

内臓脂肪組織に由来するセリンプロテアーゼ阻害剤：Vaspin の同定 肥満状態でインスリン感受性を高める新規アディポサイトカイン

肥田和之^{a*}, 和田 淳^a, 江口 潤^a, Zhang Hong^b, 馬場雅子^a, 清田 綾^a,
橋本 泉^a, 岡田達夫^a, 安原章浩^a, 中司敦子^a, 赤木 滋^a, 四方賢一^a,
宝来真志^c, 二見淳一郎^d, 渡辺英二郎^e, 松木 泰^e, 平松隆司^e, 槇野博史^a,
Yashpal S. Kanwar^f

^a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, ^b北京大学第一医院腎臓研究所,

^c住友化学工業株式会社生物環境科学研究所, ^d岡山大学工学部 生物機能工学科蛋白質機能工学研究室,

^e大日本住友製薬株式会社大阪研究所宝塚分室ゲノム研究所, ^fノースウェスタン大学病理学教室

キーワード：Vaspin, アディポサイトカイン, 内臓脂肪, インスリン抵抗性, メタボリックシンドローム

はじめに

肥満により著明に増大する脂肪組織は近年の医学生命科学の進歩により, 単なるエネルギーの貯蔵庫としての役割のみならず, 高血圧, 糖尿病など生活習慣病に影響を及ぼす様々な生理活性物質を分泌し, 多彩な生理機能を果たしていることが明らかにされている。肥満症は世界的に急速な増加傾向にあるが, 糖尿病との関連においていまだ不明瞭な点が多い。今回, 肥満状態において皮下脂肪組織ではなく, 主として蓄積された内臓脂肪組織より分泌される新規アディポサイトカインの同定に成功し, α_1 -antitrypsin とホモロジーを有し, セリンプロテアーゼ阻害剤ファミリーに属す

ることから, Vaspin (Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) と命名した。内臓脂肪蓄積を上流とするメタボリック症候群の病態が心血管イベントを引き起こすリスクファクターとして注目されているが¹⁻⁶, 蓄積された内臓脂肪から分泌される Vaspin が糖代謝にいかなる影響を及ぼすのか検討した。

Vaspin の単離とクローニング

30週齢の内臓脂肪蓄積を伴う2型糖尿病動物モデルラット：OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラット⁷と8週齢の耐糖能異常を示さないコントロールラット：LETO (Long-Evans Tokushima Fatty) ラットの内臓脂肪組織からそれぞれ mRNA を抽出し, PCR を用いた遺伝子サブトラクション法 (representational difference analysis of cDNA) を用いて135塩基対の Vaspin の DNA 断片を単離し, 最終的に全長の cDNA をクローニングした^{8,9}。

平成18年10月受理

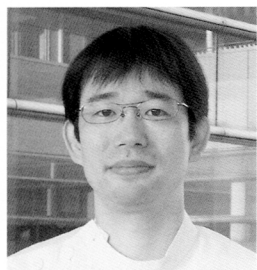
*〒701-1192 岡山市田益1711-1

国立病院機構岡山医療センター 糖尿病・代謝内科

電話：086-294-9911 FAX：086-294-9255

E-mail：hidak@okayama3.hosp.go.jp

◆ プロフィール ◆



肥田 和之

平成6年長崎大学医学部卒, 平成6年岡山大学医学部第三内科(現 腎・免疫・内分泌代謝内科学)入局。全人ゲノムプロジェクトが進行する中, 平成9年より和田淳先生御指導の下, 今日メタボリックシンドロームの病態として注目されている内臓脂肪に着目して研究を行う。肥満状態で主として内臓脂肪から発現する2つの novel gene の同定に成功し, J. Lipid Res に論文発表を行う。そのうち1つは接着因子に関わる膜蛋白であり, Biochem J (共著) に発表。もう1つが分泌蛋白であり, インスリン抵抗性を改善させるアディポカインであることを立証して Proc Natl Acad Sci USA に発表し, 平成17年岡山医学会結城賞受賞。現在, トランスジェニックマウス, ノックアウトマウスの作製, RIA 測定系の開発など共同研究で行い, 詳細な分子メカニズムを探索中である。平成15年から国立病院機構岡山医療センターに所属し, 臨床の立場からアディポカインの研究に勤しんでいる。

Vaspin は内臓脂肪組織由来の Serpin である

Vaspin はN末端に疎水性のシグナルペプチドを有し, Blastp サーチを用いて解析した結果 α_1 -antitrypsin と40.5%のホモロジーを有していた. SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org>) による蛋白の立体構造解析から3個の β シート, 9個の α フェリックスと Serpin (serine protease inhibitor) 遺伝子ファミリーに特異的な構造である reactive site loop を有していることが予想された¹⁰⁾ (図1 A). Vaspin はノーザンブロット解析において30週齢の肥満 OLETF ラットの内臓脂肪組織で発現を認めたが, 6週齢で非肥満状態の LETO ラットの内臓脂肪組織においては発現を認めなかった. また OLETF ラットの皮下脂肪組織, 褐色脂肪組織, その他の臓器においても発現を認めなかった (図1 B).

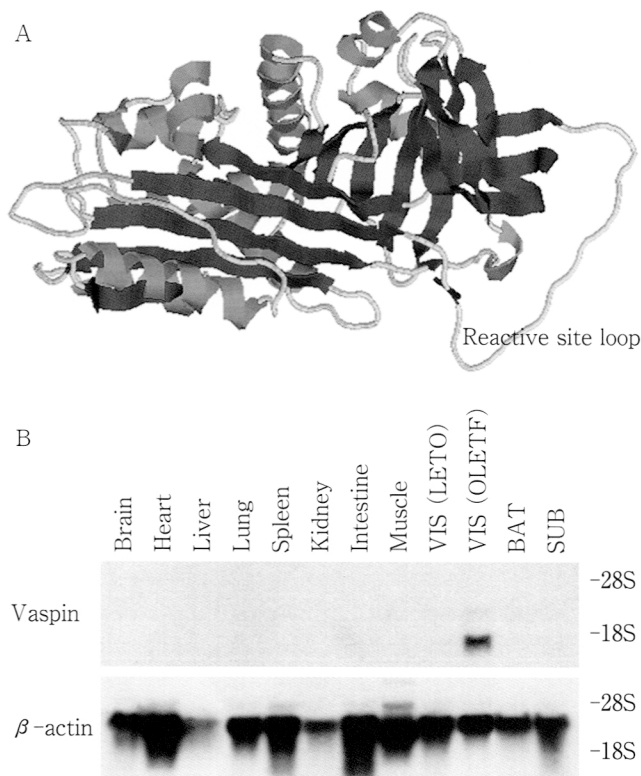


図1 Structural analyses, and gene expression of vaspin in various tissues.

A: Automated protein structure homology modeling by SWISS-MODEL predicted the presence of 3 β -sheets, 9 α -helices and a reactive site loop. B: Northern blot analyses of vaspin in various organs of obese 30 wks-old OLETF and visceral adipose tissue of lean 6 wks-old LETO rats. A single transcript is observed in visceral (VIS) fat of OLETF rats. BAT, brown; SUB, subdermal adipose tissue.

Vaspin 遺伝子の発現調節の検討

4週齢の OLETF ラットを OLETF コントロール群 (OLETF), 回転ゲージで自発運動させた運動群 (EXE), インスリン抵抗性改善剤であるピオグリタゾン投与した群 (PIO), インスリンで血糖コントロールを行ったインスリン群 (INS) に LETO コントロール群 (LETO) を加えた5群において50週齢に至るまで様々な条件で飼育し, 各白色脂肪組織での Vaspin 遺伝子発現の調節を検討した. 6週齢, 30週齢, 50週齢において各群を屠殺した. 屠殺当日空腹にて体重測定, 血液採取し, 各群の体重変化 (図2 A), 血糖コントロール変化 (図2 B), 空腹時インスリン値の変化 (図2 C) を評価し, また白色脂肪をそれぞれ, 副睾丸周囲脂肪 (EPI), 腸間膜脂肪 (MES), 後腹膜脂肪 (RET), 皮下脂肪 (SUB) に分けて, 脂肪重量変化 (図2 D) を評価するとともに Vaspin の遺伝子発現をノーザンブロット解析にて検討した (図2 E). Vaspin は6週齢の OLETF ラットの内臓脂肪組織においてほとんど検出できず, 体重, 脂肪重量そしてインスリン血中濃度がピークに達する30週齢の MES と RET で強く発現し, EPI でやや弱いシグナルの発現を認めたが, 50週齢になると糖尿病の悪化とそれに伴う体重減少により Vaspin の遺伝子発現は低下した. 50週齢の期間を通じて Vaspin は皮下脂肪組織においてほとんど発現を認めなかった. EXE 群において Vaspin の発現は耐糖能異常を示さない LETO ラットと同等レ

図2

A: Body weight of OLETF, LETO, and OLETF rats with voluntary exercise (EXE), and OLETF rats administered with pioglitazone (TZD) and insulin (INS). A decline in the body weight of OLETF rats is observed at 50 wks of age after peaking at 30 wks. B: Hemoglobin A1c levels progressively rise in OLETF rats up to 50 wks. C: Fasting immuno-reactive insulin (IRI) levels peak at 30 wks and then decline at 50 wks in OLETF rats. D: Fat pad weight peaked at 30 wks in OLETF rats, while with the TZD and insulin treatment they progressively rose up to 50 wks. Data included in A-D are mean \pm sem (n=5). E: Northern blot analyses of vaspin mRNA in white adipose fatty tissues (WATs). At 30 wks, the expression is high in visceral retroperitoneal (RET) and mesenteric (MES) WATs in OLETF rats. The expression is high at 30 and 50 wks in subdermal (SUB) WATs from OLETF rats treated with TZD, while vaspin's expression visceral WATs was decreased. Insulin had a partial effect on vaspin's mRNA expression. EPI, epididymal WATs.

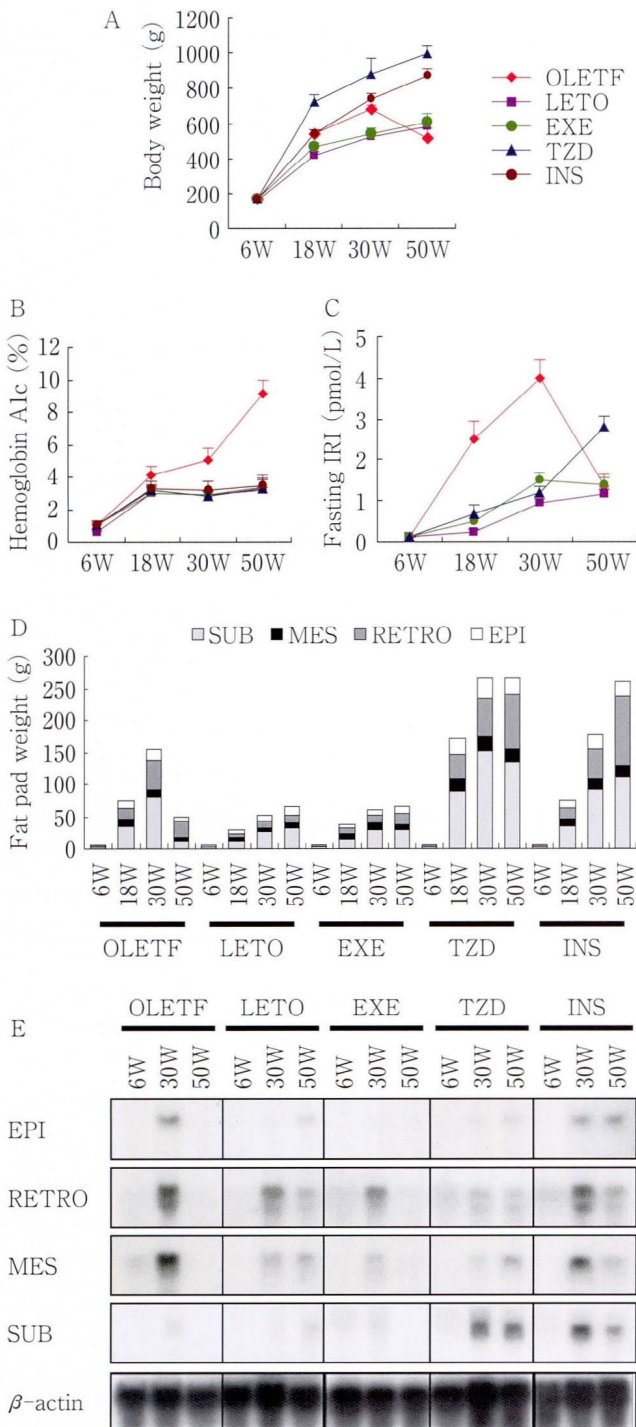


図2 Effect of pioglitazone and insulin on various physiological parameters in OLETF and related strains of rats and expression of vaspins.

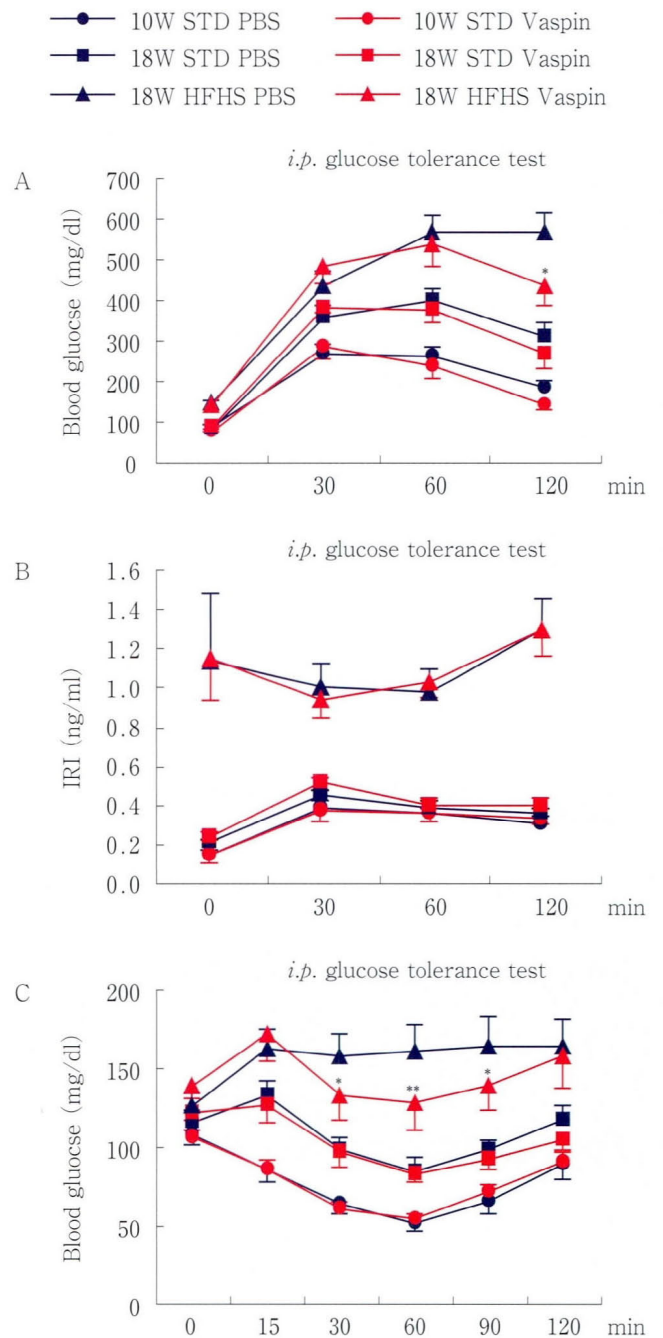


図4 Profiles of glucose tolerance and insulin sensitization tests after administration of vaspin and insulin.

A : Glucose tolerance test. The rhVaspin or PBS was intraperitoneally injected into ICR mice fed with standard starch chow (STD) or high fat and high sucrose (HFHS) chow prior to glucose administration. Glucose levels were significantly reduced with the administration of vaspin [asterisk (*), $p < 0.01$]. B : Insulin levels during the glucose tolerance test were unaltered, and HFHS mice remained hyperinsulinemic. C : Insulin sensitization test. The rhVaspin or PBS was intraperitoneally injected into mice prior to insulin administration. The blood glucose levels were lowered in HFHS group receiving insulin + vaspin [asterisks (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$]. All data are mean \pm sem (n=10).

ベルまで抑制された。ピオグリタゾン、インスリンを投与した PIO 群, INS 群において30週齢での皮下脂肪組織における Vaspin の発現は著しく亢進し, 50週までそのレベルを維持した。その一方で, 内臓脂肪組織で発現の低下を認めた。

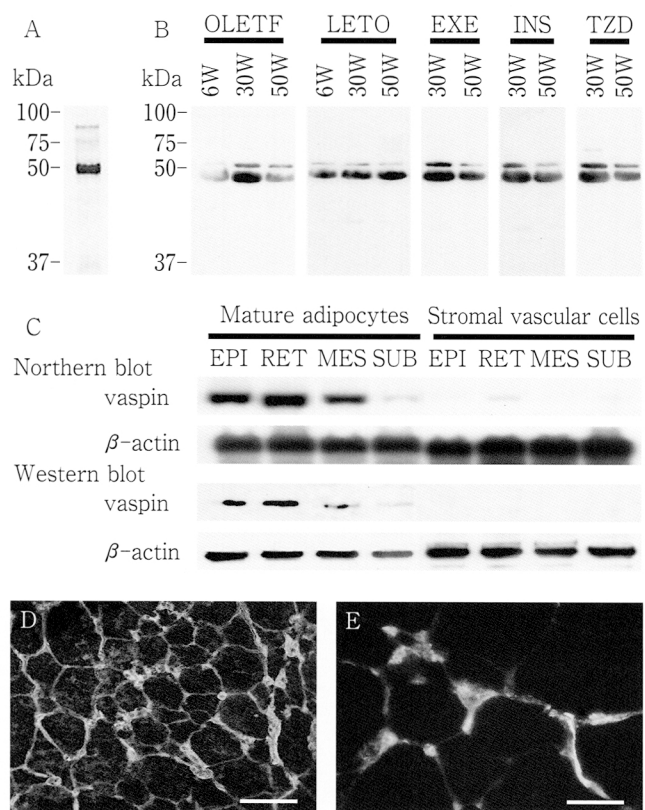


図3 Expression of vaspin in 293T cells, adipocytes, and stromal vascular cells.

A : Western blot analysis of mouse vaspin using supernatants of 293T cultured cells transfected with AxCamOL64 and polyclonal anti-vaspin antibody. A prominent band of ~45kDa is observed. B : Western blot analyses of vaspin using sera of OLETF and LETO rats, and OLETF rats with voluntary exercise (EXE), OLETF rats administered with pioglitazone (TZD) and insulin (INS). A major ~45kDa and a minor ~50kDa bands are seen at 30 wks. The band intensity is notably less at 50 wks in OLETF rats but it seems to be normalized with insulin and TZD treatments. C : Expression of vaspin in mature adipocytes and stromal vascular cells isolated from epididymal (EPI), retroperitoneal (RET), mesenteric (MES), and subdermal (SUB) WATs as analyzed by Northern and Western blot analyses. Expression is confined to adipocytes of visceral WATs and not to stromal endothelial or vascular cells. D, E : Expression in the adipocytes was confirmed by Immunofluorescence microscopy in 30 wk-old OLETF rats. (Bar=100mm in D, Bar=25mm in E).

Vaspin の成熟脂肪細胞に特異的な発現とその血清発現レベル

全長のマウス Vaspin cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し, HEK 293細胞に導入した。その培養上清を用いたウェスタンブロット解析において, 約45kDa のバンドが認められた(図3 A)。Vaspin 蛋白の血清レベルは, インスリン抵抗性がピークとなる30週齢では LETO ラットに比較して OLETF ラットで上昇し, 糖尿病の悪化, 体重減少に伴い, 50週齢の OLETF ラットにおいては著明に発現が低下した(図3 B)。INS 群や PIO 群においては50週齢においても Vaspin の血清レベルの発現は OLETF 群に比較し保持され, EXE 群と同程度であった。血液中の Vaspin が脂肪細胞から産生されることを確認するため, OLETF ラットの白色脂肪組織を成熟脂肪細胞と間葉系細胞に分離し, ウェスタンブロット解析およびノーザンブロット解析を施行した¹¹⁾。その結果 Vaspin の mRNA と蛋白質発現は, 成熟脂肪細胞において主として認められた(図3 C)。また腸間膜脂肪組織を用いた免疫組織染色¹²⁾によって Vaspin の発現は脂肪細胞の細胞質に局限して発現し, 間葉系細胞には認めなかった(図3 D, E)。

Vaspin は高脂肪高蔗糖飼料で誘発した肥満 ICR マウスにおいてインスリン感受性を高める

Vaspin の機能解析を行うため10週齢の ICR マウスにおいて, ブドウ糖負荷試験とインスリン静注負荷試験を施行した。ブドウ糖負荷試験は当日午前7時と午後7時の計2回, 10匹ずつ2群に分けて rhVaspin (1 mg/kg weight) あるいは溶媒をそれぞれ腹腔内投与した。2回目の注射の2時間後にブドウ糖 (2 g/kg weight) を腹腔内に投与し, 120分後まで定期的に血糖とインスリンを測定した。インスリン静注負荷試験に関しては, 当日午前7時と午後7時に各群10匹ずつ rhVaspin または溶媒を腹腔内投与し, 2回目の注射の2時間前から絶食状態とした。4時間の絶食後, インスリンを (0.5 unit/kg weight) 投与し血糖を経時的に測定した。上記の実験は更に, 18週齢に至るまで餌として総カロリー中, 脂肪成分が11%含まれている飼料〔標準飼料: standard (STD)〕が与えられる群と総カロリー中, 58%の脂肪を含んだ飼料〔高脂肪高蔗糖飼料: high fat high sucrose (HFHS)〕が与えられる群

に分けて飼育し，10週齢と同様の負荷試験を施行した。HFHS 飼育下 ICR マウスは，18週齢で高血糖，高インスリン血症と肥満を呈しているが，rhVaspin を投与することにより，ブドウ糖負荷試験において120分後の血糖値を有意に低下させた（図 4 A）。しかし，インスリン値は変化せず，相対的に高インスリン血症のままであった（図 4 B）。インスリン静注負荷試験において STD 飼育下において rhVaspin を投与により有意差は認めなかったが，HFHS 飼育下，18週齢で肥満を来している ICR マウス群において rhVaspin を投与すると溶媒を投与した群に比較して血糖値はインスリン腹腔内注入30分後から90分後の間，有意に低下した（図 4 C）。

Vaspin は食餌誘発肥満マウスの白色脂肪組織の遺伝子発現プロファイル在非肥満状態の遺伝子発現に近づける効果を有する

18週齢の3群〔STD 群，HFHS 群，2週間（16週から18週にかけて週2回：計4回）rhVaspin を腹腔内投与した HFHS 群〕のマウスの腸間膜脂肪組織と皮下脂肪組織からそれぞれ RNA を分離して DNA チップ解析を用いた解析から，rhVaspin を投与することにより腸間膜脂肪組織と皮下脂肪組織において HFHS で変化した遺伝子発現のそれぞれ49.9%と52.8%で非肥満

状態の遺伝子発現状態に復する効果が示された¹³⁾。レプチン，レジスチン，TNF- α ，GLUT 4，アディポネクチン等のインスリン抵抗性に関連する遺伝子発現もリアルタイム PCR を用いて解析した結果，rhVaspin を投与することにより同様な結果が得られた（図 5 A，B）。また体系的なクラスター解析をした結果¹⁴⁾，HFHS 群と STD 群の2群は樹状図で別々の分岐に位置したが，rhVaspin を2週間投与した HFHS 群の腸間膜脂肪組織と皮下脂肪組織はともに，STD 群と同じ分岐上に位置した（図 5 C）。

おわりに

Vaspin は内臓脂肪組織から派生し，プロテアーゼ阻害活性を有する因子であり，特に白色脂肪組織に働きかけて，インスリン機能を高めることによって糖尿病や肥満症といったメタボリックシンドロームでみられる特有の異常を改善させる。本研究の知見がメタボリックシンドロームにおいてインスリン感受性の改善を促進できるプロテアーゼ阻害剤抑制薬の治療への原動力となり発展につながることを期待する。

文 献

- 1) Kunitomi M, Wada J, Takahashi K, Tsuchiyama Y, Mimura Y, Hida K, Miyatake N, Fujii M, Kira S, Shikata K and Makino H : Relationship between reduced serum IGF-I

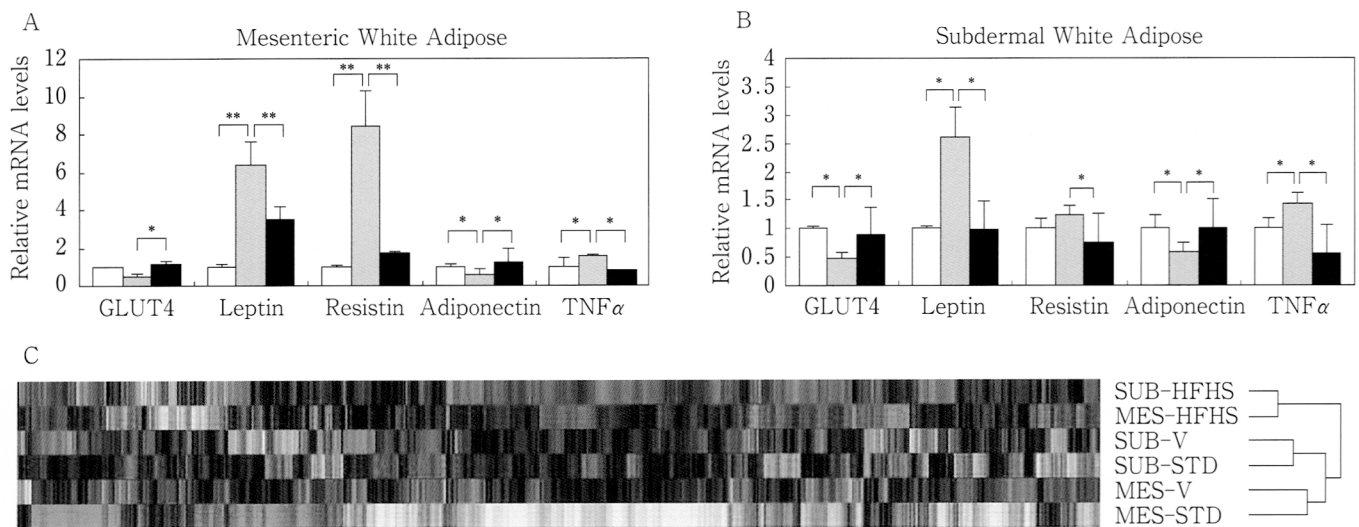


図5 Effect of vaspin on leptin, resistin, TNF α , GLUT4, and adiponectin in obese ICR mice fed with HFHS chow. Vaspin administration reverses gene expression profile of WATs.

A, B : Injection of rhVaspin suppressed gene expression of leptin, resistin and TNF α and increased the expression of GLUT4 and adiponectin in obese ICR mice with HFHS chow. Data are mean \pm sem (n=5). (*) P<0.05, (**) P<0.01. C : Hierarchical clustering analysis seems to divide into two distinct groups, HFHS and STD chow groups. Both mesenteric (MES) and subdermal (SUB) gene expression profile in rhVaspin treated ICR mice fed with HFHS chow is on same branch of as those mice fed with STD chow.

- levels and accumulation of visceral fat in Japanese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2002) **26**, 361-369.
- 2) Seida A, Wada J, Kunitomi M, Tsuchiyama Y, Miyatake N, Fujii M, Kira S, Takahashi K, Shikata K and Makino H : Serum bFGF levels are reduced in Japanese overweight men and restored by a 6-month exercise education. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2003) **27**, 1325-1331.
 - 3) Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ and Wood JL : The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med* (1998) **338**, 1 - 7 .
 - 4) Kannel WB, Cupples LA, Ramaswami R, Stokes J III, Kreger BE and Higgins M : Regional obesity and risk of cardiovascular disease ; the Framingham Study. *J Clin Epidemiol* (1991) **44**, 183-190.
 - 5) Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC and Manson JE : Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc* (1998) **280**, 1843-1848.
 - 6) Poulriot MC, Despres JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, Tremblay A and Bouchard C : Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* (1992) **41**, 826-834.
 - 7) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosuni M and Natori T : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* (1992) **41**, 1422-1428.
 - 8) Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K and Makino H : Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res* (2000) **41**, 1615-1622.
 - 9) Hubank M and Schatz DG : Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* (1994) **22**, 5640-5648.
 - 10) Gettins PG : Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* (2002) **102**, 4751-4804.
 - 11) Joost HG and Schurmann A : Subcellular fractionation of adipocytes and 3T3-L1 cells. *Methods Mol Biol* (2001) **155**, 77-82.
 - 12) Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, Wang H, Lin S, Kanwar YS and Makino H : Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem* (2001) **276**, 17132-17139.
 - 13) Alter O, Brown PO and Botstein D : Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 10101-10106.
 - 14) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D : Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 14863-14868.