

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592799

研究課題名(和文) Dドーパクロムトートメラーゼが関わるインスリン抵抗性発症機序の多角的研究

研究課題名(英文) A study of molecular mechanisms by which D-dopachrome tautomerase improves insulin resistance in obesity

研究代表者

岩田 武男 (IWATA, Takeo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10350399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規アディポカインであるDドーパクロムトートメラーゼ(DDT)はインスリン抵抗性改善能を有する。DDTのインスリン抵抗性改善機序の解明を目的に、脂肪細胞特異的DDT過剰発現マウス(TGマウス)を用いた解析、DDTシグナルで発現変動する遺伝子の同定、DDTの脂肪分化抑制機序の検討を行った。TGマウスでは高脂肪食によるインスリン抵抗性発症の抑制傾向が示された。DDT発現抑制脂肪細胞では、インスリン抵抗性の抑制作用を有するVEGF-Aの発現抑制が、増悪作用を有するSEPP-1の発現上昇が認められた。DDTのヒト脂肪細胞分化抑制機序にc-Fosを介したLMO3の発現抑制が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：D-dopachrome tautomerase (DDT), an adipokine, improves insulin resistance in obesity. To clarify the mechanisms, we performed analysis using transgenic mice overexpressing DDT in the adipocytes (TG mice), identification of genes whose expressions change in DDT-knockdown preadipocytes, and investigation of molecular mechanisms by which DDT inhibits adipogenesis. TG mice fed high fat diet tended to inhibit the insulin resistance. DDT-knockdown in adipocytes decreased expression of VEGF-A that was reported to accelerate insulin resistance, and increased expression of SEPP-1 that inhibits insulin signals in the adipose tissue and skeletal muscle. Adipogenesis inhibited by DDT was specific in a human preadipocyte cell line, SGBS cells. Expressions of LMO3 and c-Fos were decreased in SGBS cells treated with DDT in the presence of glucocorticoid, suggesting that these genes may be involved in adipogenesis inhibited by DDT in human preadipocytes.

研究分野：薬理学、内分泌学

キーワード：アディポカイン インスリン抵抗性 脂肪細胞 肥満

## 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病態であり、直接の動脈硬化の危険因子となる他、2型糖尿病、高血圧、脂質異常症などの動脈硬化関連疾患を合併する。脂肪組織は様々な生理活性物質（アディポカイン）を分泌する内分泌器官であり、正常な脂肪組織から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のいわゆる善玉アディポカインが分泌されるが、肥満の脂肪組織からは善玉アディポカインの分泌低下と腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）、レジスチン、プラスミノゲン活性化抑制因子（PAI-1）などの悪玉アディポカインや遊離脂肪酸の分泌が増加し、これらがインスリン抵抗性や動脈硬化の病態と関連することが知られている。

### (2) D ドーパクロムトートメラーゼ

D ドーパクロムトートメラーゼ（DDT）は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我々が同定した新規アディポカインである。肥満者の脂肪細胞で DDT mRNA 発現量の減少が認められる。肥満モデルマウスである db/db マウスに DDT 組換えタンパク質を投与するとインスリン抵抗性の改善が認められることから、DDT はインスリン抵抗性改善能を有する善玉アディポカインであることが示唆された。さらに DDT の発現低下脂肪細胞では脂質代謝制御因子である AMP-activated protein kinase（AMPK）の不活性による脂質代謝の亢進とインスリン抵抗性惹起因子 aP2 の高発現が認められる。さらに DDT 組換えタンパク質（rDDT）をヒト前駆脂肪細胞株 SGBS に作用させると、脂肪分化の抑制が認められる。これらの作用が DDT のインスリン抵抗性の改善に寄与していると考えられるが、DDT の脂肪組織への作用が完全に明らかになってはおらず、また、その詳細な分子機序の解明が待たれる。さらに DDT の脂肪組織以外への作用における作用等、明らかにすべき課題は多い。

## 2. 研究の目的

本研究では DDT のインスリン抵抗性改善作用の作用機序を明らかにするため、以下の実験を行った。

- (1) 脂肪細胞特異的 Ddt 発現マウスの作製および表現形解析
- (2) DDT の発現抑制細胞で発現が変動する遺伝子の同定
- (3) DDT の脂肪分化抑制作用機序の検討

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

脂肪細胞特異的 Ddt 過剰発現マウス（TG マウス）を以下のように作成した。全長マウス Ddt cDNA を、マウス脂肪組織 total RNA を鋳型に特異的プライマーを用いた逆転写 PCR（RT-PCR）により増幅した。ウサギグ

ロビン遺伝子のエキソン 2 の EcoRI サイトに Ddt cDNA を挿入し、Addgene 社から購入した pBS aP2 promoter polyA のマウス aP2 プロモータの下流に組み込んだ（図 1）。HindIII の消化産物の C57BL6 の卵前核へのインジェクション以降の TG マウスの作製過程は山形大学遺伝子実験施設に委託した。

改変遺伝子特異的プライマーを用いた genotyping スクリーニングにより、5 系統の TG マウスを得た。そのうち脂肪組織で Ddt の発現が高い 2 系統を実験に用いた。マウスは 12 時間明暗サイクル環境下で通常食（日本クレア）と水を自由に与え飼育した。

7 週齢の TG マウスと野生型マウス（WT）の雄 3 匹ずつに高脂肪食（HFD；日本クレア）を 4 週間与え、その間の体重変動、随時血糖を測定した。24 時間絶食後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験により耐糖能を評価した。

24 時間の絶食後にマウスからエーテル麻酔下で脂肪組織、肝臓等の各臓器を摘出した。各臓器から total RNA およびタンパク質を抽出し、リアルタイム RT-PCR（qRT-PCR）、ウエスタンブロット解析により各遺伝子およびタンパク質の発現・活性化を検討した。

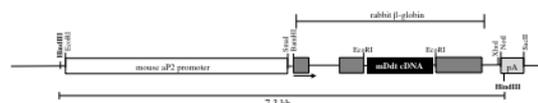


図 1 脂肪細胞特異的 DDT 発現マウス作製に用いた遺伝子コンストラクト。

### (2) DDT 発現抑制で変動する遺伝子の同定

DDT 遺伝子を標的とする shRNA（shDDT）とコントロール shRNA（shNC）を発現するアデノウイルスをそれぞれ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た。脂肪分化開始後、9 日目の細胞から total RNA を抽出し、北海道システムサイエンス社にマイクロアレイ解析（Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K）を委託した。発現変動が認められた遺伝子について、機能をオンラインデータベースや文献で検索し、インスリン抵抗性に関連する遺伝子について、qRT-PCR で発現を検証した。そうのうち、発現変動が認められた vascular endothelial growth factor-A（VEGF-A）とセレノ結合タンパク質（SEPP-1）に関して TG マウスの脂肪組織、肝臓での発現を qRT-PCR、ウエスタンブロット解析により検討した。

### (3) DDT の脂肪分化抑制機序の検討

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 に 5 nM rDDT を作用させ、24 時間後に IBMX, insulin, dexamethasone（DEX）、Troglitazone を加え、脂肪細胞への分化誘導を開始した。3 日後に培地を DMEM-10%FBS に交換し、その後 2 日毎に培地交換を行った。分化開始後 7 日目に Oil-red O 染色を行い、顕微鏡下で観察後、

2-propanol により Oil-red O を溶解し、500 nm の吸光度を測定した。分化 7 日目の脂肪細胞から total RNA を抽出し、脂肪細胞のマーカー遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR により測定した。

5 nM rDDT を 24 時間作用させた SGBS 細胞での LMO3 の発現を qRT-PCR により検討した。また 1  $\mu$ M DEX 存在下で 5 nM rDDT を SGBS 細胞に作用させ、0.5、1、3、6 時間培養後、total RNA を抽出し、LMO3、HSD11 1、KLF15、c-Fos mRNA 量を qRT-PCR により測定した。また同様に DEX を 24 時間作用させた SGBS 細胞からタンパク質を抽出し、LMO3 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) TG マウスの解析

脂肪細胞特異的に Ddt を過剰発現する遺伝子改変マウス (TG マウス) を 3 系統作製し、それらの系統の繁殖及び、表現形の観察を行った。TG マウスは正常に発生し、WT と比較して外見上の差異は認められない。通常食で飼育した TG マウスでは体重、空腹時血糖値、耐糖能、血清中中性脂肪濃度に野生型との間に差異は認められなかった。一方、高脂肪食を与え、肥満誘導を行った TG マウスでは対象マウスと比較検討では、体重には差異が認められなかったが、TG マウスで空腹時血糖値の上昇抑制が認められ、さらにグルコース負荷試験、インスリン負荷試験の結果より耐糖能の低下の抑制が認められた (図 2)。これらの結果より脂肪細胞での DDT は肥満により誘導されるインスリン抵抗性を抑制する作用があることが確認された。TG マウスの脂肪組織と肝臓で AMPK の活性化型リン酸化レベルが高く、脂質代謝が抑制されていることが示唆された。

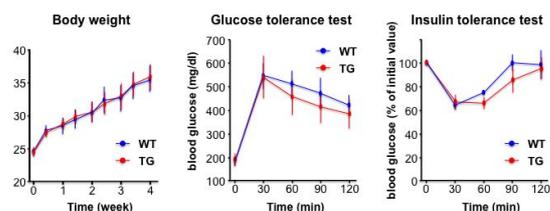


図 2 HFD を与えた脂肪細胞特異的 Ddt 発現マウス (TG) マウスと野生型マウス (WT) の体重変動 (左)、グルコース負荷試験 (中)、インスリン負荷試験 (右)。

##### (2) DDT 発現抑制脂肪細胞で発現が変動する遺伝子の同定

マイクロアレイ解析により、DDT 発現抑制脂肪細胞で 2 倍以上発現が上昇する遺伝子 342 種と、発現が低下する遺伝子 541 種を同定した。発現変動が大きく、インスリン抵抗性への関与が報告されている遺伝子につい

て、リアルタイム RT-PCR により発現変動の検証を行い、DDT 発現抑制脂肪細胞で発現減少が認められた vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) と、発現上昇が認められたセレノ結合タンパク質 (SEPP-1) に着目した (図 3)。TG マウスの脂肪組織での VEGF-A の高発現と SEPP-1 の低発現を確認した。脂肪細胞特異的 VEGF-KO マウスに高脂肪食を与えると、脂肪細胞のアポトーシス誘導による血中遊離脂肪酸濃度の上昇が認められ、全身性の糖代謝が悪化することが報告されている。SEPP-1 は主に肝臓から分泌され、脂肪細胞や骨格筋でのインスリンシグナルを阻害しインスリン抵抗性を惹起する報告がある。そのため、DDT の VEGF-A 発現促進作用および SEPP-1 発現抑制作用は、DDT のインスリン抵抗性改善作用の一因である可能性が考えられた。

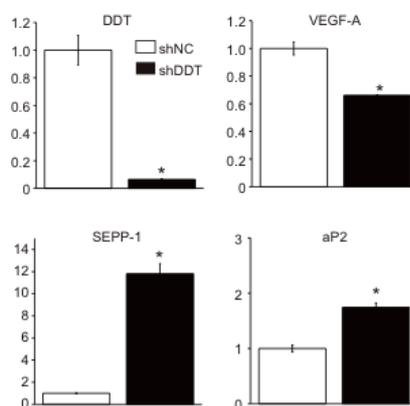


図 3 DDT 発現抑制脂肪細胞 (shDDT) での DDT、VEGF-A、SEPP-1、aP2 mRNA 発現。

##### (3) DDT の脂肪分化抑制機序

ヒト前駆脂肪細胞株 SGBS に組換え DDT を作用させると脂肪脂肪への分化抑制能を示すが、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 では認められなかった。このことは DDT の脂肪分化抑制作用はヒト特異的であることが示唆される。最近、糖質コルチコイド (GR) シグナルの下流に位置する LMO3 が、ヒト特異的に脂肪細胞への分化を促進させる報告がなされた。そこで、SGBS 細胞での DDT が LMO3 発現に及ぼす影響を検討した。DDT を作用させた SGBS 細胞では、LMO3 の発現が抑制された。また糖質コルチコイド DEX による LMO3 発現誘導を DDT により阻害されたことから、DDT は LMO3 を介して脂肪細胞への分化を抑制することが示唆された。

DDT の LMO3 の発現抑制の分子機序を検討するため、GR の標的遺伝子である HSD11 1、KLF15、c-Fos の mRNA 発現について検討したところ、これらの中で GR に早期応答する c-Fos の発現が有意に DDT により阻害された (図 4)。このことにより、DDT の LMO3 の GR 依存性発現抑制作用に c-Fos の関与が示唆された。

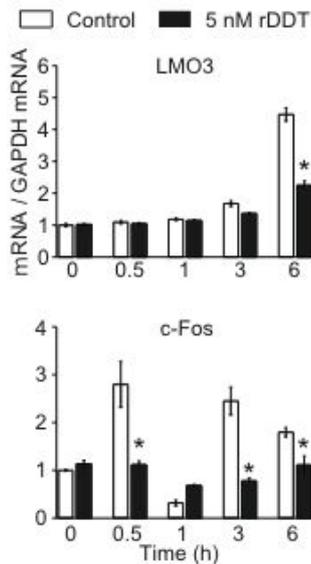


図4 DDTがSGBS細胞でのDEXによるLMO3、c-FOS発現誘導に及ぼす効果。

## 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)

Ishimoto K, Iwata T, Taniguchi H, Mizusawa N, Tanaka E, Yoshimoto K.  
D-dopachrome-tautomerase promotes IL-6 expression and inhibits adipogenesis in preadipocytes. *Cytokine*, 60: 772-777 (2012)  
査読有り。Doi:10.1016/j.cyto.2012.07.037

[学会発表](計3件)

岩田武男、栗林恭子、吉本勝彦「前駆脂肪細胞におけるD-dopachrome tautomerase遺伝子の転写調節」第56回歯科基礎医学学会学術大会(福岡県・福岡市)9.25-27(2014)

岩田武男、谷口寿章、桑島正道、水澤典子、吉本勝彦「D-dopachrome tautomeraseの脂肪組織への作用」第17回日本内分泌病理学会学術総会(神奈川県・横浜市)10.4-5(2013)

岩田武男、石本恭子、水澤典子、吉本勝彦「D-dopachrome tautomeraseのインスリン抵抗性改善機序に関連する分子の探索」第55回歯科基礎医学学会学術大会(岡山県・岡山市)9.20-22(2013)

## 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

(2)研究分担者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：90201863

水澤 典子 (MIZUSAWA, Noriko)

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：80254746

石本 恭子 (ISHIMOTO, Kyoko)

徳島大学・大学病院・診療支援医師  
研究者番号：60579952