

平成30年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19541

研究課題名(和文) 生理活性因子AGFの抗肥満作用機序解明と寿命延長作用の検討

研究課題名(英文) The anti-obese and life-extending effect of AGF

研究代表者

杉崎 太一 (Sugizaki, Taichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：00468480

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)：直接的に十分な効果と安全性を備えた抗肥満薬は存在しない。しかしながら、肥満は世界的に増加傾向にあり、その進展に伴って心血管疾患や2型糖尿病などの肥満関連疾患の増加、それらによる健康寿命の短縮、医療経済的負担の増加など、様々な問題が生じる。我々はメタボリックシンドロームなどとの関連が示唆される新たな生理活性因子であるアンジオポエチン様タンパクファミリーの一つであるAGF (angiotensin-related growth factor)に着目し、これまでAGFの抗肥満作用を明らかにしてきた。本研究ではAGFの抗肥満作用の機序と、寿命延長に対する効果について検討した。

研究成果の概要(英文)：There is no anti-obesity medicine with directly sufficient efficacy and safety guaranteed. Obesity, however, is on an increasing trend globally, and along with the progress thereof, various problems such as an increase in obesity-related diseases, including cardiovascular diseases and type 2 diabetes, shortened healthy life span and an increase in medical economic burden, etc. We have focused on AGF (angiotensin-related growth factor) which is one of the angiotensin-like protein family and a new physiologically active factor suggested to be associated with metabolic syndrome, etc. and have clarified some anti-obesity action of AGF. In this project, we investigated the mechanism of anti-obesity action of AGF and its effect on extending life span.

研究分野：代謝学

キーワード：肥満 Angpt16/AGF エネルギー代謝 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

肥満・過体重は現在、日本を含めた世界の公衆衛生において最も重要な事案の一つとなっている。肥満と過体重の合計は、2013年には全世界で21億人にまで増加し、成人における肥満・過体重の割合も約40%まで増加している(Ng M, et al., Lancet 2014)。日本においても厚生労働省の調査によると、20歳以上の肥満者の割合は、20~30%となっている。肥満の進行により、心血管疾患、がん、2型糖尿病、変形性関節症、慢性腎臓病などの発症率が上昇し、2010年に肥満・過体重が原因で死亡した人の数は世界で340万人と推定されており、また、重度の肥満者は、正常体重者に比較し、8~10年早期に死亡するという報告もある。医療経済の面では、肥満者は正常体重者よりも年間医療費が25%高く、多くの国で肥満は総医療費の1~3%を占めるといわれ、特に米国では多く5~10%と報告されている。このように、健康の増進、QOL(生活の質)の向上、医療費負担の軽減のために、肥満・過体重の克服は急務であるといえる。

一方、我が国の2013年の平均寿命は男性80.21歳、女性86.61歳と更に延長し、女性では世界一となっている。しかしながら、日常生活が制限されることなく生活できる期間である「健康寿命」については、2010年の調査では男性70.42歳、女性73.62歳であり、いわゆる「不健康な期間」が男性9.13年、女性12.68年であった。平均寿命は今後さらに伸びると予想されており、それに伴って、健康寿命との差である「不健康な期間」も延長することが考えられる。この期間の拡大は、医療費や介護・福祉などの費用も増加することを意味している。平均寿命の延伸以上に健康寿命を延ばすことができれば、QOLの改善とともに、社会保障給付費の低減につながる。

近年、我々のグループはメタボリックシンドロームなどに関係する新たな生理活性因子であるアンジオポエチン様タンパクファミリーのAngptl2、Anpgt14、AGF/Angptl6の機能解析を行っている。特に、AGFは末梢のエネルギー代謝に重要な骨格筋や脂肪組織での酸化やエネルギー消費亢進および中枢性の摂食抑制作用による抗肥満作用があり、またアンジオポエチンと同様に血管内皮細胞に作用して血管新生および血流促進作用を有しており、肥満に伴うメタボリックシンドロームを改善しながら、血管にも作用することで心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の予防にもなると考えられる。分子構造的特徴としてAGFは、N端のcoiled-coilドメインと、受容体と結合し生理活性を導くと考えられるC端のfibrinogen-likeドメインを有し、通常coiled-coilドメインを介して3量体以上の多量体で存在する。現在のところ、AGF受容体は不明であり、またその抗肥満作用についても詳細なメカニズムは不明のままである。また、未発表のデータであ

るが、AGF過剰発現マウスにおいて、寿命への関与が示唆されているFoxO1および、抗酸化酵素であるMn-SODなどを含めたFoxO1標的遺伝子群の発現増加を認め、FoxO1の活性化が示唆されており、AGFの発現増加が寿命延長につながる可能性がある。

したがって、AGFは肥満を発端とするメタボリックシンドロームなどの疾患群を予防、治療しながら、動脈硬化性疾患の発症を予防し、これらの疾病に伴うQOLの低下を回避するとともに、直接的な作用としての寿命延長効果も期待され、健康寿命の延伸への寄与が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、生理活性因子AGFによるエネルギー代謝制御の分子機構解明と寿命の延伸効果の実証および機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

全身性AGF過剰発現マウス(CAG-AGF)および、肥満モデルのレプチン受容体変異マウスであるdb/dbマウスにAGFを全身性に過剰発現させたマウス(CAG-AGF;db/db)を作成し、AGFの代謝制御の機序と生存期間への効果を検討する。

4. 研究成果

抗肥満効果の検証として、AGF過剰発現マウスのエネルギー消費量を間接熱量測定法にて評価し、野生型マウスに比してエネルギー消費量は増加を認め、X線CT検査においては、内臓および皮下脂肪の減少を認め、以前の報告と同様に、体重減少の要因と考えられた。

高脂肪食負荷試験(3か月)においても、AGF過剰発現マウスでは、血糖値の減少、体重増加の抑制を認め、各臓器重量においても有意に低下を認めた(図1)。

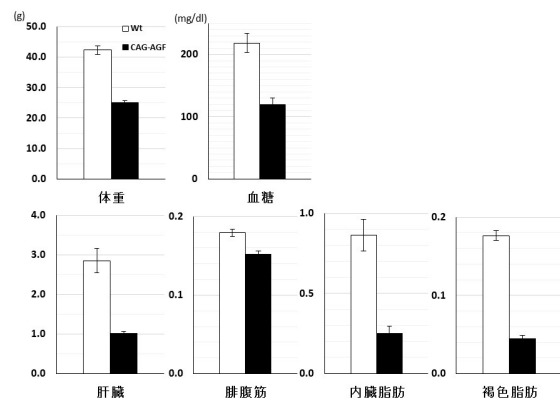


図1. 高脂肪食負荷(3か月)後の体重、血糖、臓器重量の比較

全身性AGF過剰マウスにおける、このような全身性のエネルギー消費の増加の原因について、各臓器での検討を行った。AGF過剰マウスは体温も高いことから、主な熱産生臓器である褐色脂肪組織の解析を行ったが、この臓器において熱産生を担う脱共益タンパク質(UCP1)の発現は、mRNAレベル、タンパクレ

ベル共に野生型に比較して高くなく、組織像では野生型よりも AGF 過剰発現マウスの方が細胞内の脂肪滴の蓄積が多くみられた。一方、白色脂肪組織では、過剰発現マウスにおいて内臓脂肪・皮下脂肪共に脂肪滴の減少を認め、間質が目立つ組織像であり、白色脂肪組織の褐色化を考え、UCP1 や CIDEA などの褐色脂肪遺伝子、TBX1 や CD137 などのベージュ細胞遺伝子や PRDM1 などの mRNA 量を比較したが、野生型に比し、増加を認めるものは無かった。最大の代謝臓器である骨格筋において、脱共益タンパク質は主に UCP3 が発現している。この発現について、mRNA レベルでは、マウスの世代や高脂肪食負荷、寒冷暴露などの条件によって、野生型に比べ AGF 過剰発現マウスで同等かもしくは有意に高値となるが、タンパクレベルでは mRNA 量が同等の時でも増加を認めていた。その機序として、UCP3 のタンパク質分解系への AGF の作用を考え、シクロヘキシミド追跡試験を行った。細胞内のタンパク質分解系には大きく分けて、ユビキチンプロテアソーム系とオートファージリソソーム系の 2 つがあり、UCP1 は主に後者、UCP3 は前者により分解され、また UCP3 の半減期は数時間と報告されている (Moazed B, et al., Can J Physiol Pharmacol 2002, Azzu V, et al., Biochem J 2010)。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを使用することによりタンパク質分解系によるタンパク量の減少を観察することができる。AGF を過剰発現させた分化筋芽細胞株 C2C12 にシクロヘキシミドを添加し、その後細胞を回収してタンパク抽出を行い、ウェスタンブロットにて、UCP3 タンパクの発現量を比較すると、対照群の細胞ではシクロヘキシミド添加によりタンパク量が半減したが、AGF 過剰発現細胞では減少を認めなかった (図 2)。AGF に

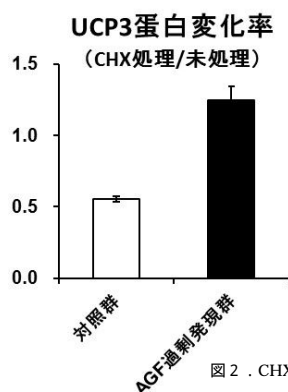


図 2 . CHX 処理による UCP3 蛋白量の変化

よる UCP3 タンパク分解の抑制が示唆され、それによる骨格筋における UCP3 タンパクの増加が、エネルギー消費増加や体温上昇に寄与している可能性がある。

さらに、肥満 2 型糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体変異マウス (*db/db* マウス) に AGF を全身性に過剰発現させたマウス (CAG-AGF;*db/db*) を作成し、高度肥満モデルにおける AGF の作用を検証した。摂餌量は同等だが、*db/db* マウスと比較し、

CAG-AGF;*db/db* マウスは体重の減少を認め、インスリン感受性も改善した。X 線 CT 検査においても、内臓および皮下脂肪の減少を認めた (図 3)。

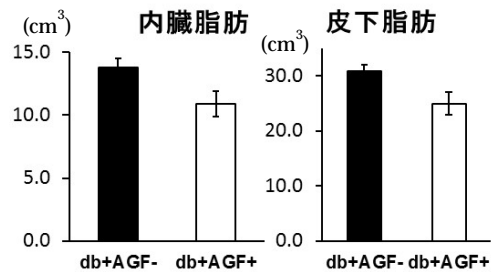


図 3 . X 線 CT における脂肪量測定

間接熱量測定においては、野生型マウスに比し *db/db* マウスはエネルギー消費量が減少したが、CAG-AGF;*db/db* マウスでは *db/db* マウスよりも有意に高値を示し、高度な肥満に対しても AGF の抗肥満作用は有効であることが確認された (図 4)。

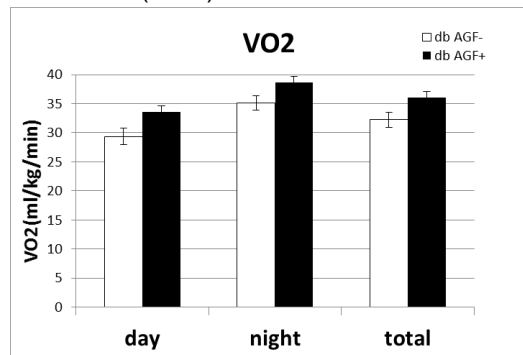


図 4 . 間接熱量測定による酸素消費量測定

db/db マウスは通常寿命が 10 か月程度とされるが、高脂肪食負荷によりさらに短縮される (Okada-Iwabu M, et al., Nature 2013, Zhang HM, et al., PLoS One 2012)。このモデルを用いて、AGF による寿命延長効果を検討した。CAG-AGF;*db/db* マウスと、同腹の *db/db* マウスに共に高脂肪食負荷をかけ、生存期間を調べた。図 5 に示す様に、CAG-AGF;*db/db* マウスで生存期間の延長を認め、AGF の全身的な過剰発現が生存期間に正の効果を及ぼすと考えられる。また、全身の酸化ストレスマーカーを測定したところ、CAG-AGF;*db/db* マウスで有意な減少を認めており、生存率改善との関与が推測されるが、その要因として、

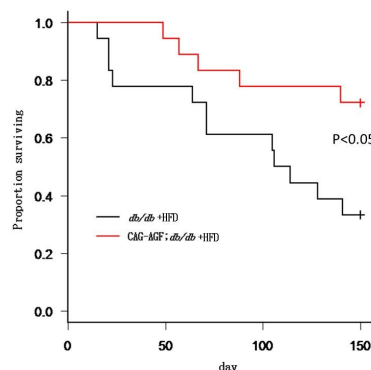


図 5 . *db/db* への高脂肪食負荷による生存曲線

各臓器で増加していた抗酸化酵素である Mn-SOD などの寄与が示唆される。

今後、UCP3 のタンパク分解について、AGF の関与がゴビキチン化の阻害なのか、26S プロテアソームの機能制御なのかなど、その作用点についての検討を行いつつ、これまでの細胞実験によって、AGF 増加による酸素消費の増加が UCP などによるプロトンリークと同時に、ATP 産生に關与する部分もある事が分かっているので、酸化的リン酸化の効率やミトコンドリアの各複合体の変化などについて詳細に解析を行っていく必要がある。また、現在、全身的ノックアウトおよび、臓器特異的 AGF 欠損マウスを作製しており、合わせて解析していく。

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 4 件)

1. Morinaga Jun、Zhao Jiabin、Endo Motoyoshi、Kadomatsu Tsuyoshi、Miyata Keishi、Sugizaki Taichi、Okadome Yusuke、Tian Zhe、Horiguchi Haruki、Miyashita Kazuya、Maruyama Nobuhiro、Mukoyama Masashi、Oike Yuichi. Association of circulating ANGPTL 3, 4, and 8 levels with medical status in a population undergoing routine medical checkups: A cross-sectional study. PLoS One. 査読有,13, e0193731, 2018.

DOI: 10.1371/journal.pone.0193731

2. Zhao Jiabin、Tian Zhe、Kadomatsu Tsuyoshi、Xie Peiyu、Miyata Keishi、Sugizaki Taichi、Endo Motoyoshi、Zhu Shunshun、Fan Haoqiu、Horiguchi Haruki、Morinaga Jun、Terada Kazutoyo、Yoshizawa Tatsuya、Yamagata Kazuya、Oike Yuichi. Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice. J Biol Chem. 査読有, 293, 1596-1609, 2018.

DOI: 10.1074/jbc.M117.814996

3. Tanoue H.、Morinaga J.、Yoshizawa T.、Yugami M.、Itoh H.、Nakamura T.、Uehara Y.、Masuda T.、Odagiri H.、Sugizaki T.、Kadomatsu T.、Miyata K.、Endo M.、Terada K.、Ochi H.、Takeda S.、Yamagata K.、Fukuda T.、Mizuta H.、Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chondrogenic differentiation during bone growth as a cartilage matrix factor. Osteoarthritis Cartilage. 査読有, 26, 108-117, 2018.

DOI: 10.1016/j.joca.2017.10.011

4. Sugizaki Taichi、Zhu Shunshun、Guo Ge、Matsumoto Akiko、Zhao Jiabin、Endo Motoyoshi、Horiguchi Haruki、Morinaga Jun、Tian Zhe、Kadomatsu Tsuyoshi、

Miyata Keishi、Itoh Hiroshi、Oike Yuichi. Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. NPJ Aging Mech Dis. 査読有, 3,12, 2017. DOI: 10.1038/s41514-017-0012-0

[学会発表](計 0 件)

[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.kumamoto-u-molgene.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
杉崎 太一 (SUGIZAKI, Taichi)
熊本大学・生命科学研究部・学術研究員
研究者番号：00468480

(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 ()