

氏 名 SUN Wuping

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1733 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Involvement of TRPV2 in the differentiation of mouse brown
adipocytes

論文審査委員 主 査 教授 箕越 靖彦
教授 富永 真琴
教授 池中 一裕
教授 矢田 俊彦 自治医科大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The prevalence of obesity has increased worldwide, and obesity is believed to be a result from an imbalance between intake of energy and energy expenditure. Obesity is characterized by increased adipose tissue mass that results from increased fat cell size and number. It is well known that there are two types of adipose tissue, a white adipose tissue (WAT) and a brown adipose tissue (BAT). Importantly, it has been reported that BAT also exists in adult humans. Therefore, understanding the molecular mechanisms for differentiation of not only white adipocytes, but also brown adipocytes has been the subject of intense investigation. It has been reported that the increase in intracellular calcium levels in 3T3-L1 pre-adipocytes by calcium-mobilizing reagents including ionomycin or a calcium-ATPase inhibitor, thapsigargin (TG) efficiently inhibits differentiation, diminishes adipocyte-specific gene expression and reduces lipid accumulation. However, the effect of $[Ca^{2+}]_i$ increase on brown adipocyte differentiation is still not known.

Most of transient receptor potential (TRP) ion channels are non-selective calcium permeable cation channels that were originally discovered in mutant *Drosophila* that responded abnormally to a light stimulus. Among these members of the TRP channels, TRPV2 also functions as a non-selective calcium-permeable cation channel and is composed of six trans-membrane domains with a putative pore-loop region. TRPV2 is activated by noxious heat, with an activation temperature threshold of higher than 52 °C, and by a number of exogenous chemical ligands, e.g. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB) and lysophosphatidyl choline (LPC), with a species specific manner. SKF96365 (SKF) is a TRPV2-selective antagonist. Importantly, TRPV2 is also reported as a mechano-sensitive channel activated by mechanical stretch and cell swelling. However, the expression and physiological role of TRPV2 in brown adipocytes are still unknown.

Therefore, I hypothesized that TRPV2 is functionally expressed in brown adipocytes and that TRPV2 activation induces calcium influx, which could regulate brown adipocyte differentiation. My aim is to investigate the involvement of TRPV2 in mouse brown adipocytes differentiation.

This study was conducted and investigated from different levels, from molecular identity to channel function. *Trpv2* mRNA and TRPV2 protein expression levels were analyzed in primary cultured mouse brown adipocytes using RT-PCR and Western blotting methods, and functional expression level of TRPV2 was examined using calcium-imaging and whole-cell patch-clamp methods. Pharmacological studies were conducted with TRPV2 agonists, 2APB and LPC, and a selective antagonist SKF. Mechanical stimulation was applied using a 3-D sunflower mini shaker in the CO₂

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

incubator. Brown adipocytes differentiation was assessed by counting differentiated brown adipocyte numbers and measuring triglyceride levels.

Trpv2 was dominantly expressed in brown adipocytes among *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv3* and *Trpv4*, and TRPV2 was also functionally expressed in brown adipocytes. Functional expression of TRPV2 was dramatically increased during the differentiation of mouse brown adipocytes. Moreover, pharmacological studies demonstrated that activation of TRPV2 prevents the differentiation of mouse brown adipocytes via a calcineurin pathway. Mechanical stimulation inhibited mouse brown adipocyte differentiation via TRPV2 activation. Differentiated adipocyte numbers and triglyceride levels in the isolated brown adipocytes from interscapular BAT (iBAT) were not different between WT and TRPV2-knockout (TRPV2KO) mice in the 6 day-differentiation. However, TRPV2 agonists and mechanical stimulation inhibited brown adipocyte differentiation more effectively in WT than in TRPV2KO adipocytes. FK506 and cyclosporine A rescued TRPV2 activation-induced inhibition of mouse brown adipocyte differentiation, suggesting that TRPV2 activation-induced inhibition of mouse brown adipocyte differentiation is occurred via a calcineurin pathway. iBAT weights per body weights were significantly larger in TRPV2KO than in WT mice. And TRPV2KO mice showed increased brown adipocyte cell sizes and impaired thermogenesis in response to β_3 -agonist application.

In conclusion, TRPV2 is functionally expressed in mouse brown adipocytes and plays an important role in regulating mouse brown adipocyte differentiation. Membrane stretch possibly due to the increase in brown adipocyte volume through lipid droplet accumulation induced activation of TRPV2, which might prevent mouse brown adipocyte differentiation via a calcineurin pathway. The fact that TRPV2 acts as a negative modulator in brown adipocyte differentiation suggests that TRPV2 might be involved in the prevention of iBAT over-growth. Therefore, TRPV2 would be a promising therapy target for human obesity treatment and prevention.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

本論文は、TRPV2チャンネルがマウス褐色脂肪細胞に発現し、TRPV2の活性化が褐色脂肪細胞の分化を抑制することを明らかにしたものである。

出願者は、褐色脂肪組織に発現するTRPチャンネルをスクリーニングした結果、TRPV2遺伝子が褐色脂肪組織に発現していることを見いだした。褐色脂肪細胞の初代培養系を立ち上げ、カルシウムイメージング法並びにホールセルパッチクランプ法を用いた薬理的な解析によってTRPV2の機能的な発現を確認した。さらに発現量が褐色脂肪細胞の分化に伴い増加することを見いだした。

褐色脂肪細胞に発現するTRPV2の意義を明らかにするために、分化過程におけるTRPV2の役割を検討した。分化開始時から6日間、TRPV2活性化剤存在下で培養すると、分化した褐色脂肪細胞の数が無処置の細胞と比較して減少していた。総トリグリセリド量、並びに褐色脂肪細胞の分化マーカーであるUCP1、PPAR γ 遺伝子発現量もTRPV2活性化剤処置群で低下していた。細胞内カルシウム濃度上昇が分化にどのような作用を与えるかをイオノマイシン及びタプシガルギンを用いて検討した結果、分化開始6日後に褐色脂肪細胞の分化マーカー、総トリグリセリド量が減少したことから、褐色脂肪細胞において細胞内カルシウム濃度の上昇は分化を抑制することが明らかとなった。DNA量に差は無かった。TRPV2チャンネルは機械刺激によって活性化されるチャンネルである。そこで、シェーカーを用いて機械刺激を与えながら培養し、分化マーカーへの影響を観察したところ、機械刺激によって褐色脂肪細胞の分化が抑制されることを見いだした。さらに、これらの結果がTRPV2活性化を介することを明らかにするためにTRPV2欠損マウスから作製した褐色脂肪細胞を用いてその効果を調べた。その結果、TRPV2欠損細胞ではTRPV2活性化剤、機械刺激によって起こる分化の抑制が有意に弱いことを見いだした。一方で、無処置で分化した野生型の褐色脂肪細胞とTRPV2欠損の褐色脂肪細胞との間には大きな違いを認めなかった。白色脂肪細胞では、細胞内カルシウムがカルシニューリンを活性化し、白色脂肪細胞の分化に関わる遺伝子の発現を抑制することが報告されている。そこで、TRPV2活性化剤による分化抑制作用に対してカルシニューリン阻害剤がどのような効果を及ぼすかを調べた。その結果、カルシニューリン阻害剤がTRPV2活性化による褐色脂肪細胞分化抑制作用を有意に阻害することを見いだした。これらの結果から、TRPV2の活性化は褐色脂肪細胞の分化を抑制することが明らかとなった。

さらに、個体レベルにおけるTRPV2の役割を検討するためにTRPV2欠損マウスの解析を行った。その結果、TRPV2欠損マウスの褐色脂肪組織では細胞並びに脂肪滴の肥大化が認められた。また、褐色脂肪細胞の機能を検討するために*in vivo*麻酔下で褐色脂肪組織温度及び深部体温を計測した結果、TRPV2欠損マウスでは β 3受容体活性化剤投与による褐色脂肪組織並びに直腸温の上昇が有意に減弱していた。これらの結果から褐色脂肪組織の機能維持にTRPV2が必須であることが明らかとなった。

以上のように、出願者はマウス褐色脂肪細胞におけるTRPV2チャンネルの発現を遺伝子レベル、蛋白質レベル、機能的レベルで明らかにし、TRPV2活性化が褐色脂肪細胞の分化ならびに熱産生等の機能維持に重要な役割を担うことを証明した。本研究は褐色脂肪細胞における細胞内カルシウム濃度上昇の役割を明らかにし、TRPV2の褐色脂肪組織における生

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

理的役割を議論した非常に優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。