

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591304

研究課題名(和文)新規内臓脂肪量マーカーの臨床応用

研究課題名(英文)CCDC3 is specifically upregulated in omental adipose tissue in subjects with abdominal obesity

研究代表者

卯木 智(Ugi, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：20378483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、5名ずつの肥満者・非肥満者での生検内臓・皮下脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析により、肥満者の内臓脂肪において特異的に発現が増加する因子 CCDC3を新規に同定した。肥満モデルマウスにおける検討でも、内臓脂肪特異的に発現が増加しており、さらに、脂肪生検を行った43名での検討において、内臓脂肪組織における本遺伝子発現量は、BMIおよびウエスト周囲長と有意に相関したが、皮下脂肪組織における発現は相関しなかった。

この因子は、シグナルペプチドを有し、実際、培養液に蛋白が分泌されることが確認された。このことから、その血中濃度は、内臓脂肪量を推定するバイオマーカーとなる可能性がある(論文掲載)。

研究成果の概要(英文)：To search for novel markers of visceral adiposity, visceral and subcutaneous adipose tissues were obtained from 43 Japanese men. We conducted microarray analysis using RNA from visceral and subcutaneous adipose tissues obtained from five men with abdominal obesity and five non-obese men. The mRNA expression of CCDC3 (encoding coiled-coil domain-containing protein 3) was upregulated in omental adipose tissues from abdominally obese subjects (3.07-fold) but not in subcutaneous adipose tissues (0.89-fold). Similar expression patterns were found in two distinct mouse models of obesity. In the analysis of all 43 men, CCDC3 mRNA levels in omental, but not in subcutaneous adipose tissue, were positively correlated with waist circumference and BMI. CCDC3 was predicted to be a secretory protein, which was confirmed by western blotting.

These results suggest that CCDC3 is a potential biomarker for estimating visceral adiposity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：内臓脂肪 アジポサイトカイン メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は、様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する内分泌臓器であり、生体内の恒常性を維持するために重要な働きをしている。肥満、すなわち脂肪細胞が肥大化すると、アディポサイトカインの分泌異常がおこり、インスリン感受性の低下、動脈硬化惹起などをひきおこし、これがメタボリックシンドロームの成因のひとつと考えられている。従って、アディポサイトカインの同定、生体内における機能、分泌調節機構を解明することは、メタボリックシンドロームの発症阻止、治療につながる可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト生検内臓脂肪組織および皮下脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析により、肥満者の内臓脂肪において特異的に発現が増加する因子を新規に同定し、その機能解析を行う。さらには、同定された因子の、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病状態における意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、滋賀医科大学倫理委員会の承諾を得た。試験参加者へは、書面による説明と承諾を得て行われた。

(2) 対象(表)

滋賀医科大学附属病院において、早期胃癌手術を施行した男性 43 名(平均年齢 68.9 歳、平均 BMI 23.4)において、術中に内臓脂肪および皮下脂肪生検を行い、total RNA を抽出した。

Variables	Non-obese	Abdominal Obesity	P value
Age (years)	69.4 ± 7.1	66.0 ± 7.7	0.49
BMI (kg/m ²)	21.5 ± 0.7	25.3 ± 0.9	> 0.001
Waist Circumference (cm)	78.5 ± 5.3	90.7 ± 3.2	> 0.001
HbA1c (%)	5.34 ± 0.25	5.52 ± 0.25	0.30
Leptin (ng/ml)	2.88 ± 1.25	4.80 ± 2.01	0.11
Adiponectin (µg/ml)	7.12 ± 1.39	3.46 ± 1.84	> 0.01
hsCRP (mg/L)	0.82 ± 0.67	0.39 ± 0.22	0.23
IL-6 (pg/ml)	2.16 ± 0.88	1.46 ± 0.47	0.17

(3) マイクロアレイ

脂肪生検を施行した 43 名のうち、5 名ずつの肥満者および非肥満者(平均 BMI 21.5 vs 25.3)において、生検内臓脂肪組織および皮下脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析(Alient Technologies 社、human genome Oligo Microarray)を行い、肥満者において 2 倍以上に発現が増加している遺伝子を検索した。

(4) 動物実験

2 種類の肥満モデルマウスを用いた。雄性 c57BL/6J マウス 5 匹ずつを通常食(NC)および高脂肪食(HFD)で 13 週間飼育した。また、雄性 db/db マウスおよび db/m+マウスを通常食で 15 週間飼育した。おのおののマウスから内臓脂肪組織および皮下脂肪組織を用いてマイクロアレイ解析を行った(Alient Technologies 社、mouse genome Oligo Microarray)。

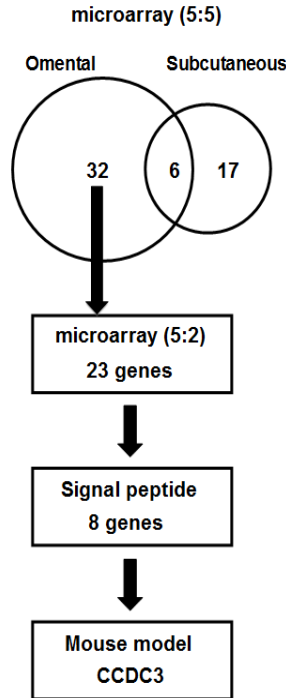
(5) 細胞培養細胞

ヒト CCDC3 cDNA をコードする FLAG-tag 発現ベクター(GeneCopeia 社、pReceiver)を遺伝子導入により HEK293T 細胞に発現させたのち、48 時間培養を行い、培養液を回収し、anti-FLAG 抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) ヒトにおけるマイクロアレイ結果

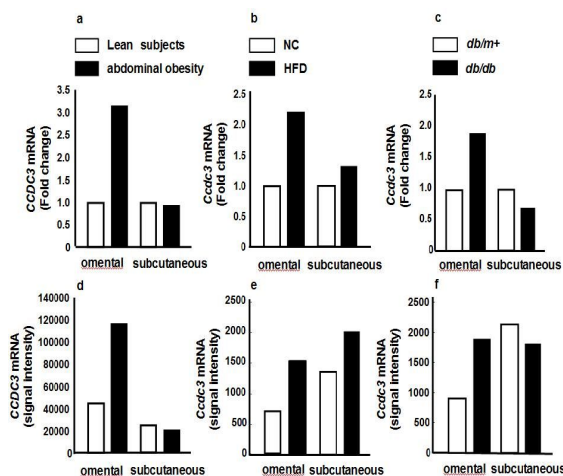
5名ずつの肥満者・非肥満者において、マイクロアレイ解析により、30,500遺伝子の中で、内臓脂肪または皮下脂肪において発現上昇している遺伝子は55個あった。うち、38遺伝子は内臓脂肪で、さらにそのうちの32遺伝子は内臓脂肪でのみ発現上昇していた(図)。



耐糖能異常による発現への影響を除外するため、10名のうち、正常耐糖能者のみ(非肥満5名、肥満2名)を選択し、再度マイクロアレイ解析をした結果、内臓脂肪特異的には発現が上昇していた遺伝子は23個あった。その中で、シグナルペプチドを有し、分泌蛋白と予測される遺伝子は8個あった。

(2) マウスにおけるマイクロアレイ結果

同定された8遺伝子について、2つの肥満モデルマウスにおける発現について検討した。その結果、8遺伝子の中で、CCDC3のみが、ヒトでの結果と同様に内臓脂肪特異的には発現が増加していた。



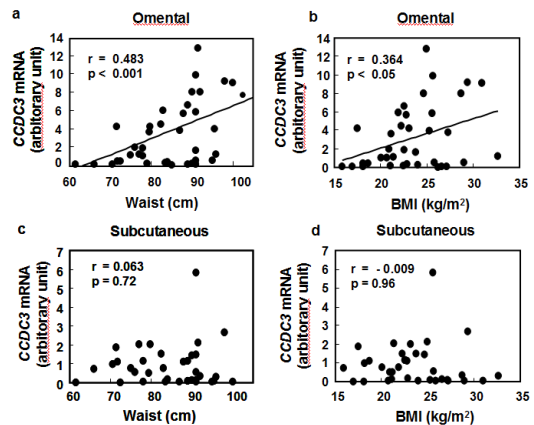
ヒトにおける CCDC3 発現：内臓脂肪 2.15 倍、皮下脂肪 1.28 倍。

HFD マウス：内臓脂肪 2.15 倍、皮下脂肪 1.28 倍。

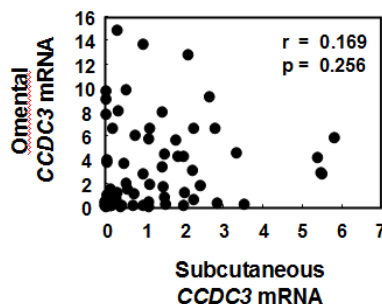
db/db マウス：内臓脂肪 1.9 倍、皮下脂肪 0.7 倍 (図左下)。

(3) CCDC3 発現量と BMI およびウエスト周囲長との相関

脂肪生検を施行した 43 名において、内臓脂肪・皮下脂肪組織における CCDC3 mRNA 発現量とウエスト周囲長および BMI との相関を検討した。その結果、内臓脂肪組織における CCDC3 mRNA 発現量は、ウエスト周囲長 ($r = 0.483, p < 0.001$)、および BMI ($r = 0.364, p < 0.05$)と有意に正相関した。一方、皮下脂肪組織における発現量は相関しなかった(図下)。

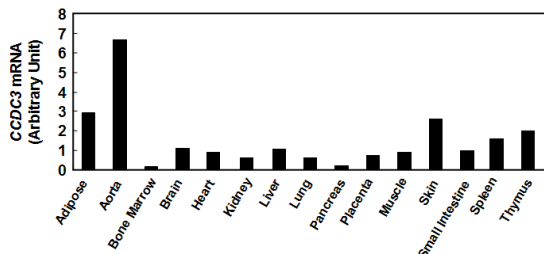


また、CCDC3 mRNA の内臓脂肪における発現量と皮下脂肪における発現量は相関しなかった(図下)。



(4) 臓器別 CCDC3 発現特性の検討

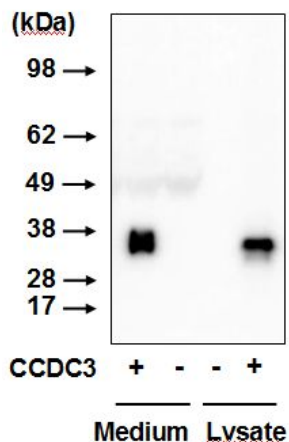
ヒトにおいて、臓器別の *CCDC3* 発現特性について検討した。*CCDC3* は、大動脈においてもっとも高発現しており、ついで脂肪組織において高発現していた。(図下)



さらに、3T3-L1 脂肪細胞における検討において、*CCDC3* は、線維芽細胞から脂肪細胞への分化に従って発現量が増加した。

(5) CCDC3 蛋白は分泌蛋白である

Swiss-Prot データベースでの検索により、*CCDC3* の遺伝子産物は、N 末端にシグナルペプチドを有する分泌蛋白であることが予測された。そこで、実際に *CCDC3* 遺伝子産物が培養細胞において分泌されるかについて検討した。その結果、ヒト *CCDC3* を発現させた HEK293T 細胞において、培養液中に *CCDC3* 蛋白が分泌されていることを証明した。ウエスタンブロットで同定された分泌蛋白は分子量 38 kDa であり、*CCDC3* 遺伝子から予測される分子量と一致していた(図下)



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)

Satoshi Ugi, Shiro Maeda, Yoshihiro Kawamura, et al:

CCDC3 is specifically upregulated in omental adipose tissue in subjects with abdominal obesity.

Obesity. 22: 1070-1077, 2014.
doi:10.1002/oby.20645 (査読有)

[学会発表](計0件)

[図書](計1件)

卯木 智, 西尾 善彦, 他7名

新たなメタボリックシンドローム発症遺伝子同定のための網羅的研究 ヒト生検脂肪組織マイクロアレイ解析と全ゲノム SNP 解析を用いて

Therapeutic Research 32 巻 6 号 26-30, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

卯木 智 (UGI, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20378483

研究者番号:

20378483

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: