

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890013

研究課題名（和文） 脂肪細胞分化とケミカルバイオロジー

研究課題名（英文） adipogenesis and chemical biology

研究代表者

岡村 将史 (Okamura Masashi)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：60547397

研究成果の概要（和文）：PHD1, 2, 3 および PHD4 レトロウイルスの作製に成功した。PHD1 および PHD2 の siRNA を用いて PHD1 および PHD2 のノックダウンに成功した。しかしながらこれらは 3T3-L1 脂肪形成に明らかな変化を与えなかった。米国コネチカット大学から Phd1<sup>ff</sup>Phd2<sup>ff</sup>Phd3<sup>ff</sup>, Phd2<sup>ff</sup>, Phd3<sup>ff</sup> および Phd2<sup>ff</sup>Rosa26<sup>+/CreERT2</sup> マウスを輸入し、各種遺伝子改変モデルの系統樹立に成功した。低酸素シグナルの最終的なエフェクターである HIF を検出する 7xHRE 人工レポーターを用いて、新規 PHD 阻害薬のスクリーニングを行った結果、コバルトとほぼ同等のルシフェラーゼ活性化能を有する化合物を見出した。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of PHD1, 2, 3 and 4 or siRNA-mediated knockdown of PHD1 and 2 did not affect 3T3-L1 adipogenesis. We successfully transferred and set up Phd1<sup>ff</sup>Phd2<sup>ff</sup>Phd3<sup>ff</sup>, Phd2<sup>ff</sup>, Phd3<sup>ff</sup> and Phd2<sup>ff</sup>Rosa26<sup>+/CreERT2</sup> mice from Connecticut University. By using 7 x HRE artificial promoter, we screened various compounds and founded new compounds equivalent to cobalt.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：低酸素、PAI-1、脂肪細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) は tPA 等を阻害する Serpin であり、脂肪細胞は主な産生細胞の 1 つである。興味あることに、PAI-1 量（血中、組織）は肥満、メタボリック症候群、その動脈硬化性疾患の発症と強い関連を有し、PAI-1 欠損マウスでは肥満、糖尿病の発症が軽減するこ

とが報告されている。さらに、PAI-1 阻害作用のある化合物 (PAI-039) 投与により脂肪細胞分化過程が修飾され、肥満が抑制されることも動物モデルで証明された。しかし、PAI-1 の病態（脂肪細胞分化）や化合物の分子レベルでの作用機序は全く不明であった。最近、研究協力者の東北大学医学部附属創生応用医学研究センター宮田敏男教授は、

世界に先駆け高活性の PAI-1 阻害薬の開発を成功させ (前臨床試験段階)、プロトタイプ化合物 (TM5007) は Nature Review Nephrology (5, 203-211, 2009) にも紹介された。本研究では、これらオリジナルな PAI-1 阻害薬をツールとして、脂肪細胞分化に於ける PAI-1 の役割を解明し、さらに PAI-1 阻害薬の抗肥満薬としての可能性を検討する。

本研究では、脂肪細胞分化と低酸素 (hypoxia) との関わりについても初めて詳細な分子レベルでの解析を試みる。これら関係に関しては以前から議論されてはいたが、明らかになっていない。研究者は、低酸素に対する一連の細胞応答機構、特に調節因子である低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor (HIF) に着目している。HIF は prolylhydroxylase (PHD) により分解される (PHD は酸素センサー分子と呼ばれる)。本研究では、東北大学で開発された PHD 阻害薬 (Nature Review Drug Discovery 8, 139-152, 2009 に Novel drug として紹介された TM6008 の後継化合物) や PHD 欠損マウス (Circulation, 116, 2007: コネチカト大学 Fong 教授から供与) などユニークなツールを駆使し、この課題に取り組む (これら研究材料を併せて使用出来るのは国内外でも申請者のみである)。

## 2. 研究の目的

脂肪細胞分化の過程や病態を解明し、画期的な治療法 (薬) を提案するために、本研究では、1) 新たな標的分子として PAI-1、PHD に着目し、2) 申請者が習熟した脂肪細胞分化の培養細胞モデルとオリジナルでユニークなツール (PAI-1 阻害薬、PHD 阻害薬、PHD 欠損マウス) も使い、3) 脂肪細胞分化に於ける PAI-1、HIF (PHD) の役割を解明し、さらに PAI-1 (PHD) 阻害薬の抗肥満薬としての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### I. 脂肪細胞分化の過程に於ける PAI-1、HIF (PHD) の発現解析

脂肪分化各過程の細胞から RNA および蛋白を抽出し、定量 PCR およびイムノブロット

解析で発現を解析。

### II. レトロウイルスを用いた強制発現およびオリゴ siRNA を用いた検討から PAI-1、HIF (PHD) の病態生理学的意義を解析

各種遺伝子の強制発現 (レトロウイルス発現系を用いるが、北村俊雄教授から供与を受ける) および RNAi 干渉による脂肪滴蓄積に与える影響を、オイルレッド O 染色法を用いて定量化。他の分化マーカーとの経時的な関係は、定量 PCR およびイムノブロットを用いて解析。

分化制御の作用点が判明した場合は、プロモーターに与える影響に関してレポーターアッセイを用いて検討。

## 4. 研究成果

研究の立ち上げに際し、実験室の申請登録および承認ならびにレトロウイルス作成使用および遺伝子改変動物の作成使用に対して、遺伝子組換え実験計画申請書および動物実験計画書の申請および承認を得た。これら承認およびカルタヘナ法のもと米国より Phd1<sup>ff</sup>Phd2<sup>ff</sup>Phd3<sup>ff</sup>, Phd2<sup>ff</sup>, Phd3<sup>ff</sup> および Phd2<sup>ff</sup>Rosa26<sup>+/CreERT2</sup> マウスをコネチカト大学より輸入することに成功した。これらマウスを入手出来るのは日本では我々のみである。Phd1<sup>ff</sup>Phd2<sup>ff</sup>Phd3<sup>ff</sup>, Phd2<sup>ff</sup>, Phd3<sup>ff</sup> および Phd2<sup>ff</sup>Rosa26<sup>+/CreERT2</sup> マウスは、モニタリングで感染症を認めたため抗生剤投与を行った。その後、ワイルドタイプマウスと掛け合わせ F1 ヘテロマウスの作製に成功している。現在 Phd1<sup>ff</sup>, Phd2<sup>ff</sup>, Phd3<sup>ff</sup>, Phd1<sup>ff</sup>Phd2<sup>ff</sup>Phd3<sup>ff</sup> ホモ flox マウス、および Rosa26<sup>+/CreERT2</sup> の作製に成功している。ATCC より 3T3-L1 細胞を購入し、脂肪細胞分化系の確立に成功した。遺伝子の発現変動を検出するための RNA 回収、蛋白回収、RT-PCR およびイムノブロットの実

験系の立ち上げに成功した。PHD1, 2, 3, 4 および Cre レトロウイルスの作成および細胞への導入に成功した。PHD1, 2, 3 および 4 レトロウイルスすべて有しているのは報告上、世界でも我々のみである。特に PHD4 レトロウイルスはこれまでに報告がない。Cre レトロウイルスを感染させることで、各種 PHD flox マウスにおける初代培養出来る増殖可能な組織において各種 PHD を簡便に短期間でノックアウトすることが可能となった。これらは低酸素シグナルのシステムの動作原理を明らかにする上でも有用であり、また、実験に必要な実験動物の数も減らせるため動物の福祉の観点からも極めて重要であると考えられる。PHD1, 2, 3, 4 および PAI-1 蛋白発現系の作成に成功した。低酸素シグナルの最終的なエフェクターである HIF を検出する 7xHRE 人工レポーターおよび脂肪細胞分化に重要な C/EBP $\beta$  および PPAR $\gamma$  プロモーターを用いたレポーターアッセイ系の立ち上げに成功した。作用点検討のためプロモーターをクローニングする際に必要なラット、マウスおよびヒト genomic DNA のライブラリー作成に成功した。

PHD1, 2 および HIF2 $\alpha$  のオリゴ siRNA の導入に成功した。これらオリゴ siRNA を 3T3-L1 細胞に導入し、脂肪滴蓄積に与える影響を検討したが明らかな変化を認めなかった。また、昨年成功していた PHD1, 2, 3, 4 レトロウイルスを 3T3-L1 細胞に導入し、脂肪滴蓄積に与える影響を検討したが明らかな変化を認めなかった。以上から、低酸素システムは脂肪細胞分化に関連がある可能性は低いと考えられた。低酸素シグナルの最終的なエフェクターである HIF を検出する 7xHRE 人工レポーターを用いて、新規 PHD 阻害薬のスク

リーニングを行った。その結果、陽性対象であるコバルトとほぼ同等のルシフェラーゼ活性化能を有する化合物を見出した。さらにこの化合物を用いて MTS アッセイ (細胞毒性試験) および HPLC を用いた分解性検討試験を行った。その結果、この化合物は、細胞毒性が極めて低く、ブタエステラーゼによりほとんど分解されないことも判明した。

#### 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 7 件)

1. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases systolic blood pressure in Japanese hypertensive patients with type 2 diabetes.  
Ogawa S, Ishiki M, Nako K, Okamura M, Senda M, Mori T, Ito S.  
Tohoku J Exp Med. 2011;223(2):133-5. 査読有り
2. Aliskiren reduces albuminuria and oxidative stress, and elevates glomerular filtration rates in Japanese patients with advanced diabetic nephropathy.  
Ogawa S, Nako K, Okamura M, Senda M, Mori T, Ito S.  
Hypertens Res. In press. 査読有り
3. Methylglyoxal is a predictor in type 2 diabetic patients of intima-media thickening and elevation of blood pressure.  
Ogawa S, Nakayama K, Nakayama M, Mori T, Matsushima M, Okamura M, Nako K, Senda M, Miyata T, Ito S.  
Hypertension. 2010, 56(3):471-6. 査読有り
4. Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity.  
Okamura M, Inagaki T, Tanaka T and Sakai J.  
Organogenesis. 2010, 6(1):24-32. 査読有り
5. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice.  
Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M, Kodama T, Shinkai Y, Sakai J.  
Genes Cells. 2009, 14(8):991-1001. 査読有り

6. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop.

Wakabayashi K, **Okamura M**, Tsutsumi S, Nishikawa N S, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J.

Mol Cell Biol. 2009, 29(13):3544-55. 査読有り

7. COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis.

**Okamura M**, Kudo H, Wakabayashi K, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106(14):5819-24. 査読有り

[学会発表] (計 22 件)

1. (学会等名) 日本糖尿病学会第 48 回東北地方会  
(発表標題) 糖尿病腎症におけるレニンプロセキナーゼ (アリスキレン) の治療効果の検討  
(発表者名) **岡村将史**、小川晋、奈古一宏、千田美穂、伊藤貞嘉。  
(発表年月日) 2010 年 11 月 6 日  
(場所) 仙台
2. (学会等名) 日本糖尿病学会第 48 回東北地方会  
(発表標題) 正常アルブミン尿糖尿病の尿中 4 型コラーゲン (U-COL) 増大因子の検討  
(発表者名) 小川晋、森建文、奈古一宏、**岡村将史**、千田美穂、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2010 年 11 月 6 日  
(場所) 仙台
3. (学会等名) 日本糖尿病学会第 48 回東北地方会  
(発表標題) 高結合能低親和性インスリン結合抗体により早朝低血糖を繰り返した一例  
(発表者名) 神幸希、小川晋、奈古一宏、**岡村将史**、千田美穂、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2010 年 11 月 6 日  
(場所) 仙台
4. (学会等名) 日本糖尿病学会第 48 回東北地方会  
(発表標題) 認知症を合併した糖尿病患者の後方支援の重要性を示唆した症例  
(発表者名) 石崎絵里佳、和泉順子、菅野エリ

子、佐藤昌子、小川晋、奈古一宏、**岡村将史**、千田美穂、伊藤貞嘉

(発表年月日) 2010 年 11 月 6 日

(場所) 仙台

5. (学会等名) 第 33 回日本高血圧学会。  
(発表標題) 糖尿病性腎症において、アルブミン尿抑制効果が最も大きいアンジオテンシン受容体ブロッカー (ARB) 投与時期の検討  
(発表者名) 小川晋、森建文、**岡村将史**、千田美穂、奈古一宏、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2010 年 10 月 16 日  
(場所) 福岡
6. (学会等名) 第 7 回インスリン抵抗性とメタボリックシンドローム研究会  
(発表標題) The PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop.  
(発表者名) 酒井 寿郎、若林賢一、**岡村将史**、田中十志也、油谷浩幸、稲垣毅  
(発表年月日) 2010 年 7 月 4 日  
(場所) 東京
7. (学会等名) 第 9 回宮城県生活習慣病フォーラム (招待講演)  
(発表標題) 肥満症とエビゲノム  
(発表者名) **岡村将史**  
(発表年月日) 2010 年 6 月 22 日  
(場所) 仙台
8. (学会等名) 第 32 回日本分子生物学会年会  
(発表標題) The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma/Retinoid X Receptor alpha Heterodimer Targets the Histone Modification Enzyme PR-Set7/Setd8 Gene and Regulates Adipogenesis through a Positive Feedback Loop.  
(発表者名) 酒井寿郎、油谷浩幸、児玉龍彦、若林賢一、田中十志也、**岡村将史**、堤修一、浜窪隆雄  
(発表年月日) 2009 年 12 月 11 日  
(場所) 横浜
9. (学会等名) 第一回 NM-GCOE 国際シンポジウム (招待講演)  
(発表標題) The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma/Retinoid X Receptor alpha Heterodimer Targets the Histone Modification Enzyme PR-Set7/Setd8 Gene and Regulates Adipogenesis through a Positive Feedback Loop.  
(発表者名) **岡村将史**、若林賢一、宮田敏男、伊藤貞嘉、酒井寿郎

- (発表年月日) 2009年12月8日  
(場所) 仙台
10. (学会等名) 第21回日本糖尿病性腎症研究会  
(発表標題) 高血圧合併2型糖尿病性腎症例におけるARB治療による有効性の予測因子の検討  
(発表者名) 小川 晋、森 建文、**岡村将史**、奈古一宏、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年12月6日  
(場所) 大阪
11. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) インスリン注射部位の変更により著名にインスリン投与量が減少した1型糖尿病の1例  
(発表者名) 竹内陽一、小川晋、三島英換、**岡村将史**、奈古一宏、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
12. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) 脱水を警戒し、多飲により著名な低Na血症に陥った糖尿病性腎症の1例  
(発表者名) 神幸希、小川晋、竹内陽一、三島英換、**岡村将史**、奈古一宏、佐藤博、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
13. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) 正常アルブミン尿例における4型コラーゲン測定の臨床的意義  
(発表者名) 小川晋、森建文、**岡村将史**、奈古一宏、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
14. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) 高結合部位、低親和性を有するインスリン抗体陽性例の臨床像の検討  
(発表者名) 三島英換、小川晋、竹内陽一、**岡村将史**、奈古一宏、石塚恒夫、阿部文明、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
15. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) 蛋白漏出性胃腸症、骨髄異型性症候群を合併した糖尿病性腎症の1例  
(発表者名) **岡村将史**、小川晋、竹内陽一、三島英換、奈古一宏、伊藤貞嘉
- (発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
16. (学会等名) 日本糖尿病学会第47回東北地方会  
(発表標題) MRI上の腎皮髄コントラスト低下と糖尿病性腎血管障害の関連検討  
(発表者名) 井上英行、小川晋、森建文、奈古一宏、**岡村将史**、佐藤博、伊藤貞嘉  
(発表年月日) 2009年11月7日  
(場所) 仙台
17. (学会等名) 第13回日本心血管内分泌代謝学会  
(発表標題) COUP-TFIIは、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの下流でPPAR $\gamma$ の発現をエピジェネティックに調節することで脂肪細胞分化を制御する  
(発表者名) **岡村将史**、若林賢一、堤修一、宮田敏男、内藤眞、浜窪隆雄、伊藤貞嘉、油谷浩幸、児玉龍彦、酒井寿郎  
(発表年月日) 2009年10月23日  
(場所) 大宮
18. (学会等名) 第13回日本心血管内分泌代謝学会  
(発表標題) PR-set7/Setd8は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ 複合体の標的遺伝子でありポジティブフィードバック機構で脂肪細胞分化を制御する  
(発表者名) **岡村将史**、若林賢一、堤修一、井原茂男、橋本祐一、浜窪隆雄、伊藤貞嘉、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎  
(発表年月日) 2009年10月23日  
(場所) 大宮
19. (学会等名) 第32回日本高血圧学会総会  
(発表標題) ヒストンメチル化修飾酵素PR-Set7/Setd8は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ 複合体の標的遺伝子でありポジティブフィードバック機構で脂肪細胞分化を制御する  
(発表者名) **岡村将史**、若林賢一、堤修一、西川直子、田中十志也、榊原伊織、北上純一、井原茂男、橋本祐一、浜窪隆雄、伊藤貞嘉、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎  
(発表年月日) 2009年10月1日  
(場所) 大津
20. (学会等名) 第32回日本高血圧学会総会  
(発表標題) COUP-TFIIは、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの下流にあり、PPAR $\gamma$ の発現をエピジェネティックに制御し、脂肪細胞分化を制御する  
(発表者名) **岡村将史**、工藤宏美、若林賢一、田中十志也、野中綾、内田あおい、堤修一、榊原伊織、内藤眞、浜窪隆雄、伊藤貞嘉、油谷浩幸、児玉龍彦、酒井寿郎

(発表年月日) 2009年10月1日  
(場所) 大津

21. (学会等名) 第27回内分泌代謝学サマーセミナー

(発表標題) ヒストンメチル化修飾酵素 P R-Set7/Setd8 は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  複合体の標的遺伝子でありポジティブフィードバックループ機構で脂肪細胞分化を制御する

(発表者名) **岡村将史**、若林賢一、堤修一、西川直子、田中十志也、榊原伊織、北上純一、井原茂男、橋本祐一、浜窪隆雄、伊藤貞嘉、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎

(発表年月日) 2009年7月16日  
(場所) 福井

22. (学会等名) 第82回日本内分泌学会学術総会

(発表標題) Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、COUP-TFII を介して、PPAR $\gamma$  遺伝子の発現をエピジェネティックに調節し、脂肪細胞分化を制御する

(発表者名) **岡村将史**  
(発表年月日) 2009年4月23日  
(場所) 前橋

[図書] (計3件)

1. (出版社名) 東北医学雑誌  
(書名) 栄養状態が体質を変化させる分子基盤 (脂肪形成時におけるエピゲノム解析)  
(著者名) **岡村将史**、伊藤貞嘉、酒井寿郎  
(発行年等) 2010年、44-47。
2. (出版社名) 北隆館  
(書名) BIO Clinica (メタボリックメモリー) (分担執筆)  
(著者名) **岡村将史**、酒井寿郎  
(発行年等) 2010年、986-987。
3. (出版社名) 医学書院  
(書名) 糖尿病診療マスター (分担執筆)  
(著者名) **岡村将史**、小川晋、伊藤貞嘉  
(発行年等) 2010年、41-46。

[産業財産権]

○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  
<http://miyatalab.jimdo.com/研究業績-略歴/岡村将史/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
岡村 将史 (Okamura Masashi)  
東北大学・大学院医学系研究科・助手  
研究者番号：60547397

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：