

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21790866

研究課題名 (和文) 肥満・糖尿病におけるウィルムス関連タンパク 1 の役割の解明

研究課題名 (英文) Roles of Wilms' Tumor 1-Associating Protein in Development of Obesity and Diabetes

研究代表者

岡崎 由希子 (OKAZAKI YUKIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30422299

研究成果の概要 (和文) : Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) の肥満・糖尿病への関与を検討した。Wtap+/-マウスは普通食および高脂肪食負荷にて野生型と比較して体重および体脂肪率が小さく、耐糖能の改善・インスリン抵抗性の低下を認めた。その機序として、WTAP が減少すると脂肪組織・肝臓・マクロファージへの影響を介して肥満や糖尿病になりにくい方向に動くことを、細胞および動物実験から明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We investigated whether WTAP contributes to the progression of obesity or diabetes. Wtap+/- mice were smaller in body weight and body fat contents fed on both normal chow and high fat diet, and more glucose tolerant and insulin sensitive than wild type (WT) mice. Both in vivo and in vitro studies showed the new roles of WTAP in development of obesity and diabetes by affecting adipose tissue, liver and macrophage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常、脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、肝臓・骨格筋・脂肪組織などの多臓器におけるインスリン抵抗性の進行に加え、膵β細胞のインスリン分泌と細胞量増大の二面の適応が破綻して発症すると考えられている。我々はインスリン分泌細胞である膵β細胞に着目し、インスリン抵抗性

状態における膵β細胞の代償性増殖機構に関与する分子を同定することを目的として、インスリン抵抗性マウスモデルの膵島細胞における網羅的発現解析を行い、細胞周期調節因子の一つである Cyclin A2 が上昇することを見出した。また Cyclin A2 の発現調節因子ウィルムス腫瘍関連タンパク 1 (Wilms' tumor 1-associating protein : 以下 Wtap と

略す)も肥満マウスの膵島で増大していることを見出し、遺伝子改変動物(Wtap ヘテロ欠損マウス:以下 Wtap+/-マウスと略す)の解析に進んだ。

Wtap は腫瘍抑制遺伝子産物であり、また泌尿生殖器系の発生に必須の因子である Wilms' tumor-1 (WT-1) に結合する核蛋白として同定された。Wtap 遺伝子は各臓器にユビキタスに発現していることが報告されており、機能解析は進んでいないが RNA スプライシングにおける役割や mRNA の安定化に寄与することなどが報告されている。また遺伝子改変動物の解析ではホモ欠損マウスは、胎生 6.5 日で致死的となりこれが Cyclin A2 欠損マウスの表現型と一致することが報告されている。

そこで我々は、本研究において Cyclin A2 および Wtap の肥満および糖代謝における役割を明らかにする目的で、Wtap+/-マウスの解析を行った。Wtap+/-マウスはインスリン感受性が良好で高脂肪食下においても抗肥満・抗糖尿病の表現型を呈した。その原因の一つとして、脂肪組織における脂肪細胞の肥大化抑制を介したメカニズムが考えられ、この分子機序を明らかにすることによって肥満による 2 型糖尿病の病態解明や新規治療法の開発につながることを期待された。

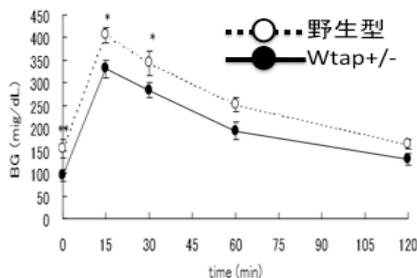


図1 Wtap+/-は高脂肪食負荷でも耐糖能が良い

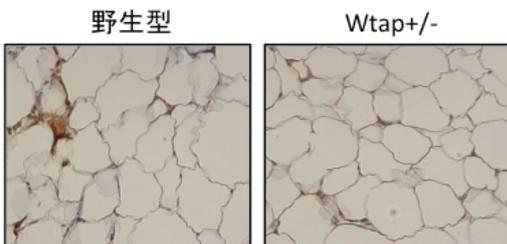


図2 Wtap+/-マウスの白色脂肪細胞は高脂肪食負荷でも小さく、炎症細胞(茶色)の浸潤が少ない

2. 研究の目的

(1) Wtap+/-マウスの抗肥満、耐糖能改善のメカニズムの解明

現時点では、Wtap+/-マウスの脂肪細胞における変化が、全身での糖代謝を改善していると考えている。この仮説を検証するために、

Wtap+/-マウスのどの臓器でインスリン抵抗性の改善が起きているかを検討する。また Wtap は Cyclin A2 の発現調節を通じて細胞周期を調節していると考えられるので、細胞周期への影響を脂肪細胞と、脂肪細胞浸潤マクロファージへの影響の両面からマウスの臓器並びに培養細胞を用いて検討する。

(2) Cyclin A2、Wtap の各臓器における糖代謝調節メカニズムの解析

Wtap+/-マウスの表現型としては、全身の臓器の重量の低下、ならびに高脂肪食に抵抗して脂肪重量増加が低下することが観察されている。これに関して検討を加える。また、肝臓においては Kupffer 細胞などの非肝実質細胞が炎症を惹起し肝実質細胞の耐糖能や脂肪合成に影響を与えている可能性もあるので、その面も追求する。

(3) Wtap の発現調節及び、新規 Wtap 標的分子の同定

以上の検討は Wtap が Cyclin A2 の発現を調節することで表現型が出ているとする仮説に基づいているが、Wtap の機能には未知の部分も多い。そのため、Wtap 自身の発現・活性調節のメカニズムを探求するとともに、新規の Wtap 標的分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) Wtap+/-マウスの抗肥満、耐糖能改善のメカニズムの解明

① 通常食または高脂肪食下での体重増加の推移の追跡を迫る。また、インスリン注入後のインスリン感受性臓器、特に肝臓と骨格筋でのインスリンシグナルがどの段階で修飾を受けているかを観察する。具体的にはインスリン受容体チロシンリン酸化、IRS-1 チロシンリン酸化、IRS-2 チロシンリン酸化、IRS-1 結合 PI-3 キナーゼ p85 サブユニット、IRS-2 結合 PI-3 キナーゼ p85 サブユニットの各量の変化を観察し、Wtap+/-マウスの耐糖能改善のメカニズムを考察する。

② 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて siRNA による Wtap の発現抑制を行い、細胞周期、及び脂肪細胞への分化に与える影響を検討する。また RAW264 細胞を用いて siRNA による Wtap の発現抑制を行い、Wtap がマクロファージの細胞周期、及び細胞増殖に与える影響、サイトカインの発現等を検討する。

(2) Cyclin A2、Wtap の各臓器における糖代謝

調節メカニズムの解析

- ① 肝臓、骨格筋において、Wtap^{+/-}マウスとコントロールマウスの組織標本を観察する。また、Wtap^{+/-}マウスの肝臓、骨格筋における遺伝子発現を特に糖代謝、脂質代謝に関連する遺伝子に注目して主に TaqMan RT-PCR を用いて検討する。
- ② ①と相補的な実験として、同定した発現が変化している遺伝子が、Wtap の発現量変化による一次的な変化であるのか、それとも耐糖能改善やホルモン/サイトカイン変化による二次的な変化であるかを検討するために、単離肝臓初代培養もしくは骨格筋細胞において siRNA もしくはアデノウイルスによる siRNA を用いて Wtap をノックダウンし、遺伝子発現や糖取り込み、糖放出への影響を検討する。

(3) Wtap の発現調節及び、新規 Wtap 標的分子の同定

Wtap のプロモータ領域をクローニングし、luciferase をリポーターとする reporter construct を作成し、プロモータ活性を調節する因子を同定する。まずは 5' 上流部分をクローニングして、ルシフェラーゼ cDNA の 5' 上流に結びつける定法に従ったコンストラクトを作成するが、Wtap が Wtap 自身の翻訳調節をしている可能性を考えて、Wtap mRNA の 3' 未翻訳部分をルシフェラーゼ cDNA の 3' 下流に結びつけたコンストラクトを作成し、発現・翻訳調節の解析を行う。既報に従い Wtap は Cyclin A2 の 3' 未翻訳部分に結合することでその翻訳の調節を行う。このリポーターシステム (ルシフェラーゼ cDNA + Cyclin A2 3' 未翻訳 mRNA) を用い、Wtap の活性調節を行う薬剤・小分子のスクリーニングを行う。スクリーニングで探索された分子が Wtap を介して作用を発揮しているかどうかを確認するために、Wtap のノックダウンを同時に行うか、Wtap^{-/-}の MEF を樹立して、その小分子の効果が消失するかどうかを観察する。

またこの小分子が耐糖能に影響を及ぼすか否かを調べるために、正常耐糖能 (C57B6J マウス) や肥満・糖尿病マウス (db/db マウスなど) への投与実験を行う。Wtap 関連タンパクを探索するために Tandem Affinity Purification (TAP) Systems を用い、結合タンパクおよび、mRNA を同定することを試みる。

4. 研究成果

(1) Wtap^{+/-}マウスの抗肥満、耐糖能改善のメカニズムの解明

- ① 通常食または高脂肪食下での体重増加の推移を追跡した。Wtap^{+/-}マウスの肥満抵抗性について、食餌量を測定したが、コントロールマウスと明らかな差を認めなかった。

インスリン負荷試験の結果、Wtap^{+/-}マウスはコントロールマウスと比較して肝臓および骨格筋におけるインスリン受容体シグナル伝達が亢進していることが明らかになった。

- ② 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて RNAi による Wtap の発現抑制を行ったところ、脂肪細胞への分化・肥大化は抑制された。またマクロファージに対する影響を検討するため RAW264 細胞を用いて RNAi による Wtap の発現抑制を行ったところ、³H 標識したチミジンの取り込みが低下し、細胞増殖が抑制された。

また、Wtap^{+/-}マウス由来の胎児線維芽細胞は、脂肪細胞への分化能が障害されていた。

また、Wtap^{+/-}マウス由来の胎児線維芽細胞は、脂肪細胞への分化能が障害されていた。すなわち Wtap の減少は、脂肪組織およびマクロファージにおいて、肥満に対して保護的に働くことが明らかになった。

また、骨髄移植により骨髄特異的 Wtap^{+/-}マウスを作成し、マクロファージにおける Wtap 減少の全身へ影響を検討したが、体重や糖代謝は対照と比較して大きな差を認めなかった。すなわち Wtap 減少による抗肥満作用は、主に脂肪細胞に由来する可能性が示唆された。

(2) Cyclin A2、Wtap の各臓器における糖代謝調節メカニズムの解析

肝臓において、Wtap^{+/-}マウスとコントロールマウスの組織標本を観察したところ、肝臓における脂肪肝の発症・増悪が著明に抑制されており、また肝臓マクロファージ数は減少していた。Wtap^{+/-}マウスの肝臓、骨格筋における遺伝子発現を検討したところ、エネルギー燃焼にかかわる遺伝子に大きな違いは認めなかったが、肝臓において脂質蓄積にかかわる遺伝子の発現誘導が著明に抑制されていた。これらのことより、Wtap^{+/-}マウスの抗肥満・耐糖能改善のメカニズムの少なくとも一部は、Wtap 減少が肝臓および脂肪組織およびマクロファージに影響し、肝臓や骨格筋のインスリン受容体シグナル伝達の亢進をもたらすことなどによるということが明らかになった。

(3) Wtap の発現調節及び、新規 Wtap 標的分子の同定

Wtap は血管内皮細胞においては Cyclin

A2の3'未翻訳部分に結合することでその翻訳を調節すると報告されているが、脂肪組織やマクロファージにおいてWtapの低下は、必ずしもCyclin A2の発現やタンパク量低下に繋がらなかった。すなわちWtap+/-マウスの抗肥満作用はCyclin A2以外の分子を介す事が想定された。WtapのCyclin A2以外の分子標的の候補として、酵母ツーハイブリッド法によるGATA転写因子と相互作用するタンパクのスクリーニングにおいてWtapが報告されていることに着目した。Wtap発現ベクターを作成し、COS細胞においてGATA発現ベクターと共発現させ、免疫沈降法によりタンパク相互作用を検討したところ、GATA-3とWtapに結合が認められた。GATA-2, 3は前駆脂肪細胞において、脂肪細胞分化の抑制因子の一つとして報告されているため、脂肪細胞におけるWtap+/-マウスの抗肥満の分子メカニズムはGATA転写因子を介す可能性が示唆された。

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)

なし

〔学会発表〕(計8件)

- ① 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating protein阻害による抗肥満・抗糖尿病の可能性、第3回日本肥満症治療学会、2010年9月11日、学術総合センター(東京)
- ② 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Roles of Wilms' Tumor-1-Associating Protein in Development of Obesity and Diabetes、第70回米国糖尿病学会、2010年6月27日、Orange County Convention Center(オークランド・米国)
- ③ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating protein(WTAP)の肥満・糖代謝への関与の検討、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月27日、岡山コンベンションセンター(岡山)
- ④ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating proteinの肥満・糖代謝への関与の検討、第83回日本内分泌学会、2010年3月26日、国立京都国際会館(京都)
- ⑤ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating proteinの肥満・糖代謝への関与の検討、第24回日本肥満・糖尿病動物学会、2010年1月22日、ホテルコスモスクエア国際交流セ

ンター(大阪)

- ⑥ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating proteinの肥満・糖代謝への関与の検討、第59回日本体質医学会、2009年7月26日、学士会館(東京)
- ⑦ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating proteinの肥満・糖代謝への関与の検討、第2回日本肥満症治療学会、2009年7月10日、日本消防会館(東京)
- ⑧ 小林 正稔、岡崎 由希子、植木 浩二郎 Wilms' tumor 1-associating proteinの肥満・糖代謝への関与の検討、第52回日本糖尿病学会、2009年5月22日、大阪国際会議場(大阪)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡崎 由希子 (OKAZAKI YUKIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30422299

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小林 正稔 (KOBAYASHI MASATOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号: 30396725