

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07428

研究課題名(和文) 可溶性LR11による脂肪細胞病的トランスディファレンシエーションの検査基盤の同定

研究課題名(英文) Establishment of examinational basis for pathological trans-differentiation of adipocytes through soluble LR11

研究代表者

姜 美子 (Jiang, Meizi)

東邦大学・医学部・非常勤研究生

研究者番号：00624066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂肪細胞のブラウニングフェノタイプ変換におけるLDL受容体スーパーファミリーLR11の役割を解明することを目的とした。脂肪組織より二次元培養褐色脂肪細胞と三次元培養ベージュ脂肪細胞を調整し、その細胞生物学的解析から、LR11は白色、褐色、ベージュ脂肪細胞フェノタイプ間のトランスディファレンシエーション機構に関与することが示唆された。ヒト検体解析により、血中可溶性LR11が動脈硬化の進展した病態において高値を示した。LR11は脂肪細胞のブラウニングトランスディファレンシエーションの制御破綻により動脈硬化の進展した病態を表す検査マーカーになる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主な学術的意義は、これまで細胞培養系では生体で見られる形態と機能を鑑別することが難しかった白色細胞と褐色・ベージュ脂肪細胞の特徴を表現する三次元培養解析系を確立したこと、さらに、それを用いて脂肪細胞のブラウニングフェノタイプ機構におけるLDLレセプタースーパーファミリーLR11の関与を明らかにしたことである。社会的意義は、血中可溶性LR11濃度が動脈硬化で高値を示すという検査学的病態基盤を同定したことである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the role of LR11, an LDL receptor super-family member, on the browning phenotype transition of adipocytes. The cell-biological study using 2D-cultured brown adipocytes and 3D-cultured beige adipocytes suggested that LR11 is involved in the trans-differentiation mechanism among the white, brown and beige phenotypes of the cultured adipocytes. The human sample studies indicated that circulating soluble LR11 levels are increased in diseases with advanced atherosclerosis. LR11 is expected to be an examination marker for atherosclerosis in association with the disturbed regulation of trans-differentiation in adipocytes.

研究分野：病態検査学

キーワード：フェノタイプ変換 LDLレセプタースーパーファミリー LR11 脂肪細胞 ディファレンシエーション
褐色脂肪 ベージュ脂肪

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

『成熟細胞の病的フェノタイプ変換』は病態検査学の基礎研究課題である。これまでに研究代表者は、LDL レセプタースーパーファミリー可溶性受容体 LR11 が、血管平滑筋細胞をコントラクトイルフェノタイプにディファレンシエーション、皮下脂肪細胞をブラウニングフェノタイプにトランスディファレンシエーションすることを抑制し、その遺伝子がロックアウトされるとこれらのディファレンシエーションが促され、その結果として血管傷害後の動脈硬化や過食による肥満に著しい抵抗性を示すことを報告した(J Clin Invest 2008, Nature Commun 2015)。とりわけ、近年、褐色脂肪には至らない軽度のベージュ細胞が出現するブラウニングモデルマウスが数多く発見されるなか、本マウスモデルの褐色脂肪細胞への変換は著しい。褐色脂肪細胞の分化は、筋細胞と起源を同一にする(myf5+前駆細胞)ものと白色脂肪細胞と起源を同一にする(myf5-前駆細胞)ものが知られ、褐色脂肪細胞の分化とエネルギー消費の機能獲得は、白色脂肪の分化を制御する転写因子に加えて PRDM16 をはじめとする褐色脂肪細胞に特異的な転写因子による協調的な調節が必要である。しかしながら、この制御は不明のところが多く、その機構の解明は世界的競合テーマである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成熟脂肪細胞の病的フェノタイプ変換におけるブラウニング細胞へのネガティブレギュレータ LR11 に焦点を当てることで、ブラウニング細胞へのトランスディファレンシエーション制御機構を解明する。そのための細胞生物学的基盤を明らかにできる培養細胞系を構築する。これまで代表者が明らかにしてきた一連のマウス解析と細胞生物学の研究成果を背景に、これまで平面培養では生体で見られる形態と機能を鑑別することが難しかった白色細胞と褐色・ベージュ脂肪細胞の特徴を表現する解析系を確立し脂肪細胞の病的フェノタイプ制御における可溶性 LR11 の役割を明らかにし、糖尿病や動脈硬化で高値を示す血中 LR11 濃度の検査学的基盤を同定する。

3. 研究の方法

1) ブラウニング脂肪細胞培養系の確立

本細胞解析に用いる Mesenchymal stromal cells(MSCs)はヒトおよびマウス皮下脂肪より従来の方法(Nature Commun 2015)により調整した。通常の平板環境で3-14日増殖培養後、一部の細胞はブラウニング誘導培地でさらに7-10日(二次元培養)分化培養を行い、一部の細胞はFP001ポリマー(Nissan Chemical)存在下脂肪細胞分化誘導培地(Cell Application)でさらに28日間培養し(三次元培養)成熟分化した脂肪細胞を回収した。

2) ブラウニング脂肪細胞の解析

細胞形態はOil-red O染色により、mRNA発現はreal-time RT-PCRにより、それぞれ解析した。Norepinephrine (NE)を6時間添加した後の可溶性LR11濃度をELISA(Sekisui)測定した。

3) LR11欠損二次元培養脂肪細胞の解析

LR11 ロックアウトマウスおよび野生型マウス脂肪組織より上記の方法でMSCsを調整し二次元培養を行い、NE添加前後のUCP-1 mRNA発現量を解析した。一部MSCsに不活化処理を行って回収した。

4) ヒト血中可溶性LR11解析

それぞれの共同研究施設で測定解析した。

本研究計画は東邦大学および共同研究施設の倫理委員会および該当する委員会で承認され実施した。

4. 研究成果

1) ブラウニング脂肪細胞培養系の確立

二次元培養MSCsをブラウニング誘導させ成熟分化させた成熟脂肪細胞では細胞全体に多胞性の小型脂肪滴を認めた。一方、P001ポリマー存在下で分化誘導した三次元培養成熟脂肪細胞では細胞内に単一の大型脂肪滴を認めた。

2) ブラウニング脂肪細胞の解析

二次元培養MSCsを引き続きブラウニング誘導させ成熟分化させた多胞性脂肪細胞では、Uncoupling protein-1 (UCP-1) mRNA発現が急速に増加した。LR11 mRNA発現は二次元培養MSCsの増殖とともに著しく増大し、コンフルエント状態で発現量は徐々に減少した。ブラウニング誘導させた多胞性脂肪細胞では、UCP-1 mRNA発現の増大と対照的にLR11 mRNA発現は著しく減少し、その後、LR11 mRNA発現量はほぼ一定に保たれた。この二次元培養多胞性脂肪細胞は、NE存在下で時間依存性にUCP-1 mRNA発現量が増大するのに対し、LR11 mRNA発現量は著しく低下し

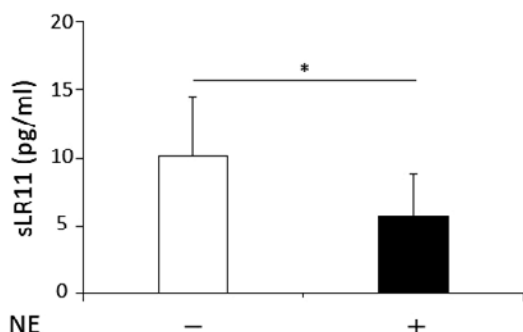


図1 二次元培養多胞性脂肪細胞におけるノルエピネフリン (NE) 添加による培養液中可溶性 LR11 濃度の差異 (* $p < 0.05$)

た。培地中の可溶性 LR11 量も NE 添加により有意に低下した (図 1)。

三次元培養分化誘導脂肪細胞では、脂肪細胞の成熟とともに UCP-1 mRNA 発現量が増大した。一方、LR11 mRNA 発現量も著しく増加したが成熟が進むとともに低下した。この三次元培養単胞性脂肪細胞は、NE 存在下で時間依存性に UCP-1 mRNA 発現量、LR11 mRNA 発現量ともに増大した。

以上の結果より、二次元培養ブラウニング脂肪細胞は褐色脂肪細胞に特徴的な多胞性形態と UCP-1 発現誘導を示し、三次元成熟脂肪細胞はベージュ脂肪細胞に特徴的な単胞性形態と UCP-1 発現を示した。今後、本培養系における 2 種類の異なった形態のブラウニング細胞の遺伝子発現などを詳細に調べる必要がある。さらに、この 2 種類の

ブラウニング細胞において、フェノタイプ変換ネガティブレギュレータ LR11 の発現誘導が異なっていたことから、その発現誘導機構が白色脂肪、褐色脂肪、ベージュ脂肪という異なった脂肪細胞フェノタイプ間におけるブラウニングトランスディファレンシエーションの制御に関わることが示唆される。

3) LR11 欠損二次元培養脂肪細胞の解析

LR11 ノックアウトマウス皮下脂肪組織 MSCs 由来二次元培養脂肪細胞における NE 添加による UCP-1 mRNA 発現量の変化を検討したところ、LR11 欠損細胞では野生型マウス由来細胞に比べて UCP-1 mRNA 発現は NE 添加前後ともに増大していた (図 2)。

一部の MSCs に不死化処理を行い脂肪細胞に成熟する複数のクローンを獲得した。

4) ヒト血中可溶性 LR11 解析

様々な原因で血管傷害が進展する病態における血中可溶性 LR11 濃度解析の結果から、頸動脈狭窄、妊娠高血圧、川崎病により血管傷害の進展する病態で高値となることが示された。

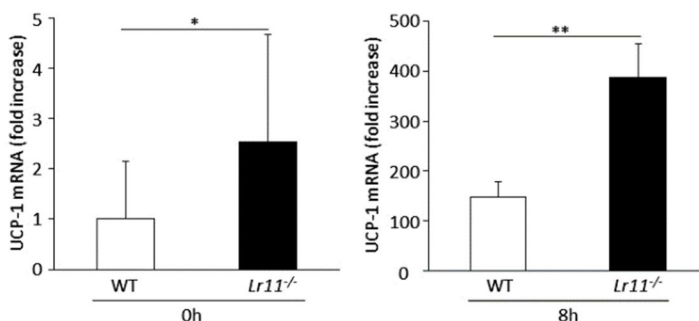


図2 LR11 ノックアウトマウス由来二次元培養脂肪細胞 (*Lr11*^{-/-}) と野生型由来二次元培養脂肪細胞 (WT) におけるノルエピネフリン (NE) 添加前後による UCP-1 mRNA 量の差異 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

総括

脂肪組織 MSCs から熱産生遺伝子 UCP-1 を発現し、褐色脂肪とベージュ脂肪細胞の特徴である多胞性と単胞性の培養脂肪細胞

を同定した。両細胞のブラウニング成熟過程と熱産生機能発現過程における LR11 発現は異なっていること、さらに、UCP-1 発現誘導は LR11 欠損細胞で増大することから、LR11 発現の差異がベージュ脂肪と褐色脂肪の形成に関わる可能性がある。今後、本細胞培養系を用いた LR11 欠損不死化脂肪細胞の解析により LR11 の役割が明らかになることが期待される。さらに、ヒト検体解析により、血中可溶性 LR11 が血管傷害などの血管病において高値を示すことが一層確実になった。可溶性 LR11 はブラウニングトランスディファレンシエーションの制御破綻により引き起こされる血管傷害に基づく動脈硬化などの病態を表す血中検査マーカーになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shoko Nakamura, Meizi Jiang, Rena Oka, Takashi Yamaguchi, Nobuyuki Hiruta, Hiroyuki Ebinuma, Wolfgang J Schneider, Ichiro Tatsuno and Hideaki Bujo	4. 巻 7
2. 論文標題 LR11, an LDL Receptor Gene Superfamily Member, Represses the Norepinephrine-Induced Expression of Uncoupling Protein 1 in Primary Cultured Beige Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toho Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 48-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14994/tohojmed.2020-019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mikamo H, Jiang M, Noro M, Suzuki Y, Hiruta N, Unoki-Kubota H, Schneider WJ, Bujo H	4. 巻 17
2. 論文標題 Susceptibilities of epicardial and subcutaneous fat tissue for browning-gene expression and diet-induced volume reduction are different	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 6542-6550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.8690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Harada M, Jiang M, Terai K, Ebinuma H, Hiruta N, Schneider WJ, Sugo N, Nagao T, Bujo H	4. 巻 490
2. 論文標題 Levels of circulating soluble LR11, a regulator of smooth muscle cell migration, are highly associated with atherosclerotic plaques in patients with carotid artery stenosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 69-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe K, Suzuki H, Jiang M, Tsukano S, Kataoka S, Ito S, Sakai T, Hirokawa T, Haniu H, Numano F, Hoshina S, Hasegawa S, Matsunaga M, Chiba K, Saito N, Yoshida H, Takami S, Okubo S, Hirano H, Saitoh A, Bujo H.	4. 巻 86
2. 論文標題 Soluble LR11 as a Novel Biomarker in Acute Kawasaki Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 977-983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-20-1271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 姜 美子, 武城英明
2. 発表標題 疾患マーカーとしての可溶性リポ蛋白受容体 - 脂肪細胞バイオマーカーの可能性 -
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Meizi Jiang, Tatsuro Kanaki, Akiteru Hayashi, Hiroyuki Ebinuma, Wolfgang J. Schneider, Hideaki Bujo
2. 発表標題 The LDL-receptor relative LR11 is an autonomous regulator of white-to-beige trans-differentiation in polymer-scaffold 3D-cultured adipocytes.
3. 学会等名 American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jiang M, Ebinuma H, Murano T, Bujo H
2. 発表標題 Expression of LR11/SorLA, a thermogenesis suppressor, is regulated in adipogenesis of cultured adipocytes
3. 学会等名 25th European Congress on Obesity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姜 美子, Antonio Vidal-Puig, Monique T. Mulder, Wolfgang J.Schneider, 武城英明
2. 発表標題 ベージュ脂肪は高脂肪摂取マウスの脂質異常を抑制する 脂肪の質を変える食事生活指導の可能性
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	武城 英明 (BUJO Hideaki) (80291300)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	延辺大学付属病院			
英国	ケンブリッジ大学			