

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659517

研究課題名（和文）毛細血管拡張性運動失調症における耐糖能異常発症機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of glucose intolerance in Ataxia Telangiectasia

研究代表者

高木 正稔 (TAKAGI MASATOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10406267

研究成果の概要（和文）：

毛細血管拡張性小脳失調症では脂肪細胞分化障害があることが明らかとなった。これまで C/EBP α や PPAR γ などの転写因子が脂肪細胞分化に重要であることが報告されているが、今回の研究から、脂肪細胞分化不全の原因として、micro RNA の関与が考えられた。中でも ATM 欠損細胞では mir-B が過剰発現していることが、脂肪細胞の分化に抑制的に働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Ataxia Telangiectasia derived cell exhibited defective adipocyte differentiation machinery. Involvement of transcription factors such as C/EBP α and PPAR γ is known to regulate adipocyte differentiation. In this research, we identified micro RNAs contributes adipocyte differentiation, and defective differentiation was results of microRNAs dysregulation by ATM. Especially, over expression on mir-B in ATM defective cell attenuated adipocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児腫瘍学 T細胞受容体 VDJ再構成 ATM

1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性小脳失調症 Ataxia Telangiectasia (A-T)は小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全、早老症や耐糖能異常を示し、悪性腫瘍を高率に合併する疾患である。責任遺伝子 ATM は DNA 障害で活性化され、DNA 損傷応答機構の上で中心的な役割を担っている。ATM が DNA 損傷応答機構以外にも多くの役割を持っていることは A-T 患者の表現系より強く示唆されるが、中でもインスリン刺激伝達経路で役割を担っていることは我々の研究結果も含め、過去の報告が強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では ATM による脂肪細胞分化調節機構を分子生物学的に明らかにすることを通して、個体の糖代謝における ATM の役割を明らかにする。ATM は DNA 損傷応答機構にかかわる重要な分子である。DNA 損傷応答機構と脂肪細胞分化制御、個体の糖代謝への関連に研究を展開する。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト腎臓由来 293T 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/ml Penicillin /

Streptomycin (P/S) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。ATM^{+/+} 並びに ATM^{-/-} マウス胎児線維芽細胞 MEF はさらに 0.1 mM non-essential amino acids、55 μM 2-mercaptoethanol を添加し培養した。ATM^{+/+} 並びに ATM^{-/-} MEF は p19^{ARF} 欠損細胞である。p19^{ARF} 欠損による脂肪細胞分化能への影響は認められなかった。

In vitro における脂肪細胞への分化誘導

脂肪細胞へ分化誘導するため、増殖の接着阻止が起こるまで培養し、その 2 日後より 5 μg/ml insulin、1 μM dexamethasone、0.5 mM isobutyl methyl xanthine 含有 DMEM にて培養を開始し、2 日毎に培地交換を実施した。

Oil Red O 染色

脂肪細胞における脂肪滴を染色するため、細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し 10% formaldehyde で 30 分間固定した。その後、60% Oil Red O (0.15 g / 50 ml of 2-propanol) で 30 分間染色し、60% 2-propanol で軽く洗浄し、さらに PBS で洗浄後、観察した。

ウェスタンブロット

細胞を PBS で洗浄し、RIPA 緩衝液 (150 mM NaCl、1% NP40、0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]、0.1% sodium deoxycholate、5 mM EDTA、10 mM Tris-HCl, pH 7.4、Protease inhibitor) で溶解した後、SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE の後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、5% スキムミルクでブロッキングを行った。その後一次抗体を反応させ、HRP 結合型抗ラビット抗体または抗マウス抗体および ECL で検出した (GE Healthcare)。一次抗体は C/EBPα (14AA)(Santa Cruz)、α-Tubulin (DM1A)(MERCK) を用いた。

miRNA 発現マイクロアレイ解析

マウスマイクロアレイ発現解析は MicroRNA Expression Profiling Assay (Illumina) を用いて行った。

miRNA 発現解析

miRNA は mir-Vana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて抽出した。逆転写反応は miRNA 特異的プライマー及び TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて実施した。PCR 反応は TaqMan MicroRNA Assays のプライマー並びに TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、LightCycler 480 (Roche) で解析を行った。

プラスミド

マウスのゲノム DNA より miRNA-coding 領域とその前後の flanking 領域を含む約 270-bp を増幅した。プライマーは Table 1 に示す通りである。増幅した PCR 産物を pLKO.1 TRC クローニングベクターの EcoRI/AgeI 部位にサブクローニングした。

4. 研究成果

ATM^{-/-} MEF では脂肪細胞分化が障害される

毛細血管拡張性運動失調症(A-T)患者は低体重、BMI の漸減傾向、脂肪組織の減少を呈することから、A-T における脂肪生成能を検証した。脂肪細胞の機能を明らかにするため、ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF を用いて *in vitro* における脂肪細胞分化誘導実験を行った。MEF を脂肪細胞へと分化誘導すると、ATM^{+/+} MEF においては Oil Red O で染色される脂肪滴の蓄積が認められる一方、ATM^{-/-} MEF では脂肪細胞分化が完全に障害された (図 1)。

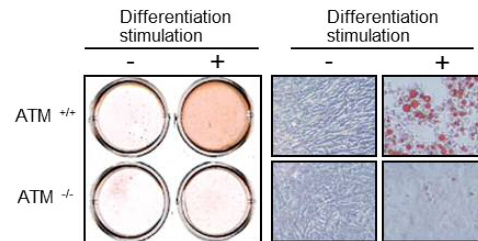


図 1. *in vitro* において ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF の脂肪細胞分化誘導を行い、Oil Red O 染色を実施した。右は左を顕微鏡にて観察したものである。

ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF における miRNA の発現

C/EBPαや PPARγに代表されるような、いくつかの転写因子が脂肪細胞分化を制御していることが知られている。これらの転写因子に加え、miRNA もまた脂肪細胞分化制御に関係していることが知られている。ATM に依存した脂肪細胞分化に関連する miRNA を明らかにするため、脂肪細胞分化誘導前後における ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF における miRNA の発現を調べた。分化誘導前の ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF を比較すると、655 個の miRNA のうち、62 個の miRNA で発現量に 2 倍以上の差が認められ、5 倍以上の差を示す miRNA は 10 個認められた。分化誘導後においては、86 個の miRNA が 2 倍以上の差を呈し、12 個の miRNA で 5 倍以上の差を認めた。この 12 個の miRNA の中より、特に発現量の差が大きいものを 3 つずつ抽出し、さらなる検討を行った (表 1)。

表 1

Name	Fold change
mmu-miR-A	27.3879093
mmu-miR-B	18.9269032
mmu-miR-C	12.17835891
mmu-miR-D	0.1271098
mmu-miR-E	0.0951631
mmu-miR-F	0.0651957

miRNA 発現量の比を示す。miRNA は分化誘導後 4 日目の細胞より抽出した。

マイクロアレイ解析の結果より抽出した miRNA の発現量を確認するため、ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF における成熟 miRNA を特異的に検出するべく、定量性 PCR 法にて検討した。残念ながら miR-C に関しては発現量が極めて低いため、定量性 PCR 法では検出できなかった。定量性 PCR 法では、miR-C を除く全ての miRNA において、マイクロアレイ解析と相関する結果が得られた (図 2)。ATM^{+/+} MEF において、分化誘導後 miR-E の発現低下が認められた。また miR-B は ATM^{+/+} 及び ATM^{-/-} MEF において、分化誘導後の発現増加が認められた。

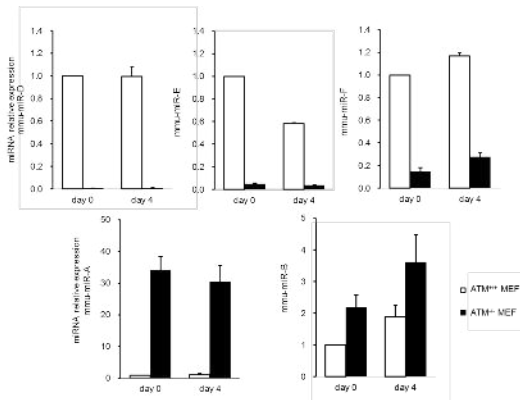


図 2. miRNA の発現量について、マイクロアレイ解析と相関した結果が認められた。

ATM^{-/-} MEF において miR-D、miR-E、miR-F を過剰発現させる

前述の検討により、ATM^{-/-} MEF における脂肪細胞分化の障害は miR-D、miR-E、miR-F の発現が低いことによるものではないかと推察された。そのため、ATM^{-/-} MEF にレンチウイルスを用いて miR-D、miR-E、miR-F を過剰発現させ、これらの miRNA が脂肪細胞分化を回復させるかどうかを検証した。各々の miRNA を発現させた MEF について、定量性 PCR 法を用いて miR-D、miR-E、miR-F の過剰発現を確認した (図 3)。

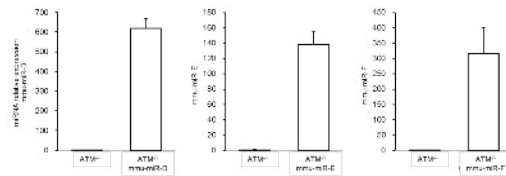


図 3. 各 miRNA を発現させた MEF について、定量性 PCR 法にて miR-D、miR-E、miR-F の発現量を測定した。

次に、miRNA を過剰発現させたこれらの MEF の分化能を Oil Red O 染色並びにウエスタンブロットにて検討した。残念ながら、過剰発現させた miR-D、miR-E、miR-F のいずれも ATM^{-/-} MEF の分化を回復させなかった。さらに脂肪生成において重要な役割を担い、また脂肪細胞分化の指標の 1 つである C/EBP α の発現を確認したところ、これらの miRNA を過剰発現させた細胞では、分化誘導を行っても発現が認められなかった。

ATM^{+/+} MEF において miR-A、miR-B を過剰発現させる

miR-A 及び miR-B は ATM^{-/-} MEF において高発現が認められた。これより、ATM^{+/+} MEF で見られるような適切な脂肪細胞分化が miR-A や miR-B を過剰発現させることで阻害されるのではないかと考えられた。そこで、これらの miRNA が脂肪細胞分化を阻害するかどうかを検証するため、レンチウイルスを用いて miR-A または miR-B を ATM^{+/+} MEF に過剰発現させた。miR-A、miR-B の過剰発現は定量性 PCR 法にて確認した (図 4)。

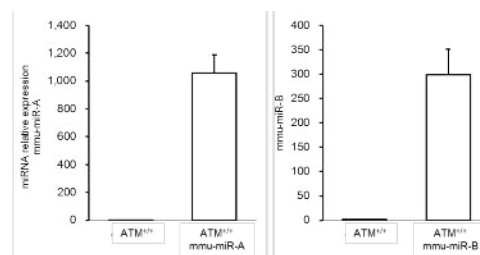
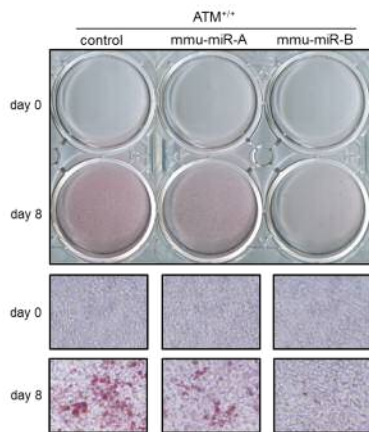


図 4. miRNA を過剰発現させた MEF における、miR-A 及び miR-B の発現量を定量性 PCR 法にて測定した。

先程と同様、これらの細胞を用いて脂肪細胞への分化能を Oil Red O 染色並びにウエスタンブロットにて評価した。興味深いことに、ATM^{+/+} MEF に miR-B を過剰発現させた細胞において脂肪細胞分化の抑制が認められた (図 5a)。また、分化誘導後の C/EBP α の発現も低下していた (図 5b)。

a



b

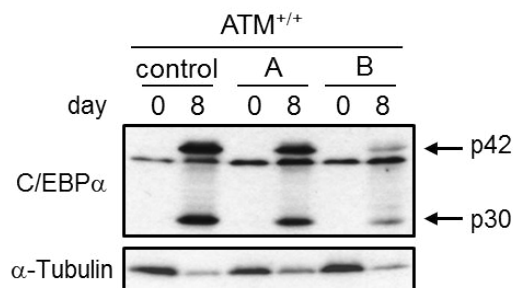


図 5. miR-A、miR-B を過剰発現させた MEF に対し脂肪細胞分化誘導を行った。a: Oil Red O 染色 b: ウェスタンブロット解析

また ATM ノックアウトマウスの表現型の解析を主に行い、microCT を用いた解析から、脂肪細胞分布に異常があることを明らかにし、またグルコースクランプテストを用い、耐糖能異常があることを確認した。また治療法開発のための研究として PARP γ アゴニストである pioglitazon を用い、ATM ノックアウトマウスの耐糖能異常改善を目的とした研究を開始した。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 正稔 (TAKAGI MASATOSHI)

東京医科歯科大学・大学院・講師

研究者番号: 10406267

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: