

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08799

研究課題名(和文) 脂肪肝特異的な発現を示す新規タンパクの機能解析—脂肪肝発症の分子メカニズム—

研究課題名(英文) Elucidation of physiological function of fatty liver-specific protein

研究代表者

松末 公彦 (MATSUSUE, KIMIHIKO)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：10389364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪蓄積細胞に高発現する機能未知 HPD1 タンパクの生理機能を解明するために、HPD1 がノックダウンされた脂肪細胞を作製した。まず、HPD1ノックダウン及びコントロール脂肪細胞からの mRNA を用いて GeneChip 解析を行った。この結果、両細胞間で発現変動が認められた遺伝子には、脂質代謝、糖代謝及び細胞骨格関連遺伝子が含まれていた。さらに、3T3-L1脂肪細胞から HPD1 をノックダウンすることにより、hexokinase 遺伝子の発現が低下することを見出した。以上の結果より、HPD1 は他のタンパクを介して脂質代謝や糖代謝に関連する遺伝子の発現を、転写レベルで制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPD1 タンパクは、脂肪肝の肝実質細胞や脂肪細胞など高脂肪蓄積細胞に特異的に発現している。それゆえ、我々は本タンパクを介した肝臓及び脂肪組織における新しい脂肪蓄積シグナルの存在を予想した。予想に反して、当該研究の結果は糖代謝との関連性を示すものであるが、直接的あるいは間接的な HPD1 を介した脂肪蓄積シグナルの同定は、過剰な脂肪蓄積が原因となる非アルコール性脂肪肝インスリン感受性ならびに肥満などの治療に対するターゲットとしての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological function of HPD1 highly expressed in fat-accumulated cells, we prepared HPD1-knockdown adipocytes (3T3-L1 cells). Genechip analysis was used to analyze the gene expression of HPD1 knockdown and control cell mRNAs. The genes causing change in the expression by the knockdown of HPD1 was lipid metabolism, glucose metabolism, cytokine receptor and cytoskeleton-related genes. In these genes, hexokinase (known as glucose kinase) was focused. The hexokinase in HPD1-knockdown adipocytes led to the significant decrease of mRNA and protein levels and also glucose kinase activity compared to that in control adipocytes. The subcellular localization of HPD1 was previously demonstrated as detectable proteins in the cytoskeleton-enriched fraction. These results suggest that HPD1 in adipocytes indirectly associates with transcriptional regulation of a large number of genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：脂肪細胞 糖代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)は、肥満及び2型糖尿病モデルである ob/ob マウスの脂肪肝において発現が誘導されている。その PPARgamma の肝臓特異的なノックアウトは、ob/ob マウスの脂肪肝を劇的に改善した。この結果は、肝 PPARgamma が脂肪肝発症に関与していることを意味する。しかしながら、PPARgamma は転写因子であるため、PPARgamma 制御下で脂肪肝形成に直接関与する未知因子の存在が予想された。そこで、我々はその脂肪蓄積因子の網羅的な単離のため、ワイルド ob/ob 肝(脂肪肝)及び PPARgamma 欠損 ob/ob 肝(脂肪肝改善)を用いて GeneChip 発現解析を行い、多くの興味深い遺伝子の単離に成功した。本研究では単離された遺伝子群の中から、機能未知遺伝子 HPD1 (Hepatic PPAR gamma-Dependent gene1: 仮名称) にフォーカスした。

2. 研究の目的

本研究は、現状唯一の HPD1 発現細胞株である 3T3-L1 成熟脂肪細胞における HPD1 の生理機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

HPD1 発現細胞株である 3T3-L1 成熟脂肪細胞の HPD1 を short hairpin RNA(shRNA)によりノックダウンし、コントロール(β -galactosidase に対する shRNA)細胞との比較において表現型を解析、あるいは Affymetrix GeneChip を用いた発現解析を行った。3T3-L1 成熟脂肪細胞への HPD1shRNA の導入は、HPD1shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた。

4. 研究成果

【3T3-L1 脂肪細胞における HPD1 ノックダウン】

分化誘導剤 (DMI: dexamethasone,3-isobutyl-1-methylxanthine,insulin)で分化させた 3T3-L1 成熟脂肪細胞に HPD1shRNA 発現レンチウイルスを感染させ、HPD1 をノックダウンした。HPD1shRNA 発現における HPD1mRNA はコントロール細胞の約 90% であり、この条件を以後の実験に使用した(Figure 1)。

【HPD1 ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞における細胞形態の変化】

コントロール細胞との比較において、HPD1 ノックダウン細胞の細胞形態に明らかな変化は認められなかった。また脂肪滴特異的な蛍光試薬による細胞内脂肪滴の染色の結果においても、両細胞の脂肪滴の大きさ、数そして形状などにも明らかな変化は認められなかった。

【HPD1 ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞を用いた GeneChip 解析】

コントロール及び HPD1 ノックダウン細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、GeneChip 解析を行った。この結果、コントロールに比べ HPD1 ノックダウンにより 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は 61 遺伝子、コントロールに比べ HPD1 ノックダウンにより 1/2 以上発現が減少した遺伝子は 36 遺伝子であった。これら発現レベルが変動した遺伝子群の中には、脂質代謝、糖代謝、サイトカイン受容体及び細胞骨格関連遺伝子等が含まれていた。

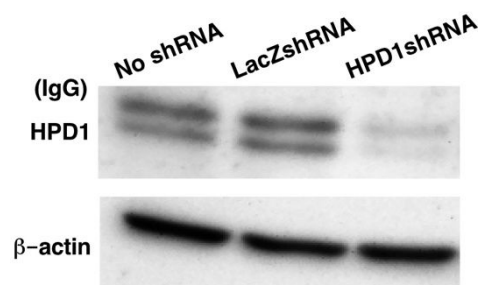


Figure 1. Effect of HPD1 knockdown in 3T3-L1 adipocytes by HPD1shRNA. 3T3-L1 pre-adipocytes were infected with LacZshRNA or HPD1shRNA lentivirus vector. At 4 days after infection, the cells were differentiated by dexamethasone,3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin (DMI). The mRNA and protein were extracted from mature-adipocytes at 12 days. The expression of HPD1 and β -actin proteins were analyzed by Western blotting using anti-HPD1 and anti- β -actin IgGs.

【HPD1 による hexokinase 遺伝子の制御】

Genechip 解析の結果より、グルコースのリン酸化酵素である hexokinase 遺伝子の発現が低下することを見出した。HPD1 ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞における hexokinase mRNA レベルは、分化開始後 7~15 日後で、コントロール細胞に比べ約 50~60%まで低下した(Figure 2A)。更に、HPD1 ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞における hexokinase 活性及びそのタンパクレベルもまた、コントロール細胞に比べ低下した(Figure 2B)。

【考察】

Genechip 解析の結果、HPD1 のノックダウンは、多くの遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかになった。しかしながら、同定された遺伝子群の中には、直接的に脂肪蓄積に關与する遺伝子を見出すことが出来なかった。そこで今回はそれらの遺伝子群の中から、HPD1 ノックダウンによる遺伝子発現の変動が顕著であった hexokinase 遺伝子について更なる検討を行った。

脂肪細胞における HPD1 ノックダウンは、hexokinase mRNA の低下を引き起こした。我々はデータベースによる HPD1 のアミノ酸配列の解析及び細胞内局在性の解析結果

から、HPD1 が細胞骨格タンパクを含む画分に局在していることを明らかにしている。それゆえ、HPD1 が直接的に hexokinase 遺伝子の転写を制御しているとは考えにくく、HPD1 の機能として他のタンパクを介した間接的な遺伝子発現調節が示唆された。

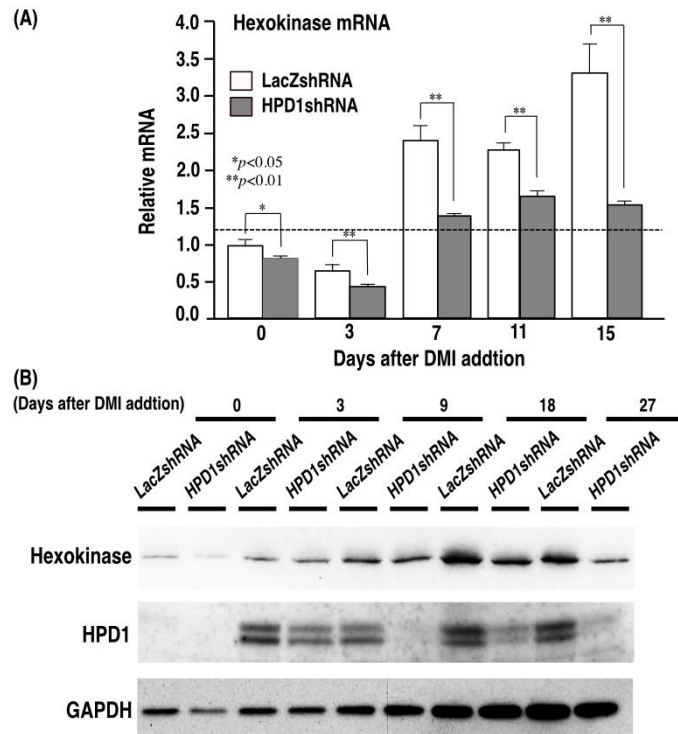


Figure 2. The deficiency of HPD1 leads to the decrease of hexokinase mRNA (A) and protein (B) in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 pre-adipocytes were infected with LacZshRNA or HPD1shRNA lentivirus vector. At 4 days after infection, the cells were differentiated by DMI. The mRNA and protein were extracted from mature-adipocytes at 0, 3, 9, 18 and 27 day days. GAPDH was used as a loading control. DMI: dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aibara, D. Matsuo, K. Yamano, S. Matsusue, K.	4. 巻 721
2. 論文標題 Vaspin is a novel target gene of hepatic CCAAT-enhancer-binding protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144113-144119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2019.144113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aibara, D. Matsuo, K. Yamano, S. Matsusue, K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Insulin induces expression of the hepatic vaspin gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ19-0276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aibara, D. Matsuo, K. Yamano, S. Matsusue, K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Fat-specific protein 27b is regulated by hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatic steatosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ19-0296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aibara D, Matsusue K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Fat-specific protein 27 is a novel target gene of liver X receptor .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Endocrinol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2018.02.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾康平、藍原大甫、松末公彦、山野茂
2. 発表標題 Codeine 親電子性代謝物 Codeinone は Keap1/Nrf2 システムを活性化する
3. 学会等名 第 36 回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾康平、藍原大甫、松末公彦、山野茂
2. 発表標題 Morphine 親電子性代謝物 Morphinone は Keap1/Nrf2 システムを活性化する
3. 学会等名 フォーラム 2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藍原大甫、松末公彦、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 脂肪肝における Fsp27b 遺伝子の発現解析 PPAR による発現制御
3. 学会等名 第 35 回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郡加寿美、藍原大甫、松末公彦、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 肝 C/EBP の新規標的遺伝子 Serpina12 の同定と発現調節機構
3. 学会等名 第 35 回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藍原大甫、松末公彦、松尾康平、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスの脂肪肝における Fsp27b 遺伝子の発現制御-PPARgammaの関与-
3. 学会等名 フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藍原大甫、松末公彦、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 再摂食時における肝 Fsp27 遺伝子の発現制御-インスリンの関与-
3. 学会等名 第138 年会日本薬学
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藍原大甫、松末公彦、松尾康平、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 再摂食時の肝臓における Fsp27 遺伝子の発現解析-インスリンによる発現抑制-
3. 学会等名 第 34 回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藍原大甫、松末公彦、瀧口総一、山野茂
2. 発表標題 脂肪肝形成に関与する Fsp27 遺伝子のインスリンによる発現制御
3. 学会等名 フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀧口総一、松末公彦、寺本典弘、井口東郎
2. 発表標題 肺癌腹膜播種マウスモデルにおける crizotinib の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾康平、立野愛美、松延祐衣、藍原大甫、松末公彦、成松鎮雄、山野茂
2. 発表標題 Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C12 と AKR1C13 の酵素化学的性質 - マウス肝 Morphine 6-Dehydrogenase との異同 -
3. 学会等名 第 44 回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----