

## 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：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790926

研究課題名(和文)小胞体ストレスを介したVaspinのメタボリックシンドローム制御機構の解明

研究課題名(英文)The beneficial role of vaspin in metabolic syndrome by amelioration of ER stress

研究代表者

中司 敦子(Nakatsuka, Atsuko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00625949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Vaspinの遺伝子改変マウスの検討や培養実験により、vaspinが肥満やインスリン抵抗性・脂肪肝・動脈硬化を抑制することを明らかにした。Vaspinは肝臓や血管内皮細胞の細胞表面に存在するGRP78と結合する。肝臓では肝細胞表面のGRP78/MTJ-1複合体に結合してAktやAMPKリン酸化を亢進させ、糖脂質代謝を改善する。血管では、vaspinは血管内皮細胞表面のGRP78/VDAC複合体と結合し、VDACのリガンドとして知られるkringle 5がVDACを介して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させアポトーシスを起こす経路を阻害し、またAktリン酸化を亢進させ、内皮細胞のアポトーシスを抑制する。

研究成果の概要(英文)：To study the role of vaspin, we generated vaspin transgenic (Tg) mice and vaspin knockout (KO) mice. Under high fat-high sucrose diet, the obesity, insulin resistance and fatty liver were ameliorated in Tg mice, while they were exacerbated in KO mice. We identified GRP78 as a vaspin-interacting molecule, and GRP78 forms complex with anchor proteins on the plasma membrane. On hepatocytes, vaspin interacts with GRP78/MTJ-1 complex and enhance the phosphorylation of Akt and AMPK, and improves glucose and lipid metabolism. Next, we studied the role of vaspin on atherosclerosis. Vaspin inhibited arterial intimal thickening of balloon injured and cuff-injured vessels of rodent model. Vaspin binds to GRP78/VDAC complex on vascular endothelial cells and competes with the known VDAC ligand, kringle 5. Vaspin inhibits kringle 5-induced apoptosis pathway and enhances the phosphorylation of Akt. Subsequently, vaspin inhibits apoptosis of vascular endothelial cells.

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 動脈硬化 小胞体ストレス アポトーシス アディポカイン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、内臓脂肪は内分泌臓器の一つとして認識され、脂肪細胞から分泌される生理活性を有するアディポカインが他臓器に作用することで全身の糖脂質代謝、さらには慢性炎症にも関与していることが明らかになってきた。これまでに Leptin, tumor necrotic factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), acylation-stimulating protein (ASP), adiponectin, resistin, retinol binding protein-4 (RBP-4), chemerin, Sfrp5 などの分泌蛋白がアディポカインとして同定されており、脂肪細胞肥大化や脂肪組織の蓄積、インスリン抵抗性や動脈硬化に深く関与すると考えられている。

我々は、メタボリックシンドロームの病態に深く関与する新規アディポカインを同定するために、2型糖尿病・肥満を発症する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用いた遺伝子サブトラクションを行うことにより、内臓脂肪特異的に発現が亢進する遺伝子をスクリーニングした(Hida K, *J Lipid Res* 41, 1616-1622, 2000)。その結果、肥満や糖尿病で内臓脂肪特異的に発現が亢進する遺伝子 Vaspin (visceral adipose tissue derived serine protease inhibitor)を発見した。Vaspin は  $\alpha$ 1-antitrypsin と 40.5%のホモロジーを有し、ヒト・マウス・ラットで保存され、その構造から serpin (serine protease inhibitor)遺伝子ファミリーに属することが判明した(Hida K, *PNAS* 102, 10610-10615, 2005)。

## 2. 研究の目的

我々はVaspinを発見し、その機能解析によって、内臓脂肪細胞から分泌されて、肥満やインスリン抵抗性、脂肪肝さらに動脈硬化を改善する代償因子であることを見出した。そして、vaspinは細胞表面に存在するGlucose Regulated Protein 78 (GRP78)と結合することで細胞内にシグナルを伝達するという仮説に達した。GRP78は通常は小胞体(ER)に局在するシャペロン蛋白であり、細胞表面ではアンカー蛋白と複合体を形成して発現している。

アンカー蛋白は各臓器により様々で、シグナルも異なることが示唆される。本研究では、肝臓や他臓器におけるGRP78のアンカー蛋白を明らかにし、vaspinによるGRP78を介したERストレスの制御という観点で分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

Vaspinトランスジェニック(Tg)、ノックアウト(KO)マウスの解析からvaspinは糖代謝、インスリン抵抗性、脂肪肝を改善させ、GRP78と結合して作用するという仮説に達した。本研究ではまず、マウス肝臓の形質膜蛋白を分離し、形質膜においてvaspinと GRP78・MTJ-1(murine tumor cell DnaJ-like protein 1) が結合することを、免疫沈降やラジオアイソトープラベル化 vaspin ( $^{125}$ I-vaspin)を用いた結合実験で明らかにする。さらにvaspinがGRP78に結合した下流のシグナルとしてAktリン酸化の亢進や、ERストレスの改善 (IRE1, eIF2, PERKなどを検討) を明らかにする。

次に、Tg、KOマウスを用いた大腿動脈のカフ傷害実験、WKYラット頸動脈にバルーン擦過を行いアデノウイルスでvaspinを発現させた場合の内臓肥厚に関する検討を行い、動脈硬化に対するvaspinの作用を検討する。血管内皮細胞の細胞膜分画でvaspinと GRP78, VDAC (voltage dependent anion channel) が複合体を形成すること証明し、アポトーシスアッセイやCa $^{2+}$ アッセイで機序を解明する。

## 4. 研究成果

Vaspin は肝臓の細胞膜表面すなわち形質膜において GRP78, アンカー蛋白である MTJ-1 と複合体を結合していることを明らかにし、さらに vaspin が GRP78・MTJ-1 複合体に結合すると Akt シグナル, AMPK シグナルを増強させ、また小胞体ストレスを軽減することで

糖脂質代謝を改善させるという機序を証明した。

また、WKY ラット頸動脈に擦過を行い、同部位にアデノウイルスを使用した vaspin 遺伝子導入による内膜肥厚の検討や、Tg マウスの大腿動脈カフ傷害実験を行うと、vaspin により血管内膜肥厚が抑制された。そして、vaspin は血管内皮細胞の細胞表面において GRP78/VDAC 複合体に結合することを、培養細胞およびトランスジェニックマウス大動脈を用いた免疫沈降で証明した。VDAC のリガンドとして知られる kringle 5 は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇によるアポトーシスを起こすことが知られている。そこで vaspin と kringle 5 蛋白を用いて、結合実験、ヒト大動脈血管内皮細胞の細胞内カルシウム測定とアポトーシスアッセイを行った。その結果 vaspin は血管内皮細胞表面において、kringle 5 の GRP78/VDAC 複合体への結合を競合阻害し、血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するという作用機序を解明した。

#### 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 14 件)

- 1) Watanabe M\*, Nakatsuka A\*, et al.,: Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92647 \* equally contributed, 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0092647.
- 2) Nakatsuka A, Wada J, et al.,: Visceral Adipose Tissue-derived Serine Proteinase Inhibitor Inhibits Apoptosis of Endothelial Cells as a Ligand for the Cell-Surface GRP78/Voltage-dependent Anion Channel Complex. *Circ Res* 112(5):771-80, 2013 査読有, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300049.

- 3) Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle Abnormality in Metabolic Syndrome and Nuclear Receptors as an Emerging Therapeutic Target. *Acta Med Okayama*. 67(3): 129-134, 2013 査読有, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804135>
- 4) Nakatsuka A, Wada J, et al.,: Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes*. 61(11):2823-32, 2012 査読有, doi: 10.2337/db12-0232.
- 5) Nakatsuka A, Wada J, et al., RXR antagonism induces G0 /G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21<sup>Cip1</sup> pathway in adipocytes. *J Pathol*. 226(5):784-95, 2012 査読有, doi: 10.1002/path.3001.
- 6) Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, et al.,: 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.
- 7) Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, et al., Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 56(3):912-21, 2012 査読有, doi: 10.1002/hep.25782.
- 8) Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, et al., The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 13:163. 2012 査読有, doi: 10.1186/1471-2369-13-163.

[学会発表](計 11 件)

1. 中司敦子, 肥満において PEMT 欠損がもたらす脂肪肝とエビゲノム. 第 34 回日本肥満学会, 2013/10/12, 東京
2. 中司敦子, 慢性血管合併症における Vaspin の意義の解明. 第 28 回日本糖尿病合併症学会, 2013 年 9/14, 旭川
3. 中司敦子, Vaspin による VDAC/GRP78 経路を介した血管内皮細胞アポトーシスの制御. 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2013/9/6, 東京
4. 中司敦子, Vaspin による VDAC/GRP78 経路を介した血管内皮細胞アポトーシスの制御. 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2013/9/6, 東京.
5. Nakatsuka A, Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote steatohepatitis with tumorigenesis. 73<sup>rd</sup> American Diabetes Association. 2013/6/21-6/25, 2013, Chicago,IL, USA
6. 中司敦子, メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)の意義. 第 56 回日本糖尿病学会学術総会 . 2013-5/16 ~ 5/18, 熊本
7. 中司敦子, 糖尿病性腎症における PEMT 阻害の意義. 第 56 回日本腎臓学会学術総会 . 2013-5/10 ~ 5/12, 東京国際フォーラム
8. 中司敦子, Vaspin による小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 . 第 56 回日本腎臓学会学術総会 . 2013-5/10 ~ 5/12 , 東京国際フォーラム
9. Nakatsuka A, N-methyltransferase (PEMT) deficiency improves obesity and insulin resistance associated with unexpected progression of steatohepatitis. Keystone Symposia, Diabetes. 2013/1/27-2/1 Keystone, Colorado, USA.

10. 中司敦子, メタボリックシンドロームにおける PEMT の意義. 第 33 回日本肥満学会, 2012/10/11, 京都
11. 中司敦子, メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)の意義. 第 55 回日本糖尿病学会学術総会 . 2012/5/19, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

中司 敦子 (NAKATSUKA ATSUKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 00625949