

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪細胞分化における新規制御因子 **Tob2** の機能解析

(Functional analysis of Tob2 in the regulation of adipocyte differentiation)

氏名 高橋 明格

肥満は体内に脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義され、糖尿病・高血圧・血管疾患・うつ・癌など多くの生活習慣病に繋がる危険因子である。近年は、日本においても、食の欧米化に起因する肥満が急激に増加しており、新規抗肥満薬の創製は急務とされる。白色脂肪組織は体内の余剰な脂肪をトリグリセリドの形で蓄積する組織である。また、白色脂肪組織は、内分泌組織としても機能し、アディポカインと呼ばれるホルモンを分泌する。アディポカインは主に脳、肝臓、膵臓、脂肪細胞で作用し、エネルギー代謝を制御する。肥満は脂肪組織の生理学的機能が破綻した状態であり、グルコースや脂肪の血中濃度を制御する機構が無秩序になった状態である。脂肪細胞分化は、脂肪組織形成を促進する過程の1つであり、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) と CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ファミリーをはじめとする転写因子のカスケード反応により緻密に制御されている。概略としては、脂肪細胞分化誘導刺激直後、はじめに、転写因子 C/EBP β と C/EBP δ の発現が上昇する。この2つの転写因子の発現上昇は、転写因子 C/EBP α や PPAR γ の発現を誘導する。C/EBP α と PPAR γ は成熟脂肪細胞の性質獲得に必須である

脂肪合成因子やアディポカインの遺伝子発現を誘起する。骨形態形成因子(BMPs)と Smad 蛋白質は、骨形成を促進する機能が広く知られている。さらに、近年の研究では、BMP シグナル経路の活性化が脂肪細胞分化を亢進すること、肥満もしくはメタボリックシンドロームを呈した人の白色脂肪組織においては、BMP 受容体の発現量が上昇していることが明らかになってきた。これらの知見は、BMP/Smad シグナル経路が脂肪組織形成・脂肪細胞分化を制御することを示唆しているが、その正確な分子機構は分かっていない。Tob/BTG ファミリーは、Tob、Tob2、BTG1、BTG2、ANA/BTG3、BTG4 の6つの構成因子からなり、主に、癌化・骨形成を制御することが知られている。また、Tob/BTG ファミリーは、BMP/Smad シグナル経路の調節因子として知られている。Tob と ANA/BTG3 は Smad 蛋白質との結合を介して、BMP/Smad シグナル経路を抑制する。そのため、Tob や ANA/BTG3 は骨芽細胞の分化・増殖を阻害し、骨形成を負に制御する。反対に、BTG2 は BMP シグナル経路を活性化し、脊椎パターン形成を制御する。しかしながら、Tob/BTG ファミリーの脂肪組織形成ならびに脂肪細胞分化への関与は明らかでない。本研究では、Tob/BTG ファミリーの構成因子である Tob2 が BMP/Smad シグナル経路の阻害を介して、脂肪細胞分化を抑制することを示した。

私は、高脂肪食および通常食を負荷したマウスの白色脂肪組織における遺伝子発現プロファイルを解析している中で、Tob/BTG ファミリーの構成因子のうち3つの遺伝子(*tob*、*tob2*、*ana/btg3*)の発現量が、高脂肪食負荷マウスにおいて、1.5～2倍減少していることを見いだした。このデータを検証するため、通常食および高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織における Tob/BTG ファミリーの発現量を定量的リアルタイム PCR 法とウェスタンブロッティング法により調べた。この結果、高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織において、Tob2 と ANA/BTG3 の発現量が顕著に減少していることを確認した。さらに、食欲抑制遺伝子であるレプチンを欠損した肥満モデルマウス *ob/ob* マウスの白色脂肪組織においても、*tob2* の発現量の減少がみられた。これらの結果は、Tob2 の機能と肥満との関連性を示唆する。そこで、*tob2* 欠損マウスを用いて、エネルギー恒常性・肥満における Tob2 の役割を調べた。その結果、通常食負荷条件下では、*tob2* 欠損マウスの体

重・組織重量・血中グルコース濃度等の代謝パラメーターには異常がないことが分かった。高脂肪食負荷条件下においても、体重・インスリン感受性・グルコース耐性・血中グルコース濃度は *tob2* 欠損マウスと野生型マウスで差がなかったが、興味深いことに、*tob2* 欠損では脂肪肝の改善ならびに白色脂肪組織の肥大化がみられた。また、この *tob2* 欠損マウスの肥大化した脂肪組織では、脂肪細胞の面積の増加がみられ、*Pparg1* と *Pparg2* の発現の上昇がみられた。さらに、PPAR γ の標的遺伝子であり、成熟脂肪細胞の機能に必須である遺伝子群 *Fabp4*, *Lpl*, *Fasn*, *Adiponectin*, *Resistin*, *Leptin* の発現の増加がみられた。これらの結果より、*tob2* 欠損マウスの白色脂肪組織において、脂肪細胞分化が亢進していることが強く示唆された。そこで、Tob2 の脂肪細胞分化への関与を調べた。野生型および *tob2* 欠損マウスより単離した初代培養白色脂肪前駆細胞を BMP2 を含む脂肪細胞分化誘導培地で刺激し、分化誘導を行った。この結果、*tob2* 欠損細胞において脂肪蓄積の亢進がみられ、PPAR γ 2 の発現が転写レベルで増加していた。さらに、レトロウイルス感染システムを用いて、3T3-L1 脂肪前駆細胞から *tob2* 遺伝子をノックダウンした細胞株ならびに *tob2* を過剰発現させた細胞株を樹立し、それらの成熟脂肪細胞への分化誘導能を、コントロール細胞株と比較した。その結果、*tob2* ノックダウン細胞株では、脂肪蓄積が亢進し、また PPAR γ 2 の発現が上昇していることが分かった。反対に、*tob2* 過剰発現細胞株では、脂肪蓄積の低下がみられ、PPAR γ 2 の発現が転写レベルで減少していた。以上より、Tob2 は PPAR γ 2 の発現を転写レベルで抑制することにより脂肪細胞分化を負に制御することが示された。Tob/BTG ファミリーは Smad 蛋白質と結合を介し、BMP シグナル経路を調節する。また、BMP シグナル経路の活性化は脂肪組織形成・脂肪細胞分化を促進する。これらの知見より、私は、Tob2 が BMP シグナル経路を負に調節し、脂肪細胞分化を抑制するという仮説をたてた。実際に、Tob2 は Smad1, 4, 5, 6, 7, 8 と結合し、また、脂肪細胞分化誘導後、*tob2* ノックダウン 3T3-L1 細胞株では、BMP2 刺激により誘導される Smad1/5 のリン酸化が亢進していた。さらに、高脂肪食負荷条件下、*tob2* 欠損マウスでは、BMP 受容体遺伝子 *Bmpr1a* の発現量の増加が見られた。Smad6 は BMP シグナル経路の抑制因子であり、脂肪細胞分化を抑制することが知られている。また、Tob2 は Smad 蛋白質の中でも Smad6 と強く結合することから、私は、Tob2 が Smad6 と協調的に

BMP シグナル経路を阻害しているのではないかと考えた。そして、*PPAR γ 2* のプロモーター活性に *Tob2* と *Smad6* が与える影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた結果、*Tob2* と *Smad6* は相乗的に *PPAR γ 2* の転写活性を阻害していることを明らかにした。以上より、脂肪細胞分化過程において、*Tob2* は BMP/*Smad* シグナル経路を *Smad6* と協調的に阻害していることが示された。BMP 刺激の下流において、*C/EBP α* は *PPAR γ 2* プロモーター上で *Smad1/4* と複合体を形成し、協調的に *PPAR γ 2* の発現を誘導する。*Tob2* が *Smad1/4* と結合することから、私は、*Tob2* は *C/EBP α* とも結合することで *PPAR γ 2* の発現を調節しているのではないかと考えて解析を進め、*Tob2* が *C/EBP α* と結合し、核内で共局在していることを明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いて、成熟脂肪細胞における *PPAR γ 2* プロモーター上の *C/EBP α* の占有率に *Tob2* が与える影響を調べた。この結果、*tob2* 欠損細胞において、*C/EBP α* の *PPAR γ 2* プロモーターへの結合の増加がみられ、反対に、*tob2* 過剰発現 3T3-L1 細胞株では、*C/EBP α* の *PPAR γ 2* プロモーターへの結合の減少がみられた。つまり、*Tob2* は *C/EBP α* の *PPAR γ 2* プロモーター上への結合を阻害することが示された。以上より、*Tob2* は、BMP/*Smad* シグナル経路と *C/EBP α* による *PPAR γ 2* の転写活性化の阻害を介して、*PPAR γ 2* の発現を抑制することにより、脂肪細胞分化を負に調節する新規制御因子であることが示された。

本研究は、*Tob2* の脂肪組織形成における新規機能を明らかにしたものである。*Tob2* は富栄養条件で自身の発現量を減らすことから、栄養条件に応答して白色脂肪組織形成を制御していると考えられた。*Tob2* は通常食条件に代表される体内のエネルギーの消費と取り込みのバランスが均等に近い条件を感知し、脂肪細胞分化を阻害することで、脂肪組織の大きさを規定し、ホメオスタシスの維持に関与しているのかもしれない。さらに、*Tob2* が BMP シグナル経路を阻害し、脂肪組織形成過程を抑制することは、これまでの BMP シグナル経路の活性化による脂肪組織の肥大化を示した知見を強く裏付けるものである。脂肪組織特異的に *Tob2* を標的としたアプローチは、新規抗肥満薬の創製に繋がるものと考えられる。