

令和 5 年 8 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09001

研究課題名(和文) 血管・脂肪組織由来新規分泌因子Favineの機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis on Favine, Fat and Vessel-derived Secretory Protein

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって我々の同定した血管・脂肪組織由来分泌因子Favineのあらたな作用を見出しました。動脈硬化モデルマウスのアポリポ蛋白質E欠損マウスにおいて、Favineの欠損は動脈硬化を進行させ、石灰化と血栓形成を誘発することを明らかにしました。アポリポ蛋白質EおよびFavineを共に欠損したマウス大動脈の遺伝子発現変化は、不安定化プラークを有するヒト動脈硬化症の遺伝子発現変化と酷似することが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管・組織由来分泌因子Favineが血管保護・血栓形成制御作用を有することを明らかにしました。Favineの動脈硬化および血栓形成への作用機序のさらなる解明は、既存の脂質降下を介した動脈硬化進展抑制治療や出血の副作用を併せ持つ血小板活性化抑制による抗血小板剤とは異なる、画期的な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ます。

研究成果の概要(英文)：We uncovered the important contribution of Favine on atherosclerosis. Favine deficiency in apolipoprotein E KO mice accelerated atherosclerosis accompanied by calcification and thrombus. Gene expression changes in the aortas of Favine/Apolipoprotein E double knockout mice resembled those with human unstable atherosclerotic plaques.

研究分野：動脈硬化

キーワード：Favine 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Favine は脂肪組織と大動脈に高発現する。Favine は脂肪細胞分化促進作用および脂肪合成促進作用を有することが我々のこれまでの研究から明らかとなったが、血管における作用は不明であった(文献 1,2)。培養脂肪細胞においては、Favine 過剰発現により PPAR の発現が亢進し、逆に Favine の抑制により PPAR の発現が低下する。脂肪細胞と同様に血管内皮細胞 HUVEC においても Favine 遺伝子は PPAR agonist によって発現が誘導され、TNF によって発現が低下する。TNF は PPAR 活性を低下させる。これらの結果から、Favine が血管においても PPAR 活性制御に関与している可能性を想定した。血管における PPAR の作用として、血管平滑筋増殖抑制と血小板凝集抑制 血管内皮細胞における MMP、VCAM-1、ICAM-1 など接着因子の抑制、抗血栓作用、酸化ストレスの軽減など多面的な作用が解明されつつあった(Circ Res, 2008)(J. Cardiol, 2015)。ヒトの心血管疾患の原因となる因子や自然歴を大規模集団において長期間観察することを目的とした Framingham study における SNP 解析から、Favine 遺伝子変異が血小板凝集能と相関することが報告された(Nat Genet 2012)。このことは、Favine が心血管疾患の発症、進展に関与する可能性を高く示唆された。上記の経緯から、Favine が動脈硬化に関与する可能性およびそのメカニズムとして PPAR 活性も制御している可能性の存在を想定し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

Favine の(1)動脈硬化への作用、(2)血栓形成/凝固線溶に対する作用、(3)脂肪細胞分化促進、脂肪合成促進作用のメカニズム解明、(4)血中濃度測定系の開発、(5)Favine 受容体の同定を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Favine の動脈硬化への作用

Favine 欠損マウスと Apolipoprotein E 欠損(ApoE KO)マウスを交配して作成した Favine/ApoE ダブル欠損(DKO)マウスに対し、高コレステロール食を負荷し、大動脈の遺伝子発現変化ならびに大動脈の組織学的評価を行った。DKO マウスは ApoE KO マウスに比して、動脈硬化のプラークが増大し、血管の石灰化が進行し、さらに血栓形成傾向を有することが示された(図1)(図2)(図3)。

ApoE KO Favine/ApoE DKO

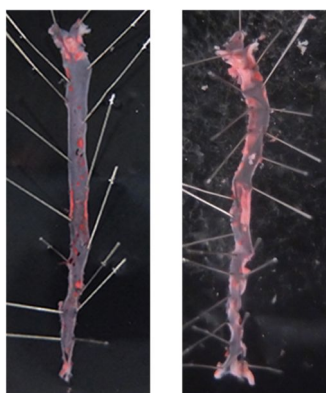


図1. 大動脈 Oil Red O 染色
Favine 欠損により動脈硬化が悪化

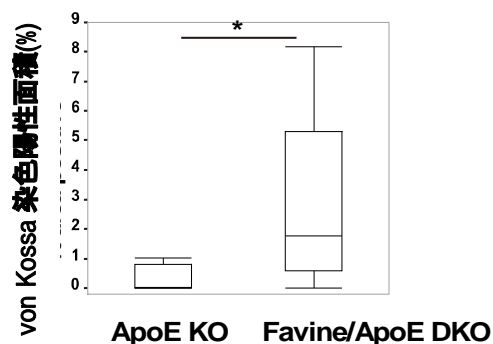


図2. 大動脈石灰化評価
Favine 欠損により石灰化が増強する

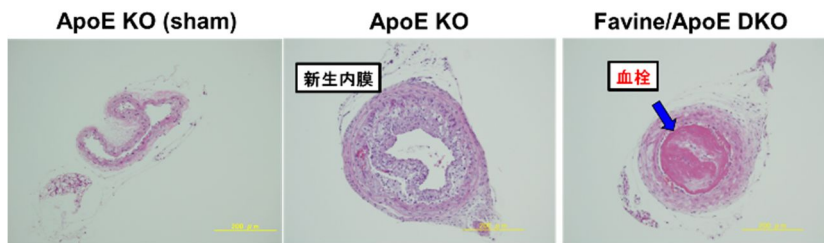


図 3. DKO マウスの血栓

Favine 欠損により、頸動脈結紮時に血栓(矢印)が形成される

ApoE KO マウスと DKO マウスでは、動脈硬化惹起因子として知られる糖代謝ならびに脂質代謝に関する血中パラメーターには差が見られなかった。そこで、DKO マウスの動脈硬化増悪と血栓形成増悪のメカニズムを明らかにするため、大動脈の RNA-Seq 解析を行った。RNA-Seq 解析から、DKO マウス大動脈の遺伝子発現変動の上流制御因子として Myocyte-specific enhancer factor 2c (MEF2C) が導き出された。MEF2C は血管の機能恒常性に重要な転写因子であり、MEF2C の下流因子として転写因子 Kruppel-like Factor 2 (KLF) 2 が知られる。MEF2C と KLF2 は、動脈硬化および血栓形成に關与する PAI-1 や Thrombomodulin の発現を制御する。大動脈 RNA-Seq 解析で得られた知見を基に血管内皮細胞 HUVEC に対して Favine 遺伝子発現抑制を行った。Favine 抑制により MEF2C と KLF2 の遺伝子発現低下、そして下流の PAI-1 や Thrombomodulin 遺伝子の変化を確認した(図 4)。

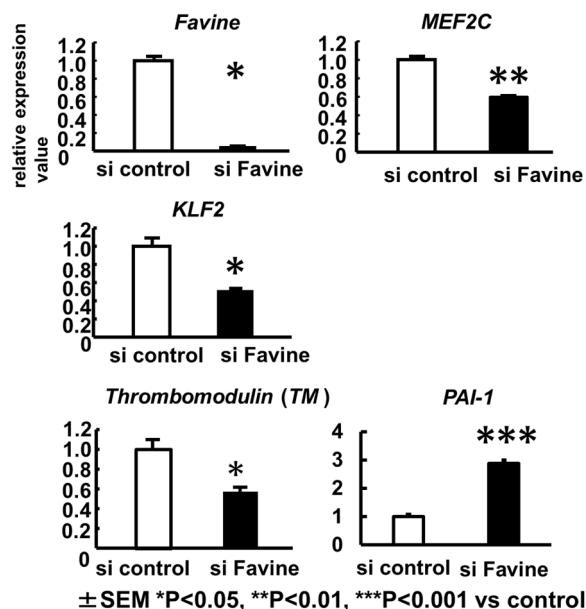


図 4. HUVEC における Favine 遺伝子抑制実験

Favine 欠損により、MEF2C-KLF2 経路の遺伝子発現が変化する

(2) 血栓形成/凝固線溶に対する作用

Favine 欠損マウスの血小板凝集能、凝固・線溶系の評価を開始した。マウスの血小板機能解析には、多数の個体を必要とするため、マウスの継続的な繁殖が必要であり、現在も検討を続けている。

(3) 脂肪細胞分化促進、脂肪合成促進作用のメカニズム解明

組換え Favine を添加した脂肪細胞または Favine 過剰発現脂肪細胞における RNA-seq 解析を行い、脂肪細胞分化カスケードを評価し、Favine の直接標的因子を同定することを計画し、解析検体を準備した。実際の解析は現在進行中である。

(4) 血中濃度測定系の開発

Favine の ELISA 系の開発を行った。野生型のマウス血液中には Favine が 60 ~ 80pg/ml の濃度で存在することが明らかとなりつつある (文献 3)

(5) Favine 受容体の同定

脂肪、血管、肝臓を Favine 標的細胞として想定し、受容体探索を計画した。タグ標識 Favine を作製し、Favine 受容体同定の準備を行った。Favine 受容体の同定は現在進行中である。

4. 研究成果

血管・組織由来分泌因子 Favine が血管保護・血栓形成制御作用を有することを明らかにした。具体的には、動脈硬化モデルマウス ApoE 欠損マウスと Favine 欠損マウスを交配して作出した ApoE/Favine 欠損マウスは、ApoE 欠損マウスより動脈硬化が増悪し、石灰化が亢進することを見出した。さらに ApoE/Favine 欠損マウスは血栓形成が促進することも見出した。in vitro 解析では、血管内皮細胞における Favine 遺伝子発現抑制により、動脈硬化や血栓形成に関わる遺伝子群の発現が上昇することを示した。これまでの知見に関して「動脈硬化性疾患予防用組成物、血小板凝集抑制用組成物及び血栓形成抑制用組成物」として特許を申請した(特願 2019-077802)。研究成果に関して論文報告を行った(文献 3)。

これまで生体において Favine 以外で単一因子の欠損により血栓形成および血管石灰化が見られた報告はない。Favine の動脈硬化および血栓形成への作用機序の解明は、既存の脂質降下を介した動脈硬化進展抑制治療や出血の副作用を併せ持つ血小板活性化抑制による抗血小板剤とは異なる、画期的な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。

[引用文献]

1. 小林祥子、福原淳範、田口貴史、松田守弘、棚野義博、大月道夫、下村伊一郎
“ Identification of a new secretory factor, CCDC3/Favine, in adipocytes and endothelial cells.”
Biochem Biophys Res Commun. 392,2010,
29-35
2. 小林祥子、福原淳範、大月道夫、菅波孝祥、小川佳宏、森井英一、下村伊一郎
“ Fat/vessel-derived secretory protein (Favine)/CCDC3 is involved in lipid accumulation.”
The Journal of biological chemistry 290(12) 2015,7443-51
3. 小林祥子、喜多俊文、奥崎大介、藤島裕也、大月道夫、加藤恒、西澤恭子、宮下かずや、横山知永子、福原淳範、森井英一、下村伊一郎
“ Favine/CCDC3 deficiency accelerated atherosclerosis and thrombus formation is associated with decreased MEF2C-KLF2 pathway.”
iScience 25(11), 2022, 105252-105252

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小林祥子、喜多俊文、奥崎大介、藤島裕也、大月道夫、加藤恒、西澤恭子、宮下かずや、横山知永子、福原淳範、森井英一、下村伊一郎	4. 巻 25
2. 論文標題 Favine/CCDC3 deficiency accelerated atherosclerosis and thrombus formation is associated with decreased MEF2C-KLF2 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林祥子、加藤恒、喜多俊文、奥崎大介、藤島裕也、西澤恭子、大月道夫、福原淳範、森井英一、下村伊一郎
2. 発表標題 血管・脂肪由来分泌因子Favineの機能解析
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林祥子、喜多俊文、福原淳範、加藤恒、森井英一、下村伊一郎
2. 発表標題 血管および脂肪組織由来分泌因子Favineの機能解析
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林祥子、喜多俊文、福原淳範、大月道夫、加藤恒、森井英一、下村伊一郎
2. 発表標題 Functional Analysis on Favine/CCDC3
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林祥子、加藤恒、福原淳範、喜多俊文、大月道夫、森井英一、下村伊一郎
2. 発表標題 血管・脂肪由来分泌因子Favineの機能解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林祥子、早川友朗、林令子、奥野陽亮、福原淳範、大月道夫、森井英一、下村伊一郎
2. 発表標題 脂肪組織・血管由来分泌因子Favineの機能探索
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 動脈硬化性疾患予防用組成物、血小板凝集抑制用組成物及び血栓形成抑制用組成物	発明者 小林祥子、加藤恒、森井英一、福原淳範、喜多俊文、下村	権利者 大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-077802	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	大月 道夫 (Otsuki Michio) (00403056)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	削除：2021年7月12日
研究分担者	福原 淳範 (Fukuhara Atsunori) (00437328)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	森井 英一 (Morii Eiichi)		
研究協力者	加藤 恒 (Kato Hisashi)		

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