

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893335

研究課題名(和文) 低アディポネクチン血症克服のための新規分泌調節機構の解明-レドックス制御の関与-

研究課題名(英文) Adipocytokine secretion and redox signaling in obesity-related metabolic diseases

研究代表者

松尾 禎之 (MATSUO, Yoshiyuki)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50447926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織から産生されるアディポサイトカインの分泌障害や恒常性の破綻が、肥満に起因する様々な疾患の発症・進展に大きく寄与する。アディポサイトカインの分泌を制御する細胞内マシナリーとして、小胞体における翻訳後修飾機構に着目した。成熟脂肪細胞への分化に伴い、発現が誘導される一連の小胞体内レドックス制御分子を同定した。さらに細胞内への脂肪蓄積や脂質過酸化により、繊維化促進因子であるトロンボスポンジン1 (THBS1)が誘導されることを明らかにした。脂肪組織から産生されるTHBS1は、内臓脂肪型肥満の指標としての特性を有し、肥満に起因する様々な代謝異常のメディエーターとして働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests a causal role played by adipose-derived secretory factors, adipocytokines, in the pathogenesis of obesity-related metabolic diseases. We aimed to determine the potential implications of endoplasmic reticulum (ER)-resident folding catalysts in the regulation of adipocytokine secretion. A series of redox enzymes were up-regulated during adipocyte differentiation, suggesting their involvement in adipocytokine synthesis and maturation in the ER. We also found that excessive fat accumulation and lipid peroxidation could induce the expression of thrombospondin 1 (THBS1), a potential mediator of tissue inflammation associated with obesity. Serum THBS1 levels showed a significant correlation with multiple traits of obesity/diabetes in Japanese subjects, particularly in women. THBS1 may act as a critical circulating factor that couples obesity with metabolic syndrome and diabetes in humans.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質 レドックス 炎症 アディポサイトカイン 小胞体

### 1. 研究開始当初の背景

現代においては、飽食化や運動不足に象徴される生活習慣の悪化に伴い、脂肪の蓄積が引き起こす様々な代謝異常疾患が社会問題化している。近年、脂肪細胞から産生される生理活性物質(アディポサイトカイン)が、メタボリックシンドロームの発症・進展に深く関与することが明らかとなり、従来のエネルギー貯蔵庫としての役割に加えて、内分泌器官としての脂肪組織の機能が注目を集めるようになった。肥満の進展に起因するアディポサイトカインの過剰産生は、組織炎症や線維化を促進し、疾患の増悪に繋がる。一方、脂肪細胞の肥大化に伴い、善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌量が低下することが知られており、低アディポネクチン血症はメタボリックシンドロームの病態基盤として、インスリン抵抗性や動脈硬化等の合併症の進展に大きく寄与すると考えられている。このように、アディポサイトカインの分泌障害・恒常性の破綻が、肥満による代謝制御異常を引き起こす重要な要因の一つとして認知されるようになった。さらに、ある種のアディポサイトカインの体内レベルが、病態の重症度・進展度との相関を示すことも報告され、いわゆるバイオマーカーとしての役割にも注目が集まっている。しかしながら、分泌器官としての脂肪組織の機能に関する研究の歴史は浅く、アディポサイトカインの発現を制御する細胞内因子や、肥満に付随して起こる分泌異常の分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

アディポサイトカインのバイオマーカーとしての有用性や、その臨床応用が期待される反面、肥満に伴うアディポサイトカインの分泌異常に関する細胞生物学的知見は限られており、脂肪細胞における分泌制御機構の解明が強く求められている。そこで本研究では、アディポサイトカインの分泌を司る細胞内小器官として小胞体の機能に着目した。アディポネクチンをはじめとする分泌タンパク質の多くは、小胞体内で様々な翻訳後修飾を受け機能獲得に到るが、中でもシステイン残基の酸化によるジスルフィド(S-S)結合の形成は、タンパク質の活性維持や高次構造の安定化などに重要な役割を果たしている。S-S結合の形成や切断は、タンパク質の酸化/還元(レドックス)反応であり、その過程は酸化還元酵素によって触媒される。アディポネクチンの成熟過程においても、S-S結合を介した複合体形成・多量体化が必要と考えられているが、その制御機構の実態については未解決の問題が多く残されている。本研究ではアディポサイトカインの分泌を制御する細胞内機構として、タンパク質の酸化・還元(レドックス)反応に焦点を当て、タンパク質の翻訳後修飾や品質管理機構の実態解

明を契機として、肥満におけるアディポサイトカインの分泌障害のメカニズムを明らかにする。さらに脂肪蓄積がもたらす細胞の機能障害(脂肪毒性)の成因について、ストレス応答機構や炎症シグナル経路の活性化の観点から解析を試みる。

### 3. 研究の方法

本課題の研究計画立案時においては、様々な代謝異常を改善する作用をもつアディポネクチンのみを解析対象とした。その後の脂肪組織における遺伝子発現解析(内臓および皮下脂肪組織の遺伝子プロファイル比較)や、身体パラメータと血中代謝マーカーの関連解析に基づき、肥満の進展や組織炎症の増悪への関与が示唆されるトロンボスポンジン1(THBS1/TSP-1)を標的分子に加えた。アディポネクチンとTHBS1は、ともにS-S結合を介した多量体を形成することが知られており、こうした高次構造の獲得が生理活性に大きく影響すると考えられている。肥満症において特徴的な発現パターンを示すこれらのアディポサイトカインについて、分泌量を規定する細胞内メカニズムの解明とともに、メタボリックシンドロームや各種合併症のバイオマーカーとしての有効性・臨床的意義の検討を行う。

(1) 培養細胞を用いて、アディポネクチンおよびTHBS1の発現系を構築する。細胞外に分泌されるアディポサイトカインの定量に加え、分泌経路におけるタンパク質の構造変化(多量体化、レドックス状態の変化)について解析を行う。脂肪細胞の分泌経路への関与が予想されるレドックス関連分子について、過剰発現、遺伝子ノックダウンによる分泌経路への影響を明らかにするほか、ジスルフィドを介したアディポサイトカインとの相互作用の有無など、レドックス制御の詳細について検討を行う。

(2) 3T3-L1細胞を分化誘導因子の添加により脂肪細胞へと分化させる。各タイムポイントにおける分化マーカー、およびレドックス関連分子の発現量の変化をreal-time PCR、およびウエスタンブロッティングにより解析し、脂肪細胞の成熟度、アディポサイトカインの分泌量との関連を明らかにする。また遊離脂肪酸を用いた脂肪蓄積モデルを構築し、細胞の生存能、ストレス応答経路への影響について解析を行う。

(3) ヒト脂肪組織におけるTHBS1の遺伝子発現ならびに血中THBS1レベルと肥満との関連性を明らかにする。皮下および内臓脂肪組織におけるTHBS1遺伝子の発現量をreal-time PCRにより定量する。血中のTHBS1レベルはELISA法により測定する。THBS1の発現と肥満パラメータとの関連性、治療介入による発現変動と病態改善効果との相関などについて統計学的解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) ヒトアディポネクチンの発現コンストラクトを構築し、培養細胞への導入および薬剤選択により、アディポネクチンの安定発現株を樹立した。アディポネクチンは、小胞体における成熟過程で分子間が S-S 結合で結ばれた多量体を形成する。還元条件、および非還元条件下で電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングにより単量体と多量体の発現を検出した。その際、それぞれのフォームの識別に適した抗体の選別を行い、細胞内におけるアディポネクチンのフォールディング、およびレドックス状態の検出系を確立した。

(2) 本課題では、脂肪細胞が産生するアディポサイトカインの分泌マシナリーとして、小胞体に局在するタンパク質に着目した。脂肪細胞分化モデルとして頻用されるマウス 3T3-L1 細胞を用いて、分化誘導前後の発現比較により、アディポサイトカインの分泌に関与する候補分子の探索を試みた。小胞体におけるタンパク質の品質管理機構やストレス応答経路に関わる分子を中心に、分化に伴うタンパクレベルの変動を検討したところ、既にアディポネクチンの分泌制御への関与が報告されている Ero1 のほか、チオレドキシンファミリーに属する酸化還元酵素や分子シャペロンの誘導が観察された。成熟脂肪細胞における大幅な発現上昇は、これらの分子がアディポサイトカインの生合成に関与する可能性を示唆しており、アディポネクチンおよび THBS1 の分泌制御機構を解明する上で重要な手がかりとなり得る。これらの候補分子について、発現コンストラクトおよび発現抑制系の構築を行った。現在、候補分子の過剰発現あるいは発現抑制によるアディポサイトカインの多量体化・分泌への影響、両者の相互作用の有無について解析を進めており、成熟脂肪細胞における小胞体内レドックスネットワークの機能解明に繋がることから期待される。

遊離脂肪酸による脂肪毒性評価系において、細胞質における脂肪滴形成に伴い、生存能の低下が認められた。脂肪滴蓄積や脂質の過酸化により、THBS1 や TGF- $\beta$  等の組織炎症・繊維化に関わる因子が誘導されることが明らかとなった。また、遊離脂肪酸の種類によって、脂肪蓄積量や細胞毒性、炎症応答因子の発現プロファイルなどが大きく異なることが示唆された。

(3) 肥満に起因する様々な病態において、脂肪細胞の産生するアディポサイトカインの果たす役割について解析を行った。インスリン抵抗性や組織線維化のメディエーターとして働く THBS1 について、病態形成における制御因子としての機能、また代謝性疾患のバイオマーカーとしての有用性を検討した。ヒト脂肪組織における THBS1 の発現及び血清 THBS1 レベルと肥満との関連性を検討した。外科的に切除されたヒト脂肪組織 16 例 (平均 BMI 22.8) について、THBS1 遺伝子の発現を定量 PCR により検出したところ、内臓

脂肪組織での THBS1 の発現量は、皮下脂肪に比し約 2.5 倍有意に高値であった。内臓脂肪組織における THBS1 の発現量は、BMI と有意な正相関を、HDL コレステロール値とは負の相関を示した。皮下脂肪組織においてはこのような相関は認められず、THBS1 の発現量は内臓肥満度とより密接な関連を示すことが示唆された。

また血中の THBS1 レベルと肥満度との関連解析では、特に閉経前女性 (n=42, 平均 BMI 32.1) において、血中の THBS1 濃度が肥満群で有意に高値を示すことが明らかとなった。一方、閉経後女性 (n=44, 平均 BMI 30.1) や男性 (n=60, 平均 BMI 29.6) では、肥満の程度と THBS1 レベルとの間に明確な関連性は認められなかった。閉経前女性においては、血清 THBS1 値は BMI や内臓脂肪量、腹囲などの肥満に関連する身体パラメータと有意な正の相関を示した。さらに 6 ヶ月間の食事・運動療法による減量治療例において、治療前後の血清 THBS1 値と肥満関連マーカーの変化量について相関解析を行った。閉経前女性では、血清 THBS1 値の変化量は BMI の変化量と有意な正相関を示し、また内臓脂肪量の変化量についても正の相関傾向が認められた。以上より、THBS1 は内臓脂肪組織で発現が高く、その血中レベルは特に若齢女性において肥満関連指標と相関を示したが、その関連性は性別や加齢の影響を受ける可能性が明らかとなった。THBS1 は脂肪蓄積により発現が上昇し、肥満に起因する代謝異常のメディエーターとして働く可能性が示唆された。

## 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 2 件)

Matsuo Y, Tanaka M, Yamakage H, Sasaki Y, Muranaka K, Hata H, Ikai I, Shimatsu A, Inoue M, Chun TH, Satoh-Asahara N. Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome. *Metabolism*.64:1490-1499 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.metabol.2015.07.016

松尾 禎之、浅原 (佐藤) 哲子、小川佳宏. Fatty Acid と心血管疾患 *血管医学* 15:169-177 (2014) 査読無

[http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J25\\_15\\_2\\_73-81.html](http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J25_15_2_73-81.html)

### [学会発表](計 5 件)

松尾 禎之、田中 将志、佐々木 洋介、山陰 一、村中 和哉、猪飼 伊和夫、畑 啓昭、島津 章、井上 真由美、全 泰和、浅原 哲子. 肥満における内臓・皮下脂肪蓄積と線維化関連因子 TSP-1 との関連解析 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 21 日～24 日 東京第一ホテル下関 (山口県)

松尾 禎之、田中 将志、佐々木 洋介、  
山陰 一、村中 和哉、猪飼 伊和夫、畑 啓  
昭、島津 章、井上 真由美、全 泰和、  
浅原 哲子. 肥満における内臓・皮下脂  
肪蓄積と線維化関連因子 TSP-1 との関  
連解析 第 88 回日本内分泌学会学術総  
会 2015 年 4 月 23 日～25 日 ホテルニユ  
ーオータニ東京 (東京都)

Satoh-Asahara N, Matsuo Y, Tanaka M,  
Sasaki Y, Yamakage H, Muranaka K, Ikai I,  
Hata H, Shimatsu A, Inoue M, Chun TH.  
Sexually dimorphic, fat depot-dependent  
expression of a fibrogenic adipokine,  
thrombospondin 1 (THBS1) in human  
obesity. 2015 Keystone Symposia  
Conference, X7:Obesity and the Metabolic  
Syndrome: Mitochondria and Energy  
Expenditure. 2015 年 3 月 22 日～27 日  
Whistler (Canada)

松尾 禎之、田中 将志、佐々木 洋介、  
山陰 一、村中 和哉、猪飼 伊和夫、畑 啓  
昭、島津 章、井上 真由美、全 泰和、  
浅原 哲子. 肥満における内臓・皮下脂  
肪蓄積と線維化関連因子 TSP-1 との関  
連性 第 35 回日本肥満学会 2014 年 10  
月 24 日～25 日 シーガイアコンベンシ  
ョンセンター (宮崎)

Matsuo Y, Tanaka M, Sasaki Y, Yamakage  
H, Muranaka K, Ikai I, Hata H, Shimatsu A,  
Inoue M, Chun TH, Satoh-Asahara N.  
Sexually dimorphic, fat depot-dependent  
expression of a fibrogenic adipokine,  
thrombospondin 1 (THBS1) in human  
obesity. 9th Metabolic Syndrome, Type 2  
Diabetes and Atherosclerosis Congress,  
MSDA2014 2014 年 9 月 12 日～14 日  
Kyoto International Conference Center (京  
都府)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 禎之 (MATSUO, Yoshiyuki)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50447926