

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11616

研究課題名(和文)高精度網羅的タンパク質定量法によるメタボリックシンドロームの発生機序の全体像解明

研究課題名(英文)Elucidation of the overall mechanism of metabolic syndrome by high-precision comprehensive protein quantification

研究代表者

永井 宏平(Nagai, Kouhei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：70500578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SWATH質量分析法は、臓器などに含まれる数百から数千種類のタンパク質を同時に、かつ精密に定量することができる分析手法である。本研究では高脂肪食を5週間摂取させて極初期のメタボリックシンドロームの状態にしたマウスの肝臓や脂肪組織中のタンパク質の網羅的な定量解析を行った。その結果、極初期のメタボリックシンドロームにおいては、糖新生の進行が抑制されており、これが代謝異常の引き金となっている可能性が示され。また、肝臓におけるUSP5やEpiplakin、脂肪組織におけるASPHなどの新規な肥満関連因子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリックシンドローム(MS)は、内臓脂肪の蓄積により、インスリン抵抗性・脂質代謝異常といった代謝異常が集積する状態を指す。MSを放置すると動脈硬化などの不可逆的な臓器障害を徐々に進行させ、やがて糖尿病、腎不全、心筋梗塞、脳卒中といった致命的な病気の発症を引き起こす。したがって、できるだけ早い段階でMSを予防し、改善することが、生活習慣病発症のリスクを回避することにつながると思われる。本研究によって、極初期のメタボリックシンドロームにおける臓器の生化学的変化を一部明らかにすることができた。また、新規に発見された肥満関連因子は、早期のメタボリックシンドロームの治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：SWATH mass spectrometry is an analytical technique that can simultaneously and precisely quantify hundreds to thousands of proteins in organs and other biological samples. In this study, we performed a comprehensive quantitative analysis of proteins in the liver and adipose tissue of mice that were fed a high-fat diet for 5 weeks and were in a state of very early metabolic syndrome. The results showed that the progression of glycogenesis is suppressed in the very early stage of the metabolic syndrome, which may trigger the metabolic abnormalities. We also found novel obesity-related factors such as USP5 and Epiplakin in the liver and ASPH in adipose tissue.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオーム解析 メタボリックシンドローム 肝臓 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MS) は、内臓脂肪の蓄積を前提として、インスリン抵抗性・脂質代謝異常・血圧上昇といった代謝異常が集積する状態を指す。MS を未治療のまま放置すると、インスリン抵抗性や動脈硬化などの不可逆的な臓器障害を徐々に進行させ、やがて糖尿病、腎不全、心筋梗塞、脳卒中といった致命的な病気の発症を引き起こす。したがって、できるだけ早い段階で MS を予防し、改善することが、生活習慣病発症のリスクを回避することにつながると考えられている。現在、初期の MS 該当者に対する対応は、生活習慣改善の保健指導が中心である。機能性食品や漢方薬による対応も進みつつあるが、これらは糖質 / 脂質の吸収阻害や脂肪燃焼の促進による体重減少を狙ったものがほとんどであり、代謝異常を直接治療するものではない。将来の高齢化社会の一層の進行を目の前にして、MS の初期段階から代謝異常の進行を予防する積極的な医療介入 (薬物治療) 法の開発が必要と考えられるようになってきた

2. 研究の目的

本研究では、SWATH 質量分析法と呼ばれる非常に精密な網羅的タンパク質量定量法を用いて、高脂肪食の摂取によって肥満誘導したマウスの各臓器 (肝臓、脂肪組織など) におけるタンパク質存在量を網羅的に定量し、初期のメタボリックシンドロームにおける各臓器の生化学的・病理学的な変化を明らかにすることを目的とした。本研究によって、初期のメタボリックシンドロームにおける治療標的を見出すことができれば、MS の極初期段階から、代謝異常の進行を予防する、あるいは正常化する積極的な医療介入が可能になり、生活習慣病への移行防止、健康寿命の増加、医療保険制度の健全化等につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 脂肪の割合のみが異なる普通食 (ND) と高脂肪食 (HFD) を C57BL/6J マウス (n=6 ずつ) に 5 週間摂取させて初期のメタボリックシンドロームの状態に誘導した。実験 1 では、最終日に 16 時間の絶食を行い、実験 2 では、最終日に HFD 群の餌を普通食に置き換え、両群の餌の摂取状況を統一した状況で、採血と臓器の採取を行った。臓器の重量、血糖値、血中中性脂肪、血中コレステロール、肝臓中中性脂肪、肝臓中コレステロール値を測定し、メタボリックシンドロームの進行状況を評価した。

(2) 肝臓、脂肪組織を Lysis 溶液中でホモジナイズしタンパク質を抽出した。得られたタンパク質溶液をトリプシン消化し、Ziptip によって脱塩した後に、得られたペプチドを nanoLC-MS/MS (SCIEX, TripleTOF5600+) で解析した。まずは Information dependent analysis (IDA) 法で解析し、得られた MS/MS データを Uniprot のマウスのタンパク質データベースに対してデータベース検索を行って Ion library を作成した。次に同じ試料を SWATH 法で解析し、網羅的なフラグメントイオンの定量を行った。得られた結果を Ion library と照らし合わせることで、網羅的な定量解析を行った。タンパク質量定量データを ND 群と HFD 群で比較して、存在量に有意な差が見られたタンパク質について、肥満との関連を考察した。また、必要に応じて Western blot を用いて、実験結果の確認を行った。

4. 研究成果

(1) C57BL/6J マウスに普通食 (ND) と高脂肪食 (HFD) を 5 週間摂取させた結果、HFD 群では ND 群と比べて、最終日体重、精巣周囲脂肪重量、空腹時血糖が有意に増加した (図 1)。それに対して、肝臓重量、血中中性脂肪、血中コレステロール、肝臓中中性脂肪、肝臓中コレステロール値などは有意な差が見られなかった。このことから、5 週間の HFD 摂取によって、内臓脂肪の蓄積とインスリン抵抗性は進行しているが、まだ、脂質代謝異常や肝臓の肥大は見られないごく初期のメタボリックシンドロームの状態にあることが示された。そこで、この条件で得られた肝臓と脂肪組織のプロテオーム解析を行った。(2) 実験 2 の最終日に絶食を行った実験区における肝臓のプロテオーム解析を行った、

	HFD	ND
餌 (g/day)	2.30	3.15
初日体重 (g)	20.3±0.8	20.2±0.2
最終日体重 (g)	31.5±2.0*	28.3±1.5
肝臓重量 (g)	0.95±0.07	0.95±0.13
精巣周囲脂肪重量 (g)	1.16±0.29*	0.52±0.22
空腹時血糖値 (mg/dL)	145.75±6.72*	100.89±14.6
空腹時血中中性脂肪 (mg/dL)	81.37±3.19	75.9±8.77
空腹時血中コレステロール (mg/dL)	89.26±7.36	82.5±14.1
肝臓中中性脂肪 (mg/g)	150.04±5.66	154.86±10.07
肝臓中コレステロール (mg/g)	9.23±0.26	9.96±1.07

値は平均値 ± 標準誤差, *: P < 0.01 by t-test

図1. 動物実験の結果

SWATH 解析の結果 1039 種類のタンパク質が同定され、738 種類のタンパク質が定量可能だった。そのうち 121 種類のタンパク質が両群で有意な差がみられ ($P < 0.05$)、HFD 群で 1.5 倍以上増加したタンパク質が 75 種類、1.5 倍以上低下したタンパク質が 26 種類存在した。これらの存在量に差が見られたタンパク質の機能を調べ、肥満と代謝異常の関係を考察した。絶食時には、脂肪組織から流入した脂肪の分解、アセチル CoA からのケトン体の合成、TCA 回路の抑制と解糖系の更新などが起こることが知られているが、HFD 群では ND 群に比べて、脂肪酸の酸化、ケトン体やコレステロールの合成に関わる酵素の量が増加した。一方、脂肪酸合成、TCA 回路、糖新生経路にかかわる酵素の量が減少したことが示唆された。このうち、脂肪酸合成に関わる Acly、糖新生に関わる Got1、Pck1 については、western blot によっても HFD 摂取によって減少することが確認された。一般的に、型糖尿病患者ではインスリン抵抗性により、グリコーゲンの蓄積が進まず糖新生が亢進することが報告されている。しかし、今回の結果より極初期のメタボリックシンドロームでは逆に糖新生の進行が抑制されており、脂肪分解で生じたグリセロールからピルビン酸に至る経路上の代謝物が蓄積している可能性が考えられた (図 2)

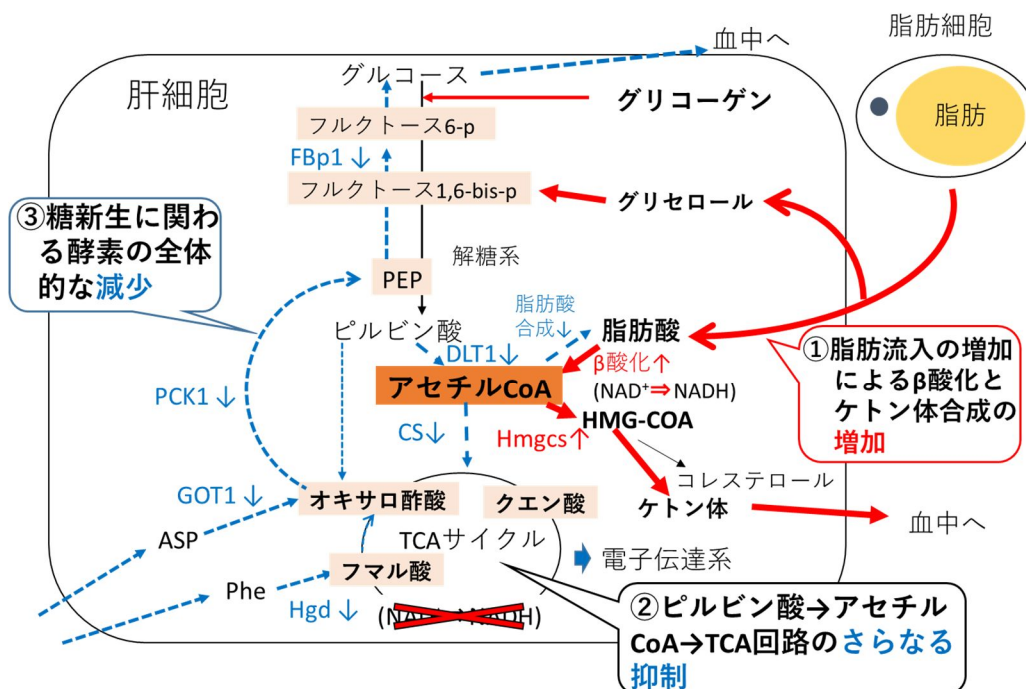


図 2. 高脂肪食摂取が、空腹時の肝臓の代謝に与える影響

また、2 倍以上増加、もしくは減少した 8 種類のタンパク質のうち、HFD 群で増加した 2 種類のタンパク質は、これまでに肥満との関連が報告されていなかった。特に、HFD 群で 9 倍以上増加していた Ubiquitin specific proteinase 5 (UPS5)は、タンパク質に結合していない重合化ユビキチンを分解し、単量体のユビキチンを供給する機能を持ち、これまでに DNA 修復、がん、炎症との関連が報告されているが、肥満との関連は報告されていない。ここから、UPS5 が新規な肥満関連因子である可能性が考えられた (1)。

(2) つぎに、実験 の最終日に絶食を行わなかった実験区における肝臓のプロテオーム解析を行った、SWATH 解析の結果 1092 種類のタンパク質が同定され、875 種類のタンパク質が定量可能だった。そのうち 188 種類のタンパク質が両群で有意な差がみられ ($P < 0.05$)、HFD 群で 1.5 倍以上増加したタンパク質が 8 種類、1.5 倍以上低下したタンパク質が 10 種類存在した。これらの有意な差が見られたタンパク質の機能を解析したところ、HFD 群において肝臓における脂肪酸合成の低下するという予想通りの結果が得られた。また、鉄代謝やビタミン A 輸送に関わるタンパク質など、これまでの報告と一致する結果が得られた。ここから、SWATH 法はメタボリックシンドローム初期の解析方法として有効であることが確認できた。また、HFD 群で 1.9 倍減少した Epiplakin は、ケラチンと相互作用して肝臓保護作用を示すことが報告されている (2) が、これまで、肥満とのかわりには報告されてこなかった。ここから、Epiplakin が新規な生活習慣病の治療標的になる可能性が考えられた。

(3) 更に、実験 の最終日に絶食を行った実験区における精巣周囲脂肪組織のプロテオーム解析を行った、SWATH 解析の結果 798 種類のタンパク質が同定され、278 種類のタンパク質が

定量可能だった。そのうち 10 種類のタンパク質が両群で有意な差がみられ ($P < 0.05$)、HFD 群で 1.5 倍以上増加したタンパク質が 6 種類、1.5 倍以上低下したタンパク質が 1 種類存在した。これらの存在量に差が見られたタンパク質の機能を調べた結果、血中のナトリウム利尿ペプチド (NP) の分解に関わる Natriuretic peptide receptor 3 (NPR3) が HFD 群で 3 倍程度増加していることが示された。近年、NP は脂肪細胞に対して脂肪分解の促進 (3) やベージュ細胞への変換の促進 (4) といった肥満抑制の効果を示すことが明らかになっている。それに対して、血中の NP の分解に関わる NPR3 は肥満したヒトの脂肪組織で発現が増加しており、インスリン抵抗性と相関していることが報告されている (5)。今回の我々の結果は、これらの報告と一致しており、WATH 法はメタボリックシンドローム初期の解析方法として有効であることが確認できた。また、HFD 群において、細胞分解に関わる Notch シグナルに関わる Asparatyl/asparagyl beta-hydroxylase (ASPH) が 2.4 倍増加していた。本タンパク質と肥満との関連はこれまで報告されておらず、新規な肥満関連因子である可能性がある。

以上のように、我々は、肥満マウスの臓器のプロテオーム解析を通して、極初期のメタボリックシンドロームにおいては、糖新生の進行が抑制されており、脂肪分解で生じたグリセロールからピルビン酸に至る経路上の代謝物が蓄積している可能性が示された。また、肝臓における USP5 や Epiplakin、脂肪組織における ASPH などの新規な肥満関連因子を発見した。今後は、これら因子の治療標的としての可能性を検討していく。

<引用文献>

- (1) Ning F, *et al* Pharmacological Research 157 (2020) 1045571
- (2) Sandra, Szabo. *et al*. Journal of Hepatology (2015) 62、1357–1366
- (3) Sengenès, C. *et al*. FASEB J. (2000) 14、1345-1351.
- (4) Birkenfield, A. L. *et al*. J. Clin. Invest. (2012)、122、1022-1036
- (5) Kovacova, Z. *et al*. Obesity (2016) 24、820-828.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉元健人, 井関七海, 黒川萌音, 三澤成葉, 長嶺凜子, 岸田邦博, 永井宏平
2. 発表標題 SWATH法による高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓の定量プロテオミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岸田 邦博 (Kishida Kunihiro) (30412703)	近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------