

脂肪組織と脂質異常症における 遺伝子転写因子の発現制御

——脂肪組織と脂肪細胞の分化におけるホメオボックスファミリー遺伝子の
発現制御と脂質代謝異常症における病態との関連——

出口 安 裕

要旨：脂肪組織の遺伝子発現を制御する転写因子の発現制御は脂肪細胞の増殖や分化において重要である。又、脂質異常症をはじめとする病態の解析においても転写因子の発現制御は重要な情報を提供すると考えられる。本論文では最近のこの分野の知見を概略し、著者らが取り組んでいる脂肪組織における細胞分化と関連するホメオボックス関連遺伝子を中心とする転写因子の発現制御の研究の一端を述べる。又、脂質異常症マウスを用いた脂肪組織の病態との関連した研究についても一部を示す。このような脂肪組織における転写因子の研究は、脂肪細胞における組織特異的遺伝子発現の調節機能を通して、その遺伝子産物や異常分子による脂肪細胞の増殖分化の制御にも、ひとつの新たな方法論を提供し、肥満症をはじめとする生活習慣病の病態の予防や診断に貢献することが期待される。

Summary : Changes in gene expression in adipocytes are considered to be involved in adipocyte growth and differentiation. Hyperlipidemia with atherosclerosis shows several evidences of importance of aberrant growth and differentiation of adipocytes. In this study, coordinate expression of transcription factor genes related to cell growth and differentiation was studied in adipogenesis of hyperlipidemia with atherosclerosis.

キーワード：脂肪細胞、転写因子、分化、脂質異常症

Key words : adipocyte, transcription factor, differentiation, adipogenesis of hyperlipidemia with atherosclerosis

1. はじめに

2006年度の国民健康・栄養調査では、脂質異常症は4,220万人にのぼると推定されている。脂質異常症は、虚血性心疾患や虚血性脳血管障害の重要な危険因子である。脂質代謝異常症をはじめとする生活習慣病は、増加の一途を辿り、また我々の生命予後を決定する。脂肪細胞は脂肪の産生、代謝を行うと同時に、刺激に応じてサイトカインやホルモンを産生分泌する組織として機能し、これらの機能異常は肥満や脂質代謝異常などの病態と関連する。内臓脂肪を構成する脂肪

組織の分子レベルの研究や肥満症における遺伝子レベルの脂肪細胞の病態解析はその予防や新しい治療戦略の観点からも重要である。近年、脂肪細胞の増殖・分化の制御や各脂肪組織（内臓脂肪や皮下脂肪、褐色脂肪組織や白色脂肪組織）を構成する脂肪細胞における遺伝子レベルの研究の重要性が明らかになってきた⁽¹⁻³⁾。

特に細胞の遺伝子発現を制御する転写因子の発現制御は細胞の増殖や分化のうえで重要である。脂肪細胞における転写因子の研究も最近行われているが、主なものについては表1の様であり、脂肪細胞の増殖や分化との関連で研究されているが⁽⁴⁻⁶⁾、以下に概説する。

表1 脂肪細胞に重要な転写因子

PPAR γ
C/EBP α C/EBP β C/EBP δ
TFAP 2 β (AP 2 β)
Foxo 1
GLUT 4 transacting factor
Homeobox family genes

2. 脂肪細胞における遺伝子転写因子

脂肪細胞において、精力的にこれまで研究されてきた転写因子は、脂肪細胞の分化との関連でロイシンジッパー型転写因子 C/EBP ファミリーと受容体型転写因子の PPAR γ である⁽⁴⁻⁶⁾。脂肪細胞の分化の系で、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化における転写因子の発現制御が、マウスの前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞のシステムを用いて詳細に解析された。

脂肪細胞分化誘導直後の一過性細胞増殖の段階に発現する転写因子 C/EBP β と δ が協調して活性化し、転写因子 PPAR γ 、C/EBP α の発現を誘導する。このうち PPAR γ は、脂肪細胞分化に必須の転写因子であり、脂肪細胞特有の遺伝子発現を促す。さらには脂肪細胞の脂肪蓄積能を誘導する。C/EBP α についてはインスリン感受性の獲得や脂肪細胞の増殖と分化の調節機能を有すると考えられている。実際、C/EBP α や PPAR γ のノックアウト（欠損）マウスが作製され、生体の脂肪組織形成におけるこれら転写因子の重要性が明らかとなった。一方、C/EBP β 、C/EBP δ のダブル（両）欠損マウスでは、脂肪細胞数の減少が認められるものの、分化した脂肪細胞では正常の PPAR γ や C/EBP α の発現が見られた。さらに C/EBP β 、C/EBP δ ダブル欠損マウスから得られた胎児繊維芽細胞は、C/EBP α 、PPAR γ の発現が全く誘導されず、脂肪細胞への分化が完全に抑制されていたことから判断すると、生体では C/EBP β 、C/EBP δ 以外の未知の転写因子が存在する可能性が示唆される。

別の系において、これら PPAR γ や C/EBP α を誘導する転写因子として C/EBP β 、C/EBP δ が同定されているが、C/EBP β と C/EBP δ を両方欠損したマウスでは、脂肪細胞数の減少が認められるものの、分化した脂肪細胞では PPAR γ や C/EBP α を正常に発現していることから、PPAR γ を誘導する未知の転写因子の存在が推定されている。転写因子 TFAP 2 B（マウスでは

AP-2 β) は、AP 2 転写因子ファミリーの一つであり、C 末端側が DNA への結合と 2 量体形成に関与し、N 末端側が転写活性に関与することが報告されているが、分化した成熟脂肪細胞において、転写因子 TFAP 2 B 遺伝子の発現が増加することが報告されている。転写因子 TFAP 2 B はインスリン非依存性に糖取り込みを亢進させることにより、中性脂肪の蓄積を引き起こし、脂肪細胞を肥大化、アディポサイトカインの分泌異常を誘導させる⁽⁷⁾。最近、TRAP 2 の過剰発現は脂肪細胞の機能異常と関連して、2 型糖尿病の発症進展に関与するとの報告もある。

フォークヘッド型転写因子のひとつである Foxo 1 は脂肪組織、肝臓、脾臓、骨格筋などのインスリン反応性臓器に発現し、インスリンシグナル依存的にリン酸化を受け、遺伝子転写の場である核内から細胞質へ移行することで転写調節機能が制御される。Foxo 1 の標的遺伝子には、酸化ストレスや細胞周期を制御する因子、糖新生律速酵素などが報告されている。また、糖輸送体 GLUT 4 は筋肉や脂肪組織に発現し、血糖値の調節に重要であるが、GLUT 4 が脂肪組織で発現するのに必要な遺伝子調節領域である ASE に結合する転写因子の脂肪細胞における重要性も報告されてきている。

本稿では我々が従来から取り組んできた脂肪細胞の増殖と分化に関連する遺伝子と転写因子の発現解析と脂質代謝異常を伴う肥満症をはじめとする病態の分子レベルの解析について報告する。特に、細胞分化関連遺伝子のひとつであるホメオボックスファミリー遺伝子の脂肪細胞における機能について述べる。

3. ホメオボックス遺伝子とその新しいファミリー遺伝子

細胞分化関連遺伝子のひとつであるホメオボックス (homeobox) 遺伝子は、従来、ショウジョウバエの発生に関与する形態形成遺伝子の中に共通して存在する 180 ヌクレオチドからなる類似の構造として発見された。それ以後今日まで数々の類似遺伝子が、ヒトに至るまで多くの生物において発見され、胚発生や形態形成および臓器発生におけるその役割が詳細に研究されてきている⁽⁸⁻⁹⁾。とくに、ホメオドメイン (homeodomain、ホメオボックスがコードする蛋白ドメイン) のカルボキシ末端 (C 末端) は、種々の DNA 結合性転写因子に認められるヘリックスモチーフ構造を示すことから、ホメオボックス遺伝子は発生や形態・臓器形成のパターンフォーメーションを調節する DNA 結合蛋白をコードすると考えられ、転写調節因子としての機能が個体レベルにおいて明らかになってきた。また、哺乳類の組織特異的転写調節因子の中にホメオドメイン構造をもつものが明らかとなり成体の組織において組織特異的転写調節因子として機能するホメオボックス遺伝子の新しい役割が示されてきた⁽¹⁰⁻¹³⁾。

従来の発生や形態形成に関与することで見いだされた典型的なホメオボックス遺伝子はヒト HOX (マウス *hox*) ファミリー遺伝子と分類され、構造的にも非常に類似し、染色体上において、クラスター (cluster) を形成して存在している。これらは発生や形態形成過程におけるパターンフォーメーション (pattern formation) に関与し、個々の遺伝子産物の形態形成の過程にお

ける機能について、個体レベルの遺伝子の導入実験などにより検討されてきた。

近年、同定されたいくつかの組織特異的転写調節因子は、この HOX (Hox) ファミリーのホメオドメインとは類似するが、その HOX (Hox) ファミリー遺伝子相互と比して、かなり異なる (diverge) ホメオドメイン (POU-homeodomain) (ホメオドメインのアミノ酸の比較にて HOX (Hox) ファミリー遺伝子と比べ、~30% 相同である。HOX (Hox) ファミリー遺伝子同士は 80~90% 以上相同。) を共通に有し、新しいホメオボックスのサブファミリー遺伝子と考えられている⁽⁸⁻⁹⁾。例えば、免疫グロブリン (immunoglobulin) 遺伝子や種々の遺伝子の転写を制御するプロモーター/エンハンサー (promoter/enhancer) に存在するオクタマーモチーフ (octamer motif) に結合する Oct-2 は、B 細胞特異的に存在し、種々の B 細胞特異的遺伝子の発現調節に関与するが、POU-homeodomain を有す。下垂体細胞に特異的に存在し、下垂体特異的遺伝子の発現を調節する転写因子である Pit-1 もこの部類に属す。このファミリーに属する遺伝子は、成体の組織における組織特異的な遺伝子の転写調節に関与している⁽¹⁰⁻¹³⁾。筆者ら⁽¹⁴⁻¹⁶⁾により同定された HLX (hlx) や HLX (hlx) 9 もこのファミリーに属し、その形態発生以外における機能が解析されてきている。これらは成体の血液系細胞や造血組織、膵臓などにおいて特異的に発現しており、染色体座 (chromosomal loci) もヒト第 1 染色体長腕上であり、従来のヒト HOX ファミリー遺伝子のそれとは異なる。さらに、成体の精巣や卵巣組織で発現している別の HOX (Hox) ファミリー遺伝子の機能が研究されている。

4. ホメオボックス遺伝子による他の構造遺伝子の発現調節

ホメオボックス遺伝子は、前述のように、ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH) タイプの DNA 結合性転写因子をコードする⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。

(1) オクタマー結合蛋白

ホメオボックス遺伝子産物のうち、転写制御因子としての機能が明らかな例として、オクタマー結合蛋白質 (Oct 1~11)、脳下垂体成長ホルモン転写促進因子 (Pit-1)、および線虫の神経分化因子の unc-86 (Unc) に共通して存在する配列 (POU ドメイン) を有するものがある^(20,21)。この中で、オクタマーモチーフ (-ATTGCAT-) を認識するオクタマー結合蛋白質は現在まで複数同定されていて、その代表は Oct-1、Oct-2 である。オクタマー配列は免疫グロブリンや T 細胞レセプター遺伝子等の発現調節にきわめて重要であることが示されている。Oct-1 は様々な細胞に存在するが、Oct-2 の発現はリンパ系細胞に限られる。この Oct-2 はオクタマー配列への特異的結合をとおして、免疫グロブリン、T 細胞レセプターの特異的遺伝子発現因子として機能している。Oct-2 は B および T 細胞において免疫グロブリンまたは T 細胞レセプター遺伝子の組み換え (rearrangement) が生じる前から存在している。Oct-2 を発現していない非リンパ球性の細胞に、オクタマー配列をもったレポーター遺伝子と、発現ベクターに組み込んだ Oct-2 を同時

に導入すると、レポーターの遺伝子発現が生じる⁽²²⁾。ホメオドメインを除去した Oct-2 を用いれば、配列 DNA への結合、遺伝子発現機能は失われるので、ホメオドメイン部分は、この研究においても DNA 結合ドメインとして機能していることがわかる。

Oct-1 はヒストン遺伝子の上流領域のオクタマー配列に結合したり、ヘルペスウイルス初期遺伝子の 5' 上流領域に結合することが示されている。この場合、ウイルスにコードされる VP 16 蛋白質自体には DNA 結合機能はないので、Oct-1 は RNA ポリメラーゼ複合体等と相互作用して、蛋白質複合体を形成することによって機能していると考えられている⁽²³⁾。

(2) その他のホメオドメイン蛋白

ホメオドメイン蛋白は、特異的な DNA 配列を認識して結合するが、ショウジョウバエの形態形成に関与する一部のホメオボックス遺伝子において、よく研究されている (Ant、En、Dfx 等)⁽²⁴⁻²⁷⁾。これらは表 4 のような DNA 特異的結合部位が同定されており、これら遺伝子はその蛋白産物と DNA との親和性 (affinity) により、その結合が調節され、それを介して種々の形態発生に関与する遺伝子の発現が調節され、発生という複雑な生物学的現象がコントロールされている。En ホメオドメイン蛋白質と、Ftz ホメオドメイン蛋白質は非常に相同な塩基配列を認識して、En および Ftz 遺伝子の 5' 上流領域 DNA に結合する。ただし、その結合親和性は蛋白質により異なる。標的結合部位をエンハンサーエレメントとしてレポーター遺伝子につなぎ、Ftz 蛋白質を合成するような発現ユニットとともに細胞に導入すると、レポーター遺伝子の転写促進がみられる。この時、同時に En ホメオドメイン蛋白質を発現するように、En 発現ベクターも導入すると、この転写促進がみられなくなる。この実験等により、Ftz 蛋白質が、エンハンサーエレメント (標的配列) に結合して転写を促進し、同じ標的配列が En 蛋白質により結合されたときは転写がもはや促進されない (競合阻害)。

Ubx 遺伝子はショウジョウバエ胚パラセグメントに発現するが、その発現調節に Flz ホメオドメイン蛋白による転写促進と、En ホメオドメイン蛋白による転写抑制のバランスが関与していると考えられる。また、En 遺伝子の 5' 上流には、種々のホメオドメイン蛋白質が結合する部位が複数存在している。この領域をレポータープラスミドへつなぎ、Ftz、Prd、Zen、Zen 2 ホメオドメイン蛋白質のいずれかを発現させるベクターとともに細胞へ入れると、転写の促進がみられる。複数個のこれらホメオドメイン蛋白質を同時に発現させると、更に促進がみられる。興味あることに、この系に Eve または En ホメオドメイン蛋白質を同時に発現させると、促進が認められない。つまり、種々のホメオドメイン蛋白質が複数相互的に作用することで、転写の促進、抑制の調節がなされている⁽²⁴⁻²⁷⁾。

最近、マウスの Hox ファミリーに属する遺伝子の一部につき、その標的 DNA 結合配列が同定され、その機能が検討されているが、その配列はショウジョウバエの代表的なホメオボックス遺伝子の標的配列と共通性を有している (-ATTA-motif)⁽²⁸⁾。その配列をプロモーター領域にもった種々の構造遺伝子の発現を、Hox 蛋白質が実際に調節することが、レポータープラスミド

やプロモーター領域を用いたレポータープラスミドによる細胞導入実験により明らかとなっている。例えば、マウス *Hox 2.5* や *Hox 2.4* は、この結合モチーフを介して神経細胞接着因子である N-CAM の遺伝子を調節する⁽²⁹⁾。また、マウスのホメオボックス遺伝子である *Evx-1* 遺伝子（ショウジョウバエの *Eve* 遺伝子と関連）は、*c-fos/AP-1* のシグナル伝達機構を介して、細胞外マトリックスである形態調節分子のテネイシン遺伝子の発現を調節することが報告されている⁽³⁰⁾。また、マウスの *Hox 3.1* 遺伝子産物は、 β -アミロイド遺伝子のプロモーターにこのモチーフを介して作用し、アミロイド蛋白発現を抑制することが知られている⁽³¹⁾。*Hox 3 D* 遺伝子等のような幾つかのホメオボックス遺伝子は、そのプロモーター領域にホメオドメイン蛋白産物自体に対する標的 DNA 結合部位を有しており、ホメオドメイン蛋白自体が、ホメオボックス遺伝子の発現に関与している⁽³²⁾。つまり、ホメオドメイン蛋白は、その構造上の類似性より比較的似た特異的 DNA 塩基配列を認識すると考えられるが、複数のホメオドメイン蛋白が共通の標的配列を異なる親和性で認識結合すると考えられる。

5. 脂肪組織における転写因子としてのホメオボックス遺伝子の発現制御：

内臓脂肪組織と皮下脂肪組織での比較

次に本研究においては、生活習慣病の病態と関連する脂肪組織の性質を分子レベルで明らかにすることを目的として、細胞分化と関連する転写制御因子の一つであるホメオボックス遺伝子の発現様式を系統的に解析することにより、脂肪組織の部位による脂肪細胞の性質を評価・分析した。脂肪細胞は脂肪の産生や代謝だけではなく、サイトカイン等を分泌して体内の代謝やエネルギー産生の調節等をおこなう⁽¹⁻³⁾。まず我々は、各種の脂肪組織におけるこれら遺伝子の発現の解析を行った。

生後 8 週の Specific Pathogen Free のオスのマウスから腸管膜周囲内臓脂肪と皮下脂肪、精巣周囲脂肪を取り出し、ホメオボックス遺伝子を主とした分化関連遺伝子の発現量の違いを解析した。実験方法は、グアニジンチオシアネート法 (P. Chomczynski, N. Sacchi) により RNA を抽出した。得た全 RNA を RT (reverse transcription) によって cDNA に変換し、各遺伝子の合成プライマーやランダムプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction) を行った⁽³³⁾。PCR に用いた遺伝子固有の合成プライマーは、HOX ファミリーと MSX ファミリーなどの Non-HOX のホメオボックス遺伝子とその他、細胞の増殖・分化関連遺伝子およびコントロールとしての *actin*、*HPRT* 遺伝子である。逆転写反応 (RT, Applied Biosystems: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) は、 $10\times$ Reverse Transcription Buffer $2\ \mu\text{l}$ 、 $25\times$ dNTPs $0.8\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ Random Primers $2\ \mu\text{l}$ 、RNase Inhibitor $1\ \mu\text{l}$ 、Nuclease-free H_2O $3.2\ \mu\text{l}$ 、Sample (TotalRNA) $10\ \mu\text{l}$ 、Reverse Transcriptase ($50\ \text{U}/\mu\text{l}$) $1\ \mu\text{l}$ で全容量 $20\ \mu\text{l}$ とし、 25°C 10 分、 37°C 120 分、 85°C 5 秒の条件で行った。PCR は、 $10\times$ Buffer for Blend Taq $5\ \mu\text{l}$ 、 $2\ \text{mM}$ dNTPs $5\ \mu\text{l}$ 、Nuclease-free H_2O $37.5\ \mu\text{l}$ 、Primers $1\ \mu\text{l}$ 、cDNA $1\ \mu\text{l}$ 、Blend Taq ($2.5\ \text{U}/\mu\text{l}$) $0.5\ \mu\text{l}$ で全容量 $50\ \mu\text{l}$ とし、Preparation として 94°C 2 分を

表 2

gene	visceral	subcutaneous	testicular	gene	visceral	subcutaneous	testicular
Hoxa 1	(+)	(+)	(-)	Hoxd 1	(-)	(-)	(-)
Hoxa 2	(+)	(+)	(+)	Hoxd 3	(+)	(+)	(+)
Hoxa 3	(+)	(+)	(+)	Hoxd 4	(+)	(+)	(+)
Hoxa 4	(+)	(-)	(+)	Hoxd 8	(-)	(-)	(-)
Hoxa 5	(+)	(+)	(-)	Hoxd 9	(+)	(+)	(+)
Hoxa 6	(+)	(+)	(+)	Hoxd 10	(+)	(+)	(+)
Hoxa 7	(-)	(+)	(-)	Hoxd 11	(-)	(-)	(-)
Hoxa 9	(+)	(+)	(+)	Hoxd 12	(+)	(+)	(+)
Hoxa 10	(+)	(+)	(+)	Hoxd 13	(+)	(+)	(+)
Hoxa 11	(+)	(+)	(+)	γ HOX	(-)	(-)	(-)
Hoxa 13	(+)	(+)	(+)	MSX 1	(+)	(+)	(+)
Hoxb 1	(+)	(+)	(-)	MSX 2	(+)	(+)	(+)
Hoxb 2	(+)	(+)	(-)	Pdx 1	(+)	(-)	(+)
Hoxb 3	(+)	(+)	(+)	Cdx 2	(+)	(+)	(+)
Hoxb 4	(+)	(+)	(+)	Gbx 2	(+)	(+)	(+)
Hoxb 5	(+)	(+)	(-)	Nkx 6.1	(+)	(+)	(+)
Hoxb 6	(+)	(+)	(-)	Nkx 6.2	(+)	(+)	(+)
Hoxb 7	(+)	(+)	(-)	Nkx 2.2	(-)	(-)	(-)
Hoxb 8	(+)	(+)	(+)	Pax 6	(+)	(+)	(+)
Hoxb 9	(+)	(+)	(+)	Pax 4	(+)	(+)	(+)
Hoxb 13	(+)	(+)	(+)	Isl 1	(+)	(+)	(+)
Hoxc 4	(+)	(+)	(+)	Hlxb 9	(+)	(+)	(-)
Hoxc 5	(-)	(-)	(+)	Brain 4	(+)	(+)	(+)
Hoxc 6	(+)	(+)	(+)	Glut 2	(+)	(+)	(+)
Hoxc 8	(-)	(-)	(-)	Hlx	(+)	(+)	(-)
Hoxc 9	(+)	(+)	(+)	c-myc	(+)	(+)	(+)
Hoxc 10	(-)	(-)	(-)	c-jun	(-)	(-)	(-)
Hoxc 11	(+)	(-)	(-)	jun-B	(-)	(-)	(-)
Hoxc 12	(-)	(-)	(-)	CXCR 4	(+)	(+)	(+)
Hoxc 13	(-)	(-)	(+)	cyclinD 1	(-)	(-)	(-)

1 サイクル、Denaturation 94°C 30 秒、Annealing 55–60°C 30 秒、Extension 72°C、1 分を呼び実験で決めた最適サイクルの条件で行なった。その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等において分析した。各ホメオボックス遺伝子の発現量については、同様に分析したコントロールである actin 及び HPRT 遺伝子の発現量と詳細に比較検討することにより、定量的／定性的に評価した。

その結果を表 2 に示す。各遺伝子発現の差異が、この詳細な分析によって確認された。腸管膜周囲内臓脂肪と皮下脂肪、精巣周囲脂肪において、発現に差異が見られた遺伝子は、Hoxa 1、Hoxa 4、Hoxa 5、Hoxa 7、Hoxb 1、Hoxb 2、Hoxb 5、Hoxb 6、Hoxb 7、Hoxc 5、Hoxc 11、Hoxc 13、Hlxb 9、Hlx であり、さらに、内臓脂肪と皮下脂肪においてのみ差異が見られた遺伝子は Hoxa 4、Hoxa 7、Hoxc 11 である。マウスにおいて腸管膜周囲内臓脂肪と精巣周囲脂肪は、一般的に類似した性質を持つとされているが、本実験においては、多くの遺伝子発現に差異が認められた。これは、脂肪組織による違いに加えて、ホメオボックス遺伝子が前後体軸に沿って発現することを考

表 3 Mouse Adipose tissues

Gene	Roles in Growth & Differentiation
Hoxa 1	Expressed along the entire length of the primitive streak
Hoxa 4	Expressed during development of the prepuberal testis
Hoxa 5	Expressed during embryogenesis and in adult kidney
Hoxa 7	Specific genes during keratinocyte proliferation
Hoxb 1	Role in neural crest development into glia of the peripheral nervous system
Hoxb 2	Role in controlling neurogenesis and neuronal differentiation
Hoxb 5	Involved in lung and gut development
Hoxb 6	Repress Globin mRNA
Hoxb 7	Associated with some cases of melanoma and ovarian carcinoma
Hoxc 5	Role in the genesis of anaplastic large-T-cell lymphomas
Hoxc 11	Binds to a promoter element of the lactase-phlorizin hydrolase
Hoxc 13	Involved in the control of hair keratin gene expression
Hlxb 9	Involved in pancreas development and function
HLX	Expressed within specific hematopoietic lineages
Hoxa 1	Expressed along the entire length of the primitive streak

慮しなければならない。なお、この系において変化の認められたホメオボックス関連遺伝子の従来報告されている発生分化における遺伝子機能を参考までにまとめると、表3のようになる。

6. 脂肪細胞の分化とホメオボックス遺伝子の発現制御

脂肪細胞の分化との関連におけるホメオボックス遺伝子の発現の差異を検討するために、マウス前駆脂肪細胞の培養細胞株である 3 T 3-L 1 を用いて、前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化する種々段階におけるホメオボックス遺伝子の発現変化を詳細に検討した。ホメオボックス遺伝子は、前述のように各細胞の発生・分化の制御に深く関わっているとされており、前駆脂肪細胞からの各分化段階におけるホメオボックス遺伝子の発現変化を解析することにより、成熟脂肪細胞へ分化するために重要と考えられるホメオボックス遺伝子の発現を解析することを目的とした。生体における脂肪細胞のライフサイクルについては、一般に、間葉系多機能幹細胞から前駆脂肪細胞が作られる。前駆脂肪細胞はクローン増殖した後、種々の分化段階を経て、脂肪細胞となる。その後、成熟・肥大化により、脂肪滴を蓄えた成熟脂肪細胞が形成される⁽¹⁻³⁾。機能を終えた成熟脂肪細胞は、アポトーシスなどにより生体より排除される。3 T 3-L 1 は、マウスの腹腔内から取り出された中胚葉由来の間葉系細胞である前駆脂肪細胞である。ダルベッコ変法イーグル培地にて、分化の全期間において胎児血清 (FBS) と、Day 0 から Day 2 にかけて、副腎皮質ステロイドホルモン剤であるデキサメタゾン、増殖因子であるイソブチルメチルキサンチン (IBMX)、インスリンを、Day 2 から Day 8 にかけてはインスリンを投与し、成熟脂肪細胞に分化誘導した⁽³⁴⁾。脂肪細胞の分化マーカーとして、AP 2 (アダプタータンパク質 2) や TTR (トランスサイレチン)- γ 、Fas (脂肪合成酵素) などが知られているが、AP 2 と Fas レベルは、Day

0 から Day 2 では非常に低いレベルであるが Day 4 より急激に上昇し、TTR- γ は Day 0 の時点で一定レベル存在しその後 Day 8 にかけて緩やかな上昇を見せる。これらのことから、3 T 3-L 1 の分化系において Day 4 は脂肪細胞の特徴を十分に獲得していると考えられる。また、我々の系においても Day 0 では繊維状であった前駆脂肪細胞が培養を進めるごとに形状が変化し、Day 4 ではすでに脂肪滴を蓄えており分化誘導を確認した。上記の条件で分化誘導した培養細胞の Day 0、Day 2、Day 4、Day 8 のそれぞれの分化段階の細胞の RNA を抽出し、同様の方法で細胞分化関連遺伝子の発現を詳細に解析した。

この結果を表 4 に示す。特に分化段階において発現に差異が見られた遺伝子は、Hoxb 1、Hoxb 5、Hoxb 9、Hoxd 1、Hoxd 3、Hoxd 8 である。Hoxb 1 は、Day 0 では全く発現せず、Day 2 以降は発現が認められた。Hoxb 5 と Hoxb 9 に関しては、Day 0 では発現がみられたが、Day 2 から Day 4 にかけて一旦発現がみられなくなり、Day 8 に再度発現がみられた。Hoxd 1 は、Day 0 に

表 4

gene	Day 0	Day 2	Day 4	Day 8	gene	Day 0	Day 2	Day 4	Day 8
Hoxa 1	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 1	(+)	(-)	(-)	(-)
Hoxa 2	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 3	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 3	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 4	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 8	(-)	(-)	(-)	(+)
Hoxa 5	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 9	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 6	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 10	(+)	(+)	(+)	(±)
Hoxa 7	(-)	(-)	(-)	(-)	Hoxd 11	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 9	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 12	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 10	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 13	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 11	(+)	(+)	(+)	(+)	γ HOX	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxa 13	(+)	(+)	(+)	(+)	MSX 1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 1	(-)	(+)	(+)	(+)	MSX 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 2	(-)	(-)	(-)	(-)	Pdx 1	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxb 3	(+)	(+)	(+)	(+)	Cdx 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 4	(+)	(+)	(+)	(+)	Gbx 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 5	(+)	(-)	(-)	(+)	Nkx 6.1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 6	(+)	(+)	(+)	(+)	Nkx 6.2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 7	(+)	(+)	(+)	(+)	Nkx 2.2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 8	(+)	(+)	(+)	(+)	Pax 6	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 9	(+)	(-)	(-)	(+)	Pax 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 13	(+)	(+)	(+)	(+)	Isl 1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 4	(+)	(+)	(+)	(+)	Hlxb 9	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 5	(-)	(-)	(-)	(-)	Brain 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 6	(+)	(+)	(+)	(+)	Glut 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 8	(-)	(+)	(-)	(±)	Hlx	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 9	(+)	(+)	(+)	(+)	c-myc	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 10	(+)	(+)	(+)	(+)	c-jun	(-)	(+)	(±)	(-)
Hoxc 11	(+)	(+)	(+)	(+)	jun-B	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxc 12	(-)	(-)	(-)	(-)	CXCR 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 13	(+)	(+)	(+)	(+)	cyclinD 1	(-)	(-)	(-)	(-)

表 5 Adipocyte differentiation (3 T 3-L 1)

Gene	Roles in Growth & Differentiation
Hoxb 1	Role in neural crest development into glias of the peripheral nervous system
Hoxb 5	Involved in lung and gut development
Hoxb 9	Expressed in the embryonic and adult spinal cord
Hoxd 1	Expressed in presumed trunk neural crest and the dermatome
Hoxd 3	Detected in spinal cord, dorsal root ganglia, first cervical vertebra, thyroid gland, kidney tubules, esophagus, stomach and intestines
Hoxd 8	Associated with severe limb and genital abnormalities/Role in adult urogenital tract function

においては発現がみられたが、Day 2 以降は発現が見られなかった。興味深いことに Hoxd 8 は、Hoxd 1 と全く逆の動きを見せた。この 2 つの遺伝子の機能は今後の導入実験等の結果を待たねばならないが、これらの遺伝子は相補的に働いていることが示唆される。Hoxd 3 は、Day 0 から Day 4 にかけては発現が認められたが、Day 8 においては全く発現がみられなかった。これら 6 つの遺伝子は、分化の段階において選択的に発現していることから、脂肪細胞の分化に影響を与えていることが考えられる。これらの結果をもとに、各分化段階において発現量の変化が確認できなかった遺伝子も含め、各ホメオボックスファミリー遺伝子の発現の組み合わせ、つまりこれらの協調的発現制御によって脂肪細胞・脂肪組織全体の分化制御を行っていることが考えられる。

さらに、3 T 3-L 1 培養分化細胞における遺伝子発現の変化と、上述の実験に用いた正常マウスの内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の遺伝子発現パターンについて比較検討した。今回我々は、十分に分化程度の進んだ 3 T 3-L 1 培養細胞の Day 8 (成熟脂肪細胞) の cDNA について詳細に比較検討を行った。今回解析した 60 個の遺伝子の内、遺伝子発現プロファイルが同じ遺伝子を検索したところ、内臓脂肪組織では 52 個、皮下脂肪組織では 50 個の遺伝子の発現が一致していた。皮下脂肪組織において特異的に発現プロファイルが異なる遺伝子は、Hoxa 4、Hoxa 7 等である⁽³⁵⁾。このことから、内臓脂肪組織は、細胞分化関連遺伝子であるホメオボックス遺伝子の発現制御の観点においては、3 T 3-L 1 培養成熟脂肪細胞により近似した遺伝子発現プロファイルを持つことが考察される。

なお、この系において変化の認められたホメオボックス関連遺伝子の従来報告されている発生分化における遺伝子機能を参考までにまとめると、表 5 のようになる。

7. 脂質代謝異常症における病態とホメオボックス遺伝子の発現：

病態マウスと高脂肪食誘導肥満ラットの系における解析⁽³⁵⁾

(1) 脂質代謝異常マウスにおける解析

脂質代謝異常による肥満症の関連病態の進行と関連するホメオボックスファミリー遺伝子をはじめとする細胞分化関連遺伝子の発現の変化を解析するために、遺伝的に脂質代謝異常症を発症する KOR (B 6.KOR-Apoesh1、以下 KOR) マウスを用いて、同様にホメオボックスファミリー

遺伝子の発現を解析・評価した。脂質代謝異常症は、メタボリックシンドロームの危険因子のひとつも重要な因子の一つとされており、特に高 LDL-コレステロール血症は、動脈硬化症とも密接に関係しているため、本マウスにおいてその発現を解析することは意義深い。ApoE 欠損自然発症脂質代謝異常マウスである KOR マウスは、Apo プロテイン E を先天的に欠損したコンジェニックマウス (congenic mouse) で、生後早期から脂質代謝異常症の病態を呈し、生後 20 週を越えると極めて高度の脂質代謝異常をともなう動脈硬化病変を発症する。(コンジェニックマウスとは、変異遺伝子を、導入しようとするドナー系統に 12 回以上の戻し交配を行って、ApoE 遺伝子以外の遺伝的背景をほぼ入れ替えたマウスのことである。) KOR マウスの実際の総血清コレステロール値は、3 週齢のマウスでおよそ 600 mg/dl で、26 週齢のマウスではおよそ 800 mg

表 6

gene	Visceral Adipose Tissues		Visceral Adipose Tissues		gene	Subcutaneous Adipose Tissues		Subcutaneous Adipose Tissues	
	aged 3 weeks	aged 26 weeks	aged 3 weeks	aged 26 weeks		aged 3 weeks	aged 26 weeks	aged 3 weeks	aged 26 weeks
Hoxa 1	(+)	(-)	(+)	(-)	Hoxd 1	(+)	(-)	(-)	(-)
Hoxa 2	(+)	(-)	(+)	(+)	Hoxd 3	(-)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 3	(+)	(-)	(+)	(-)	Hoxd 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 4	(-)	(-)	(-)	(-)	Hoxd 8	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxa 5	(+)	(-)	(-)	(+)	Hoxd 9	(+)	(+)	(-)	(-)
Hoxa 6	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 10	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 7	(-)	(-)	(-)	(-)	Hoxd 11	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 9	(+)	(-)	(-)	(-)	Hoxd 12	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 10	(+)	(+)	(+)	(+)	Hoxd 13	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxa 11	(+)	(+)	(+)	(+)	γ HOX	(-)	(+)	(-)	(-)
Hoxa 13	(+)	(+)	(+)	(+)	MSX 1	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxb 1	(-)	(+)	(+)	(+)	MSX 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 2	(-)	(-)	(-)	(-)	Pdx 1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 3	(-)	(-)	(-)	(-)	Cdx 2	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxb 4	(+)	(+)	(+)	(+)	Gbx 2	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxb 5	(-)	(-)	(-)	(-)	Nkx 6.1	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxb 6	(+)	(-)	(+)	(+)	Nkx 6.2	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxb 7	(+)	(+)	(+)	(-)	Nkx 2.2	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxb 8	(+)	(+)	(+)	(+)	Pax 6	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 9	(+)	(-)	(+)	(+)	Pax 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 13	(+)	(-)	(+)	(-)	Isl 1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 4	(+)	(+)	(+)	(+)	Hlxb 9	(+)	(+)	(-)	(-)
Hoxc 5	(+)	(-)	(+)	(-)	Brain 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 6	(+)	(+)	(+)	(-)	Glut 2	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 8	(-)	(-)	(+)	(-)	Hlx	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxc 9	(+)	(+)	(+)	(-)	c-myc	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxc 10	(-)	(-)	(+)	(-)	c-jun	(+)	(-)	(+)	(-)
Hoxc 11	(+)	(-)	(-)	(-)	jun-B	(-)	(-)	(-)	(-)
Hoxc 12	(-)	(-)	(-)	(-)	CXCR 4	(+)	(-)	(-)	(-)
Hoxc 13	(-)	(-)	(+)	(-)	cyclinD 1	(-)	(-)	(-)	(-)

/dl である。(ノーマルマウスの血清総コレステロール値は 100 mg/dl である。) 生後 3 週齢と生後 26 週齢の KOR マウスの腸管膜周囲内臓脂肪組織と皮下脂肪組織について、ホメオボックス遺伝子とその他細胞分化関連遺伝子の発現を評価した。

この遺伝子発現解析の結果を表 6 に示す。腸管膜周囲内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の両方において、3 週齢と脂質代謝異常を伴う動脈硬化病変関連病態の進行した 26 週齢の KOR マウスにおいて遺伝子発現プロファイルに変化の見られる特定の遺伝子が存在した。また、3 週齢 KOR マウスの内臓脂肪組織と皮下脂肪組織との比較自体においても、調査した 60 個の遺伝子中 12 個の遺伝子に発現プロファイルの差異が認められ、ホメオボックスファミリー遺伝子が組織特異的発現プロファイルを示すことから、これらそれぞれの脂肪組織(細胞)の性質がホメオボックスファミリー遺伝子発現制御の観点からも異なるものであることが考えられる。同様に、26 週齢 KOR マウスにおいても皮下脂肪組織と内臓脂肪組織において、16 個の遺伝子の発現が異なった。内臓脂肪組織においては、3 週齢と脂質代謝異常関連病態の進行した 26 週齢で病態の進展に関連して、発現に変化が見られた遺伝子は 21 個あり、その内、皮下脂肪組織では変化が見られず、内臓脂肪組織に特異的な変化を呈した細胞分化関連遺伝子は、Hoxa 2、Hoxa 9、Hoxb 1、Hoxb 6、Hoxb 9、Hoxc 11、Hoxd 1、 γ HOX、CXCR 4 である。皮下脂肪組織においては、同様に 3 週齢と 26 週齢で 23 個の遺伝子に変化があり、その内、皮下脂肪に特異的な変化を呈した遺伝子は、Hoxb 7、Hoxc 6、Hoxc 8、Hoxc 9、Hoxc 10、Hoxc 13、Hoxd 10、Hoxd 12、Gbx 2、Nkx 6.2、Hlx である。内臓脂肪組織と皮下脂肪組織に共に、病態の進展と関連して遺伝子発現プロファイルの変化した細胞分化関連遺伝子は、Hoxa 1、Hoxa 3、Hoxa 5、Hoxb 13、Hoxc 5、Hoxd 3、Hoxd 13、MSX 1、Cdx 2、Nkx 6.1、Nkx 2.2、c-jun である。内臓脂肪組織において、解析したホメオボックスファミリー遺伝子のうち、特に今回の実験に用いた 8 週齢の正常マウスと KOR マウスの 3 週齢の発現が同じで、26 週齢の KOR マウスにおける発現が異なるホメオボックス遺伝子は、Hoxa 2、Hoxa 3、Hoxb 9、Hoxb 13、Hoxd 13 である。皮下脂肪組織における同様の変化を示した遺伝子は、Hoxa 3、Hoxb 7、Hoxb 13、Hoxc 9、Hoxd 10、Hoxd 12、Hoxd 13 である。これらのホメオボックス遺伝子発現プロファイルの変化は、特に脂質代謝異常関連病態の進行による脂肪組織の性質の変化と関連し、その遺伝子発現プロファイルの変化が脂肪組織の病態と関係している可能性が示唆される。

前述のように、我々が実験に用いた 3 T 3-L 1 脂肪前駆細胞では、Day 4 から脂肪滴を蓄え始めており、脂肪細胞へと分化したことが他の脂肪細胞マーカー等と合わせて判断できるが、26 週齢の KOR マウスの細胞分化関連遺伝子発現プロファイルについて、Day 0 から Day 2 の脂肪細胞に分化する前の段階と、Day 4 から Day 8 の脂肪細胞が成熟する段階との発現プロファイルを比較検討したところ、病態の進行した 26 週齢の KOR マウスのホメオボックス遺伝子発現について比較解析すると、内臓脂肪組織においてみられた Hoxb 9 が、3 T 3-L 1 培養細胞では、Day 0 では発現しているが、分化誘導によって急速に down-regulation され、Day 2、Day 4 では発現せず、Day 8 の成熟脂肪細胞へと分化した段階では再び発現している。また、KOR マウスでは、

表7 Characteristics of differential profiles of homeobox genes

Gene	Roles in Growth & Differentiation
Hoxa 2	The encoded protein may be involved in the placement of hindbrain segments in the proper location along the anterior-posterior axis during development
Hoxa 9	Highly similar to the abdominal-B (Abd-B) gene of <i>Drosophila</i> A specific translocation event which causes a fusion between this gene and the NUP 98 gene has been associated with myeloid leukemogenesis
Hoxb 1	Role in neural crest development into glia of the peripheral nervous system
Hoxb 6	Involved in development of lung and skin Localized to both the nucleus and cytoplasm.
Hoxb 9	Increased expression of this gene is associated with some cases of leukemia, prostate cancer and lung cancer
Hoxc 11	Play a role in early intestinal development The product of this gene binds to a promoter element of the lactase-phlorizin hydrolase
Hoxd 1	Involved in the transcriptional regulation of key eukaryotic developmental processes

この Hoxb 9 については 3 週齢では発現しているが、病態の進んだ 26 週齢マウスでは発現していない。この発現の結果からも Hoxb 9 は、脂肪細胞の分化^(34,37)や脂質代謝異常の病態と関連して、内臓脂肪において何らかの役割を担っていることが推察される。

なお、この系において KOR マウスの内臓脂肪組織での 3 週齢と 26 週齢マウスとの比較から変化の認められたホメオボックス遺伝子のうち、皮下脂肪組織での同比較で変化の認められなかったホメオボックス遺伝子の従来報告されている発生分化における遺伝子機能を参考までにまとめると、表7のようになる。

(2) 高脂肪食負荷による肥満ラットを用いた解析

生体における食事による負荷、とくに高脂肪負荷の転写因子や細胞分化関連遺伝子発現における影響を研究するために、同様にホメオボックスファミリー遺伝子をはじめとする細胞分化関連遺伝子の発現を高脂肪食負荷による肥満ラットの系において解析・評価した。ラットは 3 週齢より普通食と高脂肪食をそれぞれ 8 週間投与し、その直後、腸管膜周囲内臓脂肪組織と皮下脂肪組織、視床下部の組織、褐色脂肪細胞、筋組織（ひらめ筋・ひ腹筋）から RNA を同様に抽出し、ホメオボックス遺伝子発現プロファイルの差異を評価・分析した⁽³³⁾。内臓脂肪組織と皮下脂肪組織、筋組織においては、コントロールである同種同週齢の普通食摂取ラット（control）と比較して、高脂肪食負荷時（DIO）に遺伝子発現プロファイルに差異がみられるかも比較解析した。

褐色脂肪細胞はヒトにおいて、白色脂肪細胞が全身に分布しているのに対し、その分布は首周りや脇の下、肩甲骨間、心臓、腎臓周囲などに限られる。また、白色脂肪細胞が、余剰のエネルギーを中性脂肪として貯蔵し、必要に応じて遊離脂肪酸を血中に放出する脂質貯蔵の役割を担っているのに対し、褐色脂肪細胞は、遊離脂肪酸を自らの細胞内で酸化分解し、脱共役蛋白質 (UCP 1) を介してエネルギーを消費する熱産生の役割を担う。PAI-1 や TNF- α 、レプチン、アディポネクチンなどの分泌も白色脂肪細胞に限られる。白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞におけるホメオボックス遺伝子の発現プロファイルの差異を見ることは、これらの細胞の性質の評価に有用であ

表 8

gene	Visceral Adipose Tissue		Subcutaneous Adipose Tissue		Hypothalamus		Brown Adipose Tissue
	DIO	Control	DIO	Control	DIO	Control	
Hoxa 4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Hoxa 10	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 11	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 13	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Hoxb 5	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Hoxb 9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Hoxb 13	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 8	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 11	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 10	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 13	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Cdx 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
c-jun	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

る。今回我々は、ラット褐色脂肪細胞におけるホメオボックス遺伝子の発現も同時に評価した。

腸管膜周囲内臓脂肪組織、皮下脂肪組織、視床下部組織、褐色脂肪細胞の実験結果を表 8、ひらめ筋細胞、ひ腹筋細胞の実験結果を表 9 に示す。まず、ラット脂肪組織の結果については、普通食コントロールラットにおいて、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織では、今回の我々の研究において、Hoxa 10 と Hoxa 13 の 2 つの遺伝子の発現に差異がみられ、これらの選択的な発現が各脂肪組織の性質に関与している可能性が示唆される。腸管膜周囲内臓脂肪組織においては、Hoxa 13 がコントロールラットでは発現しているのに対し高脂肪食負荷ラットにおいては発

表 9

gene	Gastrocnemius		Soleus	
	DIO	Control	DIO	Control
Hoxa 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 7	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 9	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxa 10	(-)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 11	(+)	(+)	(+)	(-)
Hoxa 13	(-)	(+)	(-)	(-)
Hoxb 5	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxb 9	(-)	(+)	(+)	(-)
Hoxb 13	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 6	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 8	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxc 11	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 1	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 3	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 4	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 10	(+)	(+)	(+)	(+)
Hoxd 13	(-)	(+)	(+)	(-)
Cdx 1	(+)	(+)	(+)	(+)
c-jun	(-)	(-)	(-)	(-)

現が見られなかった。また、皮下脂肪組織においては、Hoxa 10 がコントロールラットでは発現を確認できなかったが、高脂肪食負荷ラットにおいては、高いレベルの発現が確認され、逆に Hoxd 13 は、コントロールラットにおいては発現が見られたが、高脂肪食負荷ラットにおいてはその発現を確認できなかった。本実験結果において、褐色脂肪細胞 (BAT) は、今回調べた遺伝子のうち、Hoxb 9 と c-jun 以外の全ての遺伝子が発現しており、今回我々の結果では、その発現が内臓脂肪組織にも皮下脂肪組織のどちらか一方に類似しているわけではなかった。

ラットの筋組織のホメオボックス遺伝子発現プロファイルの解析結果は、表 9 に示したように、ひらめ筋とひ腹筋組織のコントロールラットにおけるホメオボックス遺伝子発現は、Hoxa 10、Hoxa 11、Hoxa 13、Hoxb 9、Hoxd 13 の 5 つの遺伝子において差異がみられた。高脂肪食負荷ラットの筋組織はひらめ筋、ひ腹筋共に、コントロールラットの筋組織とそれぞれ比較してホメオボックス遺伝子の発現プロファイルに変化が認められた。高脂肪食負荷により筋組織においても、細胞分化関連遺伝子レベルで発現プロファイルの違いが見られたことは、筋組織における高脂肪食負荷の影響が遺伝子発現制御の点でも病態と関連して変化していることの一例を示し、興味深いと考える。

更に前述した従来より脂肪組織において重要と考えられる表 1 に示したような PPAR γ や C/EBP 群などの転写因子、更には従来報告されている種々の転写因子に関して、脂肪細胞の分化や脂質異常症の脂肪組織の病態との関連、高脂肪食負荷の影響についても詳細に研究してきたが別稿に紙面の関係で述べる (submitted in publication)。

本稿で述べたように、脂肪組織においても、組織特異的転写因子としての各ホメオボックスファミリー遺伝子の協調的発現制御 (coordinate expression) は重要で、脂肪組織の特性や病態との関連で、各脂肪組織 (細胞) の性質が獲得されていると考えられる。つまり、脂肪組織において各ホメオボックス遺伝子の協調的発現制御は必要であるが、週齢、種、遺伝的背景に加えて、脂肪組織においても組織 (臓器) の種類や、脂質代謝異常などの病態、食餌など多くの因子との関連で変化することが本研究において明らかとなった。

現在、脂肪細胞における各ホメオボックスファミリー遺伝子や転写因子の導入やアンチセンス等による機能阻害実験、遺伝子欠損解析等により、より詳細に転写因子の発現制御及び機能と脂肪細胞の分化や性質の解析を行なっているところである。

8. 終わりに (結語)

以上述べたような方向の転写因子の研究は、最近スタートしたばかりであり、脂肪細胞特有の転写因子についても今後報告されてくると考える。また、ホメオボックスファミリー遺伝子を含む転写因子の脂肪細胞における機能や、脂質代謝異常等の肥満症関連病態における遺伝子発現プロファイルの変化や病態との関連については、今後の詳細な遺伝子産物の機能解析等の研究を待たねばならない。本来本稿で触れた、ホメオボックス遺伝子を含む多くの転写因子は、その複合

体としての組み合わせやカスケードの組み合わせで特異的に遺伝子発現を制御する。このような転写因子の組み合わせによる遺伝子の特異的発現制御の新しい研究の方向は、脂肪細胞の増殖や分化、ひいては脂肪細胞に関わる病態の研究にも今後寄与することが期待される。

本稿で詳述した特定のホメオボックス関連遺伝子の機能に関しては、従来のホメオボックス遺伝子の形態形成や発生における重要な機能に加え、広義のホメオボックスファミリー遺伝子産物の組織特異的 DNA 結合転写因子としての脂肪細胞における機能に加えて、脂質代謝異常を伴う肥満症関連病態の解明にひとつの糸口を提供しうると思われる。そして、特定の転写因子の研究において、脂肪細胞における組織特異的遺伝子発現の調節機能を通して、その遺伝子産物や異常分子による脂肪細胞の増殖分化の制御にも、ひとつの新たな方法論を提供し、肥満症や脂質異常症をはじめとする生活習慣病の病態の予防や診断に貢献することが期待される。

謝辞

最後になりましたが、暖かいご指導及び実験材料の提供にご協力頂いた国立循環器病研究所生化学部宮里幹也部長及び宮崎大学医学部伊達紫教授、そして、実験にご協力いただいた同志社女子大学生生活科学部出口ゼミのゼミ生に感謝いたします。

参考文献

- 1) Smas, C. M., Sul, H. S., *Biochem. J.*, 309, 697–710, 1995.
- 2) Gregoire, F. M., Smas, C. M., Sul, H. S., *Physiol. Rev.*, 78, 783–809, 1998.
- 3) Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M., *Annu. Rev. Biol.*, 16, 145–171, 2000.
- 4) Rosen E. D., et al., *Gene & Deve.* 16, 22–26, 2002.
- 5) Wu, Z. Rosen, E. D. Brun, *Mol. Cell*, 3, 151–158, 1999.
- 6) Porse R. T., et al., *Cell*, 107, 247–258, 2001.
- 7) Tsukada, S., et al., *Mol. Endocrinol.*, 147, 1685–1695, 2006.
- 8) Ingraham, H. A., Chen, R., Mangalam, H. J. et al., *Cell*, 55, 519, 1988.
- 9) He, X., Treacy, M. N., Simmons, D. M. et al., *Nature*, 340, 35, 1989.
- 10) Sturm, R. and Herr, W., *Nature*, 336, 601–604, 1988.
- 11) Deguchi, Y., Moroney, J. F., Wilson, G. L. et al., *New biologists*, 3, 353, 1991.
- 12) Deguchi, Y., Fox, C. and Kehrl, J. H., *Blood*, 79, 2841, 1992.
- 13) Kongsuwan, K., Webb, E., Housiack, P. et al., *EMBO J.*, 7, 2131, 1988.
- 14) Deguchi, Y., Moroney, J. F., Kehrl, J. H., *Blood*, 78, 445, 1991.
- 15) Magli, M. C., Barba, P., Celetti, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 6348, 1991.
- 16) Deguchi, Y., Kirshenbaum, A. and Kehrl, J. H., *Blood*, 79, 2841–2848, 1992.
- 17) Desplan, C., Thesis, J., O'Farrell, P. H., *Nature*, 318, 630–635, 1985.
- 18) Hoey, T., Levine, M., *Nature*, 332, 858–861, 1988.
- 19) Otting, G., Qian, Y.-q., Muller, M., Affolter, M., Gehring, Wand Wuthrich, K., *EMBO. J.*, 7, 4305–4309, 1988.
- 20) Sturm, R. A., Herr, W., *Nature*, 336, 601–605, 1988.
- 21) Finney, M., Ruvkun, G. and Horvitz, H. R., *Cell*, 55, 757–769, 1988.
- 22) Clerc, R. G., Corcoran, L. M., LeBowitz, J. H., Baltimore, D. and Sharp, P. A., *Genes & Dev.*, 2, 1570–1581, 1988.
- 23) Sturm. R. A., Das, G. and Herr, W., *Genes & Dev.*, 2, 1582–1599, 1988.

- 24) Beachy, P. A., Krasnow, M. A., Gavis, E. R. and Hogness, D. S., *Cell*, 55, 1069–1081, 1988.
- 25) Cohen, S. M., Brunner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. and Jackle, H., *Nature*, 38, 432–434, 1989.
- 26) Jaynes, J. B. and O'Farrel, P. H., *Nature*, 336, 744–749, 1988.
- 27) Han, K. H., Levine, M. S., and Manley, J. L., *Cell*, 56, 573–583, 1989.
- 28) Schhier, A. F. and Gehring, W. J., *Nature*, 356, 804–807, 1992.
- 29) Jones, F. S., Prediger, E. A., Bittner, D. A., De Robertis, E. M. and Edelman, G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 2086–2090, 1992.
- 30) Jones, F. S., Chalepakis, G., Gruss, P. and Edelman, G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 2091–2095, 1992.
- 31) Violette, S. M., Shashikant, C. S., Salbaum, J. M., Belting, H. G., Wang, J. C. H. and Ruddle, F. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 3805–3809, 1992.
- 32) Arcioni, L., Simeone, A., Guazzi, S., Zappavigna, V., Boncinelli, E. and Mavilio, F., *EMBO J.*, 11, 265–277, 1992.
- 33) Guo, X. and Liao, K., *Gene*, 251, 45–53, 2000.
- 34) Tamori, Y., Kawanishi, M., Niki, T., Shinoda, H., Araki, S., Okazawa, H., Kasuga, M., *J. Biol. Chem.*, 273, 19740–19746, 1998.
- 35) Deguchi, Y., et al. In press.
- 36) Deguchi, Y., et al. In press.
- 37) Nadler, S. T., Stoehr, J. P., Schueler, K. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 11371–11376, 2000.

[でぐち やすひろ 内科学、臨床病態学、健康科学]