九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Dehydroepiandrosterone-enhanced dual specificity protein phosphatase (DDSP) prevents diet-induced and genetic obesity

渡邉, 哲博

https://hdl.handle.net/2324/1654982

出版情報：九州大学, 2015, 博士（医学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名：渡　邉　哲　博

論 文 名：Dehydroepiandrosterone-enhanced dual specificity protein phosphatase (DDSP) prevents diet-induced and genetic obesity
(Dehydroepiandrosterone-enhanced dual specificity protein phosphatase は、食餌性および遺伝性肥満を防ぐ)

区　　分：乙

論　文　内　容　の　要　旨

Dehydroepiandrosterone(DHEA)は、糖尿病や肥満といった病気に対して様々な治療効果をもたらす。しかしながら、DHEA の分子作用機序については不明である。以前、我々の研究室では DHEA-enhanced dual specificity protein phosphatase(DDSP と命名)が、DHEA の標的分子の一つであることを報告した。DHEA シグナル伝達における DDSP の役割を調べるため、私は CAG プロモーターによって誘導発現される *DDSP* 組換え遺伝子をもったトランスジェニック(*DDSP-Tg*)マウスを作製した。サザンブロット法で、6 匹の *DDSP* 組換え遺伝子を発現するマウスを同定した。6 匹のマウスのうち 3 匹は *DDSP* が 1 コピーより多く入っており、正常の成長と外見であったが子孫ができないことが判明した。このことは *DDSP* 組換え遺伝子は配偶子形成に影響することを示唆した。*DDSP* 組換え遺伝子を 1 コピー保有した 3 匹の *DDSP-Tg* マウスには子孫が生まれ、3 種類の *DDSP-Tg* マウスの樹立に成功した。これらの 3 種類のマウスは、いずれも成長や形態に異常を認めなかった。ノーザンブロット法を用いた検討では、*DDSP-Tg* マウスは DDSP mRNA を脂肪組織や筋組織を含めて全ての臓器で発現していた。次に、*DDSP-Tg* マウスの 12.5 日齢の胚からマウス胚線維芽細胞を作製した。ルシフェラーゼレポーター解析法(PathDetect in vivo signal transduction pathway transreporting system)を用いて、マウス胚線維芽細胞における p38 活性の評価を行った。プレートにマウス胚線維芽細胞をまき、48 時間後にルシフェラーゼレポーターコンストラクトを同時形質導入し、さらに 24 時間後に一部のセルは 500nM のソルビトールを含んだ培養液で 15 分間高浸透圧処理を行い、その後、細胞を溶解し LUMAT LB9507 luminometer を用いてルシフェラーゼ解析を行った。野生型マウスの胚より作製したマウス胚線維芽細胞(WT-MEF) は、ソルビトール刺激によって p38 活性は約 3 倍に増加していたが、*DDSP-Tg* マウスより作製したマウス胚線維芽細胞(DDSP-MEF)では、WT-MEF に比べて p38 活性の増加は有意に小さく($P<0.01$)、DDSP-MEF で p38 活性が抑制されていることが示唆された。DDSP の抗肥満作用を検討するためマウスの体重測定を行ったところ、*DDSP-Tg* マウスは、普通食下では野生型マウスと同等であったが、高脂肪食下では 13 週齢以降のいずれの時点においても有意に低体重であった($P<0.05$)。14 週齢において、*DDSP-Tg* マウスと野生型マウスとで食餌摂取量に有意差を認めなかった。15 週齢において、Letica infrared system を用いて自発的な運動量について比較検討したが、*DDSP-Tg* マウスと野生型マウスで運動量に有意差を認めなかった。15 週齢において、Oxymax opencircuit indirect calorimetry system を用いて酸素消費量を検討したところ、*DDSP-Tg* マウスは野生型マウスに比べ有意に酸素消費量が多く($P<0.01$)、*DDSP-Tg* マウスでは基礎代謝量が増加していることが示唆された。次に、基礎代謝量を増加させる基礎的な機序を解明

するために、褐色脂肪組織、白色脂肪組織、筋肉組織における熱産生や脂質代謝に関連する様々な遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討した。22 週齢のマウスの各臓器から RNA を抽出し、ランダムプライマーを混和した後に SuperScriptⅢ逆転写酵素を用いて 3μg の total RNA を逆転写させ、その後、LightCycler を用いたリアルタイム PCR で解析を行った。この解析の結果、*DDSP-Tg* マウスの筋組織では、野生型マウスに比べ熱産生因子である peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator1α(*Pgc1α*)の発現量が有意に増加していた(P<0.01)。また、*DDSP-Tg* マウスの白色脂肪組織では、野生型マウスに比べ uncoupling protein2(*Ucp2*)発現量は約 2 倍に増加(P<0.01)し、脂肪分解遺伝子である β3-adrenergic receptor(*β3-AdR*)と脂肪酸 β 酸化のマーカーである carnitine palmitoyltransferase1(*Cpt1*)の発現量が有意に高値(P<0.01)で、diacylglycerol acyltransferase 2(*DGAT2*)の発現量が有意に低値(P<0.01)であった。以上の結果より、白色脂肪組織における脂肪分解の増加と脂肪合成の低下が示され、少なくとも *DDSP-Tg* マウスの肥満改善効果の一部分の説明となることが示唆された。さらに、遺伝性肥満マウスにおける DDSP の役割を調べるため、*db/db* の遺伝子変異を持った *DDSP-Tg*(*DDSP-Tg db/db*)マウスを作製した。*DDSP-Tg db/db* マウスは、6～9 週齢のいずれの時点においても、*db/db* マウスに比べ有意に低体重であり(P<0.01)、9 週齢においては *DDSP-Tg* マウスに比べても低体重であった(P<0.05)。*db/db* マウスと *DDSP-Tg db/db* マウスを比較したところ、肝臓・腎臓・心臓・骨格筋の重量に有意差はなかったが、内臓および皮下の白色脂肪組織重量が *DDSP-Tg* マウスで著明に減少していた。6 週齢における糖負荷試験では、*db/db* マウスおよび *DDSP-Tg db/db* マウスのいずれも重度の耐糖能異常を示した。9 週齢における *DDSP-Tg db/db* マウスの空腹時血糖値および血清インスリン濃度は、*db/db* マウスと同程度であった。したがって、*DDSP-Tg db/db* マウスでは、*db/db* マウスで認める肥満は完全に消失したが、インスリン感受性は改善していないことが明らかとなった。*DDSP-Tg db/db* マウスは、9 週齢以降に悪液質となり、12 週齢前後で致死となった。肉眼解剖では内臓に明らかな異常は認められなかったが、*DDSP-Tg db/db* マウスでは、食餌摂取量の減少と著明な脱水症を認め、これらが致死の原因と思われた。結論として、DDSP の発現が食餌性および遺伝性(*db/db*)肥満を防ぐことにつながることが我々の研究で明らかとなった。DHEA の抗肥満効果が DDSP を介したものである可能性があり、肥満治療の治療標的となりうることが示唆された。