

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390241

研究課題名(和文) Vaspinのメタボリック症候群における意義と創薬への展開

研究課題名(英文) The significance of vaspin in metabolic syndrome and drug discovery

研究代表者

和田 淳 (Wada, Jun)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30294408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：Vaspinは肥満ラットの内臓脂肪から発見したアディポサイトカインである。メタボリックシンドロームにおいてインスリン抵抗性を改善し、動脈硬化の進展を抑制する代償因子であるとの結論に至った。Vaspinはヒトの血中にも存在し、体格指数やインスリン抵抗性指数と正の相関を認め、2型糖尿病でも血中濃度が増加している。アディポネクチンやレプチンとは異なった血中濃度動態を示しておりメタボリック症候群治療の新たな分子ターゲットである。

研究成果の概要(英文)：Vaspin is a novel adipocytokine, which was identified from visceral adipose tissue in obese rats. Vaspin ameliorates the insulin resistance and development of atherosclerosis in metabolic syndrome. Vaspin circulates in the sera of human subjects and it positively correlated with body mass index and degree of insulin resistance. Serum levels of vaspin were higher in patients with type 2 diabetes compared with normal healthy subjects. The regulation of serum concentration of vaspin is different from leptin and adiponectin, and vaspin may be a new therapeutic target for metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム インスリン抵抗性 アディポカイン バスピン 糖尿病 脂質異常症 高血圧 肥満症

1. 研究開始当初の背景

我々はメタボリック症候群の病態に深く関与するアディポサイトカインを同定するために、内臓脂肪蓄積を来し2型糖尿病・高血圧・脂質異常症を発症する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて内臓脂肪特異的な遺伝子群のスクリーニングを行った (Hida K and Wada J, *J Lipid Res* 41, 1615-1622, 2000)。その結果我々が発見した vaspin (visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) はラット・マウス・ヒトで保存され、 α 1-antitrypsin と40.5%のホモロジーを有し、その構造から serpin (serine protease inhibitor) 遺伝子ファミリーに属する新規アディポカインであることが判明した (Hida K and Wada J, *PNAS* 102, 10610-10615, 2005)。

2. 研究の目的

Vaspin の発見から今までの機能解析から vaspin はメタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性、脂肪肝、脂質代謝異常、動脈硬化を改善する代償因子であるという仮説に到達した。本研究ではまずこの代償メカニズムを遺伝子改変動物によって明らかにすることを目的とした。次にヒト糖尿病や肥満症患者の血中濃度の測定を行い臨床指標との相関を検討した。

3. 研究の方法

Vaspin リコンビナント蛋白を産生し Diet-induced obesity (DIO) 糖尿病マウスあるいは db/db マウスに投与して糖代謝への影響を検討した。さらに AP2 プロモータを用いて脂肪細胞に vaspin を過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg)、vaspin ノックアウトマウス (KO) を作製し

た。これらの遺伝子改変動物を高脂肪高蔗糖食に供し、肥満・糖代謝・脂質代謝に対する影響を検討した。さらにヒトの血中 vaspin 濃度を測定するために vaspin リコンビナント蛋白を産生し、ポリクローナル抗体を作製しミリポア社 (Linco 社) と RIA の測定系を開発した。

4. 研究成果

肥満・2型糖尿病動物モデルである OLETF ラット内臓脂肪組織からアディポカインである visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin) を同定した (*PNAS*, 2005)。AP2 プロモーターを用いたトランスジェニック (Tg) マウスでは高脂肪高蔗糖 (HFHS) 飼育時の体重増加が野生型 (WT) に比べて20週齢で約8%抑制され、糖負荷テストおよびインスリン負荷テストでインスリン抵抗性の改善を認めた。また HFHS 飼育下の肝臓中性脂肪含量は Tg マウスで有意に低値であった。逆に vaspin ノックアウト (KO) マウスでは WT と比較して HFHS 飼育時の体重増加を認め、また糖・インスリン負荷試験で、インスリン抵抗性の悪化を認めた (*Diabetes*, 2012)。さらに肝臓においてバスピンは細胞膜表面の MTJ-1/GRP78 複合体に結合し、小胞体ストレスを解消するとともに Akt シグナルを増強することによってインスリン抵抗性を改善すると報告した (*Diabetes*, 2012)。また日本人における血清バスピ濃度を検討したところ93%で0.2-3ng/ml、7%では10-40ng/mlと高値であり、それはバスピ遺伝子イントロン2に存在する rs77060950 によって規定されていた [CC (0.6 ± 0.4 ng/ml), CA (18.4 ± 9.6 ng/ml), AA (30.5 ± 5.1 ng/ml)]。バスピ血中濃度は2型糖尿病患者 (n=275)、肥満者を含む日本人 (n=1138) いずれの集団におい

てもインスリン抵抗性指標(HOMA-IR)と正の相関を呈した(JCEM, 2012)。

ストレプトゾトシン誘発糖尿病Wistarラットの内頸動脈にバルーン擦過モデルを作製、バスピンをアデノウイルスで導入したところ内膜肥厚が改善された。さらにバスピンTgマウスにおける大腿動脈カフ障害モデルにおいても内膜肥厚が改善された。ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)からバスピン相互作用分子をTandem affinity tag purification法によって精製しLC-MS/MS解析をしたところ、小胞体ストレス関連分子の一つであるglucose regulated protein 78 (GRP78)を同定し両者の結合をpull-down assayにより確認した。5 μ M thapsigarginで小胞体ストレスを誘導するとGRP78が小胞体分画から細胞膜分画に移動することが知られているが、HAECをthapsigarginで処理することによって $K_d=0.565 \times 10^{-9}$ Mの高親和性結合を認めた。GRP78には疎水性膜ドメインがないが、細胞膜上のアンカープロテインである voltage-dependent anion channel (VDAC)と結合することが報告されている。バスピン/GRP78/VDAC複合体の存在が大動脈細胞膜分画を用いた免疫沈降法によって確認された。Kringle 5はGRP78/VDAC複合体のリガンドであり、細胞内Ca濃度の上昇と血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するが、バスピンはKringle 5とGRP78/VDAC複合体との結合に競合し、細胞内Ca濃度の上昇と血管内皮細胞のアポトーシス誘導を抑制した。肝細胞や血管内皮細胞における小胞体ストレスによって細胞表面に移動した

GRP78 複合体にバスピンが結合し、細胞内シグナルや小胞体ストレスを制御することによってインスリン抵抗性や動脈硬化を改善すると考えられる。

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21件)

Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. *PLoS ONE* 9(3), e92647, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0092647.

Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines. *PLoS ONE* 9(1), e85594, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0085594.

Nakayama K, Nakao K, Takatori Y, Inoue J, Kojo S, Akagi S, Fukushima M, Wada J, Makino H. Long-term effect of cinacalcet hydrochloride on abdominal aortic calcification in patients on hemodialysis with secondary hyperparathyroidism. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7,25-33, 2013, 査読有, doi: 10.2147/IJNRD.S54731.

Tachibana H, Ogawa D, Sogawa N, Asanuma M, Miyazaki I, Terami N, Hatanaka T, Horiguchi CS, Nakatsuka A, Eguchi J, Wada J, Yamada H, Takei K, Makino H. Metallothionein deficiency exacerbates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F105-F115, 2014, 査読有, doi: 10.1152/ajprenal.00034.2013.

Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013, 査読有, doi: 10.2147/IJNRD.S51829.

Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H. Urinary fetuin-A is a novel marker for

diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0077118.

Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013, 査読有, doi: 10.1186/1471-2369-14-23.

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013, 査読有, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300049.

Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2012, 査読有, doi: 10.1159/000343102.

Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012, 査読有, doi: 10.1186/1471-2369-13-163.

Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Horiguchi CS, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver X receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012, 査読有, doi: 10.1681/ASN.2012010022.

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012, 査読有, doi: 10.2337/db12-0232.

Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA,

Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013, 査読有, doi: 10.1177/1479164112444640.

Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012, 査読有, doi: 10.2147/IJNRD.S32191.

Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012, 査読有, doi: 10.1002/hep.25782.

Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012, 査読有, doi: 10.1210/jc.2011-3297.

Kanzaki M, Wada J, Sugiyama K, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Eguchi J, Akiba H, Yagita H, Makino H. Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology* 153(2), 612-620, 2012, 査読有, doi: 10.1210/en.2011-1579.

Hida K, Poulsen P, Teshigawara S, Nilsson E, Friedrichsen M, Ribel-Madsen R, Grunnet L, Lund SS, Wada J, Vaag A. Impact of circulating vaspin levels on metabolic variables in elderly twins. *Diabetologia* 55(2), 530-532, 2012, 査読有, doi: 10.1007/s00125-011-2385-0.

Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the

p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012, 査読有, doi: 10.1002/path.3001.

Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res* 2011:534872, 2011, 査読有, doi: 10.1155/2011/534872.

- 21 Takatori Y, Akagi S, Sugiyama H, Inoue J, Kojo S, Morinaga H, Nakao K, Wada J, Makino H. Icodextrin increases technique survival rate in peritoneal dialysis patients with diabetic nephropathy by improving body fluid management: a randomized controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(6), 1337-1344, 2011, 査読有, doi: 10.2215/CJN.10041110.

〔学会発表〕(計9件)

Murakami K, Wada J, Eguchi J, Ogawa D, Terami T, Terami N, Makino H. ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) / CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. *ADA 73th Scientific Session*. (Chicago) June 23, 2013

Nakatsuka A, Wada J, Murakami K, Terami T, Eguchi J, Ogawa D, Makino H. Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. *ADA 73th Scientific Session*. June 23, 2013 (Chicago)

Ogawa D, Eguchi J, Tachibana H, Sato-Horiguchi C, Hatanaka T, Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. *ADA 73th Scientific Session*. June 22, 2013 (Chicago)

Katayama A, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Teshigawara S, Terami T, Inoue K, Hida K, Makino H: T Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver diseases in obesity. *Keystone Symposia 'Adipose Tissue Biology'*, Jan 27-Feb 1, 2013 (Keystone, Colorado, USA)

Teshigawara S, Wada J, Kanzaki M, Nakatsuka A, Murakami K, Katayama A, Terami T, Inoue K, Eguchi J, Makino H: The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. *Keystone Symposia 'Adipose Tissue Biology'*, Jan 27-Feb 1,

2013 (Keystone, Colorado, USA)

Nakatsuka A, Wada J, Murakami K, Kanzaki M, Terami T, Katayama A, Eguchi J, Makino H: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency improves obesity and insulin resistance associated with unexpected progression of steatohepatitis. *Keystone Symposia 'Adipose Tissue Biology'*, Jan 27-Feb 1, 2013 (Keystone, Colorado, USA)

Wada J: Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. *International Symposium for the Study of Obesity "Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity"* Oct 13-14, 2012, (Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto) (Invited)

Kanzaki M, Wada J, Nakatsuka A, Murakami K, Teshigawara S, Katayama A, Terami T, Inoue K, Eguchi J, Makino H: The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome; Modulation of inflammatory responses in liver and adipose tissue. *Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation*, Feb 1, 2012 (Santa Fe, New Mexico, USA)

Nakatsuka A, Wada J, Murakami K, Kanzaki M, Terami T, Katayama A, Eguchi J, Makino H: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but aggravates non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation*, Feb 1, 2012 (Santa Fe, New Mexico, USA)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

和田 淳 (WADA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30294408