

# 主 論 文

## Antiobesity Action of ACAM by Modulating the Dynamics of Cell Adhesion and Actin Polymerization in Adipocytes

(細胞接着とアクチン重合を介した、脂肪組織における ACAM の抗肥満作用)

### **【緒言】**

肥満研究の進歩により、内臓脂肪組織は単なる脂質の貯蔵臓器ではなく、アディポサイトカインなどの様々な生理活性物質を分泌することにより、食事摂取やインスリン抵抗性に関与し、体内のエネルギーバランスを調節する内分泌臓器として注目されている。

そこで、我々はメタボリックシンドロームの発症メカニズムを解明する目的で、内臓脂肪組織に着目し内臓脂肪蓄積型肥満、2型糖尿病、高血圧、脂質異常症を呈する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いて、遺伝子サブトラクション法により内臓脂肪組織において発現の上昇する遺伝子群を探索した。その結果、CTX (cortical thymocyte marker in Xenopus) 遺伝子ファミリーに属する 1 型膜蛋白である ACAM (adipocyte adhesion molecule) を同定し、以下の知見を得て報告した。

### **ACAM mRNA の白色脂肪組織での発現は肥満の形成に伴い上昇する**

ACAM mRNA は、OLETF ラット、遺伝性肥満糖尿病モデルの db/db マウス、食事性肥満モデルの DIO (diet induced obesity) マウスの内臓脂肪組織と皮下脂肪組織で発現が増強し、ヒト皮下脂肪組織での発現は BMI と正の相関を認めた。

### **ACAM は主に成熟脂肪細胞の plasma membrane 分画に発現を認める**

マウス内臓脂肪組織と皮下脂肪組織をコラゲナーゼで処理してノーザンブロットで検討したところ、ACAM mRNA は主に成熟脂肪細胞に発現しており、SVF (stromal vascular fraction) での発現はほぼ認めなかった。また、成熟脂肪細胞での ACAM の細胞内局在性をウェスタンブロットで検討したところ plasma membrane 分画に発現を認めた。

### **ACAMは細胞間のホモフィリックな細胞接着に関与する**

CTX遺伝子ファミリーメンバーの多くは、上皮細胞、内皮細胞においてホモフィリックな細胞間接着能を有することが知られている。そこで、CHO細胞株を用いてACAM stable cell lineを作成しcell aggregation assayを行うと、ACAM高発現株はコントロール株、低発現株と比較して、より大きな細胞凝集塊を形成したことから、ACAMは細胞間のホモフィリックな接着能を有すると考えられた。

CTX遺伝子ファミリーを含めて成熟脂肪細胞に発現する接着分子の報告はほとんどない。また、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化過程における細胞形態変化には細胞間のinteractionが重要であり、この形態変化における細胞内シグナル伝達や細胞骨格の変化を細胞間接着分子が掌っていると推察されたことから、ACAMの脂肪細胞分化や肥満形成における機能解析は、肥満、メタボリックシンドロームの発症メカニズム解析や新規治療開発に結びつくと考え、本研究を行った。

### **【材料と方法】**

#### **ACAM transgenic (Tg) マウス作製**

aP2プロモーターを用いて導入遺伝子を作製した。これをマウス受精卵にマイクロインジェクションし、仮親マウスの卵管へ移植し、3ラインのACAM Tgマウスを得た。

#### **動物実験**

6週齢のオスACAM Tgマウスとオス野生型 (WT) マウスを、自由飲水、自由摂餌下で通常食 (STD) 群と高脂肪高蔗糖食 (HFHS) 群に分けて飼育し、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験に加え、酸素消費量、呼吸商、運動量、摂餌量などの各代謝データを個別に測定し、30週齢で血液、各臓器を採取した。

## リアルタイムPCR解析

各マウス組織をホモジナイズし、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いてTotal RNA抽出を行った。2 $\mu$ g total RNAからcDNAを合成し、リアルタイムPCR法 (Applied Biosystems) により各mRNAの発現を定量した。

## ノーザンブロット

各マウス組織と分化誘導後の3T3-L1脂肪細胞をホモジナイズし、RNeasy Lipid Tissue Mini Kitを用いてTotal RNAを抽出。10 $\mu$ g total RNAを2.2 mol/Lホルムアルデヒド 1% agarose gelに泳動後、Hybond XL nylon membrane (GE Healthcare) に転写。このメンブレンを、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でラベルした各cDNAプローブによりハイブリダイズし、ノーザンブロット解析を行った。

## ウェスタンブロット

ACAM TgマウスとWTマウスの脂肪組織をRIPAバッファーでホモジナイズした産物、また、3T3-L1脂肪細胞をCellLytic M (Sigma-Aldrich) でホモジナイズした産物を抗ACAM抗体、抗 $\gamma$ -actin抗体によりウェスタンブロットを行った。

## ルシフェラーゼアッセイ

ACAMプロモーター領域の-79から-57の部位のC/EBP $\beta$ コンセンサス結合部位を含むpGL3ベクターに加え、KLF4とGATA1の発現ベクターをNeon electroporation transfection system (Invitrogen) により3T3-L1脂肪細胞に導入しルシフェラーゼアッセイを行った。

## ACAM相互作用分子の同定

Calmodulin-binding peptide (CBP) とStreptavidin-binding peptide (SBP) で標識した、全長マウスACAM cDNA (Adeno-pCTAP-mACAM) をアデノウイルスベクターにより3T3-L1脂肪細胞に発現させ、InterPlay Mammalian TAP (tandem-affinity purification) system (Stratagene) を用いて、ACAM相互作用蛋白を抽出した。次に、これらの蛋白をLC-MS/MSとMALDI-TOF/MSにより解析することでACAMの細胞内相互作用分子を同定した。

## 形態学的検討

各マウスの精巣周囲脂肪組織、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓を10%ホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、PAS染色を行った。また、各マウスの精巣周囲脂肪組織の凍結切片を用いて、抗ACAM抗体と抗F4/80抗体、Phalloidinの各々の組み合わせで免疫蛍光染色を行った。Oil Red O染色には、肝臓の凍結切片を用いた。

精巣周囲脂肪組織、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、3T3-L1脂肪細胞を4%パラフォルムアルデヒドと0.05%グルタルアルデヒドで固定し、エタノール脱水後包埋。ニッケルグリッド上の60-80 nmの薄切切片を、抗ACAM抗体と抗 $\gamma$ -actin抗体に反応させた後、10nm金コロイドで標識した二次抗体に反応させ透過型電子顕微鏡にて観察した。

## 統計解析

すべての結果は、平均値と標準誤差 (SE)により示した。多群間比較はBonferroniとTukeyによる、one-way ANOVAを用いて解析した。P値<0.05を有意とした。

## **【結果】**

### **ACAMは3T3-L1脂肪細胞においてKLF4、C/EBP $\beta$ の転写制御を受け脂肪細胞分化を促進する**

3T3-L1脂肪細胞をC/EBP $\beta$ のドミナントネガティブフォームであるLIPアデノウイルスベクターで処理し分化誘導したところ、コントロール群に比較してACAMの発現はC/EBP $\alpha$ やPPAR $\gamma$ などのadipogenic markerの発現や脂肪細胞分化とともに抑制された。加えて、ACAMはSertoli細胞においてKLF4とGATA1が協調的に作用することで転写活性が上昇し、3T3-L1脂肪細胞においてはKLF4がC/EBP $\beta$ を介して脂肪細胞分化を制御すると報告されていることから、3T3-L1脂肪細胞におけるACAMの転写調節とKLF4、C/EBP $\beta$ との関連について以下の検討を行った。すなわち、ACAMプロモーター領域の-79から-57の部位のC/EBP $\beta$ コンセンサス結合部位を含むpGL3ベク

ターを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。さらに、KLF4とGATA1の発現ベクター添加によりルシフェラーゼ活性はさらに上昇した。これらの結果から、3T3-L1脂肪細胞においてもKLF4およびC/EBP $\beta$ がACAMの転写活性を増強し、脂肪細胞分化を促進していることが示された。

### aP2 promoterによるACAM Tgマウスは体重増加と脂肪細胞の肥大化が抑制される

主に脂肪細胞に過剰発現するaP2プロモーターを用いて、ACAM Tg マウスを作出し、*in vivo*におけるACAMの肥満形成や脂肪細胞分化における役割を検討したところ、HFHS飼育下でWTマウスに比べACAM Tgマウスは、体重増加抑制と内臓脂肪組織重量の増加抑制に加え、脂肪細胞の肥大化抑制を認めるとともに、耐糖能異常とsmall dense LDL-C含む脂質異常が是正された。これらの結果から、ACAMは*in vivo*において、脂肪細胞の分化増殖を制御することで肥満の進行を抑制し、全身のエネルギー代謝を制御していると考えられた。

### ACAM Tg マウスは褐色脂肪機能が亢進し基礎代謝が亢進している

ACAM Tgマウスのメタボリックパラメーター改善のメカニズムを解析する目的で、代謝プロファイルの検討を行ったところ、ACAM TgマウスはWTマウスに比べHFHS飼育下で有意な酸素消費量亢進を認めた。そこで、肩甲骨間褐色脂肪組織について検討を行ったところ、WTマウスに比べACAM Tgマウスは肩甲骨間褐色脂肪組織重量の増加抑制、脂肪滴のサイズ縮小、UCP1 (uncoupling protein 1) mRNAの発現上昇を認めた。これらの結果から、ACAM Tgマウスは褐色脂肪組織機能の亢進により基礎代謝が亢進していることが示された。

### ACAMは脂肪細胞においてもホモフィリックな接着活性を有し、重合アクチンとzonula adherenceの形成を促進することで脂肪細胞の肥大化と肥満の形成を抑制する

ACAM全長cDNAをアデノウイルスベクターにより3T3-L1脂肪細胞に発現させ、Interplay Mammalian TAP systemにより抽出した蛋白を、LC-MS/MSとMALDI-TOF/MSにより解析することでACAMと相互作用する細胞内分子の探索を行った結果、細胞骨格分子であるMyosinII-Aと $\gamma$ -actinを同定した。

次に、これまでの我々の検討から、ACAMは細胞間のホモフィリックな接着能を有することから、ACAMは脂肪細胞においても細胞接着や $\gamma$ -actinとの相互作用により細胞骨格の変化をもたらし、脂肪細胞の肥大化を抑制しているとの仮説を立て引き続き検討を行った。すなわち、WTマウスとACAM Tgマウスの白色脂肪組織を用いて重合アクチンを染色するPhalloidinと抗ACAM抗体による免疫組織学的検討を行ったところ、PhalloidinはACAM Tgマウスでより強く染色され、ACAMとの共染色が観察された。加えて、抗ACAM抗体と抗 $\gamma$ -actin抗体を用いた免疫電子顕微鏡による検討から、ACAMと $\gamma$ -actinは共にACAM Tgマウスの白色脂肪細胞間隙に強く発現しzonula adherenceを形成していることが見いだされた。

### **[考察]**

これらの結果から、ACAMは3T3-L1脂肪細胞において、cAMP-PKA-C/EBP $\beta$  pathwayにより制御され、Sertoli細胞などの上皮系細胞のみならず、白色脂肪細胞においてもホモフィリックな接着活性を有することが判明した。また、HFHS食を負荷したACAM Tgマウスの白色脂肪組織では、WTマウスに比べ細胞膜表面におけるACAMの発現が増加し、脂肪細胞同士の接着を促進する。加えて、その接着部位でACAMの細胞内相互作用分子であるアクチンの発現が高まることで、表層アクチン(F-actin)が形成され脂肪細胞の肥大化が抑制されるという新しい分子機構が判明した。これらの分子機構が、肥満やインスリン抵抗性に対して防御的に作用することで、生体における糖代謝や脂質代謝が改善すると考えられた。

### **[結論]**

ACAMを介した白色脂肪組織における脂肪蓄積制御の新しい分子機構が明らかとなった。この分子機構を生体に応用することで、メタボリックシンドロームや2型糖尿病治療における新たな創薬ターゲット分子の同定につながると考えられる。これらの疾患を克服し、心血管疾患などの合併症の発症を予防することで、健康寿命の維持・延長に寄与できると期待している。