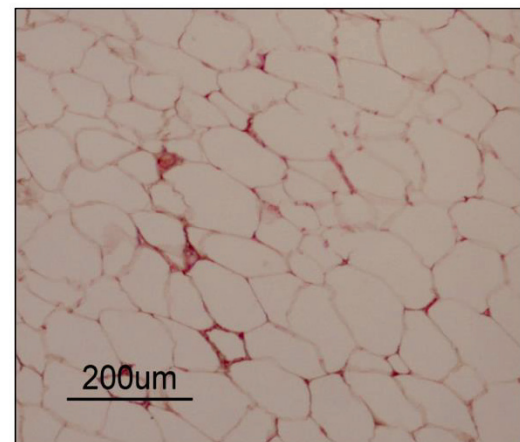


*db/db AREG*

### Epididymal fat



*db/db*



*db/db AREG*

**Fig.21 *db/db*-AREG マウス由来白色脂肪組織のパラフィン切片の作製、および H&E の染色**

*db/db*-AREG マウス、および *db/db* マウスの腎臓周囲、および精巣周囲白色脂肪組織のパラフィン切片を作製し、H&E 染色を行った。

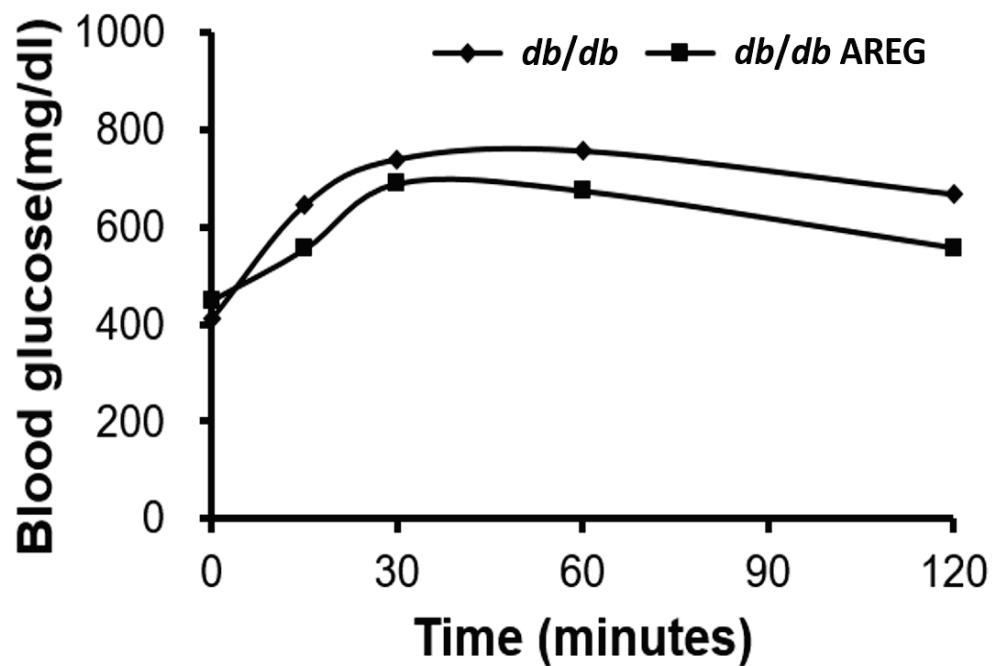
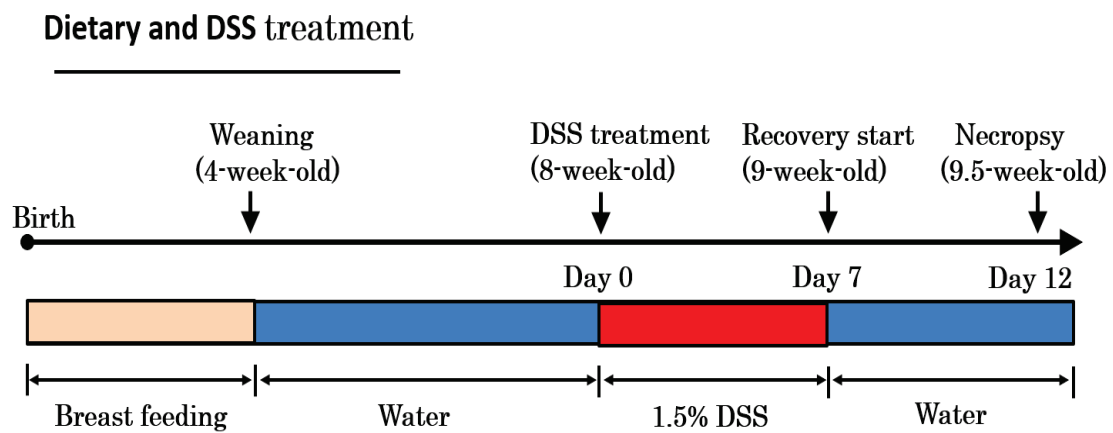


Fig.22 Glucose tolerance test(GTT)による糖代謝に関する検討

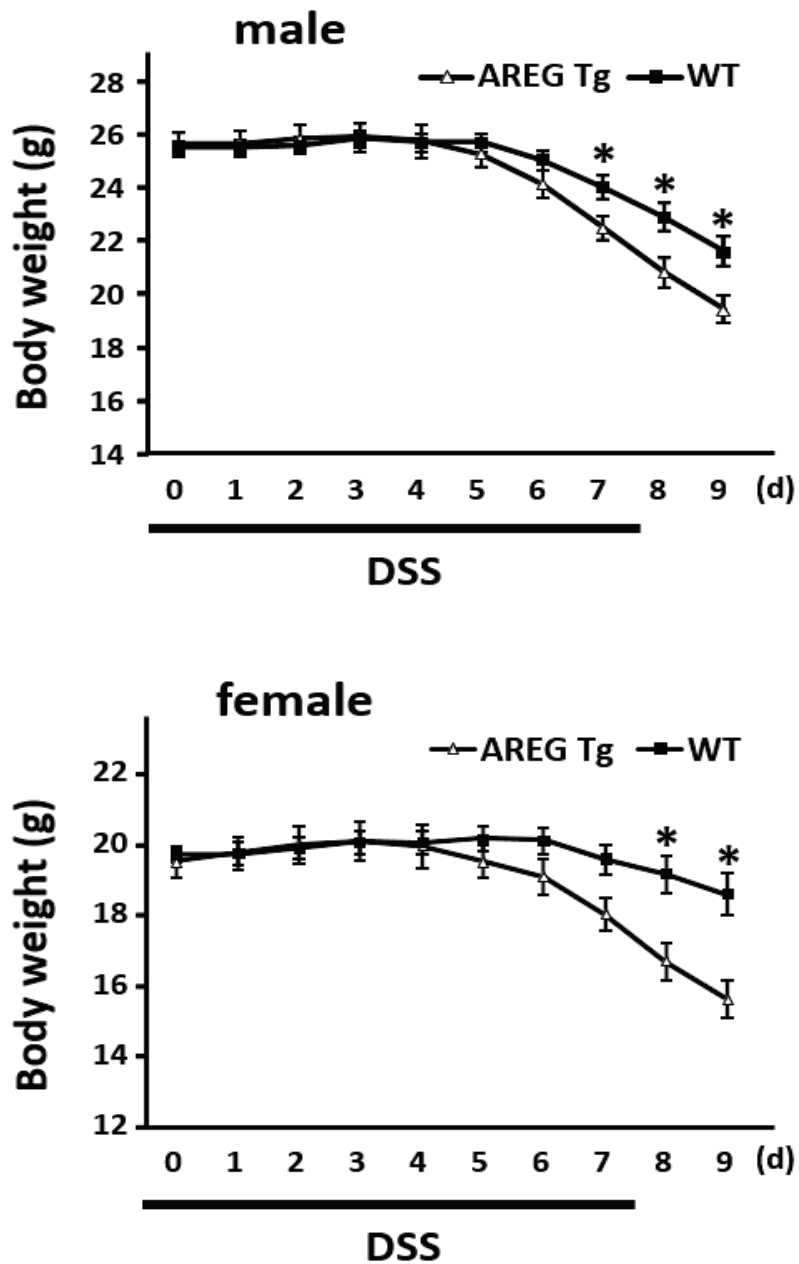
Glucose を 2 g/kg 体重になるように腹腔内投与をした後、尾静脈より採血を行った。血中 glucose 濃度の測定を行った結果、*db/db*-AREG マウスにおいて低下傾向が認められた。

## DSS experimental design



**Fig.23 AREG-Tg マウスを用いた DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作製**

上記の手順に従って、AREG-Tg マウスの DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを作製し、DSS 大腸炎の発症、および回復期に与える影響を検討した。



**Fig.24 AREG-Tg マウスと WT マウス体重の比較解析**

1.5%DSS 溶液の飲水投与によって AREG-Tg マウスとコントロール (WT) マウスの大腸炎を誘導し、体重を比較検討した。大腸炎発症 7 日、および DSS 投与から水道水に戻した回復期において、AREG-Tg マウスは WT マウスと比較して、体重は有意に減少した。(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

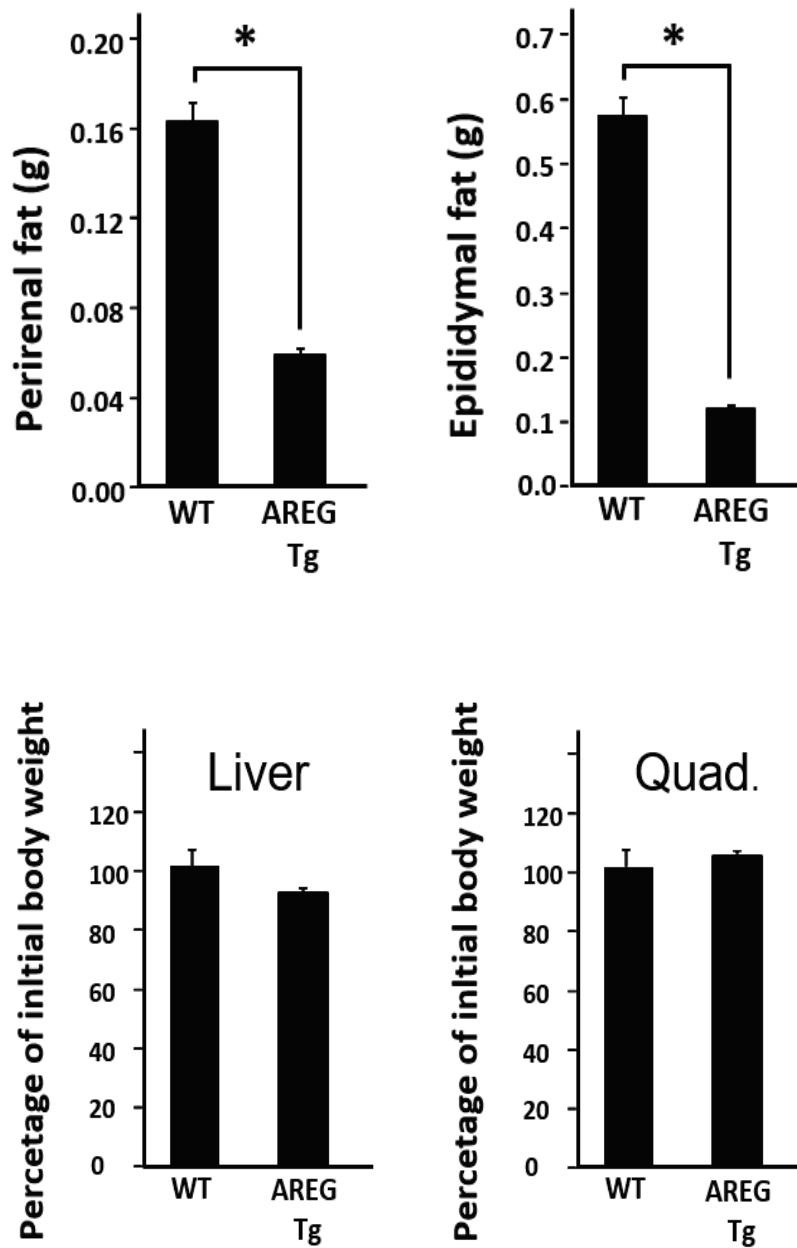


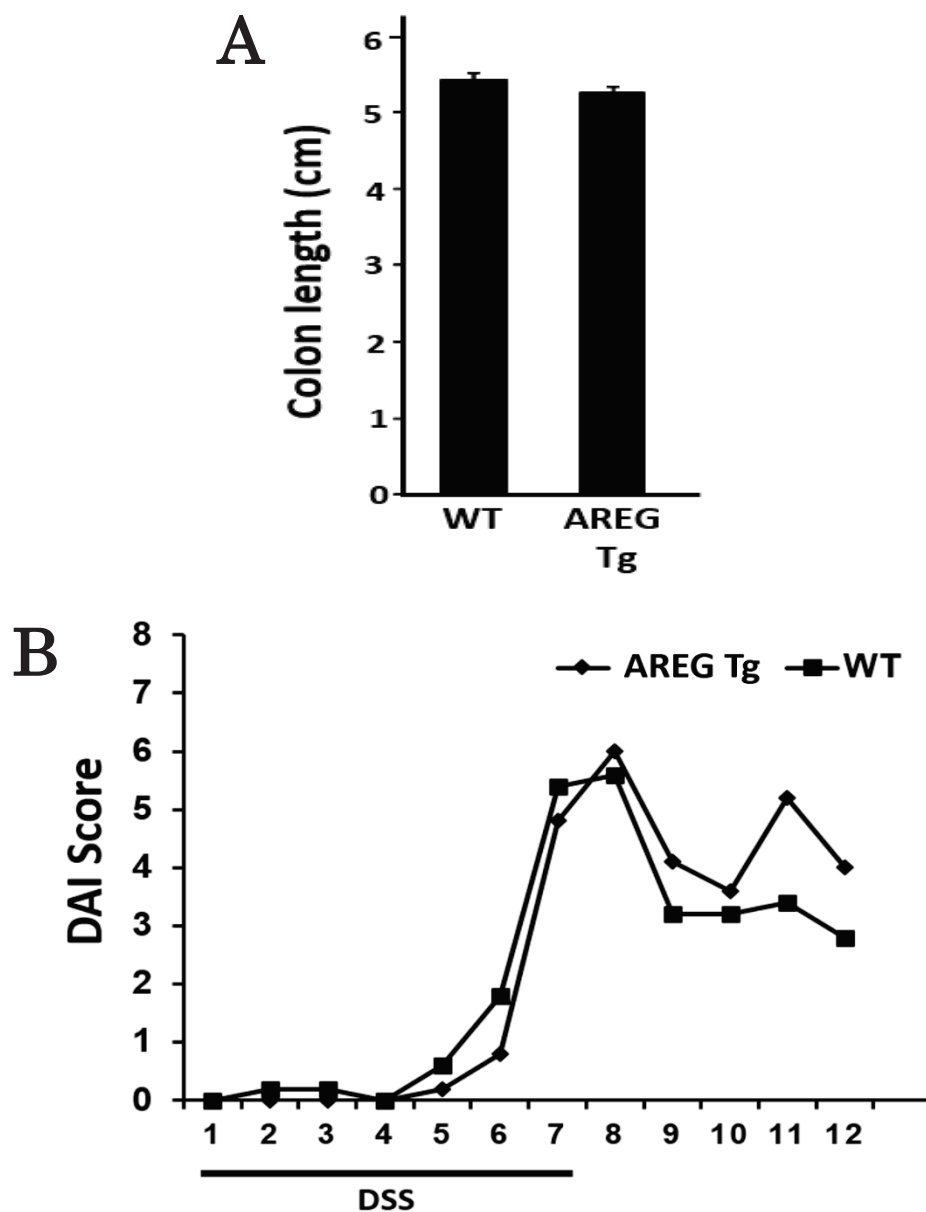
Fig.25 DSS 誘導性大腸炎モデルマウス各組織重量の検討

AREG-Tg マウス、および WT マウスの各組織を摘出し、湿重量を測定した結果、腎臓周囲と精巣周囲白色組織重量は有意に減少していたが、肝臓や大腿筋 (Quad) の湿重量の変化は認められなかった。(\*,  $P < 0.05$ )

<b>Score</b>	<b>Body weight loss (%)</b>	<b>Stool consistency</b>	<b>Bleeding in the stool</b>
<b>0</b>	≤ 1%	Firm	No blood
<b>1</b>	1 - 5%	Soft but can pick up	Stool color changed
<b>2</b>	5 - 10%	Soft can't pick up	Visible blood, small area
<b>3</b>	10 -15%	Can't pick up, no shape	Visible blood, large area, not on all the stool
<b>4</b>	>15%	Watery	Gross blood on most of the stool

**Table.3 DAI スコアの評価指標**

上記に示したように、AREG-Tg マウス、および WT マウスの大腸炎発症の指標として disease activity index (DAI) スコアを算出し、評価を行った。



**Fig.26** 大腸長の測定、および DAI スコアによる DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの評価

AREG-Tg マウス、および WT マウスの大腸長に有意な差は認められなかった (A)。便の粘性、出血量および体重を記録し、大腸炎の指標として DAI スコアを算出した結果、有意な差は認められなかった (B)。

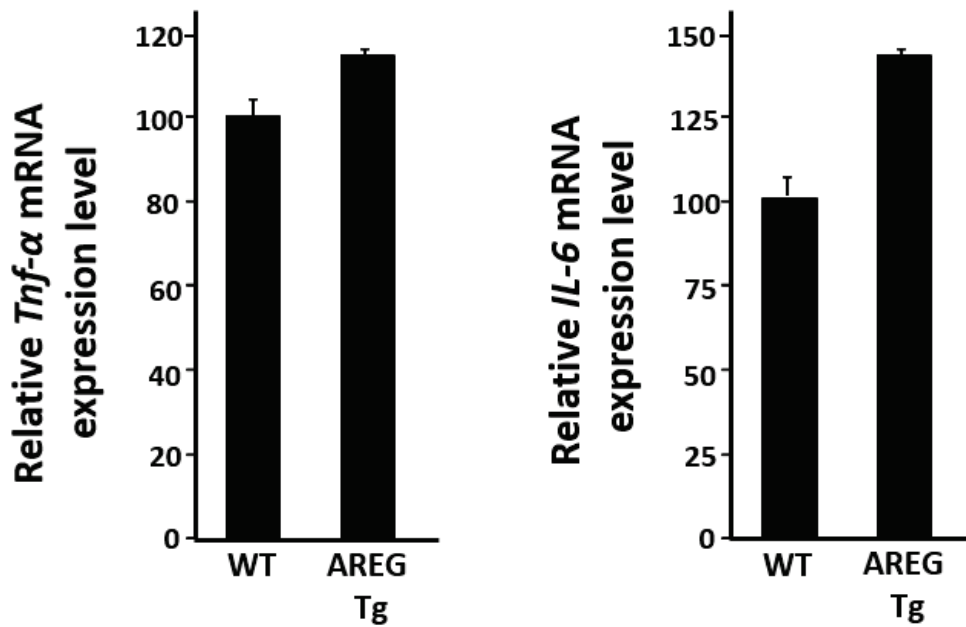


Fig.27 AREG-Tg マウスの大腸組織における炎症性遺伝子の発現解析

AREG-Tg マウス、および WT マウスの大腸組織における炎症性因子 *IL-6* mRNA、および *Tnf-α* mRNA の発現を real-time PCR 法により解析した結果、有意な差は認められなかった。



## 総合考察

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満を背景としてインスリン抵抗性や高血圧症、および高脂血症のリスクが上昇する基盤病態であり、内臓脂肪組織の肥満形成のメカニズムの解明が急務である。本研究では、内臓脂肪組織の脂肪細胞増殖のメカニズムにおける制御因子の解明、さらに発癌などの他疾患リスクの上昇のメカニズムを明らかにするために新規アディポサイトカインの探索を行った。第一章では、当研究室において以前に実施された遺伝性肥満モデル (*db/db*) マウス由来の白色脂肪組織における遺伝子発現の網羅的な解析結果から、肥満発症や病態の進行に伴って発現上昇する遺伝子であり、細胞増殖に関与する候補因子として AREG を単離した。第二章では、白色脂肪組織特異的 AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (AREG-Tg マウス) の樹立を行った。肥満白色脂肪組織の形成過程における高発現した AREG の生理的意義の解明、および他疾患との関連性を検証するために、*Areg* 遺伝子を過剰発現させた遺伝性肥満 *db/db* マウスや DSS 大腸炎モデル新たに作出を行い、形質の解析を行った。

本研究において、肥満発症や病態の進行に伴って発現上昇する AREG が炎症性の M1 マクロファージ細胞において高発現していたことから、肥満白色脂肪組織において AREG が新規の M1 マクロファージ細胞マーカーであり、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織において *Tnf- $\alpha$*  の mRNA 発現が亢進していた結果からも白色脂肪組織の慢性炎症の鍵因子としての可能性が示された。一方、AREG-Tg マウスの形質に関しては、AREG による脂肪細胞の増殖や血管新生の亢進などによって肥満形成が増強すると予想したものの、AREG-Tg マウスの白色脂肪組織重量の低下や白色脂肪細胞サイズの縮小が観察され、AREG は肥満発症の際に脂肪細胞の肥大化を抑制する負の制御因子である可能性が示唆された。*Areg* 遺伝子を有する遺伝性肥満 *db/db* マウスにおいても体重減少、および白色脂肪組織重量の低下が認められていることから、抗肥満効果や内臓脂肪組織の縮小を目的として組換え AREG タンパク質の *in vivo* での投与試験なども興味深いと考えられた。

一方、AREG は EGF ファミリーの一つとして様々な細胞増殖および分化に関与し、主に上皮系細胞の増殖因子として広く知られ、その中でも特に癌組織において過剰発現し、癌細胞に対する増殖因子として重要な病態的な役割を担うことが示されている。以前の研究において、主に上皮系癌細胞である肺癌細胞や乳癌細胞に対する増殖因子として強力な増殖促進作用を有することが報告されており、また癌組織において高発現した

AREG が癌細胞の増殖や浸潤のみならず、アポトーシスに対する抵抗性の獲得に関わり、シスプラチンのような抗癌剤に対する抵抗性獲得にも寄与することが示されている [125]。AREG は特に肺癌における病態的解明が進められており、臨床的には非小細胞肺癌などの癌患者において血中 AREG 量が上昇していることが報告されている。事実、EGFR 阻害剤であるエルロニチブやゲフィチニブは分子標的薬として非小細胞肺癌に対して実用化されており [126,127]、一方、血清中の AREG 濃度は予後の経過を示す重要な診断マーカーとしても利用されている [128]。癌組織における AREG の高発現の病態的意義は、先に述べたように、癌細胞の増殖やアポトーシスに対する抵抗性以外にもワールブルグ効果を含めた低酸素下の癌組織の成長促進にあるが、最近の研究では癌抑制因子である p53 の活性化により AREG が高発現することも明らかにされ、癌細胞が細胞死を回避する自立した機構にも関与するなど癌特有の増殖、あるいは生存メカニズムとして興味深い現象が見出されている [129]。そもそも AREG は杯盤胞移入、骨形成、神経軸索伸長、ケラチノサイトの増殖など正常な組織形成においても重要な生理作用を担う [130] だけでなく、乳腺発達においても極めて重要な役割を有する。Areg 遺伝子欠損マウスは生殖行動も可能であるが、乳腺の発達異常から哺乳活動に障害を生じ、産仔は分娩後に栄養障害によって死に至る [131]。加えて、思春期、および妊娠期において、エストロゲンやプロゲステロンなどのホルモン作用と相乗的に AREG は正常な乳腺細胞の細胞増殖において重要な役割を担う。ヒト乳腺上皮 HME 細胞株は *in vitro* の培養系において無血清培地でも生存し、EGF 非存在下で細胞増殖を示すが [132]、AREG の中和抗体を培養液に添加した場合、細胞増殖は阻害されることが明らかとなっている [133]。以上のことから、血中 AREG の乳癌発症に与える影響に関する今後の検証も非常に興味深い。本研究では、発癌に関する検証実験は行うことはできなかったが、BMI と発癌リスクの上昇の分子メカニズムを解明する上でも、発癌誘導を介在するアディポサイトカインの候補として AREG-Tg マウスを利用した研究内容は AREG の病態的意義の解明の上で、極めて重要な情報を与えるものと期待される。

## References

- [1] J.A. Pasco, K.L. Holloway, A.G. Dobbins, et al., Body mass index and measures of body fat for defining obesity and underweight: a cross-sectional, population-based study, *BMC Obes* 1 (2014)9.
- [2] S. Fujioka, Y. Matsuzawa, K. Tokunaga, et al., Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity, *Metabolism* 36 (1987)54-9.
- [3] Y. Okada, M. Kubo, H. Ohmiya, et al., Common variants at CDKAL1 and KLF9 are associated with body mass index in east Asian populations, *Nat Genet* 44 (2012)302-6.
- [4] K.A. Harford, C.M. Reynolds, F.C. McGillicuddy, et al., Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue, *Proc Nutr Soc* 70 (2011)408-17.
- [5] D.B. Hausman, M. DiGirolamo, T.J. Bartness, et al., The biology of white adipocyte proliferation, *Obes Rev* 2 (2001)239-54.
- [6] S. Lim, J.B. Meigs, Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk, *Int J Cardiol* 169 (2013)166-76.
- [7] M. Saito, Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, et al., High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity, *Diabetes* 58 (2009)1526-31.
- [8] B. Cannon, J. Nedergaard, Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiol Rev* 84 (2004)277-359.
- [9] S. Enerback, The origins of brown adipose tissue, *N Engl J Med* 360 (2009)2021-3.
- [10] T. Yoneshiro, S. Aita, Y. Kawai, et al., Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans, *Am J Clin Nutr* 95 (2012)845-50.
- [11] H. Ohno, K. Shinoda, B.M. Spiegelman, et al., PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein, *Cell Metab* 15 (2012)395-404.
- [12] L. Lehr, K. Canola, B. Leger, et al., Differentiation and characterization in primary culture of white adipose tissue brown adipocyte-like cells, *Int J Obes (Lond)* 33 (2009)680-6.

- [13] T. Hanamoto, K. Kajita, I. Mori, et al., The role of small proliferative adipocytes in the development of obesity: comparison between Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats and non-obese Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats, *Endocr J* 60 (2013)1001-11.
- [14] H. Sugihara, N. Yonemitsu, S. Miyabara, et al., Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties, *Differentiation* 31 (1986)42-9.
- [15] K.L. Spalding, E. Arner, P.O. Westermark, et al., Dynamics of fat cell turnover in humans, *Nature* 453 (2008)783-7.
- [16] A.S. Rosenthal, Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response, *Immunol Rev* 40 (1978)136-52.
- [17] T.D. Tetley, Macrophages and the pathogenesis of COPD, *Chest* 121 (2002)156S-159S.
- [18] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J Clin Invest* 112 (2003)1796-808.
- [19] N. Kamei, K. Tobe, R. Suzuki, et al., Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance, *J Biol Chem* 281 (2006)26602-14.
- [20] A. Chen, S. Mumick, C. Zhang, et al., Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity, *Obes Res* 13 (2005)1311-20.
- [21] S.P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber, et al., CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding, *J Clin Invest* 116 (2006)115-24.
- [22] H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori, et al., MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, *J Clin Invest* 116 (2006)1494-505.
- [23] M.H. Barros, F. Hauck, J.H. Dreyer, et al., Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages, *PLoS One* 8 (2013) e80908.
- [24] A. Mantovani, A. Sica, M. Locati, Macrophage polarization comes of age, *Immunity* 23 (2005)344-6.
- [25] L.K. Heilbronn, L.V. Campbell, Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity, *Curr Pharm Des* 14 (2008)1225-30.
- [26] S. Tateya, F. Kim, Y. Tamori, Recent advances in obesity-induced inflammation and

insulin resistance, *Front Endocrinol (Lausanne)* 4 (2013)93.

[27] P. Li, M. Lu, M.T. Nguyen, et al., Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice, *J Biol Chem* 285 (2010)15333-45.

[28] C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J Clin Invest* 117 (2007)175-84.

[29] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, et al., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J Clin Invest* 116 (2006)1784-92.

[30] M. Inoue, T. Sobue, S. Tsugane, Impact of body mass index on the risk of total cancer incidence and mortality among middle-aged Japanese: data from a large-scale population-based cohort study--the JPHC study, *Cancer Causes Control* 15 (2004)671-80.

[31] R.S. Ahima, Adipose tissue as an endocrine organ, *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5 (2006)242S-249S.

[32] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372 (1994)425-32.

[33] J.L. Halaas, K.S. Gajiwala, M. Maffei, et al., Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene, *Science* 269 (1995)543-6.

[34] H. Masuzaki, Y. Ogawa, N. Isse, et al., Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue, *Diabetes* 44 (1995)855-8.

[35] M.A. Pelleymounter, M.J. Cullen, M.B. Baker, et al., Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice, *Science* 269 (1995)540-3.

[36] D.A. Schoeller, L.K. Cella, M.K. Sinha, et al., Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing, *J Clin Invest* 100 (1997)1882-7.

[37] A.M. Teppo, C.P. Maury, Radioimmunoassay of tumor necrosis factor in serum, *Clin Chem* 33 (1987)2024-7.

[38] P.A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, et al., Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (2001) E745-51.

[39] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J Clin Invest* 112 (2003)1796-808.

[40] F. Massiera, J. Seydoux, A. Geloën, et al., Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and

increased locomotor activity, *Endocrinology* 142 (2001)5220-5.

[41] H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J Clin Invest* 112 (2003)1821-30.

[42] G.S. Hotamisligil, N.S. Shargill, B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science* 259 (1993)87-91.

[43] G.S. Hotamisligil, B.M. Spiegelman, Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link, *Diabetes* 43 (1994)1271-8.

[44] T. Yamaji, M. Iwasaki, S. Sasazuki, et al., Visceral fat volume and the prevalence of colorectal adenoma, *Am J Epidemiol* 170 (2009)1502-11.

[45] S.Y. Nam, B.C. Kim, K.S. Han, et al., Abdominal visceral adipose tissue predicts risk of colorectal adenoma in both sexes, *Clin Gastroenterol Hepatol* 8 (2010)443-50. e1-2.

[46] H. Endo, K. Hosono, T. Fujisawa, et al., Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary conditions, *Gut* 58 (2009)1637-43.

[47] Y. Kamada, H. Matsumoto, S. Tamura, et al., Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model, *J Hepatol* 47 (2007)556-64.

[48] T. Hanamoto, K. Kajita, I. Mori, et al., The role of small proliferative adipocytes in the development of obesity: comparison between Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats and non-obese Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats, *Endocr J* 60 (2013)1001-11.

[49] H. Sugihara, N. Yonemitsu, S. Miyabara, et al., Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture, *J Lipid Res* 28 (1987)1038-45.

[50] R.T. Bailer, C.L. Ng-Bautista, G.M. Ness, et al., Expression of interleukin-6 receptors and NF-kappa B in AIDS-related Kaposi sarcoma cell strains, *Lymphology* 30 (1997)63-76.

[51] G. Bassi, L. Pacelli, R. Carusone, et al., Adipose-derived stromal cells (ASCs), *Transfus Apher Sci* 47 (2012)193-8.

[52] M.T. Foster, T.J. Bartness, Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291 (2006) R1630-7.

[53] Q.A. Wang, C. Tao, R.K. Gupta, et al., Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration, *Nat Med* 19 (2013)1338-44.

[54] H. Hauner, K. Rohrig, T. Petruschke, Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte

development and function, *Eur J Clin Invest* 25 (1995)90-6.

[55] G. Ai, X. Shao, M. Meng, et al., Epidermal growth factor promotes proliferation and maintains multipotency of continuous cultured adipose stem cells via activating STAT signal pathway in vitro, *Medicine (Baltimore)* 96 (2017) e7607.

[56] B.A. Bunnell, M. Flaat, C. Gagliardi, et al., Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation, *Methods* 45 (2008)115-20.

[57] N. Itoh, Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease, *Cell Tissue Res* 342 (2010)1-11.

[58] A. Kharitonkov, V.J. Wroblewski, A. Koester, et al., The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21, *Endocrinology* 148 (2007)774-81.

[59] T. Nishimura, Y. Nakatake, M. Konishi, et al., Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver, *Biochim Biophys Acta* 1492 (2000)203-6.

[60] T. Inagaki, P. Dutchak, G. Zhao, et al., Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21, *Cell Metab* 5 (2007)415-25.

[61] Hondares, Elayne, et al. "Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue." *Journal of Biological Chemistry* 286.15 (2011): 12983-90.

[62] F.M. Fisher, S. Kleiner, N. Douris, et al., FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis, *Genes Dev* 26 (2012)271-81.

[63] A. Kharitonkov, T.L. Shiyanova, A. Koester, et al., FGF-21 as a novel metabolic regulator, *J Clin Invest* 115 (2005)1627-35.

[64] J.S. Moyers, T.L. Shiyanova, F. Mehrbod, et al., Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling, *J Cell Physiol* 210 (2007)1-6.

[65] N. Mejhert, J. Galitzky, A.T. Pettersson, et al., Mapping of the fibroblast growth factors in human white adipose tissue, *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2010)2451-7.

[66] X. Zhang, D.C. Yeung, M. Karpisek, et al., Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans, *Diabetes* 57 (2008)1246-53.

[67] J. Xu, D.J. Lloyd, C. Hale, et al., Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice, *Diabetes* 58 (2009)250-9.

[68] Y. Xu, C. Meng, G. Liu, et al., Classically activated macrophages protect against

- lipopolysaccharide induced acute lung injury by expressing amphiregulin in mice, *Anesthesiology* 124 (2016)1086-99.
- [69] C. Meng, G. Liu, H. Mu, et al., Amphiregulin may be a new biomarker of classically activated macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 466 (2015)393-9.
- [70] G. Liu, H. Yang, Modulation of macrophage activation and programming in immunity, *J Cell Physiol* 228 (2013)502-12.
- [71] S.P. Saunders, J.L. Barlow, C.M. Walsh, et al., C-type lectin SIGN-R1 has a role in experimental colitis and responsiveness to lipopolysaccharide, *J Immunol* 184 (2010)2627-37.
- [72] S. Yamane, S. Ishida, Y. Hanamoto, et al., Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients, *J Inflamm (Lond)* 5 (2008)5.
- [73] S. Blanchet, K. Ramgolam, A. Baulig, et al., Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 (2004)421-7.
- [74] M. Chokki, H. Mitsuhashi, T. Kamimura, Metalloprotease-dependent amphiregulin release mediates tumor necrosis factor-alpha-induced IL-8 secretion in the human airway epithelial cell line NCI-H292, *Life Sci* 78 (2006)3051-7.
- [75] S. Lisi, M. Sisto, D.D. Lofrumento, et al., Pro-inflammatory role of Anti-Ro/SSA autoantibodies through the activation of Furin-TACE-amphiregulin axis, *J Autoimmun* 35 (2010)160-70.
- [76] S. Okumura, H. Sagara, T. Fukuda, et al., FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells, *J Allergy Clin Immunol* 115 (2005)272-9.
- [77] A. Kariagina, J. Xie, J.R. Leippardt, et al., Amphiregulin mediates estrogen, progesterone, and EGFR signaling in the normal rat mammary gland and in hormone-dependent rat mammary cancers, *Horm Cancer* 1 (2010)229-44.
- [78] B. Busser, L. Sancey, E. Brambilla, et al., The multiple roles of amphiregulin in human cancer, *Biochim Biophys Acta* 1816 (2011)119-31.
- [79] I.M. Elangovan, M. Vaz, C.R. Tamatam, et al., FOSL1 promotes Kras-induced lung cancer through amphiregulin and cell survival gene regulation, *Am J Respir Cell Mol Biol* (2017).
- [80] Y. Cao, Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity, *Cell Metab* 18 (2013)478-89.



- [81] S.U. Amano, J.L. Cohen, P. Vangala, et al., Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation, *Cell Metab* 19 (2014)162-171.
- [82] Boucher, J., A. Kleinridders and C.R. Kahn, Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. 6(1).
- [83] Gschwind, A., O.M. Fischer and A. Ullrich, The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(5): p. 361-70.
- [84] Plowman, G.D., et al., The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(5): p. 1969-81.
- [85] Berasain, C., et al., Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*, 2005. 128(2): p. 424-32.
- [86] Inatomi, O., et al., Regulation of amphiregulin and epiregulin expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med*, 2006. 18(3): p. 497-503.
- [87] Schuger, L., et al., Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation. *Development*, 1996. 122(6): p. 1759-67.
- [88] Sakurai, H., et al., EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney. *Am J Physiol*, 1997. 273(3 Pt 2): p. F463-72.
- [89] Normanno, N., et al., Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1994. 29(1): p. 11-27.
- [90] Perugorria, M.J., et al., The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*, 2008. 48(4): p. 1251-61.
- [91] Hurbin, A., et al., Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem*, 2002. 277(51): p. 49127-33.
- [92] Castillo, J., et al., Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6129-38.
- [93] Johnson, G.R., et al., Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol*, 1992. 118(3): p. 741-51.
- [94] Sternlicht, M.D., et al., Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*,

2005. 132(17): p. 3923-33.

[95] Eckstein, N., et al., Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(2): p. 739-50.

[96] Lemos-Gonzalez, Y., et al., Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *Br J Cancer*, 2007. 96(10): p. 1569-78.

[97] Ciardiello, F., et al., Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(17): p. 7792-6.

[98] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.

[99] Busser, B., et al., The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1816(2): p. 119-31.

[100] Anderson, J.M. and C.M. Van Itallie, Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, 1995. 269(4 Pt 1): p. G467-75.

[101] Van der Sluis, M., et al., Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 2006. 131(1): p. 117-29.

[102] Nam, S.T., et al., Role of NADH: quinone oxidoreductase-1 in the tight junctions of colonic epithelial cells. *BMB Rep*, 2014. 47(9): p. 494-9.

[103] Playford, R.J. and N.A. Wright, Why is epidermal growth factor present in the gut lumen? *Gut*, 1996. 38(3): p. 303-5.

[104] Beck, P.L. and D.K. Podolsky, Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1999. 5(1): p. 44-60.

[105] Egger, B., et al., Mice harboring a defective epidermal growth factor receptor (waved-2) have an increased susceptibility to acute dextran sulfate-induced colitis. *Scand J Gastroenterol*, 2000. 35(11): p. 1181-7.

[106] Hsu, D., et al., Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury. *Lab Invest*, 2010. 90(9): p. 1295-305.

[107] Fukata, M., et al., Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*, 2006. 131(3): p. 862-77.

[108] K. Ebihara, Y. Ogawa, H. Masuzaki, et al., Transgenic overexpression of leptin rescues

- insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes, *Diabetes* 50 (2001)1440-8.
- [109] K. Juuti-Uusitalo, L.J. Klunder, K.A. Sjollem, et al., Differential effects of TNF (TNFSF2) and IFN-gamma on intestinal epithelial cell morphogenesis and barrier function in three-dimensional culture, *Plos One* 6 (2011) e22967.
- [110] Z. Wu, P. Puigserver, U. Andersson, et al., Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1, *Cell* 98 (1999)115-24.
- [111] G. Fruhbeck, L. Mendez-Gimenez, J.A. Fernandez-Formoso, et al., Regulation of adipocyte lipolysis, *Nutr Res Rev* 27 (2014)63-93.
- [112] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, et al., EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004)13306-11.
- [113] K. Takeda, S. Akira, TLR signaling pathways, *Semin Immunol* 16 (2004)3-9.
- [114] S.J. Stone, H.M. Myers, S.M. Watkins, et al., Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice, *J Biol Chem* 279 (2004)11767-76.
- [115] S. Friedel, K. Reichwald, A. Scherag, et al., Mutation screen and association studies in the diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 gene (DGAT2), a positional candidate gene for early onset obesity on chromosome 11q13, *BMC Genet* 8 (2007)17.
- [116] R. Suzuki, K. Tobe, M. Aoyama, et al., Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action, *J Biol Chem* 280 (2005)3331-7.
- [117] D. Gomez-Martin, M. Diaz-Zamudio, M. Galindo-Campos, et al., Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity, *Autoimmun Rev* 9 (2010)454-8.
- [118] A. Chandra, S. Lan, J. Zhu, et al., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling promotes proliferation and survival in osteoprogenitors by increasing early growth response 2 (EGR2) expression, *J Biol Chem* 288 (2013)20488-98.
- [119] W.J. Sandborn, B.G. Feagan, S. Stoinov, et al., Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease, *N Engl J Med* 357 (2007)228-38.
- [120] E. Miyauchi, T. Ogita, J. Miyamoto, et al., *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules, *Plos One* 8 (2013) e79735.

- [121] N. Powell, J.W. Lo, P. Biancheri, et al., Interleukin 6 increases production of cytokines by colonic innate lymphoid cells in mice and patients with chronic intestinal inflammation, *Gastroenterology* 149 (2015)456-67. e15.
- [122] Y. M. Shah, The role of hypoxia in intestinal inflammation, *Mol Cell Pediatr* 3 (2016)1.
- [123] F. Baert, M. Noman, S. Vermeire, et al., Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease, *N Engl J Med* 348 (2003)601-8.
- [124] S.O. Nam, F. Yotsumoto, K. Miyata, et al., Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer, *Cancer Med* 4 (2015)575-87.
- [125] A. Chandra, S. Lan, J. Zhu, et al., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling promotes proliferation and survival in osteoprogenitors by increasing early growth response 2 (EGR2) expression, *J Biol Chem* 288 (2013)20488-98.
- [126] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, et al., EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004)13306-11.
- [127] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, et al., Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected], *J Clin Oncol* 21 (2003)2237-46.
- [128] C.L. Addison, K. Ding, H. Zhao, et al., Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21, *J Clin Oncol* 28 (2010)5247-56.
- [129] N. Taira, T. Yamaguchi, J. Kimura, et al., Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014)717-22.
- [130] P.W. Cook, P.A. Mattox, W.W. Keeble, et al., A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin, *Mol Cell Biol* 11 (1991)2547-57.
- [131] L. Ciarloni, S. Mallepell, C. Brisken, Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007)5455-60.
- [132] I. M. Berquin, M.L. Dziubinski, G.P. Nolan, et al., A functional screen for genes inducing epidermal growth factor autonomy of human mammary epithelial cells confirms the role of

amphiregulin, *Oncogene* 20 (2001)4019-28.

[133] J. Castillo, E. Erroba, M.J. Perugorria, et al., Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells, *Cancer Res* 66 (2006)6129-38.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始、適切なお指導、ご助言およびご校閲頂いたのみならず、最初から私に研究者となるために温かく励ましてくださった、まるで父親のように力強いお言葉で励ましてくださった、広島大学大学院生物圏科学研究科 矢中 規之先生に心より御礼申し上げます。さらに、副審査を担当して頂き、論文作成におきまして有益なご助言を賜りました、島田 昌之教授、島本 整教授、および浅川 学教授に深く感謝致します。また、論文やセミナーや研究指導において、的確な助言をしてくださった加藤 範久教授、Thanutchaporn Kumrungsee 助教に深く感謝致します。

pcDNA3.1 を御供与頂いた、亀井 康富博士（京都府立大学）、に厚く御礼申し上げます。

様々なご助言により研究生活を支えてくださった張 培培氏、真田 洋平氏、楊 永壽氏、橋本 貴生氏には本当にお世話になりました。

本研究の立案にあたり大きく貢献された久本 高央氏に心より感謝致します。

研究室の梶原 香氏、有馬 岳志氏、鎌田 奈都美氏などの皆様には、研究面のご協力だけではなく、様々な面で助けていただき、本当にありがとうございます。

分子栄養学研究室のさらなる発展を心より願っています。

最後に、どんなときにも私を支えてくれた、妻 李寧、両親、そして大切な友人達に心から感謝致します。

平成 30 年 3 月

楊 波