

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461369

研究課題名(和文)新規の肥満糖尿病抵抗性マウスにおける著しい異所性褐色脂肪変容の基盤解明

研究課題名(英文)Molecular basis of the severe ectopic browning transition of adipocytes in novel mice with resistance against obesity and diabetes

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、可溶性受容体LR11ノックアウトマウスを用いて、白色脂肪から褐色脂肪への機能転換を制御する機序を解明し新規の肥満と糖尿病の修飾法を探索することを目的とした。細胞生物学的解析から、褐色細胞の機能獲得にLR11がインヒビターとして働くことが明らかになった。細胞内シグナル解析から、可溶性LR11の褐色脂肪分化への抑制作用には、BMP受容体と結合することでBMP7により刺激されるシグナル伝達を抑制することが一因と考えられた。以上より、LR11は褐色脂肪機能獲得のインヒビターであり、肥満や糖尿病の新規治療に結びつく可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to clarify the mechanism underlying the regulation for the functional transition from white adipocytes to brown adipocytes, and to propose a novel modulation therapy for diabetes and obesity. Cell biological analyses showed that LR11 played an important role as an inhibitor in the functional acquisition of brown adipocytes. Intracellular signal analyses showed that, in the inhibition activity of soluble LR11 for the browning differentiation, LR11 was thought to at least in part inhibit the BMP7-induced signal cascade by the complex formation with the receptor BMPR. Taken together, LR11 was an inhibitor for the functional acquisition of brown adipocytes, and is possibly applied for the novel therapy for obesity and diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：LR11 エネルギー消費 褐色細胞 機能獲得 肥満 糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は脂肪細胞の特徴を有するとともに、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。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 Beige cell 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。このようななかで研究代表者は、細胞分化モジュレーター LR11 のノックアウトマウスが、BMP を介して褐色脂肪細胞分化を制御する褐色脂肪モデルであることに遭遇した。

### 2. 研究の目的

褐色脂肪細胞の分化は、筋細胞と起源を同一にする (myf5<sup>+</sup>前駆細胞) もの、白色脂肪細胞と起源を同一にする (myf5<sup>-</sup>前駆細胞) ものがある。研究代表者が作成した可溶性受容体 LR11 ノックアウトマウスの脂肪細胞では、異所性褐色脂肪分化が著しく誘導されたことから、海外共同研究に着手してその一部の分子機構を解明した。本研究は、このモデルを用いて、白色脂肪から褐色脂肪への機能転換を制御する分子機構の全容を解明し新規の修飾法を探索することが目的である。

### 3. 研究の方法

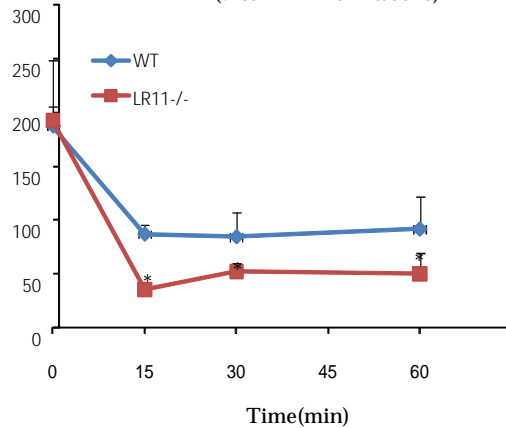
LR11 ノックアウトマウスに高脂肪食負荷および寒冷刺激による個体のエネルギー消費、糖負荷試験、インスリン感受性試験等を行った。マウス皮下脂肪及び褐色脂肪由来の培養脂肪細胞を用いて分化刺激反応、脂肪蓄積、転写因子発現を検討し、リコンビナント LR11 による褐色脂肪に関わるさまざまな機能発現に対する修飾法を解析した。

### 4. 研究成果

ノックアウトマウス脂肪組織重量は野生型に比べて減少し、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、肝臓組織像で異常を認めず、血糖値、血中インスリン値も正常範囲内だった。高脂肪食負荷後のマウスに糖負荷試験を行った結果、LR11 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 (図 1)。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有意に低下していた。脂肪組織のリアルタイム PCR

R による遺伝子発現解析の結果、ノックアウトマウス皮下脂肪組織での褐色特異的な遺伝子 PGC1、Cidea、UCP-1、Elovl3、BMP8b 発現が亢進していた。

図 1 IIT (after HF for 2 weeks)



LR11 ノックアウトマウスと野生型マウスの安静時エネルギー消費量を測定したところ、ノックアウトマウスではエネルギー消費量が增大していた。この変化は、ノックアウトマウスと野生型マウス脂肪細胞から培養した細胞レベルでも同様に認められ、マウス個体のエネルギー消費量の増大は、主にマウス脂肪細胞の変化に基づくことが明らかになった。

ノックアウトマウスおよび野生型マウスの皮下脂肪組織と褐色脂肪組織からそれぞれの初代培養前駆脂肪細胞を用意し、分化誘導 7 日後の遺伝子発現を検討した。ノックアウトマウス由来細胞では、PGC1、Cidea、UCP1 mRNA 発現がともに亢進していた。この増加はリコンビナント LR11 を添加することによりキャンセルされた。このように、マウス脂肪組織同様に、ノックアウトマウス褐色脂肪由来培養細胞では褐色脂肪に特異的な遺伝子の発現が亢進していた。

培養細胞を用いた細胞生物学的解析ではノルエピネフリン刺激により亢進した酸素消費量はリコンビナント LR11 を添加することにより有意に抑制された。また、褐色脂肪細胞にノルエピネフリンを添加することにより亢進したグリセロールの放出は LR11 リコンビナント蛋白を添加することにより有意に抑制された。

これまでに BMP7 は褐色脂肪調節因子や脂肪形成転写因子を調節しエネルギーの恒常性を調節することが報告されている。また、Smad3 シグナルの抑制により、白色脂肪細胞に褐色脂肪細胞の形質が認められるようになることが報告されている。そこで、これらの機序における LR11 の関わりを調べた。マウス初代培養脂肪細胞を用いた検討で、BMP7 により SMAD1/5/8 のリン酸化が誘導されるのに対し、リコンビナント LR11 存在下ではそのリン酸化が抑制されることが示された。免

疫沈降実験により、可溶性 LR11 と BMP 受容体と複合体形成することが明らかになり、可溶性 LR11 が本経路の受容体と結合することで Smad シグナル伝達を抑制すると考えられた。また、TGF- $\beta$  3 により誘導される SMAD3 のリン酸化もリコンビナント LR11 添加により有意に抑制された。これらの結果から、LR11 は BMP7 シグナル及び Smad3 シグナル両経路を抑制することで、褐色脂肪形成及びエネルギー産生の程度を調節すると考えられた。LR11 やそのシグナルを標的に修飾することで、肥満や糖尿病の治療となる可能性がある。

#### 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 3 件)

1. Jiang L, Konishi H, Nurwidya F, Satoh K, Takahashi F, Ebinuma H, Fujimura K, Takasu K, Jiang M, Shimokawa H, Bujo H, Daida H : Deletion of LR11 Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation With Medial Thickening in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:1972-2, 2016 (査読有)  
doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307900.
2. Terai K, Jiang M, Tokuyama W, Murano T, Takada N, Fujimura K, Ebinuma H, Kishimoto T, Hiruta N, Schneider WJ, Bujo H. Levels of soluble LR11/SorLA are highly increased in the bile of patients with biliary tract and pancreas cancers. *Clin Chim Acta.* 457:130-6, 2016 (査読有)  
doi: 10.1016/j.cca.2016.04.010.
3. Whittle AJ, Jiang M, Peirce V, Relat J, Virtue S, Ebinuma H, Fukamachi I, Yamaguchi T, Takahashi M, Murano T, Tatsuno I, Takeuchi M, Nakaseko C, Jin W, Jin Z, Campbell M, Schneider WJ, Vidal-Puig A, Bujo H. Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose tissue and correlates with BMI in humans. *Nat Commun.* 6:8951, 2015 (査読有)  
doi: 10.1038/ncomms9951.

[学会発表](計 3 件)

姜 美子、海老沼 宏幸、山口 崇、高橋 真生、龍野 一郎、金 文龍、Wolfgang J.Schneider、Antonio Vidal-Puig、武城 英明  
可溶性 LR11 は脂肪細胞の褐色化を抑制し、その血中濃度は脂肪量に依存する  
第 48 回日本動脈硬化学会、2016 年 7 月 14 日 - 15 日、東京京王プラザホテル  
ポスター発表  
Meizi Jiang, Andrew J. Whittle,

Hiroyuki Ebinuma, Takeyoshi Murano, Chiaki Nakaseko, Wenlong Jin, Antonio Vidal-Puig & Hideaki Bujo

Identification of a regulator for energy expenditure in adipose tissues - Possible application of the novel metabolic marker for infectious and chronic exhaustive diseases -

The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration followed by the 18<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases

January 11-12, 2016,

Bethesda North Marriott Hotel and Conference Center,

Poster Presentation

Meizi Jiang and Hideaki Bujo

Migration modulator LR11, an LDL receptor family member, is a novel target molecule for the detection and treatment of pathological vascular intimal smooth muscle cells

第 46 回日本動脈硬化学会、2014 年 7 月

10 日 - 11 日、東京京王プラザホテル

Oral Presentation

[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:

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

姜 美子 (JIANG, Meizi)

東邦大学・医学部・非常勤研究生

研究者番号: 00624066

(2)研究分担者  
該当者なし

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

(4)研究協力者  
清水 直美 (SHIMIZU, Naomi)  
東邦大学・医学部・講師  
研究者番号：30375802

東 守洋 (HIGASHI, Morihiko)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00323395

Antonio Vidal-Puig  
University of Cambridge Addenbrooke 's  
Hospital Metabolic Research  
Laboratories・教授