

トピックス

OLETFラット内臓脂肪組織に発現する遺伝子の同定

岡山大学医学部第三内科

和田 淳, 肥田 和之, 四方 賢一, 横野 博史

内臓脂肪組織とマルチプル リスクファクター症候群

肥満は「生活習慣病」の根幹をなす中心的な病態であり、特に内臓脂肪蓄積型肥満は皮下脂肪蓄積型肥満に比べ耐糖能異常・高血圧・高脂血症を来しやすく、疫学調査からも、心筋梗塞・狭心症・脳梗塞といった動脈硬化性疾患の合併頻度が高いことが明らかとなっている。内臓脂肪蓄積型肥満には、根底にインスリン抵抗性があり、それにともなって糖尿病・高血圧・高脂血症など動脈硬化の危険因子となる疾患群が集積する。よって、この病態を総称して大阪大学松澤らは内臓脂肪症候群の概念を唱えた¹⁾。

さらにこの疫学的知見に加え、脂肪細胞の分子生物学の進歩により、内臓脂肪組織は単に受動的な脂肪の蓄積臓器ではなく、さまざまな生理活性を有する分泌蛋白を産生する内分泌臓器として注目されており、これらの分泌蛋白を松澤らはadipocytokineと呼ぶことを提唱している。この分泌蛋白群は内臓脂肪組織の蓄積、インスリン抵抗性、さらには動脈硬化などの血管合併症の進展に深く関係していると推察される²⁾。

脂肪組織特異的発現遺伝子の クローニング

この2つの概念の提出は、脂肪細胞

の分子生物学の分野に大きなパラダイムシフトをもたらし、多くの研究者が脂肪細胞特異的さらには内臓脂肪特異的遺伝子の同定にかりたてた。まず多くの研究者が検討したのは、3T3L1細胞を脂肪細胞に分化させ、その際発現が変化してくる遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法などによりクローニングする方法である。またこの系にシグナルシークエンストラップ法などを応用し、シグナルペプチドを有する蛋白をスクリーニングする方法も用いられている。ただし現在のところ内臓脂肪細胞特異的マーカーが存在しないため、このような培養系が皮下脂肪あるいは内臓脂肪のどちらの形質に近いかは不明である。松澤らは、ヒトの皮下脂肪や内臓脂肪組織のライブラリーを構築し、1000個以上の大規模シークエンスを行うことにより、遺伝子発現プロファイルを検討した。その過程でヒト脂肪細胞特異的分泌蛋白であるadiponectinのクローニングに成功し、動脈硬化への関与も明らかになってきている³⁾。

しかしこのような試みにもかかわらず、内臓脂肪組織に特異的に発現する遺伝子は同定されてこなかった。われわれは、以前より糖尿病細小血管障害としての糖尿病性腎症の分子メカニズムを検討するために、representational difference analysis of cDNAと呼ばれるPCR(Polymerase chain reaction)

法をその原理としたサブトラクションスクリーニングを用いてきた⁴⁻⁷⁾。この研究の過程で、本方法が特異性にすぐれ、false positive cloneを単離する割合がディファレンシャルディスプレイ法に比較してはるかに少ないことを実感した。サブトラクションの最終産物を無作為にサブクローニングし、100個前後のクローンをスクリーニングすれば、ノーザン解析でその発現が確認される遺伝子を10~20個ほど得ることができる。

OLETFラット内臓脂肪組織 特異的遺伝子の探索

われわれはこの方法を応用する系としてOLETFラットを選んだ。OLETFラットは内臓脂肪蓄積を来し、糖尿病・高血圧・高トリグリセライド血症を合併することが多くの研究者の検討により明らかとなっている。また食事制限や運動負荷により、糖尿病の発症が遅延し改善することも知られている。雄性OLETFラットのインスリン濃度は、生後8週ころからコントロールであり、糖尿病抵抗性のLETOラットに比べ高値となり、25週の経口ブドウ糖負荷試験でほぼ全例が糖尿病と診断され、60週を過ぎるとインスリン分泌は低下する。内臓蓄積型肥満を来した24週齢のOLETFラットと内臓脂肪の蓄積をまだ認めない8週齢のLETOラットの内臓脂肪組織より、塩化セシウムによる超遠心法にてRNAを抽出し遺伝子サブトラクションを行った。その最終産物をサブクローニングし、約100個のクローンを無作為に選択した。遺伝子配列を決定して整理した後、ノーザン解析によりその遺伝子が実際に肥満OLETFラットの内臓脂肪組織において発現が上昇しているかどうかを確認した。その結果、

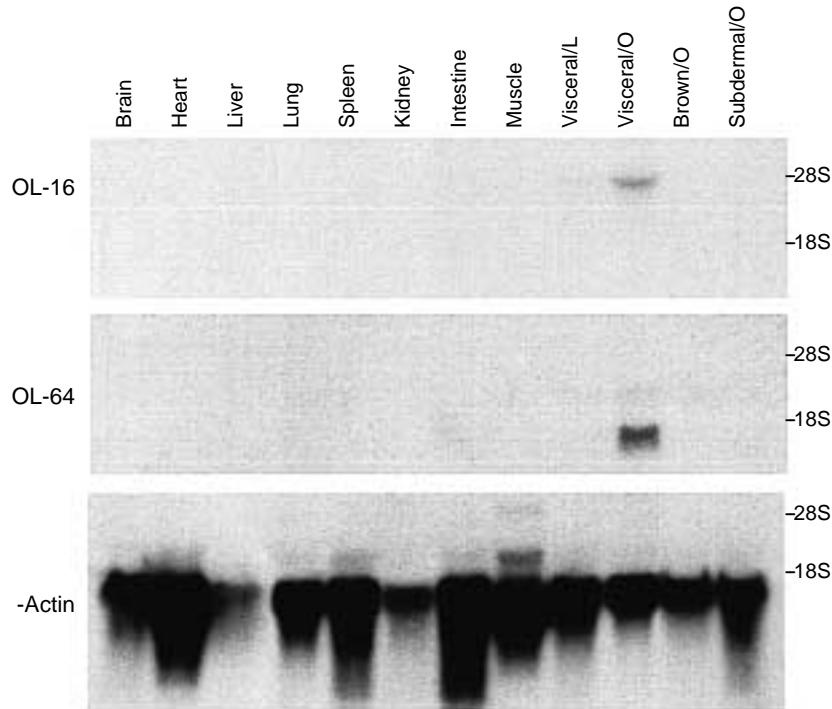


図 クローニングされた新規遺伝子のノーザン解析

新規遺伝子OL-16とOL-64の組織分布を示す。8週齢LETOラット内臓脂肪 (Visceral/L), 24週齢OLETFラット内臓脂肪 (Visceral/O), 24週齢OLETFラット褐色脂肪 (Brown/O), 24週齢OLETFラット皮下脂肪 (Subdermal/O), その他の臓器は24週齢OLETFラットから得た。

11個の既知の遺伝子群と、3個の未知遺伝子群の発現が上昇していることを確認した⁸⁾。さらに、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、非脂肪組織 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋) でノーザン解析を施行した。その結果、既知の遺伝子のうち thrombospondin-1, contrapsin-like protease inhibitor, osteoactivin, 未知の遺伝子のうち OL-16, OL-38, OL-64の計6個の遺伝子群は、肥満を来したOLETFラットの内臓脂肪に発現していたが、肥満を来していないLETOラットの内臓脂肪には全く発現を認めなかった。さらに contrapsin-like protease inhibitor, OL-16, OL-64はその他の脂肪組織・非脂肪組織においても全く発現を認めず、OLETFラットにおいては内臓脂肪組織特異的な遺伝子であると考えられた (図)。

現在、OL-16, OL-64の全長cDNAク

ローニングを行いつつあるが、OL-16はシグナルペプチドを有する一回膜貫通型の膜蛋白であり、OL-64はシグナルペプチドを有する分泌蛋白である。これら遺伝子が内臓脂肪特異的な遺伝子であることをさらに確認するためには、ノーザン解析の他に胎児マウスなどを使った *in situ* hybridizationが必要である。またOLETFラットのみならず、その他の肥満マウス、肥満ラット、さらにヒトでも内臓脂肪組織の蓄積にともなって発現してくるのか、3T3L1細胞の分化の過程でどのように発現が変化するかについても今後検討する必要がある。これらのことが確認されれば、これらの遺伝子は内臓脂肪細胞の特異的なマーカーとして有用であるのみならず、内臓脂肪蓄積の分子機序、動脈硬化の分子機序が明らかになってくるものと思われる。

文献

- 1) Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T : Molecular mechanism of metabolic syndrome X : Contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 892 : 146-154.
- 2) Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, et al. : Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 1999, 38 : 202-206.
- 3) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20 : 1595-1599.
- 4) Wada J, Kumar A, Ota K, et al. : Representational difference analysis of cDNA of genes expressed in embryonic kidney. *Kidney Int* 1997, 51 : 1629-1638.
- 5) Wada J and Kanwar YS : Charac-

- terization of mammalian translocase of inner mitochondrial membrane (Tim44) isolated from diabetic mouse kidney. Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, 144-149.
- 6) Zhang H, Wada J, Kanwar YS et al. : Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. Kidney Int 1999, 56 : 549-558.
- 7) Yang Q, Dixit B, Wada J, et al. : Identification of a renal-specific oxido-reductase in newborn diabetic mice. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97 : 9896-9901.
- 8) Hida K, Wada J, Zhang H, et al. : Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. J Lipid Res 2000, 41 : 1615-1622.