

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03411

研究課題名(和文) 脂肪細胞でPPAR 活性を制御する生理活性脂質受容体のG12/13依存性シグナル

研究課題名(英文) G12/13-dependent signaling of bioactive lipid receptors that regulate PPARgamma activity in adipocytes

研究代表者

石井 聡 (Ishii, Satoshi)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10300815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)： リゾホスファチジン酸(LPA)の第四受容体(LPA4)は、脂肪細胞において三量体Gタンパク質G12/13と共役するによって2型糖尿病の増悪因子として機能することが肥満マウスの解析で明らかになっている。そこでヒトの白色脂肪組織におけるLPA4 mRNAの発現を、痩せ型の人、糖尿病性肥満の人、非糖尿病性肥満の人の中で比較したが、3群間で有意な差は認められなかった。

LPA4と同様にLPA6はG12/13と共役する受容体で脂肪細胞に発現している。そこで肥満LPA6-KOマウスを使ってLPA6の代謝機能に関する検討を行ったが、検討対象とした代謝パラメーターには異常は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満者の中には、代謝的に健康な肥満(MHO)と呼ばれるサブグループが存在し、これらの肥満者は健康な代謝を維持し、2型糖尿病などの肥満関連疾患の発症リスクの上昇を示さない。LPA4を介したMHOのメカニズムについての理解につながる研究を進展させることにより、新しい2型糖尿病の治療・診断方法の開発に寄与できる可能性がある。また、LPA4と受容体の機能が類似しているLPA6にも注目して今後検討することも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Analysis of obese mice has shown that the fourth receptor (LPA4) for lysophosphatidic acid (LPA) functions as an aggravating factor for type 2 diabetes by coupling with G12/13 proteins in adipocytes. Thus, we compared the expression of LPA4 mRNA in human white adipose tissue between lean, diabetic obese, and non-diabetic obese individuals and found no significant differences among the three groups.

Like LPA4, LPA6 is a G12/13-coupled receptor and is expressed in adipocytes. Therefore, we conducted a study on the metabolic function of LPA6 using obese LPA6-KO mice and found no abnormalities in the metabolic parameters examined.

研究分野：生化学

キーワード：シグナル伝達 LPA リゾホスファチジン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質の一部にはホルモン様の生理活性を示すものが存在し、これらは脂質メディエーターと総称される。多くの脂質メディエーターは特異的な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と結合して、その受容体独特の細胞内シグナルを惹起する。申請者は脂質メディエーターの一つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) に対する新規のサブタイプ GPCR、LPA 第四受容体 (LPA4) を世界に先駆けて報告した (Noguchi *et al.* J. Biol. Chem. 278, 25600-25606 [2003])。LPA4 はマウスにおいて脂肪細胞、特に白色脂肪細胞に発現が高く、三量体 G タンパク質 G12 や G13 と共役することも明らかになった (Yanagida *et al.* JCI Insight 3:e97293 [2018])。LPA4-KO マウスの解析で、高脂肪食餌負荷した LPA4-KO マウスは野生型マウスと比較して同程度に肥満するにもかかわらず、惹起されるインスリン抵抗性が軽微であった。また、LPA4-KO マウスの精巣上体周囲の白色脂肪組織では過度なりモデリング (炎症と線維化) が抑制されており、白色脂肪細胞の分化・機能に重要な役割を持つミトコンドリア生成に関連する遺伝子群 (PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$ , PGC-1 等) の発現が高く、さらにアディポネクチン産生量も高かった。これらの LPA4-KO マウス表現型には、核内受容体 PPAR $\alpha$  の発現と機能の亢進が深く関与すると考えられた。

肥満は 2 型糖尿病を含む一連の代謝異常と密接に関連している。しかし、肥満者の中には、代謝的に健康な肥満 (MHO) と呼ばれるサブグループが存在し、これらの肥満者は健康な代謝を維持し、肥満関連疾患の発症リスクの上昇を示さない。最近の研究により、MHO という状態は、白色脂肪組織の過度なりモデリングの抑制、ミトコンドリアの機能亢進、アディポネクチン産生亢進により、脂肪蓄積能力が向上した結果であることが示唆されている。よって、LPA4-KO マウスの表現形を考慮すると、このマウスが MHO の新しい動物モデルとなる可能性がある。さらに、ヒトでも脂肪細胞における LPA4 の発現低下が MHO をもたらす一つの因子となる可能性がある。

一方、申請者は LPA4 同定後の 2009 年に LPA6 の同定にも成功し、やはりこの受容体が G12/13 タンパク質に共役することを報告した。LPA6 は LPA4 と同様に白色脂肪細胞で発現が高く、シグナル伝達も類似していることから、脂肪細胞における機能が LPA4 と重複する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) ヒトで認められる MHO と LPA4 の関連性を調べる足掛かりとして、ヒトの白色脂肪組織における LPA4 mRNA の発現を、痩せ型の人、糖尿病性肥満の人、非糖尿病性肥満の人の中で比較した。

(2) LPA6 の白色脂肪細胞における生理学的役割を調べるために、LPA6-KO マウスを使って LPA6 の代謝機能に関する検討を *in vivo* で行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト脂肪組織サンプル

東京大学病院で胃切除を受けた男性患者から内臓脂肪組織を入手した (東京大学大学院研究科糖尿病代謝内科 門脇孝 前教授からの供与)。肥満の診断は、Body mass index ( $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) により行った。糖尿病の診断は、日本糖尿病学会糖尿病診断基準委員会に基づき行った。RNeasy Lipid Tissue Mini Kit を用いて各患者の内臓脂肪組織約 40mg から Total RNA を採取し、cDNA 合成と定量 RT-PCR は定法に従い行った。相対的な遺伝子発現量は、36B4 (RPLP0 遺伝子にコード) の発現量で標準化した。使用したプライマー配列を以下に示す。

LPA4 Forward: AAATTGGTGCCAGGATTTGGT

LPA4 Reverse: TGGGTCTGAGGCTTGAATTTG

RPLP0 Forward: GATTACACCTTCCCCTTGGCTGA

RPLP0 Reverse: CCGACTCCTCCGACTCTTCC

本試験は、東京大学医学部施設研究倫理委員会の承認を得た。検体の使用については、参加者全員からインフォームドコンセントを得た。

#### (2) LPA6-KO マウスの解析

LPA6-KO マウスについては、以前に論文で報告した全身で LPA6 遺伝子を欠損したマウスラインを用いた (Hata *et al.* Int. Immunol. 28, 283-292 [2016])。マウスの肥満モデルとして、高脂肪食餌負荷モデルを採用した。具体的には、単独飼育している 8 週齢の雄マウスに高脂肪食 (HFD32; 日本クレア社) を 12 週間摂取させて、体重増加について検討した。解剖の際は 16 時間絶食後、麻酔下で開腹・安楽死させた後、精巣上体周囲の内臓脂肪組織と鼠径部の皮下脂肪組織と肝臓を採取しその重量を比較した。グルコース負荷試験は、16 時間絶食させたマウスにグルコースを腹腔内投与した (1.0 g/kg 体重)。インスリン負荷試験は、4 時間絶食させたマウスにヒトインスリン (ノボノルディスクファーマ社) を腹腔内投与した (1.5 U/kg 体重)。いずれの試験でも、所定の時刻に尾静脈から採血した。血中グルコース濃度は自動血糖値測定器 (グルテストネオ; 三和ケミカル社) を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト内臓白色脂肪組織における LPA4 mRNA の発現

ヒトで認められる MHO と LPA4 の関連性を調べるために、痩せ型 ( $n = 8$  人)、糖尿病性肥満 ( $n = 5$  人)、非糖尿病性肥満 ( $n = 7$  人) の内臓白色脂肪組織におけるヒト LPA4 mRNA の発現を比較した。3 群間で統計的有意差は得られなかったが、非糖尿病性肥満の内臓白色脂肪組織における LPA4 mRNA の発現は、糖尿病性肥満の内臓白色脂肪組織よりも低い傾向にあった ( $1.19 \pm 0.09$  vs.  $1.44 \pm 0.12$  [平均値  $\pm$  標準誤差; 単位は任意])。

今回の研究では、非糖尿病性肥満の内臓白色脂肪組織における LPA4 mRNA の発現が、他の群と比較して統計学的有意に低い結果は得られなかった。しかし、今後サンプル数を増やしたさらなる研究により、有意差を示せる可能性はあると考えられる。LPA4 を介した MHO のメカニズムについての理解につながる研究を進展させることにより、新しい 2 型糖尿病の治療・診断方法の開発に寄与できる可能性がある。

##### (2) LPA6 の 2 型糖尿病への関与の可能性について

通常食を摂取した 18 週齢の LPA6-KO マウスにおいて、体重・白色脂肪組織 (精巣上体周囲の内臓脂肪組織と鼠径部の皮下脂肪組織) 重量・肝臓重量を測定したが、野生型マウスと比較して異常は認められなかった ( $n = 3-6$  匹; 図 1a-d)。次に、8 週齢の LPA6-KO マウスに高脂肪食を 12 週間摂取させて、肥満時における糖脂質代謝異常への LPA6 の寄与について検討した。高脂肪食を摂取しても LPA6-KO マウスは野生型マウスと同等の体重増加を示した ( $n =$  各 20 匹; 図 1a)。高脂肪食摂取の LPA6-KO マウス由来の白色脂肪組織重量と肝臓重量はともに、野生型マウスと同等だった ( $n =$  各 10 匹; 図 1b-d)。高脂肪食を摂取マウスに対して、グルコースまたはインスリンを腹腔内に投与したが、血中グルコース濃度の時間変化には野生型マウスとの有意な差は認められなかった (図 1e, f)。

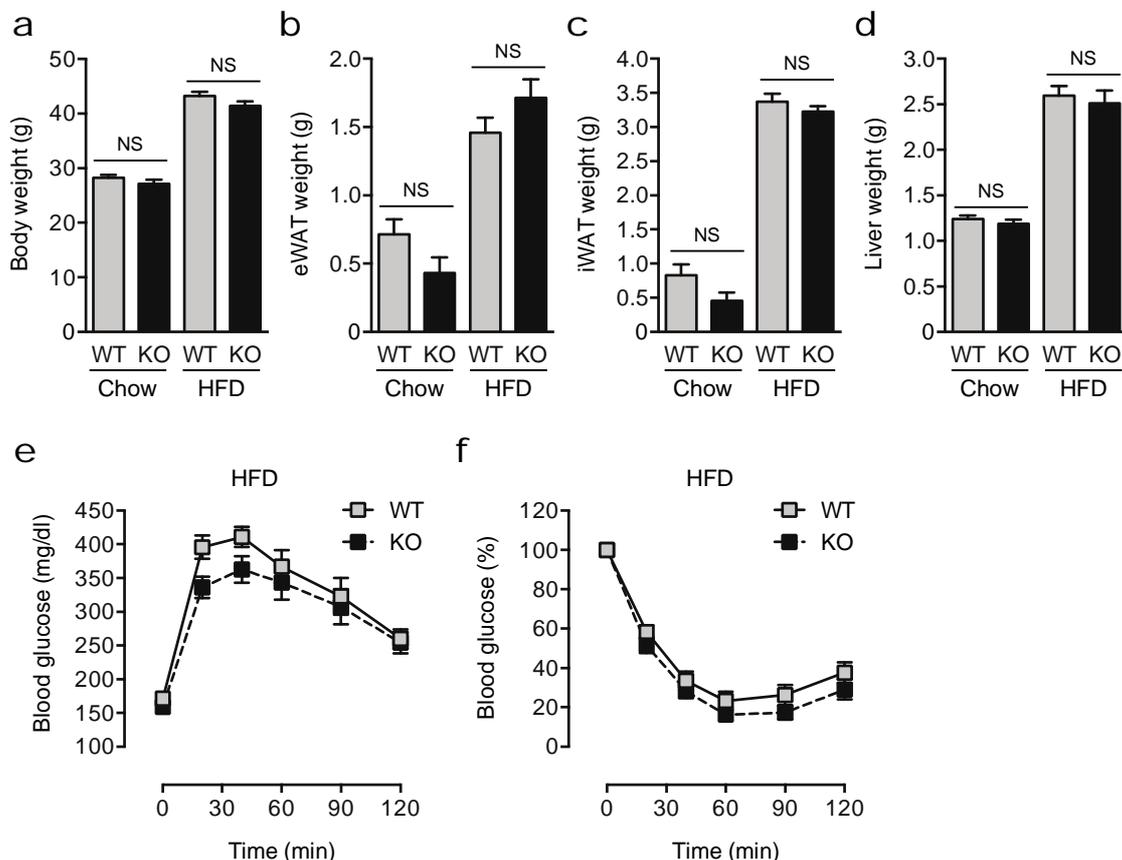


図 1 通常食 (Chow) または高脂肪食 (HDF) を摂取した LPA6-KO マウスの代謝パラメーター (a) 体重, (b) 精巣上体周囲の内臓脂肪組織重量, (c) 鼠径部の皮下脂肪組織重量, (d) 肝臓重量, (e) 腹腔内へグルコース投与後の血糖値の時間変化, (f) 腹腔内へインスリン投与後の血糖値の時間変化. データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した. NS: 統計学的有意差無し.

以上の結果は、マウスの肥満に伴う白色脂肪組織の機能不全に起因する 2 型糖尿病 (インスリン抵抗性や耐糖能低下) の発症に LPA6 は関与しないことを示唆する。LPA6-KO マウスは正常に発生し、明らかな異常は認められない。一方、LPA4-KO マウスは約 30% が胎生致死となるが

(Sumida *et al.* Blood 116, 5060-5070 [2010])、LPA6 とのダブル KO マウスは 100%が胎生致死となる (Yasuda *et al.* J. Clin. Invest. 129, 4332-4349 [2019])。更なる解析により、ともに G12/13 と共役する LPA4 と LPA6 は、血管内皮細胞で協調的に機能することが胎児期の血管新生に必須であることが明らかになった。LPA4 単独 KO マウスに比べダブル KO マウスで表現型が顕著になったのはこれが理由であると考えられる。ゆえに、脂肪細胞特異的な LPA4/LPA6 ダブル KO マウスの表現型を LPA4 単独 KO マウスの表現型と比較すれば、脂肪細胞においても LPA6 が LPA4 と協調した機能を持つかどうかを確認することができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuda, D., Kobayashi, D., Akahoshi, N., Ohto-Nakanishi, T., Yoshioka, K., Takuwa, Y., Mizuno, S., Takahashi, S., and *Ishii, S.	4. 巻 129
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid-induced YAP/TAZ activation promotes developmental angiogenesis by repressing Notch ligand Dll4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Clin. Invest.	6. 最初と最後の頁 4332-4349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI121955	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 -

1. 著者名 安田大恭、石井聡	4. 巻 47
2. 論文標題 リゾホスファチジン酸による血管新生の分子メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Akita J. Med.	6. 最初と最後の頁 11- 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 石井聡	4. 巻 19
2. 論文標題 アレルギー疾患における血小板活性化因子(PAF)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 皮膚アレルギーフロンティア	6. 最初と最後の頁 81-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Satoshi Ishii
2. 発表標題 G12/13-coupled Non-Edge LPA receptors mediate developmental angiogenesis
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conferences; Lysophospholipid and Related Mediators: From Bench to Clinic（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田大恭、小林大礎、吉岡和晃、 多久和陽、石井 聡
2. 発表標題 転写共役因子YAP/TAZを介したリゾホスファチジン酸の血管新生制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Yasuda, Daiki Kobayashi, Kazuaki Yoshioka, Yoh Takuwa, Satoshi Ishii
2. 発表標題 G 12/13-coupled LPA receptors play an important role in developmental angiogenesis
3. 学会等名 ICBL 2019 -60th International Conference on the Bioscience of Lipids- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Ishii
2. 発表標題 Pathophysiological significance of platelet-activating factor (PAF) in allergic diseases
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第44回年次学術大会・総会 ランチョンセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレス発表資料  <a href="https://research-er.jp/articles/view/81280">https://research-er.jp/articles/view/81280</a></p>
---

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 分担者	安田 大恭  (Yasuda Daisuke)  (70594951)	秋田大学・医学系研究科・講師    (11401)	

	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	門脇 孝  (Kadowaki Takashi)		

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			
米国	Virginia Commonwealth University			
ハンガリー	Semmelweis University			