

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591033
研究課題名 (和文) 骨格筋における PPAR δ 発現がインスリン抵抗性に及ぼす影響に関する検討
研究課題名 (英文) Research on the effects of skeletal muscle specific expression of PPAR δ on insulin resistance
研究代表者 鈴木 浩明 (SUZUKI HIROAKI) 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授 研究者番号 40344890

研究成果の概要：2型糖尿病モデルマウスの KK/Ta マウスの骨格筋に PPAR δ を発現させたマウスと、PPAR δ を発現していないマウスで体重および血糖に有意な差が認められなかった。また、肝臓で PPARs によって発現が調節されている mitoNEET の機能解析を行った。アデノウイルスベクターを使用して肝臓での mitoNEET を過剰発現をさせると体重減少と血糖の低下が認められた。逆に、肝臓での mitoNEET の発現を低下させると血糖が上昇した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：内分泌代謝内科学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：PPAR δ ，骨格筋，mitoNEET，インスリン抵抗性，糖尿病

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性の増大は、メタボリックシンドローム (MetS) や2型糖尿病 (T2DM) 発症と強く関連している。骨格筋はインスリン感受性を規定する主要な臓器であり、骨格筋におけるインスリン抵抗性増大のメカニズムの解明は、MetSやT2DMの予防や治療に寄与すると考えられる。

PPAR は、核内受容体スーパーファミリーに属し、 α と δ 、 γ の3つのアイソフォームが存在する。PPAR α は肝臓や腎臓などで強く発現し、脂肪酸 β 酸化に関連する遺伝子の転写制御に関与している。PPAR δ は全身に発現しているが、骨格筋に強く発現している。骨格

筋における PPAR δ の過剰発現により、骨格筋の組成を速筋から遅筋に変化し、運動耐容能の向上や脂肪酸の β 酸化の亢進と脂肪負荷に対する抗肥満作用が認められることが報告されている。PPAR γ は脂肪組織に強く発現し、脂肪細胞の分化に関与し、PPAR γ のアゴニストはインスリン抵抗性改善薬として臨床応用されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、PPAR のインスリン抵抗性の及ぼす影響、特に、骨格筋における PPAR δ の作用とインスリン感受性、肥満に与える影響とそのメカニズムを解明し、2型糖尿病

やメタボリックシンドローム発症における骨格筋の役割を検討することにある。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋特異的 PPAR δ 発現トランスジェニックマウスの解析

ヒト α アクチンをプロモーターとし、VP-16により骨格筋特異的に PPAR δ が恒常的に発現するようにしたトランスジェニックマウスを KK/Ta マウスで作成した (HAVPD KK Tg)。HAVPD KK Tg の各臓器を採取し、RT-PCR およびウエスタンブロットによってトランスジーン の発現を確認した。

HAVPD KK Tg の骨格筋をホルマリンで固定し、SDS を含むバッファーでホモジネート後、抗 HA 抗体で HAVPD と DNA の複合体を免疫沈降によって回収した。回収した DNA を TA クローニングベクターおよびルシフェラーゼベクターにクローニングし、DNA 配列の決定とエンハンサー活性について検討した。

HAVPD KK Tg と KKAY マウスを交配し、骨格筋特異的 PPAR δ 発現 KKAY マウス (HAVPD KKAY Tg) 作成した。

(2) mitoNEET の機能解析

KKAY マウスにフェノフィブラート (PPAR α アゴニスト) もしくは、GW501516 (PPAR δ アゴニスト)、ピオグリタゾン (PPAR γ アゴニスト) を投与し、肝臓および骨格筋、脂肪組織から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ解析を行った。この結果から、肝臓で PPARs によって発現が亢進する遺伝子として mitoNEET を見いだした。

C57BL6/J マウス、KKAY マウス、Ob/Ob マウスにおける mitoNEET の絶食、再摂食時の発現について、ノザンブロットで検討した。

mitoNEET cDNA および mitoNEET の siRNA をアデノウイルスベクターに組み込みマウスの尾静脈から静注し、経時的に体重、血糖の推移を観察した。は、過剰発現では GFP を、ノックダウンでは LacZ をコントロールとした。

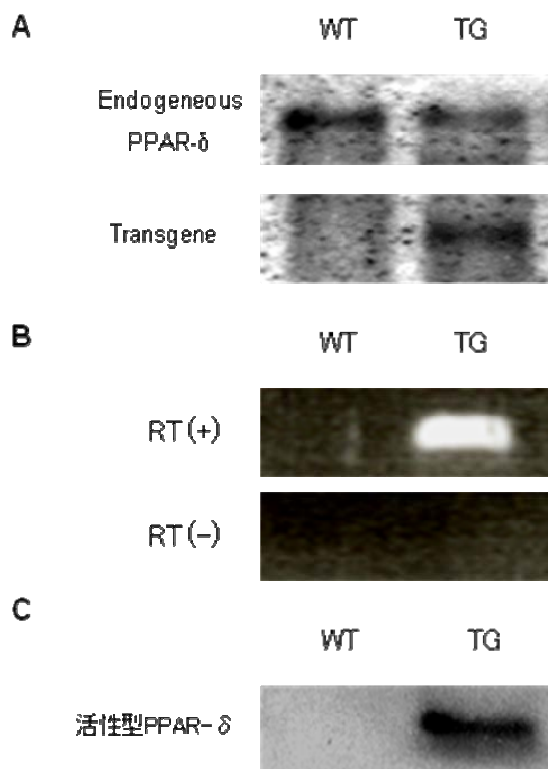
4. 研究成果

(1) 骨格筋特異的 PPAR δ 発現トランスジェニックマウスの解析

① トランスジーン の発現

サザンブロット解析から、3系統の HAVPD KK Tg が得られた。ノザンブロットでは、total RNA ではトランスジーン の発現が認められなかったが、poly A RNA を用いたノザンブロットでは、骨格筋にトランスジーン の発現が認められた。ノザンブロット同様、ウエスタンブロットではトランスジーン の発現は認められなかったが、抗 HA 抗体で免疫沈降を行ったところ、骨格筋での発現が認められた (図1)。以上のことから、トランスジェニ

図1. 骨格筋における PPAR δ トランスジ



ンの発現。ノザンブロット (A), RT-PCR (B), 免疫沈降 (C)。

ックマウスの PPAR δ 発現は弱いと考えられた。RT-PCR による解析では、トランスジーン の発現は、3 系統とも骨格筋で強く発現し、胃と褐色脂肪組織で弱い発現が認められた。これは、使用したヒト α アクチンプロモーターの特性によるものと考えられた。

② 骨格筋における PPAR δ 結合遺伝子の同定

HAVPD Tg の骨格筋を用いてクロマチン免疫沈降を行い、いくつかのクローンが得られた。これらの DNA 断片には PPAR 応答配列 (PPRE) が含まれておらず、レポータープラスミドに組み込み、HepG2 細胞にトランスフェクションして PPAR α アゴニスト (フェノフィブラート) への反応を検討したが、レポーター遺伝子の発現増加は認められず、非特異的なものと考えられた。

骨格筋組織からのタンパク DNA 複合体の回収率が低いことと、トランスジーン の発現が弱いことが、クロマチン免疫沈降がうまくいかない原因と考えられた。

③ 骨格筋特異的 PPAR δ 発現 KKAY トランスジェニックマウスの作成

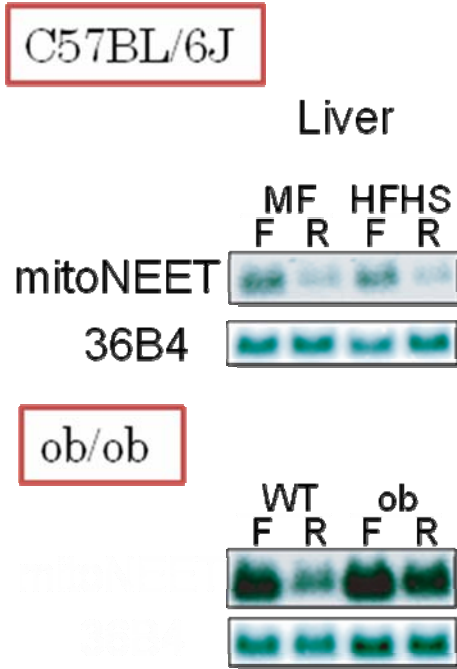
KK/Ta マウスでの検討では、Tg と WT の間に有意な体重および HbA1C の差は認められなかった。KK/Ta マウスは、糖尿病の程度が軽いため、HAVPD KK Tg と KKAY マウスを交配し、HAVPD KKAY Tg を作成し、ホモの HAVPD

KKAy Tg を得た。

(2) mitoNEET の機能解析

KKAy マウスマウスのマイクロアレイ解析から、肝臓で PPARs に反応する遺伝子として、mitoNEET に注目して解析を行った。

C57BL/6/J マウスの肝臓における mitoNEET の遺伝子発現は、絶食時は再摂食に比べ高く、ob/ob マウスにおいても同様であったが、その発現変動の差が小さかったため、病態に関連してその発現が調節されている可能性が示唆された (図 2)。骨格筋および白色脂肪組



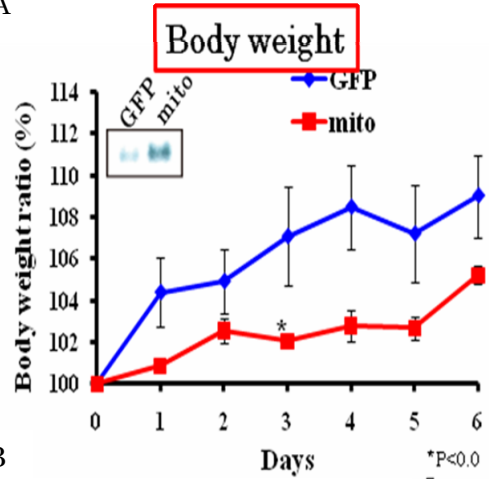
mitoNEET の発現の変化。C57BL/6J と ob/ob マウスで mitoNEET 発現をノザンブロットで検討した。MF; 普通食, HFHS; 高脂肪高蔗糖食、WT; ワイルドタイプ、ob; ob/ob マウス、F; 絶食、R; 再摂食。

織では、絶食と再摂食で mitoNEET の発現に差は認められなかった。

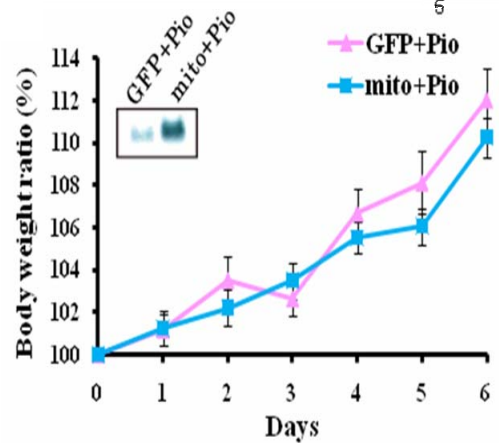
肝臓で特に遺伝子発現変動があることから mitoNEET が肝臓におけるエネルギー代謝において重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、組み換えアデノウイルスを用いて KKAy の肝臓において mitoNEET を過剰発現させたところ、コントロール (GFP 発現) に比べ体重が低下したが (図 3)、血糖値には有意差は認められなかった (図 4)。一方、mitoNEET をノックダウンしたところ、過剰発現とは逆に、コントロール (LacZ) に比べ体重は増加傾向を示し (図 5)、血糖値は

図 3. mitoNEET 過剰発現と体重変化。A は

A



B



ピオグリタゾン投与しない場合、B はピオグリタゾン投与した場合の体重変化。枠内は、ノザンブロットによる mitoNEET の発現。GFP; GFP 過剰発現、mito; mitoNEET 過剰発現、pio; ピオグリタゾン投与。

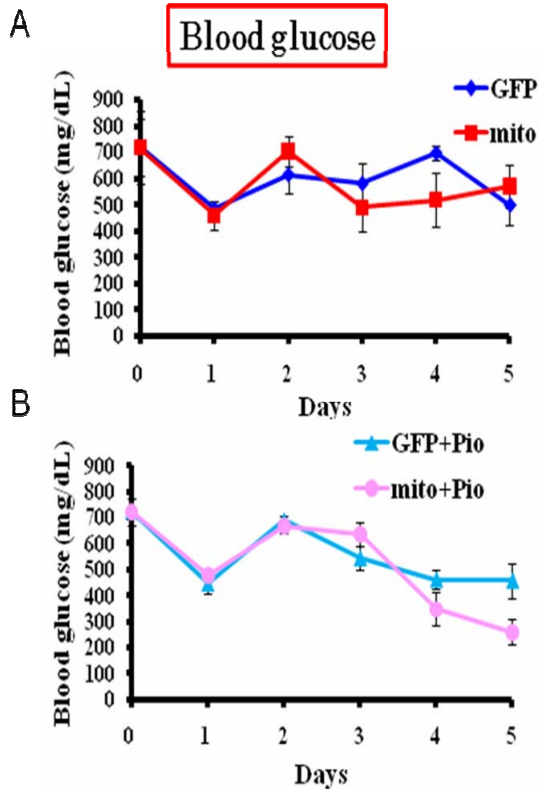
有意に増加した (図 6)。

mitoNEET は、ピオグリタゾン結合タンパクとしての性質を有するため、mitoNEET を過剰発現または、ノックダウンしたマウスにピオグリタゾン投与して、体重と血糖値の推移について検討した。ピオグリタゾン投与により mitoNEET 過剰発現による体重の減少が認められなくなった (図 3)。しかし、血糖値は、ピオグリタゾンの投与でもコントロールと mitoNEET 過剰発現に有意差は認められなかった (図 4)。mitoNEET ノックダウンによる体重増加傾向は、ピオグリタゾン投与ではコントロールと有意差が認められなくなった (図 5)。一方、血糖値についてはピオグリタゾン投与しても、mitoNEET でコントロールに比べて有意に増加していた (図 6)。mitoNEET をノックダウンしたマウスの肝臓は、コントロールマウスに比べて脂肪肝が改善していた (図 7)。

以上から、mitoNEET は血糖および脂質代謝のコントロールに重要な調節蛋白である

可能性が示唆された。

図 4. mitoNEET 過剰発現と血糖変化。A は



ピオグリタゾン投与しない場合、B はピオグリタゾン投与した場合の血糖変化。GFP; GFP 過剰発現、mito; mitoNEET 過剰発現、pio; ピオグリタゾン投与。

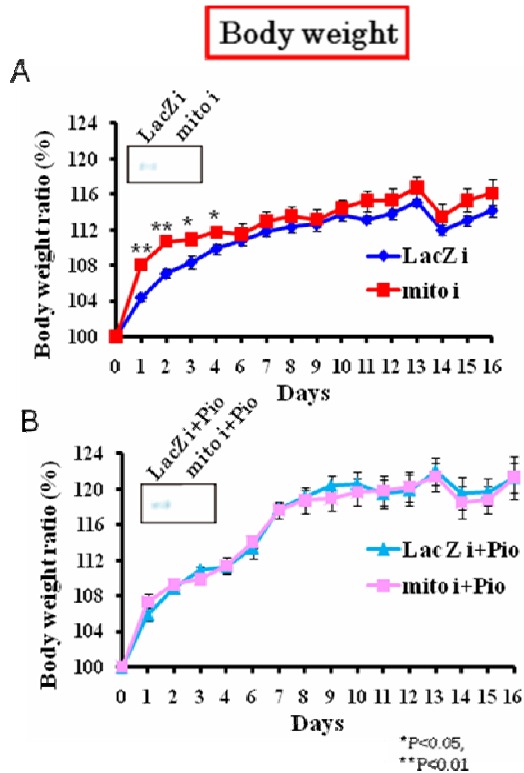
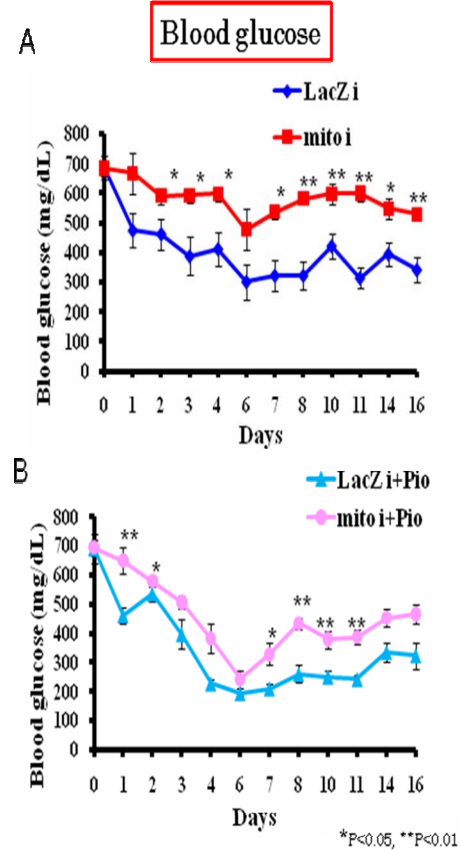


図 5. mitoNEET ノックダウンと体重変化。A はピオグリタゾン投与しない場合、B はピオグリタゾン投与した場合の体重変化。枠内は、ノザンプロットによる mitoNEET の発現。LacZi; LacZ ノックダウン、mitoi; mitoNEET ノックダウン、pio; ピオグリタゾン投与。

図 6. mitoNEET ノックダウンと血糖変化。A



はピオグリタゾン投与しない場合、B はピオグリタゾン投与した場合の血糖変化。mitoi; mitoNEET ノックダウン、pio; ピオグリタゾン投与。

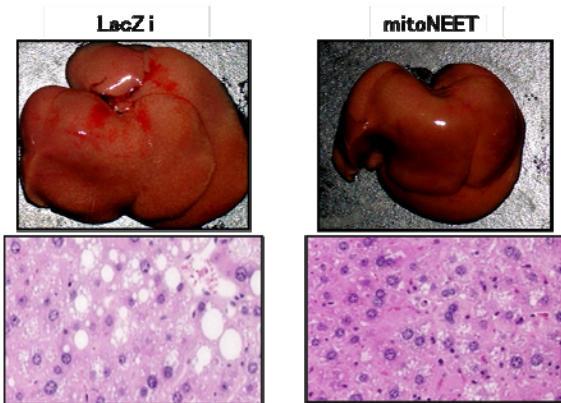


図 6. mitoNEET のノックダウンと肝臓の組織所見。LacZi; LacZ ノックダウン、mitoNEET; mitoNEET ノックダウン。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 渡邊和寿, 大木真也, 横尾友隆, 鈴木浩明, 高橋昭光, 矢藤繁, 小林和人, 島野仁, 石川三衛, 川上正舒, 山田信博, 豊島秀男、ピオグリタゾン結合蛋白mitoNEETの機能解析、第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008 年 7 月 24 日、神戸
- ② 渡邊和寿, 大木真也, 横尾友隆, 鈴木浩明, 島野仁, 石川三衛, 川上正舒, 山田信博, 豊島秀男、ピオグリタゾン結合タンパク mitoNEETの機能解析、第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2008 年 7 月 10 日、つくば
- ③ 大木真也, 渡邊和寿, 横尾友隆, 鈴木浩明, 高橋昭光, 矢藤繁, 小林和人, 島野仁, 石川三衛, 山田信博, 豊島秀男、ピオグリタゾン結合タンパク mitoNEETの機能解析、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 22 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 浩明 (SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号 40344890

(2) 研究分担者

豊島 秀男 (TOYOSHIMA HIDEO)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号 20197966

(2007 年度)

横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)
自治医科大学・医学部・研究員
研究者番号 80400688

(2007 年度)

(3) 連携研究者

横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)
自治医科大学・医学部・研究員
研究者番号 80400688

(2008 年度)