

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293218

研究課題名(和文) Vaspinとその相互作用分子から展開するメタボリック症候群関連創薬

研究課題名(英文) Vaspin and its interacting molecules as therapeutic targets for metabolic syndrome

研究代表者

和田 淳 (Wada, Jun)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30294408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：Vaspinは内臓脂肪組織から発見したserine protease inhibitor (serpin)ファミリーに属する新規アディポカインであり、メタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性、脂肪肝、脂質代謝異常、動脈硬化を改善する代償因子であるVaspinの受容体であるGRP78/DNAJC1 (DnaJ homolog, subfamily C, member 1)複合体のうちDNAJC1 (DnaJ homolog, subfamily C, member 1)のコンディショナルノックアウトマウスを作出した。DNAJC1はメタボリックシンドロームにおける創薬ターゲットと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified vaspin (visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) as a novel adipokine. Vaspin inhibits insulin resistance, fatty liver, dyslipidemia and atherosclerosis in metabolic syndrome. Vaspin inhibits kallikrein 7 belonging to serine protease and increases glucagon-like peptide-1. We generated DNAJC1 (DnaJ homolog, subfamily C, member 1) conditional knockout mice and we demonstrated that they are therapeutic targets for metabolic syndrome.

研究分野：内科学、糖尿病学、腎臓病学、肥満症、メタボリックシンドローム

キーワード：メタボリックシンドローム アディポカイン セリンプロテアーゼ 小胞体ストレス 肥満症

1. 研究開始当初の背景

Vaspin は内臓脂肪組織から発見した serine protease inhibitor (serpin)ファミリーに属する新規アディポカインであり、現在までの機能解析の結果から vaspin はメタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性、脂肪肝、脂質代謝異常、動脈硬化を改善する代償因子であると報告してきた。また vaspin 受容体として小胞体ストレスによって膜表面に表出してくる Glucose-regulated protein 78 (GRP78; BiP)を同定し、vaspin はリガンドとして作用して肝臓への Akt シグナルを促進したり、血管内皮細胞のアポトーシスを抑制したりすることを報告した。

2. 研究の目的

Vaspin の受容体である GRP78 とその細胞膜アンカー蛋白である DNAJC1 (DnaJ homolog, subfamily C, member 1)に着目してメタボリックシンドロームにおける意義と創薬のターゲットとしての重要性を検討した。

3. 研究の方法

(1)12週齢の C57BL6J 雄マウスの臓器を採取し、ウエスタンブロットにより、*Dnajc1* の発現の有無、発現程度について比較した。

(2)培養肝細胞(H4-II-E-C3 細胞)を用いて、小胞体ストレス・インスリン刺激・パルミチン刺激による *Dnajc1* の発現の変化を検討した。

(3)メタボリックシンドロームにおける *Dnajc1* の機能を明らかにするために、臓器特異的 *Dnajc1* ノックアウトマウスの作成を行った。Exon1 を loxP 配列で挟む conditional ノックアウトマウスのコンストラクションを作製した。

4. 研究成果

(1)12週齢の C57BL6J 雄マウスの臓器を採取し、ウエスタンブロットで検討したところ、膵臓で最も発現量が多く、その他肺・心臓・胸腺・肝臓・脾臓・胃・筋肉での発現を認めた。さらには血中にも *Dnajc1* 蛋白が分泌されていることを明らかにした。

(2)*Dnajc1* は GRP78 と結合することが知られており、GRP78 は小胞体ストレス関連分子であることから、*Dnajc1* も小胞体ストレス応答に関与する可能性が考えられた。培養肝細胞(H4-II-E-C3 細胞)に小胞体ストレス誘導物質である tunicamycin を添加すると、*Dnajc1* の発現も増加した。また、高糖濃度刺激、インスリン刺激や、パルミチン酸刺激によっても、*Dnajc1* の発現亢進が認められた。

(3)メタボリックシンドロームにおける *Dnajc1* の機能を明らかにするために、臓器特異的 *Dnajc1* ノックアウトマウスの作成を行った。Exon1 を loxP 配列で挟む conditional ノックアウトマウスのコンストラクトを作製した。HK3i ES 細胞にインジェク

ションを行い、96 個の ES コロニーをスクリーニングし、11 クローンがポジティブクローンであった。さらにサザン解析により、相同組換えが認められた 3 クローンから DNAJC1 の Exon1 を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子改変マウス (FLOX マウス) を作製した。

肝臓特異的な *Dnajc1* 機能解析を行うため、肝臓特異的プロモーターである Albumin promoter-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、肝臓特異的 *Dnajc1* マウスを作製した。

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 11 件)

1. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS ONE* 2014 Jun 24;9(6):e100777. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0100777.
2. Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism*. 2015 Apr;64(4):489-97. 査読有
doi: 10.1016/j.metabol.2014.12.003.
3. Wang Y, Katayama A, Terami T, Han X, Nunoue T, Zhang D, Teshigawara S, Eguchi J, Nakatsuka A, Murakami K, Ogawa D, Furuta Y, Makino H, Wada J. Translocase of inner mitochondrial membrane 44 alters the mitochondrial fusion and fission dynamics and protects from type 2 diabetes. *Metabolism*. 2015 Jun;64(6):677-88. 査読有
doi: 10.1016/j.metabol.2015.02.004.
4. Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Kanzaki M, Nunoue T, Hida K, Wada Nozomu, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Yamamoto K, Kiyonari H, Makino H, Wada J. Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2015 Nov 19;5:16920. 査読有
doi: 10.1038/srep16920.
5. Wada J, Makino H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Jan;12(1):13-26. 査読有

- doi: 10.1038/nrneph.2015.175.
6. Nakatsuka A, Matsuyama M, Yamaguchi S, Katayama A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Ogawa D, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Watanabe E, Wada J. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2016 Feb 17;6:21721. 査読有
doi: 10.1038/srep21721.
 7. Murakami K, Eguchi J, Hida K, Nakatsuka A, Katayama A, Sakurai M, Choshi H, Furutani M, Ogawa D, Takei K, Otsuka F, Wada J. Antiobesity action of ACAM by modulating the dynamics of cell adhesion and actin polymerization in adipocytes. *Diabetes*. 2016 May;65(5):1255-67. 査読有
doi: 10.2337/db15-1304.
 8. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nat Commun*. 2016 Sep 28;7:13016. 査読有
doi: 10.1038/ncomms13016.
 9. Takeuchi H, Okuyama M, Uchida HA, Kakio Y, Umebayashi R, Okuyama Y, Fujii Y, Ozawa S, Yoshida M, Oshima Y, Sano S, Wada J. Chronic Kidney Disease Is Positively and Diabetes Mellitus Is Negatively Associated with Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS One*. 2016 Oct 20;11(10):e0164015. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0164015.
 10. Wada N, Takaki A, Ikeda F, Yasunaka T, Onji M, Nouse K, Nakatsuka A, Wada J, Koike K, Miyahara K, Shiraha H, Yamamoto K, Okada H. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2017 Jan;11(1):115-124. 査読有
doi: 10.1007/s12072-016-9773-y.
 11. Hatanaka T, Ogawa D, Tachibana H, Eguchi J, Inoue T, Yamada H, Takei K, Makino H, Wada J. Inhibition of SGLT2 alleviates diabetic nephropathy by suppressing high glucose-induced oxidative stress in type 1 diabetic mice. *Pharmacol Res Perspect*. 2016 May 30;4(4):e00239. 査読有
doi: 10.1002/prp2.239.

〔学会発表〕(計4件)

1. 中司敦子、山口哲志、柴田祐助、勅使川原早苗、江口潤、和田淳 糖尿病腎症における vaspin の意義 第 59 回日本糖尿病学会 平成 28 年 5 月 19 日 (京都)
2. Jun Wada. 'Identification of an adipokine, vaspin, and its role in metabolic syndrome and diabetic nephropathy.' Symposium 'DM nephropathy: Risk, Mechanism, Management and Outcome. 11th IDF-WPR Congress 2016 and 8th AASD Scientific Meeting. Taipei, Taiwan, Oct 29, 2016.
3. 中司敦子、山口哲志、柴田祐助、勅使川原早苗、江口潤、和田淳 Vaspin の肥満症における腎障害抑制機序の解明 第 37 回日本肥満学会 平成 28 年 10 月 7 日 (東京)
4. Atsuko Nakatsuka, Satoshi Yamaguchi, Jun Eguchi, Jun Wada. A protective role of vaspin against proximal tubular cell injuries in diabetes mellitus. Keystone Symposia Diabetes. Jan 22-26, 2017, Keystone, Colorado, USA

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 淳 (WADA, Jun)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
腎・免疫・内分泌代謝内科学・教授

研究者番号：30294408

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者

中司敦子 (NAKATSUKA, Atsuko)

岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・

助教

研究者番号：00625949