

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19599016
 研究課題名（和文） 機能的 SNP に着目したインスリンによるレジスチン遺伝子の転写調節機構の解明
 研究課題名（英文） Regulation of human resistin gene expression by insulin through functional SNP
 研究代表者
 大沼 裕 (ONUMA HIROSHI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00294794

研究成果の概要：

ヒト単球系の THP-1 細胞において、インスリンによりヒトレジスチン mRNA の発現は約 65% 抑制された。THP-1 細胞およびレポーターベクターを用いた検討では、basal のプロモーター活性は SNP -420 が G 型の場合、C 型に比べて約 20% 高かったが、インスリンによるプロモーター活性の抑制効果は、SNP -420 の G 型、C 型にかかわらず認められなかった。インスリン作用を媒介する転写因子 FOXO1 を THP-1 に共発現してプロモーター活性を検討したが、活性化は認められず、また、共発現下においてもインスリンの抑制作用は認められなかった。インスリンによるヒトレジスチン mRNA の発現制御は、インスリン応答性エレメント (IRE) を介した転写レベルでの制御とは別の機構でなされている可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

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：ヒトレジスチン、転写調節、インスリン、SNP

1. 研究開始当初の背景

レジスチンは、マウスの脂肪細胞から分泌

されるインスリン抵抗性惹起性アディポサイトカインとして報告された。ヒトにおいて

は、マウスとは異なり、レジスチンは主に単球、マクロファージに発現していることが明らかにされ、その生理的意義がマウスレジスチンとは異なることも考えられていた。

我々は、ヒトレジスチン遺伝子のプロモーター領域の SNP を解析し、SNP -420 の遺伝子型が G/G の場合、2 型糖尿病の発症リスクが C/C 型に比べ約 2 倍と有意に高いこと、さらに、この SNP が G の場合にのみ、この転写因子 Sp1/3 が特異的にプロモーターに結合し転写活性を高めていることを明らかにし、さらに、一般人約 2 0 0 0 人の解析により、血中のレジスチン濃度は SNP - 4 2 0 の遺伝子型により規定され、C/C, C/G, G/G の順に高いことを明らかにした。さらにヒトレジスチン血中濃度が 2 型糖尿病患者で高く、インスリン抵抗性の指標となる HOMA-IR と関連していることを報告した。

マウス脂肪細胞において、インスリンは、レジスチンの mRNA の発現を抑制することが報告された。

2. 研究の目的

糖尿病感受性遺伝子であるヒトレジスチン遺伝子の発現調節を明らかにすることは、糖尿病の病因の解明および新たな治療法を開拓する上で有意義であると考えられる。

ヒトレジスチン遺伝子のプロモーター領域、約 3 k b のシークエンスには、インスリン応答性エレメントに類似の配列が複数存在し、インスリンによるレジスチン mRNA の発現制御が、主に転写レベルで行われていると考えられる。本研究は、インスリンによるレジスチン遺伝子の転写調節機構を解析し、インスリン応答性エレメント (insulin response element: IRE) の同定、さらに、IRE と 2 型糖尿病感受性 SNP (SNP -420) の相互

作用について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト単球系細胞 THP-1 を用いて、インスリンのヒトレジスチン遺伝子発現への影響を検討した。

2) ヒト genomic DNA (SNP-420 G/G 型および C/C 型) を鋳型にして、ヒトレジスチンプロモーター領域、最長約 3kb を PCR で増幅することにより、1 連の 5'flanking 領域の欠失シリーズを作成 (翻訳開始点より、-3kb, -1kb, -890b, -450b) した。これを pGL3 ベクターに組み込み、レジスチンプロモーター活性測定用のルシフェラーゼレポーターベクターを作成した。

3) ルシフェラーゼレポーターベクターに組み込まれた、それぞれの欠失プロモーターをヒト単球系細胞である THP-1 細胞にインスリンレセプターとともにトランスフェクションし、インスリンで刺激することにより、インスリンのプロモーター活性に与える効果をルシフェラーゼアッセイにより検討した。THP-1 細胞以外の他の cell line を用いても同様の検討を行った。

4) インスリン応答性エレメント (IRE) に結合し、インスリン作用を媒介する転写因子 FOXO1 を THP-1 細胞などにプロモーターベクターと共発現して、FOXO1 のプロモーター活性に与える影響を検討した

4. 研究成果

1) ヒト単球由来の THP-1 細胞において、ヒトレジスチン mRNA が発現していることを確認した。

100 nM のインスリンで THP-1 細胞を 24 時間刺激することにより、ヒトレジスチン遺伝子の発現は、約 65%抑制された。

2) THP-1 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより翻訳開始点より 1 kb の領域のプロモーター活性を検討したところ、Basal のプロモーター活性は SNP-420 が G 型の場合、C 型に比べて約 20%高かった。

3) THP-1 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を検討したところ、プロモーター領域 -3kb, -1kb, -890b, -450b それぞれで、インスリンによるプロモーター活性の抑制は認められなかった。これは、SNP-420 が G 型の場合でも C 型の場合でも同様であった。さらに、インスリンレセプターを共発現させ、インスリン作用を検討したが、SNP-420 が G 型の場合でも C 型の場合でも、インスリンによる抑制作用は認められなかった。

また、COS7 細胞, HeLa 細胞, HepG2 細胞などの他の培養細胞を用いてインスリンレセプターを共発現し、インスリン作用を検討したが、インスリンによるプロモーター活性の抑制は認められなかった。これは SNP-420 が G 型の場合でも C 型の場合でも、同様であった。

4) インスリン応答性エレメント (IRE) に結合しインスリン作用を媒介することが明らかにされている転写因子 FOXO1 を THP-1 にプロモーターベクターと共発現してプロモーター活性を検討したが、FOXO1 による

プロモーター活性の活性化は認められなかった。さらには、FOXO1 共発現下で、インスリンの作用を検討したが、インスリンによるプロモーター活性の抑制は、G 型、C 型共に認められなかった。

5) 以上より、ヒトレジスチン遺伝子の Basal のプロモーター活性は、SNP-420 が G 型の場合 C 型に比べ高いことが明らかになった。インスリンによりヒトレジスチン遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。このインスリンによる発現抑制作用は、インスリン応答性エレメント (IRE) を介した転写レベルでの制御とは別の機構でなされている可能性が考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

大沼裕、大澤春彦、牧野英一 他

ヒトのインスリン抵抗性におけるレジスチンの意義

第 53 回日本臨床医学会中国・四国支部総会
平成 20 年 2 月 9 日、10 日

岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 裕 (ONUMA HIROSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00294794

(2) 研究分担者

大澤 春彦 (OSAWA HARUHIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90294800

牧野 英一 (MAKINO HIDEICHI) (H19)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50009578

(3) 連携研究者