

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390231

研究課題名(和文)可溶性受容体LR11による褐色脂肪細胞トランスディファレンシエーションの分子解明

研究課題名(英文)Molecular clarification of trans-differentiation to brown adipocytes through the action of soluble receptor LR11

研究代表者

武城 英明 (BUJO, Hideaki)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：80291300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、LR11欠損にともなう脂肪細胞トランスディファレンシエーションの病態生理と脂肪細胞の分子機序を、LR11を過剰発現する白血病細胞やLR11が枯渇してアルツハイマー病を発症する神経組織解析とあわせて、解明することを目的とした。トランスディファレンシエーションの分子基盤を提示し、細胞フェノタイプ変換を調節する可溶性LR11産生に重要なシェディング機構を明らかにした。本研究結果から、可溶性LR11が白色脂肪細胞の褐色化やベージュ化のネガティブレギュレーターであることが明らかになり、その放出を修飾することが新たな肥満や糖尿病治療の創薬標的になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of study is to clarify the physiological significance of and molecular mechanism underlying the trans-differentiation of brown from white adipocytes in LR11-deficient mice, together with the analyses of LR11-overexpressing hematological cells and LR11-decreasing neuronal tissues. Our findings demonstrate that the soluble form of LR11 (sLR11) suppresses thermogenesis in adipose tissue in a cell autonomous manner. Mice lacking LR11 were protected from diet-induced obesity due to increased browning of white adipose tissue and hyper-metabolism. In addition, the shedding of LR11 is regulated by proteinase with other molecules, and the soluble form and the left intracellular form may function as independent molecules for the regulation of cell phenotype. Thus, the regulation of sLR11 production is expected as a novel target for developing strategies to treat obesity and diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：LR11 脂肪細胞 褐色 エネルギー産生 トランスディファレンシエーション 糖尿病 可溶性

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は平滑筋細胞の病的フェノタイプ変換の分子機序を明らかにし動脈硬化の治療学へ展開した。この一連の分子解明のなかで高分化した平滑筋細胞が病的機能を獲得するようになるキレギュレータ、LDL 受容体スーパーファミリ-*LR11* を発見した。*LR11* は過剰にもしくは異所性に誘導されると合成型平滑筋細胞を病的に未分化な細胞へ誘導する。Shedding された可溶性受容体は、心血管病やアルツハイマー病の新規の治療マーカーとして国内外で臨床研究が進んでいる。この一連の研究のなかで、予期せず平滑筋細胞の病的フェノタイプ変換が脂肪細胞研究の課題である『白色細胞から褐色脂肪細胞へのトランスディファレンシエーション』に結びつく事実遭遇した。*LR11* ノックアウトマウスの脂肪は褐色脂肪へ分化を規定する転写因子を誘導し高脂肪摂取で白色脂肪が異所性褐色脂肪に置き換わる。このモデル観察はこれまで臨床研究で明らかになった *LR11* 異常による下記の病態形成と合致する。1) 白血病がん細胞は *sLR11* を過剰発現し血中濃度が 500 倍に達する。寛解とともに正常化し *LR11* 値は治療反応性の予測因子となる。2) アルツハイマー病患者の *LR11* 発現は減少し *LR11* の遺伝子多型は発症予測リスクである。この共通機序が褐色脂肪のトランスディファレンシエーションを解明し治療開発を促すという研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、このモデルの病態生理とその脂肪細胞の分子機序を、*LR11* を過剰発現する白血病がん細胞や *LR11* が枯渇するアルツハイマー病神経細胞の機能とあわせて、解明し、脂肪細胞トランスディ

ファレンシエーションの分子基盤を提示し、これを修飾する創薬を探索する。脂肪細胞トランスディファレンシエーションの分子機序モデルとその原因遺伝子の発現異常が病態を形成することが明らかな 2 種類の細胞をあわせて検討することで、代謝学かつ生理学の重要課題を解明し、脂肪細胞の機能異常による代謝病の創薬へ新規アプローチを提示する。

3. 研究の方法

LR11 異常発現マウスとその細胞系、*LR11* 異常発現を同定した 2 種類の異なった病態細胞系から脂肪細胞トランスディファレンシエーションの分子基盤を解明し薬剤による修飾法を探索する。

1) *LR11* ノックアウトにおける褐色脂肪細胞の分子病態：モデルマウスの病態生理学、培養脂肪細胞の分化誘導と包括的遺伝子プロファイル解析から分化制御を解析する。申請者による本モデルの細胞生物学的解析・包括遺伝子プロファイル解析と共同研究者によるエネルギー消費に関わる病態生理学解析を合わせて分子病態を包括的に解析する。1) エネルギー代謝の生理学的解析：体重および体温変動、食餌摂取量、酸素消費量、寒冷刺激後の代謝反応を *LR11*^{-/-}マウスと野生型で比較解析する。2) 培養脂肪細胞の分化解析：マウス白色および褐色脂肪に由来する前駆細胞クローンを初代培養選択し、分化誘導への反応性と遺伝子発現、細胞機能解析を行う。3) 脂肪細胞遺伝子と機能の包括的解析：*LR11*^{-/-}マウスの *PRDM16*、*PGC1*、*UCP-1* など mRNA および蛋白の各部位脂肪での

定量的発現、異所性発現、脂肪合成と分解機能を包括的に解析する。

2 LR11 過剰発現する白血病がん細胞および LR11 発現が減弱するアルツハイマー病神経細胞の分化制御機構：造血幹前駆細胞の転写因子に対する LR11 作用、マウス骨髄による生着と分化プロファイルなどから LR11 の分化制御機構を解析する。LR11 を過剰発現する造血幹前駆細胞の LR11 制御機構を解明する。mRNA 発現低下と Shedding による髄液中への可溶性 LR11 の放出が病的神経細胞へ導く。免疫組織解析による神経細胞から LR11 が放出される機序を解析する。

尚、組換え DNA 実験、動物実験は、それぞれ、施設の委員会の承認のもとで、法的および倫理的手続きに沿って実施した。

4. 研究成果

1) LR11 ノックアウトマウスの病態生理学解析

LR11 ノックアウトマウス体重の差異を検討するために、通常食に加えて、体重増加を最大限に引き出すために高脂肪食で飼育した。通常食 4 週では両者に差異は認めなかったが、腎周囲脂肪と傍精巣脂肪は有意にノックアウトマウスで減少していた。対照的に、高脂肪負荷ノックアウトマウスは有意に体重が低下し、その減少は主に白色脂肪と肝臓の重量の低下に起因していた。脂肪蓄積の差異は 8 週後にさらに顕著になった。組織学的解析により、ノックアウトマウスでは褐色脂肪の脂肪滴が小さく、肝臓の脂肪蓄積に抵抗性を示していた。エネルギーバランス解析の結果、通常食、高脂肪食ともにノックアウトマウスと野生型で差異は無

いことから、体重増加の差異はエネルギー消費に依存する可能性が示された。エネルギー消費解析から、高脂肪食で、ノックアウトマウスは野生型に比べて高い代謝率を有することが明らかになった。ノックアウトマウスは、空腹時血糖、インスリン、トリグリセリド値は低値である一方で、脂肪酸、T4、レプチン、コレステロールは有意な変化を示さなかった。組織リポ蛋白リパーゼ活性も有意差は無かった。

LR11 は主に神経細胞で発現している。しかしながら、野生型マウス皮下脂肪細胞での発現解析から、脳組織と同等に発現していることが明らかになった。このことから、ノックアウトマウスの脂肪細胞の表現型の変化が代謝率の差異を引き起こしている可能性が考えられた。上述の褐色脂肪における脂肪含量の減少はより代謝が盛んで熱産生が活性化していることを示唆している。皮下脂肪の脂肪量の低下は、脂肪蓄積の減少か脂肪酸化の亢進していることを示唆する。過去の研究から、薬物や栄養シグナルに反応して皮下脂肪は『褐色化』する特性を有することが知られる。そこで、免疫染色解析を行うと、野生型に比べて UCP1 が高発現していることが明らかになった。マイクロアレイによる遺伝子包括解析から、熱産生に関わる遺伝子群の発現が有意に増大し、代表的な熱産生遺伝子の発現亢進は定量 PCR 解析で確認された。同様な亢進はノックアウトマウス褐色細胞でも認められた。他のファミリー受容体遺伝子や血管新生等に関わる遺伝子発現の差異はなかった。これらの解析結果から、ノックアウトマウスは脂肪負荷による熱産生への増大した反応性を持っていることが明らかになった。

BMP7 とその下流シグナルカスケードであ

るsmad蛋白のリン酸化は、褐色脂肪細胞や白色脂肪における『ページ』細胞動員を制御する鍵となる機序として知られることから、ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来白色脂肪細胞をBMP7存在化に分化させ、この作用へのLR11の関与を検討した。LR11欠損細胞は、BMP7に反応して有意に高い熱産生遺伝子発現をあらわし、この反応は、可溶性LR11存在化で両方のマウス由来細胞とも完全に抑制された。BMP7によるsmad1/5/8蛋白のリン酸化は、LR11非存在下で大きく増加し、可溶性LR11存在下でその増大は消失した。可溶性LR11はまた、BMP7によるbmpr1b受容体のダウンレギュレーションを十分に抑制し、さらに、TGF β 刺激に反応する皮下脂肪細胞のSMAD3のリン酸化も有意に減少させた。

2) LR11過剰発現する白血病がん細胞およびLR11が枯渇することでアルツハイマー病が発症する神経の分化制御機構

一部の白血病細胞はLR11を強発現するとともに豊富な可溶性LR11を放出する。このことから、成熟細胞より一部の未分化状態の前駆細胞がLR11を発現しその細胞機能を調節している可能性がある。骨髓の前駆細胞の維持に重要な因子として知られる低酸素環境のLR11制御機構について解析した。免疫組織解析ならびにmRNA解析から、低酸素はマウス前駆細胞であるc-kit(-)Lin(-)細胞のLR11発現を増大させた。U937細胞において、低酸素はLR11の一過性の転写亢進と引き続いて細胞蛋白産生、可溶性LR11放出を促進した。c-kit(-)Lin(-)細胞の低酸素に誘導される支持細胞への接着能はLR11ノックアウトマウス由来細胞で減弱していた。一方、可溶性LR11はU937細胞やc-kit(-)Lin(-)細胞の接着能を亢進した。これらの接着能の制御はウロキナーゼ受容体中和抗体

で減弱した。このように、可溶性LR11産生の制御因子として低酸素状態があることが明らかになった。可溶性LR11は、細胞膜近くの細胞外領域でプロテアーゼADAM17により切断され放出される。テトラスパニンCD9はADAM17によるTNF α やICAM1を細胞表面上でADAM17がシェディングする作用を制御することが知られていることから、血液細胞におけるCD9のLR11シェディングにおける役割を解析した。LR11はTHP-1単球では発現がみられなかったが、PMA処理したYHP-1マクロファージで発現し放出されていた。共焦点顕微鏡解析から、LR11とCD9蛋白はPMA処理THP-1細胞表面に共局在していた。LR11を発現するにもかかわらずCD9を発現していないICRF-SB細胞にCD9を強制発現すると、細胞から放出される可溶性LR11が減少した。CD9は細胞のLR11シェディングを制御し可溶性LR11産生に重要であることが明らかになった。このように、LR11はシェディングされ、細胞外へ大きな蛋白が放出されるとともに、細胞内に小さな細胞内領域が残されると考えられる。そこで、細胞外領域と細胞内領域をそれぞれエピトープとした異なった抗LR11抗体をもちいて組織免疫染色を行なったところ、細胞外領域蛋白と細胞内領域蛋白のほとんどは異なった局在を示したことから、LR11蛋白の多くはプロテアーゼによりシェディングされ、可溶性受容体として存在するとともに、細胞内領域は、脂肪細胞解析で認められた別の機序を保持し細胞機能調節に関わることが示唆された。

以上、LR11ノックアウトマウスモデルの病態生理とその脂肪細胞の分子機序解析、ならびに、LR11を過剰発現する白血病がん細胞やLR11が枯渇することでアルツハイマー病が発症する神経組織解析とあわ

せて、LR11による細胞トランスディファレンシエーション機構を解析した。モデル解析と細胞生物学解析により脂肪細胞トランスディファレンシエーションの分子基盤を提示した。また、これらの細胞フェノタイプ変換を調節する機能を有する可溶性LR11産生に重要なシェディング機構を細胞生化学的に検討した。本研究成果から、可溶性LR11は白色脂肪細胞の褐色化、ベージュ化のネガティブレギュレーターであることが明らかになり、その放出を修飾することで細胞トランスディファレンシエーションを制御できる可能性がある。今後、新たな肥満や糖尿病治療の創薬標的になると考えられる。

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 6 件)

1. Ogita M, Miyauchi K, Jiang M, Kasai T, Tsuboi S, Naito R, Konishi H, Dohi T, Takayuki Y, Okazaki S, Shimada K, Bujo H, Daida H: Circulating soluble LR11, a novel marker of smooth muscle cell proliferation, is enhanced after coronary stenting in response to vascular injury, *Atherosclerosis* 237(1):374-378, 2014、査読あり、doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.044.
2. Shimizu N, Nakaseko C, Jiang M, Nishii K, Yokote K, Iseki T, Higashi M, Tamaru J, Schneider WJ, Bujo H: G-CSF induces the release of the soluble form of LR11, a regulator of myeloid cell mobilization in bone marrow. *Ann Hematol* 93(7):1111-22, 2014、査読あり、doi: 10.1007/s00277-014-2033-0.
3. Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Higashi M, Fujikawa K, Matsue K, Yokote K, Tamaru JI, Bujo H, Nakaseko C: Potential utility of serum soluble LR11 as a diagnostic biomarker for intravascular large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2014;55(10):2391-4、査読あり、doi: 10.3109/10428194.2014.880430
4. Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamaru JI, Bujo H, Nakaseko C. LR11: a novel biomarker identified in follicular lymphoma. *Br J Haematol*. 2013; 163(2):277-80、査読あり、doi: 10.1111/bjh.12467
5. Tsukamoto S, Takeuchi M, Kawaguchi T, Togasaki E, Yamazaki A, Sugita Y, Muto T, Sakai S, Takeda Y, Ohwada C, Sakaida E, Shimizu N, Nishii K, Jiang M, Yokote K, Bujo H, Nakaseko C. Tetraspanin CD9 modulates ADAM17-mediated shedding of LR11 in leukocytes. *Exp Mol Med*. 2014 ;4:46-89、査読あり、doi: 10.1038/emm.2013.161
6. Nishii K, Nakaseko C, Jiang M, Shimizu N, Takeuchi M, Schneider WJ, Bujo H. The soluble form of LR11 protein is a regulator of hypoxia-induced, urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)-mediated adhesion of immature hematological cells. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11877-86、査読あり、doi: 10.1074/jbc.M112.442491

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武城 英明 (BUJO, Hideaki)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：80291300

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：