

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890124

研究課題名（和文）新規アディポカインD-ドーパクロムトートメラーゼの発現および作用機序に関する研究

研究課題名（英文）Studies on transcriptional regulation and function of a novel adipokine, D-dopachrome tautomerase

研究代表者

石本 恭子 (ISHIMOTO KYOKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60579952

研究成果の概要（和文）：新規アディポカインである D-ドーパクロムトートメラーゼ（DDT）は前駆脂肪細胞に作用し、MAPK-ERK 経路を介して炎症性サイトカインの発現が亢進する。この DDT の作用に CD74 が関与することを明らかにした。また DDT が脂肪細胞への分化過程に作用すると、脂肪分化制御因子の発現誘導が抑制され、脂肪細胞への分化が抑制されることを明らかにした。さらに脂肪細胞での DDT の転写に必要なプロモータ領域の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：D-dopachrome tautomerase (DDT), a novel adipokine, induces mRNA expression of IL-6 in preadipocytes. The DDT-induced IL-6 expression was found to be mediated by CD74. DDT impaired adipogenesis by inhibiting mRNA induction of adipogenic regulators during adipogenesis. Furthermore, the DDT promoter region involved the transcription in adipocytes was identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：前駆脂肪細胞、DDT、CD74、ERK、IL-6、脂肪細胞分化、転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はヒト脂肪細胞が分泌するタンパク質の網羅的解析を行い、D-dopachrome tautomerase (DDT) が、肥満者の脂肪細胞で発現が低下する新規アディポカインであることを見出した。DDT は、D-ドーパクロムを基質としたトートメラーゼ活性を有する酵素として知られているが、D-ドーパクロムは生体内では不活性な物質であり、DDT の生理的意義は不明であった。DDT は一次構造、三

次構造が、多様な生理活性を有するサイトカインである MIF (macrophage migration inhibitory factor) と類似している。近年、DDT は炎症状態下や酸化ストレスに応答し MIF と類似した発現挙動を示すこと、さらに肺ガン細胞株での血管新生や、マクロファージでの炎症性サイトカインの分泌促進など、MIF と同様の作用を有することが報告され、DDT は MIF の機能的ホモログである可能性が示唆されている。

(2) これまでの我々の研究により、DDT 発現抑制脂肪細胞では脂肪蓄積量が増加すること、DDT は前駆脂肪細胞ではほとんど発現していないこと、脂肪細胞への分化に伴い発現が増加すること、が示された。MIF は前駆脂肪細胞でも発現しており、脂肪分化過程でその mRNA の発現が変動しないこと、肥満者で発現が上昇することが報告されていることから、脂肪組織での DDT と MIF は発現挙動が異なり、脂肪組織で DDT は MIF と異なる作用を有する可能性を見出した。さらに DDT は脂肪細胞に作用し、中性脂肪量の蓄積の制御、インスリン抵抗性の惹起因子である aP2 の発現抑制に関与すること、肥満マウスへの DDT 投与はインスリン抵抗性を改善することから、DDT は善玉アディポカインとしての性質を有することが示唆された。さらに DDT を前駆脂肪細胞に作用させると炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1) の発現上昇が認められるが、MIF にはその作用がないことから、少なくとも前駆脂肪細胞では DDT は単なる MIF の機能的ホモログではないことが示唆されている。本研究では DDT の前駆脂肪細胞での炎症性サイトカイン発現上昇機序の解明および、DDT の脂肪分化に及ぼす影響の検討を行った。さらに DDT の脂肪細胞での発現機序解明のため、DDT のプロモータ領域の同定、および既知の転写因子の DDT 発現に対する効果を検討した。

## 2. 研究の目的

(1) DDT の前駆脂肪細胞での炎症性サイトカイン発現上昇作用に関わる DDT 受容体ならびにシグナル伝達系を同定する。

(2) DDT の脂肪細胞分化抑制作用に関わる各種脂肪細胞分化制御因子の発現変動について検討する。

(3) 脂肪細胞における DDT の発現調節に関与する DDT 遺伝子の転写調節領域および転写調節因子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 前駆脂肪細胞での DDT 受容体の同定

DDT は MIF と構造が類似しているため、その受容体も MIF 受容体と構造が類似している可能性が高い。そこで、MIF 受容体複合体として報告されている CD74、CD44 を DDT 受容体候補とし、siRNA により個別に発現抑制させたヒト前駆脂肪細胞株 SGBS にリコンビナ

ント DDT (rDDT) を作用させ、炎症性サイトカインの発現量を検討することで DDT 受容体の同定を行った。

(2) DDT の脂肪細胞分化制御因子の発現に及ぼす影響の検討

SGBS 細胞に rDDT を作用させ脂肪細胞への分化誘導を行い、脂肪分化への影響を調べると共に、脂肪細胞への分化制御因子である CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family と peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) の発現に及ぼす影響を調べる。

(3) DDT の発現調節に関与する転写調節領域ならびに転写調節因子の同定

DDT は脂肪細胞分化に伴い、mRNA 発現が上昇することから、類似した発現挙動を示し、脂肪細胞への分化を正に制御する転写因子である Krüppel-like factor 15 (KLF15) が DDT の転写調節に関与するか検討した。すなわち、KLF15 発現ベクターを構築し、SGBS 細胞に一過性発現させ、DDT mRNA 発現が増加するかどうかをリアルタイム PCR 法にて検討した。

続いて、転写因子結合領域の決定のため、様々な長さの DDT 遺伝子の上流配列を挿入したルシフェラーゼベクター (DDT promoter-luc ベクター) を構築し、SGBS 細胞に一過性発現させ、脂肪細胞分化に伴うルシフェラーゼ活性の変化を測定し、最大の活性を示すプロモータ領域の絞り込みを行った。

## 4. 研究成果

(1) 前駆脂肪細胞での DDT 受容体の同定  
CD44 の発現抑制 SGBS 細胞では rDDT による IL-6 mRNA 量上昇作用が認められたが、CD74 の発現抑制細胞では、rDDT による IL-6 mRNA 量の上昇が認められなかった。この結果より、DDT 受容体は MIF 受容体と同様に CD74 を構成蛋白の一つとするが、CD44 は構成蛋白ではないことが示唆された (図 1)。

また、DDT を作用させた SGBS 細胞で、Akt、p38、PKC、PKA のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングにより検討したが、リン酸化に影響は認めなかった。

これらの結果により DDT は前駆脂肪細胞に対し、CD74-ERK 経路を介して炎症性サイトカイン発現を亢進させることが示唆された。また、DDT と MIF では前駆脂肪細胞での受容体複合体のタンパク質の構成が異なり、それが前

駆脂肪細胞での作用の差異と関連する可能性はある。

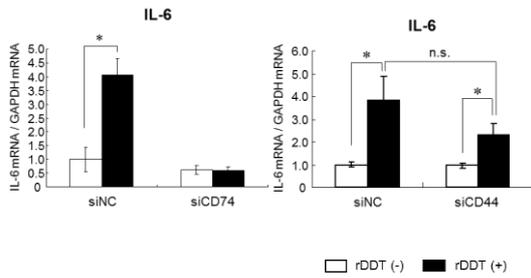


図1 CD74, CD44 発現抑制 SGBS 細胞での rDDT の IL-6 mRNA 発現に及ぼす効果

(2) DDT の脂肪細胞分化制御因子の発現に及ぼす影響

rDDTを作用させたSGBS細胞では脂肪細胞への分化が抑制された。その細胞では分化誘導時でのC/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$ 、C/EBP  $\alpha$ 、PPAR  $\gamma$  2 の発現誘導が抑制されていた。DDTにより発現誘導されるIL-6は脂肪分化を阻害することが知られているが、IL-6の脂肪細胞分化抑制機序はC/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  に非依存的であることから、DDTの脂肪細胞分化抑制作用にはIL-6以外の機序も関与していると考えられる。

(3) DDT の発現調節に関与する転写調節領域ならびに転写調節因子の同定

KLF15 を強発現させた前駆脂肪細胞では、DDT mRNA 発現量の増加は認められなかったことから、KLF15 は DDT 遺伝子の転写活性化因子ではない可能性が示唆された。

転写調節候補塩基配列として DDT 遺伝子の転写開始点を基準とした約 3000bp の塩基配列 (-2903/+135) を挿入したルシフェラーゼベクターを、前駆脂肪細胞に導入後、脂肪細胞分化誘導を行った。分化誘導後 3 日目でルシフェラーゼ活性が上昇したことから、この部位に DDT 遺伝子の転写を正に制御する領域があることが示された。さらに様々な長さの転写調節候補塩基配列として (-272/+135)、(-272/+23)、(-113/+135)、(-113/+23)、(-703/+23) 領域を各々挿入したルシフェラーゼベクターを構築した。脂肪細胞への分化誘導後 3~5 日目で、(-2903/+135) および (-272/+135)、(-272/+23) 領域のプロモーター活性の有意な増加を認めた。また、(-703/+23) 領域でも少ないが活性増加が認められた。一方、(-113/+135)、(-113/+23) 領域では活性が認められなかった (図 2)。これらの結果より、DDT の転写に重要なプロモーター領域は、(-272/+23) 領域に存在する可能性が示唆された。このような前駆脂肪

細胞から脂肪細胞への分化過程における DDT の発現調節機構の解明は、肥満の予防・治療法の開発に有用である。

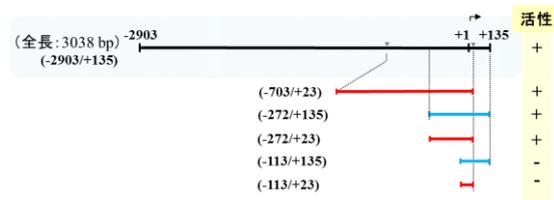


図2 各種 DDT プロモーターの design とルシフェラーゼ活性

## 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 3 件)

- ① Iwata T, Taniguchi H, Kuwajima M, Taniguchi T, Okuda Y, Sukeno A, Ishimoto K, Mizusawa N, Yoshimoto K., The action of D-dopachrome tautomerase as an adipokine in adipocyte lipid metabolism, PLoS One, 査読あり, Vol. 7, No. 2, 2012, e33402.

DOI:10.1371/journal.pone.0033402

- ② 石本恭子、新規アディポカイン D-dopachrome tautomerase の前駆脂肪細胞における機能解析、四国歯学会雑誌、査読なし、Vol. 1、No. 1、2011、pp. 1-17

- ③ Md. Golam Hossain, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Schadan Wan Nazatul Shima, Toru Okutsu, kyoko Ishimoto, Katsuhiko Yoshimoto, Compressive force inhibits adipogenesis through COX-2-mediated down-regulation of PPAR $\gamma$ 2 and C/EBP $\alpha$ , Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読あり, Vol. 109, No. 3, 2010, 297-303

DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.09.003

[学会発表] (計 6 件)

- ① 岩田武男、D-dopachrome tautomerase は肥満マウスでのインスリン抵抗性を改善する、第 53 回歯科基礎医学会学術大会、2011. 10. 2、長良川国際会議場 (岐阜)
- ② 石本恭子、Functional analysis of a novel adipokine, D-dopachrome tautomerase, in preadipocytes、International Joint Symposium: The University of Tokushima, Universitas Gadjah Mada, Niigata University, 2010. 12. 17-18、(インドネシ

ア デンパサール)

- ③ 石本恭子、前駆脂肪細胞における新規アディポカイン D-dopachrome tautomerase の作用解析、第 69 回日本矯正歯科学会、2010. 9. 27 - 29、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 石本恭子、D-dopachrome tautomerase が脂肪分化に及ぼす影響、第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2010. 9. 20 - 22、タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ 岩田武男、D-dopachrome tautomerase は脂肪細胞での中性脂肪量を制御する、第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2010. 9. 20 - 22、タワーホール船堀 (東京)
- ⑥ 石本恭子、新規アディポカイン D-dopachrome tautomerase の抗肥満作用についての検討、第 10 回日本内分泌学会四国支部学術集会、2010. 9. 4、徳島大学病院 (徳島)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石本 恭子 (ISHIMOTO KYOKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60579952

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号