

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461364

研究課題名(和文) Apop遺伝子制御によるメタボリックシンドローム抑制療法の創出

研究課題名(英文) Prevention of Metabolic syndrome by Apop gene regulation

研究代表者

安田 修 (Yasuda, Osamu)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授

研究者番号：00372615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Apop遺伝子はマウス動脈硬化プラークに発現している遺伝子としてクローニングされた。細胞内のミトコンドリアに局在するタンパク質をコードしている。機能は不明であったが、我々の研究の結果よりミトコンドリアの機能調節に関係していると考えられるに至った。Apop遺伝子を欠損したマウスにおいては血中コレステロール低下や内臓脂肪の減少等、代謝の改善が認められ、本研究によってApop遺伝子はメタボリックシンドロームに発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Apop gene was originally cloned as a gene expressed in the mouse atherosclerotic plaques. Apop gene encodes a protein localized in the mitochondria of cells. The function of Apop was unclear, however, our research revealed that Apop is implicated in the regulation of mitochondrial function. Apop gene-deficient mouse showed lowered cholesterol level and reduced visceral fat tissue, suggesting the improved metabolism of fat. This study clarified that Apop gene plays an important role in the development of metabolic syndrome.

研究分野：血管生物学

キーワード：ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は脂質異常症により動脈硬化を発症するモデルマウス (ApoE 欠損マウス) の動脈硬化巣から複数の遺伝子をクローニングした。そのなかのひとつは VIII 型コラーゲンであることを報告し、その動脈硬化発症における重要性は国際的にも認識され多くの成果が報告されている (Circ Res 104,609,2009; Am J Pathol 182,2241,2013)。他のひとつは機能不明の遺伝子であり機能性ドメインも存在しないことから機能推定は困難であったが、培養細胞に遺伝子を導入した実験結果からミトコンドリアに局在するタンパク質であり、しかもアポトーシス (細胞の自殺) 誘導機能をもつことを明らかにした (J Biol Chem 281, 23899, 2006; BBRC 377, 1097, 2008)。そこで申請者はこの遺伝子を Apoptogenic Protein (Apop) 遺伝子と名付けて発表した。また酸化ストレス誘導による老化促進因子であることも判明した。申請者らのその後の研究により、アポトーシス誘導は発現ベクターを用いて Apop を過剰発現させた結果であり、生理的な濃度での Apop が持つ本来の機能は脂肪酸代謝制御であることが考えられている。

我々は Apop 遺伝子を欠損したノックアウトマウス (ApopKO) を作製し表現系解析を行っているが、ApopKO マウスにおいては血清中の中性脂肪ならびに LDL コレステロールの有意な低下が認められ、脂肪酸代謝の亢進と合致する結果であった。これらの結果から Apop の阻害は脂質代謝異常症を改善し、かつメタボリックシンドロームの治療に有効であると考えられる。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームは心血管系疾患の発症に密接に関わっている。本研究においては申請者が独自にクローニングした新規遺伝子 (Apoptogenic Protein: Apop) の発現がメタボリックシンドローム発症に関与していることを明確にすることを目的とする。申請者らの研究によって Apop はミトコンドリアの脂肪酸代謝を調節する機能を有していることが考えられている。脂肪酸代謝は我が国の死因の常に上位をしめる冠動脈疾患、脳梗塞の危険因子となる脂質異常症ならびにメタボリックシンドロームの発症に密接に関連している。我が国にとって最重要課題のひとつである脂質異常症、メタボリックシンドロームを克服することを本研究の全体構想のなかでの目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリア機能解析

ApopKO マウスではミトコンドリア含有量が多いヒラメ筋 (赤筋) において野生型マウスよりもミトコンドリア量が増加していることが既にわかっている。他の組織においてもミトコンドリア定量を行うほか、ミトコン

ドリア機能の定量的な評価を行う。また代表的なミトコンドリア機能評価であるミトコンドリア含有酵素 (チトクロム c 酸化酵素等) の定量も行う。

### (2) 組織解析

ApopKO マウスの骨格筋、脂肪組織、心臓、腎臓等の組織で免疫染色を含む詳細な組織解析を行う。特にミトコンドリア含有量の多い組織については電子顕微鏡による解析も合わせて行い、ミトコンドリアの形態を観察する。ApopKO マウスの体重減少と脂肪組織の縮小の関連について解析する。

### (3) 寿命測定

Apop 欠損マウスではミトコンドリアの活性化、脂肪酸代謝亢進によるメタボリックシンドローム改善により、寿命が延長することが予想される。既に寿命測定のため、雄および雌の Apop 欠損マウス、ヘテロ欠損マウス、ならびに野生型マウスの各群約 20 匹の飼育を開始している。飼育開始後 2~3 年間にわたって飼育し、各群間での生存率の比較を開始する。

## 4. 研究成果

(1) Apop 遺伝子はマウス動脈硬化プラークから採取した平滑筋細胞で、高レベルに発現している遺伝子として発見された。培養細胞を用いた発現実験の結果、ミトコンドリアからチトクロム c を放出させ、カスパーゼ経路を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした。この Apop 遺伝子を欠損するノックアウトマウス (ApopKO マウス) では内臓脂肪が著明に減少し、体重増加も抑えられていた。ApopKO マウスにおいては生後 30 週齢から野生型のマウスに比して体重増加抑制が認められている。また ApopKO マウスでは、血中の LDL コレステロール (悪玉コレステロール) と中性脂肪の減少が認められている。これらの結果から、Apop 遺伝子の機能は脂肪酸代謝の調節にもあると考えられた。

(2) ApopKO マウスの行動を解析した結果、活動性の低下が認められた。したがって、ApopKO マウスには活動による体重減少よりもむしろ、代謝調節による体重変化があるものと考えられた。このことは Apop がエネルギー代謝の中核機関であるミトコンドリアに存在していることに矛盾しない結果である。Apop 遺伝子の発現調節によってミトコンドリアが活性化が変化して、体重が減少し、コレステロールと中性脂肪の低下につながったものと思われる。体重や中性脂肪の改善はメタボリックシンドロームの発症防止に直結している。メタボリックシンドロームは高齢者に多く発症し、寝たきりの原因である脳卒中や心筋梗塞の誘因であるため、超高齢社会にある日本にとっては特に解決すべき課題である。Apop 遺伝子発現抑制によって、メタボリックシンドロームを効果的に防止

できることが期待される。

(3) ミトコンドリアでのエネルギー(ATP分子)生産にはミトコンドリア内で行われている電子伝達系、TCA サイクル、ベータ酸化が関わっている。Apop タンパク質はこれらの経路を円滑に動かすための重要な因子であると考えられる。人においては多くのミトコンドリア病が知られているが、それらのほとんどは Apop 遺伝子と同様に核のなかの染色体 DNA にコードされている遺伝子の変異によって発症するものであり、エネルギー産生に重要な遺伝子の変異によって発症するものである。これらの事実は Apop 遺伝子が人のミトコンドリア病の原因遺伝子のひとつである可能性を示しており、人疾患においても重要な意義を持つことを示している。

(4) 発現抑制によってミトコンドリアの脂肪酸代謝を亢進させることが明らかになった。Apop は細胞内のミトコンドリア膜上で行われている電子伝達系の活性維持に重要な機能を有していると考えられる。電子伝達系はミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアの最も重要な機能のひとつであるエネルギー(ATP)生産を行っている。Apop K0 マウスでは電子伝達系の活性変化に伴って、脂肪酸代謝が亢進し、その結果、Apop K0 マウスでは脂肪組織が減少しているものと思われる。これらの結果は Apop 遺伝子制御によってメタボリック症候群発症を抑制し得ることを示唆するものであった。

(5) ApopK0 マウスと野生型マウスの寿命を比較した結果、ApopK0 マウスは野生型マウスよりも寿命が延伸する傾向が確認された。野生型マウスは2つ、ヘテロ K0 マウスは1つ、ApopK0 マウスは0個の Apop 遺伝子を有している。Apop 遺伝子を1つだけ有しているヘテロ K0 マウスにおいても ApopK0 マウスと同様に寿命が延伸する傾向が認められた。ヘテロ K0 マウスでも寿命が延伸するという結果は部分的にでも Apop 遺伝子発現を抑制することで寿命を延伸する可能性があることを示している。

#### 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 11 件)

Kim-Mitsuyama Shokei、Soejima Hirofumi、Yasuda Osamu、Node Koichi、Jinnouchi Hideaki、Yamamoto Eiichiro、Sekigami Taiji、Ogawa Hisao、Matsui Kunihiko、Cardiovascular and renal protective role of angiotensin blockade in hypertension with advanced CKD: a subgroup analysis of ATTEMPT-CVD

randomized trial, Scientific Reports, 査読有, Vol. 8, No. 1, 2018, p3150, DOI: 10.1038/s41598-018-20874-4

安田 修、藤井 康成、小牧 梨沙、添嶋 裕嗣、腎機能と筋肉量の相関、Campus Health、査読有, Vol. 8, No. 2, 2018、印刷中、<http://health-uv.umin.ac.jp/kikansi/saisin.html>

Yasuda O, Ikeda Y, Ohishi M, Kumamoto Earthquake and health issues of the elderly, Nihon Ronen Igakkai Zasshi, 査読無, Vol. 54, No. 2, 2017, pp120-124, DOI: 10.3143/geriatrics.54.120

安田 修、熊本地震の被害状況、日本老年医学会雑誌、査読無, Vol. 53, No. 3, 2016, pp185-186、<https://doi.org/10.3143/geriatrics.53.185>

Ogawa H, Soejima H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Yasuda O, Node K, Yamamuro M, Yamamoto E, Kataoka K, Jinnouchi H, Sekigami T, A trial of telmisartan prevention of cardiovascular diseases (ATTEMPT-CVD): Biomarker study, Eur J Prev Cardiol, Scientific Reports, 査読有, Vol. 23, No. 1, 2016, pp913-921, DOI: 10.1177/2047487315603221

Ogawa H, Soejima H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Yasuda O, Node K, Yamamuro M, Yamamoto E, Kataoka K, Jinnouchi H, Sekigami T; ATTEMPTCVD Investigators, A trial of telmisartan prevention of cardiovascular diseases (ATTEMPT-CVD): Biomarker study, Eur J Prev Cardiol, 査読有, Vol. 23, No. 9, 2015, pp913-921, DOI: 10.1177/2047487315603221

Araki S, Izumiya Y, Rokutanda T, Ianni A, Hanatani S, Kimura Y, Onoue Y, Senokuchi T, Yoshizawa T, Yasuda O, Koitabashi N, Kurabayashi M, Braun T, Bober E, Yamagata K, Ogawa H, Sirt7 Contributes to Myocardial Tissue Repair by Maintaining Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Pathway, Circulation, 査読有, Vol. 132, No. 12, 2015, pp1081-1093, DOI:

10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014821

Toyama K, Koibuchi N, Hasegawa Y, Uekawa K, Yasuda O, Sueta D, Nakagawa T, Ma M, Kusaka H, Lin B, Ogawa H, Ichijo H, Kim-Mitsuyama S, ASK1 is involved in cognitive impairment caused by long-term high-fat diet feeding in mice, *Sci Rep*, 査読有, Vol. 5, 2015, p10844, DOI: 10.1038/srep10844

Kurokawa H, Sugiyama S, Nozaki T, Sugamura K, Toyama K, Matsubara J, Fujisue K, Ohba K, Maeda H, Konishi M, Akiyama E, Sumida H, Izumiya Y, Yasuda O, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H, Telmisartan enhances mitochondrial activity and alters cellular functions in human coronary artery endothelial cells via AMP-activated protein kinase pathway, *Atherosclerosis*, 査読有, Vol. 239, No. 2, 2015, pp 375-385, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.037

Hanaoka Y, Yasuda O, Soejima H, Miyata K, Yamamoto E, Izumiya Y, Maeda N, Ohishi M, Rakugi H, Oike Y, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H, Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knockout mice exhibit enhanced energy expenditure through thermogenesis, *PLoS One*, 査読有, Vol. 9, No. 4, 2014, pe94930, DOI: 10.1371/journal.pone.0094930

Takashio S, Yamamuro M, Uemura T, Utsunomiya D, Morita K, Izumiya Y, Sugiyama S, Kojima S, Yamamoto E, Tsujita K, Tanaka T, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Yasuda O, Yamashita Y, Ogawa H, Correlation between extent of myocardial fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance and cardiac troponin T release in patients with nonischemic heart failure, *Am J Cardiol*, 査読有, Vol. 113, No. 10, 2014, pp1697-1704, DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.02.029

〔学会発表〕(計 7件)

安田 修 他, 若年アスリートにおける筋肉量と腎機能に関する解析、第 55 回全国大学保健管理研究集会、2017

安田 修 他, Apop 発現抑制と血管内皮細胞の老化、第 58 回日本老年医学会学

術集会、2016

安田 修 他, Apop 遺伝子を標的とした抗老化研究、第 58 回日本老年医学会学術集会、2016

Osamu Yasuda et al, Analysis of Apop Gene Expression in Human Atherosclerotic Tissue, 80<sup>th</sup> Japanese Circulation Society, 2016

Osamu Yasuda et al, Apoptogenic Protein is Involved in Endothelial Senescence Induced by High Glucose, American Heart Association, 2015

Osamu Yasuda et al, Analysis of Apop Gene Expression in Human Atherosclerotic Tissue, 79<sup>th</sup> Japanese Circulation Society, 2015

Osamu Yasuda et al, Apoptogenic Protein is a Novel Phenotypic Marker of the Contractile Vascular Smooth Muscle Cells, American Heart Association, 2014

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 修 (YASUDA, Osamu)  
鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授  
研究者番号：00372615

(2) 研究分担者

樂木 宏実 (RAKUGI, Hiromi)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20252679

福尾 恵介 (Fukuo, Keisuke)  
武庫川女子大学・生活環境学部・教授  
研究者番号：40156758