

令和 5 年 4 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09534

研究課題名(和文) 生理活性物質カートデュースンの受容体同定と炎症における役割の解明

研究課題名(英文) Identification of receptor for cartducin, and analysis of the role of cartducin in inflammation

研究代表者

前田 隆史 (MAEDA, Takashi)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80324789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Cartducin(カートデュースン)はC1q/TNF-related protein 3 (CTRP3)ともよばれており、新たなカテゴリーである「C1q/TNFファミリー」に属する。肥満にともなって脂肪組織で慢性炎症が生じることが分かっているため、慢性炎症のモデルとして、Cartducinノックアウトマウス(KO)および同腹野生型マウス(WT)を高脂肪食による食餌誘導性の肥満状態にして、それぞれの表現型を比較検討した。その結果、いくつかの脂質代謝関連遺伝子の発現量や内臓脂肪の重量などについて両群の間に有意な違いが見られることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常食で飼育したCartducinノックアウトマウスを絶食させた場合に、血液中のALTとASTの値が野生型マウスに比べて有意に高いことに気づいた。絶食させたノックアウトマウスの肝臓では、アミノ酸代謝関連遺伝子や糖新生関連遺伝子の発現量が増加しており、多くのアミノ酸の濃度が減少していることが明らかになった。これらの結果は、Cartducinが絶食時における肝臓での糖代謝やアミノ酸代謝にも関わっているという当初予期していなかった新たな可能性を示唆しており、肝臓におけるCartducinの働きに対する今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cartducin/CTRP3 is a paralog of adiponectin. High fat diet-fed Cartducin KO mice displayed a decrease in the epididymal white adipose tissue (WAT) weight to total body weight ratio. Adipocyte size was significantly smaller in the epididymal WAT of Cartducin KO mice than control mice. These findings indicate the role of Cartducin in the regulation of adipose tissue in obesity. Furthermore, we examined metabolic roles of Cartducin in non-obese mice under starvation conditions. Serum ALT and AST levels were increased in fasted standard chow-fed Cartducin KO mice than control mice. The expressions of several genes involved in gluconeogenesis were increased in the liver of Cartducin KO mice. Metabolome analysis of the liver of fasted Cartducin KO mice revealed that the relative concentrations of 10 of the 20 amino acids were lower. These findings indicate that Cartducin also has novel roles in regulating both gluconeogenesis and amino acid metabolism in the liver during starvation.

研究分野：病態科学系歯学

キーワード：Cartducin CTRP3 脂肪組織 糖代謝 アミノ酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫における補体系の最初の分子である C1q の C 末端部球状ドメインや腫瘍壊死因子 (TNF) と同様の構造をもつ一連の分子群が「C1q/TNF スーパーファミリー」として総称されるようになり、アディポネクチンパラログとして注目されていた。これらの分子はアディポネクチンと同様に、多量体構造をとる分泌蛋白質であり、細胞外に分泌されることにより細胞間シグナルを伝達する分子として多彩な機能をもつことが知られていた。研究代表者らが軟骨細胞から同定し、「軟骨から産生される分泌蛋白」という意味で“Cartducin(カートデュエシン)”と名付けられた分子は分子量 26-kDa の機能未知の分泌蛋白をコードしており、「C1q/TNF スーパーファミリー」に CTRP3 として属することが明らかになっていた。研究代表者らは、カートデュエシンが局所的には骨形成促進因子として骨格の成長発育において重要な役割を果たしていることや、精巣においてテストステロン産生に関わっていること、さらに筋芽細胞や脂肪前駆細胞の分化を調節していることなどを主に明らかにしていた。また、海外の研究者らによって、カートデュエシンには血漿蛋白質として血糖降下作用、心筋保護作用などがあることが報告されていた。これらのことから多様な生理的・病理的作用を持つ新たな生理活性物質としてのカートデュエシンの重要性が明らかになってきていた。

(2) ヒトにおいて、血液中のカートデュエシン濃度が肥満にともなって低下することが報告されていたが、肥満を中心として発症するメタボリック症候群とカートデュエシンの関連については不明な点が多かった。また、炎症には急性炎症と慢性炎症があることが知られていたが、各組織における慢性炎症という状態が、様々な疾病の基盤となっていることが明らかになってきていた。実際に、肥満にともなって脂肪組織で慢性炎症が生じることは分かっていたが、このプロセスにおけるカートデュエシンの役割は不明であった。しかしながら、カートデュエシンと構造的によく似たアディポネクチンが抗炎症作用を持つことが報告されていたので、研究代表者らはカートデュエシンが炎症反応を制御する分子として何らかの生理的役割を果たしているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

慢性炎症におけるカートデュエシンの役割については不明であった。そこで本研究では、カートデュエシンの炎症反応を制御する分子としての役割を解明することを試みた。具体的には、慢性炎症のモデルとして、カートデュエシンノックアウトマウス (KO) および同腹野生型マウス (WT) を高脂肪食による食餌誘導性の肥満状態 (DIO: Diet-induced obesity) にして、それぞれの表現型を比較解析することにより (肥満を中心とした) 慢性炎症におけるカートデュエシンの新たな病態生理学的意義の理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験 :

雌雄のカートデュエシンヘテロマウスを交配させて同腹のカートデュエシン KO と WT を得た。離乳した雄の KO と WT を生後 4 週から 24 週まで高脂肪食 (D12492: リサーチダイエツ社) で飼育して食餌誘導性の肥満状態にした。その間、体重を 2 週間ごとに測定した。24 週目にマウスを安楽死させて各臓器 (脂肪や肝臓など) や血液を採取した。

(2) 動物実験 :

上記と同様の方法で同腹のカートデュエシン KO と WT を得た。離乳した雄の KO と WT を生後 20-24 週まで普通食 (MF: オリエンタル酵母) で飼育した。20 時間絶食させた後、マウスを安楽死させて各臓器 (脂肪や肝臓など) や血液を採取した。

(3) 組織染色 :

摘出した臓器を 10% 中性ホルマリンで固定後にパラフィン包埋した。薄切したパラフィン切片を通常法にて脱パラフィン処理および親水処理を行いヘマトキシリンエオジン染色した。撮像した染色画像の定量は画像処理ソフト (ImageJ: NIH) を用いて行った。

(4) 血液生化学検査 :

採血したマウス血液を血漿分離採血管 (BD) で遠心して血漿を採取した。これらの血漿を検体として血液生化学検査を行なった (オリエンタル酵母)。

(5) グルコース負荷試験 (GTT):

生後 6 週から高脂肪食で飼育した 18-19 週齢のマウスを一晩 (16-18 時間) 絶食させた後、腹腔内にグルコース (1.5 mg/g 体重) を注射した。注射後 0、15、30、60、120、180 分後に血糖測定器 (三和化学) を用いて血糖値を測定した。

(6) インスリン負荷試験 (ITT):

生後 6 週から高脂肪食で飼育した 18-19 週齢のマウスを 4 時間絶食させた後、腹腔内にインスリン (1.5 U/kg 体重) を注射した。注射後 0、15、30、60、90、120 分後に血糖測定器を用いて血糖値を測定した。

(7) アラニン負荷試験 (ATT):

普通食で飼育した 20-21 週齢のマウスを 20 時間絶食させた後、腹腔内に L-アラニン (2.0 g/kg 体重) を注射した。注射後 0、15、30、45、60、90、120 分後に血糖測定器を用いて血糖値を測定した。

(8) 定量的 RT-PCR:

採取した肝臓や脂肪組織より RNeasy キット (キアゲン社) を用いて total RNA を抽出した。1 μ g の total RNA を PrimeScript RT キット (タカラバイオ) を用いて逆転写して cDNA を合成した。カートデュージン、*Ctrp1*、*Ctrp9*、*Acc1*、*Fasn*、*Atgl*、*Hsl*、*Mgl1*、*Pparg*、*C/ebpa*、*ALT*、*AST*、*PEPCK*、*FBPase*、*G6Pase*、*KLF15*、*PGC-1a* および *HPRT* の各遺伝子に対して特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。

(9) メタボローム解析:

普通食で飼育した 21 週齢のマウスを 20 時間絶食させた後に肝臓を摘出し、液体窒素中で瞬間凍結した。凍結肝臓組織 (~50 mg) を 50% アセトニトリル溶液中でホモジナイズして 4 で 5 分間遠心した。上清をさらに 4 で 120 分間遠心濾過したものをサンプルとしてキャピラリー電気泳動装置を飛行時間型質量分析装置に接続した分析装置 (CE-TOFMS) で解析した。これらの解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社で実施された。

(10) 統計解析:

Student's *t*-test を用いて、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

4. 研究成果

(1) カートデュージン KO マウスの外観:

カートデュージン KO と WT マウスの間には外観上の違いは見られなかった。また、普通食で飼育した場合と高脂肪食で飼育した場合のいずれの場合においても、KO と WT の間に体重差は認められなかった。

(2) 高脂肪食で飼育したカートデュージン KO マウスの血液生化学検査:

血液中の AST、ALT、コレステロール、LDL、HDL、中性脂肪の濃度を測定したが、カートデュージン KO と WT マウスの間にはこれらの値の違いは認められなかった。

(3) 高脂肪食で飼育したカートデュージン KO マウスの肝臓と脂肪:

24 週齢のカートデュージン KO と WT マウスの相対的肝重量 (体重比) を比較したが、両者の間に違いは見られなかった。また、肝臓における脂肪の蓄積についても組織学的に調べたが、両者の間に違いは見られなかった。一方、24 週齢のカートデュージン KO と WT マウスの相対的脂肪重量 (体重比) を比較したところ、カートデュージン KO マウスの相対的脂肪重量は WT に比べて有意に少なかった (図 1A)。さらに、脂肪細胞の大きさもカートデュージン KO マウスのほうが WT に比べて有意に小さいことが判明した (図 1B, C)。

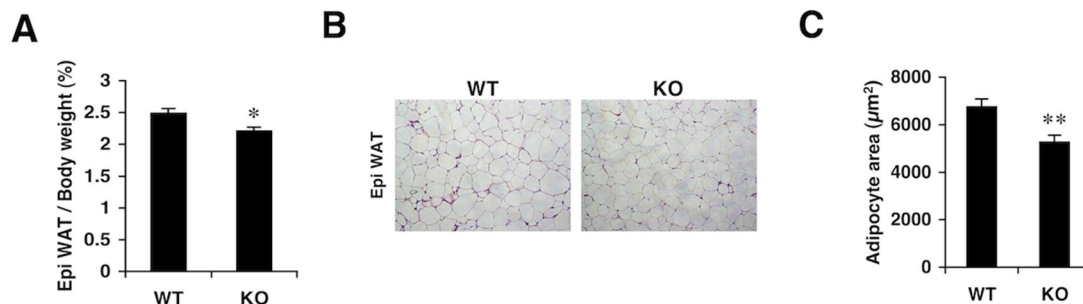


図 1 高脂肪食で飼育したカートデュージン KO マウスの脂肪組織

(4) カートデューシン K0 マウスの脂肪組織における脂肪関連遺伝子の発現量変化：
 高脂肪食で飼育したカートデューシン K0 マウスの相対的脂肪重量は WT に比べて有意に少なく、また脂肪細胞の大きさも WT に比べて有意に小さかったことから、カートデューシン K0 マウスの脂肪組織における脂肪形成と脂肪分解のバランスの変化がこれらの原因であるかどうかについて調べた。定量的 RT-PCR 法による解析の結果、カートデューシン K0 マウスの脂肪組織では、脂肪酸合成酵素の一つである *Fasn*、脂肪分解酵素の一つである *Hsl*、脂肪細胞分化に関わる転写因子の一つである *C/ebpa* の各遺伝子の発現量が有意に低下していることが明らかになった。*Hsl* 遺伝子の発現減少は予想外であった。また、グルコース負荷試験とインスリン負荷試験については、カートデューシン K0 と WT マウスの間で違いは見られなかった。

(5) 普通食で飼育した後に絶食させたカートデューシン K0 マウスの血液生化学検査：
 普通食で飼育した 24 週齢のカートデューシン K0 マウスを 20 時間絶食させた後の血液中の ALT と AST の値が野生型マウスに比べて有意に高いことが分かった。

(6) カートデューシン K0 マウスの肝臓における糖新生関連遺伝子の発現量変化：
 普通食で飼育した 24 週齢のカートデューシン K0 マウスを 20 時間絶食させた後の肝臓では野生型マウスのそれと比べて、アミノ酸代謝に関わる ALT 遺伝子や AST 遺伝子、糖新生に関わる G6Pase 遺伝子などの発現が有意に増加していることが明らかになった。また、絶食時のアラニンからの糖新生を観察した結果、野生型マウスに比べて K0 マウスではアラニンからの糖新生が亢進していることが明らかになった。絶食させたカートデューシン K0 マウスの肝臓におけるこれらのアミノ酸代謝関連遺伝子や糖新生関連遺伝子の発現量の増加が、絶食時の糖新生に影響を与えたものと考えられた。

(7) カートデューシン K0 マウスの肝臓のメタボローム解析：
 絶食時におけるカートデューシン K0 マウスと野生型マウスの両群間の肝臓内の代謝産物をメタボローム解析を用いて比較した。その結果、K0 マウスでは野生型マウスに比べて 20 種類のアミノ酸中 10 種類のアミノ酸の濃度が有意に減少していることが判明した(図 2)。これらの結果から、カートデューシンが絶食時における肝臓でのアミノ酸代謝にも関わっているという新たな知見が得られた。

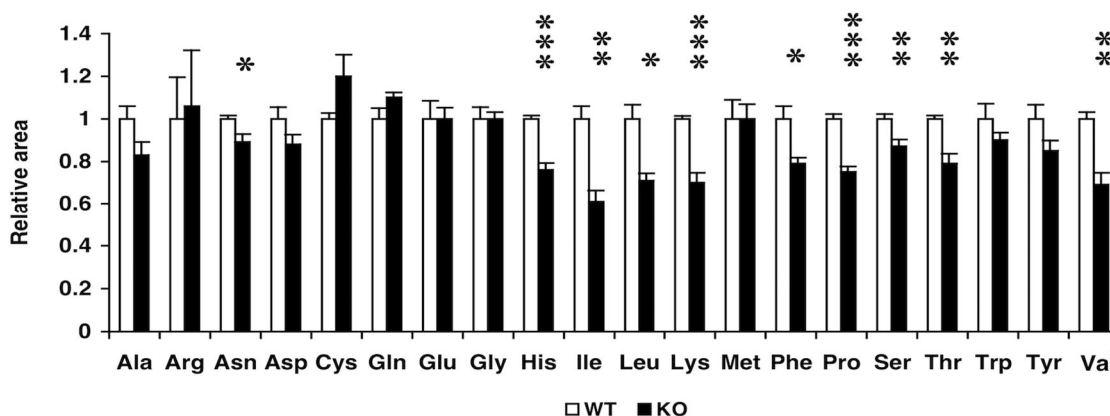


図 2 普通食で飼育した後に絶食させたカートデューシン K0 マウスの肝臓のアミノ酸濃度

(8) 総括：これらの結果から、カートデューシンが、肥満状態において脂肪組織の代謝に関わっている可能性が示唆された。さらに、カートデューシンは、絶食時においては肝臓での糖新生だけでなく、アミノ酸代謝にも関わっているという当初予期していなかった新たな可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda T.	4. 巻 49
2. 論文標題 Alterations of hepatic gluconeogenesis and amino acid metabolism in CTRP3-deficient mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1617-1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-021-06969-8	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 -

1. 著者名 Maeda T., Wakisaka S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Deficiency of C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) decreases adipose tissue weight in diet-induced obesity mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 9219-9224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05905-6	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	脇坂 聡 (WAKISAKA Satoshi) (40158598)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	削除：2021年3月8日

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
---------	---------