

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08894

研究課題名(和文) リシルオキシダーゼによる細胞外微小環境剛性変化が脂肪ベージュ化に与える影響の検討

研究課題名(英文) effect of lysyl oxidase-induced matrix rigidity change on fat browning

研究代表者

清水 良子 (Shimizu-Hirota, Ryoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30348643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の予防・治療において、エネルギー燃焼を司る褐色脂肪細胞への分化に関わる因子、ひいては脂肪ベージュ化に係る因子を解明することが必要である。脂肪組織の繊維化が脂肪細胞の分化に影響を与えることが近年報告されているが、組織リモデリングが脂肪ベージュ化に与える影響とその機序の詳細についてはいまだ不明である。リシルオキシダーゼ(LOX)はコラーゲン分子間を架橋して生体組織強度を上げ脂肪線維化を促進する酵素であり、低酸素誘導因子HIFの下流因子である。本研究では低酸素下でLOXを介した脂肪繊維化が脂肪のベージュ化をエピジェネティックに制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中高年におけるインスリン抵抗性、糖尿病が増加していることは社会問題の一つである。中高年におけるインスリン抵抗性の増加の原因の一つとして、年齢とともに褐色脂肪組織が萎縮減少することがあり、褐色脂肪組織の維持および増加、白色脂肪から褐色脂肪へのベージュ化促進を行うことができれば画期的な創薬プラットフォームになりうる。脂肪ベージュ化に関わる因子としてリモデリング関連酵素リシルオキシダーゼとその下流シグナルを見出した本研究は、代謝医学における画期的な創薬シーズとして大きな意義を持つと言える。

研究成果の概要(英文)：In the prevention and treatment of diabetes, it is necessary to elucidate the factors involved in the differentiation into brown adipocytes, which control energy burning, and the factors involved in fat browning. Although it has recently been reported that adipose tissue fibrosis affects adipocyte differentiation, the effect of tissue remodeling on beige adipogenesis and the details of the mechanism are still unknown. Lysyl oxidase (LOX) is an enzyme that cross-links collagen molecules to increase tissue strength and promote fat fibrosis, and is a downstream factor of hypoxia-inducible factor HIF. In this study, we revealed that LOX-mediated adipose fibrosis epigenetically regulates adipose beige under hypoxia.

研究分野：代謝医学

キーワード：リシルオキシダーゼ 脂肪ベージュ化 組織リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の予防・治療において、エネルギー燃焼を司る褐色脂肪細胞への分化に関わる因子、ひいては脂肪ベージュ化に係る因子を解明することが必要である。脂肪組織の繊維化が脂肪細胞の分化に影響を与えることが近年報告されているが、組織リモデリングが脂肪ベージュ化に与える影響とその機序の詳細についてはいまだ不明である。加齢や肥満などでは細胞周囲にコラーゲン線維の架橋が強化された、より剛性の高いコラーゲンが沈着することが示唆されており、コラーゲン線維の架橋による生体強度調節は低酸素誘導因子 HIF の下流で組織繊維化を促進する酵素リシルオキシダーゼ (LOX) により行われていることが本研究者の検討から明らかになった (Shimizu-Hirota R et al. J Clin Invest 2018)。LOX など組織繊維化をターゲットした研究は非常に重要と考えられる。繊維化の病態研究において、非常に扱いやすい疾患として子宮腺筋症という子宮筋の繊維化の疾患が挙げられる。子宮腺筋症は子宮内膜に類似した組織が子宮筋にでき、月経痛などの月経随伴症状や不妊症をきたし、生殖年齢女性において社会生活や家庭生活を著しく損なうことから、その治療法の開発が必要とされている。

## 2. 研究の目的

リシルオキシダーゼ (LOX) はコラーゲン分子間を架橋して生体組織強度を上げ脂肪線維化を促進する酵素であり、低酸素誘導因子 HIF の下流因子である。本研究では低酸素下で LOX を介した脂肪繊維化が脂肪のベージュ化をエピジェネティックに制御する可能性を検討した。また、子宮腺筋症の研究により、繊維化を介した子宮腺筋症の病因・病態の解明と子宮腺筋症の診断・治療応用への科学的基盤の創成を目的とした。

## 3. 研究の方法

LOX のベージュ脂肪細胞分化への影響を検討するために細胞培養系としてマウス初代脂肪組織由来幹細胞を用いて UCP1 や PRDM16 等褐色脂肪特異的遺伝子発現を確認した。褐色脂肪細胞分化への LOX の影響を評価するために、ミトコンドリア酸素消費量を評価した。その機序の解明として、シグナルおよびその下流因子について細胞染色法やウェスタンブロットを用いた検討を行った。LOX による影響を広く検討するために網羅的なエピジェネティック解析を行った。マウスモデルを用いて高脂肪食負荷での脂肪代謝や糖代謝、熱産生、酸素代謝について検討と病理学的解析を行った。

繊維化に関連した子宮腺筋症の研究では、子宮腺筋症病変・正所性子宮内膜のヒト臨床検体を用いて解析を行い、子宮腺筋症マウスモデルを新規に確立し、in vivo の機能解析を行った。子宮腺筋症マウスモデルは子宮腺筋症の診断・治療への応用を考えるうえで、重要な研究ツールとなると考えた。子宮内膜の STAT3 欠損マウスを用いて子宮腺筋症の病態の機能解析や子宮の機能としての着床の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

リシルオキシダーゼはコラーゲン繊維の架橋を担うリモデリング関連酵素である。組織リモデリングにおける重要なシグナリングの一つに STAT3 が挙げられる。この STAT3 はリシルオキシダーゼの下流シグナリング因子の候補の一つである。そのため、我々は STAT3 の活性化が繊維化を主体とする病態にどのような影響をおよぼすのかを検討するために、脂肪よりも繊維化が病態の主体として解析しやすい子宮腺筋症における STAT3 の役割について検討した。

子宮腺筋症は子宮内膜に類似した組織が子宮筋にできる良性疾患で、月経痛などの月経困難症や月経過多症という月経随伴の各種の症状や不妊症・不育症・周産期の合併症をきたし、生殖年齢女性の QOL を著しく損なうことが問題になっている。子宮腺筋症は、子宮筋に線維芽細胞が増殖し細胞外マトリックスの沈着が起こり、子宮筋が繊維化し、上記の病態を引き起こすことが知られている。しかしながら、その繊維化のメカニズムは未だ不明であり、繊維化をターゲットとした治療アプローチが考えられるものの、有効な治療薬剤は開発されておらず、既存の薬物治療に対しては抵抗性を示し、多くの場合には子宮摘出せざるを得ない。そのため、新たな研究により、新規治療戦略が必要とされている。転写因子 STAT3 活性化はリン酸化 STAT3 (pSTAT3) の発現解析により調べたところ、子宮腺筋症女性の正所性子宮内膜と子宮腺筋症病変では月経周期に関係なく持続的に STAT3 が活性化していた (pSTAT3 発現が認められた)。次に子宮腺筋症進展への STAT3 の関与を調べるため、子宮腺筋症の主要な病因説 (子宮内膜と子宮筋層の間のバリア (境界面) が破綻し正所性子宮内膜が子宮筋層内へ進入するという説) に基づいて細い針でマウス子宮全層を貫くように穴を開ける方法で子宮筋層と内膜の境界面を物理的に破壊した新しい子宮腺筋症マウスモデルを確立した。子宮内膜の 3 次元画像なども用いて組織学的に正所性子宮内膜の子宮筋層内への進入像を確認した。子宮腺筋症マウスの正所性

子宮内膜と子宮腺筋症病変はヒトと同様に pSTAT3 陽性であり、子宮内膜全体の STAT3 欠損マウスで作成した子宮腺筋症モデルでは子宮腺筋症病変数が減少し免疫細胞遊走と組織再生に関連する分子群 (Cxcl1、Icam1、および Spp1) 低下が認められた。これらの結果から、子宮腺筋症の病因・病態への IL6-STAT3 経路の関与が新たに解明され、STAT3 阻害が子宮腺筋症の新規治療戦略となることが明らかとなった。次に、STAT3 の作用を抑制する新たな薬剤として、抗寄生虫薬として臨床的に使用されている Niclosamide に着目した。子宮腺筋症に関連する疾患である子宮内膜症についての研究では、Niclosamide が子宮内膜症間質初代培養細胞の STAT3 リン酸化を直接的に抑制することを示した。Niclosamide の子宮内膜症間質についての STAT3 抑制する作用から推測して、子宮内膜症の類縁疾患である子宮腺筋症においても Niclosamide の STAT3 抑制を介した向炎症性サイトカイン産生阻害により、子宮腺筋症の病態や病変の進展を抑制できる可能性を見出した。Niclosamide の子宮内膜症治療薬および子宮腺筋症治療薬としての検討を進めることで、Niclosamide による STAT3 経路をターゲットとした子宮腺筋症の新たな治療戦略への発展が期待された。

また、STAT3 と子宮内膜に関連する研究として、子宮内膜上皮、子宮内膜間質の STAT3 欠損マウスを用いた解析を進めた。子宮内膜上皮と子宮内膜間質の STAT3 欠損マウスはどちらも子宮内膜への着床が起こらず、着床不全の表現型を示した。このことから、子宮内膜上皮と子宮内膜間質の両方において、STAT3 が必須の作用をもち、胚着床を調節していることが明らかとなった。子宮内膜上皮の STAT3 欠損マウスでは着床期の子宮内膜上皮の形態が鋸歯状構造を示し、子宮内膜上皮の STAT3 の役割として、着床が起こる場である子宮内膜上皮の構造変化へ関与することが示された。また、子宮内膜間質の STAT3 欠損マウスについては、着床期の子宮内膜上皮が持続的な細胞増殖を呈しており、子宮内膜間質の STAT3 が子宮内膜上皮に影響を与えていることが明らかとなった。子宮内膜上皮の STAT3 は着床期の子宮管腔形態変化を制御していることや、子宮内膜間質の STAT3 は子宮内膜上皮の細胞増殖能を抑制していることが判明し、子宮内膜上皮および間質の STAT3 が異なる作用を持ちながら、いずれも子宮内膜への胚着床を調節していることが解明された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makino Kanako, Shimizu-Hirota Ryoko, Goda Norio, Hashimoto Masahiro, Kawada Ichiro, Kashiwagi Kazuhiro, Hirota Yasushi, Itoh Hiroshi, Jinzaki Masahiro, Iwao Yasushi, Ko Minoru, Ko Shigeru, Takaishi Hiromasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Unbiased, comprehensive analysis of Japanese health checkup data reveals a protective effect of light to moderate alcohol consumption on lung function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95515-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Yamato, Hirota Yasushi, Saito-Fujita Tomoko, Aikawa Shizu, Hiraoka Takehiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Ikawa Masahito, Osuga Yutaka	4. 巻 162
2. 論文標題 Uterine Epithelial LIF Receptors Contribute to Implantation Chamber Formation in Blastocyst Attachment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqab169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Masataka, Shimizu-Hirota Ryoko, Mita Masashi, Hamase Kenji, Sasabe Jumpei	4. 巻 54
2. 論文標題 Chiral resolution of plasma amino acids reveals enantiomer-selective associations with organ functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 421 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-022-03140-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Iida Rei, Ishizawa Chihiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Fukui Yamato, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Osuga Yutaka	4. 巻 163
2. 論文標題 Constant Activation of STAT3 Contributes to the Development of Adenomyosis in Females	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqac044	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi Kazuhiro, Takayama Michiyo, Fukuhara Kayoko, Shimizu-Hirota Ryoko, Chu Po-Sung, Nakamoto Nobuhiro, Inoue Nagamu, Iwao Yasushi, Kanai Takanori	4. 巻 38
2. 論文標題 A significant association of non-obese non-alcoholic fatty liver disease with sarcopenic obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Nutrition ESPEN	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clnesp.2020.05.025	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Gebril Mona, Kaku Tetsuaki, Aikawa Shizu, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito-Kanatani Mayuko, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Yoshino Osamu, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 155523-155534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72640-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gebril Mona, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Fukui Yamato, Kaku Tetsuaki, Matsuo Mitsunori, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Taha Tamer, Balah Osama AI, Elnoury Mohamed Amr H, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 161
2. 論文標題 Uterine Epithelial Progesterone Receptor Governs Uterine Receptivity Through Epithelial Cell Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqaa195	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaeda Shun, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Aikawa Shizu, Shimizu Hirota Ryoko, Kaku Tetsuaki, Gebril Mona, Hirata Tomoyuki, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito Kanatani Mayuko, Takeda Norihiko, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Retinoblastoma protein promotes uterine epithelial cell cycle arrest and necroptosis for embryo invasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 50927-50947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050927	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎野香奈子、清水良子、正木克宜、館野博喜、福永興彦、井上詠、岩男泰、高石官均
2. 発表標題 当センターにおける禁煙支援の現状の検証
3. 学会等名 第61回日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	榎野 香奈子  (Makino Kanako)  (10772402)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教    (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------