

氏 名	近 藤 基 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 8 7 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Transcription factor AP-2 : a positive regulator of MCP-1 gene expression  ( 転写因子 AP-2 は MCP-1 ( monocyte chemoattractant protein-1 ) の 発現を正に調節する )
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 竹 内 義 博 副 査 教 授 遠 山 育 夫

## 論文内容要旨

※整理番号	592	(ふりがな) 氏 名	(こんどう もとゆき) 近藤 基之
学位論文題目	<p style="text-align: center;"><b>Transcription factor AP-2<math>\beta</math>: a positive regulator of MCP-1 gene expression</b></p> <p style="text-align: center;">(転写因子 AP-2<math>\beta</math>は MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) の発現を正に調節する)</p>		
<p>【目 的】</p> <p>脂肪組織は種々のホルモンやサイトカイン（アディポカインと総称される）を分泌する内分泌臓器であり、脂肪細胞の肥大化に伴いアディポカイン分泌の質および量の調節に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々は、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析により 転写因子 AP-2<math>\beta</math> が肥満 2 型糖尿病の発症候補遺伝子であることを同定し、培養マウス 3T3-L1 脂肪細胞を用いた系で AP-2<math>\beta</math> を過剰発現すると、糖取り込み亢進を介して細胞が肥大化すること、またアディポカインの中でも抗炎症作用を有するアディポネクチン遺伝子発現を転写レベルで負に調節することを報告してきた。本研究では、脂肪組織での慢性炎症と全身のインスリン抵抗性を惹起する過程で重要であり、脂肪細胞が肥大化すると脂肪組織での発現が増加する MCP-1 に関して、脂肪細胞を肥大化させる転写因子 AP-2<math>\beta</math> がその分泌調節に関わる可能性を考え、その仮説を検証した。</p> <p>【方 法】</p> <p>培養 3T3-L1 脂肪細胞に、転写因子 AP-2<math>\beta</math> を過剰発現させ、MCP-1 の遺伝子発現量を mRNA 発現量（定量的 RT-PCR 法）、細胞内蛋白発現量（Western Blot 法）および分泌蛋白量（酵素免疫吸着測定法）で定量した。AP-2<math>\beta</math> が転写因子として 直接 MCP-1 のプロモーター領域に作用している可能性を想定し、reporter assay で評価した。過剰発現下だけではなく平常状態の内因性 AP-2<math>\beta</math> が作用していることを確認するため、AP-2<math>\beta</math> を RNA 干渉にて knock down させ、内因性 AP-2<math>\beta</math> の役割を検討した。</p> <p>次に、MCP-1 遺伝子のプロモーター領域内に、AP-2<math>\beta</math> 応答領域と consensus 配列が一致する領域を 3 箇所認めたため、electrophilic mobility shift assay (EMSA) で <i>in vitro</i> での結合を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で <i>in vivo</i> での結合を確認した。同定し得た AP-2<math>\beta</math> の応答領域に対して点突然変異体を作成し、AP-2<math>\beta</math> 過剰発現による影響の違いを reporter assay で確認した。また MCP-1 遺伝子の発現を調節する転写因子 NF-<math>\kappa</math>B の応答領域として報告されているもののうち、最も近位部の領域が AP-2<math>\beta</math> の応答領域とオーバーラップしており、その相互作用を検討するために NF-<math>\kappa</math>B の応答領域に対しても点突然変異体を作成し検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 【結 果】

培養 3T3-L1 脂肪細胞に転写因子 AP-2 $\beta$  を過剰発現させると、MCP-1 の mRNA 発現量、細胞内蛋白量、分泌蛋白量が増加した。これらの現象は脂肪細胞のサイズが変化する以前に、AP-2 $\beta$  遺伝子発現量依存的に認められており、脂肪細胞のサイズが大きくなったことによる二次的な変化でないことが確認できた。RNA 干渉による AP-2 $\beta$  の knock down では、MCP-1 はその mRNA 発現量および細胞内蛋白量がともに減少した。一方、reporter assay では AP-2 $\beta$  発現量依存性に MCP-1 のプロモーター活性が増加した。

MCP-1 遺伝子のプロモーター領域内の AP-2 $\beta$  応答候補領域を同定する目的で、3 箇所の候補部位に対応するオリゴヌクレオチドを用いて EMSA を行ったところ、遠位部及び近位部候補領域には AP-2 $\beta$  は結合するものの非常に弱く、中間部候補領域（転写開始点の上流 -137 ~ -129 塩基の配列）について強い AP-2 $\beta$  の結合を認めた。同応答領域に対する ChiP assay では AP-2 $\beta$  容量依存性に *in vivo* での結合が確認された。さらに同応答領域に点突然変異を導入した MCP-1 のプロモーター活性では AP-2 $\beta$  過剰発現による転写活性増強作用も消失した。また、同応答領域にオーバーラップする形で存在する転写因子 NF- $\kappa$ B 応答領域の点突然変異を導入したベクターを用いて検討したところ、AP-2 $\beta$  は NF- $\kappa$ B とは独立して MCP-1 プロモーター活性を調節することがわかった。

## 【考 察】

本研究により、転写因子 AP-2 $\beta$  は MCP-1 遺伝子の発現を正に調節することが示された。その調節は、AP-2 $\beta$  が MCP-1 遺伝子のプロモーター領域に直接結合することにより、転写レベルで発現を調節していることが判明した。また MCP-1 の発現調節が示されている転写因子 NF- $\kappa$ B とは独立して MCP-1 遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。

脂肪細胞におけるアディポカインの質および量的分泌調節に転写因子 AP-2 $\beta$  が関与していることが示唆された。また、AP-2 $\beta$  の発現量を調節すること、あるいはその活性を抑えることにより、MCP-1 分泌量を減少させる治療が可能になれば、脂肪組織での慢性炎症と全身のインスリン抵抗性を改善し動脈硬化症の進展予防としての遺伝子治療に応用できるものと考えられる。

## 【結 語・新発見】

転写因子 AP-2 $\beta$  は、MCP-1 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、MCP-1 遺伝子発現を転写レベルで正に調節することを新たに明らかにした。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	592	氏名	近藤基之
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>肥満 2 型糖尿病の発症候補遺伝子である転写因子 AP-2<math>\beta</math> (activating enhancer binding protein 2<math>\beta</math>) は脂肪細胞を肥大化する。一方、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) は肥満者の脂肪組織で発現が増加し、脂肪組織での慢性炎症と全身のインスリン抵抗性の惹起に關与する。</p> <p>本研究は、脂肪細胞において AP-2<math>\beta</math> が MCP-1 の発現・分泌の調節に關わることを明らかにした。すなわち、AP-2<math>\beta</math> は MCP-1 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、その発現を亢進する。この発現調節は別の転写因子である NF-<math>\kappa</math>B とは独立している。</p> <p>これらの結果から、脂肪組織での慢性炎症と全身のインスリン抵抗性の改善には、MCP-1 の分泌量の減少が有効であることが示唆され、動脈硬化症の予防法や治療法の開発に寄与することが期待される。よって本論文は博士 (医学) の学位論文に値する。</p> <p>なお申請者は平成21年 2 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 21 年 2 月 10 日)			