

氏 名 おかべ けいすけ  
岡部 圭介

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 222 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Nampt-mediated NAD synthesis plays crucial role in  
differentiation and metabolic remodeling of 3T3-L1  
preadipocytes  
(Namptを介したNAD合成は3T3-L1前駆脂肪細胞分化と代謝リモ  
デリングにおいて重要な役割を果たす)

論文審査委員

(主査) 教授 森 寿  
(副査) 教授 笹原 正清  
(副査) 教授 絹川 弘一郎  
(副査) 教授 中辻 裕司  
(指導教員) 教授 戸邊 一之

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

肥満は2型糖尿病をはじめ高血圧症や脂質異常症、虚血性心疾患などのリスクとなる公衆衛生上の大きな問題である。肥満の病態は、脂肪細胞の増加(過形成)と肥大から成り、脂肪細胞の増加は前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化によって起こる。したがって脂肪細胞分化の詳細なメカニズムの解明は、肥満症の病態の理解・肥満症治療にとって極めて重要である。脂肪細胞分化の機序については、これまでの多くの研究からC/EBPファミリー、PPAR $\gamma$ を中心とした転写因子によるカスケードが重要であることが明らかとなっている。一方、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴い代謝リモデリングが生じるが、その詳細や脂肪細胞分化との関連は未知の部分が多い。

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) はNAD/NADHの酸化・還元を通して、酸化還元反応の補酵素として働くだけでなく、SirtuinやPARPによるヒストンなどの脱アセチル化、ADPリボシル化など翻訳後修飾の基質として老化や代謝、DNA修復など多くの生命現象に関与していることが知られている。またNADの合成酵素の1つであるNamptは脂肪細胞で多く発現しており、細胞外に分泌されるアディポカインとしても知られている。これまでに脂肪細胞分化と代謝リモデリングに関する研究はいくつか行なわれているが、NAD代謝に着目したものはほとんどない。そこで脂肪細胞分化におけるNAD代謝の役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

### 〔方法並びに結果〕

脂肪細胞分化のin vitroの系として広く用いられている3T3-L1前駆脂肪細胞を分化誘導し、液体クロマトグラフィ質量分析計、ガスクロマトグラフィ質量分析計により経時的に代謝物の変化を解析した。解糖系、ペントースリン酸回路、TCAサイクルの代謝物のほとんどは分化に伴い上昇していた。哺乳類ではNADは主としてsalvage pathwayにおいてNicotinamide (NAM) からNicotinamide mononucleotide (NMN) を経て合成され、Nampt、Nmnatがそれぞれの反応を触媒している。分化に伴いNADおよびNMNは上昇しており、これに一致して、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロッティングで3T3-L1細胞分化に伴うNamptおよびNmnatの発現上昇を認めた。これらの結果から3T3-L1細胞分化に伴いsalvage pathwayでのNAD合成が亢進することが示された。

次にNAD代謝と3T3-L1細胞分化との関連を明らかにするためNamptの特異的な阻害剤であるFK866を加え3T3-L1細胞に分化誘導を行った。するとFK866により分化に伴うNADの上昇は抑制され、3T3-L1細胞分化に伴う脂肪滴蓄積の抑制、主要な転写制御因子であるPPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ およびそれらの標的遺伝子の発現の著明な抑制が認められた。一方、脂肪細胞分化の初期に働くとされるC/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ は分化誘導後2日目まで有意な差は認めなかった。このことからNADはC/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ からPPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ が誘導される過程に関与しているものと考えられた。また、FK866による分化抑制はNMNを加えるこ

とでレスキューされた。これらの結果から3T3-L1細胞分化にNADが必要であることが示された。

NADは脱アセチル化、ADPリボシル化といったヒストン修飾に関わることが知られており、我々はNADがこれらのエピジェネティックな機序により3T3-L1細胞分化に関わるのではないかと考えた。ウエスタンブロットティングにより3T3-L1の分化に伴うポリADPリボシル化を評価したところ分化に伴う亢進が認められ、これはFK866により著明に抑制された。また、PARP阻害剤を加えて3T3-L1細胞に分化誘導を行ったところ分化は抑制された。ポリADPリボシル化はPPAR $\gamma$ の標的遺伝子プロモーター領域への結合を促進することが報告されている。これらのことからNADはポリADPリボシル化を介して3T3-L1細胞分化に関与することが示唆された。

近年、代謝の変化が未分化な幹細胞や前駆細胞の分化を規定している例が数多く報告されている。LC/MS、GC/MSを用いて、3T3-L1細胞分化に伴う代謝リモデリングに対するFK866の影響を解析したところ、前述の解糖系・ペントースリン酸回路・TCAサイクルの代謝物の増加はいくつかの例外を除いて障害されていた。フラックスアナライザーによる解析では、3T3-L1細胞分化に伴い嫌氣的・好氣的なATP産生はともに亢進しており、これらはFK866により阻害されていた。これらのことからNADによる代謝リモデリングもまた3T3-L1細胞分化に関わっている可能性が考えられた。

#### 〔総括〕

本研究により3T3-L1前駆脂肪細胞分化に伴いsalvage pathwayでのNAD合成が亢進すること、またそれが分化に必要なことが示された。さらに、NADはPARPによるポリADPリボシル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節および解糖系・ペントースリン酸回路・TCAサイクル等の代謝リモデリングにより分化に関与している可能性が示された。

# 学位論文審査の要旨

## 〔研究背景と目的〕

肥満は、2型糖尿病をはじめ高血圧症や脂質異常症、虚血性心疾患などのリスクとなる公衆衛生上の大きな問題である。肥満病態は、脂肪細胞の増加(過形成)と肥大から成り、脂肪細胞の増加は前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴って起こる。したがって脂肪細胞分化の詳細なメカニズムの解明は、肥満症の病態の理解と治療にとって極めて重要である。脂肪細胞分化の機序には、C/EBPファミリー、PPAR $\gamma$ を中心とした転写因子によるカスケードが重要である一方、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴い代謝リモデリングが生じるが、その詳細や脂肪細胞分化との関連は未知の部分が多い。

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) はNAD/NADHの酸化・還元により、酸化還元反応の補酵素として働くだけでなく、SirtuinやPARPによるヒストンの脱アセチル化やADPリボシル化など翻訳後修飾の基質として、老化、代謝、DNA修復など多くの生命現象に関与している。哺乳類では、NADは主にsalvage経路においてNicotinamide (NAM)からNicotinamide mononucleotide (NMN)を経て合成され、NamptとNmnatがそれぞれの反応を触媒している。Namptは、脂肪細胞で多く発現しており、細胞外に分泌されるアディポカインとしても知られている。これまでに脂肪細胞分化と代謝リモデリングに関する研究は行われているが、NAD代謝に着目したものはほとんどない。そこで岡部君は、脂肪細胞分化におけるNAD代謝の役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

## 〔方法並びに結果〕

- 1) 脂肪細胞分化のin vitroモデル系として広く用いられている3T3-L1前駆脂肪細胞を分化誘導し、液体クロマトグラフィ質量分析計(LC/MS)、ガスクロマトグラフィ質量分析計(GC/MS)により経時的に代謝物の動態を解析した。その結果、解糖系、ペントースリン酸回路、TCAサイクルの代謝物のほとんどは分化に伴い上昇していた。
- 2) リアルタイムPCR法およびウエスタンブロッティング(WB)法で、3T3-L1細胞分化に伴うNamptおよびNmnatの発現上昇を認め、3T3-L1細胞分化に伴いNAD合成が亢進することが示唆された。
- 3) NAD代謝と3T3-L1細胞分化との関連を明らかにするため、Namptの特異的な阻害剤FK866を加え分化誘導を行った。その結果、FK866により分化に伴うNADの上昇は抑制され、脂肪滴蓄積の抑制、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ およびそれらの標的遺伝子の発現の著明な抑制が認められた。一方、脂肪細胞分化の初期に働くとされるC/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ は、分化誘導後2日目まで有意な差は認めなかった。このことからNADはC/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ からPPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ が誘導される過程に関与していると考えられた。また、FK866による分化抑制は、NMNを加えることで解除された。これらの結果から、3T3-L1細胞分化にNADが必要であることが示された。
- 4) 3T3-L1細胞分化に伴う代謝リモデリングに対するFK866の影響を、LC/MS、GC/MSを用いて解析したところ、解糖系・ペントースリン酸回路・TCAサイクルの代謝物の増加は、いくつかの例外を除いて障害されていた。フラックスアナライザーによる解析では、3T3-L1細胞分化に伴い嫌氣的・好氣的なATP産生

はともに亢進しており、これらはFK866により阻害されていた。これらのことからNADによる代謝リモデリングも3T3-L1細胞分化に関わっている可能性が考えられた。

- 5) WB法により3T3-L1細胞分化に伴うポリADPリボシル化を評価したところ亢進が認められ、この亢進はFK866により抑制された。また、PARP阻害剤は3T3-L1細胞分化を抑制した。ポリADPリボシル化は、PPAR $\gamma$ の標的遺伝子プロモーター領域への結合を促進することが報告されていることから、NADは、ポリADPリボシル化を介して3T3-L1細胞分化に関与することが示唆された。

#### 〔総括〕

本研究で岡部君は、3T3-L1前駆脂肪細胞をモデルとして、脂肪細胞分化に伴う代謝リモデリング動態をNADに注目して解析した。その結果、脂肪細胞分化に伴いNAD合成が亢進すること、また、NAD合成経路酵素の一つである Nampt の特異的阻害薬を用いて、NAD合成の亢進が脂肪細胞分化に必要であることを明らかにした。さらにNADは、解糖系・ペントースリン酸回路・TCAサイクル等の代謝リモデリングと、PARPによるポリADPリボシル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節により脂肪細胞分化に関与している可能性が示された。これまで、脂肪細胞分化過程をNADに注目して詳細に代謝解析を行った報告はなく、本研究の新規性は高い。また、肥満過程の新たな病態機構を明らかにした本研究には、医学における学術的重要性が認められる。本研究は、モデル培養細胞での代謝リモデリングを明確にしたが、生体内での代謝は全身的な制御を受けることや、NADは脂肪細胞以外でも代謝に関わる重要な分子であることから、本研究の成果をすぐに臨床的研究に発展させるには課題が多く、今後の更なる研究が必要と考えられる。以上より、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。