

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08068

研究課題名(和文) アディポネクチンとCTRP11による前駆脂肪細胞の増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Possible control mechanism of adipogenic progenitor cell proliferation by adiponectin and CTRP11.

研究代表者

木村 和弘 (Kimura, Kazuhiro)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：30192561

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)：分化した脂肪細胞が分泌するアディポネクチン(AN)は、主に前駆脂肪細胞を含む分画から産生される神経成長因子NGFと血管内皮細胞増殖因子VEGF165に結合した。ANはNGFの機能を抑制したが、VEGF165による血管内皮細胞の形態変化を阻害しなかった。その後、NGF、VEGFとは異なる二つの因子を前駆脂肪細胞増殖因子として同定した。ANとこの二つの因子の結合は確認したが、機能への影響は現在解析中である。CTRP11の組み換え体も準備できたので、今後、二つの因子との結合および機能への影響を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

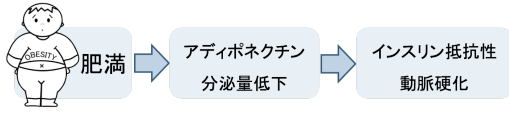
アディポネクチン(AN)の新規特性としてNGF、VEGF165、匿名の因子A、Bとの結合能とNGFの機能阻害能を示した。また因子A、Bが前駆脂肪細胞増殖因子であることを明らかにした。これらは学術的知見の蓄積に貢献するだけでなく、後者は前駆脂肪細胞を増やしてインスリン抵抗性になった組織等にインスリン感受性細胞を供給する系を活性化し、抗糖尿病効果を示すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to examine physical interaction between adiponectin (AN) and stroma-vascular fraction-derived factor and physiological importance of the interaction. I showed that AN bound to NGF, VEGF165, factor A, factor B, but not to VEGF 120, and that AN prevented NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells, but failed to influence VEGF165-induced tubulogenesis in endothelium. I also found that antibody against either factor A or factor B, but not to NGF, suppresses proliferation of adipogenic progenitors. Addition of recombinant factor A or factor B to the culture medium reverse the inhibition by corresponding antibody. As mRNA and protein were detected in the isolated preadipocytes, it is the most likely that factor A and factor B are endogenous preadipocyte growth factor. As two factors interacted with AN, further works are necessary to reveal physiological relevance of the interaction, and also interaction with CTRP11, an AN homologue.

研究分野：獣医生化学

キーワード：前駆脂肪細胞 アディポネクチン CTRP11 (C1QL4) インスリン抵抗性 肥満 NGF VEGF

1. 研究開始当初の背景

- (1) 心疾患と脳血管疾患は我が国の死因別死亡割合の 25%を占め、これら生活習慣病にかかる医療費は総医療費の約 12%にも昇る。肥満は生活習慣病の主要な危険因子であり、日本では主に食事と運動療法が対策として取入れられているが解消のみならず改善も容易ではない。肥満とは白色脂肪細胞への高度の中性脂肪の蓄積とそれに伴う組織の慢性炎症状態をいい、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF- α やインターロキン (IL)-1 などの分泌が高まり、それらによって脂肪組織以外の骨格筋や肝臓においてもインスリン感受性などが変化する。また全身および局所のエネルギー代謝も変化し、それには脂肪細胞特有の分泌因子 (アディポサイトカイン) が大きく寄与する。
- (2) アディポサイトカインであるアディポネクチン(AN)は抗炎症作用とインスリン感受性増強作用もつが、肥満度が高まることでその分泌が低下する (Trends Cardiovasc Med 24,319-24,2014; Cardiovasc Diabetol 13,103,2014)。またその作用は主に標的細胞に発現する二つの受容体 adipoR1 と adipoR2 を介する。しかし、機能ドメインである球状ドメインと血小板由来増殖因子 PDGF-BB や FGF-2 が直接、AN に結合してその機能を修飾する場合もある (Circulation 105, 2893-98, 2002; J Biol Chem 280, 18341-7, 2005)。
- 
- The diagram shows a flow from '肥満' (Obesity) to 'アディポネクチン 分泌量低下' (Decreased Adiponectin Secretion), which then leads to 'インスリン抵抗性 動脈硬化' (Insulin Resistance and Arteriosclerosis). A red box below the diagram is titled '作用機序' (Mechanism of Action) and contains two points: ① 受容体依存性: AMPK活性化 (Receptor-dependent: AMPK activation) and ② 受容体非依存性: 成長因子との結合 (Receptor-independent: Binding to growth factors), with a note that PDGF-BB, bFGF, HB-EGF binding inhibits the action.
- (3) 近年、補体 C1q や A と同様な構造を持つ C1q/TNF related proteins (CTRP)が報告された。ヒトにおいては 15 種存在し、多くは脂肪組織で発現する分泌タンパク質である (Rev Endocr Metab Disord 15,111-23, 2014; Trends Endocr Metab 23,194-204,2012)。CTRP の病態生理学的機能は少しずつ解明され始めており、脂肪組織由来 CTRP9 はマウス急性心筋梗塞モデルにおいて梗塞巣の縮小をもたらす (J Biol Chem 287,18965-73, 2012)。
- (4) 申請者はそれまでアディポカインの発現分泌調節 (Domest Anim Endocrinol 33,400-9, 2007 など)、あるいは脂肪細胞と上皮細胞 (Dev Dyn 238,1092-99, 2009 など)、血管内皮細胞 (Biochem J 374,63-9,2004 など)や交感神経系 (Peptide 34,336-42,2012 など)との相互作用への関与と役割を明らかにしてきた。さらに AN は細菌内毒素 LPS によるマクロファージからの後期炎症メディエーターHMGB1 放出を抗炎症性酵素 heme oxygenase-1 活性依存性に抑制することなどを明らかにした (Mediat Inflamm Vol. 2016, Article ID 5701959, 2016)。またピアコアによる解析により AN はケモカイン以外にもいくつかの細胞増殖因子の構造特異的に結合することを明らかにした (解析 23 分子中 11 分子:一部のみ発表)。

2. 研究の目的

- (1) 肥満は生活習慣病の危険因子であり対策が求められている。一方、肥満の進展には前駆脂肪細胞の増殖と血管新生が必須であるが、その調節機構の全容は明らかではない。肥満の進展には前駆脂肪細胞の増殖・分化と血管新生が必須である。アディポネクチン(AN)は成熟脂肪細胞から分泌され、肥満度上昇と逆比例して発現が減少する。一方、申請者は AN と神経成長因子 NGF (予備検討から内因性前駆脂肪細胞増殖因子の一つと推定)あるいは血管内皮細胞増殖因子 VEGF165 (血管新生因子) が直接結合することを見出した。そこで『成熟脂肪細胞と間質脂肪細胞との相互作用が存在し、定常状態では AN により前駆脂肪細胞や血管内皮細胞の増殖が抑制されているが、成熟脂肪細胞が肥大化すると AN 分泌が減少し前駆脂肪細胞や血管内皮細胞の増殖が開始される』と考えた。本研究では AN の NGF および VEGF の機能への影響を調べ、仮説を証明することを第一の目的とする。
- (2) 上記仮説では AN KO マウスは肥満感受性となるはずだが、そのような報告は無い。脂肪組織には AN と同様の構造を持つ CTRP-1,2,3,5,7,9,11,12,13 が発現している。このうち

CTRP11 (別名 C1QL4) は脂肪組織の SVC 画分に多く発現し、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を抑制する (J Biol Chem 288,10214-29,2013)。つまり生体内では幾つかの CTRP が AN の機能を部分的にでも代償している可能性がある。そこで CTRP11 に焦点を絞り、リガンド結合特性や発現細胞の同定、前駆脂肪細胞と血管内皮細胞の機能に対する作用を明らかにすることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

- (1) **神経成長因子 NGF に関連した実験**：NGF は脳その他、末梢の白色および褐色脂肪組織 (WAT/BAT) にもその受容体と共に高発現しており、その発現は肥満と共に増加する。また AN との結合解離定数は約 100nM である。NGF は PC12 細胞の神経突起伸張作用を示すことが知られており (Neuropathology 19,288-93, 1999)、本研究ではまずこの系を用いて NGF と AN との結合の役割を探る。また脂肪細胞に発現する NGF の役割は報告されていない。そこでまずは NGF の間質血管細胞 (SVC) 画分に含まれる前駆脂肪細胞の増殖能および成熟脂肪細胞への分化能への影響について評価する。NGF の脂肪細胞に対する機能が明らかになった場合、その系における AN の作用について調べる。
- (2) **血管内皮細胞増殖因子 VEGF に関連した実験**：血管新生時に誘導される因子で、申請者らは寒冷暴露による BAT の増生において誘導されることを見出した (J Vet Med Sci 61,403-9, 1999)。VEGF にはいくつかの分子種が存在し、AN は VEGF165 とは結合したが VEGF120 とは結合しなかった。この違いは VEGF165 のみが持つヘパリン結合ドメインのためであると考えられ、事実ヘパリン存在下では結合は見られなかった (未発表)。そこで主な VEGF 受容体 (VEGFR-2) を発現するウシ動脈由来血管内皮細胞 BAEC を用いて、受容体や ERK などのシグナル分子のリン酸化を指標に AN の VEGF165 および VEGF120 の機能に対する影響を評価する。
- (3) **CTRP11 に関連した実験**：正常および肥満動物の各組織における CTRP11mRNA の発現量を定量し、その発現調節機構を明らかにする。組換え体をつくり、ケモカインや増殖因子との結合能を明らかにする。さらには CTRP11shRNA の SVC (および精製前駆脂肪細胞) への導入による細胞増殖と成熟脂肪細胞への分化への影響について調べる。

4. 研究成果

(1) 神経成長因子 NGF に関連した実験：

① 神経成長因子 NGF によるラット PC12 細胞の神経突起の伸張と AN の影響について調べた。NGF は PC12 細胞の神経突起を伸張させたが、AN の同時処置は突起伸張を抑制した。AN 受容体のノックダウンは抑制に影響せず、AN と NGF の結合が認められたので、抑制は AN と NGF の結合に因る NGF シグナルの減弱であることが明らかとなった。主な発表論文①ではこの反応と細胞外マトリックスタンパク質 SPARC と NGF との相互作用を比較してまとめた。

② ラットの白色脂肪組織 (WAT) 由来 SVC を分離・培養して NGF の役割を調べた。ラット SVC の増殖に抗 NGF 抗体は影響しなかった。つまり、予備検討から内因性前駆脂肪細胞増殖因子の一つと推定していた NGF にはそのような効果は無いことが示された。

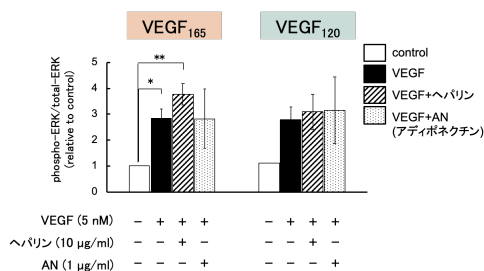
③ 上記②の系で、2 つ因子に対する抗体が独立して (相加的に) 増殖を抑制し、因子反応系に添加すると抗体は中和され増殖抑制を解除した。また 2 つの因子は SVC に発現し、分泌されており、AN 結合性を示した。ここでは匿名因子 A 及び B とするがそれらは内因性前駆脂肪細胞増殖因子として機能すると考えられた。

(2) 血管内皮細胞増殖因子 VEGF に関連した実験：

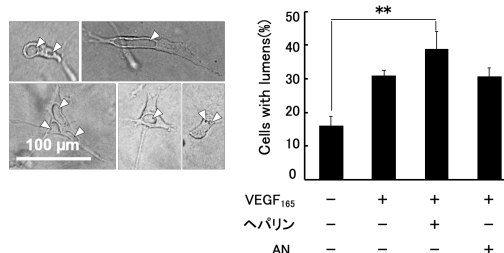
血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A のバリエーション VEGF165 は濃度依存性に AN への結合が増加し、その結合解離定数は 217 nM だった。しかし、ヘパリンの共存下では結合は消失した。

また、VEGF-A のバリエーション VEGF120 と AN との相互作用はヘパリンの有無に関わらず見られなかった。次いで培養血管内皮細胞を用いた実験を行った。VEGF165 及び VEGF120 は、それぞれ単独で BAEC の細胞内シグナルの一つ ERK リン酸化率を濃度依存性に増加させたが、AN やヘパリンの添加は VEGF-A による ERK リン酸化作用に有意な影響を与えなかった。さらに、VEGF-A と AN の相互作用とその役割を BAEC の三次元培養で調べた。BAEC は三次元培養で自発的に微小管腔を形成し、VEGF165 を添加すると管腔形成率の増加傾向が見られた。また、VEGF165 とヘパリンを同時に加えると管腔形成率はより増加した。一方、VEGF165 と AN を同時に加えたときの管腔形成率は VEGF165 単独添加のときと同じであった。以上の結果から、VEGF-A におけるアディポネクチンの結合部位が、VEGF165 のヘパリン結合部位にあること、その結合が受容体との会合に影響しないことが明らかになった。

アディポネクチンはVEGF-AのERK活性化を促進しない



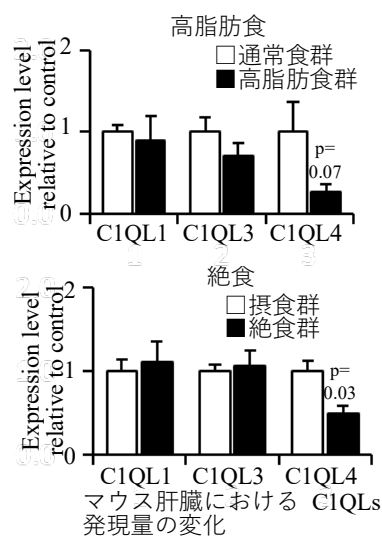
アディポネクチンは微小管腔の形成を促進しない



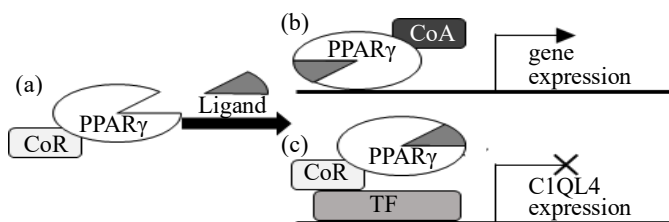
(3) CTRP11 に関連した実験:

マウス組織中に発現する CTRP11 (C1QL4) mRNA を通常の RT-PCR 法によって検出した。白色脂肪組織 (WAT) や褐色脂肪組織のみならず、これまでの報告になかった肝臓においても発現していた。生体のエネルギー状態と関連してその発現が調節されているか、エネルギー過多モデル (食餌性肥満マウス) とエネルギー不足モデル (24 時間絶食マウス) の各臓器における mRNA 発現量を調べた。肥満マウスの WAT で有意に低下し、肝臓で減少傾向を示した。絶食マウスでも WAT で低下傾向にあり肝臓で有意な減少を示した。薬物による I 型糖尿病モデルマウスにおいてもグルカゴンの相対活性を高めると、予想通り肝 CTRP11 発現は有意に低下し、糖新生の鍵酵素 PEPCK 発現を促進した。CTRP11 の発現は核内受容体 (転写因子) PPAR γ と co-repressor による調節が示唆された。

②組替え CTRP11 がようやく発現する系を確立できたが、予定された解析は終わっていない。

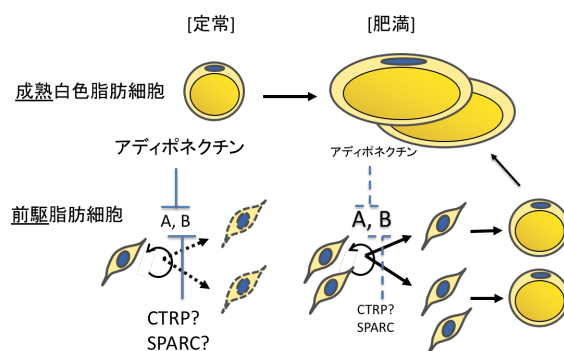


PPAR γ -corepressor 複合体による発現調節
 PPAR γ はリガンド非存在下で corepressor (CoR) と複合体を形成し、非活性状態にある (a)。リガンドとの結合により coactivator (CoA) と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する (b)。また、CoR と複合体を形成したまま、他の転写調節因子 (TF) と結合し、その活性を抑制する機能もある (c)。C1QL4 発現は後者により抑制される。



(4) この研究成果の意義と展望：

本研究により、① 抗炎症作用やインスリン感受性を高めるアディポネクチン(AN)の新規機能として神経成長因子 NGF との結合による NGF 活性阻害を追加した。NGF はコリン作動性神経の増殖生存に必要な他、痛みのコントロールに関わっており、AN の痛みの感知等における役割の解明が期待される。②では一体何が前駆脂肪細胞の増殖因子として働いているのだろうか？前駆脂肪細胞の起源や特性などを明らかにする一方、その発現パターンから因子 A および B を絞り込んだ。これらは前駆脂肪細胞の増殖を強めるためインスリン抵抗性の改善等に役立つと考えられた。AN との結合は確認したが、結合による制御があるかは今後の課題である(図参照)。③ 血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A のバリエーション VEGF165 と AN は結合するものの、VEGF120 には結合しなかった。さらに VEGF の機能 (ERK の活性化と管腔形成能) に対しても影響を及ぼさなかった。つまり、当初の仮説にあるような AN による VEGF 機能の制御はないと考えられた。④ CTRP11 については組換えタンパク質の取得が大幅に遅れたため AN の代償作用を示すか明らかにできなかった。Biacore を用いた相互作用の解析を進め、因子 A および B と結合を示すのであれば、前駆脂肪細胞の増殖分化に与える影響を解析する。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Okura, Y., Imao T., Murashima S., Shibata H., Kamikawa A., Okamatsu-Ogura Y., Saito M. and Kimura, K. (2019) Interaction of nerve growth factor β with adiponectin SPARC oppositely modulates its biological activity. **International Journal of Molecular Sciences** 20, 1541. DOI: 10.3390/ijms20071541 査読有
- ② Yoneshiro, T., Shin, W., Machida, K., Fukano, K., Tsubota, A., Chen, Y., Yasui, H., Inanami, O., Okamatsu-Ogura, Y. and Kimura, K. (2019) Differentiation of bone marrow-derived cells toward thermogenic adipocytes in white adipose tissue induced by the β_3 adrenergic stimulation. **FASEB Journal** 33, 5196-5207. DOI: 10.1096/fj.201801757RR 査読有
- ③ Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Nagaya, K., Tsubota, A., and Kimura, K. (2018) Brown adipocytes postnatally arise through both differentiation from progenitors and conversion from white adipocytes in Syrian hamster. **Journal of Applied Physiology** 124, 99-108. DOI: 10.1152/jappphysiol.00622.2017 査読有
- ④ Yamaji, D., Soliman, M.M., Kamikawa, A., Ito, T., Ahmed, M.M., Okamatsu-Ogura, Y., Saito, M. and Kimura, K. (2018) Species-specific control of HGF expression and production in adipocytes in a differentiation-dependent manner. **Domestic Animal Endocrinology** 62, 39-48. DOI: 10.1016/j.domaniend.2017.09.001 査読有
- ⑤ Ito, T., Yamaji, D., Kamikawa, A., Abd Eldaim, M.A., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Saito, M. and Kimura, K. (2017) Progesterone dose-dependently modulates hepatocyte growth factor production in 3T3-L1 mouse preadipocytes. **Endocrine Journal** 67, 777-785. DOI: 10.1507/endocrj.EJ17-0097 査読有
- ⑥ Okamatsu-Ogura, Y., Fukano, K., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., Nakamura, K., Morimatsu, M., Sakaue, H., Saito, M. and Kimura, K. (2017) Cell-cycle arrest in mature adipocytes impairs BAT

development but not WAT browning, and reduces adaptive thermogenesis in mice. **Scientific Reports** 7, 6648 DOI: 10.1038/s41598-017-07206-8 査読有

- ⑦ Shin W, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, and Kimura K. (2017) Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice. **Obesity** 25: 417-423. DOI:10.1002/oby.21727 査読有
- ⑧ Abd Eldaim, M.A., Matsuka, S., Okamatsu-Ogura, Y., Kamikawa, A., Ahmed, M.M., Terao, A., Nakajima, K. and Kimura, K. (2017) Retinoic acid modulates lipid accumulation glucose concentration-dependently through inverse regulation of SREBP-1 expression in 3T3L1 adipocytes. **Genes to Cells** 22, 568-582. DOI: 10.1111/gtc.12498 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西村真理子、中桐匠平、松岡慎也、戸田知得、岡松優子、木村和弘、神経成長因子及び血管内皮増殖因子似及ぼすアディポネクチンの作用、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年
- ② 中桐匠平、Woongchul Shin、松岡慎也、戸田知得、岡松優子、木村和弘、CTRP11 の白色脂肪組織と肝臓における発現量はマウスの代謝状態に影響される、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年
- ③ 長屋一輝、岡松優子、坪田あゆみ、戸田知得、木村和弘、シリアンハムスターにおける生後の褐色脂肪組織形成を制御する因子の解明、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年
- ④ Woongchul Shin、岡松優子、町田拳、坪田あゆみ、小林純子、木村和弘、Adrenergic induction of beige adipocyte in WAT is attenuated with aging in mice、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年
- ⑤ 長屋一輝、岡松優子、坪田あゆみ、小林純子、木村和弘、環境温度がシリアンハムスターにおける褐色脂肪組織の生後発達に及ぼす影響、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡松 優子

ローマ字氏名：(OKAMATSU, Yuko)