

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 27 年 4 月 2 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 東京医科歯科大学医学部附属病院
職 名 助教
研究代表者 土屋 恭一郎

下記のとおり平成26年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:14007)

1. 共同研究課題名	フォークヘッド転写因子の翻訳後修飾に注目した動脈硬化における病態生理的意義の解明			
2. 共同研究目的	フォークヘッド転写因子 (forkhead transcription factors:FoxO) の機能は主にリン酸化、アセチル化により調節され、生理的にはインスリンによるリン酸化と高血糖による脱アセチル化が知られている。脱リン酸化 FoxO と脱アセチル化 FoxO は共に転写因子として“活性型”と考えられているが、両者の機能的差異は不明である。2型糖尿病ではインスリン抵抗性(脱リン酸化)と高血糖(脱アセチル化)がECのFoxOを活性化すると考えられるが、各々の要因がどのように動脈硬化の進展に関与するかは明らかでない。本研究では、ECにおけるインスリン抵抗性と高血糖の動脈硬化における病態生理を、FoxOの翻訳後修飾の観点から独立して明らかにすることを目的とする。			
3. 共同研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 土屋 恭一郎	糖尿病・内分泌・代謝内科	助教	研究計画作成、実験施行、論文作成	
(分担研究者) 小川 佳宏	東京医科歯科大学大学院・分子内分代謝学分野	教授	研究計画作成、学術的助言	
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	代謝シグナル解析分野	氏名	北村 忠弘

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

培養 EC にアデノウィルスを用いて野生型 FoxO1、恒常的脱リン酸化 FoxO1 (FoxO1-ADA) および恒常的脱アセチル化 FoxO1 (FoxO1-KR) を導入する。これらの細胞間で DNA マイクロアレイ解析を施行し、野生型 FoxO1 群をコントロールとして FoxO1-ADA 群と FoxO1-KR 群で発現調節が異なる遺伝子を同定する。動脈硬化症との関連が既知の遺伝子は、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、およびクロマチン免疫沈降法により制御機構を比較する。関連が未知の遺伝子は、培養 EC で過剰発現系および発現抑制系を構築し、一酸化窒素産生、炎症系シグナル等の評価により機能解析を行う。EC 機能に関与が示唆される遺伝子については、FoxO による転写制御機構を解析し、新たなモデルマウス作成の糸口とする。

7. 共同研究の成果

これまで、FoxO1-ADA 導入細胞の DNA マイクロアレイ解析を施行し、検討を進めている。FoxO1-ADA アデノウィルスをマウス血管内皮細胞株 (MS-1 細胞) に導入し、DNA マイクロアレイ解析を施行した。FoxO1-ADA (100MOI) により FoxO1 mRNA は約 30 倍に上昇を確認した。DNA マイクロアレイ解析により、表 1 に挙げる遺伝子の発現が FoxO1-ADA により 3 倍以上に増加していた。このうち、Lcn2 (lipocalin-2/NGAL) は定量的 RT-PCR (図 1) 及び ELISA 法 (図 2) において遺伝子発現及び蛋白分泌の増加が確認された。lipocalin-2 はグラム陰性菌に対する鉄イオン封鎖効果による強力な静菌作用を持つ物質として同定された (Nature 2004;432:917-921)。EC 機能との関連においては、ラットへの lipocalin-2 投与により血管組織の eNOS 機能不全 (eNOS アンカップリング)、酸化ストレス産生の増加を伴い、血管機能障害が惹起されることが報告されている (Br J Pharmacol 2012;165:520-31)。EC 欠損ラットにおいては大動脈のインスリンシグナルが増強することが示されており (Br J Pharmacol 2012;165:520-31)、lipocalin-2 は血管のインスリン抵抗性を惹起する可能性も考えられる。EC 由来 Lipocalin-2 の意義、及びインスリン抵抗性・FoxO による発現調節機構は明らかになっておらず、今後検討を進めていきたい。

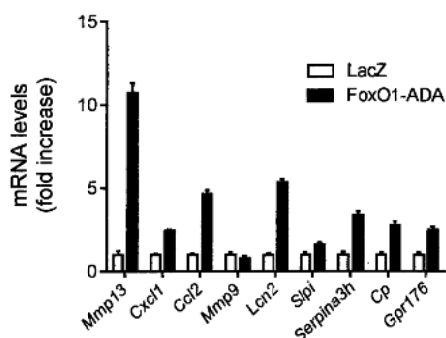


図 1 MS1 細胞への ADA-FoxO1 過剰発現における遺伝子発現の確認 マイクロアレイ結果を踏まえた定量的 RT-PCR による確認。

表 1: FoxO1-ADA 導入 EC のマイクロアレイ解析

遺伝子名	ID	ADA vs. LacZ (Fold change)
<i>Sl00g</i>	NM_009789	19.67
<i>Mmp13</i>	NM_008607	12.03
<i>Lcn2</i>	NM_008491	5.80
<i>Apod</i>	NM_007470	5.79
<i>Slpi</i>	NM_011414	4.99
<i>Sema3c</i>	NM_013657	4.05
<i>Serpina3h</i>	NM_001034870	3.82
<i>LOC100048386</i>	XM_001480393	3.68
<i>Il1f6</i>	NM_019450	3.65
<i>Fbxo15</i>	NM_015798	3.33
<i>Irg1</i>	NM_008392	3.30
<i>Ccl2</i>	NM_011333	3.20
<i>Dkk2</i>	NM_020265	3.17
<i>Cp</i>	NM_007752	3.03

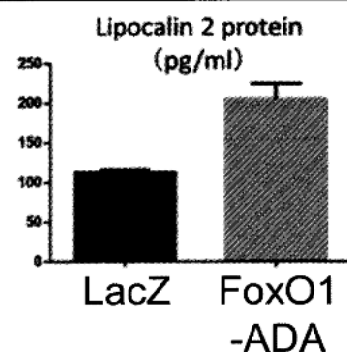


図 2 FoxO1-ADA 過剰発現における培養上清の lipocalin-2 蛋白濃度 ELISA 法による測定

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出して下さい。) なし