

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590253

研究課題名（和文） 肝脂質蓄積に関与する新たなシグナル因子の機能解析-脂肪肝原因因子としての評価-

研究課題名（英文） Physiological function of novel factor related to hepatic fat accumulation

研究代表者

松末 公彦 (MATSUSUE KIMIHIKO)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10389364

研究成果の概要（和文）：

Hepatic PPAR γ -Dependent 1 (hpd1) 遺伝子は、ob/ob マウスの脂肪肝に高発現している遺伝子として我々によって単離された機能未知遺伝子である。本遺伝子は、正常肝臓では低レベルであり、PPAR γ がノックアウトマウスされた ob/ob マウスの脂肪肝にはその発現が低下するため、PPAR γ によって発現制御されていることが推測される。本研究においては、hpd1 遺伝子のプロモーター領域に PPAR γ 結合領域を見出した。Hpd1 遺伝子の発現調節は、その領域に PPAR γ が直接結合することで制御されていることを明らかにした。また、hpd1 遺伝子の脂肪肝以外の発現組織として、本遺伝子は白色及び褐色脂肪組織に高発現が認められた。さらに、hpd1 タンパク細胞内局在として、本タンパクは 3T3-L1 脂肪細胞のミクロソーム画分に局在していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Hepatic PPAR γ -Dependent 1(hpd1) gene was isolated as high level in fatty liver of leptin-deficient (ob/ob) mouse and as unknown function. The expression of hpd1 gene is at markedly lower levels in ob/ob livers lacking PPAR γ . The present study shows that a functional PPAR response element (PPRE), located in promoter region of hpd1, directly interacts with PPAR γ . The hpd1 gene was highly expressed in not only fatty liver but also white and brown adipose tissues. To assess subcellular localization of hpd1 protein, 3T3-L1 adipocytes were fractionated by differential centrifugation. The result showed that the hpd1 protein is exclusively detected in the microsomal fraction. However, the exact subcellular localization of hpd1 protein remains to be clarified. Taken together, these results indicate that hpd1 gene is a direct target gene of PPAR γ . The gene product may be associated with fat accumulation in liver or adipose tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：転写

1. 研究開始当初の背景

典型的な肥満及び 2 型糖尿病モデル *ob/ob* マウスの脂肪肝において発現が上昇している転写因子、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) の欠損は、wild *ob/ob* マウスが発症している重篤な脂肪肝を劇的に改善した(Matsusue et al. *J. Clin. Invest.*, 2003)。この結果は、PPARgamma が脂肪肝発症に関与していることを意味する。しかしながら、PPARgamma は転写因子であるため PPARgamma 制御下で脂肪肝形成に直接関与するエフェクター因子の存在が予想された。そこで、申請者はそのエフェクター因子の網羅的な単離のため GeneChip 発現解析を行い、機能未知遺伝子 *hpd1* (Hepatic PPARgamma-Dependent 1) 遺伝子の単離に成功した。

2. 研究の目的

本研究は、肥満あるいは 2 型糖尿病病態下の脂肪肝にこれまで知られていない新たな脂質蓄積シグナルが存在し、このシグナルの活性化が脂肪肝を引き起こしているとの仮説を実証する。すなわち、本研究計画では、脂質蓄積シグナル因子の候補としての *hpd1* 遺伝子産物の生理機能を解析し、本遺伝子産物と脂肪肝発症との関連性の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1. *hpd1* 遺伝子のプロモーター解析

・デリジョンレポータープラスミドによるルシフェラーゼ活性の測定。

2. *hpd1* 遺伝子の組織及び細胞発現性の確認

・リアルタイム PCR による各組織、細胞における *hpd1* mRNA の定量。

3. *hpd1* 遺伝子産物の細胞内局在性

共焦点顕微鏡による抗 *hpd* 抗体による蛍光免疫染色。

細胞分画されたタンパクの抗 *hpd* 抗体によるウェスタンブロット。

4. 研究成果

Hpd1 遺伝子は、正常の肝臓においては低発現であるが、*ob/ob* マウスの脂肪肝には高発現している機能未知遺伝子である。さらに、本遺伝子は PPARgamma のノックアウトマウスにおいてその発現が低下するため、PPARgamma によって制御されていることが推測された。本研究の成果を以下に要約する。

1) *hpd1* 遺伝子のプロモーター領域には PPARgamma 結合領域が存在した。

hpd1 遺伝子のプロモーター解析の結果、本遺伝子のプロモーター領域に PPARgamma 結合配列を見出した。本遺伝子のプロモーター活性は、PPARgamma のリガンドであるロジグ

リタゾン処理により著しく上昇した。この結果より、*hpd1* 遺伝子は PPARgamma の新規標的遺伝子であることが明らかになった。

2) *Hpd1* 遺伝子の発現は、脂肪肝のみならず脂肪組織に高発現していた(図 1)。さらに、本遺伝子の発現は前駆脂肪細胞においては殆ど認められないものの、成熟脂肪細胞には高発現していた(図 2)。

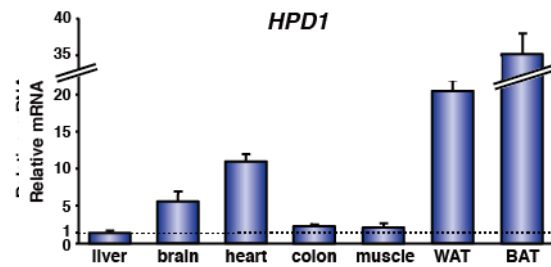


図 1. 各組織における HPD1 遺伝子の発現

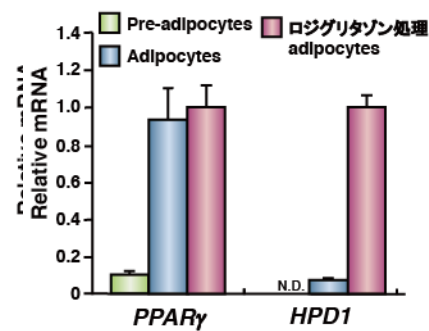


図 2. 3T3-L1 脂肪細胞における HPD1 遺伝子の発現

Hpd1 遺伝子は、脂肪肝においてその発現が上昇している遺伝子として単離されたが、脂肪組織にも高発現していることが明らかになった。本遺伝子産物は、脂肪肝及び脂肪組織に特徴的な脂肪の蓄積に関与している可能性がある。

3) *Hpd1* タンパクはミクロソーム画分に存在した。

機能未知タンパクの細胞内局在性を明らかにすることは、その機能を解明するために重要な知見となる。本研究において、作製された *hpd1* タンパクの抗体を用いることで、*hpd1* タンパクがミクロソーム画分に局在していることを明らかにした。ミクロソーム画分には小胞体や細胞骨格などのオルガネラが存在しているため、*hpd1* タンパクはこれらのオルガネラで機能していることが推測された。現在、*hpd1* タンパクが局在する詳細なオルガネラを同定している。

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 3 件)

1. Matsusue, K. A Novel Mechanism for Hepatic Lipid Accumulation: A Physiological Role for Hepatic PPAR γ -fsp27 Signal. *Yakugaku Zasshi* 132, 823–829 (2012).

DOI.10.1248/yakushi.132.823.

査読：無

2. K Uno, T Yamada, Y Ishigaki, J Imai, Y Hasegawa, J Gao, K Kaneko, K Matsusue, T Yamazaki, Y Oka, and H Katagiri. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- γ -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *European Heart Journal* 33, 1279–1289 (2011).DOI:10.1093/eurheartj/ehr265

査読：有

3. Matsusue, K. A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull* 33, 346–350

(2010).DOI:10.1248/bpb.33.346.

査読：有

[学会発表] (計 11 件)

1. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂 (平成 25 年 3 月 28 日). 機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 1 に対する shRNA 発現ベクターの作製 及び発現抑制効果の評価. In 第 133 年会日本薬学会 (横浜).

2. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂 (平成 24 年 12 月 8 日). 3T3-L1 成熟脂肪細胞において誘導される機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 1 の shRNA を用いた ノックダウン法の検討. In 第 29 回日本薬学会九州支部大会 (熊本).

3. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂 (平成 24 年 3 月 29 日). 3T3-L1 細胞における liver PPAR γ -dependent gene 1 の機能解析. In 第 132 年会日本薬学会 (北海道).

4. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂

(平成 23 年 12 月 10 日). チアゾリジン化合物により誘導される liver PPAR γ -dependent gene 1 の機能解析. In 第 28 回日本薬学会九州支部大会 (福岡).

5. 益崎優祐, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総一, and 山野茂 (平成 23 年 12 月 10 日). 脂肪肝に誘導される機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 2 の発現プロファイル解析. In 第 28 回日本薬学会九州支部大会 (福岡).

6. 松末公彦 (平成 23 年 12 月 10 日). 肝臓の脂質蓄積における新たな制御メカニズムに関する研究. In 第 28 回日本薬学会九州支部大会 (福岡). 奨励賞受賞講演

7. 末吉加津美, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総一, 山野茂 (平成 23 年 12 月 10 日). 脂肪肝に誘導される機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 3 の発現プロファイル解析. In 第 28 回日本薬学会九州支部大会 (福岡).

8. 松末公彦 (平成 23 年 3 月 31 日). 肝脂質蓄積の分子メカニズム. In 日本薬学会年会 131 回 (静岡).

9. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂 (平成 23 年 3 月 28 日). 異なる脂肪肝モデルにおける PPAR γ 新規標的遺伝子の発現解析. In 日本薬学会年会 131 回 (静岡).

10. 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂 (平成 22 年 12 月 11 日). 成因の異なる脂肪肝における PPAR γ 新規標的遺伝子の発現プロファイル解析. In 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎).

11. 瀧口総一, 井上和子, 是永夏樹, 杉枝里香, 片岡泰文, 松末公彦, 李銀姫, 久木田敏夫, 井口東郎 (平成 22 年 9 月 22 日). 肺癌骨転移への CXCL14/BRAK1 の関与. In 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松末 公彦 (MATSUSUE KIMIHICO)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：10389364

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOICHI)
独立行政法人国立病院機構・九州がんセン
ター臨床研究部・室長
研究者番号：00280793