

平成30年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11040

研究課題名(和文) Dドーパクロムトートメラゼの脂肪組織特異的発現・作用機序

研究課題名(英文) Mechanisms of adipose tissue-specific expression and action of D-dopachrome tautomerase

研究代表者

岩田 武男 (IWATA, Takeo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：10350399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：D-dopachrome tautomerase (DDT) はインスリン抵抗性改善作用を持つアディポカインだが、発現機序は不明である。DDT遺伝子の転写を促進する化合物としてAMP-activated protein kinase (AMPK) の賦活剤であるAICARとその誘導体を同定した。AMPK阻害剤はヒト前駆脂肪細胞株SGBS由来の脂肪細胞でDDT mRNA発現を抑制した。AMPKの下流のFOXO1とmTOR経路の関与について検討したところ、FOXO1はHEK293細胞ではDDTの転写を促進したがSGBS細胞では転写を抑制した。mTOR阻害薬のrapamycinはDDTの転写を促進した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional regulation of D-dopachrome tautomerase (DDT), an adipokine with anti-obesity property, is largely unknown. We first screened molecules affecting DDT transcription from a chemical library. Several derivatives of AICAR, an AMP-activated protein kinase (AMPK) activator, were found to induce DDT transcription. Furthermore, an AMPK inhibitor decreased DDT mRNA levels in adipocytes differentiated from SGBS cells, a human preadipocyte cell line, suggesting involvement of AMPK in DDT transcription. Next, we investigated involvement of FOXO1 and mTOR pathways downstream of AMPK activation in the transcription of DDT gene. FOXO1 enhanced and inhibited DDT transcription in HEK293 cells and SGBS cells, respectively. Cell-type specific effects were also observed in the DDT gene expression of cells treated with AS1842856, a FOXO1 inhibitor. Furthermore, rapamycin, an mTOR inhibitor, enhanced DDT mRNA levels in SGBS adipocytes.

研究分野：薬理学

キーワード：アディポカイン 転写調節 肥満 脂肪細胞 AMPK

1. 研究開始当初の背景

肥満は脂肪組織が肥大化する状態で、インスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病、高血圧、脂質異常症、動脈硬化など合併疾患のリスクを高める。脂肪組織は単なるエネルギーの貯蔵器官ではなく、様々な生理活性物質を分泌して全身性の代謝調節など生体機能調節に重要な働きを担う内分泌器官でもある。脂肪組織から分泌される因子はアディポカインと総称され、正常の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、レプチンといった、いわゆる善玉アディポカインが分泌される。一方、肥満の脂肪組織からは TNF- α 、IL-1 などの炎症生サイトカインや動脈硬化のリスクファクターである PAI-1 など、いわゆる悪玉アディポカインが分泌される。これらのアディポカインの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発症機序の一因と考えられている。

我々はヒト脂肪細胞が分泌する蛋白質を網羅的にプロテオーム解析し、その脂肪細胞での発現が BMI、脂肪面積など肥満パラメータと負の相関を示す D-dopachrome tautomerase (DDT) を同定した。DDT は D-dopachrome を 5,6-dihydroxyindole に変換する酵素として発見されたが、D 体である基質は生体内で不活性のため、その真の生理作用は別にあると考えられてきた。DDT は炎症性サイトカインである Macrophage migration inhibitory factor (MIF) と三次構造が類似する他、MIF もまた D-dopachrome を 5,6-dihydroxyindole -2-carboxylic acid に変換する酵素活性を有している。近年、DDT が MIF と協調して、炎症を惹起することや癌細胞の増殖・浸潤に関与することが報告され、DDT は MIF ホモログであることが示唆された。一方、我々は DDT が脂肪組織に作用して肥満マウスのインスリン抵抗性を改善する作用をもつこと、前駆脂肪細胞に作用して脂肪分化を抑制する作用を持つことを明らかにした。これらは MIF の脂肪組織の作用とは相反するもので、少なくとも脂肪組織においては、DDT は単なる MIF ホモログではないことを示唆するものである。また MIF は前駆脂肪細胞、脂肪細胞の両方で発現するのに対し、DDT は主に脂肪細胞で発現しており、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程で、その mRNA および蛋白質発現が徐々に増加する。このように脂肪細胞での DDT と MIF の発現機序は異なることが予想される。

2. 研究の目的

DDT の脂肪組織への作用および発現様式は MIF とは異なり DDT 独自のものと考えられた。DDT の脂肪組織特異的作用を増強する、あるいは DDT の脂肪組織での発現を特異的に高めることができれば、DDT の善玉アディポカインとしての作用を増強する薬物の開発につながる可能性がある。そこで、まず DDT の

脂肪組織での発現分子機序について検討するため、連携研究者である南川典昭博士 (徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授) から提供された約 1,600 種の化学物質からなる薬物ライブラリーを用いて DDT の転写に影響を与える因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

HEK293 細胞は 10% FBS を含む DMEM にて培養した。ヒト前駆脂肪細胞株 SGBS は 10% FBS、33 μ M ビオチン、17 μ M パントテン酸を含む DMEM : Ham's F12 (1:1) 培地で培養した。遺伝子導入には HEK293 細胞では Effectene (QIAGEN)、SGBS 細胞では Neon Transfection System (Invitrogen) を用いた。SGBS 細胞の脂肪細胞への分化誘導はコンフルエントの細胞に 10 nM insulin、200 pM T3、1 μ M cortisol、500 μ M 1-methyl-3-isobutylxanthine、0.25 mM dexamethasone、2 μ M troglitazone、0.01 mg/mL transferrin を加えた培養培地で 3 日間培養し、10 nM insulin、200 pM T3、1 μ M cortisol を加えた培養培地で 6 日間培養した。培地は 3 日毎に交換した。

(2) レポーターコンストラクトの作成

HEK293 細胞のゲノム DNA を鋳型に、DDT 遺伝子の転写開始点の 2903 bp 上流 (-2903) から 135 bp 下流 (+135) の領域を PCR で増幅し、FOXO1 結合候補領域を欠損させたルシフェラーゼレポーターベクター pGL4.17 (Δ 5526-5547; Promega) にサブクローニングした。変異導入プライマーを用いた PCR により、-1272/+135、-200/+135、-200/+23、-150/+23 の DDT 遺伝子領域のレポーターコンストラクトを作成した。同様に、DDT 遺伝子の転写調節領域に存在する 2 つの FOXO1 結合候補領域を欠損させたレポーターコンストラクトを作成した。

(3) ルシフェラーゼアッセイ

各レポーターコンストラクトとウミシイタケルシフェラーゼベクター (pGL4.74) を共発現させた細胞の各ルシフェラーゼアッセイを TriStar LB 941 Multi-label plate reader (Berthold Technologies) にて測定した。

(4) スクリーニング

DDT 転写調節領域 (-2903/+135) のレポーターベクターを導入した HEK293 細胞を G418 (Sigma) 含有培地で培養し、安定発現株を選出した。その細胞を 96 穴白色プレートで培養し、約 1,600 種の化合物からなる薬物ライブラリーを 10 μ M の濃度で 24 時間作用させ、細胞抽出物のルシフェラーゼ活性を測定した。対象には同量の dimethyl sulfoxide (DMSO) を作用させた細胞を用いた。

(5) 定量的逆転写 PCT (qRT-PCR)

細胞の total RNA を ISOGEN (Nippongene) にて抽出し、その cDNA を Primescript RT reagent (TaKaRa) で合成した。qRT-PCR は各遺伝子特異的プライマーを用いて THUNDERBIRDTM SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 及び Applied Biosystems Prism 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) にて行われた。各遺伝子の mRNA 量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子あるいは TATA binding protein (TBP) 遺伝子の mRNA 量により補正された。

(6) クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

FOXO1 の常時活性型を共発現させた SGBS 細胞の抽出物に含有されるゲノム DNA を Bioruptor-UCW310 (Diagenode) で約 500 bp に断片化した。FOXO1 抗体 (Abcam) 結合ビーズを用いた免疫沈降を行い、続けて DNA を抽出した。この DNA を鋳型に FOXO1 結合モチーフを含む各領域を特異的プライマーで PCR により増幅した。

(7) データ解析

各実験を少なくとも 3 回行った。各データを平均値±標準誤差で表し、Student's t-test により P 値が 0.05 以下を統計的に優位とした。

4. 研究成果

(1) DDT 遺伝子の転写調節領域の同定

ヒト DDT 遺伝子の転写開始点の 2903 bp 上流から 135 bp 下流の領域 (-2903/+135) のルシフェラーゼコンストラクトを導入した SGBS 細胞を脂肪分化誘導、0、1、3、5 日目のルシフェラーゼ活性を測定した (図 1A)。ルシフェラーゼ活性は DDT mRNA の発現パターンと同様に時間依存的に上昇した。様々なサイズの DDT 遺伝子上流の領域について同様にルシフェラーゼ活性を検討したところ、-200/+23 の領域に最も高いルシフェラーゼ活性が認められた (図 1B)。この領域には TATA-BOX がなく、2 つの CAAT-BOX が存在した。

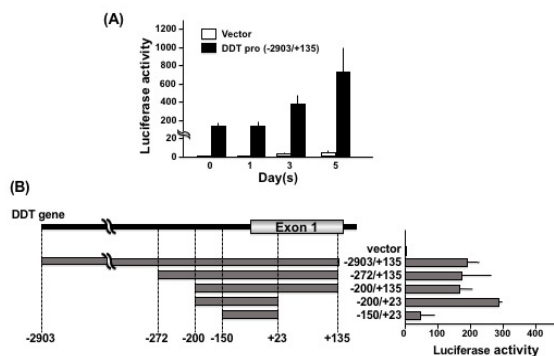


図 1 (A) DDT 遺伝子上流領域 (-2903/+135) レポーターベクターを導入した SGBS 細胞の脂肪分化誘導に伴うルシフェラーゼ活性。(B) DDT 遺伝子上流の様々な長さ領域のレポーターコンストラクトを導入した SGBS 細胞のルシフェラーゼ活性。

(2) DDT 遺伝子の転写に影響を与える化合物の同定

-2903/+135 の DDT 遺伝子領域のレポーターコンストラクトを安定発現する HEK293 細胞を用いて薬物ライブラリーからの DDT 転写調節に影響を与える化合物のスクリーニングを行った。DDT 遺伝子の転写を促進させる化合物として、5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) とその類似体が同定された (図 2A)。AICAR 及びその誘導体 SY148 は SGBS 脂肪細胞での DDT mRNA 発現を上昇させた (図 2B)。AICAR は AMPK を活性化剤であることから、AMPK の DDT 転写調節への関与を検討したところ、AMPK の阻害剤 compound C は SGBS 脂肪細胞の DDT mRNA 発現を抑制した (図 2C)。これらは AMPK の活性化が DDT の転写を正に調節することを示唆するものである。

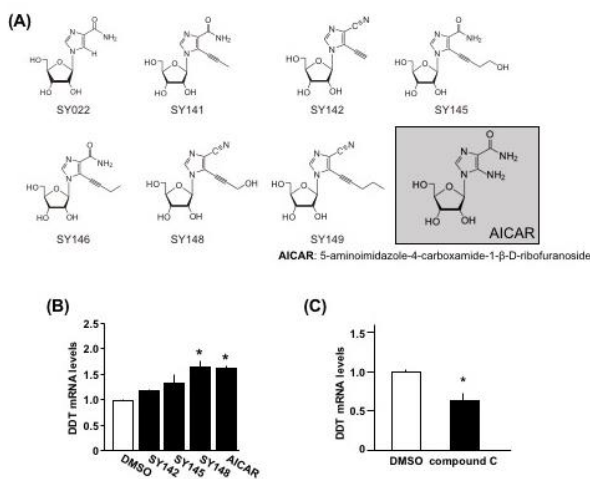


図 2 (A)薬物ライブラリーから同定された DDT 遺伝子転写を促進する AICAR 誘導体。(B)AICAR 誘導体の SGBS 細胞における DDT mRNA 発現に及ぼす影響。(C) AMPK 阻害剤 compound C の SGBS 細胞における DDT mRNA 発現に及ぼす影響。

(3) DDT 転写調節における FOXO1 シグナルの関与の検討

AMPK は SIRT1 を活性化し FOXO1 による転写を促進することが知られており、DDT 遺伝子の転写調節領域 (-2903/+135) には 2 つの FOXO1 結合モチーフが存在する。そこで DDT 遺伝子の転写調節における FOXO1 の関与を検討した。2 つの FOXO1 結合モチーフへの FOXO 1 の結合が ChIP アッセイにより確認できた (図 3A)。HEK293 細胞では、FOXO1 の常時活性型の過剰発現による DDT の転写活性の上昇、FOXO1 阻害剤 AS1842856 による DDT mRNA 量の減少が認められたが、SGBS 脂肪細胞においては HEK293 細胞と相反する結果が得られた (図 3B)。また SGBS 細胞では SIRT1 に対する siRNA を発現させた SGBS 細胞では DDT mRNA 発現が抑制された。これらの結果は HEK293 細胞では FOXO1 は DDT 遺伝子の転写を正に調節するのに対し、SGBS

細胞では負に調節することを意味しており、DDT 遺伝子転写調節の細胞特異性を示唆するものである。

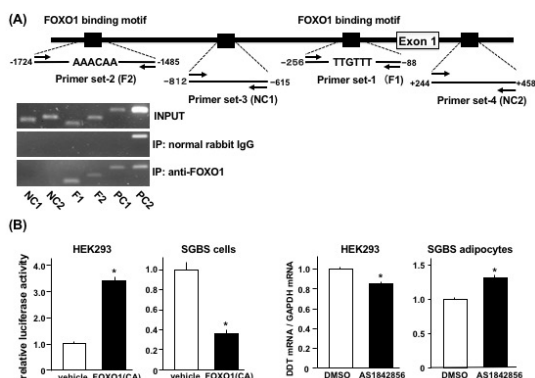


図3 (A) SGBS 脂肪細胞における DDT 遺伝子上流の FOXO1 結合モチーフと FOXO1 の結合 (ChIP アッセイ)。(B) HEK293 細胞と SGBS (脂肪) 細胞における FOXO1 常時活性型の DDT 遺伝子転写活性 (左) と mRNA 発現に及ぼす影響の比較。

(4) DDT 転写調節における mTOR シグナルの関与の検討

AMPK は mTOR シグナルを抑制することが知られている。そこで DDT 遺伝子の転写調節における mTOR の関与を検討した。mTOR 阻害剤 Rapamycin は SGBS 脂肪細胞における DDT mRNA 発現量を上昇させ、AMPK 阻害剤 compound C による DDT mRNA 発現低下を回復させた (図4)。これらの結果は AMPK による DDT 遺伝子の転写促進は mTOR シグナルの抑制を介することを示唆する。

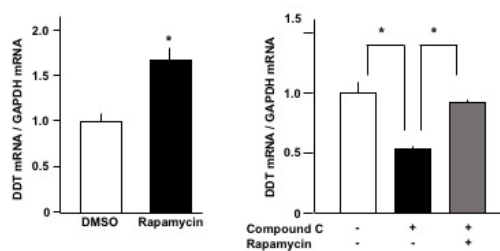


図4 SGBS 脂肪細胞における Rapamycin の DDT mRNA 発現に及ぼす影響。

(5) 今後の展望

本研究によって DDT 遺伝子の転写調節は細胞によって異なることが示唆された。今後は脂肪組織における DDT 転写調節機序の全貌の解明を目指す。具体的には脂肪細胞での FOXO1 のパートナーの同定や、他の転写調節因子の関与について検討する。

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 1 件)

(1) Iwata T, Kuribayashi K, Nakasono M, Tarashima NS, Minakawa N, Mizusawa N, Kido R, Yoshimoto K. The AMPK/mTOR pathway is involved in D-dopachrome tautomerase gene transcription in adipocytes differentiated from SGBS cells, a human preadipocyte cell line. *Cytokine* 96: 195-202 (2017) 査読有り.
doi: 10.1016/j.cyto.2017.04.017.

〔学会発表〕 (計 4 件)

(1) 岩田武男, 吉本勝彦 「脂肪組織における D-dopachrome tautomerase 遺伝子の転写調節」 第 21 回日本臨床内分泌病理学会学術総会 (東京) 10.27-10.28 (2017)

(2) 岩田武男, 吉本勝彦 「AMPK/mTOR 経路は脂肪組織での D-dopachrome tautomerase 遺伝子の転写を調節する」 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (塩尻) 9.16-9.18 (2017)

(3) 岩田武男, 栗林恭子, 吉本勝彦 「分化脂肪細胞における D-dopachrome tautomerase 遺伝子の転写調節」 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 8.24-26 (2016)

(4) 岩田武男, 栗林恭子, 吉本勝彦 「D-dopachrome tautomerase 遺伝子転写における FOXO1 と PGC1 α の関与」 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 (新潟) 9.11-9.13 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 武男 (IWATA, Takeo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：10350399

(2) 研究分担者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：90201863

水澤 典子 (MIZUSAWA, Noriko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：80254746

(3) 連携研究者

南川 典昭 (MINAKAWA, Noriaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：40209820