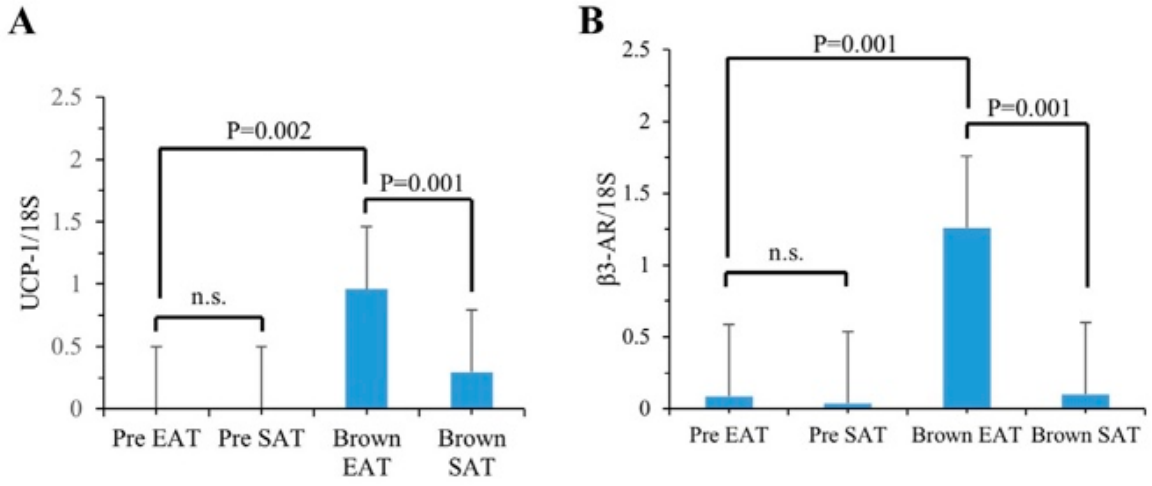
92　脂肪ブラウニングを制御する可溶性LR11の検査研究	武城　英明

【目的】先端画像技術によりヒト脂肪には、エネルギーを蓄え糖尿病の原因となる白色脂肪とともに、エネルギーを熱に変えて消費活性の増大する褐色脂肪（ベージュ脂肪）の存在することが明らかになった。著者らは、平滑筋細胞のフェノタイプである血管内膜の増殖遊走細胞から同定した脱分化遺伝子 LR11 のノックアウトマウスを作製したところ、過剰に脂肪摂取しても白色脂肪がブラウニングし安静時エネルギー消費量を増大させることで肥満や糖尿病が抑止されること、この状態を血中の可溶性 LR11 濃度が反映する事実に遭遇した。本研究は、可溶性 LR11 による脂肪ブラウニング調節機構を明らかにし、糖尿病抑止のための細胞エネルギー消費をあらわす血中マーカーの検査概念を確立することを目的とした。

【方法】可溶性レセプター*LR11* 遺伝子発現は培養樹立 3T3-L1 細胞を、ベージュ脂肪細胞の特性解析にはヒト心臓周囲脂肪と皮下脂肪、およびそれらから培養された初代脂肪細胞を使用した。遺伝子発現は Real-time RT-PCR 法により測定した。メタボローム解析を行うためのマウス脂肪細胞は初代マウス培養脂肪細胞に SV40 large T antigen を導入し不死化処理を行った。活性化脂肪診断への検査研究データベース登録にこれまでに登録されたデータから対象背景を中間集計した。

【結果】培養白色脂肪細胞における可溶性レセプター*LR11* 遺伝子発現は前脂肪細胞の増殖とともに増大し分化誘導すると低下した。ヒトベージュ脂肪細胞として知られる心臓周囲脂肪の熱産生に関連する遺伝子発現は皮下脂肪に比べては高値だった。培養ヒト初代前脂肪細胞ではブラウニング分化とともに増加し、心臓周囲脂肪由来細胞は皮下脂肪由来細胞に比べて高値だった。*LR11* ノックアウトマウス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メタボローム解析を行う 3 次元培養条件を設定した。これまでに登録が終了した糖尿病患者の中間解析では血中可溶性 LR11 は高値だった。以上より、*LR11* 遺伝子は前脂肪細胞から白色脂肪細胞へと分化誘導し、発現することでベージュ脂肪細胞への分化を抑制している可能性がある。ヒトにおいても熱産生遺伝子発現機能を有するベージュ脂肪が確認され、血中可溶性 LR11 濃度は病的脂肪が存在する可能性のある糖尿病患者で高値だったことから、血中可溶性 LR11 は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ことが明らかになった。

ヒト培養初代前脂肪細胞およびブラウニング分化後の熱産生遺伝子の発現



92. 脂肪ブラウニングを制御する可溶性 LR11 の検査研究

武城　英明

東邦大学 医学部 臨床検査医学研究室

Key words：ベージュ脂肪，LR11，血液診断，ブラウニング，糖尿病

緒　言

先端画像技術によりヒト脂肪には、エネルギーを蓄え糖尿病の原因となる白色脂肪とともに、エネルギーを熱に変えて消費活性の増大する褐色脂肪（ベージュ脂肪）の存在することが明らかになった。白色からベージュ脂肪への変換を誘導することで、従来のエネルギー制限する糖尿病治療に基礎代謝を増やす糖尿病治療を組み合わせ患者の取り組みを支援する診療が期待され、世界中でブラウニング誘導因子が探索されようとしている。著者らは、平滑筋細胞の一つのフェノタイプである血管内膜の増殖遊走細胞から同定した脱分化遺伝子である LDL 受容体ファミリー*LR11* のノックアウトマウスを作製したところ、過剰に脂肪摂取しても白色脂肪がブラウニングし安静時エネルギー消費量を増大させることで肥満や糖尿病が抑止されること、この状態を血中の可溶性 LR11 濃度が反映する事実に遭遇した［1］。本研究は、フェノタイプ変換を誘導する可溶性 LR11 による脂肪ブラウニング調節機構を明らかにし、糖尿病抑止のための細胞エネルギー消費をあらわす血中マーカーの検査概念を確立することを目的とした。すなわち、本研究は、『活性化ブラウニング脂肪を血液診断』するという新規の細胞診断検査技術を開発することを目指すなかで、主にベージュ脂肪細胞の特性を探索し、可溶性 LR11 を放出する細胞制御を解明する。あわせて、すでに単一施設研究で示唆された血中可溶性 LR11 濃度の脂肪細胞由来マーカーとしての意義［1～4］を、糖尿病や肥満症を対象にした検査研究を行うことで、新たな活性化ブラウニング細胞検査としての検査学的意義を検証する。

方　法

1. ベージュ脂肪細胞の特性と可溶性レセプターLR11 の細胞制御

可溶性レセプター*LR11* 遺伝子発現は培養樹立 3T3-L1 細胞を、ベージュ脂肪細胞の特性解析にはヒト心臓周囲脂肪と皮下脂肪、およびそれらから培養された初代脂肪細胞を使用した。遺伝子発現は Real-time RT-PCR 法により測定した。メタボローム解析を行うためのマウス脂肪細胞は初代マウス培養脂肪細胞に SV40 large T antigen を導入し不死化処理を行った。

2. 活性化脂肪診断への検査学的検証

中国延辺大学の糖尿病患者を対象にした代謝指標、生活習慣指標、血中可溶性 LR11 値の関連解析を目的として登録した検査研究データベースから対象背景を中間集計した。

（倫理面への配慮）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、基礎、動物、臨床研究は東邦大学医療センター佐倉病院と各実施施設の倫理委員会や担当委員会で研究計画の承認をうけ実施した。

結　果

1. 可溶性レセプターLR11 の樹立白色脂肪細胞における発現制御

LR11mRNA 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。

2. ヒトベージュ脂肪細胞の特性

ヒト心臓周囲脂肪の熱産生に関連する遺伝子の発現を検討したところ、皮下脂肪に比べて UCP-1 は有意に高値、β3-AR は高値傾向だった（図 1）[5]。マウス心臓周囲脂肪で検討したところ、UCP-1、β3-AR ともに高値だった（図 2)。そこで、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初代成熟細胞との間で検討したところ、UCP-1、β3-AR 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（図 3）[5]

3. *LR11* ノックアウトマウス由来不死化脂肪細胞の作製

LR11 ノックアウトマウスの白色脂肪と褐色脂肪、野生型マウスの皮下脂肪と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、ブラウニング遺伝子の発現解析に着手した。メタボローム解析を行うために、二次元培養法に加えて、微細ファイバーを用いた 3 次元培養のための条件を設定した。

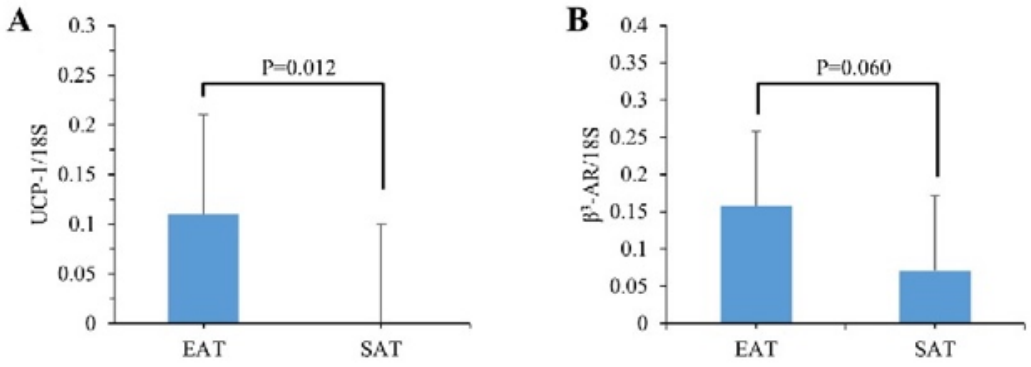


図1. ヒト心臓周囲脂肪のUCP-1（A）とβ3-AR遺伝子（B）の発現量の比較［5］
EAT、心臓周囲脂肪、SAT、皮下脂肪。平均±標準偏差（unpaired Student t test)。

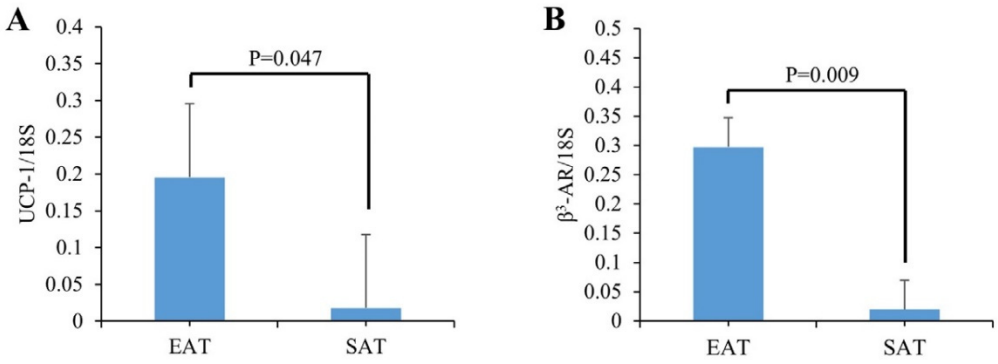


図2. マウス心臓周囲脂肪のUCP-1（A）とβ3-AR遺伝子（B）の発現量の比較［5］
EAT、心臓周囲脂肪、SAT、皮下脂肪。平均±標準偏差（unpaired Student t test）

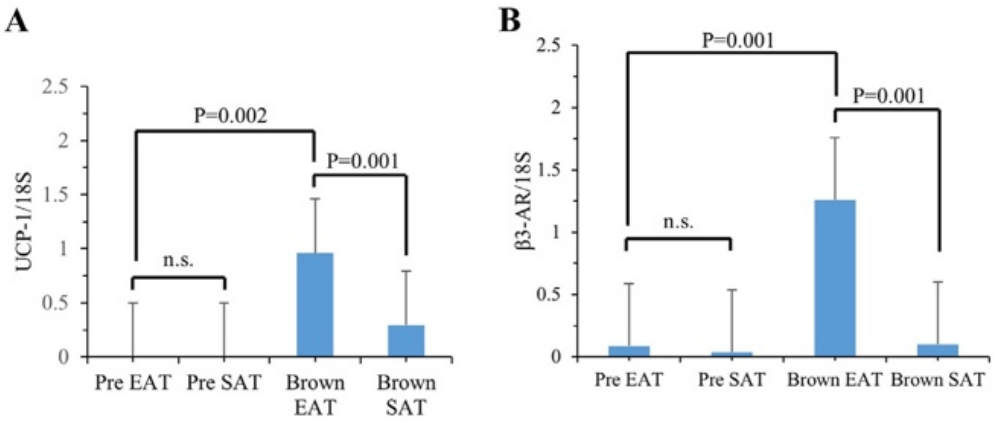


図3. ヒト前脂肪細胞におけるブラウニング分化前後のUCP-1（A）とβ3-AR遺伝子（B）の発現量の比較［5］
EAT、心臓周囲脂肪、SAT、皮下脂肪。平均±標準偏差（Mann Whitney U test）。

考　察

LR11 遺伝子は白色脂肪増殖に伴い発現が一過性に上昇し成熟細胞ではほとんど発現しないことから、前脂肪細胞から白色脂肪細胞へと分化誘導し、発現することでベージュ脂肪細胞への分化を抑制している可能性がある。ヒト心周囲脂肪においてマウス褐色脂肪と同様の熱産生遺伝子発現が誘導されるベージュ脂肪が同定された。血中可溶性 LR11 濃度は病的脂肪が存在する可能性のある糖尿病患者で高値であり、ベージュ脂肪機能獲得における LR11 の役割を明らかにするメタボローム変容を解析する *LR11* 欠損不死化初代脂肪細胞の樹立に着手した。以上の結果から、血中可溶性 LR11 は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。

共同研究者・謝辞

本研究の他施設代表共同研究者は、ケンブリッジ大学 MRC の A.Vidal-Puig 博士、ウィーン医科大学の W.J.Schneider 博士、エラスムスメディカルセンターの M.T.Mulder 博士、国際医療センター研究所の久保田浩之博士、延辺大学附属病院の金文龍博士である。本研究を実施する機会を与えていただいた上原記念生命科学財団に深謝します。

文　献

1） Whittle AJ, Jiang M, Peirce V, Relat J, Virtue S, Ebinuma H, Fukamachi I, Yamaguchi T, Takahashi M, Murano T, Tatsuno I, Takeuchi M, Nakaseko C, Jin W, Jin Z, Campbell M, Schneider WJ, Vidal-Puig A, Bujo H. Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose tissue and correlates with BMI in humans. Nat Commun. 2015 Nov 20;6:8951. doi: 10.1038/ncomms9951 PMID: 26584636

2） Berk KA, Vongpromek R, Jiang M, Schneider WJ, Timman R, Verhoeven AJ, Bujo H, Sijbrands EJ, Mulder MT. Levels of the soluble LDL receptor-relative LR11 decrease in overweight individuals with type 2 diabetes upon diet-induced weight loss. Atherosclerosis. 2016 Nov;254:67-72. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.09.066. Epub 2016 Sep 22.

3） 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. doi: 10.1016/j.cca.2016.04.016. Epub 2016 Apr 16.

4) Vongpromek R, Bujo H, Hoekstra M, Schneider WJ, van der Zee L, Schinkel AF, Korporaal SJ, Dik WA, Ebinuma H, Jiang M, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ, Mulder MT. LR11/SorLA links triglyceride-rich lipoproteins to risk of developing cardiovascular disease in FH patients. Atherosclerosis. 2015 Dec;243(2):429-37. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.009. Epub 2015 Oct 13.
5) 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. doi: 10.3892/mmr.2018.8690. Epub 2018 Mar 6.