

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890034

研究課題名（和文） メタボリックシンドロームにおけるリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 の機能解析

研究課題名（英文） Role of lysophosphatidic acid receptor LPA4 in the progression of metabolic syndrome

研究代表者

柳田 圭介 (YANAGIDA KEISUKE)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00583882

研究成果の概要（和文）：リゾホスファチジン酸（以下 LPA）は特異的な G タンパク質共役型受容体を介して様々な生理機能を発揮する生理活性脂質である。当研究室において、新規の LPA 受容体、LPA4 が同定されたが、その機能についてはほとんどわかっていない。本研究では、LPA4 欠損マウスを用い、LPA4 が肥満に伴うインスリン抵抗性の惹起や脂肪肝の進行に関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Lysophosphatidic acid (LPA) is a bioactive lipid mediator eliciting diverse biological functions through its specific G protein-coupled receptors. Although we have identified the fourth LPA receptor LPA4, little is known about physiological or pathological role of LPA4. Here we have revealed that LPA4 is involved in obesity-associated insulin resistance and fatty liver by using LPA4-deficient mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：脂質、シグナル伝達、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) リゾホスファチジン酸受容体 LPA4

リゾホスファチジン酸（以下 LPA）は最も単純な化学構造のリズリン脂質である。LPA は特異的な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して様々な生理機能を発揮する。1990 年代に 3 つの LPA 受容体が同定されていたが

(LPA1-3)、2003 年当研究室において、リガンド未同定のいわゆるオーファン GPCR の解析の過程で、LPA1-3 とは相同性の低い新規の LPA 受容体、LPA4 が同定された。近年 LPA1-3 の各種欠損マウスが作製され、LPA が生体内において実に多くの生理的・病的な局面において重要な働きをしていることが明らかになってきた。その一方で、LPA4 の機能についてはほとんどわかっていない。研究代表者ら

はこの新規 LPA 受容体の機能を明らかにすべく LPA4 欠損マウスを作製しその解析を行なっている。

(2) メタボリックシンドロームと LPA

メタボリックシンドロームとは、肥満とそれにより生じたインスリン抵抗性により、糖尿病・高脂血症・高血圧が生じ、最終的には動脈硬化の発症や進展につながっていく疾患概念である。現在日本におけるメタボリックシンドロームやその予備軍の該当者は 2,000 万人を超え、その予防が重要課題となっている。この背景や病態についてはまだ不明な点が多いが、肥満に伴う脂肪組織の変化が全身のインスリン抵抗性を引き起こすことが発端となるとされている。LPA は主にオートタキシン (ATX) と呼ばれるリゾホスホリパーゼにより合成されるが、興味深いことに ATX は脂肪組織に極めて強く発現することが知られている。脂肪組織がインスリン抵抗性を引き起こすスタート地点となることと合わせて考えて、脂肪組織の ATX とそれにより合成される LPA がメタボリックシンドロームの病態進行に関わっていることが強く予想された。

2. 研究の目的

本研究は研究代表者らが解析をすすめているリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 について、近年社会問題となっているメタボリックシンドロームの進行における役割を、遺伝子欠損マウスと分子細胞生物学的手法を用いて明らかにし、さらにその分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルでの機能解析

LPA4 のメタボリックシンドロームの進行における役割を明らかにするため、当教室で樹立された LPA4 欠損マウス (LPA4^{WT-KO} マウス) と対照群として野生型マウス (WT マウス) に高脂肪食を摂食させて、その表現型について解析を行った。具体的には、それぞれのマウスについて以下のような項目について検討した。

- ① 体重変動、脂肪組織や肝臓重量
- ② 脂肪組織や肝臓の組織学的解析
- ③ 脂肪組織による各種遺伝子発現
- ④ インスリン抵抗性や感受性に関与する各種ホルモン等の定量
- ⑤ インスリン抵抗性や耐糖能

(2) LPA4 欠損によるインスリン抵抗性改善の分子メカニズム解明

LPA4 が脂肪組織に強い発現を認めることか

ら、脂肪組織の LPA4 が WT マウスにおいてインスリン抵抗性を増悪化させていると考えられた。脂肪組織は脂肪細胞のみならず、その前駆細胞である脂肪前駆細胞や血管内皮細胞、炎症性細胞から構成される。従って、脂肪組織の酵素消化と各種細胞の細胞膜マーカー分子に対する抗体と磁気ビーズを用いることで、これらの細胞を分離し、それぞれにおける LPA4 の発現量を比較した。脂肪細胞分化の *in vitro* 実験としてマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使ったものが最もよく使用されている。LPA4 が MEF に強く発現していることから、WT マウスと LPA4-KO マウスの MEF を使い、LPA4 が脂肪細胞分化に対して促進的または抑制的に働くかについて検討を行なった。具体的にはコンフルエント到達 2 日後にデキサメサゾン、インスリン、IBMX で処理することで、MEF が脂肪細胞に分化するので、各種脂肪細胞特異的なマーカー遺伝子の発現を指標にして、野生型マウス・LPA4-KO マウス間由来の MEF で比較を行なった。また、LPA4 による細胞内シグナル伝達に関わる阻害剤 (ROCK 阻害剤; Y27632) の影響についても検討した。

4. 研究成果

(1) 個体レベルでの機能解析

① 体重変動、脂肪組織や肝臓重量

まず、WT マウスと LPA4-KO マウスに高脂肪食を摂食させることで肥満を惹起させ、体重変動を比較したところ、両群の間に有意な差は認められなかった。

一方、脂肪組織と肝臓の重量を検討したところ、脂肪組織の重量は両群に大きな違いが認められなかったが、肝臓重量は LPA4-KO マウスの群で著しく小さいことがわかった。WT マウス群では高脂肪食負荷と肥満により、肝臓の肥大化に伴って脂肪肝の様相を呈していたが、LPA4-KO マウスでは肝臓の様相が正常食摂取下のマウスと類似しており、脂肪肝の進行が抑制していることがわかった。

② 脂肪組織や肝臓の組織学的解析

次に、上記表現型をもたらす機序に迫るべく、肝臓や LPA4 を高発現する脂肪組織の組織学的解析を行った。ホルマリン固定後の肝臓組織切片において、Oil red-O 染色 (脂肪を染色) にて解析したところ、WT マウス群では非常に強い染色が認められた一方、LPA4-KO マウス群においてはほとんど染色されず、普通食摂食下のマウス肝臓に近い組織像を示した。従って、LPA4-KO マウスでは脂肪肝の進行が抑制されていることが、組織上からも確認された。

脂肪組織の量的質的変動が脂肪肝の進行に大きな影響を与えることが数多くの研究か

ら示されている。ホルマリン固定後の脂肪組織切片において、LPA4-KO マウスの脂肪組織では各々の脂肪細胞のサイズが WT マウスに比べて小さいことがわかった。また、WT マウスの脂肪組織においては炎症細胞が集積するエリアが多く認められたのに対して、LPA4-KO マウスにおいてはそれがほとんど認められなかった。上記の通り、両マウス群において脂肪組織の重量は大きく違わなかったことから、WT マウスと LPA4-KO マウスの間における脂肪組織の質的違いが脂肪肝進行の違いにつながっている可能性が示唆された。

③ 脂肪組織による各種遺伝子発現

上記の通り、組織切片上 WT マウスの脂肪組織においては炎症細胞が集積するエリアが多く認められたのに対して、LPA4-KO マウスにおいてはそれがほとんど認められなかった。近年、脂肪組織における慢性炎症が全身におけるインスリン抵抗性や脂肪肝進行につながるということが数多くの研究により支持されている。そこで、定量 PCR で脂肪組織における慢性炎症に関わる各種遺伝子発現を検討した。肥満になり脂肪組織が大きくなると、炎症性サイトカインである TNF α や MCP-1 の発現が増加し、マクロファージが浸潤してくることが知られているため、TNF α 、MCP-1 やマクロファージマーカーである CD68、F4/80 の mRNA 発現を検討した。結果、高脂肪食負荷をした WT マウス脂肪組織においてはこれらの遺伝子発現が亢進している一方、LPA4-KO マウス脂肪組織ではこれらの発現が有意に低いことが確認された。従って、LPA4-KO マウスの脂肪組織は肥満に伴う慢性炎症の進行が抑制されていることが示唆された。

④ インスリン抵抗性や感受性に関与する各種ホルモン等の定量

肥満はインスリン抵抗性につながるが、その点において、脂肪組織から分泌されてインスリン抵抗性を改善または悪化させるアディポカインが近年注目されている。上記の通り、高脂肪食負荷条件において LPA4-KO マウスにおいては脂肪組織の質的改善が認められたため、これがアディポカインの量に影響している可能性が考えられた。そこで、各種アディポカインの血中濃度を ELISA 法によって検討した結果、インスリン感受性アディポカインであるアディポネクチンの血中濃度が LPA4-KO マウスにおいて WT マウスに比べて有意に高いことがわかった。アディポネクチンは肥大化していない”良質”な脂肪細胞から多く放出され、肝臓や骨格筋におけるインスリン抵抗性を改善すること、また脂肪肝の進行も抑制することが知られており、

LPA4-KO マウスで認められた脂肪肝の抑制や以下の⑤で示すインスリン抵抗性の改善をもたらす原因の一つが高いアディポネクチンの血中濃度である可能性が示唆された。

⑤ インスリン抵抗性や耐糖能

肥満による脂肪細胞の肥大化や脂肪肝の進行が全身のインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病につながるということが知られている。そこで、高脂肪食負荷した各群のマウスの空腹時血糖値を調べたところ、血清中のグルコースが LPA4-KO マウスで低値を示すことがわかった。その機序として WT マウスで生じるインスリン抵抗性が LPA4-KO マウスでは軽減していること、つまり LPA4-KO マウスにおいては肥満が生じているにも関わらずインスリン感受性が保たれている可能性が考えられた。そこで、各マウス群にインスリンを投与して血糖値の変動を検討した結果、たしかに LPA4-KO マウスにおいてはインスリンが効きやすく、WT マウスに比較して血糖値低下率が高いことがわかった。また、グルコースを経口投与し、血糖値の変動を検討した結果、LPA4-KO マウスにおいてはより早期に血糖値がグルコース投与前までに低下することが確認された。以上の結果より、高脂肪食負荷による肥満モデルにおいて、LPA4-KO マウスはインスリン抵抗性を生じにくく、耐糖能が維持されることがわかった。

(2) LPA4 欠損によるインスリン抵抗性改善の分子メカニズム解明

LPA4 が脂肪組織に強い発現を認めることから、脂肪組織の LPA4 が WT マウスにおいてインスリン抵抗性を増悪化させていると考えられた。脂肪組織は、脂肪細胞の他、その前駆細胞である前駆脂肪細胞、血管を構成する血管内皮細胞、炎症に関わるリンパ球やマクロファージなど複数の細胞から構成される。そこで、脂肪組織の酵素消化と各種細胞の細胞膜マーカー分子に対する抗体と磁気ビーズを用いることで、これらの細胞を分離し、それぞれにおける LPA4 の発現量を比較した。結果、LPA4 は脂肪細胞とその前駆細胞である脂肪前駆細胞に高い発現を示すことがわかった。

脂肪細胞分化の *in vitro* 実験としてマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使ったものが最もよく使用されている。LPA4 が MEF に強く発現していることから、WT マウスと LPA4-KO マウスの MEF を使い、LPA4 が脂肪細胞分化に対して促進的または抑制的に働くかについて検討を行なった。分化誘導後 8 日目の細胞において、PPAR γ やアディポネクチンといった脂肪細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を検討した結果、LPA4-KO マウス由来の MEF 細胞において、これらの遺伝子発現が有意に高いこ

とがわかった。また細胞内トリアシルグリセロールの定量によっても、LPA4-KO マウス由来の MEF 細胞においてより分化が亢進していることが確認された。研究代表者らはこれまでに LPA4 が Rho と呼ばれる低分子 G タンパク質とその下流で働く Rho 結合キナーゼ

(ROCK) を活性化することを明らかにしている (Yanagida et al.)。したがって、Rho や ROCK の活性化が脂肪細胞への分化に寄与する可能性が考えられた。そこで、脂肪細胞分化実験における ROCK 阻害剤である Y27632 の効果について検討した。結果、ROCK の活性を阻害剤で抑制すると WT マウス由来の MEF 細胞の脂肪細胞への分化の程度が LPA4-KO マウス由来の MEF 細胞と同等まで亢進することがわかった。さらに LPA4-KO マウス由来の MEF 細胞においては ROCK 阻害剤による影響を大きくは受けないことも示された。以上のことから、前駆脂肪細胞では、LPA4 を介して伝達されるシグナルが、ROCK を活性化させることを通じて PPAR γ の発現を抑制しており、その結果として脂肪細胞の分化を抑制する役割をもつことが示唆された。

(3) 研究のインパクト

以上の結果から以下のような LPA4 を介した生理的メカニズムが示唆された。つまり、脂肪細胞から分泌された ATX は細胞外で LPA を産生する。この LPA は、WT マウスの細胞の場合には、前駆脂肪細胞に働き、脂肪細胞への分化を抑制する。マウスが脂肪負荷された場合、脂肪細胞は脂肪を蓄積する必要に迫られるが、脂肪細胞が増えることのできない状況下ではそれぞれの脂肪細胞に過負荷が掛かるために細胞は徐々に肥大し、悪玉脂肪細胞へと変貌する。その結果、脂肪組織では炎症が起こり、また血中アディポネクチン量が低下する。これにより、マウスはインスリン抵抗性や脂肪肝といった生活習慣病を発症することになる。逆に LPA4 が欠損している場合には、LPA4 を欠損した前駆脂肪細胞は、LPA による脂肪細胞への分化抑制が生じない。そのため、マウスに脂肪が負荷された場合、WT マウスに比べて多くの脂肪細胞が動員されることになる。これにより、脂肪細胞一つあたりの脂肪蓄積の負担は軽く、細胞の肥大は最小限に抑えられる (善玉脂肪細胞)。このことは則ち、脂肪組織の量 (重さ) は同じでも脂肪細胞の質が維持されることを意味し、LPA4-KO マウスでは生活習慣病の発症が遅延することとなる。

今後、LPA4 の拮抗剤 (アンタゴニスト) が得られれば、ヒトの前駆脂肪細胞においても LPA による PPAR γ の発現の抑制効果の解除が可能になると思われる。その結果、成熟脂肪細胞形成の促進や血中アディポネクチン濃度の増加を介して、2 型糖尿病の病態の根幹

をなす「インスリン抵抗性」を改善することが期待できる。同様のメカニズムをもつインスリン抵抗性改善薬として、PPAR γ アゴニスト (ピオグリタゾン) が広く用いられているが、肝臓にも働くことで脂肪肝を誘発する可能性も動物実験等から示唆されている。本研究のターゲットとなった LPA4 は肝臓には発現が極めて低く、脂肪組織に発現が高いため、LPA4 拮抗剤は脂肪組織に標的を絞った、より理想的なインスリン抵抗性改善薬になることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yanagida, K. and Ishii, S., Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research, *J. Biochem.*, 査読有、vol 150, 2011, pp. 223-232
DOI: 10.1093/jb/mvr087
- ② Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., Abe, M., Yanagida, K., Hamano, F., Sato, S., Tamaki, K., Morishita, Y., Kano, MR., Iwata, C., Miyazono, K., Sakimura, K., Shimizu, T., and Ishii, S., LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis.、*Blood*, 査読有、vol 116, 2010, pp. 5560-5570
DOI: 10.1182/blood-2010-03-272443
- ③ Ihara, Y., Kihara, Y., Hamano, F., Yanagida, K., Morishita, Y., Kunita, A., Yamori, T., Fukayama, M., Aburatani, H., Shimizu, T., and Ishii, S. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor.、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 査読有、vol. 107, 2010, pp. 17309-17314
DOI: 10.1073/pnas.1001165107
- ④ 柳田圭介、石井聡、リゾホスファチジン酸受容体研究 Update、医学のあゆみ、査読無、233 巻、2010、pp. 807-811

[学会発表] (計 2 件)

- ① 柳田 圭介、メタボリックシンドロームにおけるリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 の病態生理機能、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、国立京都国際会館、京都府・京都市)

② Keisuke Yanagida, Functional analysis of p2y5/LPA6 receptors with missense mutations identified in familial hypotrichosis/woolly hair patients、FASEB summer research conferences、2011年8月14日-19日、ルッカ・イルシオッコ、(イタリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 圭介 (YANAGIDA KEISUKE)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00583882

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし