

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09520

研究課題名(和文)D-ドーパクロムトートメラゼに関連する肥満治療薬の開発戦略

研究課題名(英文)A strategy for the development of anti-obesity drugs related to D-dopachrome tautomerase.

研究代表者

岩田 武男 (Iwata, Takeo)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10350399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：D-dopachrome tautomeraseはインスリン抵抗性改善作用をもつアディポカインとして作用するが、macrophage migration inhibitory factor (MIF) と協調してがん細胞の増殖や炎症を促進するMIFホモログでもある。様々な細胞におけるDDT作用とその分子機序を解明することはDDTを標的とした肥満治療薬の開発につながる可能性がある。本研究では3種の異なるがん細胞株でDDTがサイクリンD1発現を促進することで細胞増殖を促進すること、DDTが非血清存在下で培養したマクロファージで炎症作用と抗炎症作用の相反する作用をもつことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は全身性代謝疾患や動脈硬化の発症リスクを高める。日本の診断基準であるBMI 25以上の世界人口は約20億人と言われており、肥満の改善は公衆衛生上の重要課題であるが、安全かつ有効性の高い肥満治療薬はないのが現状である。脂肪組織に作用してインスリン抵抗性を改善するDDTはMIFホモログとしての作用をもつ。本研究でその一端が明らかになったように、様々な細胞でのDDTの作用と作用機序が解明できれば、脂肪組織でのインスリン抵抗性改善作用のみに関わる分子を標的とした肥満治療薬の開発に、またMIFホモログとしての作用を特異的に阻害する抗炎症薬や抗がん薬の開発に、それぞれつながることができると考える。

研究成果の概要(英文)：D-dopachrome tautomerase (DDT) acts as an adipokine that improves insulin resistance, whereas, it is also thought to be a homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF), an inflammatory cytokine that promote cancer growth and inflammation. Investigation of the action of DDT in various cell types and its molecular mechanisms may lead to the development of DDT-related obesity drugs. In this study, we found that DDT promotes cell proliferation by enhancing cyclin D1 expression in three different human cancer cell lines, and that DDT may possess opposing effects on inflammation and anti-inflammation in macrophages derived from THP-1, a human monocytic leukemia cell line, cultured in the absence of fetal bovine serum.

研究分野：機能形態学

キーワード：肥満 肥満治療薬 アディポカイン がん 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

肥満は過剰に蓄積した脂肪組織が炎症をきたしている状態であり、2 型糖尿病、脂質異常症、高血圧を合併しやすい。肥満とこれらの合併症は動脈硬化の原因となり、心筋梗塞、脳卒中などの心・血管の発症リスクを高める。脂肪組織は成熟脂肪細胞と血管間質画分(SVF)からなり、SVF には間葉系幹細胞、前駆脂肪細胞、血管構成細胞、マクロファージなどの免疫細胞が含まれる。脂肪組織はエネルギー過剰時には成熟脂肪細胞で中性脂肪を合成して貯蔵し、エネルギー不足時にはその中性脂肪から脂肪酸を分解して他の組織・細胞に供給するエネルギー調節器官であるが、様々な生体調節を担う生理活性物質であるアディポカインを産生・分泌する内分泌器官でもある。非肥満者の脂肪組織からはインスリン感受性を高めるレプチンやアディポネクチンといった善玉アディポカインが分泌されるのに対し、肥満者の脂肪組織からは善玉アディポカインの分泌が減少し、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインや動脈硬化のリスク因子である PAI-1 など悪玉アディポカインの分泌が増加する。このアディポカインの質的・量的な変化が肥満の合併症発症に関与すると考えられている。

ヒト脂肪細胞が分泌する蛋白質の網羅的解析により同定された「D-ドーパクロムトートメラーゼ (DDT)」は、肥満者の脂肪細胞で発現が低下する。これまでの研究によりインスリン抵抗性改善作用および脂肪分化抑制作用をもつことから DDT は善玉アディポカインであることが示唆され、肥満治療薬の標的となる可能性が示唆される。一方、特定の癌細胞において DDT は炎症性サイトカイン「マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)」と同様に発現が上昇し、MIF と協調して癌細胞の増殖や炎症を惹起する「MIF ホモログ」あることが報告されている。

2. 研究の目的

DDT の脂肪組織での発現や作用は MIF と関連しないことがわかっており、脂肪組織特異的に DDT の発現を高める、あるいは作用を増強する薬物が開発できれば肥満治療薬として応用できる可能性がある。本研究は、様々な細胞での DDT の作用解析を行い、DDT 独自の作用と MIF ホモログとしての作用について検討し、その分子機序を解析することで DDT の肥満治療薬の標的分子を探索につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI1640) に 56°C で 30 分の非働化処理を行った 10% 胎児ウシ血清 (FBS; SIGMA) を添加した培地で、ヒト肝がん細胞株 HepG2 は Dulbecco's minimal Eagle's medium (DMEM) に 10% FBS 添加培地で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。K562 と THP-1 への遺伝子導入は Neon system (ThermoFisher) を用いて 1450 V、10 ms、#1 (K562) と 1400 V、20 ms、#2 (THP-1) の条件下による電気穿孔法で、HepG2 への遺伝子導入は Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) を用いて行った。THP-1 細胞からのマクロファージへの分化は 100 nM horbol 12-myristate 13-acetate を加えて 24-48 時間培養することで行った。

(2) 細胞増殖アッセイ

細胞増殖の評価は、Cell counter TC20 (BIO RAD) による細胞数測定と Cell counting Kit-8 (CCK8; DOJINDO) による細胞活性測定の方法を用いた。

(3) 定量的逆転写 polymerase chain reaction (qRT-PCR)

各細胞からの total RNA 抽出には ISOGEN (ニッポンジーン) を、逆転写反応には ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (東洋紡) を、qRT-PCR には各遺伝子特異的プライマーと Thunderbird[®] SYBR[®] qPCR Mix (東洋紡) および Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) をそれぞれ用いた。各遺伝子の mRNA 量は内部標準遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 量により補正した。

(4) ウェスタンブロッティング

各細胞から抽出したタンパク質を 10-15% の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore) にブロッティングした。その PVDF 膜を Blocking One (ナカライテスク) を用いてブロッキングした後、各一次抗体希釈液に浸して一晩 4°C で反応させた。TBS-T で洗浄後、HRP 標識 IgG 二次抗体で 40 分間反応させた。十分な洗浄を行った後、Immobilon Western (Millipore) により発光させ、そのシグナルを Luminograph III (アトー) で検出した。

4. 研究成果

(1) 肝がん細胞株 HepG2 の細胞増殖における DDT の作用

ヒト肝がん細胞株 HepG2 において MIF は細胞増殖を促進させるが、DDT の作用については不明である。そこで DDT の HepG2 における細胞増殖への影響について検討した。

まず DDT により HepG2 の細胞数がどう変化するかを明らかにするために DDT 遺伝子に対する short hairpin RNA (shDDT) を導入した HepG2 の経時的な細胞活性を測定した。対照の short hairpin RNA (shNC) を導入した細胞に比べ、shDDT 導入細胞では導入後 1 日目から 3 日目まで細胞活性の低下が認められた (Fig. 1)。また shDDT 導入は、細胞周期の促進因子である cyclin D1 (CCND1) mRNA 発現量を減少させたが、アポトーシス関連因子 Bcl-2 associated X-protein (BAX)、Bcl-2-like protein 11 (BIM)、B-cell leukemia/lymphoma 2 (BCL-2) の mRNA 発現量は変化させなかった (Fig. 2)。さらに shDDT 導入 HepG2 細胞では cyclin D1 のタンパク質発現の低下が認められたが、caspase-3 の分解には影響を及ぼさなかった。さらに shDDT 導入 HepG2 に 10 nM 組換え DDT タンパク質 (rDDT) を作用させると、作用させていない対照群に比べ細胞増殖の促進が認められた。これらの結果より、DDT は HepG2 の細胞増殖促進作用をもち、その機序には cyclin D1 の発現上昇は関与するがアポトーシスは関与しないことが示唆された。

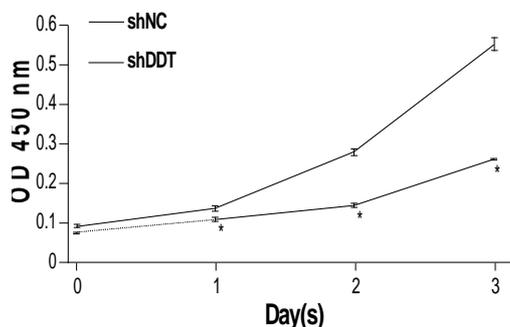


Fig. 1 shNC(実線)およびshDDT(点線)導入 HepG2 の細胞活性の経時的変化。* $P < 0.05$ (n=3)。

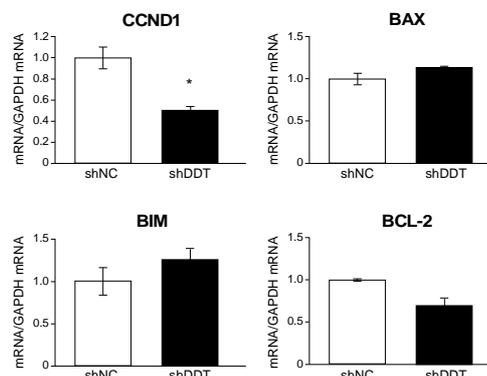


Fig. 2 shNC (白カラム) および shDDT (黒カラム) 導入 HepG2 の細胞増殖関連因子 mRNA 発現。* $P < 0.05$ (n=3)。

(2) 慢性骨髄性白血病細胞株 K562 の細胞増殖における DDT の作用

DDT の白血病細胞における作用は報告されていない。そこでヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞における細胞増殖への関与について検討した。shDDT を導入した K562 の細胞増殖を shNC を導入した K562 のものと比較したところ、shDDT は K562 の細胞数と細胞活性の増加を抑制した。shDDT は K562 の cyclin D1 mRNA 発現を抑制し、慢性骨髄性白血病における細胞増殖促進タンパク質である BCR-ABL の mRNA 発現も有意差は認められないものの低下させる傾向を示した。一方で、shDDT は K562 のアポトーシスに影響を及ぼさなかった。これらの結果から、DDT は cyclin D1 発現を介して K562 の細胞増殖を促進する可能性が示唆された。

(3) 単球性白血病細胞株 THP-1 の細胞増殖における DDT の作用

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 の細胞増殖における DDT の作用について検討を行った。shDDT 導入 THP-1 では shNC 導入細胞に比べ統計的に有意な細胞活性の低下が認められた。shDDT 導入が THP-1 細胞の細胞増殖関連因子の mRNA 発現に及ぼす影響について検討したところ、shDDT 導入細胞では shNC 導入細胞に比べて、アポトーシス促進因子 BAX の mRNA 発現量は有意に高く、cyclin D1 mRNA 発現では有意差はないものの低い傾向にあった。以上の結果から DDT は THP-1 の細胞増殖抑制作用をもつことが示唆された。

(4) マクロファージにおける DDT の作用

脂肪組織は成熟脂肪細胞と血管間質画分の細胞からなり、血管間質細胞には前駆脂肪細胞や血管構成細胞のほか、マクロファージなどの免疫細胞が含まれる。肥満の脂肪組織では 1 型マクロファージの浸潤が促進され、周囲の細胞と相互作用することで TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインが分泌されるようになる。しかし、その相互作用の詳細な機序は不明である。DDT は脂肪細胞に作用して脂質代謝を抑制すること、前駆脂肪細胞に作用して脂肪分化を抑制することは明らかになっているが、マクロファージに対する作用に対してはほとんど明らかになっていない。そこでヒト単球細胞株 THP-1 細胞から分化させたマクロファージを用いて DDT が炎症性サイトカイン発現・分泌に与える影響について検討した。

FBS 存在下で 10 nM rDDT を 3 時間作用させた分化マクロファージでは、作用させていない対照細胞と比べて tumor necrosis factor- α (TNF- α) と interleukin-1 β (IL-1 β) の mRNA 発現量に差が認められなかったが、リポ多糖 (LPS) によるこれらの mRNA 発現誘導を増強した。FBS 非存在下では、10 nM rDDT を 3 時間作用させた分化マクロファージでの TNF- α と IL-1 β の mRNA 発現を上昇させた。さらに FBS 非存在下での 24 時間の rDDT 処理は LPS による IL-1 β の mRNA

発現誘導と培地中への分泌を抑制した。さらに rDDT は LPS による NF- κ B シグナルの活性化を抑制した。

DDT は肝がん細胞株 HepG2、慢性骨髄性白血病株 K562、単球性白血病細胞株 THP-1 のいずれのがん細胞株に対して細胞増殖促進作用を示したことから、幅広いがん細胞に対して MIF と同様に細胞を増殖させると考えられる。しかし、HepG2 における MIF の細胞増殖促進作用には cyclin D1 発現上昇とアポトーシス促進作用の両方が関与するが、DDT の HepG2 細胞増殖の作用にはアポトーシスは関与しなかった。したがって DDT と MIF の細胞増殖促進機序は同一ではない可能性が考えられた。

分化マクロファージの炎症性サイトカイン mRNA 発現に対して DDT の作用は FBS の有無により異なることが分かった。本研究による検討では DDT は LPS 誘導性の IL-1 β 発現を FBS 存在下では促進し、FBS 非存在下では抑制するという相反する結果になったことから、DDT は潜在的に炎症作用と抗炎症作用の両方を持っており、状況に応じて異なる作用が現れる可能性が示唆された。これらの DDT の作用の違いを決める環境と分子機序を明らかにすることができれば DDT の抗炎症作用を増強する、あるいは炎症作用を抑制する薬物の開発につながり、肥満治療やがん治療に役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TAKAHASHI ASUKA、IWATA TAKEO、YAMASHITA KIKUJI	4. 巻 41
2. 論文標題 Knockdown of D-dopachrome Tautomerase Inhibits Cell Proliferation in Human HepG2 Cell Line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4077 ~ 4082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋飛鳥、岩田武男、大津海人、丸山彩輝、山下菊治
2. 発表標題 皮下及び内臓脂肪細胞で異なる発現を示す遺伝子の同定
3. 学会等名 本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋飛鳥、岩田武男、山下菊治
2. 発表標題 D-dopachrome tautomeraseはヒト肝がん細胞株HepG2の細胞増殖を促進する
3. 学会等名 第24回バイオ治療法研究会学術集会（福岡）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田武男、猪又里穂、山下菊治
2. 発表標題 インスリン抵抗性改善作用を有するアディポカインD-dopachrome tautomeraseの単球・マクロファージにおける機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水澤典子、原田永勝、岩田武男、吉本勝彦
2. 発表標題 Prss53は腓 細胞のミトコンドリア機能を介した細胞維持に關与する
3. 学会等名 第22回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2019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	水澤 典子 (Mizusawa Noriko) (80254746)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究 分担者	吉本 勝彦 (Yoshimoto Katsuhiko) (90201863)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

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
---------	---------