

トピックス

チアゾリジンによる新たなレプチン発現制御機構の解析

群馬大学医学部第一内科

佐藤 哲郎, 森 昌朋

近年, 脂肪組織が単なるエネルギー貯蔵庫ではなく, 種々のサイトカインやホルモンを分泌し, これらのアディポカインが生活習慣病である肥満症における2型糖尿病, 冠動脈疾患や脂質代謝異常などの病態に深く関与していることが明らかとなりつつある. ホルモン刺激により線維芽細胞から脂肪細胞へと分化する3T3-L1細胞などの培養細胞株を用いた研究から, 脂肪細胞の分化, 増殖に関する種々の知見が累積している. 脂肪細胞分化の過程では多数の転写因子が協調的に発現機能し, そのなかでもbasic-leucine zipper型転写因子であるCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) と核内受容体であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) が重要な役割を演ずることが判明している.

アディポカインの1つであるレプチンは, 遺伝性肥満マウス (*ob/ob* mouse) の病因遺伝子として1994年にクローニングされた. レプチンは脂肪細胞に強く発現し, 中枢神経系, 特に視床下部に発現するレプチン受容体に結合して神経伝達物質の発現を制御することによって, 生体において摂食とエネルギー消費を調節する. 血中レプチンレベルは体脂肪量と相関し, その発現は摂食やインスリン, グルココルチコイドによって増強される. 一方, 絶食や α -adrenergic刺激に加えて, 2型糖尿病治療薬であり, PPAR の合成リ

ガンドであるチアゾリジン系薬剤 (TZD) が *in vivo* ならびに *in vitro* においてレプチン遺伝子発現を転写レベルで抑制することが明らかとなっている. Hollenbergらは, TZDによるレプチン遺伝子転写抑制はC/EBP と PPAR の何らかのfunctional antagonismによって惹起されると報告している¹⁾. 一方, Bergerらはcyclohexamide添加によって, TZDによるレプチン遺伝子発現抑制が消失することから, この現象には何らかの新規タンパク質の合成が必要であることを示唆している²⁾.

近年, 私たちはsubtraction cloning法ならびにarray解析によりTZDの1つであるtroglitazone (TZ) が, ヒト肺癌細胞株においてC/EBP homologous protein (CHOP) 発現を増強し, アポトーシスを惹起することを報告した³⁾. CHOPはC/EBP familyのメンバーに属し, C端側にleucine zipper構造を有しており, ほかのC/EBP familyメンバーと結合可能であるが, そのDNA結合領域にプロリン残基が2つ存在するため, CHOPホモダイマーあるいはCHOPとほかのC/EBPのヘテロダイマーは古典的C/EBP結合配列に結合することができない. この特徴的な構造から, CHOPはほかのC/EBPの機能を阻害する内因性ドミナントネガティブ体として機能すると考えられ, 実際にCHOPを強制発現させると

3T3-L1細胞の脂肪細胞分化が抑制されることが報告されている⁴⁾. そこで, 私たちは脂肪細胞においてTZによってCHOP発現が増強するか否か, またC/EBP によってその転写が活性化されるレプチン遺伝子のTZによる発現抑制にCHOPが関与するか解析を行った.

未分化な3T3-L1細胞ではTZはCHOP発現に明らかな影響を及ぼさなかったが³⁾, 脂肪細胞に分化させたL1細胞においてTZは濃度ならびに時間依存性にCHOP mRNAならびに蛋白量を増加させた. この現象はPPARのアンタゴニストであるYM440では認められなかった. また, 3T3-L1細胞をTZで処理し経時的に核蛋白を抽出して, レプチン遺伝子プロモーター上に存在するC/EBP結合配列への核蛋白中のC/EBPの結合を解析したところ, TZにて結合蛋白量が減少することが判明した. 一方, 核蛋白中のC/EBP や 蛋白量を定量しても, それらの蛋白量はTZによって変化しなかったことから, TZがC/EBPのレプチンプロモーターへの結合を阻害する物質を誘導することが予測された.

そこで, *in vitro*においてCHOPがC/EBP や のレプチンプロモーターへの結合を直接抑制するか否か検討した. ゲルシフト法において*in vitro*で作成したCHOPはC/EBP や の結合を容量依存性に抑制し, さらにCV-1細胞を用いたtransfection系においてもCHOPはC/EBP によるレプチン遺伝子転写活性化を機能的に容量依存性に抑制した. また, C末端のleucine zipper構造を欠失させヘテロダイマー形成能を欠如した変異CHOPでは, C/EBP による転写活性化の阻害が認められず, 免疫沈降法にて実際に3T3-L1細胞の内因性CHOPが

C/EBPと複合体を形成し、この複合体量がTZによって明らかに増加していることが判明した。以上の結果より、TZによるレプチン遺伝子転写抑制のメカニズムの1つとして、TZが内因性ドミナントネガティブ体であるCHOPを誘導し、CHOPがレプチン遺伝子の重要な転写活性化因子であるC/EBPやのプロモーターへの結合を阻害することによる可能性が示唆された。

ヒトならびにハムスターCHOP遺伝子プロモーター領域の塩基配列を解析したところ、PPARのコンセンサス結合配列であるDR1を認めず、またDR1に弱いホモロジーを有する3カ所の配列に対してもPPARとRXRヘテロダイマーの結合は認められなかった³⁾。この結果より、TZはCHOP遺伝子プロモーター活性を制御する転写因子機能を調節し、間接的にCHOPレベルを増加させる可能性が示唆された。また、CHOP遺伝子に対するTZの増強効果か、今後さらに検討が必要である。

CHOPは別名growth arrest and DNA damage inducible gene 153とも呼ばれ、細胞アポトーシスに関与することが知られている。In vivoにおいてTZがレプチン分泌の盛んな大型脂肪細胞のアポトーシスを惹起することが

報告されており⁵⁾、CHOPはC/EBP機能を阻害するのみでなく、大型脂肪細胞のアポトーシスにも関与してレプチンレベルを低下させる可能性も考えられる。近年、CHOPノックアウトマウスが作成され、これらのマウスではendoplasmic reticulum stressによるアポトーシス異常が認められることが報告されている⁶⁻⁸⁾。本研究結果もあわせて考えると、CHOPノックアウトマウスにおいて脂肪細胞のアポトーシス異常が存在し、肥満やTZD抵抗性の高レプチン血症を呈する可能性が考えられ、興味を持たれる。

文 献

- 1) Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, et al.: Functional antagonism between CCAAT/enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. J Biol Chem 1997, 272 : 5283-5290.
- 2) Berger J, Tanen M, Elbrecht A, et al.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit adipocyte 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. J Biol Chem 2001, 276 : 12629-12635.
- 3) Batchvarova N, Wang XZ, Ron D.: Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd 153). EMBO J 1995, 14 :

4654-4661.

- 4) Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, et al.: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible (GADD) 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. Oncogene 2002, 21 : 2171-2180.
- 5) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al.: Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest 1998, 101 : 1354-1361.
- 6) Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, et al.: CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev 1998, 12 : 982-995.
- 7) Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, et al.: Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. Proc Natl Acad Sci 2001, 98 : 10845-10850.
- 8) Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al.: Targeted disruption of the CHOP gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. J Clin Invest 2002, 109 : 525-532.