

令和元年6月6日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05231

研究課題名(和文) 糖尿病を抑止する活性化脂肪を診断する血中可溶性レセプターの検査学的意義と産生機序

研究課題名(英文) Examinational significance and production mechanism of a circulating soluble receptor for the diagnosis of activated adipocytes to prevent diabetes

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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究成果により、(1)脂肪細胞のブラウニング抑制遺伝子LR11は成熟脂肪細胞への分化前に発現してブラウニングを抑制することで白色脂肪に誘導する可能性のあること、(2)ヒト体内にベージュ脂肪が存在し他の脂肪と異なった減量治療反応性を有すること、及び、(3)糖尿病や肥満症患者において、血中可溶性LR11値の変動は、体脂肪量よりも合併症に強く関わる事が明らかになった。これらの細胞生物学研究と検査学研究の結果から、血中可溶性LR11は病的脂肪変容を反映し、新規の『活性化脂肪細胞』マーカーとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な特色は、古典的な生理学、代謝学の研究課題である褐色脂肪細胞の生成と白色脂肪のブラウニングという研究課題を平滑筋細胞のフェノタイプ変換で発見した遺伝子をもちいて明らかにしたことである。社会的意義は、多施設検査研究で得られた可溶性レセプターLR11から診断する活性化脂肪細胞にかかわる解析結果をもとに、糖尿病や肥満症の診療で、可溶性LR11という新規の診療補助検査『活性化脂肪細胞』の有用性を提示したことである。

研究成果の概要(英文)：The study results showed that (1) the expression of browning-inhibitor gene LR11 was induced before differentiation to mature adipocytes, suggesting the induction to white adipocytes through its specific inhibition for browning, (2) beige adipocytes existed in the human body, which show the different sensitivity from other fat against the reduction therapy, and (3) among patients with diabetes and/or obesity, the changes in circulating soluble LR11 levels were not associated with those in body weights, but clearly with the degrees of accompanied diseases. These cell-biological and laboratory research results revealed that circulating sLR11 reflects pathological alteration in adipocytes, and that sLR11 is potentially a novel marker for “activated adipocytes”.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：糖尿病 LR11 ブラウニング

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

1. 研究開始当初の背景

病気の発症を引き起こす細胞変化に、成熟分化細胞として高度に分化した機能が失われること、新たな機能を獲得する幼弱な病的細胞が出現することがあげられる。分化細胞からトランジションした幼弱細胞の出現は、それまで調和を保っていた周辺の環境や個体の恒常性を破綻させる。このような細胞変化は動脈硬化症でみとめられる。血管平滑筋細胞は内膜肥厚巣へ移動する過程で、収縮能を喪失し、増殖能やサイトカイン、プロテアーゼ産生能を獲得する。この『平滑筋のフェノタイプトランジション』は古典的な生理学課題である。研究代表者は高分化した平滑筋細胞では遺伝子発現が休止し病的な幼弱細胞へと脱分化することで転写が誘導される遺伝子を包括的に探索することで新規 LDL レセプターファミリーLR11 を発見した(Jiang M, *J Clin Invest* 118:2733, 2008)。LR11 蛋白は細胞内および表面の膜上に存在しプロテアーゼにより分断され可溶性レセプターとなり、ウロキナーゼ受容体等に結合しその作用を増強することでフェノタイプトランジションを促す。可溶性 LR11 は血中で検出されることから、血中可溶性 LR11 測定研究用試薬を作成し市場化した (Matsuo M, *Clin Chem* 55:1801, 2009)。さまざまな疾患で血中濃度が測定された結果から、動脈硬化症で高値となるとともに、血液病や糖尿病、神経病でも高値を示す病態があることが発見された。すなわち、平滑筋細胞のみならず普遍的な病的細胞へのフェノタイプトランジションを検出する可能性があり(Sakai S, *Clin Chim Acta* 413: 1542, 2012; Ogita M, *Clin Chim Acta* 415:191, 2013; Ohwada C, *Leuk Lymphoma* 11:1, 2015 など)、高感度の第二世代試薬が市場化された (Fujimura K, *Clin Chim Acta* 430:48, 2014)。一方、病的意義を明らかにするために、LR11 ノックアウトマウスを作成したところ、その表現型は脂肪細胞で顕著にみられた。マウス白色脂肪は脂肪摂取で肥大化せずに褐色脂肪へ分化誘導され、細胞エネルギー消費活性の亢進した異所性褐色脂肪となる。その結果、安静時エネルギー消費量が増加しインスリン抵抗性や脂肪肝が生じない (*Nature Commun* 20;6:8951, 2015)。このようにして、平滑筋細胞のフェノタイプトランジションで同定された遺伝子がノックアウトマウスの『白色脂肪のブラウニング』分子機構のキーレギュレーターであることが明らかになった。このような一連の基礎的および臨床疫学的な研究背景から、可溶性 LR11 による質的脂肪細胞診断による糖尿病治療の可能性を考え、本研究計画に至った。

2. 研究の目的

エネルギー消費活性の増大したベージュ脂肪が糖尿病を抑止することから、そのような活性化脂肪を誘導する新規薬剤とその変化を正確に検出する日常診療における血液検査の開発が急務の課題である。本研究は、ブラウニング抵抗性血中可溶性 LR11 の検査学的意義とその機序を明らかにし、活性化脂肪細胞という新規の糖尿病治療に向けた検査学概念を提示することを目的とした。ヒト可溶性 LR11 血中濃度はヒト脂肪量と密接に相関する一方、糖尿病で著しいはずれ値を呈する (*Nature Commun* 20;6:8951, 2015)。本研究は、これまでのモデル解析とヒト疫学研究による成果を基盤に、『活性化ブラウニング脂肪を診断』するという新規の細胞診断の基盤を構築することを目的とする。可溶性レセプターLR11 がどのように活性化ブラウニング脂肪細胞から分断放出されるのか、褐色機能にどのように関わるのかという制御機構を明らかにし、実際に実験モデルで得られた LR11 過剰発現によりブラウニングを抑制し細胞エネルギー消費を減ずることによって生じる個体病態を検証する。あわせて、糖尿病や肥満症を対象に可溶性 LR11 測定に関わる多施設検査学研究を行い、これらの基礎、検査学結果を総括し新たな細胞検査の概念を提示する。

3. 研究の方法

(1)可溶性レセプターLR11 の細胞制御：

培養樹立白色脂肪細胞 3T3-L1 細胞の増殖過程と分化刺激後の成熟過程における前脂肪細胞と脂肪蓄積脂肪細胞をそれぞれ調整し、LR11 遺伝子発現を Real-time RT-PCR 法により解析した。遺伝子改変マウス由来培養脂肪細胞における分断放出の制御、および、結合分子による褐色細胞機能活性調節を解明するために、LR11 ノックアウトマウス白色脂肪、褐色脂肪から均一化した前脂肪細胞を調整し、それぞれ褐色脂肪化条件で分化誘導した成熟脂肪細胞における褐色脂肪機能に関わる包括的遺伝子発現やメタボローム定量解析するために不死化した。不死化処理を行った前脂肪細胞をクローン化し、LR11 ノックアウトマウス白色脂肪、褐色脂肪、および野生型マウス皮下脂肪、褐色脂肪に由来する未分化前脂肪細胞の分化刺激反応性を形態学的ならびに遺伝子発現能を解析した。

(2)ブラウニングによる病態修飾：

ヒト脂肪細胞における可溶性 LR11 の病態形成における意義を明らかにするために、ブラウニング特性を有することが示唆されている心臓周囲脂肪のブラウニング機能と減量治療による反応性を検討した。遺伝子発現解析に用いるヒト脂肪は病理解剖より摘出された心臓周囲脂肪と皮下脂肪を使用した。マウス脂肪は db/db マウスより摘出した。遺伝子発現は調整した mRNA を用いて、Real-time RT-PCR 法により測定した。減量前後の脂肪蓄積量の反応性は東邦大学医療センター肥満患者の減量治療成績を解析した。

(3)血中可溶性 LR11 による活性化脂肪診断に向けた検査学的検証：

バイオマーカーとしての意義を検証する検査学的検討は、共同研究施設である延辺大学糖尿病内分泌内科、ロッテルダムエラスムス病院内科に通院中の糖尿病患者と肥満症患者の血液検体

の血中 LR11 を測定し病態との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則ならびにわが国の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づき、東邦大学または実施する施設の倫理委員会で研究計画の承認を受け、その指導のもとで対象者に研究概要を説明し同意を得て実施した。遺伝子解析実験および動物実験は、実施施設の規定、国で定められている組換え DNA 実験指針、動物実験等の実施に関する基本指針等に沿って各委員会で実験許可を受け動物愛護に配慮して実施した。

4. 研究成果

(1) 可溶性レセプターLR11の細胞制御：

培養樹立脂肪細胞における発現制御

LR11 mRNA 量は増殖前にはほとんど発現していなかったが、血清添加に伴う前脂肪細胞の増殖とともに急速に増大し、増殖速度の最も高い添加 3-4 日で最大となり、その後、急速に低下し、10 日後には発現はほぼ認められなかった。分化誘導を行うと LR11 mRNA 量は急速に低下し、成熟脂肪細胞ではほとんど発現は認められなかった。以上の結果から、白色脂肪細胞の成熟過程において、LR11 遺伝子は前脂肪細胞の増殖期に一過性に発現が増大し、成熟白色脂肪細胞では発現がほとんど認められないことが明らかになった。

LR11 発現・ノックアウト褐色脂肪細胞培養系の樹立

LR11 ノックアウトマウス白色脂肪、褐色脂肪に加えて、野生型マウス皮下脂肪、褐色脂肪から前脂肪細胞を調整し均一化し複数のクローン株を樹立した。これらに SV40 large T antigen を導入し、選択されたクローンの増殖能と白色脂肪および褐色脂肪分化能を評価した。加えて、褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の代表的な形態学的差異として知られる細胞内脂肪滴形状を評価するために 3 次元培養法の条件設定を行なった。本来、成熟白色脂肪は細胞全体に及ぶ単一の脂肪滴からなるのに対し、成熟褐色脂肪は複数の小さな脂肪滴から構成されることが知られる。しかしながら、二次元培養法では白色脂肪は単房(胞)性脂肪の形態は取らずに多房(胞)性脂肪細胞となることから外観上両者の識別が困難である。そこで、培養条件下で、生体内で起きるブラウニングの精密な制御機構を再現し、二次元培養法の実験的限界を克服する微細ファイバーを用いた 3 次元培養で包括的遺伝子発現、機能解析とともに形態学的解析を組み入れるシステムを構築した。

以上より、樹立脂肪細胞における LR11 発現制御が明らかになり、また、マウス白色脂肪、褐色脂肪から複数の不死亡細胞株を樹立し培養環境下でのブラウニング制御を検討することが可能になった。とりわけ、3 次元培養条件が設定され、これらを組み合わせることで、可溶性 LR11 のブラウニング調節を明らかにすることが可能となった。

(2) ブラウニングによる病態修飾：

心臓周囲脂肪のブラウニング特性の解析

ヒト心臓周囲脂肪のブラウニング特性を解析するために、熱産生に関連する遺伝子の発現を検討した。ヒト病理解剖 15 検体より調整した心臓周囲脂肪と皮下脂肪の遺伝子発現は、UCP-1 は皮下脂肪に比べて有意に高値、3-AR は高値傾向だった。マウス心臓周囲脂肪で検討したところ、UCP-1、3-AR とともに高値だった。そこで、その差異を起こす機序を明らかにするために、ヒト心臓周囲脂肪から培養ヒト前脂肪細胞を調整し、ブラウニング分化させた成熟細胞との間で検討したところ、UCP-1、3-AR とともに分化とともに増加し、心臓周囲脂肪は皮下脂肪に比べて有意に高値だった。

減量治療に伴う心臓周囲脂肪の反応性の解析

ヒト心臓周囲脂肪の病態学的特性を明らかにするために、減量治療に伴う心臓周囲脂肪量の変化を内臓脂肪や皮下脂肪の変化量と比較した。10 名の心疾患を有する肥満患者(男性 8 名、平均年齢 45 歳)の治療前後(平均治療期間 44 日、治療前平均体重 110 kg、治療後平均体重 100 kg)で皮下脂肪と内臓脂肪は有意に減少したのに対し、心臓周囲脂肪は減少しなかった。体重減少の割合は、皮下脂肪と内臓脂肪の減少割合と有意に正の相関を示したのに対し、心臓周囲脂肪は相関しなかった。その結果、心臓周囲脂肪量の変化は内臓脂肪量や皮下脂肪量の変化と関連しなかった。

以上より、ヒト心臓周囲脂肪は他の体脂肪と異なり、熱産生活性を特徴としたブラウニング特性を有し、減量治療に対して他の体脂肪とは異なった反応性を示した。このようにして、マウスのみでなく、ヒトにおいても環境や刺激により脂肪細胞はブラウニングし、代謝学的に病態に関与する可能性が示された。

(3) 血中可溶性 LR11 による活性化脂肪診断に向けた検査学的検証：

糖尿病における検証

脂肪細胞変容が病因となり糖代謝異常を引き起こし全身の血管障害を進展させる病態として知られる糖尿病 165 名で検討したところ、健常者に比べて血中可溶性 LR11 は高値であり、年齢、性別、血圧、LDL-コレステロール、血糖値など様々な動脈硬化リスクと関連したが、血糖値は可溶性 LR11 濃度の独立した規定因子だった。血中可溶性 LR11 は年齢や血糖値と並び糖尿病患者の超常

波血管壁肥厚に関連し、ロジスティック解析から、血糖値が、内膜中膜肥厚0.80mmをカットオフ値とした時に最もよく関連するのに対し、可溶性LR11値は0.90mmだった。以上の結果から、糖尿病において可溶性LR11は、血糖とは異なる血管障害の状態を反映するバイオマーカーとなる可能性が示された。

肥満症における検証

BMI27を越す肥満糖尿病患者64名の20週間の減量治療前後の血中可溶性LR11値を測定した。治療前の可溶性LR11値は15.4 ng/mLと、年齢性別を一致させた健康人対照64名(10.2 ng/mL)と比べて有意に高値だった。減量治療により、9.7%の体重減少とともに可溶性LR11値は13.3 ng/mLに低下した。LR11変化量は、non HDL-コレステロール変化量、HbA1c変化量と有意に正の相関を示した一方、体重減少量とは関連しなかった。

以上より、血中可溶性LR11は、脂肪細胞変容が病因となる糖尿病や肥満症において、合併症の進展や、減量に伴う脂肪細胞の量の変化ではなく機能回復を反映していることが推測された。

(4) 考察

本研究は、糖尿病患者や肥満症患者の血中で高値となる可溶性LR11の活性化脂肪変容のバイオマーカーとしての検査学的意義を明らかにするために、検体解析、病態関連、細胞生物学の視点から計画された。本研究結果より、可溶性LR11は、実際にヒト脂肪のブラウニング特性の調節に関わりその病態を反映する可能性があると考えられた。細胞生物学的に、LR11遺伝子は前脂肪細胞の増殖期に一過性に発現が増大し、成熟細胞では発現がほとんど認められない制御特性が明らかになった。これまでにノックアウトマウスから得られた結果を合わせ、LR11遺伝子は脂肪細胞の成熟前の分化過程で発現しブラウニングを抑制し白色脂肪に誘導する可能性がある。今回作成されたマウス白色脂肪、褐色脂肪から樹立した不死化細胞クローンを用いて、培養環境下でのブラウニング制御を検討することで細胞変容との関わりが明らかにできる可能性がある。とりわけ、特徴的な形態学的差異である単房(胞)性脂肪と多房(胞)性脂肪細胞の形成について微細ファイバーを用いた3次元培養条件が設定されたことから、これらを組み合わせることで、可溶性LR11のブラウニング調節における役割を解析することが可能になった。また、多施設で進めてきた横断研究が進み、中国延辺大学とエラスムス病院の結果が解析され、糖尿病診療と肥満症治療における血中可溶性LR11の意義について、体脂肪量のみならず合併症に強く関わる病的脂肪の特性を反映する可能性が示された。このようにして、可溶性LR11は、ヒト病態において病因となる脂肪細胞変容である活性化脂肪障害の状態を反映する検査学的指標になる可能性がある。

本研究結果の学術的な特色は古典的な生理学、代謝学の研究課題である褐色脂肪細胞の生成と白色脂肪のブラウニングという研究課題について、研究者が平滑筋細胞のフェノタイプ変換で発見した遺伝子をもちいてアプローチしたことである。ノックアウトマウスで明らかになった世界でユニークな病的脂肪変換モデルをもちいたこと、血中可溶性レセプターからブラウニング細胞診断を樹立する試みは世界でユニークな視点による研究結果である。これまでの一連の研究から、異所性褐色脂肪モデルマウス、血中LR11濃度測定系が準備され、動物と細胞を用いた病態解析のための国内外共同研究体制の元で本研究は行われ、可溶性LR11の細胞制御およびブラウニングによる病態修飾を解明し、血中可溶性LR11による活性化脂肪診断という検査学的基盤を検証した。多施設横断的検査研究で得られた可溶性レセプターLR11から診断する活性化脂肪細胞にかかわる結果をもとに、可溶性LR11制御の細胞生物学的同定とあわせて、新規の診療補助検査『活性化脂肪細胞』の有用性を提示する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Harada M, Jiang M, Terai K, Ebinuma H, Hiruta N, Schneider WJ, Sugo N, Nagao T, Bujo H. Levels of circulating soluble LR11, a regulator of smooth muscle cell migration, are highly associated with atherosclerotic plaques in patients with carotid artery stenosis. *Clin Chim Acta*. 2019 Mar;490:69-76. (査読有)
doi: 10.1016/j.cca.2018.12.005.
2. Yano K, Hirayama S, Misawa N, Furuta A, Ueno T, Motoi Y, Seino U, Ebinuma H, Ikeuchi T, Schneider WJ, Bujo H, Miida T. Soluble LR11 competes with amyloid in binding to cerebrospinal fluid-high-density lipoprotein. *Clin Chim Acta*. 2019 Feb;489:29-34. (査読有)
doi: 10.1016/j.cca.2018.11.024.
3. Watanabe T, Nema T, Hiruta N, Murano T, Schneider WJ, Bujo H. Lp8 is potentially associated with partial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency in a patient with primary biliary cirrhosis. *J Clin Lipidol*. 2018 Sep - Oct;12(5):1157-1163. (査読有)
doi: 10.1016/j.jacl.2018.06.007.
4. Mikamo H, Jiang M, Noro M, Suzuki Y, Hiruta N, Unoki-Kubota H, Schneider WJ, Bujo

- H. Susceptibilities of epicardial and subcutaneous fat tissue for browning-gene expression and diet-induced volume reduction are different. *Mol Med Rep.* 2018 May;17(5):6542-6550. (査読有)
doi: 10.3892/mmr.2018.8690.
5. Vongpromek R, Bos S, Ten Kate GR, Bujo H, Jiang M, Nieman K, Schneider W, Roeters van Lennep JE, Verhoeven AJM, Sijbrands EJG, Mulder MT. Soluble LR11 associates with aortic root calcification in asymptomatic treated male patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2017 Oct;265:299-304. (査読有)
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.018.
 6. Hashimoto R, Jiang M, Shiba T, Hiruta N, Takahashi M, Higashi M, Hori Y, Bujo H, Maeno T. Soluble form of LR11 is highly increased in the vitreous fluids of patients with idiopathic epiretinal membrane. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017 May;255(5):885-891. (査読有)
doi: 10.1007/s00417-017-3585-1.
 7. Berk KA, Vongpromek R, Jiang M, Schneider WJ, Timman R, Verhoeven AJ, Bujo H, Sijbrands EJ, Mulder MT. Levels of the soluble LDL receptor-related LR11 decrease in overweight individuals with type 2 diabetes upon diet-induced weight loss. *Atherosclerosis.* 2016 Nov;254:67-72. (査読有)
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.09.066.
 8. 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.* 2016 Sep;36(9):1972-9. (査読有)
doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307900.
 9. Kosaka K, Kubota Y, Adachi N, Akita S, Sasahara Y, Kira T, Kuroda M, Mitsukawa N, Bujo H, Satoh K. Human adipocytes from the subcutaneous superficial layer have greater adipogenic potential and lower PPAR- DNA methylation levels than deep layer adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Aug 1;311(2):C322-9. (査読有)
doi: 10.1152/ajpcell.00301.2015.
 10. Jin W, Jiang M, Han X, Han X, Murano T, Hiruta N, Ebinuma H, Piao L, Schneider WJ, Bujo H. Circulating soluble form of LR11, a regulator of smooth muscle cell migration, is a novel marker for intima-media thickness of carotid arteries in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2016 Jun 1;457:137-41. (査読有)
doi: 10.1016/j.cca.2016.04.016.
 11. 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 pancreatic cancers. *Clin Chim Acta.* 2016 Jun 1;457:130-6. (査読有)
doi: 10.1016/j.cca.2016.04.010.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Meizi Jiang, Hiroyuki Ebinuma, Takeyoshi Murano, Hideaki Bujo: Expression of LR11/SorLA, a thermogenesis suppressor, is regulated in adipogenesis of cultured adipocytes. 25th European Congress on Obesity 2018
2. 姜 美子, Antonio Vidal-Puig, Monique T. Mulder, Wolfgang J. Schneider, 武城英明: ページ脂肪は高脂肪摂取マウスの脂質異常を抑制する 脂肪の質を変える食事生活指導の可能性. 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
3. 姜 美子, Antonio Vidal-Puig, Monique T. Mulder, 村野武義, 山口 崇, 龍野一郎, 武城英明: 肥満症やメタボリックシンドロームの減量治療におけるページ脂肪の役割に関する基礎的および検査学的検討. 第 32 回日本小児脂質研究会学術集会 2018
4. 美甘周史, 姜 美子, 野呂真人, 鈴木康夫, 蛭田啓之, 久保田浩之, 武城英明: 心外膜脂肪と皮下脂肪組織は、褐色化遺伝子発現および減量に対する感受性が異なる. 第 32 回日本小児脂質研究会学術集会 2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：蛭田 啓之

ローマ字氏名：HIRUTA, nobuyuki

研究協力者氏名：姜 美子

ローマ字氏名：JIANG, meizi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。