

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34423

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11660

研究課題名（和文）新規臓器間ネットワーク因子の同定とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Identification and Mechanistic Analysis of Novel Inter-Organ Network Factors

研究代表者

向井 貴子（MUKAI, Takako）

帝塚山学院大学・人間科学部・助手

研究者番号：60701464

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）：本研究では、分泌型糖タンパク質CREG1が臓器間ネットワークを担う内分泌因子として広く全身性に働いていることを明らかにすることを目的とした。その結果、CREG1が環境条件や栄養状態に応じて発現し、特定臓器由来のCREG1が他の臓器の遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなった。また、CREG1の取込みに、IGF2受容体非依存的な経路が存在することが示唆された。さらに、CREG1の発現制御機構の解析から、CREG1の発現を誘導する複数の植物由来成分を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器間ネットワークは多臓器生物が恒常性を維持する上で欠かせないシステムである。本研究では、CREG1を臓器間ネットワーク因子として捉え、機能解析を行い、特定の臓器由来のCREG1が他臓器の遺伝子発現に影響を与えることを示した。本研究結果は、新たな臓器間連携の解明につながる学術的に意義を有する。また、CREG1の発現を誘導する複数の植物由来成分を明らかにした。臓器間ネットワーク因子としての性質や、これまで報告されたきたCREG1の様々な生理作用を考えると、本研究結果は生活習慣病の予防・治療薬の開発基盤となり、健康長寿社会の構築に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The secreted glycoprotein CREG1 is involved in various cellular functions. This study aims to elucidate the systemic role of CREG1 as an endocrine factor mediating inter-organ networks. Our findings reveal that CREG1 expression is modulated by environmental conditions and nutritional status, and that CREG1 originating from specific organs influences gene expression in other organs. The results also suggested the existence of an IGF2 receptor-independent CREG1 uptake pathway. Furthermore, we identified several plant-derived components that induce CREG1 expression.

研究分野：健康科学

キーワード：CREG1 ヘパトカイン バトカイン 褐色脂肪

1. 研究開始当初の背景

臓器同士が内分泌因子を介して直接的に情報のやり取りを行う仕組み、臓器間ネットワークが、個体の恒常性維持に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた。多臓器生物が、様々な環境や栄養状態の中で恒常性を維持し、健康に生命活動を営んでいくためには、各臓器が調和を保ちながら代謝活動を行う必要がある。そのため、我々の体内では、臓器間ネットワークを担う内分泌因子が、環境条件や栄養状態に応じて分泌され、標的臓器で様々な生理作用を引き起こすことで調和を保ち、個体の健康が維持されている。故に、これら臓器間ネットワーク因子の分泌異常やシグナルの破綻は、糖尿病や肥満症などの生活習慣病や、サルコペニアやフレイルなどの加齢性疾患に深く関与している。研究開始当初においては、肝臓-筋肉、心臓-脳-腎臓、脂肪-肝臓などの臓器間連携が報告されていた。

申請者は、分泌型糖タンパク質 Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1(以下 CREG1)が褐色脂肪細胞の分化促進作用を有することを報告した (FASEB J 2019, JB 2019)。その研究課程において、褐色脂肪組織と肝臓の CREG1 発現量が環境条件や栄養状態によって有意に変化することや、浸透圧ポンプによる精製 CREG1 タンパク質の皮下投与、及び肝臓や脂肪組織における CREG1 の過剰発現が、脂肪肝改善作用、抗肥満作用、及び全身の糖代謝改善作用を示すことを見出し、CREG1 が内分泌因子として広く全身性に働く可能性を考えるに至った。研究開始当初において CREG1 の作用については、申請者が明らかにした褐色脂肪化作用の他、細胞の分化・増殖、炎症応答、アポトーシス抑制作用、オートファジー活性化作用や線維化抑制作用などが報告されていた。しかし、臓器間ネットワーク因子を担う内分泌因子としての CREG1 の研究はなされていなかった。

2. 研究の目的

上述のように、臓器間ネットワークは多臓器生物が恒常性を維持する上で欠かせないシステムである。本研究では、臓器間ネットワーク因子として CREG1 を捉え、どのような条件で分泌され、どの臓器で、どのような作用を引き起こすのかに焦点を当てた研究を行い、新規臓器間ネットワーク因子としての CREG1 の働きを明らかにすることを目的とし、そのメカニズムの解明と、応用化に向けた分子基盤の構築を行う。本研究成果は、CREG1 を利用した生活習慣病治療薬、老化予防薬の開発基盤となり、近い将来訪れる超高齢化社会にも貢献できると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、新規臓器間ネットワーク因子としての CREG1 の働きを明らかにすること、及び応用化に向けた分子基盤の構築を行うことを目的とし、下記の3項目を柱とした研究を実施した。(1) CREG1 の発現条件、標的臓器、生理作用の検討、(2) CREG1 の取込み機構・作用メカニズムの解明、(3) CREG1 の発現制御機構の解明

(1) 動物実験

実験動物として C57BL/6J(雄)マウスを用いた。通常食として CE-2、高脂肪食には D12451 を用い、自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。

(2) CREG1 抑制アデノ随伴ウイルスの作製と投与

CREG1 抑制アデノ随伴ウイルスベクターの作製には AAVpro Helper Free System を用いた。HEK293T 細胞を用いて CREG1 抑制アデノ随伴ウイルスを産生させ、AAVpro Purification Kit を用いて精製した。CREG1 抑制アデノ随伴ウイルスベクターの各組織への投与には 8 週齢の C57BL/6J(雄)マウスを用いた。褐色脂肪組織への投与においては麻酔下で剃毛後、肩甲骨の上の皮膚を切開し、肩甲骨間褐色脂肪組織に CREG1 抑制アデノ随伴ウイルスベクターを直接投与した。鼠径部皮下脂肪組織への投与においては、麻酔科で脂肪組織を確認後、皮膚の上から直接投与した。肝臓への投与においては、静脈より投与した。

(3) 細胞実験

褐色脂肪のモデル細胞である C3H10T1/2 細胞を用いた。CREG1 のノックダウンには Stealth RNAi を使用し、Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent を用いて細胞に導入した。導入翌日に培地を交換し実験に供した。

(5) レポーターアッセイ

マウス CREG1 遺伝子上流、2kb~5 kb をクローニングし、レポーター遺伝子を作成した。CREG1 プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを COS7 細胞、及び C3H10T1/2 細胞に導入した。24 時間培養後、試験物質を含んだ培地、あるいは精製 CREG1 を添加した。さらに 24 時間培養した後、細胞を溶解し CREG1 プロモーター活性を測定した。本研究における動物実験、及び遺伝子組換え実験は、帝塚山学院大学の動物実験委員会、及び組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けその規定に従って行った。

4. 研究成果

(1) CREG1 の発現条件、標的臓器、生理作用の検討

(1)-1 CREG1 の発現条件の検討

臓器間ネットワーク因子として CREG1 が担うシグナルに関しての手掛かりを得るために、寒冷、及び絶食条件下における各組織の CREG1 発現量を検討した。寒冷環境下での CREG1 発現のタイムコースを検討したところ、肝臓、内臓脂肪(EWAT)における CREG1 の発現量は寒冷によってほとんど変化しなかったが、褐色脂肪組織(BAT)、鼠径部皮下脂肪組織(IWAT)における CREG1 の発現は寒冷一週間後をピークとして、それぞれ 5.4 倍、2.2 倍に上昇した。一方、絶食条件下においては、肝臓における CREG1 の発現は 1.6 倍に上昇したが、その他の組織における CREG1 発現量はほとんど変化しなかった。また、肝臓における CREG1 の発現上昇は再摂食 4 時間後には元のレベルに戻った。このことから、CREG1 の発現は組織特異的に、寒冷、及び栄養シグナルを担っている可能性が示唆された。

(1)-2 特定臓器の CREG1 が他臓器に与える影響

脂肪組織における CREG1 の発現が寒冷条件下で上昇することから、BAT、IWAT、EWAT、肝臓間の CREG1 を介したネットワークについて、組織特異的 CREG1 抑制実験により検討した。BAT における CREG1 の抑制により、IWAT における UCP1 発現は減少傾向を示し、EWAT における FGF21 発現量は有意に上昇した。IWAT における CREG1 発現抑制は他の臓器に影響を与えなかったが、肝臓における CREG1 発現の抑制により、IWAT の CREG1、FGF21 発現量に上昇傾向が認められた。以上より、特定臓器由来の CREG1 が他の臓器の遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。

(1)-3 CREG1 を介した臓器間ネットワークの生理的意義の検討

これまでの研究から、CREG1 は褐色脂肪化(ベージュ化)や脂肪肝の発症に関与していることが示されている。そこで褐色脂肪組織由来 CREG1 の脂肪肝への影響、及び肝臓由来 CREG1 のベージュ化への影響を検討した。マウスを高脂肪食で 2 ヶ月間飼育後、BAT 特異的に CREG1 を抑制し、さらに 2 ヶ月間高脂肪食で飼育し脂肪肝形成を促進させた。その結果、肝重量、肝中脂質量に有意な差は認められなかった。従って、BAT 由来の CREG1 は脂肪肝の形成には影響しないと考えられた。一方、肝臓特異的に CREG1 を抑制したマウスを寒冷環境下で 1 週間飼育し、ベージュ化マーカーである UCP1 の各脂肪組織における発現量を検討した。その結果、BAT、及び IWAT における、UCP1 発現量に変化は認められなかったものの、EWAT の UCP1 発現量は 30%にまで有意に減少した。従って、肝臓由来 CREG1 は、内分泌因子として働き、寒冷時における EWAT のベージュ化に関与することが示唆された。

(2) CREG1 の取込み機構・作用メカニズムの解明

ウエスタンブロッティング、及び免疫細胞染色法により CREG1 の細胞取込みを検討した。ウエスタンブロッティングの結果、細胞外の CREG1 は約 2 時間で細胞内に取込まれることが確認された。また、細胞外 CREG1 の取込みは免疫細胞染色でも検出された。CREG1 の受容体として IGF2 受容体が報告されている。そこで、IGF2 受容体をノックダウンし CREG1 の取込みを検討した。その結果、IGF2 受容体の発現を抑制した状態でも、CREG1 の取込みが認められ、IGF2 受容体非依存的な CREG1 の取込み機構の存在が示唆された。IGF2 受容体非依存的な CREG1 の取込み機構の解明を目的とし、細胞表面ビオチン化アッセイ、及び免疫沈降実験を実施した。しかしながら、CREG1 の取込みに関わる分子を得ることはできなかった。原因の一因として、抗体の性能不足が考えられたことから、新たに抗 CREG1 抗体を作製した。今後、本抗体を用いて、CREG1 の取込み・作用メカニズムについて明らかにしていきたい。

(3) CREG1 の発現制御機構の解明

C3H10T1/2 細胞を用いて、細胞内シグナルに関係した種々のアゴニスト、及び培養条件を変化させ、CREG1 の発現条件を検討した。その結果、CREG1 の発現は低栄養条件下において有意に上昇した。この結果は、上記(1)-1 において絶食時に肝臓の CREG1 が発現上昇するという動物実験の結果に一致している。CREG1 はオートファジーに関与していることが示唆されていることから、オートファジー特異的誘導ペプチドである Tat-Beclin1 D11 による刺激を行った。その結果、CREG1 の発現は有意に上昇し、オートファジー誘導が CREG1 の発現誘導因子の一つであることが明らかとなった。さらに、応用化を目指し、オートファジー誘導性が報告されている植物由来成分について検討を行い、CREG1 誘導作用を持ついくつかの物質を確定した。CREG1 の発現制御機構、及びハイスループットなスクリーニング系の確立を目的として、CREG1 の上流領域を含むレポーター遺伝子を作製した。今後、さらに詳細な発現制御メカニズムについて解析を進める。

以上、本研究より、CREG1 が新規臓器間ネットワーク因子として働くことが示された。また、オートファジー誘導経路による発現誘導、及びこの経路を刺激する植物由来成分の同定など、応用基盤に繋がる成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	楠堂 達也 (KUSUDO Tatsuya) (00460535)	帝塚山学院大学・人間科学部・准教授 (34423)	

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