

氏 名	福 家 智 也
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 1 2 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 2 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Transcription factor AP-2 β inhibits expression and secretion of leptin, an insulin-sensitizing hormone, in 3T3-L1 adipocytes (転写因子 AP-2 β は、3T3-L1 脂肪細胞において、インスリン感受性ホルモンであるレプチンの発現・分泌を抑制する)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 村 上 節 副 査 教 授 佐 藤 浩

論文内容要旨

※整理番号	617	(ふりがな) 氏名	(ふけともや) 福家 智也
学位論文題目	<p>Transcription factor AP-2β inhibits expression and secretion of leptin, an insulin-sensitizing hormone, in 3T3-L1 adipocytes. (転写因子 AP-2βは、3T3-L1 脂肪細胞において、インスリン感受性ホルモンであるレプチンの発現・分泌を抑制する)</p>		
<p>【目的】 脂肪組織は種々のホルモンやサイトカイン（アディポカイン）を分泌する内分泌臓器であり、脂肪細胞の肥大化などによりその分泌の質および量が増加することが報告されている。我々は、Single Nucleotide Polymorphism を用いた Genome Wide Association Study により転写因子 (TFAP2B) の遺伝子座が肥満 2 型糖尿病の発症と関連することを見出し、本転写因子が脂肪組織に発現すること、培養脂肪細胞の分化に伴いその発現が増加することを報告した。また、ヒト生検脂肪組織を用いた検討により、皮下脂肪組織でのレプチン mRNA 発現量が血中レプチン濃度と正相関し、一方、TFAP2B 発現量と負に相関することが明らかとなった (Ugi S. et. al. obesity in press)。レプチンは脂肪細胞から特異的に分泌され強力な節食抑制やエネルギー消費亢進をもたらすホルモンで、さらにインスリン感受性を増強することから、その作用不足はインスリン抵抗性の成因に重要な役割を有すると考えられる。そこで、転写因子 TFAP2B (マウスでは AP-2β) が脂肪細胞におけるレプチンの発現調節にいかに関与するかについて、その分子機構を検討した。</p> <p>【方法】 培養 3T3-L1 脂肪細胞に転写因子 AP-2β を過剰発現させ、レプチン mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法で、細胞内蛋白発現量を Western Blot 法で、また分泌蛋白量を酵素免疫吸着測定法で定量した。AP-2β が転写因子として直接レプチンのプロモーター領域に作用している可能性を想定し、reporter assay で評価した。過剰発現下だけではなく平常状態で内因性 AP-2β が作用していることを確認するため、AP-2β を RNA 干渉にて knock down させ、内因性 AP-2β の役割を検討した。</p> <p>次に、レプチン遺伝子のプロモーター領域内に、AP-2β 応答領域と consensus 配列が一致する領域を 3 箇所認めたため、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で <i>in vitro</i> での結合を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で <i>in vivo</i> での結合を確認した。同定し得た AP-2β の応答領域に対して点突然変異体を作成し、AP-2β 過剰発現による影響の違いを reporter assay で確認した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

【結 果】

培養 3T3-L1 脂肪細胞に転写因子 AP-2 β を過剰発現させると、レプチンの mRNA 発現量、細胞内蛋白量、分泌蛋白量が減少した。これらの現象は脂肪細胞のサイズが変化する以前に、AP-2 β 遺伝子発現量依存的に認められており、脂肪細胞のサイズが大きくなったことによる二次的な変化でないことが確認できた。RNA 干渉による AP-2 β の knock down では、レプチンはその mRNA 発現量および細胞内蛋白量がともに増加した。一方、reporter assay では AP-2 β 発現量依存性にレプチンのプロモーター活性が減少した。

レプチン遺伝子のプロモーター領域内の AP-2 β 応答候補領域を同定する目的で、3箇所候補部位に対応するオリゴヌクレオチドを用いて EMSA を行ったところ、遠位部及び中間部候補領域には AP-2 β は結合するものの、その結合は非常に弱く、近位部候補領域（転写開始点より +34~+42 塩基の配列）に強い結合を認めた。同応答領域に対する ChIP assay では AP-2 β 容量依存性に *in vivo* での結合が確認された。さらに同応答領域に点突然変異を導入したベクターを用いた検討では、AP-2 β 過剰発現によるレプチンプロモーター活性の抑制作用は消失した。

【考 察】

本研究により、転写因子 AP-2 β は 3T3-L1 脂肪細胞において、レプチン遺伝子の発現を負に調節することが示された。その調節は、AP-2 β がレプチン遺伝子のプロモーター領域に直接結合することにより、転写レベルで発現を抑制していることが判明した。

我々は、転写因子 AP-2 β が脂肪細胞においてインスリン感受性増強に関わるアディポネクチンの量的分泌調節に関与していることを報告し、今回、レプチンの量的分泌調節にも関与していることを見出した。これらの成績から AP-2 β の発現量やその活性を制御することにより、これらのアディポカイン分泌を増加させる治療が可能になれば、インスリン抵抗性を改善し、糖尿病の発症予防やその進展阻止の治療に応用できるものと考えられる。

【結 語・新知見】

転写因子 AP-2 β は、レプチン遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、レプチン遺伝子発現を転写レベルで抑制することを新たに明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	617	氏名	福家智也
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>転写因子 AP-2β 遺伝子座 (<i>TFAP2B</i>) は肥満 2 型糖尿病の発症に関連する。一方、脂肪組織での <i>TFAP2B</i> 発現量はレプチン mRNA 発現や血中レプチン濃度と負に相関する。脂肪細胞から分泌されるレプチンは摂食抑制作用やエネルギー代謝亢進作用を示すホルモンであり、またインスリン感受性を増強するので、レプチンの作用不足はインスリン抵抗性の要因の一つになりうる。</p> <p>そこで本研究では、脂肪細胞において AP-2β がレプチンの発現調節にどのように関与するのかを検討した。その結果、培養脂肪細胞に本転写因子を過剰発現させると、この転写因子はレプチン遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、レプチンの発現を転写レベルで抑制することを明らかにした。</p> <p>このように本論文は、転写因子 AP-2β の発現や活性の制御による、インスリン抵抗性の改善や糖尿病の予防・治療の可能性を示した。よって本論文は博士 (医学) の学位論文に値する。</p> <p>なお申請者は最終試験として論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 22 年 / 月 28 日)			