

氏名	る 山	しゃん 山
学位の種類	博士 (農学)	
学位記番号	甲第338号	
学位授与年月日	平成16年 3月12日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Regulation of arachidonate cyclooxygenase pathway during the process of adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells (3T3-L1 培養細胞の脂肪細胞への分化誘導過程におけるアラキドン酸シクロオキシゲナーゼ経路の調節)	
学位論文審査委員	(主査) 横田一成 (副査) 地阪光生 梶原忠彦 山野好章 藤原勉	

学位論文の内容の要旨

Obesity is a risk factor to cause complicated diseases such as diabetes and others. Obesity accompanies an increase in the number or size of adipocytes, which should involve the changes in the life cycle of fat cells. During these processes, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , which is a member of nuclear receptors, plays an important role in the differentiation and the progression of insulin resistance in adipocytes. For the activation of PPAR γ , the prostaglandin (PG)D₂ dehydration product, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ is the most effective as an endogenous ligand. Nevertheless, it remains unclear about the origin of these prostanoids during the adipogenesis.

To evaluate the ability of adipocytes to induce the gene expression of cyclooxygenase (COX) pathway to provide PGJ₂ derivatives, we determined the transcriptional activation of isoforms of COXs and PGD synthases (PGDSs) as well as PPAR γ . This analysis revealed that the PPAR γ mRNA level increased significantly within several hours and maintained during the maturation phase. The transcription of COX-2 isoform gene was enhanced transiently during the induction of differentiation or the maturation process, whereas the COX-1 gene was constitutively expressed. Moreover, the analysis of isoforms of PGDS showed that the expression of the lipocalin-type PGDS (L-PGDS) gene was only detectable and the mRNA level increased gradually following the progression of mature adipogenesis. Almost there was no expression of hematopoietic-type PGDS. These results suggest that cultured 3T3-L1 cells have capacity to induce the transient expression of COX-2 during the triggering of mature process of adipocytes, and to cooperate with newly induced L-PGDS isoform to form PGD₂ which is a precursor of PGJ₂ serving as an endogenous ligand for PPAR γ .

Moreover, in terms of functional links between COX isoforms and PG synthases, we studied the regulation about the gene expression of several isoforms of the biosynthetic enzymes in the arachidonate COX pathway to produce PGs by employing an adipogenic cell line of 3T3-L1 cells. These analyses revealed that specific and unique transcript levels of the isoforms of COX pathway including COXs, PGD synthases, and PGE synthase (PGES). Moreover, we confirmed the formation of the immunoreactive PGD₂ from arachidonic acid by the mature adipocytes. Thus, the mature adipocytes were able to form PGD₂, presumably resulting in its conversion into PGJ₂ derivatives. As for the expression of PGES, both cytosolic and membrane-associated subtypes are expressed similarly at relatively constant levels through the life cycle. However, the ability of preadipocytes to produce PGE₂ was greater than mature adipocytes in response to a mixture of phorbol diester and calcium ionophore. The studies using aspirin revealed the maturation process required the basal synthesis of prostanoids with adipogenic effects mainly through the coupling of constitutive COX-1 with the corresponding PG synthases. Moreover, the treatment of the mature adipocytes with exogenous PGD₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and PGE₂ in the presence of aspirin enhanced the adipogenesis, which was in sharp contrast with the inhibitory effect of PGF_{2 α} . These findings imply the specific roles of prostanoids produced by the mature adipocytes in the maintenance of terminal differentiation through an autocrine control mechanism.

論文審査の結果の要旨

肥満では、過剰な脂肪蓄積が起こるが、それ以上に問題となるのがインスリン抵抗性のような脂肪細胞機能の著しい変化である。これらの過程で中心的な働きを示すのが、核内受容体で転写因子のペルオキシソーム増殖剤応答性因子 (PPAR)の γ 型である。この核内受容体の活性化には、低分子性のリガンドが必要である。最近になって、天然の生理活性物質として、内因性リガンドの脂肪酸関連物質やエイコサノイド化合物のあるものに活性化作用が見出されている。そして、アラキドン酸シクロオキシゲナーゼ (COX) 経路で生合成されるプロスタノイドの一種の 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) が最も極力な活性化効果を示すことが確認されている。しかし、このプロスタノイドを含めたエイコサノイド類の生合成経路のアラキドン酸カスケード反応経路の遺伝子発現や発現調節、さらに、内因性エイコサノイド類の作用は不明な点が多い。そこで、本研究は、脂肪細胞とその関連細胞でのアラキドン酸カスケード反応経路、特に、COX 経路を中心に研究を行った。実験系には、哺乳動物の培養細胞で脂肪細胞への分化誘導能を示すマウスの前駆脂肪細胞株の 3T3-L1 細胞を用いている。

最初に、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導過程において、PPAR γ の活性化リガンドとして作用をもつ PGJ₂ 誘導体を生合成するアラキドン酸 COX 経路の生合成酵素のアイソフォームの遺伝子発現様式を検討した。それらの結果、脂肪細胞の終末分化相への誘導を起こすことに伴って、核内受容体の PPAR γ の遺伝子発現の著しい増加と、その後の安定した遺伝子発現レベルが脂肪細胞の成熟期に認められた。一方、アラキドン酸カスケード反応経路の律速酵素の COX アイソフォームの遺伝子発現量を測定すると、前駆脂肪細胞の生育期、分化誘導期、そして、成熟期に渡って、ほぼ構成的に発現されていることが確認された。それに対して、誘導型の COX-2 は、分化誘導期の数時間と成熟

期の数時間のそれぞれに、二相的で一過的な遺伝子発現量の増加を示した。PGJ₂ 誘導体の生成には、COX 反応と PGD 合成酵素の関与が必要となる。今回の研究で、脳などの中枢神経系で発現しているリポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) の発現が選択的に成熟期で発現していることを明らかにした。脂肪細胞の終末分化相の進行に従いその転写レベルの増加を観察した。対照的に、脾臓などで発現している造血器型の酵素の発現は、ほとんど認められなかった。これらの結果より、3T3-L1 脂肪細胞は、脂肪細胞の分化誘導過程の進行に伴って誘導される L-PGDS アイソフォームと COX との反応との共役により、PGD₂ とそれに由来する PGJ₂ 誘導体の生成が起こるものと考えられた。

次に、他の COX 経路のプロスタノイド類の生合成経路の遺伝子発現についても検討した。その結果、PGE 合成酵素アイソフォームの遺伝子発現レベルを調べたところ、膜結合型と細胞質型の酵素の両方のタイプが脂肪細胞のライフサイクルの変化にかかわらず検出された。しかし、前駆脂肪細胞から分化誘導期を経て成熟期に進行するに従い、酵素免疫測定法で測定した PGE₂ レベルの低下が認められた。一方、脂肪細胞の終末分化相での L-PGDS の遺伝子発現レベルの増加は PGD₂ の生成量の増加を想定させたので、酵素免疫測定法で成熟期の PGD₂ 生成量を測定した。その結果、PGD₂ の生合成活性は、成熟期に一定のレベルで検出された。このことから、核内受容体の PPAR γ の内因性リガンドとなる 15d-PGJ₂ を含む PGJ₂ 誘導体が生成できると考えられる。COX 阻害剤のアスピリンの存在下に、種々の PG 類で処理したところ、PGD₂ と 15d-PGJ₂ は、脂肪蓄積量を増加したことから、脂肪細胞の分化誘導過程で構成的に存在する COX と L-PGDS が共役して、これらの PG の生成に関与するものと考えられた。これらの知見から、成熟脂肪細胞が生成する内因性のプロスタノイド類は、オートクライン的な調節機構を介して終末分化誘導期の脂肪細胞の脂肪合成に寄与することがわかった。

以上のように、本論文では、脂肪細胞のライフサイクルの変化における PG 類の生合成系のアラキドン酸カスケード反応経路の COX 系反応経路の生合成酵素のアイソフォームの遺伝子発現の調節に関する新規の研究の知見を得た。これらの知見は、さらに、種々の代謝調節因子や食品由来因子の作用に伴うアラキドン酸カスケード反応経路の調節機構に関する研究への進展につながる基盤研究として重要なものと判断できる。本審査委員会は、本学生が、本学連合農学研究科博士課程修了者として十分な学力と見識を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるのに適合していると判断した。