

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390061

研究課題名(和文) 脂質メディエーター受容体を標的とした創薬基盤

研究課題名(英文) Targeting bioactive lipid receptors for drug development

研究代表者

石井 聡 (Ishii, Satoshi)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10300815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体的一种であるリゾホスファチジン酸第四受容体(LPA4)のノックアウトマウスの解析により、申請者はLPA4が2型糖尿病の増悪化と密接に関連していることを以前より明らかにしていた。本研究では白色脂肪細胞においてLPA4がRhoとRhoキナーゼ系を介してミトコンドリア増生抑制シグナルを送り、脂肪細胞の分化を抑制する働きを明らかにした。このLPA4の働きをアンタゴニストの開発によって制御できれば、脂肪細胞の分化を促進して2型糖尿病の治療に役立つと期待される。そこで本研究では化合物ライブラリーからLPA4アンタゴニストのスクリーニングも行った。

研究成果の概要(英文)：Through the analysis of mice deficient in the fourth lysophosphatidic receptor (LPA4), we previously revealed that LPA4 is involved in development of type 2 diabetes. In this study, we found that LPA4 negatively regulates mitochondria biogenesis by activating the Rho/Rho kinase pathway and then suppresses adipogenesis. LPA4 antagonists are expected to promote adipogenesis and may be useful for the treatment of patients with type 2 diabetes. In this study, therefore, we screened LPA4 antagonists from a chemical library.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：脂質 シグナル伝達 LPA リゾホスファチジン酸 LPA4 化合物ライブラリー

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。近年、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.* (2003)]。しかしながら、脂質を認識する GPCR についてリガンドと受容体の関係を明らかにできたとはいえ、特異的に拮抗する薬剤は開発されておらず、生理学的・病態生理学的機能は依然として未解明のままであった。その後の高脂肪食負荷を施した LPA4 のノックアウト (KO) マウスを解析した研究によって、申請者は LPA4 が 2 型糖尿病の増悪化と密接に関連していることを明らかにした。その機序として、LPA4 には白色脂肪細胞の分化を抑制する機能が備わっていることが考えられた。

2. 研究の目的

LPA4 が脂肪細胞の分化を抑制する細胞内シグナルを明らかにして、LPA4 が 2 型糖尿病の発症に関わる機序を検証する。また、LPA4 のアンタゴニスト (拮抗剤) は、2 型糖尿病を治療する創薬の対象と考えられることから、化合物ライブラリーのスクリーニングによって注目する脂質メディエーター受容体の特異的アンタゴニストを見つけ出し、新しい作用機序をもつ新薬を開発するための基盤提供を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 白色脂肪組織の細胞分画

LPA4 の発現レベルを調べた実験では、白色脂肪組織 (eWAT) を構成する細胞を以下の方法で分離した。普通食で飼育した野生型マウス由来の精巢上体周囲の eWAT をコラゲナーゼ処理し、遠心法で成熟脂肪細胞と間質・血管系画分 (SVF) に分離した。得られた SVF を抗 CD45 (血球系細胞マーカー) 抗体、抗 TER-119 (赤血球系細胞マーカー) 抗体と反応させ、磁気ビーズ法で血球系細胞 (CD45 陽性または TER-119 陽性) と非血球系細胞 (CD45 陰性/TER-119 陰性) に分離した。この方法により分離された非血球系細胞を抗 CD31 (血管内皮細胞マーカー) 抗体を用いて、同様の方法で CD45 陰性/TER-119 陰性/CD31 陽性の血管内皮細胞と CD45 陰性/TER-119 陰性/CD31 陰性の Lineage 陰性細胞 (以下 Lin 陰性細胞) に分離した。なお、Lin 陰性細胞は前駆脂肪細胞を主に含むことが過去に報告されている。各細胞画分から回収した全 RNA を定量 RT-PCR で解析し、各種細胞マーカー (すなわち、成熟脂肪細胞マーカーであるアディポネクチン、血球系細胞マーカーである

CD45、血管内皮細胞マーカーである CD31、前駆脂肪細胞マーカーである Smoothed) の遺伝子発現レベルを LPA4 の遺伝子発現レベルとともに検討した。

(2) 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* (2010)]。野生型マウスと KO マウスの eWAT から RNA を抽出・精製し、マイクロアレイ (Affymetrix 社 GeneChip [3' Expression] Mouse Genome 430 2.0 Array: 約 34,000 遺伝子) で発現解析を行った。

(3) C3H10T1/2 細胞の脂肪細胞への分化

DMEM/10%FCS 培地で培養したマウス間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞の脂肪細胞への分化は、以下の条件で行った。10 μ M ピオグリタゾン、0.5 mM IBMX、10 μ g/mL インスリン、0.25 μ M デキサメタゾンを加えて 5-6 日間培養の後、10 μ g/mL インスリンのみ加えた培地でさらに 2-3 日、そしてそこからインスリンを抜いた通常の DMEM/10%FCS 培地で 2-3 日培養して分化させた。なお、分化した細胞を実験に供する際は、シグマ社のヒストパック-1077 を使って比較的比重が高い未分化細胞を除いて分化した細胞を濃縮した。siRNA はダーマコン社から購入し、ロンザ社の AMAXA を使ってエレクトロポレーション法で細胞内へ導入した。細胞は血清飢餓条件下で 16 時間培養した後、LPA4 アゴニストで 24 時間刺激し、QIAzol (キアゲン社) を用いて総 RNA を抽出した。

(4) 化合物ライブラリーのスクリーニング

東京大学創薬オープンイノベーションセンターが保有する化合物ライブラリーをスクリーニングして、LPA4 アンタゴニスト活性を示す化合物を選別した。化合物のアンタゴニストとしての評価は、LPA-LPA4-Gq 細胞内シグナル経路によるカルシウム濃度上昇反応への阻害効果を指標とした。この反応に用いた細胞は、LPA に対する応答を生来示さない特徴をもつラット神経芽腫細胞株 B103 細胞に LPA4 を安定的に過剰発現させた細胞である。この細胞を 2.5 mM プロベネシド存在下においてカルシウム指示薬 (1 \times Fluo-4 Direct: Invitrogen 社製) で標識した後、予め化合物を分注しておいた 384 穴プレートへ 20,000 個/10 μ L ずつ播種した。細胞は浮遊状態でライブラリー由来の化合物 (20 μ M) と室温で 45 分間インキュベートした。その後、LPA を含む溶液を等量加え (LPA の終濃度: 1 μ M)、細胞内カルシウム濃度上昇反応をハイスループット対応測定機器 (浜松ホトニクス社製、FDSS7000) で約 2 分間測定した。ピーク値をもとに各化合物による阻害率を算出した。

4. 研究成果

(1) LPA4 が脂肪細胞の分化を抑制する機序

LPA4 の発現をマウスの主な臓器で調べたところ、脂肪組織で高いことが明らかとなった。しかも白色脂肪組織 (WAT) の方が褐色脂肪組織 (BAT) よりも発現が高かった。WAT を構成する細胞画分で調べると、成熟脂肪細胞と Lin 陰性細胞つまり前駆脂肪細胞に発現が高かった。Chow Diet 食餌で LPA4-K0 マウスに表現型 (体重、脂肪組織重量、インスリン感受性等) を特に認めることはできなかったが、WAT 由来の RNA でマイクロアレイを行ったところミトコンドリア構成タンパク質をコードする遺伝子群の発現が上昇していることが観察された。そこで、ミトコンドリア増生が亢進していると考え、ミトコンドリア増生に関わる遺伝子群 (PGC-1 など) を qPCR で確認したところ K0 マウスで発現上昇を認めた。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 (アディポカイン分泌など) にミトコンドリア機能が重要である。そこで、WAT における脂肪細胞分化に関する遺伝子発現を qPCR で調べたところ、PPAR など多くの遺伝子発現が K0 マウスでやはり上昇していた。しかも成熟脂肪細胞から分泌される血中アディポネクチン濃度も K0 マウスで有意に高かった。以上の結果から、LPA4 はマウスにおいてミトコンドリア増生を抑制し、白色脂肪細胞の分化や機能を制御することが示唆された。

次に、脂肪細胞に分化させた C3H10T1/2 細胞を使って、LPA4 のミトコンドリア増生抑制機能を *in vitro* で検討した。血清飢餓後に LPA4 のアゴニストで細胞を刺激すると、ミトコンドリア増生関連遺伝子の発現が低下することが観察された。この細胞を siRNA や薬剤で処理することにより、LPA4 アゴニストによるミトコンドリア増生関連遺伝子発現低下が三量体 G タンパク質 G12/13、G12/13 によって活性化される低分子量 G タンパク質 Rho、そして Rho によって活性化される Rho キナーゼを介していることが示された。さらに、この脂肪細胞に分化させた C3H10T1/2 細胞を LPA4 アゴニストで刺激すると、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現も同様に抑制されるが、この抑制機構もやはり G12/13、Rho、Rho キナーゼが関わっていることが示された。

マウスに脂肪を負荷した場合、脂肪細胞は余分な脂肪を蓄積する必要に迫られる。その結果、脂肪細胞は肥大するが、それに伴い脂肪細胞の炎症を誘発するサイトカインやケモカインを産生するようになり、脂肪組織での炎症を誘発する。同時にインスリン感受性を上げるアディポネクチンの産生は低下する。この現象が一因となり、マウスはインスリン抵抗性や脂肪肝といった生活習慣病を発症することになる。本研究で LPA4-K0 マウスは、LPA4-Rho-Rho キナーゼ系を介したミトコンドリア増生抑制機構が解除されているため、ミトコンドリア増生が亢進する状態と

なっていることが示された。ミトコンドリア増生は脂肪細胞の分化が促進するため、LPA4-K0 マウスは脂肪負荷されて脂肪を蓄積する必要に迫られても一つ一つの脂肪細胞は野生型マウスと比べて肥大化しにくいと考えられる。このことは則ち、脂肪組織の量 (重さ) は同じでも脂肪細胞の質が維持されることを意味し、LPA4-K0 マウスでは生活習慣病の病態が軽度となるのであろう。一方、成熟脂肪細胞においても LPA4 の高い発現が認められることから、脂肪細胞分化抑制作用以外の LPA4 の機能が内臓脂肪組織の質的悪化につながる可能性も考えられる。

(2) LPA4 アンタゴニストのスクリーニング

「研究の方法」で記したハイスループットアッセイ系によって、LPA4 アンタゴニスト活性を有する化合物のスクリーニングを行った。実際に、以下に示す から の項目を評価することで約 11,000 化合物の中から 17 個の候補化合物を絞り込んだ。18 個の化合物それぞれに対する構造類似体を加えた 115 個の化合物を と の評価に供した。その結果 37 個の化合物が選別された。

自家蛍光の有無

カルシウム濃度上昇反応を検出する際に蛍光物質を利用するが、測定波長付近に強い自家蛍光を発する化合物は、カルシウム反応の測定を妨げるため候補から除外した。

阻害効果の再現性

1 次評価では $n = 1$ で多検体のアッセイを行い、アンタゴニスト活性がみとめられた化合物に関しては、 $n = 4$ で 2 次評価を行って再現性を確認した。再現性が認められない化合物は候補から除外した。

LPA 特異性の検討

LPA の代わりに ATP (やはり Gq を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させる) を細胞に作用させた際にもアンタゴニスト活性が認められた化合物は、LPA4 への特異性が低いと考え候補から除外した。

LPA4 特異性の検討

LPA4 の他に 5 種存在する LPA 受容体のうち、LPA4 と同様のカルシウム反応で評価が可能な 4 種の LPA 受容体 (LPA1, LPA2, LPA3, LPA5) に対して、化合物がアンタゴニスト活性を示すかを検討した。LPA4 と同様に B103 細胞に各 LPA 受容体を安定発現させ、細胞内カルシウム応答を測定した。LPA4 に対するアンタゴニスト活性が比較的高い化合物を選別した。

濃度依存性の検討

LPA4 受容体に対するアンタゴニスト活性の濃度依存性を測定して、IC50 値を求めた。

本研究では、LPA4 アンタゴニスト活性が比較的強い化合物として 37 個の候補化合物を選別した。今後、これら化合物は LPA6 への特異性を評価することで、LPA4 に特異性の高いものをさらに絞り込む予定である。LPA6

は G12/13 とのみ共役する受容体であるため、LPA6 の活性化を細胞内カルシウム応答として検出することができない。したがって、G12/13 を介した細胞の形態変化(定性的評価)に加え、G12/13-Gs キメラタンパク質の過剰発現によって G12/13 シグナルを細胞内 cAMP 上昇に変換するアッセイ系(定量的評価) [Yanagida *et al.* *J. Biol. Chem.* (2009)] で LPA6 に対する応答性を評価する予定である。さらに今後は、化学合成の専門家との共同研究によって候補化合物をリード化合物として合成展開し、構造類縁体を作る予定である。これら構造類縁体についても同様にアンタゴニスト活性を評価し、より LPA4 受容体に対する特異性・親和性が優れたものを絞り込んでいく。また、このような過程で絞り込まれた化合物の抗糖尿病効果については、糖尿病マウスを用いて *in vivo* で評価する予定である。今後優れた LPA4 のアンタゴニストが得られれば、ヒトにおいても KO マウスのように LPA による前駆脂肪細胞分化抑制効果の解除が可能になると思われる。その結果、成熟脂肪細胞形成の促進や血中アディポネクチン濃度の増加を介して、2 型糖尿病の病態の根幹をなす「インスリン抵抗性」を改善することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hikiji, H., Endo, D., Horie, K., Harayama, T., Akahoshi, N., Igarashi, H., Kihara, Y., Yanagida, K., Takeda, J., Koji, T., Shimizu, T., and *Ishii, S. (2014) TDAG8 activation inhibits osteoclastic bone resorption. *FASEB J.* 28, 871-879. 査読有
doi:10.1096/fj.13-233106

Sugatani, J., Sadamitsu, S., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Higa, R., Hattori, Y., Uchida, T., Ikari, A., Sugiyama, W., Watanabe, T., Ishii, S., Miwa, M., and Shimizu, T. (2014) Antiobese function of platelet-activating factor: increased adiposity in platelet-activating factor receptor-deficient mice with age. *FASEB J.* 28, 440-452. 査読有
doi:10.1096/fj.13-233262

Sumida, H., Nakamura, K., Yanagida, K., Asano, Y., Kadono, T., Tamaki, K., Igarashi, K., Aoki, J., Sato, S., Ishii, S., Shimizu, T., and Yatomi, Y. (2013) Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone. *Clin. Chim. Acta* 415, 74-80. 査読有
doi:10.1016/j.cca.2012.10.003

Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T., and Ishii, S. (2013) Current

progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 33-41. 査読有
doi:10.1016/j.bbailip.2012.08.003

Komachi, M., Sato, K., Tobo, M., Mogi, C., Yamada, T., Ohta, H., Tomura, H., Kimura, T., Im, D.S., Yanagida, K., Ishii, S., Takeyoshi, I., and Okajima F. (2012) Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis *in vivo*. *Cancer Sci.* 103, 1099-1104. 査読有
doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02246.x

Yanagida, K. and *Ishii, S. (2011) Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. *J. Biochem.* 150, 223-232. 査読有
doi:10.1093/jb/mvr087

〔学会発表〕(計 5 件)

五十嵐秀光、石井聡 骨髄造血幹細胞の維持と分化におけるリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 の機能解析 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 09 月 11 日、横浜
Yanagida, K., Kubota, N., Kadowaki, T., Shimizu, T., and Ishii, S. Roles of lysophosphatidic acid receptor LPA4 in diet-induced obesity and insulin resistance. FASEB Summer Research Conference/Lysophospholipid and Other Related Mediators -From Bench to Clinic. 2013 年 08 月 06 日、Niseko (Japan)

柳田圭介、窪田直人、門脇孝、清水孝雄、石井聡 内蔵脂肪型肥満/インスリン抵抗性の進行におけるリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 の関与 第 55 回脂質生化学会 2013 年 06 月 07 日、松島
Yanagida, K., Kubota, N., Kadowaki, T., Shimizu, T., and Ishii, S. Involvement of lysophosphatidic acid receptor LPA4 in chronic inflammation in adipose tissue and insulin resistance caused by diet-induced obesity. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) 2012 年 10 月 24 日、Tokyo (Japan)

石井聡、清水孝雄 脂質メディエーターの多彩な機能 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都

〔その他〕

ホームページ等

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

me.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 聡 (ISHII, Satoshi)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10300815

(2) 研究分担者

大戸 貴代 (OHTO, Takayo)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80511378

安田 大恭 (YASUDA, Daisuke)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70594951