

令和元年6月26日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05136

研究課題名(和文)三量体Gタンパク質G12/13を介した生理活性脂質の生体制御

研究課題名(英文)Biological regulation by G α 12/13-mediated lipid mediator function

研究代表者

石井 聡 (Satoshi, Ishii)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10300815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：白色脂肪細胞の分化及び機能が、三量体Gタンパク質G12/13と共役するリゾホスファチジン酸(LPA)の第四受容体(LPA4)によって制御されることが、LPA4ノックアウトマウスのin vivo及びin vitro解析により明らかとなった。分子機序として、LPA4シグナルはPPAR α の発現や機能を阻害することが示された。この機序によってLPA4は、肥満時に認められる慢性炎症や線維化を伴う白色脂肪組織の過度なリモデリングに寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LPA4シグナルによる白色脂肪細胞の分化や機能の抑制は、白色脂肪組織が多量の脂肪を蓄積するとき起きる過度なリモデリングとそれに伴う組織の慢性炎症の原因となる。今後LPA4について、KOマウスのさらなる解析に加えて選択的アゴニストやアンタゴニストの開発が進めば、肥満に伴うインスリン抵抗性(2型糖尿病)に対する新しい治療法の創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that adipogenesis and adipocyte function are regulated by LPA4, a fourth subtype of G-protein coupled receptor for lysophosphatidic acid (LPA). In brief, LPA4-knockout mice showed enhanced expression of adipogenesis genes and reduced level of inhibitory phosphorylation of PPAR α in white adipose tissue, along with increased production of adiponectin. In mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes, LPA4 activation consistently suppressed the mRNA expression of adipogenesis genes and also genes regulated by the phosphorylation of PPAR α in a G12/13 protein-dependent manner. LPA4 signaling seems to limit proper remodeling of white adipose tissue in diet-induced obesity.

研究分野：生化学

キーワード：シグナル伝達 LPA リゾホスファチジン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質の一部にはホルモン様の生理活性を示すものが存在し、これらは脂質メディエーターと総称される。多くの脂質メディエーターは特異的な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と結合して、その受容体独特の細胞内シグナルを惹起する。申請者は脂質メディエーターの一つであるリゾホスファチジン酸 (LPA) に対する新規のサブタイプ GPCR、LPA 第四受容体 (LPA4) を世界に先駆けて報告した (Noguchi *et al.* J. Biol. Chem. 278, 25600-25606 [2003])。LPA4 はマウスにおいて脂肪細胞、特に白色脂肪細胞に発現が高く、三量体 G タンパク質 G12 や G13 と共役することも明らかになった。新規に樹立した LPA4-KO マウスの解析で、高脂肪食餌負荷した LPA4-KO マウスは野生型マウスと比較して同程度に肥満するにもかかわらず、惹起されるインスリン抵抗性が軽微であった。また、LPA4-KO マウスの精巢上体周囲の白色脂肪組織 (eWAT) では過度なリモデリング (炎症と線維化) が抑制されており、白色脂肪細胞の分化・機能に重要な役割を持つミトコンドリア合成に関連する遺伝子群 (PPAR, ERR, PGC-1 等) の発現が高かった。

2. 研究の目的

LPA4 を含め、G12/13 と共役する GPCR の白色脂肪細胞における生理学的役割はほとんど解明されていない。本研究では、白色脂肪細胞において LPA4 が分化や機能を制御する機序について、LPA4-KO マウスを使った *in vivo* 及び *in vitro* 実験で検討した。

3. 研究の方法

(1) LPA4-KO マウスの解析

LPA4-KO マウスについては、以前に論文で報告したラインを用いた [Sumida *et al.* Blood 116,5060-5070 (2010)]。eWAT からの総 RNA 抽出は QIAzol (Qiagen 社) を用いた。

(2) マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の脂肪細胞への分化

胎生 12.5 日齢マウス胎児由来の MEF は定法に従って調製した。MEF はコラーゲンコートディッシュ上で DMEM/10% FCS 培地で培養し、3-5 回継代したものを使用した。MEF を脂肪細胞へ分化させる際は、細胞を 3 日間コンフルエント状態で培養した後に、10 μ M ピオグリタゾン、0.5 mM IBMX、10 μ g/mL ヒトインスリン、0.25 μ M デキサメタゾンで 4-5 日間処理し、さらに 10 μ g/mL ヒトインスリンのみ加えた培地でさらに 4-5 日培養した。総 RNA 抽出は eWAT と同様に QIAzol (Qiagen 社) を用いた。分化した細胞を細胞内 cAMP レベルの増減や細胞内 Ca 濃度上昇を観察する実験に供する際は、予め 0.1% BSA を含む DMEM 培地で一晚培養することで血清飢餓にしてから、0.25% トリプシン、2 mM EDTA、0.2 U/ml リペラーゼ TM で細胞をディッシュから剥がして懸濁液とした。LPA4 と G12/13 タンパク質に対する siRNA (Dharmacon 社) は、Lonza 社の AMAXA を使ってエレクトロポレーション法で懸濁状態の細胞へトランスフェクションした。この細胞をディッシュに播き、16-24 時間後に xFect (Clontech 社) を用いて SRF-RE プロモーターでホタルルシフェラーゼ遺伝子を制御する発現ベクターと SV40-ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (Promega 社) をトランスフェクションした。この 4-6 時間後に、細胞をさらに血清飢餓条件で 12 時間培養し、LPA4 選択的アゴニスト OctadecenyI phosphate で 6 時間刺激した。細胞内 cAMP レベル、細胞内カルシウム濃度、ルシフェラーゼ活性のアッセイについては、既報の論文 (Yanagida *et al.* JCI Insight 3, e97293 [2018]) に詳細を記した。

(3) ピオグリタゾン含有餌の摂取

Kubota らの方法 (Sci. Rep. 6, 34707 [2016]) に従って、オリエンタル酵母社製マウス通常餌 MF の粉末に重量比で 0.02% の割合でピオグリタゾンを加え、これを個別飼育の雄マウスに 1 週間摂取させて実験に供した。

(4) ミトコンドリア DNA の定量と機能解析

eWAT からの DNA 抽出には QIAamp DNA mini kit (Qiagen 社) を用いた。ミトコンドリア DNA と核 DNA のそれぞれに特異的なプライマー (ミトコンドリア: 16S rRNA, 核 DNA: ヘキソキナーゼ 2) を用いて定量的 PCR で解析し、核 DNA に対するミトコンドリア DNA 量の比を各検体で求めた。基礎酸素消費量率は、ミンスした eWAT を対象に MitoXpress-Xtra-HS OCR assay kit (Luxcel Biosciences 社) を使って定量した。

4. 研究成果

(1) G12/13 タンパク質を介した LPA4 シグナルによる PPAR の機能抑制について

マウス eWAT から RNA を調整し、「脂肪細胞の成熟 (脂肪生成) に寄与する遺伝子群」の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法で解析した。通常餌及び高脂肪餌とも、野生型マウスに比べ LPA4-KO マウスの方が多くの遺伝子で発現レベルが高かった (PPAR, C/EBP, SREBP 等)。さらに、eWAT 由来のタンパク質をウェスタンブロッティング法で解析したところ、通常餌・高脂肪餌とも KO マウスの方が PPAR の発現レベルは高く、且つ 112 番目のセリンのリン酸化レベルは低下していた。このリン酸化は PPAR の機能を抑制する働きのあることが過去に報告されているが、実際 eWAT における「PPAR リン酸化によって発現制御を受ける遺伝子群」の発現レベルを RT-PCR 法で解析すると、通常餌・高脂肪餌とも KO マウスの方が多くの遺伝子で発現レベルが上昇していた (SELENBP1, CIDEA 等)。次に、LPA4 が G12/13 タンパク質を活性化して上記の遺伝子群の発現を抑制することを *in vitro* で示すために、脂肪細胞に分化させた MEF を使って実

験を行った。まず、LPA4 が共役する G タンパク質について検討を行った。野生型マウス由来の細胞を Octadecenyl phosphate (LPA4 選択的アゴニスト) で刺激したところ、Gs, Gi タンパク質の活性化 (それぞれ、細胞内 cAMP レベルの増減) や Gq タンパク質の活性化 (細胞内カルシウム濃度の上昇) は認められなかった。一方で、SRF-RE プロモーターによるルシフェラーゼアッセイでは活性上昇が認められたことから、LPA4 刺激に伴う G12/13 タンパク質の活性化が示唆された。この考察と矛盾なく、ルシフェラーゼ活性の上昇は LPA4 または G12/13 タンパク質の siRNA 処理により大きく減少した。以上の結果から、初代培養脂肪細胞においても LPA4 は、G12/13 タンパク質と選択的に共役すると考えられた。この脂肪細胞に分化させた野生型 MEF を LPA4 選択的に刺激したとき、「脂肪細胞の成熟 (脂肪生成) に寄与する遺伝子群」及び「PPAR リン酸化によって発現制御を受ける遺伝子群」の多くで発現レベルの低下が認められた。一方、同様の実験を LPA4-KO マウス由来の MEF で行うと、上記の遺伝子発現レベルの変化は認められなかった。以上の結果から、LPA4 シグナルが G12/13 タンパク質を介して脂肪組織の過度なリモデリング (過剰な脂肪を蓄積した白色脂肪組織で観察される現象で、脂肪細胞の肥大化とそれに続く細胞死によって惹起される慢性炎症と線維化が特徴) に寄与すること、そしてその機序の一つとして LPA4 シグナルによる PPAR への阻害効果が考えられた。

(2) LPA4-KO マウスの白色脂肪細胞における PPAR について

ピオグリタゾンなどの PPAR アゴニストをマウスに投与すると、脂肪細胞の PPAR の機能を薬理的に亢進させ、血中アディポネクチン濃度を上昇させることができる。ピオグリタゾン不含通常餌を摂取したとき、血中アディポネクチン濃度は WT マウスよりも LPA4-KO マウスで高かった。同じ条件でピオグリタゾン含有通常餌を与えたとき、LPA4-KO マウスと WT マウスは同等のアディポネクチン濃度の上昇を示すことが明らかとなった。すなわち、ピオグリタゾン含有餌を摂取した LPA4-KO マウスの血中アディポネクチン濃度は、依然として WT マウスよりも高い状態が維持されていた。以上の結果は、LPA4-KO マウスの脂肪細胞で PPAR の発現量が増えたことを反映しているのかもしれない。若しくは、LPA4-KO マウスではピオグリタゾンによる PPAR の活性化とは別のメカニズムで PPAR が過度に活性化されている可能性もある。リン酸化などの翻訳後修飾や、共役因子との会合が変化することなどが機序として考えられる。

(3) LPA4-KO マウスの白色脂肪細胞におけるミトコンドリアについて

「背景」の項で述べたように、通常食を摂取した LPA4-KO マウスの eWAT において、ミトコンドリアの生合成関連遺伝子の発現が抑制されていた。そこで、eWAT に含まれるミトコンドリア DNA の量 (核の DNA 量で補正) を調べたところ、野生型マウスに比べ LPA4-KO マウスで高かった。また、eWAT に含まれるミトコンドリアの機能 (基礎酸素消費量率) は LPA4-KO の方が高かった。以上の結果は、LPA4-KO マウスの白色脂肪細胞において、ミトコンドリアの数と機能が亢進していることを示唆する。

WAT を構成する白色脂肪細胞の機能は、三量体 G タンパク質 G12/13 と共役する GPCR である LPA4 によって制御されることが明らかとなった。LPA4 シグナルは PPAR の発現や機能を阻害して白色脂肪細胞の分化を抑制し、結果として WAT の過度なリモデリングに寄与することが示唆された。また LPA4 シグナルは、ミトコンドリアバイオジェネシスの抑制にも明らかに寄与していた。白色脂肪細胞は褐色脂肪細胞に比べミトコンドリアの量は少ないものの、分化や機能維持にミトコンドリアが重要であるとされる。しかしながら、今回の脂肪細胞の分化抑制とミトコンドリアバイオジェネシスの抑制の因果関係については、LPA4-KO マウスの今後の更なる解析が必要と考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Kano, K., Matsumoto, H., Inoue, A., Yukiura, H., Kanai, M., Chun, J., Ishii, S., Shimizu, T., and Aoki, J. (2019) Molecular mechanism of lysophosphatidic acid-induced hypertensive response. *Sci Rep.* 9:2662. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-019-39041-4

Yanagida, K. Igarashi, H., Yasuda, D., Kobayashi, D., Ohto-Nakanishi, T., Akahoshi, N., Sekiba, A., Toyoda, T., Ishijima, T., Nakai, Y., Shojima, N., Kubota, N., Abe, K., Kadowaki, T., *Ishii, S., and Shimizu, T. (2018) The G 12/13-coupled receptor, LPA4 limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity. *JCI Insight* 3:e97293. 査読有

DOI: 10.1172/jci.insight.97293

石井聡, 五十嵐秀光 (2018) リゾホスファチジン酸 (LPA) を介した骨髄ニッチの制御. *臨床免疫・アレルギー科* 70(3), 221-228. 査読無

<http://www.kahyo.com/item/M201809-703>

石井聡, 柳田圭介 (2018) Non-EDG 型 LPA 受容体: 生化学, 立体構造, 生理機能. *生化学* 90(5), 596-608. 査読無

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900596

- Tsukahara, R., Yamamoto, S., Yoshikawa, K., Gotoh, M., Tsukahara, T., Neyama, H., Ishii, S., Akahoshi, N., Yanagida, K., Sumida, H., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K.-I., Murakami-Murofushi, K., and Ueda H. (2018) LPA5 signaling is involved in multiple sclerosis-mediated neuropathic pain in the cuprizone mouse model. **J. Pharmacol. Sci.** 136, 93-96. 査読有
DOI: 10.1016/j.jphs.2018.01.001
- Tanishima, M., Takashima, S., Honda, A., Yasuda, D., Tanikawa, T., Ishii, S., and MaruYama, T. (2017) Identification of optineurin as an interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein and its role in regulation of MyD88-dependent signaling. **J. Biol. Chem.** 292, 17250-17257. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.m117.813899
- Takara, K., Eino, D., Ando, K., Yasuda, D., Naito, H., Tsukada, Y., Iba, T., Wakabayashi, T., Muramatsu, F., Kidoya, H., Fukuhara, S., Mochizuki, N., Ishii, S., Kishima, H., and Takakura, N. (2017) Lysophosphatidic acid receptor 4 activation augments drug delivery in tumors by tightening endothelial cell-cell contact. **Cell Rep.** 20, 2072-2086. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.080
- Dai, S.-P., Huang, Y.-H., Chang, C.-J., Huang, Y.-F., Hsieh, W.-S., Tabata, Y., Ishii, S., and Sun, W.-H. (2017) TDAG8 involved in initiating inflammatory hyperalgesia and establishing hyperalgesic priming in mice. **Sci. Rep.** 7:41415. 査読有
DOI: 10.1038/srep41415
- Lin, S.-H., Steinhoff, M., Ikoma, A., Chang, Y.-C., Cheng, Y.-R., Kopparaju, R.C., Ishii, S., Sun, W.-H., and Chen, C.-C. (2017) Involvement of TRPV1 and TDAG8 in pruriception associated with noxious acidosis. **J. Invest. Dermatol.** 137, 170-178. 査読有
DOI: 10.1016/j.jid.2016.07.037
- Doi, H., Sato, K., Shindou, H., Sumi, K., Koyama, H., Hosoya, T., Watanabe, Y., Ishii, S., Tsukada, H., Nakanishi, K., and Suzuki, M. (2016) Blood-brain barrier permeability of ginkgolide: Comparison of the behavior of PET probes 7 - [¹⁸F]fluoro- and 10-*O*-*p*- [¹¹C]methylbenzyl ginkgolide B in monkey and rat brains. **Bioorg. Med. Chem.** 24, 5148-5157. 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.08.032
- Hata, E., Sasaki, N., Takeda, A., Tohya, K., Umemoto, E., Akahoshi, N., Ishii, S., Bando, K., Abe, T., Kano, K., Aoki, J., Hayasaka, H., and Miyasaka, M. (2016) Lysophosphatidic acid receptors LPA₄ and LPA₆ differentially promote lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes. **Int. Immunol.** 28, 283-292. 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxv072

[学会発表](計 12 件)

- 柳田圭介, 安田大恭, 小林大礎, 清水孝雄, 石井聡 リゾホスファチジン酸受容体 LPA4 の脂肪細胞における機能. 第 91 回日本生化学会大会 (2018)
- 王嬌, 可野邦行, 丸山貴司, 石井聡, 青木淳賢 Activation of LPA5 receptor enhances IL-10 production in murine peritoneal macrophage. 第 91 回日本生化学会大会 (2018)
- 丸山貴司, 石井聡 LPA5 による接触性皮膚炎の制御. 第 60 回日本脂質生化学会 (2018)
- 可野邦行, 松本宏隆, 井上飛鳥, 雪浦弘志, Jerold Chun, 石井聡, 清水孝雄, 青木淳賢 LPA による昇圧作用メカニズムの解析. 第 60 回日本脂質生化学会 (2018)
- 丸山貴司, 大戸貴代, 石井聡 リゾホスファチジン酸受容体 LPA5 を介した T 細胞の分化運命決定機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)
- Daisuke Yasuda and Satoshi Ishii G 12/13-coupled LPA receptors mediate novel angiogenesis mechanism. FASEB Summer Research Conferences; Lysophospholipid and Related Mediators: From Bench to Clinic (2017)
- 安田大恭, 石井聡 リゾホスファチジン酸による血管新生調節機序. 第 59 回日本脂質生化学会大会 (2017)
- 安田大恭, 石井聡 リゾホスファチジン酸受容体の血管形成における役割. 第 58 回日本脂質生化学会大会 (2016)
- 赤星軌征, 武富芳隆, 村上誠, 石井聡 リゾホスファチジン酸第 5 受容体 (LPA5) シグナルによるマスト細胞抑制機構. 第 58 回日本脂質生化学会大会 (2016)
- 安田大恭, 石井聡 血管形成を制御するリゾホスファチジン酸受容体. 第 89 回日本生化学会大会 (2016)
- 赤星軌征, 武富芳隆, 村上誠, 石井聡 リゾホスファチジン酸第 5 受容体 (LPA5) 欠損マウスにおける受動アナフィラキシー増悪化. 第 89 回日本生化学会大会 (2016)
- 石井聡 リゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体の細胞分化制御機能. 日本脂質栄養学会 第

25 回大会 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bougyo/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安田 大恭

ローマ字氏名：Daisuke Yasuda

所属研究機関名：秋田大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：70594951

研究分担者氏名：赤星 軌征

ローマ字氏名：Noriyuki Akahoshi

所属研究機関名：昭和薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：70534551

研究分担者氏名：大戸 貴代

ローマ字氏名：Takayo Ohto

所属研究機関名：秋田大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：80511378

研究分担者氏名：丸山 貴司

ローマ字氏名：Takashi Maruyama

所属研究機関名：秋田大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10622524