

助成番号 26-2-30

## 老化と脂肪蓄積に關与するペプチドの研究

札幌医科大学医学部 薬理学講座

野島 伊与里

### 1. 諸言

SIRT1 はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide: NAD<sup>+</sup>) を補酵素とする脱アセチル化酵素であり、アセチル化修飾を受けたヒストンなどのタンパク質や転写因子、転写のコファクターを脱アセチル化してその機能を調節することによりさまざまな遺伝子の発現調節に關与している。われわれは SIRT1 が発生途中の神経幹細胞において一過性に核に移行することにより神経幹細胞から神経細胞への分化に働くことを見出した<sup>1)</sup>。神経細胞への分化には SIRT1 は神経幹細胞の核内で co-repressor NCoR に結合して NCoR を脱アセチル化し細胞を未分化状態にとどめる転写因子 Hes1 と Hes5 の発現を抑制して神経細胞への分化に働くことによっていた。また、骨格筋や心筋ではオートファジー関連因子群の発現量を増加させていた。ミトコンドリアは障害されると ATP の産生能が低下するばかりではなく電子伝達系の機能障害により酸化ストレスを放出する。生理的には細胞の酸化ストレスのほとんどが障害ミトコンドリアに由来している。SIRT1 は同時に、オートファジー、特に障害されたミトコンドリアのオートファジーを進めることやスーパーオキシドジスムターゼ 2 (superoxide dismutase 2 : SOD2) などの抗酸化酵素を増加させることにより細胞内酸化ストレスを低下させることや骨格筋の筋タンパク質の転写を増加させること<sup>2)-5)</sup>、さらに、障害された筋細胞の膜修復を進めることを明らかにした<sup>6)</sup>。これらの SIRT1 の機能はポリフェノールの 1 つであるレスベラトロールの経口投与によって活性化させることができ、さらにレスベラトロールの継続投与はドゥシャンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスの骨格筋や心筋の障害、さらには遺伝性に心不全を起こす TO-2 ハムスターの心筋障害に対して治療効果をもたらすことを明らかにしている<sup>2), 5), 7)</sup>。

酵母では SIRT1 のホモログ Sir2 は過剰発現により酵母の寿命が延長され、逆に発現量低下により寿命が短縮されることから Sir2 は長寿遺伝子とも呼ばれている。しかし Sir2 が酵母の寿命を延ばすメカニズムについては不明であり、高等動物 SIRT1 の機能から、オートファジー機能亢進や抗酸化酵素の増加といった細胞内酸化ストレス低下作用やミトコンドリア機能強化による効率のよい ATP 産生が關与する可能性が考えられてはいるが実際に

それらの機能により寿命が延長されるかの証明はない。さらに、高等動物では SIRT1 が寿命や老化とどのように関連するかよくわかっていない。マウス胎児から分離した一次培養線維芽細胞 ([mouse embryonic fibroblast : MEF] 細胞) は培養を継代すると増殖スピードが著しく鈍化して細胞形態は扁平化しいわゆる老化老化の状態を示す。このため MEF 細胞はシャーレ内で老化を再現する実験方法として有益な方法である。われわれは MEF 細胞の老化を調べ、SIRT1 活性により発現抑制がかかり、SIRT1 の抑制や細胞老化で発現増加する分子”A”を同定し、”A”のトランスジェニックマウスを作成したところこのマウスは通常マウスよりも肥満していることが判明した。そこで”A”の脂肪への影響を 3T3-L1 細胞を用いて検討した。

## 2.方法

### 2.1. 3T3-L1 細胞

マウス脂肪前駆細胞の 3T3-L1 細胞 (JCRB Cell Bank) は 10% 胎児血清を含む DMEM 培地 (low glucose) で培養した。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化には細胞を 12-well dish に散布し 70% confluent の状態で 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.25  $\mu\text{M}$  dexamethasone (IBD 溶液) を加え 2 日間培養後、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン存在下で 2 日間培養し、さらに DMEM 培地で 4 日間培養した<sup>8)</sup>。細胞の中性脂質は Oil Red O 染色で同定し、染色像を Image J により定量解析した。

各種 siRNA (Sigma Aldrich) または control siRNA (SIC-001, Sigma Aldrich) は、細胞を IBD 処理する 12 時間前に 50 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞に transfection し、さらに 48 時間後にもう一度 transfection をおこなった。薬物での処理は IBD 処理する 12 時間前に阻害薬”C”、”D”を各種濃度で作用させ、IBD を除去後、”A”もしくはインスリン添加時にもう一度添加し、48 時間後に除去した。

### 2.2 RNA および蛋白質解析

細胞 RNA は RNeasy Kit (Qiagen) により分離し、cDNA に変換後に PCR 法で検出し、Western blot 解析は定法に従って行った<sup>1),2)</sup>。

抗体は anti-perilipin-1 antibody (#3470, Cell Signaling Technology)、anti-GAPDH antibody (G9545, Sigma-Aldrich)、anti-CEBP $\alpha$  (#2295, Cell Signaling Technology)、anti-PPAR $\gamma$  (#2435, Cell Signaling Technology) を用いた。

その他の試薬は Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation から購入した。

## 3.結果

MEF 細胞の細胞老化により増加する分子の中から、C2C12 細胞を SIRT1 阻害薬で処理した場合に増加する分子、さらに C2C12 細胞を SIRT1 活性化剤のレスベラトロールで処理

した場合に減少する分子を調べたところ”A”が見出された。”A”は構造から分泌蛋白質であることが推定され、実際、COS 細胞に発現させると細胞培養液に”A”が検出された。”A”の機能を調べるために”A”を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、正常マウスに比べて約 1.5 倍の体重を示した。このマウスは皮下脂肪の増大が見られた。そこで今回 “A”が脂肪にどのような作用を有するかを検討した。

3T3-L1 細胞は脂肪前駆細胞であり、継代 1 日後に **confluent** となった細胞にインスリン、3-isobutyl-1-methylxanthine と dexamethasone (IBD) を 2 日間、続いてインスリンのみで 2 日間 (I 処理とする)、さらに通常培地に戻して 4 日間培養すると脂肪細胞に分化する (図 1a)。そこで”A”の 3T3-L1 細胞への分化誘導能について検討した。3T3-L1 細胞に”A”を単独で作用させても脂肪細胞への分化は見られなかった。そこで、分化誘導を起こすプロトコールの中でいずれかの分子を”A”に交換することにより分化が誘導されるかを検討した (図 1a 上)。その結果、細胞を IBD で 2 日間処理した後インスリンの代わりに”A”で 2 日間処理して、その後 4 日間培養すると脂肪細胞に分化して Oil-Red-O 染色で赤く細胞が染色されることを見出した (図 1b)。一方、”A”を IBD の代わりに用い 2 日間培養し、その後インスリン (I) を作用させても脂肪細胞への分化は起きなかった (図 1b)。脂肪の量を画像解析により定量化すると IBD と”A”を用いた分化方法は通常の方法である IBD とインスリン (I) を用いた方法に変わらない脂肪細胞への分化能が見られた。perilipin 1 は脂肪細胞に特異的に発現する蛋白質である。Western blot 解析により perilipin 1 は IBD 処理でわずかに誘導され、IBD+ インスリンで強く誘導された (図 1c)。IBD+”A”の処理では IBD+インスリンと同等の perilipin 1 の誘導能を持つことが判明した (図 1a 下)。

脂肪細胞の分化の regulator となる転写因子は PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$ であり、3T3-L1 細胞分化において PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$ が分化に大きく関与している。そこでこれらの分子の発現について検討した。図 1b に示すように 3T3-L1 細胞の分化では IBD+I もしくは IBD+”A”の処理により PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$ が強く誘導されることが判明した。さらに、”A”がどのように細胞に作用するかを候補となる受容体を検索した。その結果”B”受容体の発現について検討したところ、3T3-L1 細胞を IBD で処理すると”B”受容体が誘導されることが判明した (図 1c)。

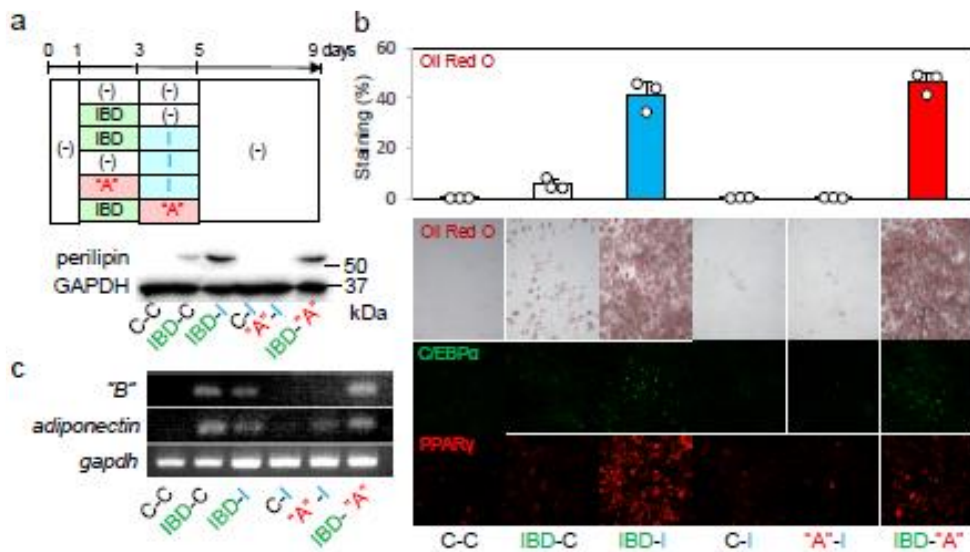


図1 “A”による 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化 (a 上) 分化のプロトコール。(-)は通常培地のみ。IBD; insulin +3- isobutyl-1-methylxanthine+dexamethasone, I; insulin. (a 下) Western blot 解析。(b) Oil-Red-O 染色と C/EBP $\alpha$ 及び PPAR $\gamma$ 免疫染色。グラフは Oil-Red-O 染色像を Image-J で定量化した結果を示す。(c) RT-PCR の結果。“B”受容体が IBD 処理により誘導された。adiponectin は脂肪細胞のマーカー蛋白質。

“B”受容体が“A”の作用に関与するかどうかを“B”受容体のノックダウンによって調べた。

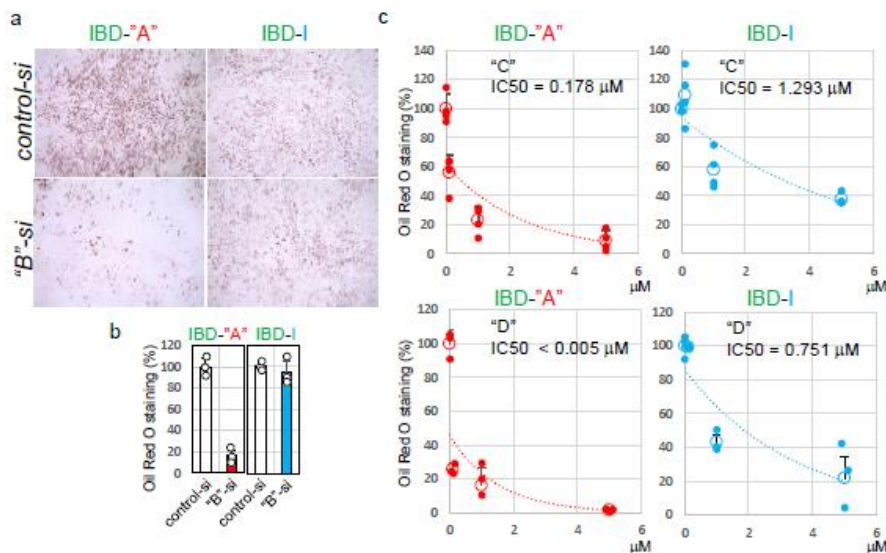


図2 “A”の 3T3-L1 細胞への脂肪分化作用は“B”受容体を介して作用する (a) “B”受容体のノックダウン (“B”-si) では IBD+“A”による脂肪細胞への分化が著しく阻害されたが、IBD + インスリンによる分化には影響しなかった。(b) Oil-Red-O 染色像を定量化解析した。(c) “B”受容体のシグナル伝達を阻害する阻害薬“C”と“D”の作用を IBD+“A” および IBD+ インスリン の脂肪細胞分化で調べた。細胞は Oil-Red-O 染色を行い、定量化解析を行った。

図 2a の Oil-Red-O 染色像に示すように”B”受容体のノックダウンにより IBD + ”A”の脂肪分化作用は抑制されたが IBD + インスリンの脂肪細胞分化は抑制されないことが判明した。脂肪分化能を定量した結果を図 2b に示す。 ”A”がインスリンとは別のシグナル伝達経路で機能していることが考えられた。このことをさらに明らかとするために”B”受容体のシグナル経路を阻害する薬物である”C”と”D”の脂肪細胞分化への影響を検討した (図 2c)。”C”と”D”ともに IBD+”A”による分化作用を著しく抑制したが、IBD+ インスリンによる分化誘導作用には著しく弱い作用しか有しないことが判明した。

#### 4.考察

今回、SIRT1 で発現が抑制され、SIRT1 の阻害や細胞老化で発現量が増加する分子”A”には 3T3-L1 脂肪前駆細胞を脂肪細胞へ分化させる機能が観察された。また、”B”受容体をノックダウンすることによって”A”の分化作用は消失することから”A”の受容体として”B”受容体が関与する可能性がきわめて高いことが判明した。”A”の作用が発現するためには 3T3-L1 細胞をあらかじめ IBD で処理しておく必要があったが、この際、”B”受容体が IBD で発現したことは”A”の作用に ”B”受容体が関与する裏づけになると考えられた。さらに”B”受容体のセカンドメッセンジャーとして働く酵素を阻害する”C”と”D”は IBD + ”A”による脂肪細胞化を強く阻害して、一方、IBD + インスリンによる脂肪細胞化に弱く作用することは、”A”が”B”受容体を介して作用することの傍証となると考えられた。”B”受容体の機能は”C”に比べて”D”がより特異的に抑制することが知られており、今回の図 2c の結果もそのことが反映されたものと考えられた。”C”と”D”はいずれも高濃度では IBD + インスリンの分化作用も阻害した。”C”と”D”はリン酸化酵素阻害薬であり、高濃度ではインスリン受容体シグナル伝達の一部を阻害する可能性が考えられた。また、インスリンシグナルの一部は”C”や”D”によって阻害される酵素も一部活性化することも報告されている。このためにインスリンによる分化作用も”C”や”D”で一部阻害された可能性も考えられた。”A”の脂肪細胞増加作用は従来の脂肪の形成とは異なる機構であり、肥満の分子メカニズムの研究や新たな抗肥満薬の開発につながる可能性が考えられた。

#### 5.結語

本研究により”A”が脂肪細胞の前駆細胞から脂肪細胞へ分化させる機能を持つこと、さらにそのシグナル伝達に”B”受容体が関与することが明らかとなった。

#### 6.文献

1) Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S et al. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105: 15999-15604. [Cover captured]

- 2) Hori SY, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K et al. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011; 338:784-794. (A highlighted paper of the Journal)
- 3) Kuno A, Hori YS, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K et al. Resveratrol improves cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice through SIRT1 Protein-mediated modulation of p300 Protein. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 5963-5972.
- 4) Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Hayashi T, Sakuragi H, Tanabe M et al. Resveratrol Ameliorates Mitophagy Disturbance and Improves Cardiac Pathophysiology of Dystrophin-deficient mdx Mice. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 15555.
- 5) Sebori R, Kuno A, Hosoda R, Hayashi T, Horio Y. Resveratrol Decreases Oxidative Stress by Restoring Mitophagy and Improves the Pathophysiology of Dystrophin-Deficient mdx Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; Article ID 9179270.
- 6) Fujiwara D, Iwahara N, Sebori R, Hosoda R, Shimohama S, Kuno A et al. SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury. *PLoS One.* 2019; 14(6): e0218329.
- 7) Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 8375-8382.
- 8) Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y et al. Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 12867-12875.

## 7.成果発表

なし