

令和元年5月27日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09649

研究課題名(和文) Fetuin-A/ CPPによるPEW・MIA症候群の成立機序の解明

研究課題名(英文) Contribution of fetuin-A/ CPP to PEW and MIA syndrome

研究代表者

森 克仁 (Mori, Katsuhito)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60382040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Fetuin-Aは肝で合成・分泌される約60kDaの糖蛋白質であり、過剰なリン・カルシウム負荷に対してコロイド状粒子CPP(calciprotein particle)を形成し石灰化を抑制する。近年、「CPP病原体説」が提唱され、本研究では、CPPが脂肪細胞に作用し、慢性腎臓病や透析における代謝・栄養障害に関与する仮説を検証をした。

CPPの培養脂肪細胞に対する作用は軽微であったが、CPPは培養肝細胞における60kDaのfetuin-A蛋白発現を著明に増加させた。興味深いことにCPPはmRNA発現に影響せず、翻訳後修飾を促進することで蛋白発現を調整することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fetuin-Aは石灰化抑制因子であることは良く知られているが、その過程で形成、産生されるCPPの生理的、病理学的意義は不明であった。最近、「CPP病原体説」が提唱されており、進展したCKDの栄養障害にCPPが関与している仮説を立てた。しかし脂肪細胞に対するCPPの影響は軽微であった。一方、CPPは肝fetuin-A発現に対しては顕著な効果を発揮した。この結果はCPPによるfetuin-A発現のfeedback機構の存在を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Fetuin-A is a liver-derived circulating glycoprotein that has a potent calcification-inhibitory capacity. Fetuin-A is posttranslationally modified (60 kDa fully modified fetuin-A: FM-Fet). Under calcification stress, fetuin-A can prevent calcification by forming colloidal complexes, termed CPP. Since recent reports suggest the pathological functions of CPP, we hypothesized that CPP may play roles for malnutrition in patients with advanced CKD through dysregulation of adipocytes.

Little effects of CPP on adipocytes were observed. On the other hand, CPP dramatically increased protein expression of FM-Fet. However, CPP did not affect the mRNA expression of fetuin-A. FM-Fet contains glycosylation sites. Treatment with brefeldin-A, which blocks the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex, inhibited CPP-induced FM-Fet expression. These findings suggest that CPP could upregulate posttranslational modifications of fetuin-A.

研究分野：代謝・腎臓内科学

キーワード：fetuin-A CPP

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

Fetuin-A は肝で合成され血中に分泌される約 60kDa の多機能糖蛋白質であり、腎不全・透析患者における過剰なリン・カルシウム負荷に対して、コロイド粒子(fetuin-A-containing calciprotein particle: CPP)を形成することでリン酸カルシウム結晶の成長を抑制し、石灰化に対して防衛的に作用する。近年、この形成された CPP が血管を含む様々な臓器障害を誘導する「CPP 病原体説」が提唱されており、CPP の生理的、病理的意義が注目されている。特に過剰な石灰化ストレス下で primary CPP (直径 50-100nm)より形成されるサイズの大きな secondary CPP (直径 100-200nm)は細胞毒性が強く、CKD・透析患者の血中での上昇も観察されている。

2. 研究の目的

本研究では、CPP が主に脂肪細胞に作用し、代謝・栄養異常を惹起し、PEW (protein-energy wasting)、延いては MIA 症候群に関与するという仮説を検証することを目的とした。さらに、肝細胞に対する影響も検討した。

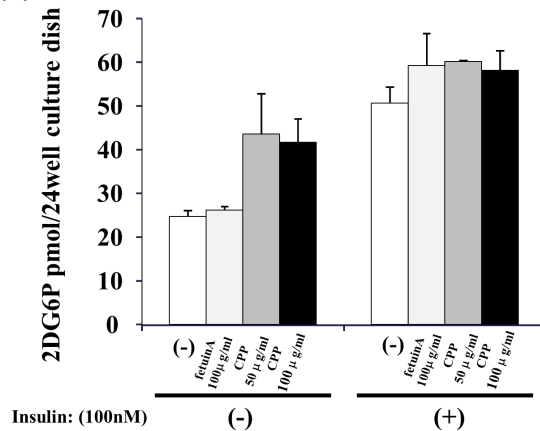
3. 研究の方法

既報通り *in vitro* で CPP の合成を試み、電顕にてこの CPP が secondary CPP に該当することを確認した。この合成 CPP の (1) 3T3-L1 脂肪細胞と (2) HepG2 肝細胞に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 3T3-L1 脂肪細胞

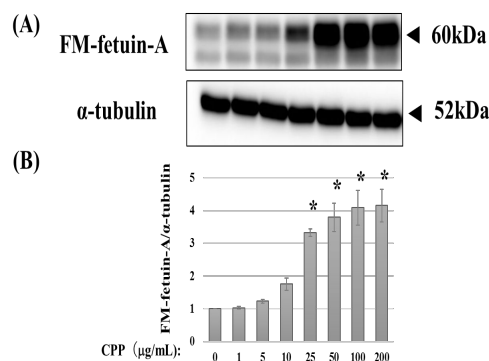
図 1



分化誘導 7 日目の 3T3-L1 脂肪細胞に 100μg の fetuin-A、50、100μg の CPP を添加し、100nM のインスリンで刺激した。Fetuin-A も CPP もインスリン依存性の糖取り込みには、影響しなかった。しかし、CPP は fetuin-A と比較し、インスリン非依存性の糖取り込みを促進した。CPP による異化亢進、すなわち、CPP のインスリンによる糖取り込み抑制作用を予測していたが、その作用は明らかではなかった。

(2) HepG2 肝細胞

図 2-1

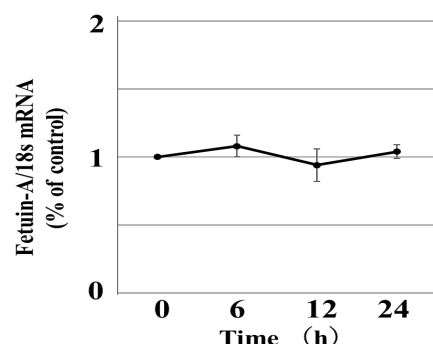


Fetuin-A は、2 つの N 結合、3 つの O 結合糖鎖付加の修飾を受けるため、アミノ酸配列から推測される分子量よりも大きく、Western blot では約 60kDa のバンドとして認められる (fully modified fetuin-A: FM-Fet)。

HepG2 細胞に合成 CPP を添加し 24 時間後 FM-Fet の蛋白発現の検討を行ったところ、CPP の用量依存的に増加が認められた。

同様に、100μg の CPP を添加したところ、経時的に FM-Fet の発現は増加し、添加後、12 時間より有意な上昇を認めた。(data not shown)

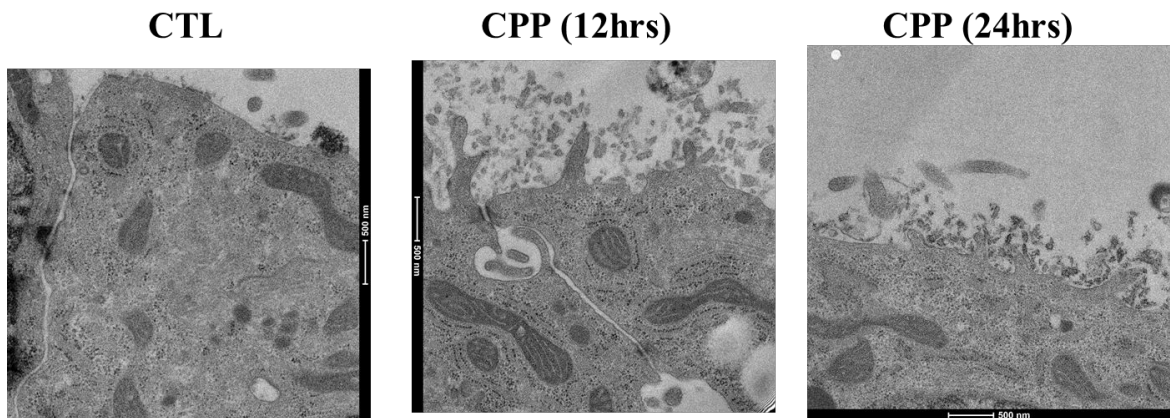
図 2-2



次いで、この CPP の FM-Fet の発現増加が fetuin-A の mRNA 上昇によるものか検討を行った。興味深いことに、fetuin-A の mRNA 発現は 100μg の CPP 添加で変化が認められなかった。

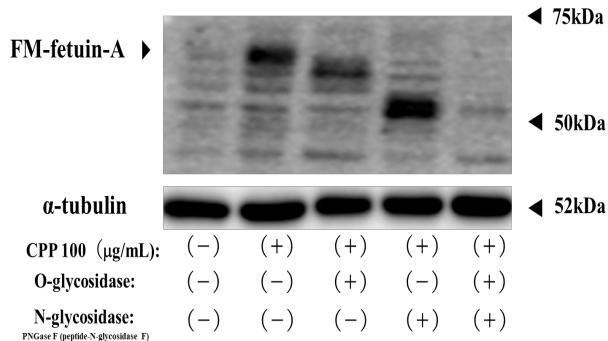
合成 CPP を形成する bovine の fetuin-A が HepG2 肝細胞に取り込まれている可能性も考えられたが、使用したヒト fetuin-A を認識する抗体は、bovine fetuin-A を認識せず、この可能性は否定的であった。(data not shown)

図 2-3



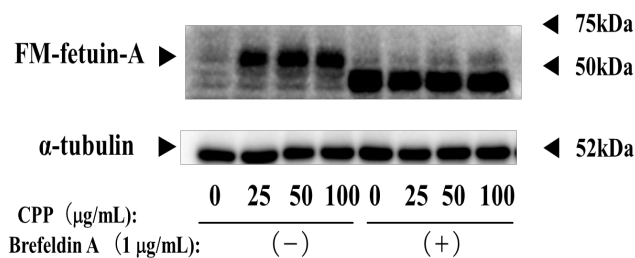
血管平滑筋細胞を用いた既報では、合成 CPP は細胞内に取り込まれ、血管石灰化を促進するという報告があるため、走査型電顕で検討を行った。しかし、HepG2 肝細胞内には、CPP 様の構造物は認められなかった。一方、細胞表面には、secondary CPP と考えられる微細構造物の集積が認められた。以前に fetuin-A が細胞表面に発現する Toll-like receptor (TLR) 4 に作用しインスリン抵抗性を惹起することが報告されている。そこで、TLR4 の阻害剤である TAK242 を使用したが、CPP による FM-Fet 発現には影響せず、TLR4 が CPP の受容体である可能性は低いと考えられた(data not shown)。

図 2-4



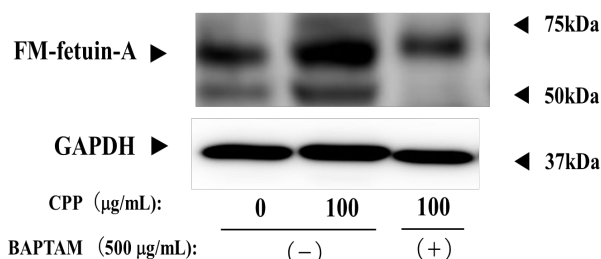
上述の如く、fetuin-A は翻訳後修飾を受けるため、O- および N-glycosidase を使用したところ、CPP により誘導された FM-Fet のバンドは下方にシフトした。すなわち、CPP は fetuin-A の糖鎖付加に対して、促進的に作用することが示唆された。

図 2-5



そこで、小胞体からゴルジ体への輸送を阻害する brefeldin A で前処置したところ、CPP による FM-Fet の発現は低下し、バンドは下方にシフトした。この結果は、CPP が翻訳後修飾（糖鎖付加）を促進することをサポートすると考えられた。

図 2-6



最後に、CPP が細胞内カルシウム濃度依存的に血管石灰化を促進する可能性が報告されているため、細胞内カルシウムをキレートする BAPTAM を使用した。その結果、BAPTAM は CPP により誘導される FM-Fet の発現を抑制した。従って、CPP による翻訳後修飾（糖鎖付加）は、一部、細胞内カルシウム依存的に調節されることが示唆された。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

- 1) Maruo S, Mori K, Motoyama K, et al.: Correlation analysis of monocyte subsets and insulin resistance considering fetuin-A involvement in patients with type 2 diabetes. Clin Trans Med 7:9, 2018 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Uedono H, Mori K, Ochi A, et al.: Effects of fetuin-A-containing calciprotein particle (CPP) on posttranslational modifications of fetuin-A in HepG2 cells. ASN Kidney Week 2018, 2018.10.23-28, San Diego, California, USA
- 2) 上殿英記、森克仁、越智章展、他: Fetuin-A-containing calciprotein particles (CPP)の肝でのfetuin-A 発現調節. 第 63 回日本透析医学会, 2018 年 6 月 29 日 ~ 7 月 1 日, 神戸国際会議場, 兵庫
- 3) 上殿英記、森克仁、越智章展、他: Fetuin-A-containing calciprotein particles (CPP)による肝fetuin-A 発現調整. 第 61 回日本腎臓学会, 2018 年 6 月 8 日 ~ 10 日, 朱鷺メッセ, 新潟
- 4) 丸尾沙織、森克仁、元山宏華、他: 2 型糖尿病における血中単球サブセットとfetuin-A、インスリン抵抗性との関係. 第 61 回日本糖尿病学会, 2018 年 5 月 24 日 ~ 28 日, 東京国際フォーラム, 東京
- 5) 森克仁、元山宏華、瓦林令奈、他: 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性とfetuin-A、血中単球サブセットとの関係. 第 38 回日本肥満学会, 2017 年 10 月 7 日 ~ 8 日, 大阪国際会議場, 大阪
- 6) 森克仁、和田憲嗣、上殿英記、他: 2 型糖尿病透析患者におけるテネリグリプチンの血清fetuin-A 濃度に対する影響. 第 59 回日本糖尿病学会, 2016 年 5 月 18 日 ~ 21 日, 京都国際会館, 京都

[図書] (計 2 件)

- 1) Mori K, Inaba M: Diabetes and Aging-related Complications. In: Yamagishi S eds. Chapter 5: Diabetes and Vascular Calcification: Springer, 59-68, 2017
- 2) 森克仁、稲葉雅章: 糖尿病と循環器病 一歩進んだ糖尿病循環器病学 -Diabetic Cardiology-. 監修: 檜垣實男 編: 綿田裕孝 大石充. 第 5 章糖尿病合併循環器病の病態と治療 11. 透析: 医薬ジャーナル社, 210-216, 2017

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 黒尾 誠
ローマ字氏名: (KURO-O Makoto)
所属研究機関名: 自治医科大学
部局名: 抗加齢医学研究部
職名: 教授
研究者番号: 10716864

研究分担者氏名: 森岡 与明
ローマ字氏名: (MORIOKA Tomoaki)
所属研究機関名: 大阪市立大学大学院医学研究科
職名: 講師
研究者番号: 30382154

研究分担者氏名: 庄司 哲雄
ローマ字氏名: (SHOJI Tetsuo)
所属研究機関名: 大阪市立大学大学院医学研究科
職名: 准教授
研究者番号: 40271192

※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。