

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893207

研究課題名(和文) 脂肪細胞分化におけるコケイン症候群原因遺伝子Ercc6の働き

研究課題名(英文) Novel Ercc6 function through the adipocyte differentiation in Cockayne Syndrome

研究代表者

橋本 悟 (hashimoto, satoru)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60352150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：コケイン症候群は紫外線に対するDNA損傷の修復因子に変異を伴う常染色体劣性遺伝病である。その症状は多岐に渡り、出生時に発症している重症例の存在も鑑みて、DNA修復機構の欠損だけでは全ての症状を説明する事が困難な状態である。そこでコケイン症候群原因遺伝子の別の機能として、細胞分化における転写調節機能の有無を、脂肪細胞の分化系を用いて検討した。CRISPR-Cas9によってコケイン症候群遺伝子の一つであるErcc6遺伝子ノックアウトした3T3-L1細胞では、分化誘導因子に対する反応に異常があることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Cockayne syndrome (CS) is a rare autosomal recessive disease with a mutation on DNA repair genes against the UV induced DNA lesions. Since CS has multiple phenotypes, not only the skin disease but also severe growth retardation, the pathophysiological symptoms of CS patients are rather complicated. To explore the new function of CS responding genes, we investigated the adipocytes cell-differentiation experiments using 3T3-L1 cells. Ercc6, one of CS syndrome genes, knockout cells by CRISPR-Cas9 system showed the alteration of cell differentiation to adipocyte upon the inducing factors.

研究分野：転写異常

キーワード：脂肪細胞分化

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は脂肪細胞から構成される結合組織であり、主に皮下及び臓器周辺に分布し、その役割は脂肪の貯蓄、物理的保護、内分泌器官としての働きがある。内臓脂肪型肥満を示すメタボリックシンドロームは、糖尿病、高脂血症、高血圧といった社会的にも問題意識の高い病態と深く関わっており、脂肪組織に関わる病態の研究は、社会的意義の高い研究と考えられる。

コケイン症候群は常染色体劣性遺伝形式を示す神経、発育障害、光線過敏、難聴、網膜色素変性症、齲歯を主体とする全身性疾患であるが、皮下脂肪組織の減少は外見上特徴的な症状の一つである。コケイン症候群に関するこれまでの研究は、その原因遺伝子の主な働きである、紫外線による DNA 障害の修復機構について、その分子機構の解明を主に繊維芽細胞とケラチノサイトを用いて行われてきている。しかしながら紫外線が皮下の臓器に到達する事はなく、コケイン症候群の様々な症状を研究するには、個々の臓器由来の細胞を用いて、原因遺伝子の DNA 修復機構以外の機能を検討する必要がある。

コケイン症候群原因遺伝子の一つである ERCC6 遺伝子は、転写伸長因子としても知られている。また我々は最近、DNA 修復因子が特定の遺伝子の転写開始調節に関わり、この転写調節の異常が神経症状と相関する事を報告した。同様の研究はイタリアおよびフランスのグループと共同で行っており、コケイン症候群を含む、転写に関わる遺伝子異常を認める様々な疾患群に対して、転写異常症候群という新しい分子生物学的診断概念を提唱している。

2. 研究の目的

脂肪組織の量は、前駆細胞から脂肪細胞への分化能に影響されると考えられている。マウス繊維芽細胞 3T3L1 細胞は、3 種類の分化誘導因子 (インスリン、デキサメサゾン、フ

ォスフォジエステラーゼ阻害剤) 処理により効率よく脂肪細胞に分化する。そこで、3T3L1 細胞内でコケイン症候群の原因遺伝子である Ercc6 の発現量を低下させて、脂肪細胞への分化調節に関わる遺伝子群がどのように変化するかを解明しようと発案した。本研究で DNA 修復因子の脂肪組織形成への関わりを転写調節の観点から解明する。

3. 研究の方法

研究は以下の項目の方法にて実施した。

(1) Ercc6 遺伝子枯渇 3T3L1 細胞を作成する。siRNA 法と CRISPR-Cas9 法の 2 方法を行い比較した。

(2) 脂肪細胞分化における形態学的変化を観察する。3 種類の分化誘導因子 (インスリン、デキサメサゾン、フォスフォジエステラーゼ阻害剤) 処理を行った後、位相差顕微鏡下の観察とオイルレッド O 染色によって観察した。

(3) 脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現パターン変化を同定する。脂肪細胞分化開始後、経時的に総 RNA を細胞から抽出し、逆転写産物を用いて、特定の遺伝子の発現量を定量的 PCR を行い測定した。

(4) Ercc6 遺伝子の脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現への働きを解明する。脂肪細胞分化過程で Ercc6 蛋白質の DNA 上における局在を、クロマチン免疫沈降法を用いて同定する。

4. 研究成果

本研究を進めるにあたり、まず Ercc6 遺伝子枯渇 3T3L1 細胞の作成から始めた。研究計画当初、siRNA を用いた方法を行ったが、十分な Ercc6 発現量の抑制が得られなかった。

そこで、近年普及してきた新しい遺伝子改変技術である CRISPR-Cas9 を用いることにした。Ercc6 遺伝子の翻訳開始点下流にターゲット RNA を設定し、Cas9 発現コンストラクトを作成した。3T3L1 細胞へのトランスフェクションはエレクトロポレーション法を使用した。GFP 発現プラスミドを用いて、3T3L1 細胞への導入条件を決定した後、Ercc6 を標的とした CRISPR-Cas9 コンストラクトを 3T3L1 細胞に導入した。導入後 48 時間の時点で、MultiNA を用いてゲノム DNA の切断効率を確認した。その後、コンストラクトを導入した細胞から、限界希釈法にてサブクローニングを行った。得られた複数のクローン中の Ercc6 蛋白質の発現量を、ウェスタンブロットで確認し、Ercc6 が完全に枯渇した 3T3L1 細胞の作成に成功した。

次に、作成した Ercc6 枯渇 3T3L1 細胞と野生型 3T3L1 細胞を用いて、脂肪細胞への分化誘導を行い、形態学的変化を観察した。インスリン、デキサメサゾン、フォスフォジエステラーゼ阻害剤による分化誘導開始後、8 日目にパラフォルムアルデヒドにて細胞を固定し、オイルレッド O で染色した。野生型 3T3L1 細胞では、ほとんどの細胞が赤色の色素により染まり、脂肪細胞への分化が確認された。一方で Ercc6 枯渇細胞では赤色の色素に染まる細胞をほとんど認めず、脂肪細胞への分化に異常があることを確認した。

3T3L1 細胞が成熟脂肪細胞に分化するまでにはおよそ 8 日間要することが知られているが、分化開始誘導直後から様々な遺伝子発現が連鎖的に誘導されている。Ercc6 枯渇 3T3L1 細胞の形態学的変化が、分化誘導直後からほとんど認められないことより、分化過程の早期 (0-2 日) に着目して、遺伝子発現パターンの変化を確認することにした。現在 Ercc6 枯渇 3T3L1 細胞と野生型 3T3L1 細胞における Irs-1, Irs-2, Ebp beta, Ebp delta といった脂肪細胞分化初期に発現している分

化制御因子遺伝子の発現量を、定量的 PCR 法を用いて比較確認している。また同時に、これらの遺伝子プロモーター上での Ercc6 蛋白質の動態を確認するためにクロマチン免疫沈降法を経時的に行っている。さらに、Ercc6 蛋白質の詳細な作用機序を明らかにするために、プロテオミクスを用いた複合体の解析、マイクロアレイ、ChIP シークエンス法の準備を進めている。

脂肪細胞の減少は、外見上の問題だけではなく、脂肪細胞から分泌される様々な因子によるインスリン抵抗性の変化等、脂質、糖質代謝への影響も考えられる。今後これらの解析が進むことにより、コケイン症候群だけではなく、様々な代謝異常疾患の病態解明並びに治療開発に繋がることが期待される。

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：
出願年月日：
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

橋本 悟 (HASHIMOTO SATORU)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60352150

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：