

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790907

研究課題名(和文)新規の異所性褐色脂肪モデルによる脂肪細胞分化調節機序の解明

研究課題名(英文)Clarification of mechanism underlying adipocyte differentiation using a novel model for ectopic accumulation of brown fat tissues

研究代表者

姜 美子 (JIANG, Meizi)

東邦大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00624066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はLR11KOマウスを用いて白色脂肪から褐色脂肪への分化を制御する分子機序を解明することを目的とした。LR11KOマウス皮下脂肪組織に多房性の脂肪細胞が現れ、マイクロアレイ解析から褐色脂肪細胞に特有な遺伝子発現プロファイルを得た。LR11KOマウス皮下脂肪組織由来培養細胞の褐色脂肪へ成熟分化後、UCP1、Cidea、PGC1 の遺伝子発現が亢進し、リコンビナントLR11を添加することによりその遺伝子発現は抑制された。以上より、LR11が白色脂肪組織の前脂肪細胞における異所性褐色脂肪へ転写因子調節を介した分化への制御因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Obesity is frequently accompanied with metabolic disorders such as diabetes, dyslipidemia and hypertension. However, the development of accompanied disorders varies largely depending on the genetic factors as well as life-style conditions. Adipose tissues have been largely classified to two types with different histological and physiological properties; white adipose tissue and brown adipose tissue (BAT). Animal studies have shown that the failure in increasing heat production in BAT leads to excess of energy intake compared with energy expenditure. The existence of BAT in adult humans has been recently found using modern imaging techniques. We studied that the role of Lr11 in the production of ectopic differentiation of brown adipocytes in WAT using the knockout mice. The soluble receptor was important for the prevention of the ectopic differentiation of BAT in mice. Our study results contribute to a new treatment development for the obesity-associated diabetes.

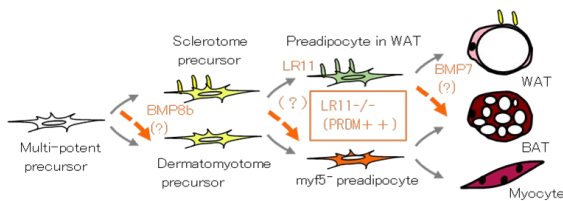
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム 脂質代謝異常

### 1. 研究開始当初の背景

臨床画像解析の発達により機能的な褐色脂肪がヒト成人脂肪組織に存在することが明らかになった。褐色脂肪は白色脂肪と異なりエネルギー消費を担うため、それを発生誘導することが糖尿病や代謝疾患の治療に結びつくこと期待されている。褐色脂肪細胞は脂肪細胞の特徴を有するとともに、機能的に筋細胞と類似し独自の熱産生機能を有する。近年、ヒト成人で褐色脂肪が存在し寒冷刺激とともにエネルギー消費が活発になることが認識された。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、この制御機構は不明のところが多く、近年、PRDM16によるPGC1発現機構が発見されたことから、PRDM16の制御機構が世界的競合テーマである。このようななかで私たちは、世界に先駆けて作成した可溶性受容体LR11のノックアウトマウスの脂肪細胞に異所性褐色脂肪分化が著しく誘導されることを発見した。LR11は本研究室でクローニングされたLDL受容体スーパーファミリーである。私は、これまでにこの新規分子が通常は発現していないにもかかわらず動脈硬化の平滑筋で強く発現すること、その発現は未分化細胞で亢進し、インテグリンシグナルを介して細胞分化を制御し、ノックアウトマウスでは血管障害後の未分化平滑筋による内膜肥厚が抑制されることを明らかにした。



### 2. 研究の目的

このような背景から未分化平滑筋細胞から同定された LR11 を発生工学的に欠損させることで脂肪組織内に褐色脂肪を異所性発現誘導するモデルを作製するに至った。本研究はこのモデルの病態生理学解析および培養細胞を用いた細胞生物学解析から、新規の細胞分化モジュレータ LR11 を介する褐色脂肪分化の分子機序を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) LR11 ノックアウトマウスの病態生理学 LR11 ノックアウトマウスに高脂肪食負荷や寒冷刺激による詳細な体重変動、臓器障害、エネルギー消費反応、インスリン感受性誘導を解析する。皮下脂肪組織の褐色脂肪特異的な遺伝子発現を検討する。また、皮下脂肪組

織の包括的遺伝子発現プロファイル解析を行う。

2) 培養前駆脂肪細胞を用いた細胞生物学 マウス皮下脂肪及び褐色脂肪から初代培養細胞を樹立する。培養前駆脂肪細胞を用いて分化刺激反応、脂肪蓄積、転写因子発現を検討する。

上記のモデル解析ならびに細胞生物学的解析を統合し、LR11 の作用に関わる分子メカニズムを解明し、最終的に新規の褐色脂肪分化制御の分子機序を提示する。

### 4. 研究成果

1) LR11 ノックアウトマウスの病態生理学解析

ノックアウトマウス脂肪組織重量は低値であり、高脂肪食負荷 8 週間行うことにより、野生型マウスでは体重増加と脂肪肝、高血糖、高インスリン血症を認めるのに対し、ノックアウトマウスでは体重はほとんど増加せず、肝臓組織像では異常を認めず、血糖値、インスリン値も正常範囲内だった(図 1、図 2、図 3、図 4)。

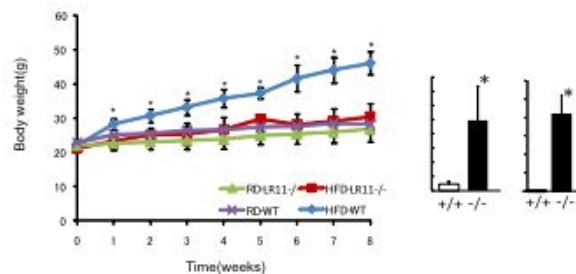


図 1 高脂肪食負荷後の体重変動(左グラフ)と負荷後の皮下脂肪における PGC1α(中グラフ)と Cidea(右グラフ)の遺伝子発現

高脂肪食負荷により野生型マウスの体重増加が著しいのに対し、LR11-/-マウスは体重増加がほとんど見られず、通常食負荷の野生型マウスと同等である。LR11-/-マウス皮下脂肪の遺伝子発現は野生型に比べ著しく増加する(\*p<0.01対+/+)。

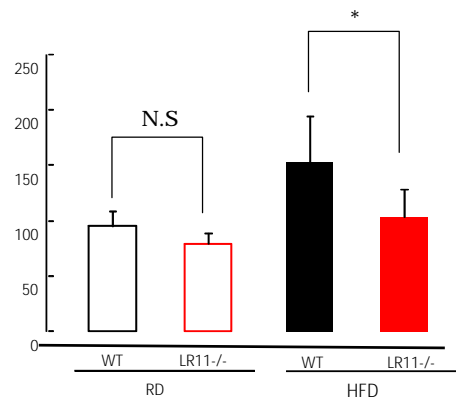


図 2 通常食飼育と高脂肪食負荷後の空腹血糖値

高脂肪食負荷により野生型マウスはLR11 ノックアウトマ

ウスに比べ空腹血糖値が有意に増加していた。

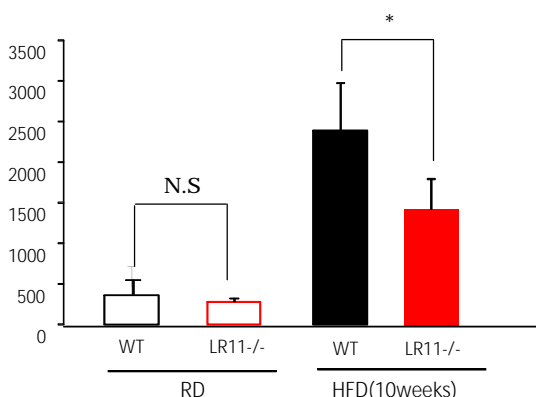


図3 通常食と高脂肪食負荷後のマウス空腹インスリン値

高脂肪食負荷後のLR11ノックアウトマウスの空腹インスリン値は有意に低下していた。

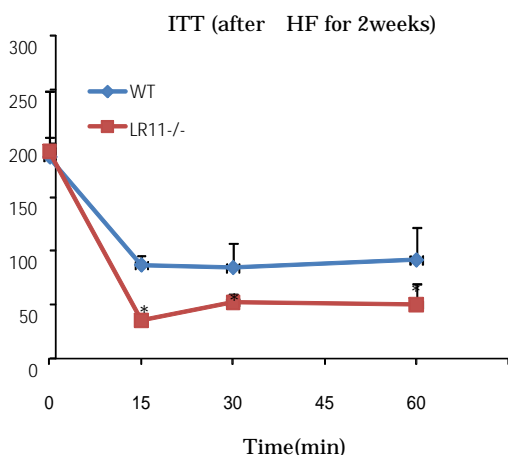


図4 高脂肪食負荷後のインスリン投与試験

高脂肪食負荷2週後LR11ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、インスリン感受性が亢進していた。

高脂肪食負荷後のマウスに糖負荷試験を行ったところ、ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ糖負荷30分、60分の血糖値とインスリン値が有意に野生型マウスより低下していた。また、インスリン投与試験を行った結果、インスリン投与15分、30分のノックアウトマウス血糖値は野生型マウスに比べ有意に低下していた。組織学解析によりノックアウトマウスの皮下脂肪組織に多房性の脂肪細胞が現れた。LR11ノックアウトマウスと野生型マウスの褐色脂肪組織、皮下脂肪組織から抽出したRNAを網羅的にマイクロアレイ解析し遺伝子発現プロファイルを得た。LR11ノックアウトマウスでは褐色脂肪細胞機能発現に必要な包括的遺伝子発現とともに分化調節に重要な転写因子である遺伝子が著しく誘導されていた。同定した遺伝子の定量mRNA解析の結果、

LR11ノックアウトマウス皮下脂肪組織では、UCP1、PGC1、Cidea、アドレナリン受容体3、BMP8b、Cox8b、Elavl3、PPAR等の遺伝子発現が野生型マウスより有意に著しく亢進していた。

2) 培養細胞を用いた細胞生物学的解析  
マウス皮下脂肪組織と褐色脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞から白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞へそれぞれ分化誘導刺激を行い、脂肪蓄積した成熟脂肪細胞を作成することに成功した。LR11ノックアウトマウス皮下脂肪組織由来細胞の褐色脂肪への成熟分化後に、UCP1、Cidea、PGC1の遺伝子発現が亢進し、リコンビナントLR11を添加することによりその遺伝子発現は抑制された。

以上の研究成果から、LR11が白色脂肪組織の前脂肪細胞における異所性褐色脂肪へ転写因子調節を介した分化への制御因子であることが明らかになった。近年の先端画像解析から機能的な褐色脂肪がヒト成人脂肪組織に存在する。褐色脂肪は白色脂肪と異なりエネルギー消費を担うため、それを発生誘導し機能発現することで糖尿病や代謝疾患の治療に結びつくと期待される。本研究で明らかになった可溶性受容体による異所性褐色脂肪の生成機序の解明は、その分化制御の解明のみならず、本分子を用いた新規の糖尿病治療への開発アプローチを提示することで促進する可能性がある。

#### 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10件)

1. 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、査読有  
doi: 10.1111/bjh.12467
2. Shiba T, Bujo H, Takahashi M, Sato Y, Jiang M, Hori Y, Maeno T, Shirai K. Vitreous fluid and circulating levels of soluble Ir11, a novel marker for progression of diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(12):2689-95、査読有  
doi: 10.1007/s00417-013-2373-9.
3. Alexopoulos P, Guo LH, Jiang M, Bujo H, Grimmer T, Förster S, Drzezga A, Kurz A, Perneczky R. Amyloid cascade and tau pathology cerebrospinal fluid markers in mild cognitive impairment with regards to Alzheimer's disease

- cerebral metabolic signature. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(2):401-8. 査読有  
doi: 10.3233/JAD-122329
4. 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.* 査読有 2013;288(17):11877-86.  
doi: 10.1074/jbc.M112.442491
  5. Tsolakidou A, Alexopoulos P, Guo LH, Grimmer T, Westerteicher C, Kratzer M, Jiang M, Bujo H, Roselli F, Leante MR, Livrea P, Kurz A, Perneczky R. -Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 activity is related to cerebrospinal fluid concentrations of sortilin-related receptor with A-type repeats, soluble amyloid precursor protein, and tau. *Alzheimers Dement.* 2013;9(4):386-91. 査読有  
doi: 10.1016/j.jalz.2012.01.015
  6. Ogita M, Miyauchi K, Dohi T, Tsuboi S, Miyazaki T, Yokoyama T, Yokoyama K, Shimada K, Kurata T, Jiang M, Bujo H, Daida H. Increased circulating soluble LR11 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta.* 2013;16(415):191-4. 査読有  
doi: 10.1016/j.cca.2012.10.047
  7. Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Shimizu N, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Jiang M, Sato Y, Ebinuma H, Yokote K, Iwama A, Fukamachi I, Schneider WJ, Saito Y, Bujo H. Circulating soluble LR11/SorLA levels are highly increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias. *Clin Chim Acta.* 2012;413(19-20):1542-8. 査読有  
doi: 10.1016/j.cca.2012.06.025
  8. Takahashi M, Bujo H, Shiba T, Jiang M, Maeno T, Shirai K. Enhanced circulating soluble LR11 in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2012;154(1):187-92. 査読有  
doi: 10.1016/j.ajo.2012.01.035
  9. Guo LH, Westerteicher C, Wang XH, Kratzer M, Tsolakidou A, Jiang M, Grimmer T, Laws SM, Alexopoulos P, Bujo H, Kurz A, Perneczky R. SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012 ;262(6):529-34. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286501>

10. Alexopoulos P, Guo LH, Tsolakidou A, Kratzer M, Grimmer T, Westerteicher C, Jiang M, Bujo H, Diehl-Schmid J, Kurz A, Perneczky R. Interrelations between CSF soluble A $\beta$  1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012;28(3):543-52. 査読有  
doi: 10.3233/JAD-2011-110983

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

姜 美子 (JIANG, Meizi)

東邦大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00624066