

## 論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 239 号	氏名	黒田 雅士
題 目	DNA Methylation Suppresses Leptin Gene in 3T3-L1 Adipocytes (DNAメチル化は3T3-L1脂肪細胞におけるレプチン発現を抑制する)		
<p>【目的】レプチンは脂肪細胞より分泌され摂食やエネルギー代謝に関与するとともに2型糖尿病などの生活習慣病の病態においても重要な役割を担っている。一方、培養系の脂肪細胞として用いられる3T3-L1脂肪細胞株におけるレプチンはマウス脂肪細胞に比較して低発現であることが知られる。我々は、3T3-L1脂肪細胞でのレプチン発現におけるDNAメチル化の意義とその発現を制御する機構に関して検討した。</p> <p>【方法】マウス脂肪組織及び3T3-L1脂肪細胞株よりゲノムDNAを抽出し、レプチンの転写開始点から-107bp~+43bpにおける10ヶ所のCpG部位のメチル化比率を検討した。DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)阻害薬である5-アザシチジン(5-aza-C)で処理した3T3-L1前駆脂肪細胞を分化誘導して3T3-L1AZ脂肪細胞を作製した。この脂肪細胞におけるレプチンmRNA発現量及びDNAメチル化比率について解析した。また、3T3-L1細胞においてDNMT1をsiRNAによりノックダウンし、分化誘導後レプチン発現及びDNAメチル化比率を解析した。脂肪細胞肥大時のレプチン発現誘導に対するDNAメチル化の影響について検討を行うため、高脂肪食負荷肥満モデルマウス脂肪組織のメチル化解析を行った。</p> <p>【結果】3T3-L1脂肪細胞ではマウス脂肪組織に比べレプチンプロモーターが高度にメチル化されていた。3T3-L1前駆脂肪細胞に対する5-aza-C処理はレプチンプロモーター上のCpGメチル化比率を低下させ、脂肪分化誘導後のレプチン発現を著明に増加させた。DNMT1ノックダウン後、分化誘導した3T3-L1脂肪細胞についても同様にDNA脱メチル化が生じ、レプチン発現の誘導が確認された。高脂肪食負荷による肥満の誘導によってマウス脂肪組織のレプチン発現は顕著に増加する。この時、脂肪細胞でのレプチンプロモーターのメチル化比率は変化なかった。</p> <p>【結論】3T3-L1脂肪細胞におけるレプチン発現に関し脂肪前駆細胞におけるDNA脱メチル化と脂肪細胞分化に伴う転写因子の活性化が重要である。脱メチル化処理により作製した3T3-L1脂肪細胞株はレプチン発現解析における有用なツールになる可能性が示された。</p>			

報告番号	甲 栄 第 239 号	氏名	黒田 雅士
審査委員	主査 宮本 賢一 副査 竹谷 豊 副査 馬渡 一諭		
<p>                     題目 DNA Methylation Suppresses Leptin Gene in 3T3-L1 Adipocytes                      (DNAメチル化は3T3-L1脂肪細胞におけるレプチン発現を抑制する)                 </p> <p>                     著者 Masashi Kuroda, Ayako Tominaga, Kasumi Nakagawa, Misa Nishiguchi, Mayu Sebe, Yumiko Miyatake, Tadahiro Kitamura, Rie Tsutsumi, Nagakatsu Harada, Yutaka Nakaya, Hiroshi Sakaue                 </p> <p>                     平成 28 年 8 月発行 PLOS ONE 雑誌第11巻第8号e0160532 発表済                 </p> <p> <b>要旨</b>                      脂肪細胞より分泌されるアディポサイトカインの一つであるレプチンは、過剰の脂肪蓄積により発現が増加する。レプチンは末梢のエネルギー状態を中枢へ伝達する分子であり、主に摂食抑制、エネルギー代謝亢進などの作用を示す。一方でレプチンによる制御機構の異常はエネルギーバランス維持機構の破綻を招き、実際にレプチン作用を欠損したマウスでは高度な肥満、2型糖尿病を呈することが知られる。以上のようにレプチンはエネルギー恒常性の維持に重要な役割を果たす一方、その転写調節機構に関して不明な点も多い。その原因の一つとして十分なレプチン発現能を有する培養脂肪細胞株が存在していないという点が挙げられる。例えば、培養脂肪細胞株として広く用いられるマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞におけるレプチン発現はマウス脂肪組織などに比し、数百分の一程度である。この培養脂肪細胞におけるレプチン低発現に関し、DNA メチル化による制御機構の関与が想定されている。そこで本研究では培養脂肪細胞でのレプチン発現制御における DNA メチル化の役割を検討するため、まず 3T3-L1 脂肪細胞とマウス脂肪組織におけるレプチン転写開始点近傍の 10 か所の CpG 部位 (-107~+43bp) のメチル化比率を比較した。次に DNA 脱メチル化処理を行うことにより、3T3-L1 脂肪細胞におけるレプチン発現の誘導を試みた。また肥満は脂肪組織におけるレプチン mRNA 発現を著明に増大させることから、高脂肪食負荷肥満モデルマウスの脂肪組織におけるメチル化解析を実施した。結果は以下の通りである。                 </p> <p>                     マウス脂肪組織に比べ、3T3-L1 脂肪細胞においてレプチンプロモーターが高度にメチル化されていた。DNA メチルトランスフェラーゼ I 阻害薬である 5-Aza-2'-deoxycydine (5-aza-C) を用い、3T3-L1 脂肪前駆細胞を処理したところ、非処理細胞に比し有意な脱メチル化が生じていた。しかし、この時レプチン mRNA 発現誘導は認められなかった。この 5-aza-C 前処理した 3T3-L1 前駆細胞を分化誘導した成熟脂肪細胞ではレプチン mRNA 発現が著明に誘導された。また、5-aza-C 前処理 3T3-L1 脂肪細胞は、レプチン mRNA 発現に関しインスリンなど液性因子による調節を受けることが明らかになった。しかしながら、高脂肪食負荷肥満モデルマウスにおける DNA メチル化解析を実施したところ、脂肪細胞レプチンプロモーターのメチル化状態に変化は認められなかった。                 </p> <p>                     以上より、レプチン発現に関して前駆細胞における DNA 脱メチル化及び脂肪細胞の分化に伴う転写活性化の重要性が示された。一方、肥満により生じるレプチン発現の増大は DNA のメチル化制御に依存しないということが示唆された。本研究において作製した DNA 脱メチル化 3T3-L1 脂肪細胞はレプチン高発現であり、液性因子による制御を受けることから、培養系でのレプチン発現解析モデルとして有用である。                 </p> <p>                     本研究はレプチン遺伝子発現に対する DNA メチル化の意義を明らかにし、肥満病態解明に貢献するものであることから、博士(栄養学)の学位授与に値するものと判定した。                 </p>			