

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590090
 研究課題名（和文）
 脂肪細胞の分化・誘導における線溶系因子の機能解明と治療戦略的ストラテジーの確立
 研究課題名（英文）
 Investigation of fibrinolytic system on differentiation of adipocytes and establishment of therapeutic strategy
 研究代表者 松野 浩之（MATSUNO HIROYUKI）
 同志社女子大学・薬学部・教授
 研究者番号：40273148

研究成果の概要：

21 世紀を迎え、我国の食生活や環境は欧米化というよりむしろ新たな独自性をもった日本スタイルを生み出していると考えられる。このような状況下で、本研究は脂肪細胞の分化・誘導に関して新しい観点から線溶系因子の関与ならびに発生的に重要なプロトンポンプの意義について探求した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生化学・血液

キーワード: plasmin, uPAR, adipocyte, migration, proliferation

1. 研究開始当初の背景

21 世紀を迎え、我国の食生活や環境は欧米化というよりむしろ新たな独自性をもった日本スタイルを生み出していると考えられる。世界各国のあらゆる料理が口にできる飽食性に加味して、いわゆるファストフードと呼ばれるものに代表される 24 時間好みの食物が手に入る環境は、摂取栄養素のかたよりや食事の時間的概念が崩壊しルーズになることで、不規則な食生活や持続的な栄養過摂取が国民全体に蔓延している。状況は異なるものの、先進国の中で移民による人口増加を続ける米国は、低所得者層での基礎疾患（高脂血症、糖尿病、高血圧など）がここ数年で明らかに増加し 21 世紀の医療の大きな問題となっている。これらの背景には安価で食せるファストフードなどに頼る生活スタイル

が原因となっていることが指摘されている。近年、我国で取り上げられているメタボリックシンドロームは、その診断基準において世界各国での認識の差はあるものの、最近公表された様々な調査結果と推計は将来において多数の基礎疾患患者を生み出す素因として重要な問題とされている。これらの疾患の分子生物学的な主役として脂肪細胞が挙げられる。内蔵脂肪と皮下脂肪、いずれも脂肪細胞で構成される組織であるものの、最近の研究でこれらの生理・生化学的違いが報告され疾患の原因として特に内蔵脂肪の研究が世界的に進められ病態制御の鍵として注目されている。

2. 研究の目的

細胞は分化増殖する過程で、様々な生理活性

蛋白を必要とする。これらは、細胞自らが遺伝子を介して蛋白合成を行う場合と、既存の細胞に貯蔵されている物質を細胞質から細胞表面へ脱顆粒させ機能する場合、さらに細胞表面に接着因子等でアンカーされている物質は、細胞表面から切り離されることで生理活性を発現する場合が考えられる。このような反応において線溶系の中心物質であるプラスミンはアンカー部分の蛋白を溶解（細胞線溶）させることで一連の反応に深く関与している。今回、計画する2年間の間に、申請者は今までの経験を生かして線溶系のそれぞれの因子の欠損マウスを使用して脂肪細胞の状態を生理学的、生化学的、分子生物学的に探求する。実際、予備実験の段階でプラスミノゲンの欠損マウスでは内蔵脂肪が付きにくいことがCTを使った時間経過観察で認められている。これらをふまえて、以下の点を探求する。

1) plasminogen, α 2-antiplasmin (α 2-plasmin inhibitor), tPA, uPA, uPAR, PAI-1 の遺伝子欠損マウスについてCT スキャンによる内蔵脂肪・皮下脂肪を週ごとに経過観察し、脂肪組織の増加と線溶系各因子の関係について探求する。これによって生体での関与が示唆される。

2) それぞれの遺伝子欠損マウスについて内蔵脂肪、皮下脂肪を explant 法によって細胞培養し脂肪細胞におけるサイトカイン（アジポサイトカイン）について分泌、合成機能を探求し、分子細胞レベルでの線溶系因子の役割を見いだす。

3) それぞれの線溶系遺伝子欠損マウスから骨髄を採取、培養して脂肪細胞への分化誘導実験を行う。これによって、後天的に獲得される脂肪細胞の特徴と線溶系因子の関係が探求される。

4) GFP 恒常発現マウス（遺伝子改変動物）を用いて、このマウスより骨髄細胞を採取、培養して線溶系各因子欠損マウスの脂肪細胞との共同培養を行う。これによって分化・誘導される細胞と宿主細胞との役割が推察され、この過程での線溶系因子の機能が探求される。

5) 遺伝子レベルでの検討を DNA Arey を用いて行い、線溶系因子の欠損が脂肪細胞の分化・誘導に遺伝子レベルで影響するのかを分子生物学的に探求する。

3. 研究の方法

1) 線溶系遺伝子欠損マウスの脂肪の変化・生化学的検査（松野 浩之）

線溶系遺伝子欠損マウスをおおきく3グループに分けて解析する。第一グループとしてプラスミンを中心に、プラスミノゲン欠損マウス (Plg^{-/-})、 α 2 アンチプラスミン欠損マウス (α 2AP^{-/-}) の2種、第二グループと

してプラスミンを活性化するプラスミノゲンアクチベター (PA) として tPA の欠損マウス (tPA^{-/-})、uPA 欠損マウス (uPA^{-/-})、tPA/uPA 両欠損マウス (tPA/uPA^{-/-}) その阻害因子欠損マウスとして PAI-1^{-/-}、第三グループとして uPA 受容体欠損マウス (uPAR^{-/-}) である。これらのマウスの中で Plg^{-/-}マウスは成長に障害があり体重増加が野生型マウスに比べて悪いことが報告されている。今回、予備実験としておこなった4〜16週間のCT スキャン（アロカ社製、小動物専用機器）による内蔵脂肪と皮下脂肪の測定実験では、内蔵脂肪がほとんど見られない現象が確認された。これらについて再現性を求める実験と共に、生化学的に逆の作用をもつ α 2AP^{-/-}マウスについて同様な実験を進める。

2) 線溶系遺伝子欠損マウスの脂肪細胞による培養実験（松野 浩之）

マウス脂肪細胞は皮下脂肪ならびに精巣部の脂肪細胞（内蔵脂肪）より単離し初代培養系として実験を行う。実験は、主に脂肪細胞の生化学的性質を同定して2種の細胞の生理学的活性の違いを探求する。具体的には、細胞量を一定にした上で各種アゴニスト刺激によるサイトカインの分泌量をEIA法によって測定する。当初のアゴニストとして脂肪の分化・誘導に関与し肥満が原因と成る疾患にも関与するインスリンを予定している。測定する分泌因子にはアジポサイトカインとしてアジポネクチン、レプチン、PAI-1、ビスファチンなどを、細胞増殖・肥大・遊走に関与するVEGF, TGF- β , TNF- α などを予定している。これらはプラスミンによって細胞表面にアンカーされていた成分が活性化されることが予想される。さらに、分泌されるサイトカインについて細胞内情報伝達機構をウエスタンブロット法によりMAPキナーゼ系を中心に解析する。これらの実験によって分泌の有無だけではなく細胞内の反応経路や時間経過（リン酸化）が観察される。さらに、分泌物質のメッセージレベルの活性化をPCR法で分析し蛋白合成レベル（遺伝子）まで誘導が生じているのかを探求する。

3) 線溶系遺伝子欠損マウスの骨髄細胞による培養実験（黒木 綾・松野 浩之）

マウス骨髄細胞は、大腿骨および腓骨から採取される。脂肪細胞は、一種の終末細胞であり、細胞形態の肥大化が脂肪組織の増加を生み出す。一方、脂肪細胞の増殖は未分化間葉系細胞から分化・誘導されることによって行われると推察される。骨髄細胞を培養しインスリンを用いて脂肪細胞への分化誘導を行う。これらの過程において線溶系因子がどのように関与するかについて各遺伝子欠損マ

ウスから採取した骨髄細胞を用いて探求する。さらに、変化が見られた細胞群について脂肪細胞と骨髄細胞（未分化細胞）の共同培養を行い観察する。内蔵脂肪由来脂肪細胞と皮下脂肪由来の脂肪細胞において骨髄細胞への影響の違いが観察される可能性があり、かつこれらの過程における線溶系因子の関与がこれらの実験から明らかにされる。これらの実験系においてはGFPの恒常発現マウス由来の骨髄細胞を用いる。これによって骨髄細胞由来の脂肪細胞を培養系の中で簡単に見分けることが可能である。必要に応じてGFP恒常発現マウスと線溶系遺伝子欠損マウスとの交配を行う。また、今回特にこの実験において注目する因子にuPARがある。uPARはuPA受容体として認識されているものの、細胞表面に接着している部分とプラスミンなどによって切り離され血液中に浮遊する部分とがあり、特に血漿中に可溶成分として存在する部分はアゴニスト的な生理活性を有するとも言われている。細胞遊走において重要な役割（バイトロネクチン、ファイブロネクチン結合サイト）を担っていることが知られており細胞間隙の溶解にも深く関与している。脂肪細胞の肥大化や分化に機能している可能性が今回の実験において探求される。

4) 線溶系遺伝子欠損マウスの脂肪組織に置ける組織学的検討 (和田 戈虹 松野 浩之)

骨髄細胞からの分化・誘導実験において、脂肪細胞がin vitroで構成される際に関与する線溶系因子についての結果を元にして生体での脂肪細胞の肥大化や分化・誘導の組織学的変化を観察する。GFP恒常発現マウスより、骨髄細胞を採取、培養した後生体組織内に注入する。組織学的変化を免疫染色法などによって脂肪組織、結合組織、繊維、その他の細胞などを観察する。

4. 研究成果

1) 内蔵脂肪と皮下脂肪の生体での変化について線溶系因子の欠損による影響が観察された。連続的なCT撮影によってuPAR欠損マウスで皮下脂肪と内蔵脂肪の変化が異なることが確認された。

2) 培養細胞の実験から、分泌細胞として内蔵脂肪由来の脂肪細胞と皮下脂肪由来の脂肪細胞の違いが情報伝達機構も含めて明確にされた。さらに、今回は発展的探求として脂肪細胞を支持する組織としての線維芽細胞に注目した結果uPARの欠損において線維化に明らかに相違があることが確認された。また、alpha2-APにおいてTGF- β を介した線維化に情報伝達経路を介して寄与してい

ることが明確にされた。

3) プロトンポンプが細胞形成時に寄与する機構を解明できた。プロトンポンプは、従来、胃壁細胞において酸分泌機構を司る細胞膜機能である。近年、発生学的に重要な役割を担っていることが報告され、今回の研究に寄って細胞レベルでエネルギーに依存したプロトンポンプの機構が解明された。

4) ウロキナーゼ型プラスミン活性化因子受容体 (uPAR)

uPARは、細胞膜非貫通型の受容体として多様な細胞に発現している。脂肪細胞においても発現が確認されているが、これらの遺伝子を欠損したマウスにおいて内蔵脂肪の減弱化が確認された。本研究中、これらの分子生物学的機構の解明は達成されなかったが、同様に繊維芽細胞を用いた実験系で、uPARの欠損によって細胞の分化・誘導が抑制される事が明確になった。これらの分子機構としてあらたにメタロプロテアーゼを介する系が確認された。これらの機能の解明は今後細胞外組織の融解と脂肪細胞の肥大化・増殖のメカニズム解明に役立つものと考えられる。

5) α 2アンチプラスミン (α 2-AP)

α 2-APは、プラスミンの生体内特異的阻害因子である。今回の研究でこれらが自ら生理活性作用を示し細胞の分化・増殖に寄与することが解明された。これらの機構は、TGF- β を介するシグナリングを修飾することで、明確に細胞内情報伝達機構に影響を与えている。これらの結果は、 α 2-APが独立した因子として生体内で機能する可能性を示したもので今後の発展が期待される。

これらの結果は、いずれも現在大きな問題とされる疾患群であるメタボリックシンドロームにおける内蔵脂肪の増加や基礎代謝疾患（糖尿病、高脂血症、高血圧）に関与する肥満について新しい見地からのアプローチで病態が解明され、治療的ストラテジーを新たに構築する貴重な研究成果になったものと考えられる。

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 7 件)

1:Kanno Y, Kuroki A, Minamida M, Kaneiwa A, Okada K, Tomogane K, Takeuchi K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H. The absence of uPAR attenuates insulin-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Thromb Res.* 2008;123(2):336-41.

2:Kanno Y, Kaneiwa A, Minamida M, Kanno M, Tomogane K, Takeuchi K, Okada K, Ueshima S,

Matsuo O, Matsuno H. The absence of uPAR is associated with the progression of dermal fibrosis. J Invest Dermatol. 2008 Dec;128(12):2792-7.

3:Hayashi K, Sun-Wada GH, Wada Y, Nakanishi-Matsui M, Futai M. Defective assembly of a hybrid vacuolar H(+)-ATPase containing the mouse testis-specific E1 isoform and yeast subunits. Biochim Biophys Acta. 2008 Oct;1777(10):1370-7.

4: Tabata H, Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. Vacuolar-type H(+)-ATPase with the $\alpha 3$ isoform is the proton pump on premature melanosomes. Cell Tissue Res. 2008 Jun;332(3):447-60.

5: Wada Y, Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N. Vacuolar-type proton ATPase as regulator of membrane dynamics in multicellular organisms. J Bioenerg Biomembr. 2008 Feb;40(1):53-7.

6: Kanno Y, Kuroki A, Okada K, Tomogane K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H. Alpha2-antiplasmin is involved in the production of transforming growth factor beta1 and fibrosis. J Thromb Haemost. 2007 Nov;5(11):2266-73.

7: Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, Futai M, Wada Y. Differential expression of a subunit isoforms of the vacuolar-type proton pump ATPase in mouse endocrine tissues. Cell Tissue Res. 2007 Aug;329(2):239-48.

[学会発表] (計 4 件)

1 : 第 30 回日本血栓止血学会 (志摩) 2007. 11. 15 : 線維化における線維素溶解因子 AP2 の役割

2 : 第 30 回分子生物学会 (横浜) 2007. 12. 11. : uPAR 欠損における血管平滑筋細胞の遊走と増殖の効果

3 : 第 31 回日本血栓止血学会 (大阪) 2008. 11. 20. 脂肪組織形成における uPAR の新たな役割の探求

4 : 第 31 回日本血栓止血学会 (大阪) 2008. 11. 20 : Fibrinolytic factors play pivotal roles on the development of metabolic diseases. (シンポジウム)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 浩之 (MATSUNO HIROYUKI)

同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号 : 40273148

(2) 研究分担者

和田 戈虹 (WADA KAHON)

同志社女子大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 00314427

(3) 連携研究者

該当なし