

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19531

研究課題名(和文) 血液凝固因子による全身の代謝不全発症機序の解明

研究課題名(英文) The role of coagulation factors in systemic metabolic homeostasis

研究代表者

吉田 陽子 (Yoshida, Yohko)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00586232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満に伴い、褐色脂肪機能が低下し全身の代謝障害を引き起こすこと、また血液凝固第Xa因子(FXa)が増加することが知られている。食餌誘導性肥満モデルマウスを作製したところ、褐色脂肪機能の低下と糖代謝異常が生じたが、その際に褐色脂肪においてFXaが増加し、その受容体であるPAR1も増加した。FXa-PAR1シグナルは褐色脂肪細胞のミトコンドリア内の活性酸素レベルを上昇させることでミトコンドリア機能を低下させ、褐色脂肪不全を引き起こした。FXa阻害薬やPAR1欠損マウスではこれらの形質が改善したことから、FXa-PAR1シグナルが糖尿病に対する新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that metabolic stress causes brown adipose tissue (BAT) dysfunction and that coagulation factor Xa (FXa) is increased in obesity. Imposing a high fat diet (HFD) on C57BL/6Ncr mice led to a marked increase in FXa and PAR1 in BAT. Administration of FXa inhibitor ameliorated the whitening of BAT, improved thermogenic response and glucose intolerance upon dietary obesity. In differentiated brown adipocytes, FXa markedly increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and reduced mitochondrial membrane potential. The inhibition of PAR1 ameliorated FXa-induced mitochondrial ROS production and reduction in membrane potential. These results suggest the previously unknown role of coagulation systems in BAT in promoting the dysfunction of this organ leading to systemic metabolic disorders. The maintenance of BAT homeostasis through the suppression of FXa-PAR1 signaling would become a new therapeutic target for obesity and diabetes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥満 糖尿病 褐色脂肪 血液凝固因子

1. 研究開始当初の背景

(1)肥満や糖尿病により健康寿命の短縮や全死亡率が上昇するため、これらの病態を解明することは極めて重要である。これまで申請者らは、肥満や糖尿病、心不全時に白色内臓脂肪が老化することで全身のインスリン抵抗性が生じ、これらの老化疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた (*Cell Metab* 2013, 2012, *J Clin Invest* 2010, *Nat Med* 2009)。褐色脂肪組織はかつて主に乳幼児に存在する熱産生器官として認識されてきたが、今日では、成人にも存在し全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた。加齢や肥満により褐色脂肪の機能が低下する分子機序は不明であったが、我々は最近、褐色脂肪組織内の微小血管ネットワークが組織の恒常性維持に必要不可欠であり、肥満時には低酸素を介したシグナルによりミトコンドリア数が減少することで褐色脂肪組織の「白色化」と機能不全が進行し、全身の糖代謝異常が生じることを明らかにした (*J Clin Invest* 2014)。我々の予備実験により、褐色脂肪組織は活発な内分泌代謝臓器であり、機能不全に陥ることで全身の代謝的恒常性が負に制御される可能性が強く示唆されていたがその詳細は明らかではなかった。

(2)血液凝固第 Xa 因子(FXa)はトロンビン産生を促進し、凝固反応を制御する主要な分子である。FXa は肥満に伴い上昇することが以前より報告されていたが、肥満や糖尿病の病態における意義は殆どわかっていなかった。我々の予備実験により、肥満時の褐色脂肪組織では FXa- Proteinase-activated receptor-1(PAR-1)シグナルが増強することがわかったが、その機序や意義については不明であった。

2. 研究の目的

(1)血液凝固第 Xa 因子(FXa)により、肥満に伴う全身の代謝不全が増悪する機序を解明する。

(2)全身の代謝を制御する臓器である褐色脂肪組織に特に注目し、FXa-Proteinase-activated receptor-1(PAR-1)シグナルにより、褐色脂肪細胞不全が生じる分子機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)これまでの予備実験により、食餌誘導性肥満モデルマウスでは、FXa が褐色脂肪不全を介して全身の代謝不全を惹起する可能性が示唆される。そこで、本肥満モデルマウスに FXa 阻害薬を投与し、全身の糖代謝不全や熱産生能の低下が改善するか検証する。

(2) 予備実験の結果、FXa-PAR1 シグナルにより褐色脂肪細胞のミトコンドリア機能不全が生じている可能性が示唆されているため、PAR1 ノックアウトマウスに肥満モデルを sa 作製し表現型を解析する。また FXa の産生を

促進する Tissue Factor を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を褐色脂肪組織に投与することで FXa を過剰発現したマウスを作製し、褐色脂肪不全を介して全身の代謝異常が惹起されるか解析する。

(3) 肥満マウスの褐色脂肪組織で、Tissue Factor の活性化により FXa のレベルが上昇しているか検証する。また、褐色脂肪組織や培養褐色脂肪細胞を用いてマイクロアレイ解析やメタボローム解析、プロテオミクス解析を行い、その他必要なあらゆる分子細胞生物学的手法を用いて、肥満ストレスにより褐色脂肪組織の FXa や PAR1 レベルが上昇する分子機序を検証する。

4. 研究成果

(1)野生型マウスに高脂肪食(HFD: High Fat Diet)を与え、食餌誘導性肥満モデルを作製すると、糖代謝異常が生じるとともに、褐色脂肪の白色化と機能不全が生じて熱産生能が低下することがわかった。その際に褐色脂肪では、FXa の受容体である PAR1 の発現が増加していたことから、肥満ストレスにより褐色脂肪組織の FXa-PAR1 シグナルが増強していると考えられた。

(2)野生型マウスに対して、HFD に FXa 阻害薬を混餌投与した肥満モデルを作製すると、FXa 阻害薬により褐色脂肪組織の白色化が抑制され、さらに熱産生能の低下や糖代謝異常も改善し、全身のエネルギー消費量が増加していることがわかった。このことから、肥満ストレス下では FXa-PAR1 シグナルの増強を介して、褐色脂肪不全が生じていることがわかった。

(3)CRISPR-Cas9 システムを用いて全身 PAR1 ノックアウトマウスを作製し、これに HFD を与えて肥満モデルを作製したところ、PAR1 の抑制により、褐色脂肪不全や糖代謝異常が改善することがわかった。反対に、アデノ随伴ウイルスを用いて、褐色脂肪組織において FXa の発現を促進する Tissue Factor や PAR1 を過剰発現させると、熱産生能や耐糖能は悪化することがわかった。

(4)FXa-PAR1 シグナルが褐色脂肪不全を惹起する機序を検証するため、培養褐色脂肪細胞に FXa を添加したところ、褐色脂肪細胞内のミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇し、ミトコンドリア機能が低下した。FXa に加えて PAR1 antagonist を投与するとミトコンドリアの活性酸素は減少した。同様に、PAR1 agonist を添加した際にもミトコンドリアの活性酸素が増加したことから、FXa-PAR1 シグナルはミトコンドリアの活性酸素を増加させることで褐色脂肪機能を低下させると考えられた。

以上の結果から、肥満時には FXa-PAR1 シグ

ナルが増強し、これがミトコンドリア活性酸素レベルを上昇させてミトコンドリア機能を低下させることで褐色脂肪機能が低下して全身の代謝不全を引き起こすことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

Hayashi Y, Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Ikegami R, Katsuumi G, Kayamori H, Jiao S, Minamino T.

The Pathological role of a coagulation factor in promoting brown adipose tissue dysfunction.

19th International Vascular Biology Meeting 2016. 2016/10/30-11/3, Boston, U.S.A. (ポスター発表)

林由香, 清水逸平, 吉田陽子, 須田将吉, 池上龍太郎, 勝海悟郎, 萱森裕美, 焦爽, 南野徹.

Coagulation FactorXa Inhibits Brown Adipose Tissue Function and Induces Systemic Metabolic Dysfunction in Obesity.

第 80 回日本循環器学会総会・学術集会, 2016/3/18-20, 仙台. (ポスター発表)

林由香, 清水逸平, 吉田陽子, 焦爽, 池上龍太郎, 須田将吉, 萱森裕美, 勝海悟郎, 南野徹.

肥満に伴う褐色脂肪組織の白色化における血液凝固第 Xa 因子の意義.

日本抗加齢医学会総会, 2016/6/11-12, 横浜. (ポスター発表)

林由香, 清水逸平, 吉田陽子, 焦爽, 池上龍太郎, 須田将吉, 萱森裕美, 勝海悟郎, 南野徹.

肥満に伴う褐色脂肪組織の白色化における血液凝固第 Xa 因子の意義.

脳心血管抗加齢研究会 2016, 2016/12/17, 東京. (ポスター発表)

Hayashi Y, Shimizu I, Yoshida Y, Ikegami R, Katsuumi G, Suda M, Minamino T.

The Pathological role of coagulation factors in promoting brown adipose tissue dysfunction and systemic metabolic disorder in obesity.

European Society of Cardiology Congress 2017. 2017/8/27, Barcelona, Spain. (ポスター発表)

Hayashi Y, Shimizu I, Yoshida Y, Ikegami R, Katsuumi G, Suda M, Minamino T.

Coagulation factors induce brown adipose tissue dysfunction and systemic metabolic dysfunction in obesity.

American Heart Association Scientific

Sessions 2017. 2017/11/11-15, Anaheim, U.S.A. (ポスター発表)

Hayashi Y, Shimizu I, Yoshida Y, Ikegami R, Katsuumi G, Suda M, Minamino T.

Factor Xa inhibits brown adipose tissue function and induces systemic metabolic dysfunction in obesity.

第 81 回日本循環器学会総会・学術集会, 2017/3/17, 金沢. (ポスター発表)

林由香, 清水逸平, 吉田陽子, 池上龍太郎, 勝海悟郎, 須田将吉, 萱森裕美, 南野徹.

Coagulation factorXa induces brown adipose tissue dysfunction and systemic metabolic disorder in obesity.

第 17 回日本抗加齢医学会総会, 2017/6/2-4, 東京. (ポスター発表)

林由香, 清水逸平, 吉田陽子, 池上龍太郎, 須田将吉, 萱森裕美, 勝海悟郎, 南野徹.

褐色脂肪組織の白色化における血液凝固第 Xa 因子の意義.

第 25 回日本血管生物医学会学術集会, 2017/12/8-10, 大阪. (ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.niigata-u.ac.jp/car/research_agin_gcontrol.html

<http://www.mol-aging.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 陽子 (YOSHIDA, Yohko)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号: 00586232

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

南野 徹 (MINAMINO, Tohru)

清水 逸平 (SHIMIZU, Ipei)

林 由香 (HAYASHI, Yuka)