

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460696

研究課題名(和文) 肥満関連疾患における第 Ⅶ因子活性化プロテアーゼの役割と病態マーカーとしての有用性

研究課題名(英文) The role of factor seven activating protease in the pathogenesis of obesity-related disorders, and its potential applications as a clinical biomarker

研究代表者

高橋 伸彦 (TAKAHASHI, Nobuhiko)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：20372279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では肥満に関連した代謝性臓器や疾患における第 Ⅶ因子活性化プロテアーゼの役割を調べる目的で研究を行い、骨格筋細胞における第 Ⅶ因子活性化プロテアーゼの遺伝子発現などいくつかの知見を得た。また、検討を進める中で脂肪細胞が第 Ⅶ因子を産生すること、さらに、その分泌は腫瘍壊死因子- α やイソプロテレノールによって増加するという新たな知見を見出した。これらの物質は肥満症の病態形成に重要な組織の炎症や交感神経の緊張を模倣するものであることから、脂肪細胞由来の第 Ⅶ因子は肥満症の病態マーカーとしての可能性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the role of factor seven activating protease in the obesity-related organs and metabolic disorders. We obtained several findings such as gene expression of factor seven activating protease in skeletal muscle cells. During the research period, we discovered a novel finding that adipocytes secrete coagulation factor seven, which is one of substrates of factor seven activating protease. Moreover, the secretion is enhanced by two independent factors, tumor necrosis factor- α and isoproterenol. The factors are implicated as mediators of tissue inflammation and sympathetic activation, both of which are involved in the pathogenesis of obesity. These results suggest that factor seven derived from adipocytes could be a clinical biomarker for the pathogenesis of obesity.

研究分野：代謝・糖尿病学、内科学、臨床検査学

キーワード：肥満症 第Ⅶ因子活性化プロテアーゼ 第Ⅶ因子 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 第 7 因子活性化プロテアーゼ (Factor seven activating protease, 以下 FSAP と略) は 560 アミノ酸残基からなる約 78kDa の分子であり、血清中に存在するセリンプロテアーゼの一種である。FSAP には 1 本鎖の不活性型とジスルフィド結合で架橋された 2 本鎖の活性型があり、FSAP に由来する様々なペプチドの断片が存在する。また、FSAP は当初、ヒアルロン酸に結合する分子として抽出されたことから別名 hyaluronic acid binding protein (HABP2) とも呼ばれる。

(2) FSAP の発現と機能: FSAP の産生について、主要な部位は肝臓であるが、その他に単球および動脈硬化巣に浸潤したマクロファージにおいても産生が認められている。一方、FSAP の機能について、*in vitro* の検討ではその酵素性質として血液凝固第 7 因子やプロウロキナーゼが同定されているが、*in vivo* の検討からは主に線溶系に關与する分子であることが示唆されている。さらに、FSAP は血管の透過性を調節し炎症反応に關与することや細胞死に關与すること、血管平滑筋の増殖や遊走に關与することが報告されている。これらのことから FSAP は動脈硬化症や炎症などの各種病態に關与する可能性が推測される。しかし、種々の病態への關与については明らかではない。

(3) 肥満関連疾患とその病態: 肥満症は糖代謝異常、脂質異常症、脂肪性肝疾患や動脈硬化症と密接に關連し、医学的にも医療的にも重要な疾患である。近年、肥満症において脂肪組織の炎症、つまり炎症細胞の浸潤とそれに伴う脂肪細胞の機能変化が病態として重視されている。

2. 研究の目的

肥満症の中心となる病態が炎症であることをふまえると、炎症への關与が示唆されている FSAP が肥満症や肥満関連疾患の病態形成において何らかの役割を担っているのではないかと考えられる。そこで本研究は肥満症に關連した代謝性疾患と FSAP との關係を、基礎的および臨床的に検討することを目的に据えた。基礎的な検討として、肝細胞やマクロファージ、脂肪細胞、実験動物を用い、FSAP の発現調節機構の解明や FSAP の作用について分子生物学的手法を用い検討を行う。これらのアプローチを通じて、肥満関連疾患における FSAP の血清病態マーカーとしての意義を確立することとした。

3. 研究の方法

肥満に關係した臓器における FSAP の発現の有無、またその調節機構について明らかにする目的で、まず培養細胞をモデルとして研究を始めた。用いた細胞は何れも基礎

研究において頻用されている細胞であり、具体的には、ヒト肝細胞癌細胞株 (Huh7)、ヒト単球-マクロファージ細胞 (THP-1)、マウス脂肪細胞 (3T3-L1)、マウス骨格筋細胞 (C2C12) である。これらの細胞に対して主に代謝機能や炎症に關与する因子を作用させ、種々の変化を検討した。以下に一般的な手法を述べ、特殊な方法は結果の項目に記す。

(1) 遺伝子発現の検討: 処置した細胞より RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて相補的 DNA を合成した。この相補的 DNA を鋳型として定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を行い、各種遺伝子発現量を測定した (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems 社)。

(2) 蛋白発現の検討: 処置した細胞に対して 1% の Triton X-100 をベースとした細胞溶解液で溶解し蛋白を抽出した。得られた細胞溶解液の蛋白濃度はピシンコニン酸タンパク質定量法を用いて測定した。一定量の総蛋白を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、ポリフッ化ビニリデン膜を用いて Western blotting を行った。その後、各種特異的抗体を用いて免疫反応を行い、化学発光を検出した。

(3) FSAP 遺伝子のノックダウン: FSAP に対する特異的な siRNA (Ambion 社) を合成し、リポフェクション法を用いて細胞に導入した。FSAP 遺伝子のノックダウンは定量的 PCR 法にて確認した。

4. 研究成果

(1) FSAP についての基礎的検討結果

肝細胞: 肝細胞のモデルである Huh7 細胞の培地に炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - を添加し、培養液中の FSAP を検討したところ、予備実験の結果にて FSAP に相当する分子量の位置にバンドの増強を確認した。そのため、種々の条件検討を行った。一定の結論は得られなかった。また、肝細胞の脂肪化や脂質代謝との關係を探る目的で肝細胞モデルである Huh7 に種々の薬品を作用させたところ、予備実験において脂肪酸の一種であるオレイン酸あるいは脂質代謝に關与する核内受容体 PPAR- の作動薬ピオグリタゾンが FSAP の遺伝子発現を低下させたため、その濃度や作用時間を変化させ検討を続けたが蛋白発現に明らかな変化を見出せなかった。

単球-マクロファージ: THP-1 単球細胞を PMA にて刺激しマクロファージへと分化させた。この THP-1 マクロファージに大腸菌由来のリポ多糖を作用させたところ、FSAP の遺伝子発現に変化を見出せなかったが、第 7 因子の分泌は増加することを見出した。その詳細を検討したところ、細胞内の第

因子蛋白は増加せず、第 因子の遺伝子発現はむしろ低下していた。そこで、細胞障害の可能性を考え培地中の乳酸脱水素酵素活性を測定したところ、リポ多糖の処置によって上昇することがわかった。以上より、リポ多糖はTHP-1マクロファージに作用し第 因子の分泌を促進し、その機序の一部に細胞障害作用が存在することが判明した。その他、THP-1マクロファージ細胞に小胞体ストレスを誘導しFSAPの細胞内発現を検討したが変化を認めなかった。

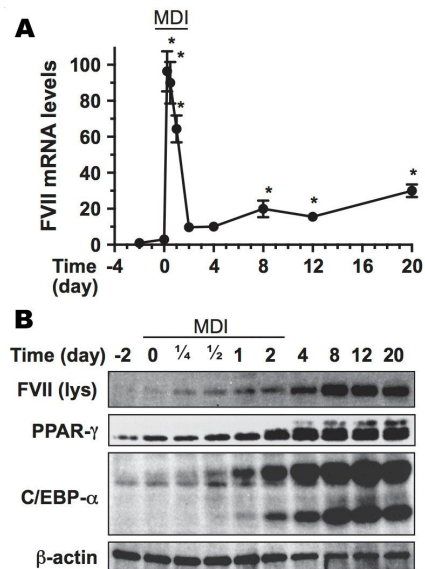
骨格筋細胞: 骨格筋細胞のモデルとしてC2C12細胞を用い、その分化過程におけるFSAPの遺伝子発現を検討したところ、FSAPの遺伝子発現は分化誘導後に低下はするが発現は保たれるという知見を得た。FSAPの骨格筋における発現や作用に関して、これまでに報告がなされておらず新規知見として検討を進めた。その中で、糖尿病治療薬の一種であるメトフォルミンや小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンはC2C12骨格筋細胞のFSAP遺伝子発現を低下させることが判明した。そこで、骨格筋細胞においてFSAPの発現が低下した場合にどのような現象が起きるのか検討を行った。まず、2種類のsiRNAを用いてFSAPの遺伝子ノックダウンモデルを作成した。次にこのモデルを用い、骨格筋の代謝や炎症に関係する遺伝子発現(グルコース輸送担体-4, 脱共役タンパク質-1, サルコリピン, 単球走化性タンパク質-1)を検討した。その結果、グルコース輸送担体-4の遺伝子発現が低下していることを見出した。今後はFSAPの変化がグルコース輸送担体-4の蛋白発現や糖取込みに変化を及ぼすのか、その意義の解明については課題が残った。また、FSAPやサルコリピン、小胞体ストレスなどの本実験における各種検討因子が相互に影響を及ぼしあわないかを確認するために横断的解析を行ったところ、偶然、小胞体ストレスがサルコリピンの発現を低下させるという新規知見も得られた。

脂肪細胞: 3T3-L1脂肪細胞に炎症性サイトカインであるTNF- α あるいはインターロイキン(IL)-1、IL-6を作用させ、FSAPの遺伝子発現を定量的PCR法にて検討した。その結果、FSAPの遺伝子発現量はきわめて少ないものの、対照と比較しTNF- α は脂肪細胞のFSAP発現を増加させた。しかしながら、蛋白発現レベルの検討において同様の効果は確認できず、病態学的な意義は明らかにできなかった。加えて、FSAPの検討に関連した課題として、その基質の一つである第 因子そのものについても検討を行った。その結果、脂肪細胞が第 因子自体を産生・分泌するという、これまでに報告のない新知見を得た。そこで、肥満の病態における脂肪細胞由来の第 因子について詳細を検討した。

(2) 脂肪細胞における第 因子の発現

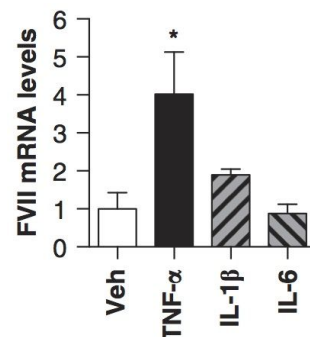
FSAPの検討と同様に3T3-L1脂肪細胞を用いた。この細胞は線維芽細胞の状態で継代培養を行い、一定の条件の下、分化誘導試薬を用いて脂肪細胞に分化させる(図1中: MDI) ことができる。そこで、脂肪細胞の分化段階における第 因子の遺伝子(図1A) 及び蛋白発現[図1B、F (lys)]を継続的に検討したところ、脂肪細胞の分化に伴って第 因子の発現は増強し、分化した脂肪細胞においてもその発現は維持されることがわかった。

[図1] 脂肪細胞分化過程におけるF 発現



肥満と脂肪細胞の第 因子(F)の関係を探る目的で、肥満の病態、特に脂肪組織の炎症に重要な役割を担うサイトカインであるTNF- α を脂肪細胞に作用させたところ、対照(vehicle, Veh)と比較し、TNF- α は脂肪細胞において第 因子の遺伝子発現(図2) および分泌を増加させた。その機序の検討を行った結果、細胞内シグナル伝達分子である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼや核内転写因子であるNF- κ Bの関与が確認された。

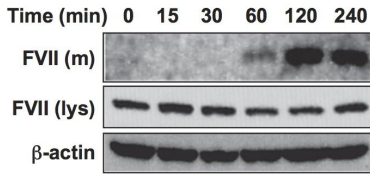
[図2] サイトカインによるF 遺伝子発現



肥満症の病態の一つに交感神経の緊張がある。そこで、交感神経 受容体刺激薬

であるイソプロテレノールを脂肪細胞に作用させたところ、第 因子の著明な分泌増加が確認された [図3、F (m)]。

[図3] イソプロテレノールによるF 分泌

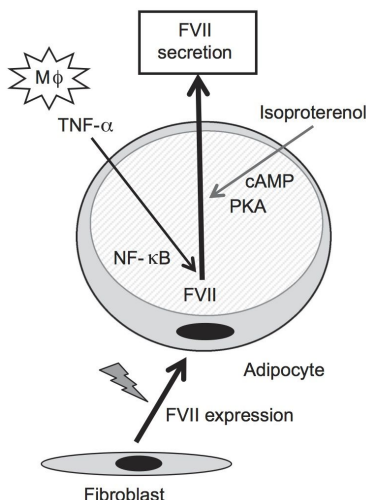


そこで、その機序の検討を行ったところ、第 因子のメッセンジャーRNAや蛋白の増加は関与せず、細胞内シグナル伝達に関するcAMPやプロテインキナーゼAの活性化が関わることが判明した。

肥満症における脂肪組織の第 因子発現を検討する目的で、C57BL/6Jマウスに低脂肪食あるいは高脂肪食を与え肥満を誘発し、その後採取した脂肪組織を用いて第 因子の遺伝子発現を検討した。その結果、高脂肪食にて肥満となったマウスの脂肪組織には、対照と比較し第 因子の遺伝子発現が約60倍近く増加していた。このことから、第 因子は肥満の病態に何らかの関与があることが推測された。

以上の検討結果より、肥満の病態に深い関わりを持つ炎症性サイトカインであるTNF- α や交感神経の緊張を模倣する刺激薬イソプロテレノールの刺激によって、脂肪細胞はそれぞれ異なる機序を通じて第 因子を分泌することが明らかとなった (図4)。第 因子は血液凝固のみならずインスリンシグナルに影響を与えることが知られており、本研究結果は脂肪細胞由来の第 因子が肥満の病態に関与することを示唆する重要な新知見であると考えられる。また、第 因子は肥満症の病態形成因子に関連することが基礎的に証明され、第 因子は肥満症の病態マーカーの可能性を有することが示唆された (発表論文)。

[図4] 脂肪細胞のF 分泌機構



(3)最後に：本研究を通じて FSAP の発現に関して様々な知見が得られた。また、検討を進める中で当初予期していなかった新たな知見もいくつか得られた。これらの研究成果をもとに今後も研究を展開していきたい。

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)

Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Kumano O, Suzuki T, Akanuma M, Yui T, Kanazawa K, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- or isoproterenol. *International Journal of Obesity*. 査読有. 39 巻、2015、747-754 doi:10.1038/ijo.2014.208

[学会発表] (計 9 件)

高橋 伸彦、内藤 澄悦、吉田 美香、熊野 穰、鈴木 健史、板谷 利、森谷 満、辻 昌宏、家子 正裕. 「小胞体ストレスは C2C12 筋管細胞において sarcoplipin 遺伝子発現を低下させる」 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 28 年 5 月 19-21 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Kumano O, Suzuki T, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. 「Adipocytes secrete coagulation factor VII」, The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity, 2015.10.2-3, Nagoya Congress Center (Aichi Prefecture・Nagoya)

高橋 伸彦、吉崎 隆之、熊野 穰、鈴木 健史、板谷 利、吉田 美香、内藤 澄悦、森谷 満、辻 昌宏、高後 裕、家子 正裕. 「THP-1 マクロファージは lipopolysaccharide 刺激によって血液凝固第 VII 因子を分泌する」, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 22 日、シーモールホール (山口県・下関市)

高橋 伸彦. 「脂肪細胞は血液凝固第 VII 因子を分泌する」, 第 35 回日本肥満学会、平成 26 年 10 月 25 日、シーガイア コンベンションセンター (宮城県・宮崎市)

高橋 伸彦、吉崎 隆之、平中 奈津弥、熊野 穰、鈴木 健史、吉田 美香、内藤 澄悦、高後 裕、家子 正裕. 「凝固第 VII 因子は脂肪細胞より分泌され、肥満症の病態マーカーの可能性を有する」, 第 15 回日本検査血液学会学術集会、平成 26 年 7 月 21 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

高橋 伸彦. 第 12 回日本検査血液学会北海道支部総会、招待講演、「肥満症、糖尿病と血液凝固異常」, 平成 26 年 6 月 14 日、北海道大学 学友会会館 フラテホール (北海道・札幌市)

高橋 伸彦、吉崎 隆之、平中 奈津弥、熊野 穰、鈴木 健史、吉田 美香、内藤 澄悦、高後 裕、家子 正裕。「3T3-L1 脂肪細胞はイソプロテレノール刺激によって血液凝固第VII因子を分泌する」、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、平成26年5月23日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

高橋 伸彦、吉崎 隆之、平中 奈津弥、熊野 穰、吉田 美香、内藤 澄悦、高後 裕、家子 正裕。「3T3-L1 脂肪細胞は血液凝固第VII因子を産生・分泌する」、第47回日本糖尿病学会北海道地方会、平成25年11月3日、北海道大学 学術交流会館（北海道・札幌市）

高橋 伸彦、吉崎 隆之、平中 奈津弥、赤沼 正康、吉田 美香、内藤 澄悦、熊野 穰、高後 裕、家子 正裕。「Expression of coagulant factor VII is induced by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes」、第18回アディポサイエンスシンポジウム、平成25年8月24日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府・大阪市）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 伸彦 (TAKAHASHI, Nobuhiko)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：20372279

(2) 研究分担者

家子 正裕 (IEKO, Masahiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50250436

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究者協力者

平中 奈津弥 (HIRANAKA, Natsumi)

熊谷 京子 (KUMAGAI, kyoko)