

平成22年1月25日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591076  
 研究課題名（和文） 脂肪細胞および血管内皮細胞由来新規内分泌因子に関する研究  
 研究課題名（英文） Identification of a new secretory factor in adipocytes and endothelial cells  
 研究代表者  
 福原 淳範（FUKUHARA ATSUNORI）  
 大阪大学・医学系研究科・特任研究員  
 研究者番号：00437328

## 研究成果の概要：

本研究では、血管から分泌され、肥満、糖尿病状態において発現が変化する新規因子の探索を目的として、Gene Chip Database をスクリーニングし、一つの新規遺伝子 CCDC3 を同定した。CCDC3 は、血管および脂肪組織に高発現し、肥満マウスの脂肪組織では発現が上昇した。培養細胞において本因子の発現実験を行ったところ、本因子は糖鎖修飾を受ける分泌因子であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生活習慣病、ホルモン、CCDC3

## 1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームや動脈硬化症と関連することがよく知られている。脂肪細胞からはTNF- $\alpha$ やIL-6, PAI-1, アディポネクチンなどのサイトカインが分泌され、肥満に伴う糖尿病や高血圧の発症に関与している。一方、肥満や糖尿病状態では血管内皮機能の障害が発症し、動脈硬化症へと進展する過程に、何らかの分泌因子が関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

肥満、糖代謝異常と血管機能を結ぶ分泌因子

の探索を目的としてスクリーニングを行い、CCDC3 を同定した。

本研究では、ccdc3 の遺伝子発現調節機構の解析、リコンビナント蛋白の作成と糖鎖修飾、分泌機構、生理機能の解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 動物モデル

コントロールマウスとしてC57BL/6Jマウス、肥満マウスとしてKKAyマウス、db/dbマウス、7週間高ショ糖、高脂肪食負荷したマウスを用いた。

動脈硬化マウスとしてLDL受容体欠損マウス

を Western diet で 30 週間飼育したもの、またはアポE 蛋白欠損マウスを Western diet で 7 週間飼育したものを用いた。精巣周囲脂肪組織と下降大血管（大動脈+大静脈）を用いた。

#### (2) 細胞実験

一過性過剰発現実験には COS 7 細胞を用いた。ラット脂肪細胞から作成した初代培養細胞から分化誘導した脂肪細胞を用いた。血管系細胞として HUVEC、HASMC を用いた。

#### (3) 蛋白発現

CCDC3 全長の cDNA の C 末端に HA タグまたは His タグを付加した発現ベクターを作成し、COS7 細胞にトランスフェクションした。

#### (4) 薬剤による遺伝子発現制御

分化誘導を行って 5 日目のラット脂肪細胞に対して薬剤を 24 時間添加した。インスリン、ピオグリタゾン、イソプロテレノール、ノルエピネフリンを用いた。

#### (5) 分泌機構の解析

CCDC3 を一過性に発現した COS 細胞に対して brefeldinA を一時間前投与し、培養液を交換後にさらに 6 時間培養し、培養上清および細胞内の CCDC3 蛋白をウェスタンブロット法で検出した。

#### (6) 多量体の形成

CCDC3 を一過性に発現した COS 細胞の培養上清に 5% 2-mercaptoethanol と 10 mM dithiothreitol を加えてボイルしたサンプルと、これらを加えていないサンプルを用いて CCDC3 蛋白をウェスタンブロット法で検出した。

#### (7) 糖鎖修飾

CCDC3 を一過性に発現した COS 細胞の培養上清から HA 抗体を用いて精製した CCDC3 蛋白に対して PNGaseF で処理を行い、CCDC3 蛋白をウェスタンブロット法で検出した。

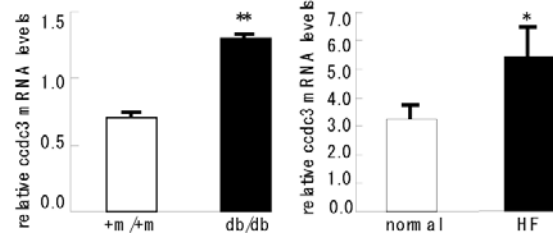
#### (8) レクチン結合

CCDC3 を一過性に発現した COS 細胞の培養上清に対して WGA-agarose への結合と WGA リガンドである chitose と GlcNAc による競合的な溶出を行い、CCDC3 蛋白をウェスタンブロット法で検出した。

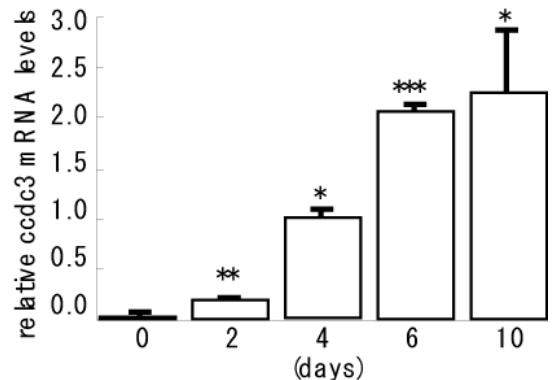
### 4. 研究成果

(1) マウス脂肪組織における遺伝子発現制御  
肥満モデルマウスとコントロールマウスの脂肪組織において CCDC3 の mRNA 発現量を比較したところ、肥満脂肪組織において発現量

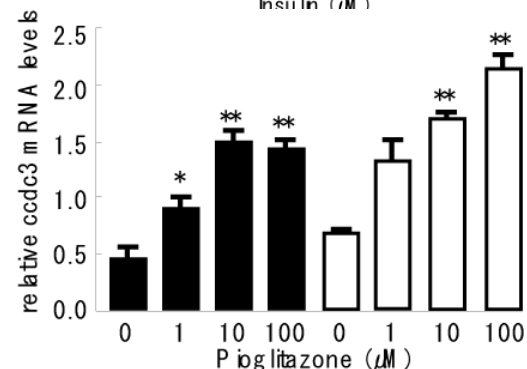
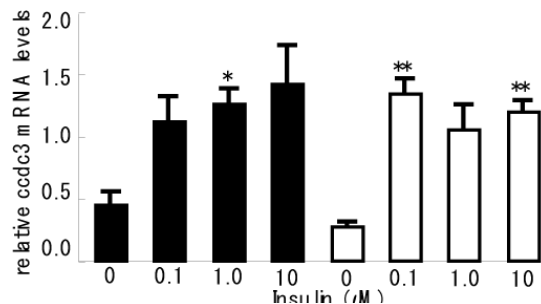
が増加していた。



次に、ラット初代脂肪細胞において分化誘導にともなって CCDC3 の mRNA 発現量は増加した。



脂肪細胞の分化に重要な因子であるインスリンと PPARgamma アゴニストであるピオグリタゾンを、分化した脂肪細胞に対して添加したところ、いずれの刺激によっても CCDC3 の発現量は増加した。



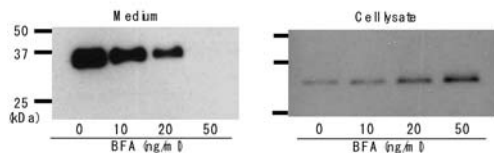
一方で脂肪細胞において脂肪分解作用をもつノルエピネフリンとイソプロテレノールで処理したところ、脂肪分解にともなって CCDC3 の発現量は低下した。以上のことから CCDC3 は脂肪細胞においては脂肪蓄積とも

に上昇し、脂肪分解によって低下する因子であることが明らかになった。

(2) マウス血管系における遺伝子発現制御  
血管系の培養細胞である、HUVEC(血管内皮細胞)、HASMC(血管平滑筋細胞)における発現量を比較したところ、血管内皮細胞に高発現していた。そこで、HUVEC に添加実験を行ったところ、脂肪細胞と同様にピオグリタゾンによって発現が亢進した。しかし、肥満マウス、動脈硬化モデルマウスとコントロールマウスの大血管において CCDC3 の mRNA 発現量を測定したところ、変化を認めなかった。生理的な条件では CCDC3 は血管と脂肪細胞に高発現しているが、病態において発現変化が見られないことが明らかになった。

### (3) 分泌経路の解析

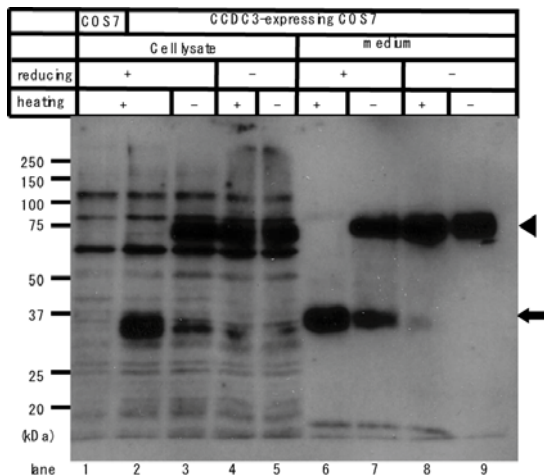
CCDC3 を外来性に過剰発現した COS 細胞に対して brefeldinA を添加して、細胞内および細胞外の CCDC3 蛋白を比較した。brefeldinA によって培養上清中の CCDC3 は減少し、細胞内 CCDC3 は増加した。



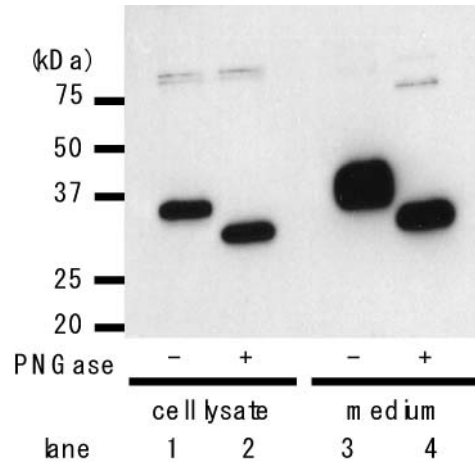
次に、培養上清中の CCDC3 蛋白を HA タグを用いて免疫精製し、エンドマン分解によって N 末端アミノ酸を同定した。コンピュータ解析で得られた予想と一致して、N 末端のシグナル配列が切断されていた。以上のことから CCDC3 はシグナル配列を有してゴルジ経路で分泌される因子であることが明らかになった。

### (4) 多量体形成と糖鎖修飾

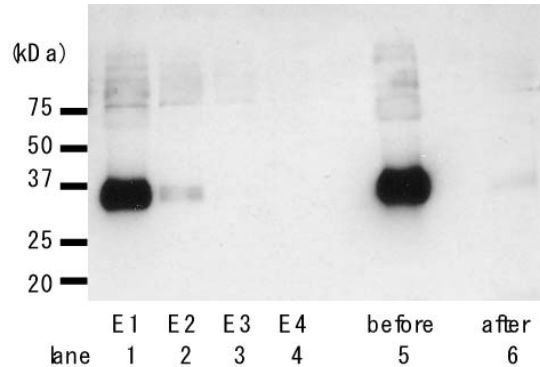
培養上清中の CCDC3 を非還元状態で泳動すると、還元状態の二倍の分子量の位置に泳動された。このことから CCDC3 は二量体を形成する性質をもつことが明らかになった。



COS 細胞で外来性に過剰発現させた CCDC3 蛋白は予想分子量よりも大きなサイズに泳動された。そこで、CCDC3 蛋白を PNGaseF (糖鎖分解酵素) によって処理したところ、予測分子量までサイズが減少した。



次に、糖蛋白に結合する性質を持つレクチンへの親和性を調べたところ、CCDC3 は WGA レクチンと結合し、WGA リガンドによって競合的に溶出されることが明らかになった。



以上のことから CCDC3 は N 型糖鎖をもつ糖蛋白質であることが明らかになった。

私どもはこれまで、脂肪細胞から分泌される生理活性因子としてアディポサイトカインの研究を行い、肥満病態にアディポサイトカインの発現異常が深く関与することを報告してきた。

本研究では脂肪細胞および血管より分泌される新規内分泌因子である CCDC3 の発現制御と分泌機構、糖蛋白質としての性質が明らかになった。本因子は定常状態では脂肪細胞と血管に発現し、肥満病態では脂肪組織で発現が上昇する性質を持つ。また、分泌因子として他臓器への作用を有する可能性があり、肥満を基盤としたメタボリックシンドロームと動脈硬化性疾患を結びつける因子として重要な役割を持つことが予想される。

本研究によって CCDC3 の蛋白作成法と過剰発現の実験系が確立された。これらの手法を用

いて、血管系細胞での機能解析や、過剰発現マウスや、KOマウスの解析によって病態への意義の解明が期待できる。

#### 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 1 件)

小林祥子、福原淳範、田口貴史、松田守弘、栩野 義博、大月道夫、下村伊一郎

Identification of a new secretory factor, CCDC3, in adipocytes and endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun

2009 Dec 29

査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福原 淳範 (FUKUHARA ATSUNORI)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：00437328

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

松田 守弘 (MATSUDA MORIHIRO)

国立病院機構呉医療センター・臨床研究部・

臨床研究部室長

研究者番号：00362591