

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22793

研究課題名(和文)新たなゲノム編集技術VIKING法を用いた脂肪細胞由来の新規昇圧因子の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel adipocyte-derived factor that elevates blood pressure using VIKING method

研究代表者

菅原 明 (Sugawara, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90270834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリック症候群においては、脂肪細胞由来の未知因子が副腎に直接作用しアルドステロン産生を促進し、肥満高血圧症の原因となっている可能性が考えられる。そこで我々は、マウス3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化させ、その培養上清をイオン交換クロマトグラフィーに供した後にLC-MS/MSを用いた質量分析を行い、複数の候補因子を得た。現在shRNAを用いたノックダウンにて機能解析中である。本研究の遂行により、これまで不明であった肥満高血圧の発症機序の分子的な理解に結びつくとともに、新たな創薬標的の提案や診断に用いる新規バイオマーカー開発へと発展することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、脂肪細胞由来の未知の液性昇圧因子の本態が初めて明らかとなるとともに新規創薬のターゲットが明確化されることから、本邦で2,700万人と推定されるメタボリック症候群・予備軍患者中に数多く存在する肥満高血圧患者の診断・治療に大きな福音をもたらす事が可能となる。特に、肥満高血圧患者において顕著な治療抵抗性高血圧に対しては、新規創薬・治療法の開発に向けて大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Hypertension is a frequently observed complication among obese patients with metabolic syndrome. In this study, we aim to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression and aldosterone secretion that may induce obesity-related hypertension. We first differentiated mouse fibroblast 3T3-L1 cells into adipocytes, and collected their supernatants. The supernatants were incubated with human adrenocortical carcinoma H295R cells, and their CYP11B2 mRNA expression was measured by quantitative PCR with reverse transcription. The supernatants were then purified by anion-exchange chromatography and were further fractionated by LC-MS/MS. We then identified several candidate proteins and are investigating their function by shRNA.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：アルドステロン合成酵素 脂肪細胞 メタボリック症候群 治療抵抗性高血圧 新規創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群は内臓脂肪型肥満を基盤として高血圧・高血糖・脂質異常が招来される疾患である。本邦における同症候群の患者数は予備軍を含めて約 2,700 万人と推定されており、患者は健常人に比べて心血管病の死亡リスクが約 2 倍に増加することが報告されている。特に高血圧発症率に関しては、肥満者は非肥満者に比べ約 3 倍であることに加え、肥満高血圧患者中には 3 種類以上の降圧薬を服用しても目標血圧に達しない治療抵抗性高血圧が多く含まれる。したがって、その治療法の開発は本邦のみならず世界全体の健康寿命の延伸にとって非常に重要であると考えられる。高血圧の発症は主としてレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の破綻が原因であるとされる。アルドステロンは強い昇圧因子であり、アンジオテンシン が副腎に働きかけ、アルドステロン産生を促進させることにより高血圧が惹起される。これに加えて、脂肪細胞由来の未知因子が副腎に直接作用しアルドステロン産生を促進することも報告されている。しかしながら、この肥満と高血圧を結びつける脂肪細胞由来液性因子は未だ同定されておらず、肥満高血圧の詳細な分子機序も不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、生化学的手法とゲノム編集技術を組み合わせた新たなアプローチによりこの脂肪細胞由来昇圧因子を同定し、肥満高血圧の発症メカニズムを解明することを目的とする。

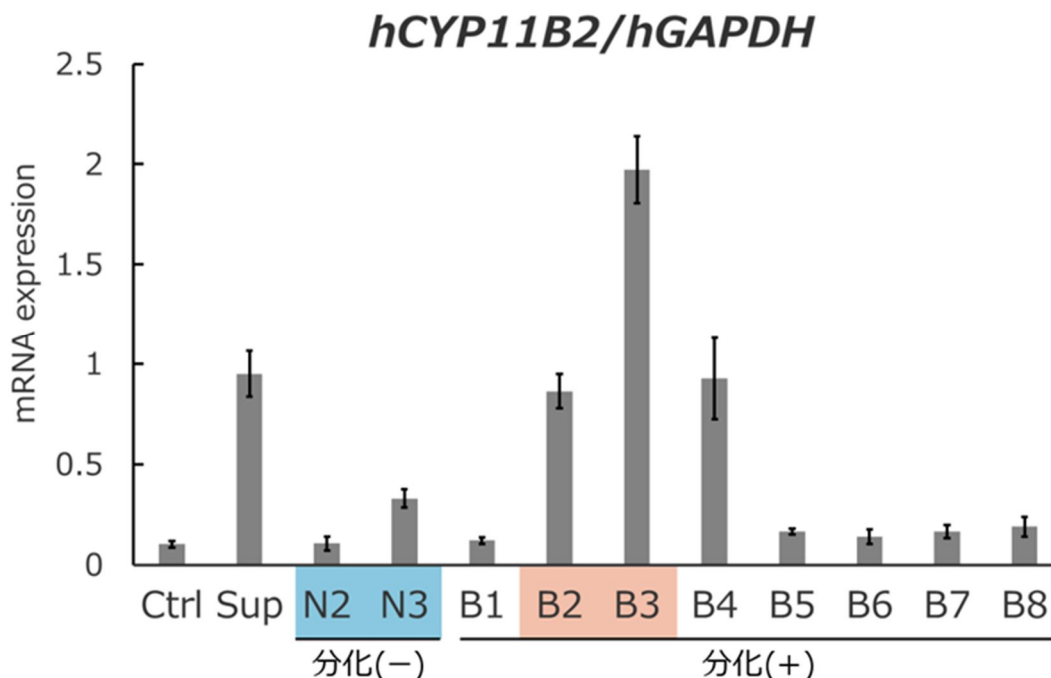
3. 研究の方法

研究は大きく下記の 2 方向で進める。

- 1) 生化学的アプローチ：マウス 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させ、その培養上清をイオン交換クロマトグラフィーに供し生化学的に分画する。アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 誘導活性を評価することで活性画分を取得する。取得された画分を LC-MS/MS を用いた質量分析を行い含まれるタンパク質群を網羅的に同定する。これらの中から分泌シグナル配列を有するタンパク質を抽出し昇圧因子候補群とする。
- 2) ゲノム編集を用いたアプローチ：新たに開発されたゲノム編集技術である VIKING 法 (Versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing) を用いて、取得した候補因子群のそれぞれの遺伝子をノックアウトしたノックアウト細胞ライブラリーを作製する。このノックアウト細胞ライブラリーのそれぞれの細胞の培養上清の活性を評価することで昇圧責任因子を特定する。

4. 研究成果

まず、マウス 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させ、その培養上清の硫酸沈殿を施行した後に 60%画分の透析を行った。透析後の画分を陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、グラディエント溶出・限外濾過を施行した。得られた画分をヒト副腎由来 H295R 細胞に添加し、CYP11B2 mRNA 発現を誘導しうる画分 (B2、B3) をピックアップした。分化脂肪細胞の培養上清画分 B2、B3 と対照の未分化脂肪細胞の培養上清画分 N2、N3 を採集し (下図) それぞれ LC-MS/MS に供し、発現の差異の検討から得られた因子の中から、我々は複数の



候補因子を同定した。現在各因子のノックダウンを shRNA を用いて行い、その機能解析を行っている。本研究の遂行により、これまで不明であった肥満高血圧の発症機序の分子的理解に結びつくとともに、新たな創薬標的の提案や診断に用いる新規バイオマーカー開発へと発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada H, Noro E, Suzuki S, Sakamoto J, Sato I, Parvin R, Yokoyama A, Sugawara A	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Effects of Adipocyte-derived Factors on the Adrenal Cortex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Mol Pharmacol..	6. 最初と最後の頁 2-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874467212666191015161334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shimada H, Sato I, Sakamoto J, Yokoyama A, Sugawara A
2. 発表標題 An approach to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会 日韓内分泌学会特別口演セッション（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakamoto J, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A
2. 発表標題 An approach to identify the undetermined adipocyte-derived factor(s) that stimulate aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression
3. 学会等名 ISARSH2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田洋樹、佐藤郁子、坂本 純、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 脂肪細胞由来の未知のアルドステロン合成酵素（CYP11B2）発現誘導因子の探索
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本 純、島田洋樹、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 未知の脂肪細胞由来因子による副腎CYP11B2発現誘導機序の解明
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本 純、島田洋樹、高橋 馨、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 未知の脂肪細胞由来因子による副腎アルドステロン合成酵素（CYP11B2）発現亢進機序の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 馨、島田洋樹、佐藤郁子、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 未知の脂肪細胞由来因子による副腎CYP11B2発現誘導機序の解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	横山 敦 (Atsushi Yokoyama) (20572332)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------