

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19554

研究課題名(和文)血管・脂肪組織由来分泌因子Favineの脂肪蓄積作用機序の解明と新たな機能探索

研究課題名(英文) Analysis of function of an adipogenic factor, Favine, which is highly expressed in vessels and adipose tissue.

研究代表者

小林 祥子 (Kobayashi, Sachiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80649111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Favine/CCDC3は研究代表者らが独自に見出した新規分泌因子である。これまでの研究からFavineが脂肪細胞分化および脂肪合成を正に制御することが示されたが、そのメカニズムは不明であった。血管におけるFavineの作用も不明であった。本研究において、Favineは抗動脈硬化作用を有する可能性が示唆された。これまで不明であった血管に対するFavineの機能が明らかとなりつつあることは非常に意義深く、Favineのさらなる機能解析は、メタボリックシンドロームの病態解明につながる可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病では動脈硬化が発症進展することが知られているが、その機序には依然不明な点が多い。研究代表者らは、血管から分泌される未知の因子が動脈硬化発症や進展に関与している可能性を想定し、Favineを同定した。本研究からFavineは抗動脈硬化作用を有することが示唆された。Favineの機能解析を通じて、動脈硬化、肥満の病態解明および創薬に発展する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Favine/CCDC3 is a secretory factor, which we identified in 2010. Favine is highly expressed in the aorta and adipose tissue. Previously, we showed that Favine has adipogenic and lipogenic effects. In this study, we showed that Favine has anti atherogenic effects on murine aorta. Further investigation on the function of Favine will provide valuable information for revealing underlying mechanisms of metabolic syndrome.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：Favine 動脈硬化 脂肪細胞分化 脂肪合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ヒトの Gene Chip Database を用いてスクリーニングを行い、血管に特異的に発現し、糖尿病や肥満によって遺伝子発現が変化し、予測アミノ酸配列上シグナルペプチドを持つ遺伝子(Coiled-coil domain containing3; CCDC3)を抽出した。マウスの発現分布解析により CCDC3 は血管と脂肪で高く発現する分泌因子であることが明らかとなり、研究代表者らは *Favine*; *fat/vessel-derived secretory protein* と命名し、*Favine* について遺伝子発現解析、蛋白質の性状解析を行った。そして、肥満糖尿病マウスの脂肪組織では *Favine* の遺伝子発現が亢進すること、脂肪細胞分化と共に *Favine* 遺伝子発現が増加すること、インスリンや PPAR  $\alpha$  アゴニストなど糖脂質代謝に関わる因子やマウスの寒冷暴露やカテコラミンなど熱産生に関わる刺激によって脂肪細胞および血管内皮細胞の *Favine* 遺伝子発現が変化すること、分泌因子であることを示した (Kobayashi et al., BBRC, 2010)。その後、Eberlein らは *Favine* 遺伝子発現量がウシの筋肉内脂肪含量と相関することを示した (Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol, 2010)。さらに Ugi らは、ヒトの内臓脂肪型肥満において内臓脂肪の *Favine* 遺伝子発現量が増加し、*Favine* 遺伝子発現量が Body mass index や腹囲周径と正に相関し、*Favine* が内臓脂肪型肥満のバイオマーカーとなりうる可能性を示した (Obesity, 2014)。これらの報告から、*Favine* は脂肪蓄積に関与することが強く示唆されていたが、実際、研究代表者らは、*Favine* の *in vitro* および *in vivo* 実験による機能解析を行い、*Favine* が脂肪分化および脂肪合成を正に制御することを明らかにした (Kobayashi et al., JBC, 2015)。

*Favine* は血管と脂肪組織に高発現する因子であり、脂肪組織における *Favine* の機能は、研究代表者らの研究によって明らかとなりつつあったが、血管における機能は依然不明であった。

## 2. 研究の目的

肥満や糖尿病では動脈硬化が発症進展することが知られており、高血糖による糖毒性や高インスリン血症、血管内皮細胞で生じる酸化ストレスが重要な発症因子であると考えられている。しかし、その発症および進展の機序には依然不明な点が多い。血管より分泌される未知の分泌因子が動脈硬化発症や進展に関与している可能性を想定し、研究代表者らは血管内皮細胞から分泌される新規因子の探索を行い、*Favine*(*fat/vessel-derived secretory protein*)を同定した。*Favine* は血管と脂肪組織で高発現し、脂肪細胞分化促進作用および脂肪組織と肝臓の脂肪蓄積促進作用を有することが明らかとなった。本研究では(1)*Favine* の脂肪蓄積作用のメカニズム解明、(2)血管における作用解析、(3)エネルギー代謝への寄与を中心とした新たな機能探索、(4)受容体の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *Favine* の脂肪細胞分化や脂肪合成促進作用のメカニズム解明のため、脂肪細胞の分化前後の各段階において *Favine* 過剰発現/発現抑制実験、*Favine* 蛋白質の添加実験を行い、細胞機能を評価した。

(2) 血管に対する作用の解析のため、*Favine* 遺伝子改変マウスを動脈硬化症のモデルマウスと交配したマウスを用いて、血管病変の程度、血管機能を評価した。血管内皮培養細胞における *Favine* 遺伝子過剰発現/抑制実験、*Favine* 蛋白質添加実験を行い、炎症シグナル解析と脂肪合成やエネルギー代謝量の評価を行った。

(3) エネルギー代謝への寄与等新たな *Favine* の機能探索のため肝臓などエネルギー産生・蓄積の主要責任臓器における *Favine* によるエネルギー代謝変化を調べた。

(4) *Favine* 受容体の同定を目指した。

## 4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化促進・脂肪合成促進作用のメカニズムの解明に関しては、*Favine* 組み換え蛋白質変異体の作製を行った。具体的にはジスルフィド結合欠損体、糖鎖修飾部位欠損体を構築した。野生型 *Favine* とこれら変異体の活性の違いを調べるために、変異体の大量精製の確立を目指したが、*Favine* は凝集しやすい性質を持ち、精製に難渋した。ようやく最近になって、収量の高い精製条件が見つかりつつあるため、今後も検討を続ける予定である。精製が完了すれば、培養脂肪細胞への添加実験を行う。*Favine* が分泌因子として細胞外から作用することで

も分化促進作用および脂肪合成促進作用を示すのかどうかを、野生型 Favine と変異型 Favine 添加実験によって明らかにする予定である。活性に必要な部位が同定されれば、同部位への中和抗体による薬剤の開発も期待される。脂肪細胞における Favine 発現抑制実験のためレンチウイルスを用いた系の構築を試みたが、脂肪細胞へのウイルス感染効率が低いことが判明し、この系の使用は断念した。

(2) 血管に対する Favine の作用解析のため、動脈硬化モデルマウスである ApoE ノックアウト (KO) マウスと Favine KO マウスの交配によってダブルノックアウトマウス (ApoE/Favine ダブル KO マウス) を作出した。ApoE KO マウスと Favine/ApoE ダブル KO マウスに対して Western diet 負荷を行い、動脈硬化を誘導した。Western diet 負荷期間による動脈硬化進展の程度を知るため、併行して ApoE 単独ノックアウトマウスを用いた条件検討を行った。動脈硬化病変の評価にはオイルレッド O 染色を用いた。まず、ApoE KO マウスは Western diet 負荷 3 カ月時点で動脈硬化の発症を確認した。そこで、Western diet 3~4 カ月負荷での検討を行うことに決定した。通常食飼育後でも ApoE KO マウスは 1 年齢の時点で著明な動脈硬化病変を有することも明らかとなったため、通常食負荷群での検討も行うこととした。ApoE/Favine ダブル KO マウスは、ApoE KO マウスに比して、動脈硬化病変が増悪した (図 1)。マウスの動脈硬化の程度は個体差があり、ばらつきがあるため、再現を確認することを優先した。本実験は Western diet 負荷期間も長いいため、再現実験には長期間かかったが、研究期間中に再現を確認することができ、Favine 欠損はマウスの動脈硬化を惹起することが明らかとなった。ApoE/Favine ダブル KO マウスの動脈硬化増悪のメカニズムを明らかにするために、炎症に関わる因子の mRNA および蛋白質発現量測定を目指し、大動脈サンプルを回収した。マウス大動脈 RNA サンプルから回収できる RNA 量は少なく、かつ、動脈硬化病変部位は ubiquitous ではないため、採取する大動脈サンプルの部位と採取方法に関する条件検討を要した。現在、定めた条件下でのサンプル回収を進めている。このサンプルを用いて、血管内皮の細胞接着因子、炎症性サイトカインを中心に遺伝子発現量を評価する予定である。今後、(1) で精製した組換え Favine を ApoE/Favine ダブル KO マウスに補充し、動脈硬化病変の変化が見られるかどうか検討を行いたい。野生型 Favine で動脈硬化改善作用がみられた場合は、変異型 Favine 補充実験を行い、Favine の活性部位の同定を進める。In vitro 実験として、血管由来の各種培養細胞に対してレンチウイルスを用いた Favine 過剰発現または発現抑制系を構築した。HUVEC に対するレンチウイルスを用いた Favine 発現抑制系によって、Favine 欠損マウスで見られる動脈硬化増悪の機序を示唆する実験結果が得られることを期待し、解析を進めている。本研究期間の検討により、現在、血管における作用機序の解明に関して、評価系の準備が整った段階にあり、今後の検討結果が待ち遠しい。

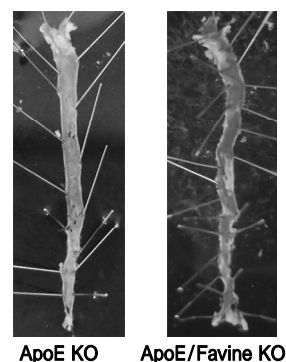


図1.大動脈Oil Red染色

(3) Favine の新たな機能として、研究代表者らは生体内でエネルギー代謝に大きく関与する臓器 (脂肪組織、肝臓、筋肉) における Favine の作用の存在を想定している。研究代表者らの構築した Favine 遺伝子改変マウスの各臓器を採取し、絶食、再摂食時の組織重量の変化、エネルギー代謝に関わる各種遺伝子発現の変化を解析するための組織回収を進行中である。

(4) Favine 受容体の同定を目指し、Favine 組換え蛋白質を精製した。Favine 受容体発現を予測する脂肪細胞および血管内皮細胞を用いて、Favine/受容体複合体の抽出を試みる予定である。

Favine は研究代表者らが世界で初めて報告した分泌因子であり、生物種間で高く保存されており、重要な因子であることが推測された。これまでの研究結果から Favine は脂肪細胞分化および脂肪合成を正に制御する因子であることが明らかとなっていた。今回、新たに、Favine は抗動脈硬化作用を有する因子であることが示された。Favine の生理的および病態生理学的意義の検証は、肥満ならびにその合併症の分子基盤のさらなる解明の一助となると考えられる。今後さらに Favine の脂肪肥大化および各臓器への脂肪蓄積促進作用のメカニズムの解明、血管における抗動脈硬化作用機序の解明や Favine の受容体の同定がなされれば、創薬の開発につながる可能性があり、大きなインパクトが予想される(図2)。

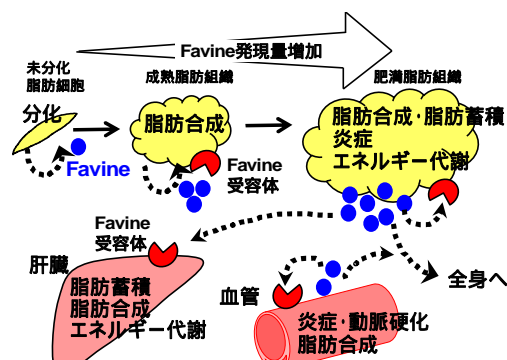


図2. Favineの作用機序の可能性と研究予定

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

小林祥子「脂肪組織・血管由来分泌因子 Favine の機能解析」第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月

小林祥子「脂肪組織・血管由来分泌因子 Favine の機能解析」第 38 回日本肥満学会 2017 年 10 月

小林祥子「Functional analysis on fat/vessel-derived secretory protein (Favine)」第 21 回アディポサイエンス・シンポジウム 2016 年 8 月

小林祥子「脂肪組織・血管由来新規分泌因子 Favine/CCDC3 の機能解析」第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 年 6 月

小林祥子「脂肪組織・血管由来分泌因子 Favine の機能解析」第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

〔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:

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。