科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 5月 14日現在

研究種目:基盤研究(C)研究期間:2007~2008課題番号:19591059

研究課題名(和文) インスリン抵抗性発症における白色脂肪および褐色脂肪組織内

活性酸素種の意義の解明

研究課題名(英文) Role of reactive oxygen species in white and brown adipose tissues

in pathogenesis of insulin resistance

研究代表者

水流添 覚(TSURUZOE KAKU) 熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:50398202

研究成果の概要:

脂肪組織におけるミトコンドリア由来酸化ストレス mtROS がインスリン抵抗性に及ぼす影響について、mtROS 特異的除去酵素である Manganese SOD(MnSOD)を中心とした in vivo 解析、in vitro 解析を行った。

交付額

(金額単位:円)

(<u>=</u> m · i = · i • /			
	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学

キーワード∶糖尿病学

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、「生体内の酸化反応と還元反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態」と定義される。エネルギー代謝などの様々な細胞活動の過程で活性酸素種(ROS) [Reactive Oxygen Species;スーパーオキサイド(O2-)や過酸化水素(H2O2)など]が産生される。ROSは通常、抗酸化物質により直ちに除去されるが、ROSの過剰産生やROS消去系の減弱により酸化ストレスが生じる。ROSは核酸、蛋白、脂質を酸化することにより直接的に細胞機能を傷害するだけでなく、細胞内の様々なストレス感受性シグナル(NF-B、JNK/SAPKなど)を活性化し細胞傷害を引き起こす。近年この酸化ストレスは、多種の疾患の病態形成に関与することが明らかになってきた。

糖尿病と酸化ストレスとの関連については、高血糖に起因する細胞内ROSの増加が糖尿病における細小血管合併症に関与することが示唆されており、特にミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)が合併症発症に強く寄与することが示された(Nature, 404:787, 2000, Diabetes, 52:2570, 2003)。実際、我々は血管内皮細胞のmtROSをターゲットとした治療は合併症発症抑制に有効な手段となり得ることを動物レベルで証明した(Biochem Biophys Res Commun. 366:814, 2008)。

一方、上述のストレス感受性シグナルは2型糖尿病の成因であるインスリン抵抗性やインスリン分泌不全に関与することも知られており、ROSは細小血管合併症のみならず高血糖そのものの発症・進展にも関与することが示唆される。これまで

に当研究室では、mtROSによるインスリン分泌障害(Biochem Biophys Res Commun.300: 216, 2003)の分子機構や、肝臓におけるサイトカイン誘発インスリン抵抗性へのmtROSの関与(Diabet es 55:1197, 2006)について報告してきた。

インスリン抵抗性の成因として近年特に注目されるのは、内臓脂肪蓄積ならびに脂肪細胞から分泌されるホルモンであるアディポサイトカインの分泌異常である。肥満と内酸化ストレスが正相関することや、脂肪組織の酸化ストレスがアディポサイトカン分泌異常に関与することが一部報告されるに至り、脂肪組織の酸化ストレスの重要性が一層クローズアップされると考えた。

2.研究の目的

当研究室におけるmtROS 解析の研究実績をふまえ、白色脂肪組織および褐色脂肪組織におけるミトコンドリア由来酸化ストレスに焦点を絞り、脂肪細胞内 mtROS が細胞機能および生体のインスリン感受性どのように関与するかをミトコンドリア ROS の特異的除去酵素であるMnSOD を用いた解析で明らかにし、さらにmtROS をターゲットとする治療法の有効性について追及したいと考えている。具体的には脂肪組織特異的 MnSOD 発現マウスの構築と、脂肪組織内の mtROS 除去による肥満インスリン抵抗性の改善効果の解析を目的とする。

3.研究の方法

(1) MnSOD 導入遺伝子の構築

Cre-LoxP を用いた組織特異的 MnSOD 過剰発現システムの構築を目的とし、図 1 に示す様に導入遺伝子をデザインした。この導入遺伝子はヒト MnSOD cDNA の上流に 1 組の LoxP 遺伝子で CAT (Chrolamphenicol acetyltransferase)cDNA を挟む構造を有する。通常はCAG (chicken -actin)プロモーター制御下に恒常的に CAT 遺伝子を発現するが、Crerecombinase 存在下では LoxP 遺伝子組み換えが生じ、CAT 遺伝子がとり除かれ、hMnSOD 遺伝子発現が生じる。

(2) 培養細胞における LoxP 組み換えの確認 培養細胞(HEK293 細胞、COS7 細胞)に上記

の MnSOD-LoxP プラスミドと Cre recombinase プラスミドを一過性に導入し培養を行う。細胞から DNA、RNA およびタンパク質を精製し、LoxP遺伝子組み換えを genomic PCR 法で、MnSOD発現を RT-PCR ならびにウエスタンブロット法で確認する。

(3) 脂肪組織特異的 MnSOD トランスジェニック マウスの作成

上記の MnSOD 導入遺伝子を C57BL6 マウス 受精卵の雄性前核にマイクロインジェクション法で導入する。トランスジェニックマウスの作成は CARD(生命資源研究・支援センター/動物源開

発研究部門)で行う。得られたマウスの尾 DNA を用いてスクリーニングを行い、MnSOD-LoxPマウスを選別する。

その後、脂肪特異的 Cre 発現マウス(aP2-Cre マウス)と MnSOD-LoxP マウスを交配し、脂肪組織特異的 MnSOD トランスジェニック(MnSOD Tg)マウスを得る。

(4) MnSOD Tg マウスの解析

構築した MnSOD Tg マウスの糖代謝、脂質代謝、インスリン抵抗性について解析を行う。 また、マウスの臓器を単離し、MnSOD の発現、 臓器の酸化ストレスならびにインスリンシグナル 分子の解析を行う。

(5) 培養脂肪細胞における MnSOD 遺伝子発現 制御機構の解析

血管内皮細胞の MnSOD は AMPK/PGC1 依存性に発現誘導されることを報告しているが、培養脂肪細胞においても同様の誘導効果が得られるか、AMPK活性化薬である AICAR、チアゾリジン誘導体である troglitazone の作用を中心に検討する。

4. 研究成果

(1) Cre-LoxPシステムを用いた脂肪組織特異的MnSOD Tgマウスの構築

まず MnSOD-LoxP プラスミド(図1) と Cre recombinase プラスミドを培養細胞 (HEK293細胞、COS7細胞) に一過性に導入し、LoxP遺伝子組み換えが起こるか検討した。

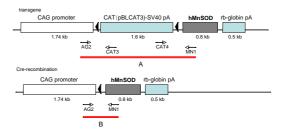


図1 MnSOD-LoxPプラスミドの構造.

PCR に 用 い た プ ラ イ マ ー (AG2,CAT3,CAT4,MN1)の配置を示す。AG2とMN1の組み合わせでPCRを行うと、組み替え前の遺伝子ではAの長さのフラグメントが増幅されるが、組み替えが起こるとBの長さに短縮したフラグメントが増幅される

リポフェクタミン法によりプラスミドを導入した細胞からgenomic DNAを精製し、プライマーAG2とMN1を用いてPCR増幅を行った。その結果、HEK293細胞、COS7細胞ともにMnSOD-LoxPプラスミドとCre recombinaseプラスミドを共発現した細胞でのみ組み替えDNAフラグメントBが増幅さ

れ、loxP遺伝子組み換えがることが確認された(図2)。

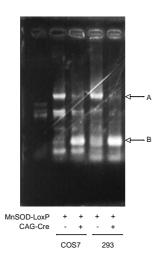


図2 PCRによるlox組み替え確認

各細胞からgenomic DNAを精製し、プライマーAG2,MN1を用いてPCRを行った。A:非組み換え遺伝子B:組み替え遺伝子

さらに、細胞から蛋白を精製し、抗MnSOD抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、MnSOD-LoxPプラスミドとCre recombinaseプラスミドを共発現した細胞ではMnSOD蛋白が著増しており、MnSOD遺伝子の転写並びに蛋白翻訳が適切に行われることことが確認された(図3)。

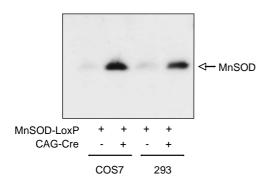


図3 ウエスタンブロット法によるMnSOD発現確認

各細胞からタンパク質を精製し抗MnSOD抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

次に、MnSOD-LoxP 遺伝子をC57BL6マウス 受精卵の雄性前核にマイクロインジェクション法 で導入した。得られたスクリーニングを行い MnSOD-LoxPマウス4ラインを得た。

MnSOD-Loxマウス4ラインについて、導入遺伝子コピー数を尾DNAを用いた定量的PCR法を用いて検討した。遺伝子コピー数は各ラインで異なり(推定2コピー~10コピー)、コピー数の多い2ラ

インを実験に供することとした。このマウスをAP2-Cre マ ウ ス と 交 配 し、 MnSOD Lox+,AP2-Cre+マウス(Tgマウス)、 MnSOD Lox+,AP2-Cre-マ ウ ス 、 MnSOD Lox-,AP2-Cre+マウス (MnSOD Lox-,AP2-Cre-(野生型)マウスの4種を得た(図4)。このマウス出生はメンデルの法則に従った。

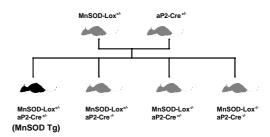


図4 マウスの遺伝子型

得られたマウスの空腹時血糖値、体重について検討した。生後12週での体重は、MnSOD Lox-,AP2-Cre-マウス(対照マウス) 27.7 \pm 0.4 g, MnSOD Lox+,AP2-Cre+マウス(MnSOD Tgマウス)24.6 \pm 0.4 gとTgマウスは体重が小さい傾向にあった。空腹時血糖値は対照マウス 87.0 \pm 1.0 mg/dl、Tgマウス92.0 \pm 15.0 mg/dlと差を認めなかった。また、経腹腔ブドウ糖負荷試験を行ったが負荷後血糖値に両群間で差は認めなかった(図5)。

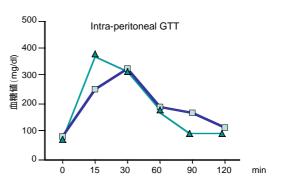


図5 MnSODトランスジェニックマウスにおける経腹腔内ブドウ糖負荷試験

1.5g/kgのブドウ糖を対照マウス()、Tgマウス ()に投与し血糖値を経時的に計測した。

今後、マウスに高脂肪食を負荷し肥満・インスリン抵抗性を導入した際のMnSOD過剰発現の影響についての解析を行う予定である。

(2) MnSOD遺伝子発現誘導機構のin vitro解析 3T3-L1脂肪細胞を用いて、MnSOD遺伝子の発現誘導機構について検討を行った。

まず3T3-L1前駆脂肪細胞をdexamethazone、IBMX、insulinを用いて脂肪細胞に分化誘導した時のMnSOD遺伝子発現の変化について検討した(図6)。図6Aに示すようにMnSOD mRNAは前駆脂肪細胞の段階では発現が低いが、分化誘導により発現が上昇し、誘導開始8日目には約8倍の増加を認めた。発現誘導の経時変化パターンは脂肪細胞特異的な分子であるadiponectinmRNAの変化とほぼ同様であった(図6 B)。

次に、薬剤によるMnSOD遺伝子発現誘導について検討した。分化8日目の3T3-L1脂肪細胞をAICAR、TNF、troglitazone存在かで24時間培養しMnSOD mRNA発現を検討した(図7)。AMPK活性化薬であるAICARは血管内皮細胞においてははMnSOD mRNA発現を増強するが、3T3-L1脂肪細胞においては発現増強作用を認めなかった。また炎症性サイトカインであるTNF

は脂肪細胞への酸化ストレスを惹起することが知られているが、TNFによるMnSOD mRNA発現変化は認めなかった。一方、チアゾリジン誘導体の一つであるtroglitazoneはMnSOD mRNA発現を約2.5倍増加させた。

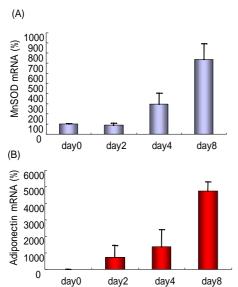


図6 3T3-I1脂肪細胞分化過程でのMnSOD(A)ならびにAdiponectin(B)遺伝子の発現変化分化誘導前、誘導開始後2,4,8日後の細胞からRNAを調整し、realtime RT-PCR法により両遺伝子の発現量を検討した。

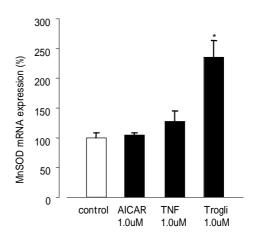


図7 AICAR、TNF 、troglitazone刺激による MnSOD mRNA発現変化

分化8日目の3T3-L1脂肪細胞を各薬剤で24時間刺激し、realtime RT-PCR法によりMnSOD遺伝子の発現量を検討した。

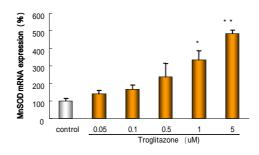


図8 各濃度のtraglitazone刺激によるMnSODmRNA発現増強

分化8日目の3T3-L1脂肪細胞を各濃度のtroglitazoneで24時間刺激し、realtime RT-PCR法によりMnSOD遺伝子発現量を検討した。

またこのTroglitazoneによるMnSOD遺伝発現誘導は、troglitazone濃度依存性であり、1 μ M以上の濃度で有意な増強を示した(図8)。

PGC-1 は遺伝子発現制御に関わるco-activatorであり、ミトコンドリア関連の遺伝子発現制御に関与することが知られる。そこで、MnSOD遺伝子発現制御へのPGC-1の関与を検討することとした。まず3T3-L1前駆脂肪細胞の分化誘導を行った際のPGC-1 mRNA発現変化について検討したが、MnSOD mRNAとは異なり脂肪分化開始後に一時的に発現が減少することが示された(図9)。またtroglitazone刺激によるPGC-1発現も検討したが、MnSOD mRNAの場合とは異なり有意な変化は見られなかった。

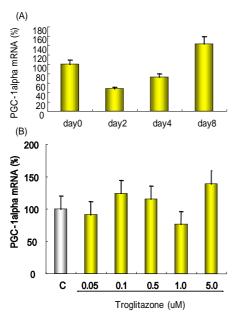


図9 3T3-L1脂肪細胞におけるPGC-1遺伝子の 発現変化

(A)3T3-L1前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導した際のPGC-1 mRNA,および(B)成熟脂肪細胞を各濃度のtroglitazone存在下で培養した際のPGC-1 mRNAについてrealtime RT-PCRを用いて解析した。

以上のように、脂肪細胞においてはPPAR 作動薬であるチアゾリジン薬がMnSOD発現を誘導することが示された。PGC-1はPPAR のco-activatorであるが、PGC-1遺伝子と、MnSOD遺伝子の発現変化には乖離が見られ、PGC-1の関与は薄いのではないかと考える。また血管内皮細胞においてはAICARなどのAMPK活性化薬でMnSOD発現誘導をもたらしうるが、培養脂肪細胞では誘導はみられない。この臓器、細胞の違いによる発現制御機構の特異性ついて今後解析を進める予定である。

謝辞

研究遂行にあたり御指導いただいた熊本大学 大学院医学薬学研究部代謝内科学 荒木栄一 教授、同 西川武志講師に深謝いたします。ま た実験補助を頂いた、熊本大学医学部附属病 院 竹田佳代先生に深謝いたします。

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 5件)

Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. Biochem Biophys Res Commun 379, 806-811, 2009(査読有り)

Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages.J Biol Chem. 283, 9852-9862, 2008 (查読有り)

Kojima K, Motoshima H, Tsutsumi A, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Kawashima J, Ichinose K, Furukawa N, Inukai K, Katayama S, Goldstein BJ, <u>Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E</u>. Rottlerin activates AMPK possibly through LKB1 in vascular cells and tissues. Biochem Biophys Res Commun. 376, 434-438. 2008 (査読有り)

Goto H, Sonoda K, Kondo T, Kukidome D, Fujisawa K, Yamashiro T, Motoshima H, Matsumura T, <u>Tsuruzoe K</u>, <u>Araki E</u>. Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetes mice. Biochem Biophys Res Commun. 366, 814-820, 2008 (査読有り)

Murata Y, <u>Tsuruzoe K</u>, Kawashima J, Furukawa N, Kondo T, Motoshima H, Igata M, Taketa K, Sasaki K, Kishikawa H, Kahn CR, Toyonaga T, <u>Araki E</u>. IRS-1 transgenic mice show increased epididymal fat mass and insulin resistance.Biochem Biophys Res Commun. 364, 301-307, 2007 (査読有り)

[学会発表](計 3件)

水流添覚: 糖尿病と心疾患. 第 5 回九州心臓核医学研究会 シンポジウム 2008年8月

2日 福岡市

水流添覚,村田雄介,竹田佳代,近藤龍也,本島寛之,荒木栄一 IRS-1 遺伝子導入による脂肪量増加と耐糖能障害 第45回日本糖尿病学会九州地方会 2007 年 10月12-14日 宮崎市

水流添覚,村田雄介,豊永哲至,古川昇,近藤 龍也,本島寛之,井形元維,竹田佳代,佐々木 一成,荒木栄一.IRS-1 過剰発現における脂肪蓄積と糖代謝についての解析 第50回日本糖尿病学会総会 2007年5月24-26日 仙台市

6.研究組織

(1)研究代表者 水流添 覚(TSURUZOE KAKU) 熊本大学·医学部附属病院·助教 研究者番号:50398202

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

荒木 栄一(ARAKI EIICHI)(2007 度は研究分担者)

熊本大学·大学院医学薬学研究部·教授

研究者番号:10253733

西川 武志(NISHIKAWA TAKESHI)(2007 度は研究分担者)

熊本大学·大学院医学薬学研究部·助教研究者番号:70336212