

## 中 司 敦 子

Atsuko Nakatsuka

岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科

Department of Medicine and Clinical Science, Okayama University Hospital



## プロフィール

昭和48年生まれ

平成10年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成10年4月 岡山大学医学部附属病院 第三内科 研修医

平成10年10月 倉敷中央病院 内科 研修医

平成12年7月 倉敷中央病院 腎臓内科 医員

平成14年10月 岡山大学医学部附属病院 腎・免疫・内分泌代謝内科 医員

平成16年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学  
研究生平成19年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学  
客員研究員

厚生労働技官 (国立療養所邑久光明園 内科 医師)

平成24年7月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖尿病性腎症治療学 助教

平成24年12月 医学博士取得

平成26年4月 岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 助教

現在に至る

## 受賞対象論文

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, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H: 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* (2013) 112, 771-780.

## 研究の背景と経緯

近年、内臓脂肪組織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, Secreted frizzled-related protein 5 (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。そこで我々は、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である vaspin (visceral adipose tissue-derived serine proteinase inhibitor) を同定し<sup>1)</sup>、vaspin が肥満やインスリン抵抗性、脂肪肝を改善させることを見出し、作用機序を解明して報告してきた<sup>2)</sup>。本論文では、vaspin の動脈硬

化抑制作用およびその機序を明らかにした。

## 1. Vaspin の同定

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 cDNA 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<sup>1)</sup>。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 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<sup>3)</sup>。

## 2. Vaspin 遺伝子改変動物の作成と表現型の検討

メタボリックシンドロームにおける vaspin の機能を明らかにするために、aP2 プロモーターを用いて vaspin トランスジェニック (Tg) マウスを作製した。高脂肪高蔗糖食で飼育時の Tg マウスの体重増加は、野生型 (WT) マウスに比べて約 8% 抑制され、脂肪

細胞サイズの縮小および脂肪組織重量、肝重量の抑制を認めた。糖負荷試験・インスリン負荷試験では、Tgマウスにおいてインスリン抵抗性が改善していた。また高脂肪高蔗糖食で誘導される脂肪肝はTgマウスで改善を認めた。さらにvaspinノックアウト (Vaspin<sup>-/-</sup>)マウスを作製して、同様に高脂肪高蔗糖食で飼育したところ、Vaspin<sup>-/-</sup>マウスは、WTマウスに比べて体重や肝重量が野生型より重く、脂肪細胞サイズの増大や脂肪肝の増悪、インスリン抵抗性の増強も認めた。Vaspin<sup>-/-</sup>マウスはTgマウスとは鏡面的な表現型を呈したことから、vaspinは肥満や糖尿病、脂肪肝を改善させる因子であることが確認できた<sup>2)</sup>。

### 3. Vaspinと相互作用する分子の探索

Vaspinと相互作用する分子について、培養細胞 (HepG2 および HAEC) を用いて TAP (tandem affinity tag purification) 法で vaspin と結合する蛋白を精製し、さらに質量解析を行った結果、78kDa glucose-regulated protein (GRP78) を同定した。両者の結合は pull-down アッセイや <sup>125</sup>I-vaspin を用いた結合実験でも確認した。GRP78は小胞体に局在するシャペロン蛋白であることが知られている。しかし近年、癌細胞や、虚血などのストレスにさらされた状態では GRP78 が細胞表面にも局在することが報告されている<sup>2)</sup>。我々は、肥満やインスリン抵抗性、糖尿病においても GRP78 が細胞表面に発現し、vaspin がこれに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には膜結合ドメインがないため、細胞表面すなわち形質膜に局在するためには、アンカー蛋白と複合体を形成することが必要である。これまでに、肝臓における GRP78のアンカー蛋白として murine tumor cell DnaJ-like protein 1 (MTJ-1) が報告され<sup>4)</sup>、また血管内皮細胞では、細胞膜表面で voltage-dependent anion channel (VDAC) と GRP78が複合体を形成することが報告されている<sup>5)</sup>。

高脂肪高蔗糖食で飼育した Tg や KO マウスは、インスリン抵抗性脂肪肝など肝臓における糖脂質代謝に変化が大きく認められたことから、まず肝臓に注目し、肝臓の形質膜分画を Iodixanol-NaCl/Tricine Density Gradient Method によって分離した。得られた形質膜分画蛋白を用いた免疫沈降およびウエスタンブロットを行い、肝臓形質膜で vaspin, GRP78, MTJ-1が複合体を形成していることを明らかにした。

### 4. 肝臓における vaspin のシグナル伝達

Vaspin が肝臓表面の GRP78/MTJ-1 に結合した後、細胞内にシグナルを伝達することが想定される。そこで Tg, Vaspin<sup>-/-</sup>, WT マウスの肝臓蛋白を抽出してウエスタンブロットを行うと、高脂肪高蔗糖食飼育 Tg マウス肝臓では Akt や AMP-activated protein kinase (AMPK) リン酸化が増強しており、逆に KO マウスでは減弱していた。また、小胞体ストレスシグナルである eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 $\alpha$ ) や inositol requiring enzyme 1 alpha (IRE1 $\alpha$ ) のリン酸化は WT マウスと比べて Tg マウスで抑制され、Vaspin<sup>-/-</sup> マウスでは増強していた。以上のことから、vaspin は肝細胞表面の GRP78/MTJ-1 複合体に結合し、Akt や AMPK リン酸化を亢進させ、その結果、糖脂質代謝を改善させることが明らかとなった (図)。

## 研究成果の内容

### 1. Vaspin による動脈硬化抑制と作用機序について

Vaspin は脂肪細胞から血中へ分泌されることから、血管への作用も想定される。そこで動脈硬化に対する vaspin の作用についても検討を行った。まずストレプトゾトシンで糖尿病を誘発した WKY ラットの頸動脈にバルーン擦過実験を施行して、アデノウイルスで vaspin を発現させたところ、LacZ 発現頸動脈と比べて vaspin を発現させたラット頸動脈では内膜肥厚が抑制された。また、Tg および WT マウスの大腿動脈にカフ傷害実験を施行して内膜肥厚度を比較すると、Tg マウスで抑制されていた。これらから vaspin は動脈硬化を改善させると考えられた。

次に培養ヒト大動脈内皮細胞にアデノウイルスで vaspin を発現させ、増殖・アポトーシスについて検討したところ、vaspin は、細胞数・5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) アッセイ・3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイいずれにおいても内皮細胞を増殖させ、アポトーシスを抑制した。内皮細胞にリコンビナントヒト vaspin 蛋白を添加した場合にも同様に細胞を増殖させた。これらのことから vaspin は内皮細胞のアポトーシスを抑制する作用を有し、血管内膜肥厚を抑制していることが示唆された。

その作用機序を明らかにするために、まず血管内皮細胞における GRP78のアンカー蛋白の同定をおこな

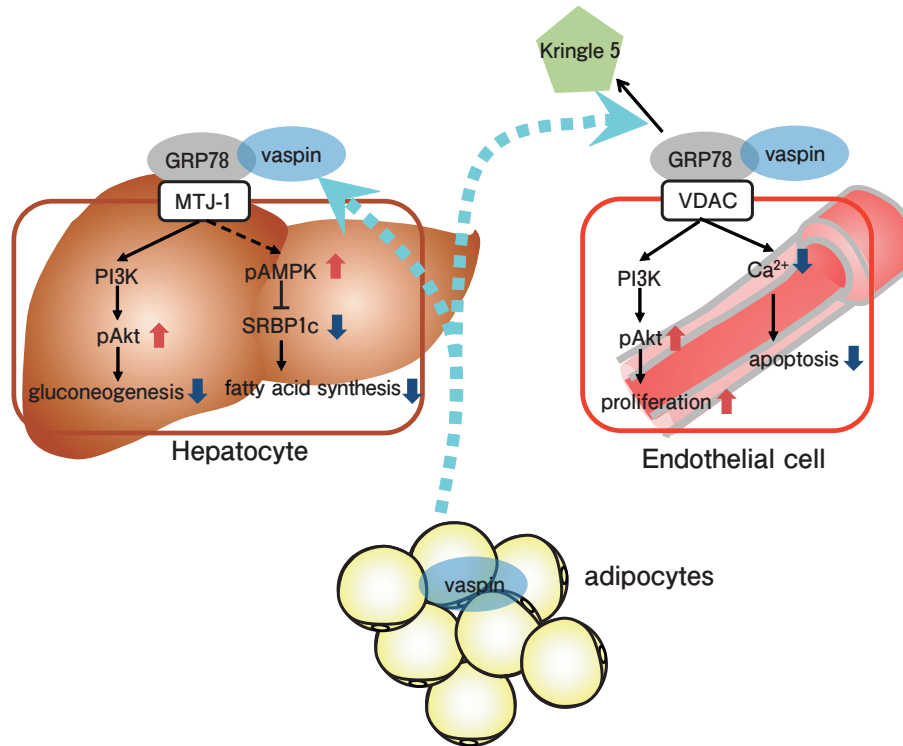


図 肝細胞・血管内皮細胞における GRP78 を介した vaspin の作用機序  
(掲載許可を得て文献<sup>2</sup>, 受賞論文より一部改編して引用)

った。Tg マウス大動脈を用いて Iodixanol-NaCl/Tricine Density Gradient Method により形質膜分画を分離した。また培養ヒト大動脈血管内皮細胞を用いて、ビオチン化ラベルした形質膜蛋白を分離回収した。既報では、血管内皮細胞における GRP78 のアンカー蛋白として VDAC (voltage-dependent anion channel) が知られているが<sup>5)</sup>、血管形質膜蛋白および培養血管内皮細胞形質膜蛋白を用いた免疫沈降を行い、vaspin が GRP78/VDAC と複合体を形成することを明らかにした。既報では plasminogen kringle 5 が GRP78/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ことが報告されている<sup>6)</sup>。我々は vaspin が GRP78 との結合において kringle 5 と競合することにより、kringle 5 によるアポトーシス経路を阻害することを明らかにした。また肝細胞と同様に血管内皮細胞においても、リコンビナントヒト vaspin 添加により Akt リン酸化が亢進していた。以上のような機序で vaspin は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった (図)。

## 研究成果の意義

Vaspin の発見から現在までの、Tg マウス、Vaspin/-マウスの解析の結果から、vaspin はメタボリックシンドロームにおける肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝や動脈硬化を改善させる代償因子であることが明らかとなった。Vaspin の相互作用分子である GRP78 は、従来小胞体に局在することが知られているが、種々の細胞ストレスにより細胞表面に移動することが近年報告されている。メタボリックシンドロームに代表される病態でも細胞表面に GRP78 が局在し、vaspin が結合することにより細胞内にシグナルが伝達される、という新しい分子機構を明らかにした。さらに GRP78 と細胞表面で複合体を形成するアンカー蛋白は臓器・細胞により異なると考えられる。各標的細胞のアンカー蛋白を明らかにすることで、vaspin の臓器・細胞ごとに異なる作用機序を明確にし、vaspin の多面的な作用の解明に繋がるものと思われる。

## 今後の展開や展望

近年メタボリックシンドロームが慢性腎臓病のリスクであり、逆に慢性腎臓病における腎性インスリン抵抗性や腎性脂質異常症などがメタボリックシンドロームを増悪させ、悪循環に至ることが注目されている。そこで今後、vaspinによるメタボリックシンドロームや糖尿病における腎障害への作用に関する研究へと展開し、この悪循環を断ち切る新たな治療戦略へと発展させたい。

## 文 献

- 1) Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K, Makino H : Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res* (2000) 41, 1615-1622.
- 2) Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, et al. : Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* (2012) 61, 2823-2832.
- 3) Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, et al. : Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor : a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102, 10610-10615.
- 4) Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY : Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J Biol Chem* (2000) 275, 19620-19627.
- 5) Arzoine L, Zilberberg N, Ben-Romano R, Shoshan-Barmatz V : Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J Biol Chem* (2009) 284, 3946-3955.
- 6) Gonzalez-Gronow M, Kaczowka SJ, Payne S, Wang F, Gawdi G, Pizzo SV : Plasminogen structural domains exhibit different functions when associated with cell surface GRP78 or the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* (2007) 282, 32811-32820.

---

平成26年4月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話 : 086-235-7235 FAX : 086-222-5214

E-mail : atsuko-n@md.okayama-u.ac.jp