

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591178

研究課題名（和文） 脂肪および血管内皮細胞由来新規内分泌因子に関する研究

研究課題名（英文） Physiological and pathological functions of Favine

研究代表者

福原 淳範 (FUKUHARA ATSUNORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00437328

研究成果の概要（和文）：

本研究では、私共が同定した血管脂肪から分泌され、肥満、糖尿病状態において発現が変化する新規因子 Favine の機能解析を行った。Favine の肝臓特異的なトランスジェニックマウスを作成し、マイクロアレイによって解析したところ、大動脈において血管収縮に関連する因子の発現量が増加した。さらに、Favine 蛋白を血管平滑筋細胞に添加すると血管収縮に関連する因子の発現量が増加した。以上のことから Favine は代謝状態によって発現量が変わり、血管収縮を制御する因子であることが示唆された。

また、Favine 抗体を作成し、血中濃度測定系を確立した。Favine は血中に存在し、代謝状態によって血中濃度が変わることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We searched for novel gene with signal sequences that are specifically expressed in murine aorta, designated one gene as Favine. Favine was expressed abundantly in the aorta and adipose tissues, and its mRNA levels were higher in adipose tissues of obese db/db mice than control mice.

In this study, we generated transgenic mouse overexpressing Favine in liver, and microarray analysis were performed in liver, adipose tissue, and aorta. In aorta of transgenic mouse, expression levels of genes associating muscle contraction were significantly increased. Moreover, in human aortic smooth muscle cells, expression levels of these genes were also induced by addition of recombinant Favine conditioned media. These results indicated that Favine should regulate aortic smooth muscle contraction. To measure Favine levels in human serum, we generated antibody and ELISA assay system. Favine protein was detected in human serum, and its level changed depending on feeding conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生活習慣病、ホルモン、Favine

1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームや動脈硬化症と関連することがよく知られている。脂肪細胞からはTNF- α やIL-6, PAI-1, アディポネクチンなどのサイトカインが分泌され、肥満に伴う糖尿病や高血圧の発症に関与している。私共は血管および脂肪組織から分泌される因子としてFavineを同定した。Favineは遺伝性肥満および食事性肥満マウスの脂肪組織で発現量が増加する因子である。培養細胞ではインスリンやピオグリタゾンで発現量が増加し、TNF-alphaなどの炎症性サイトカインによって発現量が低下する。以上のことから、肥満をメタボリックシンドロームの代謝病態、血管病変の発症、形成に関与する可能性がある。

2. 研究の目的

Favineの生理的機能および肥満病態における機能を明らかにすること、ヒトにおける血中濃度測定系を確立し、メタボリックシンドローム病態における意義を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

SAPプロモータを用いて肝臓特異的にFavineを高発現するマウスをC57バックグラウンドにて作成し、肝臓特異的にFavineが高発現するマウスを2ライン得た。肥満マウスとして12週間高ショ糖、高脂肪食負荷したマウスを用いた。精巣周囲脂肪組織と肝臓、下降大血管（大動脈+大静脈）を用いた。

(2) 細胞実験

一過性過剰発現実験にはCOS7細胞を用いた。血管系細胞としてHUVEC、HASMCを用いた。

(3) 蛋白発現

Favine全長のcDNAのC末端にHAタグまたはHisタグを付加した発現ベクターを作成し、COS7細胞にトランスフェクションし、Favineを高濃度に含む培養上清を用いた。

4. 研究成果

(1) リコンビナントタンパクの精製

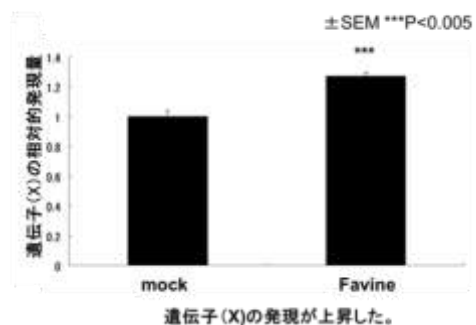
COS細胞およびHEK293細胞にプラスミドを用いて一過性にFavineを発現させた培養上清を作成した。ヒト血管平滑筋細胞(HASMC)に添加することで、血管収縮に関連した因子の遺伝子発現が有意に上昇した。

(2) Favineを発現する脂肪細胞の解析

レトロウイルスを用いてFavineを発現する3T3-L1脂肪細胞を作成した。parental細胞と比較して、分化誘導を行った。細胞増殖には有意な差はなかった。脂肪細胞への分化効率、脂肪蓄積量にも有意な差はなかった。分化後の発現遺伝子の解析を行ったが、脂肪分化に関連する遺伝子、アディポサイトカイン発現量には有意な差を認めなかった。以上のことから脂肪細胞の分化への影響はないと考えた。

次に、Favineを発現するアデノウイルスを用いて血管平滑筋細胞への過剰発現を行った。Favineの過剰発現によって血管収縮に関連する遺伝子の発現量が増加した。上昇を認められた因子はFavineを含む培養上清を血管平滑筋細胞へ添加することによっても発現量が増加した。

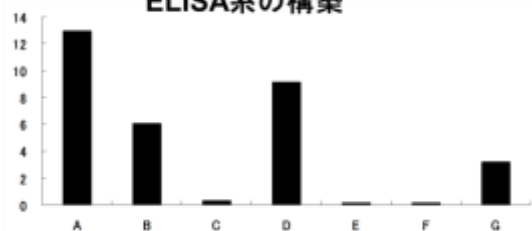
ヒト血管平滑筋培養細胞へのconditioned medium添加実験



(3) 抗体作成とELISAの構築

Favine配列を元にペプチド抗体を作製し、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を作成し、ヒトFavineおよびマウスFavine蛋白を認識する抗体を複数得た。これらの抗体を組み合わせて、ヒトFavineを定量するためのサンドイッチELISA系を作成した。健康人の血清を用いて測定をおこなったところ、測定感度以下の低値を示すものが多かった。測定感度以下の者と高濃度の者では1000倍も血中濃度が異なっており、個人差の大きい因子であった。

ELISA系の構築



測定感度以上で定量可能な症例について、食

事負荷、ブドウ糖不可、脂肪負荷を行った。その結果、個人によって反応性は大きく異なった。

ブドウ糖負荷では負荷後の血糖上昇に伴って急速に血中濃度が低下する者がある一方で、血中濃度が不変なもの、わずかに上昇するものがみられた。

30分、60分で急速に血中濃度が低下するものは負荷後の血糖上昇が大きかったことから、糖代謝に関連して血中濃度が変化する可能性が示唆された。

脂肪負荷も同様であり、負荷数時間にて大きく低下する例がある一方で変化が小さい例も見られた。

負荷後に血中濃度が低下した者では低下は一過性であり、ブドウ糖負荷との反応性の違いを認めた。

脂肪負荷においても急速に低下したものは脂肪負荷による血中TGの上昇が顕著であり、脂質代謝と関連して血中Favine濃度が変化する可能性が示唆された。

ELISA系の感度が低いいため変化を捉えられていない可能性があるため、ELISAの検出系を改良した。

マウスELISAについては得られた抗体の組み合わせを行い、評価を行った

(4) ヒト血中におけるFavineの存在

ELISAに用いた抗体をビーズに共有結合させた。ELISAで血中Favine濃度が高値の血清を用いて、免疫沈降を行った。回収された蛋白をSDS化し、複数のFavine抗体でプロットを行ったところ、予測分子量にバンドを認めた。ELISAで低値を示した血清ではこのバンドは検出されなかったことから、ヒト血中にFavineが存在することが示された。

(5) トランスジェニックマウスの作成

SAPプロモータ (serum amyloid protein) にて肝臓特異的にFavineを発現するトランスジェニックマウスを作成し、肝臓において高発現する個体を得た。

本マウスの肝臓ではmRNAレベルで 10^3 倍にmRNA発現量が増加しており、Favine抗体にて肝臓に蛋白が発現することを確認した。

本マウスの体重、摂食量は対照マウスと比較して変化なかった。

通常食状態では血糖値、インスリン値、血中アディポネクチン値は対照マウスと比較して有意な差を認めなかった。

ブドウ糖負荷テスト、インスリン負荷テストでも有意な差はなかった。

解剖後の脂肪組織、肝臓、骨格筋の重量にも有意な差はなかった。

次に、12週間の高脂肪高シヨ糖食 (F2HFHSD) 負荷を行った。

負荷中の摂食量、体重増加には有意な差はなかった。

負荷後の血糖値、インスリン値、血中アディポネクチン値は対照マウスと比較して有意な差を認めなかった。ブドウ糖負荷テスト、インスリン負荷テストでも有意な差はなかった。解剖後の脂肪組織、肝臓、骨格筋の重量にも有意な差はなかった。

以上の結果から、Favineは肥満、糖代謝以外の作用を有する可能性を考慮し、高脂肪高シヨ糖食を負荷した対照マウスとトランスジェニックマウスの大動脈、脂肪組織および肝臓を用いたアレイ解析を行い、発現遺伝子の網羅的解析をおこなった。

肝臓、脂肪組織では有意な差を認めた遺伝子群はなかった。

脂肪組織においてはリンパ球や好中球、マクロファージに関連する遺伝子の発現量がわずかに変化したが、脂肪細胞分化や糖代謝脂質代謝に関連する遺伝子の発現量は変化なかった。

大動脈においては、血管収縮に関連する遺伝子の一群の発現量が変化することを見出した。特に筋収縮に関連する遺伝子群の発現量が大きく変化した。

本結果を元に、Favineを高濃度に含む培養上清の添加実験を血管平滑筋細胞を用いて行ったところ、アレイで示された血管収縮関連遺伝子の発現量が変化することを確認した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

(1) 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
血管および脂肪組織由来新規分泌因子 favine の機能解析

小林祥子, 福原淳範, 田口貴史, 大月道夫, 下村伊一郎 ; 2011 年 5 月 19 日, 札幌

(2) 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会
血管および脂肪組織由来新規分泌因子の同定

小林祥子, 福原淳範, 松田守弘, 大月道夫,

下村伊一郎；2010年5月29日，岡山

(3) キーストンシンポジア

Identification of a new secretory factor,
CCDC3/Favine, in adipocytes and
endothelial cells

小林祥子，福原淳範，田口貴史，大月道夫，
下村伊一郎；2010年4月14日，カナダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原淳範 (FUKUHARA ATSUNORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号；00437328

(2) 研究分担者

前田和久 (MAEDA KAZUHISA)

大阪大学・医学系研究科・寄付講座准教授

研究者番号；60397750

(3) 連携研究者