

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461092

研究課題名(和文) アディポネクチン増加作用により抗動脈硬化を示す新規遺伝子発現制御薬の開発

研究課題名(英文) Development of PI Polyamide targeting adiponectin gene

研究代表者

常見 明子 (TSUNEMI, Akiko)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：90646035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規遺伝子制御薬であるPIポリアミドをマウスアディポネクチン(APN) 転写調節領域において、負の転写調節領域であるAP2 の結合部位に、その結合をブロックするようにデザイン、合成して、培養細胞とマウスでその効果を検討した。マウス培養脂肪細胞(3T3L1脂肪細胞)においてPI ポリアミドはAPNの発現を増加させた。糖尿病モデルマウス(db/db)ではグルコース負荷試験において血糖値の上昇を抑制し、インスリン負荷試験ではインスリン感受性を増加させた。また血中のTG、NEFA値を有意に低下させ、また肝臓組織では脂肪肝を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Pyrrole-Imidazole polyamides (PI polyamides) are new chemical compounds that specifically inhibit transcription factor binding. A PI polyamide that targets mouse adiponectin(APN) and increases APN gene expression was designed. Treatment of 3T3-L1 cells with 1.0µM PI polyamide significantly increased APN mRNA expression. PI polyamide administration significantly improved blood glucose level during the glucose tolerance test in db/db mouse. PI polyamide treatment also improved insulin sensitivity in db/db mouse evaluated by the insulin loading test. PI polyamide significantly decreased plasma triglyceride and free fatty acid levels in db/db mouse. Moreover, lipid deposits of the liver in db/db mouse were decreased by PI polyamide administration. The designed PI polyamide targeting SPN gene successfully increased APN expression, and improved insulin sensitivity in the diabetic mouse model. This novel compound is promising as a useful compound in the treatment of diabetes.

研究分野：代謝

キーワード：PI ポリアミド アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は種々の生理活性物質を分泌し、様々な病態と関連している。近年の食生活の欧米化や運動不足による肥満により、内臓脂肪の蓄積、脂肪細胞の肥大化が起こり、それに伴い低 APN 血症も増加している。低 APN 血症はインスリン抵抗性や糖尿病、脂質代謝異常などを惹起し、最終的に動脈硬化性疾患の発症を増加させる要因となる。脂肪細胞が分泌する APN の作用機序はインスリン抵抗性および糖尿病を中心に多くの研究が行われており、APN はインスリン標的臓器である骨格筋や肝臓等を中心に発現している受容体のリガンドとなり、細胞内でエネルギー調節タンパク質である AMPK、PPAR を活性化し、糖代謝等を改善する。また APN は動脈硬化を抑制する経路であるコレステロール逆転送の中心を担う ABCA1 や apoA-1 の発現を増加させて動脈硬化性疾患を改善すると考える。

2. 研究の目的

PI ポリアミドは新規遺伝子発現制御薬であり、非核酸有機化合物ではあるが、認識ルールに基づき塩基配列特異的に 2 本鎖 DNA を認識するため、ターゲットとする特定の遺伝子の転写因子結合領域にその結合を阻害するようにデザインすることで、転写因子による遺伝子発現調節をキャンセルすることができる。本研究では、マウス APN 遺伝子の転写調節領域において、APN の発現を負に制御する転写因子である AP2 の結合部位に、AP2 の結合を阻害するように分子設計した PI ポリアミドを設計し、培養細胞や糖尿病モデルマウスである db/db マウスに投与して、APN の発現や糖尿病に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) APN 転写調節領域における PI ポリアミドの設計について

マウス APN 遺伝子の転写調節領域における AP2 結合領域に 2 種類の PI ポリアミドを

デザイン、合成しゲルシフトアッセイにてターゲット領域との結合を確認した。

(2) 培養細胞における APN 遺伝子とタンパク質の発現に対する PI ポリアミドの効果に関する検討

マウス培養細胞である 3T3L1 脂肪細胞の培地に PI ポリアミドが 1 μ M になるように添加して 24~48 時間培養後、細胞内の APN 遺伝子とタンパク質、さらに培地中に分泌された APN タンパク質を測定した。

(3) 糖尿病マウスである db/db マウスに対する PI ポリアミドの効果に関する検討

6 週齢オス (n=6) の db/db マウスの尾静脈より 0.1%酢酸に溶解した PI ポリアミドを 1 日置きに体重 1kg あたり 1mg を 6 週間投与した。またコントロール群には配列ミスマッチな PI ポリアミドを投与した。最終週にグルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を行い、飼育期間終了後に血液、肝臓、精巢脂肪、皮下脂肪他を採取し、各組織の重量や血清中のグルコース、APN 他を測定した。また肝臓組織において HE 染色を行った。

4. 研究成果

(1) APN 発現調節領域における PI ポリアミドについて

マウス APN の負の転写因子である AP2 の結合部位に 2 種類の PI ポリアミド (図 1) をデザイン、合成し、ゲルシフトアッセイにて FITC 修飾のターゲット配列 DNA との結合を確認したところ、DNA との結合が確認できた。この結合は過剰量の非修飾の DNA によって阻害されるため、PI ポリアミドは配列特異的に結合したと示された。

(2) 培養細胞における APN 遺伝子とタンパク質の発現に対する PI ポリアミドの効果に関する検討

3T3L1 脂肪細胞において、APN を増加させる PI ポリアミドは、コントロールである配列ミスマッチな PI ポリアミドに対して、有意に APN mRNA の発現を増加させた。また細胞内の APN タンパク質を western blot で検

討するとコントロールに対して増加しており、さらに培地中に分泌した APN を ELISA 法にて測定するとコントロールに対して有意に増加していた。

肝臓で合成されたコレステロールは LDL によって末梢組織に運ばれ、HDL は末梢組織から肝臓へとコレステロールの逆転送を行う。

この逆転送に関与するのがマクロファージに発現している膜タンパク質の ABCA1 である。前述の脂肪細胞を培養した培地を用いて、マウスマクロファージ培養細胞である RAW264 細胞を培養すると、コントロールに対して、RAW264 細胞の ABCA1 mRNA の発現が有意に増加した。これにより、PI ポリアミドによって脂肪細胞において分泌亢進が認められた APN タンパクは、動脈硬化抑制に関与するマクロファージの ABCA1 の発現を増加させることがわかった。

(3)糖尿病マウスである db/db マウスに対する PI ポリアミドの効果に関する検討
マウス生体内での PI ポリアミドの取り込みについて

FITC 修飾 PI ポリアミドをマウス尾静脈より投与 2 4 時間後に、精巢上脂肪を採取し蛍光顕微鏡にて確認を行ったところ、PI ポリアミドは脂肪組織の核内に移行していることが確認された。

グルコース負荷試験、インスリン負荷試験に対する PI ポリアミドの効果

12 時間絶食にしたマウス腹腔にブドウ糖を投与し、0, 15, 30, 60, 120 分の経時的変化を観察すると、血糖値はミスマッチポリアミドを投与したコントロール群と比較してすべての時間において有意に血糖値の上昇を抑制したが、0, 15, 30 分におけるインスリン値において、有意差は認められなかった。インスリン負荷試験においては、腹腔投与後 40 分でコントロール群と比較して有意に血糖値が低下し、インスリン感受性の改善が認められた。

実験期間中の体重、尿量等の変化について

実験期間中における体重は、コントロール群に対してポリアミド群は有意な差はないものの低い傾向にあった。また食餌量に差は

認められなかった。尿量においては、9 週齢と 10 週齢でコントロール群と比較して有意に減少した。

実験終了時の血中および臓器における PI ポリアミドの効果

実験終了時において、PI ポリアミド群で血清グルコース値は低い傾向が認められたがインスリン値の差は両群で認められなかった。

APN 値はコントロール群に対してポリアミド群で高い傾向が認められた。(図 1)

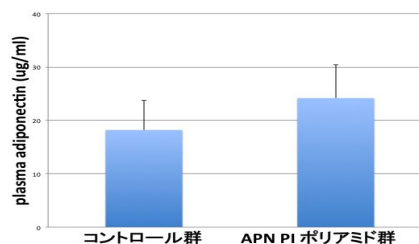


図1 マウスAPNの発現に対するPIポリアミドの効果

さらに TG 値、NEFA 値はポリアミド群で有意に低下が認められた。

肝臓組織の光学顕微鏡像 (HE 染色) を観察すると、コントロール群では肝臓組織に脂肪滴や肝細胞内の脂肪沈着が多く認められたが、ポリアミド群において軽減された。(図 2)

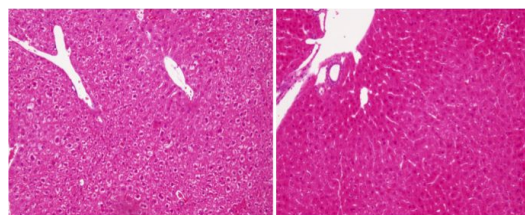


図2 肝臓組織での光学顕微鏡像

これは APN の作用機序として良く知られる AMPK の活性化で起こっていると考えられたため、肝臓組織での p-AMPK の発現を western blot で検討したところ、ポリアミド群ではコントロール群に対して AMPK のリン酸化が約 2.5 倍に増加していた。

以上の結果により、APN を増加させる PI ポリアミドは培養脂肪細胞の APN を増加させ、糖尿病モデルマウスにおいては、インスリン感受性、血中 TG、NEFA 値を改善し、肝臓組織においては脂肪の蓄積を抑制した。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1)常見明子、上野高浩、福田昇、田中翔、小林洋喜、田平和宣、畑中善成、羽毛田公、松本太郎、相馬正義 第46回日本動脈硬化学会総会(京王プラザホテル 東京都・新宿区) 2014.7.10~2014.7.11

(2)常見明子、上野高浩、福田昇、田中翔、田平和宣、畑中善成、羽毛田公、松本太郎、相馬正義 第45回日本動脈硬化学会総会(京王プラザホテル 東京都・新宿区) 2013.7.18~2013.7.19

〔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 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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

常見 明子 (TSUNEMI, Akiko)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号: 90646035

(2)研究分担者

上野 高浩 (UENO, Takahiro)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号: 40386008

(3)連携研究者 なし