

## 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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790253

研究課題名（和文）善玉アディポカイン候補 D-ドーパクロムトートメラーゼの抗肥満作用に関する研究

研究課題名（英文）A study on the anti-obesity function of an adipokine, D-dopachrome tautomerase

研究代表者

岩田 武男（IWATA TAKEO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10350399

研究成果の概要（和文）：

肥満者の脂肪細胞で発現が低下しているアディポカインとして同定した D-ドーパクロムトートメラーゼ（DDT）は、脂肪細胞での中性脂肪量の制御を行う。本研究では、DDT は脂肪細胞での脂質代謝に関連する遺伝子の発現および活性を制御すること、DDT を投与した肥満マウスではインスリン抵抗性が改善されることを明らかにした。このことから DDT は抗肥満作用を有する善玉アディポカインと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

D-dopachrome tautomerase whose mRNA levels are decreased in obese adipocytes acts to regulate contents of triacylglycerol in adipocytes. In this study, DDT was found to regulate expression and activity of molecules involved in lipid metabolism in adipocytes. Furthermore, administration of DDT improved the glucose intolerance in obese mice. These results suggested that DDT acts as an adipokine with anti-obese property.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：アディポカイン、肥満、脂肪組織、インスリン抵抗性、脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 肥満の病態

肥満は脂肪組織が過剰に蓄積した状態であり、2 型糖尿病、高血圧、脂質異常症など動脈硬化の危険因子となる疾患の発症リスクを高めるだけでなく、肥満自体が動脈硬化の危険因子となる。脂肪組織は単なるエネルギー

の貯蔵器官でなく、様々な生理活性物質、いわゆるアディポカインを分泌する内分泌器官である。正常な脂肪組織はインスリン感受性を高めるアディポネクチンやレプチンなど善玉アディポカインを分泌し、全身性の糖代謝の制御に重要な役割を担っているが、肥満の脂肪組織からは善玉アディポカインの分泌の低下および、炎症性サイトカインや

レジスチンなどの悪玉アディポカインや遊離脂肪酸の分泌が亢進する。このアディポカインの分泌プロファイリングの変化が肥満によるインスリン抵抗性の発症を引き起こすと考えられており、肥満に関連する新規アディポカインの同定と機能解析の試みが国内外で行われている。

## (2) 新規アディポカイン D ドーパクロムトートメラゼの同定

ヒト脂肪細胞が分泌するタンパク質のプロテオーム解析により得られた新規アディポカイン候補の中で、肥満者の脂肪細胞で mRNA 発現量が低下する D ドーパクロムトートメラゼ (DDT) に着目し、その機能解析を行なっている。DDT は D ドーパクロムを 5,6 ジヒドロキシインドールに変換する酵素として同定されたが、D 体であるその基質は生体内で不活性のため、その酵素活性が DDT の真の生理作用とは考えられていない。DDT はその三次構造が多様な生理活性を有するサイトカインであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) と類似しており、最近になって、DDT は MIF と協調して肺ガン細胞株で血管新生を促進すること、マクロファージで炎症刺激依存性に炎症性サイトカインの分泌を促す MIF と同様の作用があることから、MIF の機能ホモログである可能性が示唆されている。

## (2) DDT と MIF の相違

これまでの研究により DDT は肥満者の脂肪細胞で発現が低いこと、前駆脂肪細胞には発現がほとんど認められず、脂肪細胞への分化の伴い、発現が上昇することが示された。一方、MIF は前駆脂肪細胞でも発現しており、脂肪分化過程でその mRNA の発現が変動しないこと、肥満者で発現が上昇することが報告されていることから、脂肪組織での DDT と MIF は発現挙動が異なり、脂肪組織で DDT は MIF と異なる作用を有する可能性がある。

## (4) DDT の脂肪細胞への作用

DDT を標的とする short hairpin RNA (shRNA) を発現するアデノウイルスを感染させたヒト前駆脂肪細胞株 SGBS 細胞を脂肪細胞に分化させ DDT 発現抑制脂肪細胞を作製した。この細胞では中性脂肪量の増加が認められ、さらに脂質代謝に関連する遺伝子の発現増加とインスリン抵抗性惹起因子である FABP4 (別名 aP2) の発現増加が認められた。この結果は DDT が脂肪細胞に作用して、脂質代謝を制御する可能性を示唆する。本研究では、DDT の脂肪細胞への作用をより詳細に検討するとともに、DDT の肥満によるインスリン抵抗性への関与について検討した。

## 2. 研究の目的

### (1) 脂肪細胞での DDT の作用機序の解明

DDT は脂肪細胞への脂質代謝を制御することが示唆されている。その作用機序を明らかにする。

### (2) インスリン抵抗性への関与の検討

DDT を肥満マウスに投与し、体重、血糖値、インスリン抵抗性への影響について検討する。

### (3) in vivo での脂肪組織に対する作用

DDT の肥満マウス脂肪組織での脂質代謝に対する影響を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) DDT 発現抑制脂肪細胞

DDT を標的とする shRNA を発現するアデノウイルスを感染させたヒト前駆脂肪細胞株 SGBS 細胞を脂肪細胞へ分化誘導した。分化誘導後 9 日目の細胞を実験に用いた。

### (2) AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性レベルの測定

AMPK 活性化型リン酸化抗体 (anti-phosphorylated AMPK-Thr172)、及びその下流の酵素 Hormone-sensitive lipase (HSL), acetyl-CoA carboxylase (ACC) の AMPK によるリン酸化抗体 (抗リン酸化 HSL-Ser565 抗体, 抗リン酸化 ACC-Ser79 抗体) を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

### (3) protein kinase A (PKA) の活性レベルの測定

PKA リン酸化基質抗体 (抗リン酸化 RRXS/T モチーフ抗体)、及び PKA の基質である AMPK と HSL のリン酸化抗体 (抗リン酸化 AMPK-Ser485 抗体, 抗リン酸化 HSL-Ser660 抗体) を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

### (4) DDT 投与によるインスリン抵抗性評価

肥満モデルマウス db/db マウスにリコンビナント DDT を 1 日毎に腹腔内投与し、体重、血糖値、血清インスリン濃度、血清遊離脂肪濃度の測定、及びグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

### (5) DDT 投与マウスの脂肪組織での解析

リコンビナント DDT を投与したマウスの脂肪組織を麻酔下で採取し、タンパク質を抽出し、AMPK 活性化レベル、PKA 活性化レベルを測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DDT は脂肪細胞で AMPK を活性化させる

AMPK は絶食時あるいは運動時に細胞内の ATP 量が低下した際に活性化される酵素で、中性脂肪を分解する酵素である HSL の活性と脂肪酸合成酵素である ACC の活性を抑制することにより、脂質分解、脂肪酸合成を抑制し、ATP の消費を抑える。脂肪細胞での AMPK の不活性化は脂質代謝を促進し、結果としてインスリン抵抗性の惹起因子である遊離脂肪酸の分泌が増加することから、インスリン抵抗性発症の一因として捉えられている。

DDT 発現抑制脂肪細胞では中性脂肪量の増加と、HSL、ACC など脂質代謝に関連する遺伝子発現の増加が認められることから、DDT が AMPK の活性化に及ぼす影響を検討した。DDT 発現抑制脂肪細胞と対照の脂肪細胞間に活性型 AMPK のリン酸化レベルに差異は認められなかったが、AMPK の活性化剤である AICAR を作用させた際に、DDT 発現抑制脂肪細胞では AMPK の活性化が抑えられた。また AMPK によりリン酸化されている HSL と ACC 量が DDT 発現抑制脂肪細胞では低下していた (図 1)。

これらの結果は DDT 発現抑制脂肪細胞では AMPK 活性が低下していることを示唆する。DDT 発現抑制脂肪細胞にリコンビナント DDT を作用させると、活性型 AMPK のリン酸化レベルが上昇した。さらに HSL と ACC の AMPK によるリン酸化レベルも上昇したことから、DDT は脂肪細胞で AMPK を活性化させることにより脂質代謝を制御することが示唆された。

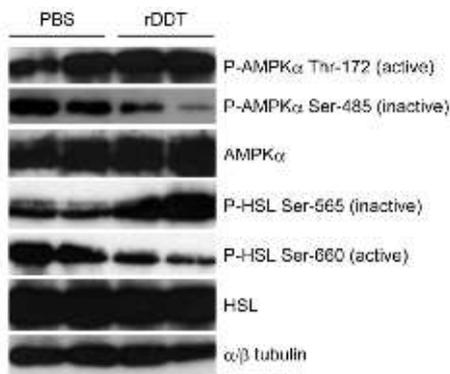


図 1 DDT 発現抑制脂肪細胞での AMPK 及びその基質のリン酸化レベル。(Iwata et al, PLoS One 7: e33402, 2012 より転載)

##### (2) DDT は肥満マウスのインスリン抵抗性を改善する

リコンビナント DDT を投与した db/db マウスでは体重の変動に差異はなかったが、血糖値、血清遊離脂肪酸濃度が DDT 投与マウスで低下していた。血清インスリン濃度に有意差は認められなかったが、低下傾向にあった。グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を

行ったところ、DDT 投与マウスで耐糖能の改善が認められた。これらの結果より、DDT は肥満によるインスリン抵抗性改善作用を有することが示された。

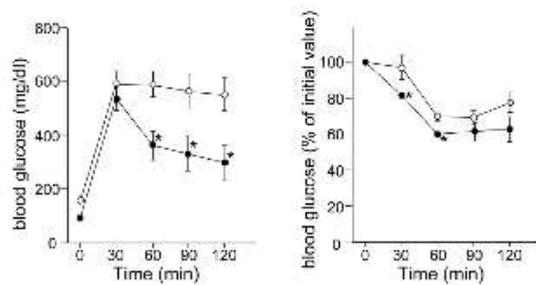


図 2 グルコース負荷試験 (左) とインスリン負荷試験 (右)。●: DDT 投与 db/db マウス ○: 対照 db/db マウス。(Iwata et al, PLoS One 7: e33402, 2012 より転載)

##### (3) DDT は脂肪組織での PKA 活性を抑制する

DDT を投与した db/db マウスの脂肪組織では AMPK の活性型リン酸化レベルに変動は認められなかった。PKA はアドレナリン受容体のシグナル分子であり、HSL による脂質分解を促進する。また AMPK をリン酸化し不活性化することが知られている。そこで DDT 投与マウスの脂肪組織での PKA 活性について検討したところ、PKA による AMPK のリン酸化レベルと HSL のリン酸化レベルが低下していた (図 3)。さらに DDT が作用した脂肪組織では PKA 基質のリン酸化が低下していた。これらの結果は DDT を投与した肥満マウスの脂肪細胞では PKA 活性が低下していることを示唆する。

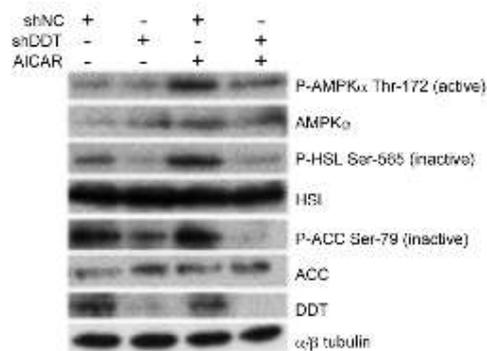


図 3 DDT を投与した肥満マウスの脂肪組織での PKA の基質のリン酸化レベル。(Iwata et al, PLoS One 7: e33402, 2012 より転載)

##### (4) まとめ

DDT は脂肪細胞での AMPK を活性化、あるいは PKA を不活性化することにより脂質代謝を制御する。さらに DDT は肥満によるインスリン抵抗性を改善する作用を有する。

## 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 2 件)

- 1) Iwata T, Taniguchi H, Kuwajima M, Taniguchi T, Okuda Y, Sukeno A, Ishimoto K, Mizusawa N, Yoshimoto K. The action of D-dopachrome tautomerase as an adipokine in adipocyte lipid metabolism. *PLoS One* 7: e33402 (2012) 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0033402
- 2) Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Le CT, Jambaldorj B, Teshigawara K, Harada N, Sakaue, H, Sakai T, Yoshimoto K, Nakaya Y. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 405: 96-101 (2011) 査読有  
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.12.134

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 岩田武男、D-dopachrome tautomerase は肥満マウスでのインスリン抵抗性を改善する、第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011.9.30-10.2、長良川国際会議場 (岐阜市)
- 2) 岩田武男、D-dopachrome tautomerase は脂肪細胞での脂質代謝を制御する、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011.5.19-21、札幌プリンスホテル (札幌市)
- 3) 石本恭子、Functional analysis of a novel adipokine, D-dopachrome tautomerase, in preadipocytes、International Joint Symposium: The University of Tokushima, Universitas Gadjah Mada, Niigata University、2010.12.17-18、The Patra Bali (インドネシア バリ)
- 4) 岩田武男、D-dopachrome tautomerase は脂肪細胞での中性脂肪量を制御する、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010.9.20-22、タワーホール船堀 (東京)
- 5) 石本恭子、D-dopachrome tautomerase が脂肪分化に及ぼす影響、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010.9.20-22、タワーホール船堀 (東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 武男 (IWATA TAKEO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：10350399