

2013 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

メタボリックシンドローム治療を目指した  
脂肪細胞におけるレジスチン生理作用の解明

京都薬科大学大学院

薬品物理化学分野

池田 義人



本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Yoshito Ikeda, Susumu Hama, Kazuaki Kajimoto, Takashi Okuno, Hiroyuki Tsuchiya, and Kentaro Kogure : Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 865-870 (2011) [第1章]
- 2) Yoshito Ikeda, Hiroyuki Tsuchiya, Susumu Hama, Kazuaki Kajimoto, and Kentaro Kogure : Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells. *FEBS. J.*, **280**, 5884-5895 (2013) [第1章第3節及び第2章]

## 略語表

ACC-2	<u>A</u> cetyl- <u>C</u> oA <u>c</u> arboxylase- <u>2</u>
ACE	<u>A</u> ngiotensin- <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme
A-FABP	<u>A</u> dipocyte- <u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
APS	<u>A</u> mmonium <u>P</u> eroxodisulfate
BMI	<u>B</u> ody <u>m</u> ass <u>i</u> ndex
BSA	<u>A</u> lbumin, from <u>b</u> ovine <u>s</u> erum, <u>E</u> ssentially <u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>f</u> ree
C/EBP $\alpha$	<u>C</u> CAAT/ <u>e</u> nhancer <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u><math>\alpha</math></u>
ChREBP	<u>C</u> arbo <u>h</u> ydrate <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
CPT-1	<u>C</u> arnitine <u>p</u> almitoyl <u>t</u> ransferase- <u>1</u>
DEX	<u>D</u> examethasone
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>m</u> edium
DTNB	5, 5'- <u>d</u> ithiobis (2- <u>n</u> itro <u>b</u> enzoate)
FASN	<u>F</u> atty <u>a</u> cid <u>s</u> ynthase
FBS	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum
GLUT4	<u>G</u> lucose transporter type <u>4</u>
GPAT	<u>G</u> lycerol 3-phosphate <u>a</u> cyl- <u>t</u> ransferase
HB-EGF	<u>H</u> eparin- <u>b</u> inding <u>E</u> GF-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
HEPES	2-[4-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-piperazinyl] <u>e</u> thanesulfonic acid
IBMX	3- <u>I</u> sobutyl-1- <u>m</u> ethyl <u>x</u> anthine
INS	<u>I</u> nsulin
NP-40	IGEPAL CA-630
PAI-1	<u>P</u> lasminogen <u>a</u> ctivator <u>i</u> nhibitor- <u>1</u>
PBEF	<u>P</u> re- <u>B</u> Cell colony- <u>e</u> nhancing <u>f</u> actor
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PPAR $\gamma$	<u>P</u> eroxisome proliferator- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor <u><math>\gamma</math></u>
RIPA	<u>R</u> adio <u>i</u> mmunoprecipitation <u>a</u> ssay
SCD-1	<u>S</u> tearoyl- <u>C</u> oA <u>d</u> esaturase- <u>1</u>
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl sulfate
SREBP-1	<u>S</u> terol <u>r</u> egulatory <u>e</u> lement <u>b</u> inding <u>p</u> rotein- <u>1</u>
T3	3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine
T4	L-Thyroxine
TEMED	N, N, N', N'- <u>T</u> etramethyl- <u>e</u> thylenediamine
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor- <u><math>\alpha</math></u>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Tween20	Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate

WB

Western blotting

WHO

World health organization

## 目次

要旨 .....	1
緒論 .....	4
<b>第1章 脂肪細胞の分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動</b>	
諸言 .....	9
実験方法 .....	10
結果 .....	18
考察 .....	24
<b>第2章 レジスチンの脂肪細胞における脂質代謝への関与</b>	
諸言 .....	26
実験方法 .....	27
結果 .....	40
考察 .....	51
<b>第3章 レジスチンを中心としたアディポサイトカイン発現関連の解析</b>	
諸言 .....	53
実験方法 .....	53
結果 .....	54
考察 .....	55
総括 .....	57
謝辞 .....	58
参考文献 .....	59

## 要旨

### はじめに

メタボリックシンドロームは、“内臓脂肪の蓄積に加えて、高血糖、高脂血症、高血圧のうちいずれか2つ以上を併発した病態”と定義され、脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病等の重篤な疾患の発症リスクを上昇させると考えられている。そのため、肥満者の増加が深刻な状況にある先進諸国を中心に、メタボリックシンドロームの効果的な治療薬の開発が求められている。メタボリックシンドロームの増悪には、脂肪細胞から分泌される生理活性物質、すなわちアディポサイトカインの発現異常が関与することが報告されている。さらに、複数のアディポサイトカインの発現バランスの崩壊がメタボリックシンドロームの病態を複雑化し、治療を困難にしていると考えられている。本研究では、食事療法や運動療法を補助し、メタボリックシンドローム患者において崩壊したアディポサイトカイン発現バランスの是正を介して重篤な疾患の発症リスク減少を可能とする新規治療ターゲットの探索を目指した。脂肪細胞において産生、分泌されるアディポサイトカインは、本来、脂肪細胞の分化や成熟化、機能性維持などの生理作用を有していると考えられるが、その詳細については不明な点が多い。著者は、「アディポサイトカインの発現は各々が独立しているのではなく、相互に影響しあうことで発現連関を形成しているため、メタボリックシンドロームの病態をより複雑化させているのではないかと考え、複数のアディポサイトカイン発現に影響を及ぼすものが、アディポサイトカイン発現バランスの是正によるメタボリックシンドローム治療のターゲットとして有用なのではないかと仮説を立てた。

### 1. 脂肪細胞の分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動

脂肪細胞成熟化と複数のアディポサイトカイン発現との関係性を解明し、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補を見出すための検討を行った。はじめに、野生型及び肥満モデルラットの精巣上体白色脂肪組織における各種アディポサイトカイン遺伝子の発現量を評価した。その結果、肥満時に血中濃度が減少するアディポネクチンの発現量に減少がみられた。さらに、肥満時に血中濃度が増加する Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、Heparin-binding EGF-like growth factor の発現量に増加傾向がみられた。一方、肥満時に血中濃度が増加すると報告されているレジスチンの発現量は予想外に減少していた。次に、野生型及び肥満モデルラットの脂肪細胞を初代培養し、分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動を評価した。その結果、脂肪組織を用いた検討とは異なり、初代培養脂肪細胞では野生型及び肥満モデルラット由来それぞれの脂肪細胞間の分化・成熟過程における各アディポサイトカイン遺伝子発現変動に違いはみられなかった。このことから、これら初代培養脂肪細胞の分化・成熟過程におけるアディポサイトカイン発現パターンは共通しており、肥満進展の過程とは独立していると考えられた。また、株化脂肪細胞 3T3-L1 の成熟過程におけるアディポサイトカインの遺伝子発現変動を評価したところ、アディポネクチン、レプチン、レジスチンの発現変動は初代培養脂肪細胞の成熟過程における発現変動と類似し増大していた。そのため、これらアディポサイトカインは脂肪細胞成熟化において重要な役割を果たしていると考えられた。中でも肥満時にみられる血中濃度の増加が多数の疾患の病態悪化に関与すると考えられているレジスチンは、培養脂肪細胞の成熟化に伴って発現が顕著に増大したにもかかわらず、肥満時脂肪組織における発現量は減少していたなど特徴的であった。そのため著者は、レジスチンは他のアディポサイトカイン発現制御を含む脂肪細胞の成熟化に重要な生理作用を有する一方、メタボリックシンドロームの病態を複雑化させている要因の1つではないかと推察した。すなわち、レジスチンがメタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として有用ではないかと考えるに至った。

## 2. レジスチンの脂肪細胞における脂質蓄積への関与

肥満時にみられるレジスチンの血中濃度増大は全身性の慢性的な炎症を惹起し、インスリン抵抗性をはじめ、様々な疾患の病態悪化に関与すると考えられている。しかし、脂肪細胞におけるレジスチンの生理作用については不明な点が多い。そこで、3T3-L1脂肪細胞の成熟過程におけるレジスチン発現を制御することで、脂肪細胞に対するレジスチンの生理作用解明を試みるとともに、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補としての有用性を評価した。その結果、著者は、レジスチン発現をsiRNAによって抑制した脂肪細胞において脂質蓄積量が有意に減少することを初めて発見した。さらに、レジスチン発現プラスミドDNAを導入したCOS7細胞の培養上清を3T3-L1細胞に添加することで、レジスチン発現抑制による脂質蓄積量の減少が回復することを見出した。このことから、レジスチンが脂肪細胞における脂質蓄積に関与している可能性が示唆された。脂質蓄積メカニズムを検討したところ、レジスチン発現抑制時に、脂肪細胞への分化に重要な転写因子であるPeroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 、CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ の発現に変化はみられなかった。ところが、詳細な検討により、多数の脂質合成酵素の発現に関与する転写因子Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)のタンパク質量の減少と転写活性の低下を見出すとともに、ChREBPの標的遺伝子であるFatty acid synthase、Acetyl-CoA carboxylase 2の発現量が減少することを明らかにした。さらに、脂質 $\beta$ 酸化に関与するCarnitine palmitoyl transferase-1の活性化も見出した。これらの結果より、レジスチン発現抑制はChREBP転写活性の抑制を介して、脂質合成の抑制及び脂質 $\beta$ 酸化の活性化(脂質消費)を誘導していることが示唆された。さらに、高脂肪食摂餌マウスに抗レジスチン抗体を定期的に投与した結果、脂肪組織/体重比や血中トリグリセリド濃度、肝臓内脂質含量の増大が抑制された。結論として、レジスチンは脂肪細胞における脂質蓄積の促進に関与することが強く示唆されたことから、メタボリックシンドローム時におけるレジスチンの生理作用を制御することが、肥満の改善に有用であると考えられた。

## 3. レジスチンを中心としたアディポサイトカイン発現関連の解析

上記の検討からレジスチンは、脂肪細胞の成熟化に重要であり、生理作用の1つとして脂質蓄積の促進に関与していることが示唆された。そのため、他のアディポサイトカインの発現にも大きく影響を与えているのではないかと考えた。そこで、レジスチンと他のアディポサイトカインとの間に発現関連が存在するのかどうかを明らかにする為、レジスチン発現抑制が及ぼす他のアディポサイトカインの発現への影響について検討した。その結果、塞栓症の発症リスクを上昇させる PAI-1 の遺伝子発現量及びタンパク質分泌量に顕著な減少がみられた。また、レジスチン含有培養上清の添加によって、レジスチン発現抑制脂肪細胞における PAI-1 の遺伝子発現量及びタンパク質分泌量の減少が回復した。このことから、アディポサイトカイン発現関連の1つとして、レジスチンによる PAI-1 発現制御が存在する可能性が示唆された。

### 総括

本研究では、メタボリックシンドロームの効果的な治療ターゲットの探索を目指して、アディポサイトカインの発現変動に注目した。その結果、アディポサイトカインの中でレジスチンが、メタボリックシンドロームの病態を複雑化させている要因の1つではないかと推察した。そして、レジスチンの脂肪細胞に対する生理作用として脂質蓄積の促進への関与が示唆された。また、レジスチンは脂肪細胞において PAI-1 の発現を制御している可能性が示唆された。これらのことから、メタボリックシンドローム時におけるレ



ジスチンの生理作用を制御することで、肥満の改善や PAI-1 発現制御による塞栓症の予防につながることを期待される。すなわち、レジスチンはメタボリックシンドロームの治療ターゲットとして有用であると考えられる。

## 緒論

### 肥満者の増加と生活習慣病

飽食と運動不足によって、先進諸国を中心に肥満者の数が増大している。世界保健機関(World health organization; WHO)が発表した「世界保健統計」によると、肥満者の数は1980年から2008年の間に約2倍に増加し、5億人以上とみなされている。さらに近年、5歳以下の子供における肥満の増加も問題視されている。肥満の指標には、体重と身長から求められる Body mass index (BMI; kg/m<sup>2</sup>) が用いられており、WHOではBMI 30以上を肥満と定義しているが、日本では日本肥満学会がBMI 25以上を肥満と定義している(図1)。これは、日本人が肥満に起因する疾患を発症しやすく、その頻度が欧米に匹敵しているためである。さらに、内臓脂肪面積が100 cm<sup>2</sup>以上且つ高血圧(130/85 mmHg以上)、高脂血症(トリグリセリド値150 mg/dL以上、またはHDLコレステロール値40 mg/dL未満)、高血糖(110 mg/dL以上)の3項目のうち2項目以上に該当するとメタボリックシンドロームと診断される。そして、メタボリックシンドロームは脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病等の重篤な疾患の発症リスクを上昇させると考えられている[1, 2]。2012年に厚生労働省が発表した「人口動態統計の年間推計」によると、心疾患は死因の第2位、脳血管疾患は第4位であり、これらを生活習慣病として捉えると総死亡数の約40%に相当する(図2)。2000年に「21世紀における国民健康づくり運動」として施行された「健康日本21」によってメタボリックシンドロームを認知している国民の割合が増加した。さらに、2012年に改正された「健康日本21(第2次)」では、生活習慣病の発症予防だけでなく重症化予防にも重点が置かれている。そして、肥満及びメタボリックシンドロームの予防、改善には食事療法と運動療法が推奨されている[3, 4]。しかし、厚生労働省から発表される「国民健康・栄養調査」によると、運動習慣のある人(1回30分以上の運動を週2日以上実施し、1年以上継続している者)の割合が2003年に比べ2011年では、若干の上昇を示しているが、肥満者の割合はさほど変化していない。これらの結果より、運動は肥満でない人に習慣づいていても、既に肥満である人には継続が困難となっていることが推察される(図3)。このような現状から、肥満者に対して食事療法や運動療法を補助し、メタボリックシンドロームに起因する重篤な疾患の発症予防及び改善を可能とする治療薬の開発が求められている。



図1. 肥満の指標 BMI と肥満度分類 (日本肥満学会)

日本ではBMIが25以上を肥満と定義している。また肥満は、1から4度に分類され、BMIが35以上を高度肥満と定義して治療の対象としている。

日本のメタボリックシンドローム診断基準

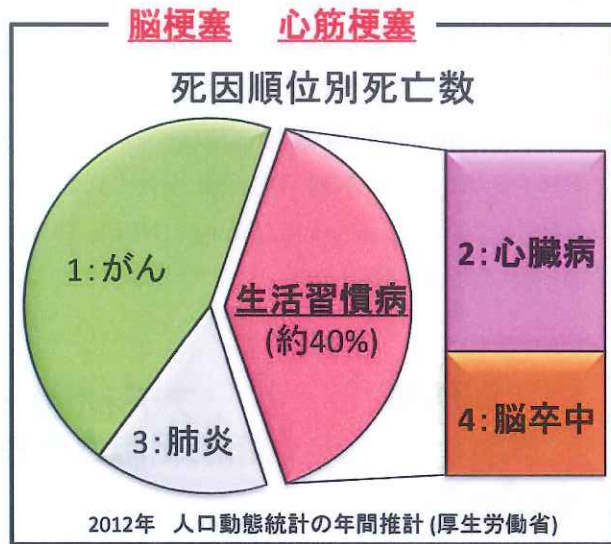
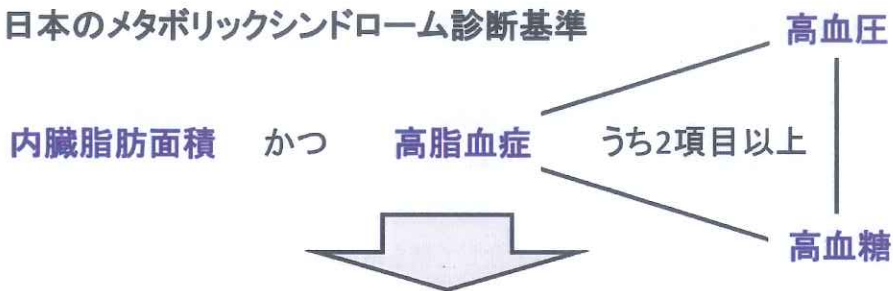


図2. メタボリックシンドローム診断基準と死因順位別死亡数

内臓脂肪の蓄積と高血圧、高血糖、高脂血症のうち2項目以上に該当するとメタボリックシンドロームと診断される。生活習慣病として分類される心臓病、脳卒中は日本の死因として約40%を占める。

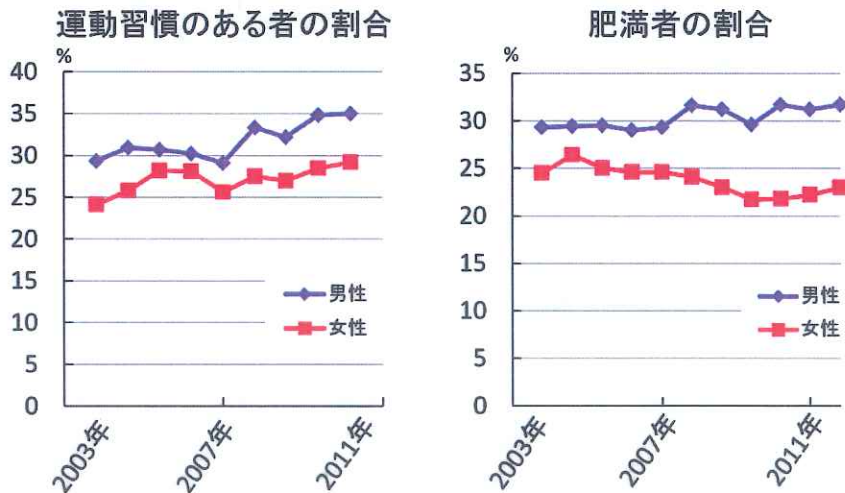


図3. 運動習慣のある者の割合の年次推移と肥満の者の割合の年次推移

1回30分以上の運動を週2日以上実施し、1年以上継続している者を運動習慣のある者と定義している。BMIが25以上の者を肥満者と定義している。(2011年 国民健康・栄養調査結果)

## 脂肪組織における脂質貯蓄とアディポサイトカイン分泌

脂肪組織には褐色脂肪組織と白色脂肪組織の2種類が存在する[5]。褐色脂肪組織にはミトコンドリアが豊富に存在し、主に熱に変換することで脂肪酸由来のエネルギーを消費する。一方、白色脂肪組織(以降、脂肪組織)は余剰のエネルギーをトリグリセリドに変換することで効率良く貯蓄し、必要時に供給する。具体的には、Glucose transporter type 4 (GLUT4)を介して糖を取り込み、脂肪酸を合成するほか、Fatty acid transporter proteinsを介して、肝臓で産生された脂肪酸を取り込み、脂肪酸をトリグリセリドに変換する[6]。エネルギー不足時には、ホルモン感受性リパーゼや Adipose triglyceride lipase の作用によって、トリグリセリドから脂肪酸が切り出され血中へと放出されることが知られている[7]。ところが近年、アディポサイトカインという概念が確立されたことで、脂肪組織は脂質の貯蓄臓器のみならず、分泌臓器としても認識されようになった(図4)。アディポサイトカインは脂肪細胞から産生、分泌されるサイトカインの総称であり、アディポネクチンやレプチン、レジスチン、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、ビスファチン、アンジオテンシノーゲン等が含まれる。

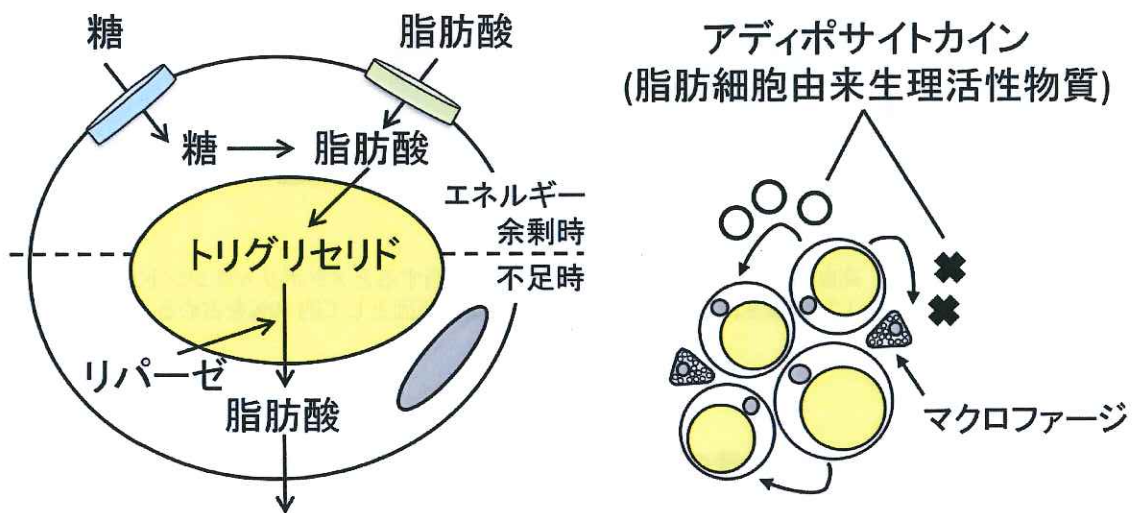


図4. 脂肪細胞における脂質貯蓄とアディポサイトカイン分泌

脂肪細胞は脂質の貯蓄、供給だけでなく、様々な生理作用を有するアディポサイトカインを分泌している。

## アディポサイトカイン発現異常と生活習慣病

脂肪細胞において産生されるアディポサイトカインは、本来、脂肪細胞の分化、成熟化、機能性維持等の生理的役割を担っていると考えられる。実際に生体内では、様々なアディポサイトカインが適切な発現バランスを保つことで正常な生理作用を維持している。しかし、メタボリックシンドローム患者の多くに認められる過剰に脂質を蓄積した肥大化脂肪細胞は、正常な脂肪細胞とは異なるアディポサイトカイン発現パターンを示す[8-11]。アディポネクチンの減少による生体防御機構の破綻[12, 13]やレプチン抵抗性による摂食抑制機構の破綻[14, 15]、レジスチンやTNF- $\alpha$ の増大によって悪化する慢性炎症[16-18]、PAI-1の

増大による線溶系の抑制等がメタボリックシンドロームをさらに悪化させ、重篤な疾患の発症リスクを上昇させる。そのため、アディポサイトカインの発現制御はメタボリックシンドローム治療において重要であると考えられてきた。実際には、複数のアディポサイトカインの発現異常によって形成される複雑な病態のために、アディポサイトカインの発現制御によるメタボリックシンドロームの治療は極めて困難なものとなっている。その為、メタボリックシンドローム患者は、根本治療ではなく、高血圧治療薬(利尿剤、カルシウム拮抗剤、Angiotensin-converting enzyme (ACE)阻害剤、 $\alpha_1$ 受容体阻害剤)、高脂血症治療薬(スタチン系薬剤、フィブレート系薬剤、小腸トランスポーター阻害剤)、糖尿病治療薬(インスリン製剤、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤、チアゾリジン系薬剤、ピグアナイド系薬剤)等の対処療法のための薬剤を多数服用するしか術がないのが現状である (図5)。

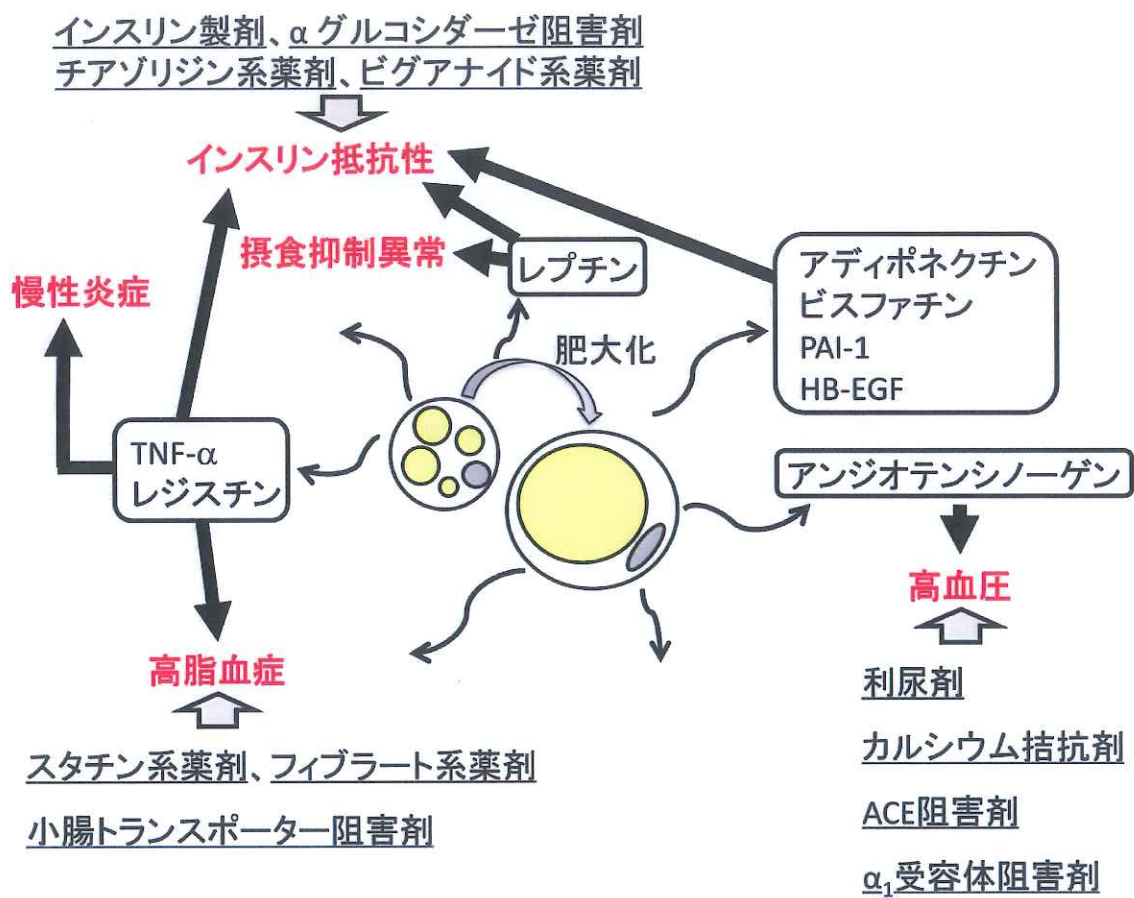


図5. メタボリックシンドロームの複雑な病態と対処療法

メタボリックシンドローム患者に多くみられる肥大化脂肪細胞ではアディポサイトカインの発現バランスが崩壊している。メタボリックシンドロームは複雑な病態を示すことから、根本治療が困難なものとなっており、それぞれの病態に対処するための薬剤を複数服用せざるを得ない。

## 効果的なメタボリックシンドローム治療を目指したアディポサイトカイン生理作用の解析

個々のアディポサイトカインに関する研究は多くの研究者によって行われてきた。しかし、複数のアディポサイトカインが発現異常をきたすことで複数の疾患が同時に発症するメタボリックシンドロームの複雑な病態を理解し、さらに効果的な治療を行う為には、崩壊したアディポサイトカインの発現バランスを是正することが重要であると考えられる。著者は、「アディポサイトカインの発現は各々が独立しているのではなく、相互に発現に影響を及ぼすことで発現連関を形成し、メタボリックシンドロームの病態をより複雑化させているのではないか」と考え、複数のアディポサイトカインの発現に影響を及ぼすものが、メタボリックシンドロームの治療に有用なターゲットとなり得るのではないかと仮説を立てた。

本研究では、食事療法や運動療法を補助し、メタボリックシンドローム患者にみられる崩壊したアディポサイトカイン発現バランスの是正を介することで、重篤な疾患の発症リスク減少を可能とする新規治療ターゲットの探索を目指した。その為には、アディポサイトカイン発現連関を含む、本来の生理作用を解明することが必要不可欠である。第1章では、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補となるアディポサイトカインを探索する為、肥満モデルラット脂肪組織におけるアディポサイトカイン発現量や培養脂肪細胞の分化、成熟過程におけるアディポサイトカイン発現変動を評価した。第2章では、注目したアディポサイトカインの一種であるレジスチンがメタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として有用であるかどうかを評価するため、レジスチン遺伝子の発現を制御し、脂肪細胞に対してどのような影響を及ぼすのか検討した。第3章では、レジスチンを中心としたアディポサイトカイン発現連関を検討する為、レジスチン発現抑制脂肪細胞を用いて、他のアディポサイトカインの発現に及ぼす影響を評価した。

## 第1章

### 脂肪細胞の分化・成熟過程における各アディポサイトカインの発現変動

#### 1.1 緒言

肥満者に多くみられる肥大化脂肪細胞におけるアディポサイトカインの発現異常がメタボリックシンドロームの複雑な病態を形成し、更なる増悪に関与している[19]。それゆえ、これまでに肥満とアディポサイトカイン生理作用の関係解明を目的とする、脂肪組織及び脂肪細胞に着目した研究が行われてきた。しかし肥満の進展には、脂肪細胞への過度な脂質の蓄積に加え、脂肪前駆細胞の増殖や脂肪細胞への分化、成熟化も重要である。脂肪組織は大部分が成熟した脂肪細胞で構成されているが、その他にも未成熟な脂肪細胞や脂肪前駆細胞、浸潤してきたマクロファージ等が混在している[20,21]。そのため、アディポサイトカインによる脂肪細胞への生理作用を厳密に解明するには、モデル動物を用いた検討だけでなく、脂肪前駆細胞から脂肪細胞へと分化、成熟化する過程や長期的に培養した脂肪細胞などを用いてそれぞれ検討する必要があると考えられる。

脂肪細胞は間葉系幹細胞から分化、成熟化することが知られている。間葉系幹細胞は恒常的に活性化している Wnt シグナルによって骨芽細胞へと分化しているが、この Wnt シグナルが抑制されると間葉系幹細胞は脂肪細胞へと分化する[22-26]。さらに、脂肪細胞への分化に重要な転写因子として Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )が知られている。分化した脂肪細胞はインスリン等の作用によって細胞内に脂質を蓄積し、成熟化する。各アディポサイトカインの発現は、脂肪細胞の分化、成熟化に伴って増大する事が知られているが、発現がみられる時期やその生理的意義など、脂肪細胞の分化、成熟化との関係性は完全に解明されていなかった。

本章ではまず、レプチン受容体機能不全肥満モデル Zucker rat の脂肪組織における各アディポサイトカインの遺伝子発現量を評価した。さらに、脂肪細胞の分化、成熟化に伴うアディポサイトカインの発現変動を評価することを目的として、Zucker rat の脂肪組織から単離した脂肪前駆細胞、ならびにマウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞を用いた。本章において著者は、メタボリックシンドロームの増悪に深い関与が示唆されているアディポサイトカインであるアディポネクチンやレプチン、レジスチン、PAI-1、HB-EGF、ビスファチンに注目した。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 動物・試薬

特に記述がない限り市販の特級又は一級のもの、それに準ずるものを使用した。

#### 【動物】

5週齢雌性 Zucker *fa/fa* Rat (肥満型)と Zucker *+/+* Rat (野生型)は清水実験材料より購入した。

#### 【細胞培養】

3T3-L1 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。Phosphate-buffered saline (PBS) (-)、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)、Hank's, Ham's F12 は日水製薬より購入した。EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)はDojindoより購入した。L-Glutamine はMP Biomedicals より購入した。Ascorbate 2Pi, Collagenase、2.5% Trypsin、NaHCO<sub>3</sub>、トリパンブルーはWakoより購入した。3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine (T3)、L-Thyroxine (T4)、3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、Dexamethasone (DEX)、Insulin (INS)、Albumin, from bovine serum, Essentially fatty acid free (BSA)はSIGMAより購入した。D-biotin、BSAF-V、D-Pantothenic acid calcium salt、O-Phosphorylethanolamine、Sodium Selenite はナカライテスクより購入した。Newborn Calf Serum はGIBCOより購入した。Transferrin はCALBIOCHEMより購入した。セルバンカーは日本全薬工業より購入した。

#### 【Total RNA 抽出】

ISOGEN はWakoより購入した。TRIzol Reagent はambionより購入した。Phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (酸性フェノール、pH4.5)はSIGMA-ALDRICHより購入した。

#### 【逆転写反応】

Random Primer (9 mer)はTaKaRaより購入した。dNTP Mixture (10 mM)はTOYOBOより購入した。Super Script III Reverse Transcriptase はInvitrogenより購入した。

#### 【Polymerase chain reaction (PCR)】

TaKaRa EX Taq Hot Start Version (EX Taq)はTaKaRaより購入した。プライマーはSIGMA又はInvitrogenより購入した。配列はTable 1.に示した。

#### 【Real time RT-PCR】

SYBR Premix Ex Taq II (perfect Real Time)はTaKaRaより購入した。プライマーはSIGMA又はInvitrogenより購入した。配列はTable 1.に示した。



**【Oil Red O 染色】**

Oil Red O は SIGMA-ALDRICH より購入した。10% Formalin Neutral buffer solution は Wako より購入した。

**Table 1.** 第 1 章で使用したプライマー

Species	Gene	Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplification	Accession No.
rat	<i>Adiponectin</i>	sense GGAAACTTGTGCAGTTGGATG	141 bp	NM_144744
		antisense GGGTCACCCTTAGGACCAAGAA		
	<i>Resistin</i>	sense GCTCTCTGCCACGTACTTA	170 bp	NM_144741
		antisense TTCATTGCAGCTGGCAGTAG		
	<i>Visfatin</i>	sense ACAGATACTGTGGCGGAATTGCT	253 bp	NM_177928
		antisense TCGACACTATCAGGTGTCTCAG		
	<i>Hbepf</i>	sense ACTTGGAAGGGACCGATCTG	121 bp	NM_012945
		antisense TTTCTAACCCTTGCCTTTC		
	<i>Gapdh</i>	sense GAGTGCCAGCTCGTCTCATA	184 bp	M17701
		antisense TGCCGTGGGTAGAGTCATA		
	<i>Leptin</i>	sense TGGCTTTGGTCTATCTG	107 bp	NM_013076
		antisense GAAATGTCATTGATCCTGGT		
	<i>Serpine1(Pai-1)</i>	sense TCTTGTATCGTCTCCATTGCT	81 bp	NM_012620
		antisense TCCACAGTGGACCTTGAGATAGG		
<i>Fabp4(aP2,A-FABP)</i>	sense GGACCTGGTCGTATCCGGTC	248 bp	NM_053365	
	antisense CGTAAACTTGTAGAAGTCACGCC			
mouse	<i>Adiponectin</i>	sense GTTCTACTGCAACATTCCGG	201 bp	NM_009605
		antisense TACACCTGGAGCCAGACTTG		
	<i>Resistin</i>	sense TCACTTTTACCTCTGTGGATATGAT	81 bp	NM_022984
		antisense TGCCCCAGGTGGTGTAAA		
	<i>Visfatin</i>	sense ACAGATACTGTGGCGGAATTGCT	253 bp	NM_021524
		antisense TCGATACTATCAGATGTCTCAG		
	<i>Hbepf</i>	sense TTTCTCCTCAAGCCACAAG	87 bp	NM_010415
		antisense TTCTTCCCTAACCCTTTCTCT		
	<i>Gapdh</i>	sense GAGGACCAGGTTGTCTCCTG	161 bp	NM_008084
		antisense ATGTAGGCCATGAGGTCCAC		
	<i>Leptin</i>	sense AAATGTGCTGCAGATAGCCAATG	81 bp	NM_008493
		antisense AGGGAGCAGCTCTTGAGAAG		
	<i>Serpine1(Pai-1)</i>	sense TCAGCCCTTGCTTGCCCTCAT	193 bp	NM_008871
		antisense GCATAGCCAGCACCGAGGA		
	<i>Fabp4(aP2,A-FABP)</i>	sense CAGAAGTGGGATGGAAAGTCG	169 bp	NM_024406
		antisense CGACTGACTATTGTAGTGTGTTGA		
	<i>C/ebpa</i>	sense GCGCAAGAGCCGAGATAAAG	113 bp	NM_007678
		antisense CACGGCTCAGCTGTTCCA		
	<i>C/ebpb</i>	sense GGACAAGCTGAGCGACGAGTA	122 bp	NM_009883
		antisense CCGTCAGCTCCAGCACCTT		
<i>Pparg</i>	sense AGTGACTTGGCTATATTTATAGCTGCATT	91 bp	NM_011146	
	antisense TGTCTTGGATGTCTCGATGG			
<i>Actb</i>	sense GACGGCCAGGTCATCACTATTG	89 bp	NM_007393	
	antisense CCACAGGATTCCATACCCAAGA			

## 1.2.2 細胞培養

本章ではラット由来初代培養脂肪細胞、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞を用いて実験を行った。

### 【脂肪細胞初代培養】

脂肪細胞の初代培養は、過去の報告を参考に行った[27]。

#### a) 試薬調製

##### 基本培地 (4°C 保存)

DMEM 溶液に終濃度がそれぞれ Newborn Calf Serum 10%、HEPES 10 mM、D-biotin 15  $\mu$ M、Ascorbate 2Pi 200  $\mu$ M、T3 1 nM、T4 30 nM、INS 1nM となるように添加した。

##### 分化誘導培地 (4°C 保存)

基本培地に終濃度がそれぞれ IBMX 500  $\mu$ M、DEX 500 nM、INS 20 nM となるように添加した。

##### 成熟化培地 (4°C 保存)

DMEM/ Ham's F12 (1:1)溶液に終濃度がそれぞれ Ascorbate 2Pi 200  $\mu$ M、T3 1 nM、T4 30 nM、INS 100 pM、Transferrin 10  $\mu$ g/mL となるように添加した。

#### b) 脂肪前駆細胞の単離

5 週齢 Zucker rat を頸椎脱臼により処置し、クリーンベンチ内で開腹して副睾丸上脂肪組織を摘出した。摘出した脂肪組織は Dish 内に分注した Hank's solution 中に stock しておいた(氷上)。摘出した脂肪組織から結合組織、血管、輸精管を取り除き、細切した後、1 mg/mL Collagenase 溶液中で、37°C、35 分間振とうした。セルストレーナー(70  $\mu$ m)を通し、細胞懸濁液を室温、1,000 rpm で 5 分間遠心分離した。浮遊した脂肪細胞の塊を沈めないように上清を aspirate 除去した。ペレット状になった脂肪前駆細胞を再懸濁し、セルストレーナー(40  $\mu$ m)を通し、室温、1,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を aspirate 除去し、適量の基本培地で懸濁した (1 mL/匹)。あらかじめ 10 cm Dish に基本培地 7 mL を添加し、細胞懸濁液を 1 mL ずつ加えた後、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、翌日培地交換することで除去しきれなかった血球等を除去した。

#### c) 脂肪細胞分化誘導刺激、成熟化

60-80%の細胞密度になったのを確認後、分化誘導培地に培地交換した(Day 0)。48 時間後、成熟化培地に培地交換した(Day 2)。さらに 72 時間培養することで十分量の脂肪滴を蓄積した初代培養脂肪細胞を得た(Day 5)。

以下に初代培養のタイムスケジュールを示す(図 6)。

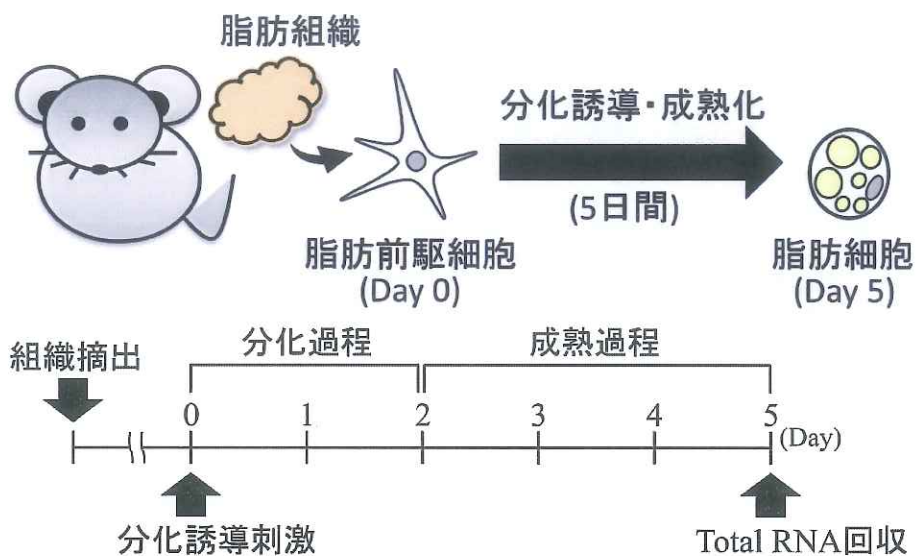


図 6. 脂肪細胞初代培養のタイムスケジュール

### 【3T3-L1】

#### a) 試薬調製

##### DMEM (4°C 保存)

DMEM を 5.1 g 秤量し、超純水で溶解し 450 mL にメスアップ後、室温で 30 分間攪拌し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

##### 1M HEPES (4°C 保存)

HEPES を 59.58 g 秤量し、超純水約 180 mL で溶解した後、5-10 N NaOH で pH 7.4 に調整した。その後、250 mL にメスアップ後、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

##### 7% NaHCO<sub>3</sub> (4°C 保存)

NaHCO<sub>3</sub> を 7 g 秤量し、超純水で溶解し 100 mL にメスアップ後、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

##### 200 mM L-Glutamine (-20°C 保存)

L-Glutamine を 8.769 g 秤量し、超純水で溶解し 300 mL にメスアップ後、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した。

##### 100 mM Ascorbate 2Pi (-20°C 保存)

Ascorbate 2Pi を 723 mg 秤量し、生理食塩水で溶解し 20 mL にメスアップ後、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌しつつ 1.2 mL ずつ分注した。

#### **500 nM T3、15 μM T4 (-20°C 保存)**

- 200 μM T3 (-20°C 保存)

T3 を 9.4 mg 秤量し、100%エタノール 70 mL に溶解し、氷上で冷却した。

- 150 μM T4 (-20°C 保存)

T4 を 9.3 mg 秤量し、100%エタノール 70 mL に溶解し、氷上で冷却した。

あらかじめ調製しておいた 150 μM T4 を 2 mL と 100%エタノール 2 mL、Saline 約 15 mL を混合した後、200 μM T3 を 50 μL 加えた。生理食塩水で 20 mL にメスアップ後、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌し、1.2 mL ずつ分注した。

#### **50 mM IBMX (-20°C 保存)**

IBMX を 111 mg 秤量し、50%エタノール 10 mL で溶解し、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した。

#### **500 μM DEX (-20°C 保存、遮光)**

DEX を 9.8 mg 秤量し、100%エタノール 50 mL で溶解し、氷上で冷却後、10 mL を 0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した。残りは褐色ビンで保存し、用事 0.22 μm のフィルターで濾過滅菌して用いた。

#### **400 μM INS (-20°C 保存)**

Insulin を 11.5 mg 秤量し、5 mM HCl 5 mL に溶解し、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した。

#### **200 mg/L D-biotin (4°C 保存、遮光)**

D-biotin を 60 mg 秤量し、湯浴中(40°C)で超純水 300 mL に溶解した。完全に溶解したのを確認後、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

#### **Fetal bovine serum (FBS) (-20°C 保存)**

FBS (-20°C)を 4°C で解凍し、56°C、30 分間加温し、非動化した。

#### **35% Glucose (4°C 保存)**

Glucose を 35 g 秤量し、超純水 100 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

#### **PBS(-) (4°C 保存)**

PBS を 4.8 g 秤量し、超純水 500 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。

#### **10×トリプシン溶液 (4°C 保存)**

EDTA・2Na・2H<sub>2</sub>O 190 mg、NaCl 630 mg、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O 190 mg を適量の超純水に溶解し、NaOH で pH 7.2 に調整し、80 mL にメスアップした。オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)を行い、2.5% Trypsin を 20 mL 加えて 100 mL とした。

#### 基本培地 (4°C 保存)

DMEM 450 mL に 1 M HEPES 5 mL、7% NaHCO<sub>3</sub> 15 mL、200 mM L-Glutamine 10 mL、35% Glucose 5 mL、100 mM Ascorbate 2Pi 1 mL、500 nM T3/15 μM T4 1 mL を添加した後、FBS 50 mL を添加した。

#### 分化誘導培地 (4°C 保存)

基本培地 50 mL に 50 mM IBMX 465 μL、500 μM DEX 93 μL、400 μM INS 204.6 μL を添加した。

#### 成熟化培地 (4°C 保存)

基本培地 50 mL に 400 μM INS 204.6 μL、200 mg/L D-biotin 930 μL を添加した。

#### b) 細胞の立ち上げ

あらかじめ 37°C 恒温槽で温めた基本培地をコニカルチューブに 9 mL 入れ、凍結保存していた細胞ストック 1 mL を加えた。1,500 rpm、25°C で 2 分間遠心分離し、上清を除去した後、基本培地を 10 mL 加えて懸濁することにより細胞を wash し、再度、同条件下で遠心分離操作を行った。基本培地で再懸濁後、Dish (10 cm) に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、翌日に培地を交換した。

#### c) 継代

基本培地、PBS (-) は 37°C に恒温槽で温めたものを使用した。培養していた Dish の培地を除去し、PBS (-) で wash した。PBS (-) で 10×トリプシンを希釈後、Dish に添加し 37°C で数分インキュベートすることで、細胞を Dish から剥がした。基本培地を加え、コニカルチューブに回収し、1,500 rpm、25°C で 2 分間遠心分離した。上清を除去し、細胞ペレットを基本培地で再懸濁した。細胞懸濁液の一部をトリパンブルー染色し、血球計数板を用いて細胞数を計数後、 $4 \times 10^5$  cells/10 cm dish となるように播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。3T3-L1 細胞は継代の時期が遅れると分化誘導効率が著しく低下するため、 $4 \times 10^5$  cells/10 cm dish に播種した細胞は 48 時間毎に継代した。また、継代回数が多くなり分化誘導効率が低下すると新規に細胞を立ち上げ、一定の分化誘導効率が得られるように注意した。

#### d) 脂肪細胞分化誘導刺激

3T3-L1 細胞の効果的な分化誘導には、非常に高い細胞密度による細胞増殖期の停止(接触阻害)が必要となる。 $2 \times 10^5$  cells/3.5 cm dish、 $1 \times 10^5$  cells/well (24 well plate) となるように播種すると、48 時間後には分化誘導に適した細胞密度が得られる。細胞密度を確認した後、分化誘導培地を加えた(Day 0)。分化誘導培地にて 48 時間培養した後、成熟化培地に培地交換した(Day 2)。成熟化培地を 1-2 日毎に交換することで十分量の脂肪滴を蓄積した脂肪細胞を得た。

以下に 3T3-L1 細胞培養のタイムスケジュールを示す(図 7)。



図 7.3 3T3-L1 細胞培養のタイムスケジュール

#### e) 細胞の凍結

細胞密度 70-80%の対数増殖期の細胞を用いて細胞の凍結を行った。細胞の回収は継代と同様の方法で行い、細胞数を計数後 1,500 rpm、25°C で 2 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去し、 $0.5-2 \times 10^6$  cells/tube (1 mL)となるようにセルバンカーで懸濁し、1.5 mL サンプルチューブに入れ、-80°C で凍結保存した。

#### 1.2.3 Total RNA 抽出

脂肪組織からの Total RNA 抽出には、組織 100 mg を ISOGEN 又は TRIzol Reagent 3 mL 中に入れ、ホモジナイザーを用いて完全に溶解させ、1 mL ずつ 1.5 mL エッペンチューブに分注することでサンプルを得た。培養細胞からの Total RNA 抽出には、培地を除去した Dish に ISOGEN 又は TRIzol Reagent を 1 mL 添加し細胞を溶解させ、1.5 mL エッペンチューブに回収することでサンプルを得た。サンプル 1 mL にクロロホルムを 200  $\mu$ L 添加し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。3 層(水層、変性タンパク質層、有機層)に分離した後、水層のみを 550  $\mu$ L 回収した。さらに、酸性フェノール 550  $\mu$ L を回収した水層に加え、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。水層 400  $\mu$ L を回収後、100%イソプロパノールを 400  $\mu$ L 加え、15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心分離することで total RNA を沈殿させた。上清を除去し、70%エタノールを 500  $\mu$ L 加え、ペレットを wash した。組織からの Total RNA 抽出の際は、この段階で各ペレットを 1 つのエッペンチューブに回収した。15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した後、上清を完全に除去し、適量(7-15  $\mu$ L)の RNase free water にペレットを溶解させ RNA サンプルを得た。RNA サンプルは、吸光度測定により RNA 濃度と精製度を求めた後、適度に希釈し逆転写反応に用いた。余剰の RNA サンプルは-80°C で保存した。

#### 1.2.4 逆転写反応

Total RNA (1  $\mu$ g)と 80 pM Random Primer (9 mer) 1  $\mu$ L、10 mM dNTP 1  $\mu$ L、RNase free water で計 10  $\mu$ L に調製した。65°C で 5 分間熱処理することで、RNA を一本鎖にし、4°C で 5 分間冷却することで、プライマーをアニーリングさせた。5 $\times$ First Strand Buffer 4  $\mu$ L、0.1 M DTT 1  $\mu$ L、RNase free water 4-4.75  $\mu$ L、逆転写酵素 0.25-1  $\mu$ L を混合した後、熱処理サンプルに加え計 20  $\mu$ L とした。25°C で 5 分間、50°C で 60 分間、70°C で 15 分間、4°C で 5 分間の条件で逆転写反応を行い、反応終了後、RNase free water 180  $\mu$ L を加え cDNA サンプルを得た。cDNA サンプルは-20°C で保存した。

## 1.2.5 PCR

cDNA サンプル 1  $\mu$ L、滅菌水 8.5  $\mu$ L、50  $\mu$ M プライマー(Table 1) 0.25  $\mu$ L ずつ、2.5 mM dNTP 1  $\mu$ L、10 $\times$ Taq buffer 1.25  $\mu$ L、EX Taq 0.25  $\mu$ L を混合し、94 $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 cycle、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 24-30 cycles、72 $^{\circ}$ C で 5 分間を 1 cycle の条件で反応を行った。PCR 反応後のサンプルは 6 $\times$ Loading dye 2.5  $\mu$ L を混合した後、2%アガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下でゲル撮影を行った。

## 1.2.6 Real time RT-PCR

SYBR Premix EX taq 10  $\mu$ L と 50 $\times$ ROX Dye 0.4  $\mu$ L、滅菌水 3  $\mu$ L、10  $\mu$ M プライマー(Table 1) 0.8  $\mu$ L ずつ、cDNA サンプル 5  $\mu$ L を遮光しながら混合し、95 $^{\circ}$ C で 30 秒間を 1 cycle、95 $^{\circ}$ C で 5 秒間、60 $^{\circ}$ C で 34 秒間を 40-50 cycles、melting curve の条件で反応を行った。GAPDH もしくは  $\beta$ -actin mRNA を内部標準とし、サンプル間の相対的発現量を  $2^{-\Delta\Delta CT}$  値法で求めた。

使用機器が Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system の時は ROX Dye II を用いた。

使用機器が Applied Biosystems Step One Real-time PCR system の時は ROX Dye I を用いた。

## 1.2.7 脂肪細胞成熟化の評価

光学顕微鏡で観察し、細胞内に形成される脂肪滴の存在を確認した。さらに、RT-PCR を行い、脂肪細胞分化マーカーである Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) の発現を確認した。

## 1.2.8 Oil Red O 染色

ホルマリン固定は、ホルマリンの細胞毒性により細胞が Dish から剥がれることを回避するために、培地 0.1 倍量の 10% Formalin Neutral buffer solution を添加し室温で 20 分間インキュベートした後、10% Formalin Neutral buffer solution のみで室温、1 時間インキュベートの条件で行った。Oil Red O は 150 mg 秤量し、100% イソプロパノール 50 mL に溶解した(保存用 Oil Red O 溶液、室温保存)。保存用 Oil Red O 溶液を超純水で 60%に希釈後、濾過した(用事調製)。ホルマリン固定した細胞を 60%イソプロパノールで 1 回 wash した後、60% Oil Red O 溶液を添加し、室温で 20 分間インキュベートした。細胞を 60%イソプロパノールで 1 回 wash、超純水で 2 回 wash した後、光学顕微鏡で観察した。また、超純水を除去し、細胞を風乾した後、100%イソプロパノールで細胞内 Oil Red O を抽出し、波長 540 nm の吸光度を測定することで細胞内 Oil Red O を比較定量した。

## 1.2.9 統計処理

Student's t-test を用いて統計処理を行った。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  を用いて有意差を示した。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 肥満モデルラット脂肪組織における各アディポサイトカイン遺伝子発現量の比較定量

肥満時における各アディポサイトカインの発現変動を評価するために Zucker rat の野生型と肥満型(図 8) から副睾丸上脂肪組織をそれぞれ摘出し、各脂肪組織におけるアディポサイトカイン(アディポネクチン、レプチン、レジスチン、PAI-1、HB-EGF、ビスファチン)の遺伝子発現量を比較定量した(図 9)。アディポネクチンは肥満時に血中濃度が低下することが報告されている[11]。そしてアディポネクチンの肥満型ラット脂肪組織における遺伝子発現量は、野生型ラット脂肪組織に比して顕著に減少していた。また、肥満時に血中濃度が上昇することが報告されている PAI-1 [8]、HB-EGF [1]の肥満型ラット脂肪組織における遺伝子発現量には増加傾向がみられた。一方、肥満時に血中濃度の上昇が報告されているレジスチン[28]の肥満型ラット脂肪組織における遺伝子発現量は顕著に減少していた。前駆 B 細胞コロニー増殖因子(PBEF)として同定されたビスファチン[29]の遺伝子発現量は、肥満型ラット脂肪組織において減少傾向がみられた。脂肪細胞から分泌され、中枢に作用することで摂食抑制に関与するレプチン[30]の遺伝子発現量は両者でほとんど差を認めなかった。



図 8. Zucker rat

肥満型はレプチン受容体に変異しているため、摂食抑制機能が異常をきたしており、肥満を呈する。

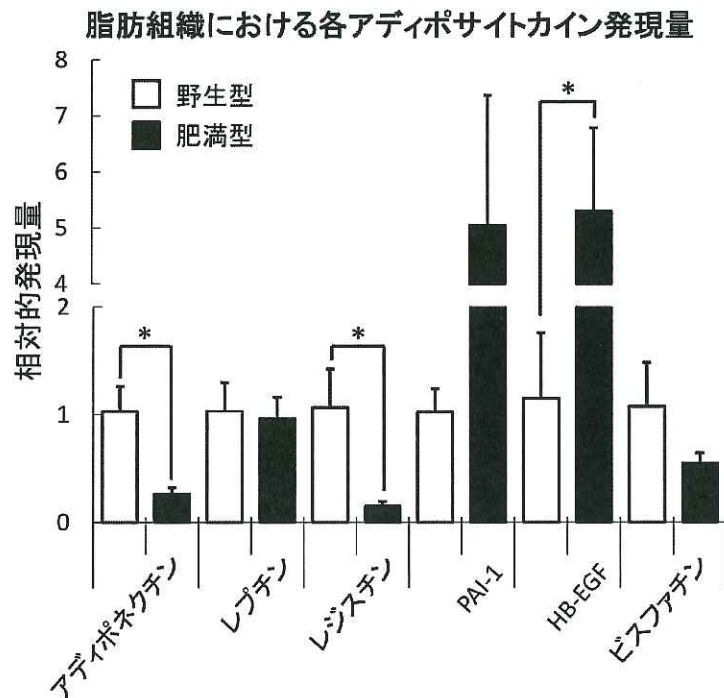


図 9. Zucker rat 野生型、肥満型の脂肪組織における各アディポサイトカイン mRNA 発現の比較定量

脂肪組織からそれぞれ RNA を抽出し、real time RT-PCR にて比較定量した。GAPDH を内部標準とし、相対的 mRNA 発現量の平均値及び標準偏差を示した。(n=3、\* $p < 0.05$ )



### 1.3.2 初代培養脂肪細胞の分化、成熟過程における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動

脂肪細胞に対する各アディポサイトカインの生理作用を解明する為に、脂肪細胞の分化、成熟過程における各アディポサイトカイン発現変動の評価を試みた。その為にまず、野生型、肥満型 Zucker rat の脂肪組織からそれぞれ脂肪前駆細胞を単離し、初代培養を行った。脂肪細胞への分化、成熟化は脂肪滴の有無及び脂肪細胞分化マーカー遺伝子 A-FABP の発現によって評価した。その結果、分化誘導刺激後(Day 2)から脂質を蓄積する細胞がみられ始め、Day 5 ではほとんどの細胞に脂質の蓄積がみられた(図 10 A)。さらに Day 2 から A-FABP の発現増大がみられた(図 10 B)。

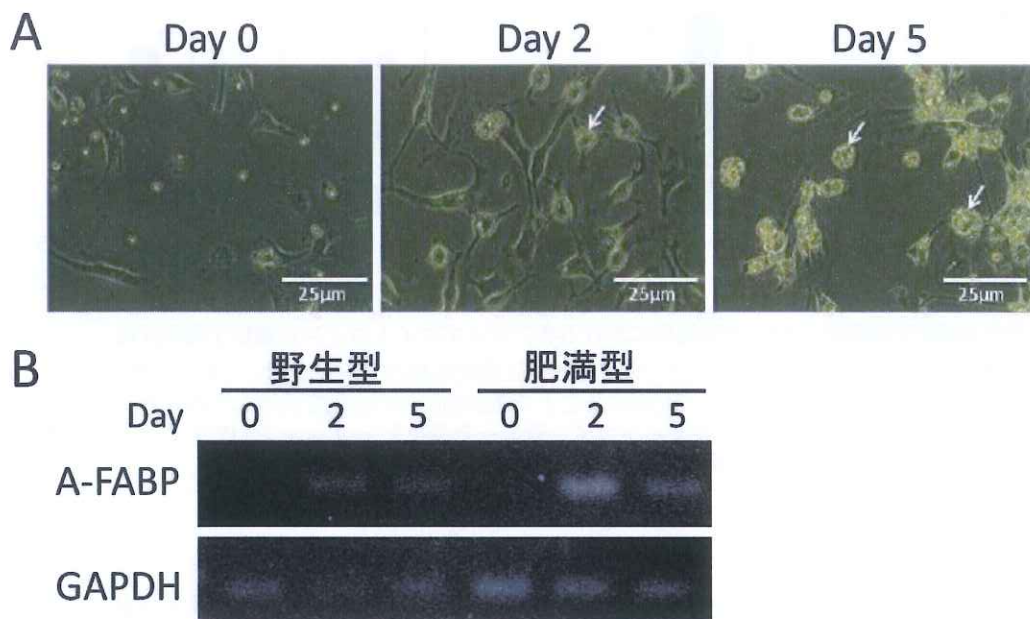


図 10. 初代培養脂肪細胞の形態変化と脂肪細胞分化マーカーの発現変動

(A) 野生型 Zucker rat の副睾丸上脂肪組織から脂肪前駆細胞を単離し、DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞分化誘導刺激を与えた(Day 0)。表記した培養期間において細胞形態画像を撮影した。矢印は脂質を蓄積した細胞を示す。(B) 野生型、肥満型由来初代培養脂肪細胞の分化、成熟過程における A-FABP mRNA の発現変動を RT-PCR にて評価した。

次に、野生型、肥満型由来のそれぞれ初代培養脂肪細胞の分化、成熟過程における各アディポサイトカイン遺伝子発現変動を比較した。興味深いことに野生型、肥満型ラットから摘出した脂肪組織においてアディポサイトカインの発現量に違いがみられたのに対して、初代培養脂肪細胞の分化、成熟過程における発現変動パターンに違いはみられなかった(図 11)。アディポネクチン、レプチン、レジスチンの遺伝子発現量は、脂肪細胞へと分化、成熟化するにつれて顕著に増加していた。このとき、アディポネクチン及びレジスチンの遺伝子発現量は、Day 2 において、Day 0 と比較して約 20 倍に増加していた。またレプチン遺伝子の発現は Day 2 までほとんど認められなかったが、Day 2 から Day 5 にかけて著しく増加していた。一方、PAI-1 及び HB-EGF の遺伝子発現量は Day 0 から Day 2 にかけて減少していたが、Day 2 から Day 5 にかけて増加した。ビスファチン遺伝子発現量は Day 2 において一過性の発現上昇を示した。

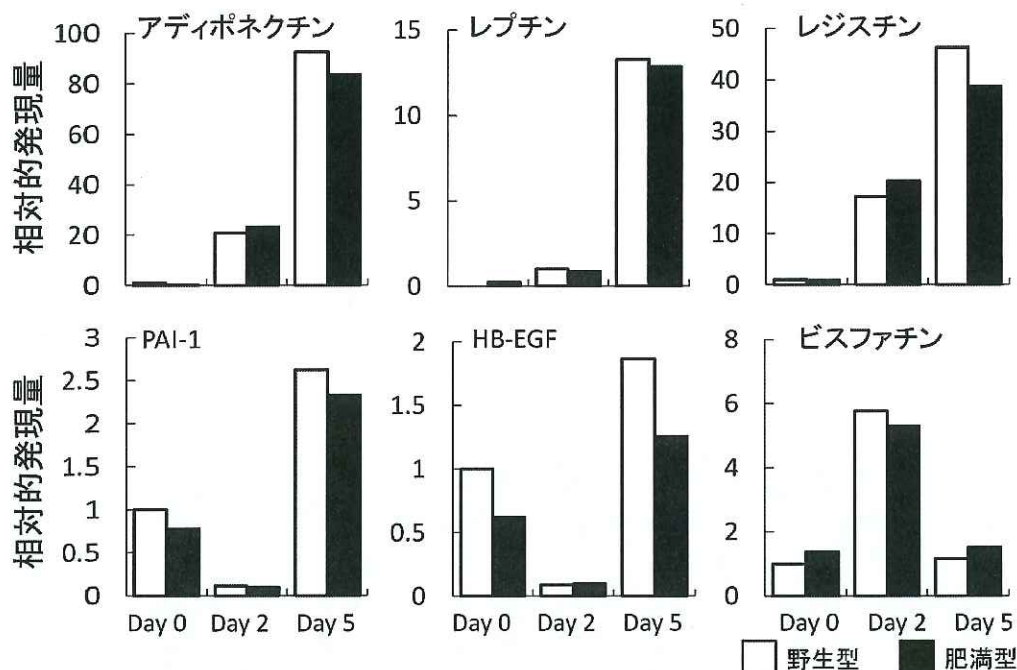


図 11. 初代培養脂肪細胞の分化、成熟過程における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動  
 野生型、肥満型 Zucker rat それぞれ4匹ずつから抽出した脂肪組織のプールを用いて初代培養を行った。脂肪前駆細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した(Day 0)。RNA を表記した日数でそれぞれ抽出し、各アディポサイトカイン遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。GAPDH を内部標準とし、相対的 mRNA 発現量の平均値を示した。

### 1.3.3 3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動

多くの研究においてマウス株化脂肪前駆細胞 3T3-L1 は、分化誘導刺激を与えてから 8 日ほど成熟化させて実験に用いられてきた(Day 8-10)。しかし本研究では、初代培養脂肪細胞との比較を目的に5日間の培養期間で評価を行った(Day 5)。成熟期間は短くなるが、脂肪細胞は十分量の脂質を蓄積していた(図 12)。さらに、成熟期間の初期にあたる Day 3-5 にかけて顕著な細胞形態変化がみられ、ほとんどの細胞が脂質を蓄積するように変化した。

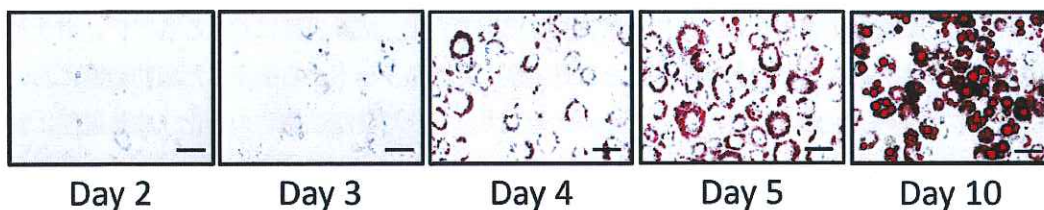


図 12. 3T3-L1 細胞の成熟過程における細胞形態変化  
 3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した(Day 0)。表記した日数でそれぞれ細胞に蓄積した脂質を Oil Red O 染色し、顕微鏡画像を撮影した。  
 赤色：脂質、Bars : 50 μm

次に、3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期における脂肪細胞分化マーカーA-FABP 及び脂肪細胞の分化、成熟化に重要な転写因子 PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  の遺伝子発現変動を評価した(図 13)。その結果、A-FABP、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  の脂肪細胞成熟化に伴った顕著な遺伝子発現増大がみられた。C/EBP $\beta$  の遺伝子発現量は Day 3 において一過性の発現減少を示し、その後、徐々に増大した。

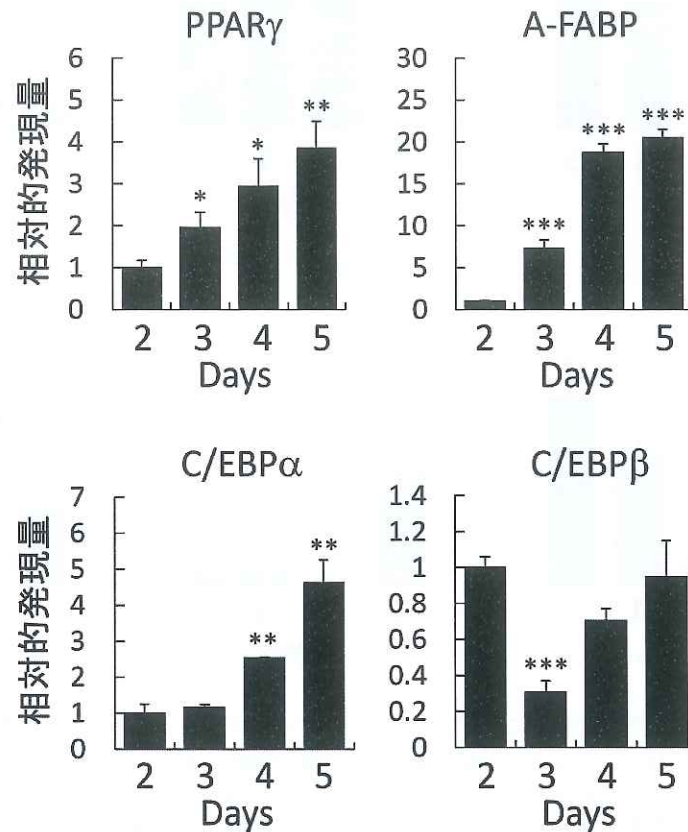


図 13. 3T3-L1 細胞の成熟過程初期における脂肪細胞分化マーカーの遺伝子発現変動

3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した(Day 0)。RNA を表記した日数でそれぞれ抽出し、各遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的 mRNA 発現量の平均値及び標準偏差を示した。(n=3、\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01、\*\*\* $p$ <0.001 versus Day 2)

3T3-L1 脂肪細胞の成熟期間が過去の研究より短期間であっても、脂肪細胞への分化、成熟化に特徴的な細胞形態変化、遺伝子発現変動がみられた。そこで、3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動を評価した(図 14)。その結果、アディポネクチン、レプチン、レジスチン、ビスファチンの遺伝子発現量に顕著な増大がみられた。また、PAI-1 の遺伝子発現量は Day 3 において一過性の発現減少を示し、その後、徐々に増大した。HB-EGF の遺伝子発現は Day 2 でのみ確認できた。初代培養脂肪細胞(図 11)と 3T3-L1 脂肪細胞(図 14)のそれぞれ成熟過程初期における遺伝子発現変動パターンが一致していたアディポサイトカインは、アディポネクチン及びレプチン、レジスチンであった。そのため、これらアディポサイトカインが脂肪細胞成熟化に何らかの重要な生理作用を有している可能性が考えられた。PAI-1 は、一過性に遺伝子発現量が減少する傾向が一致していた。

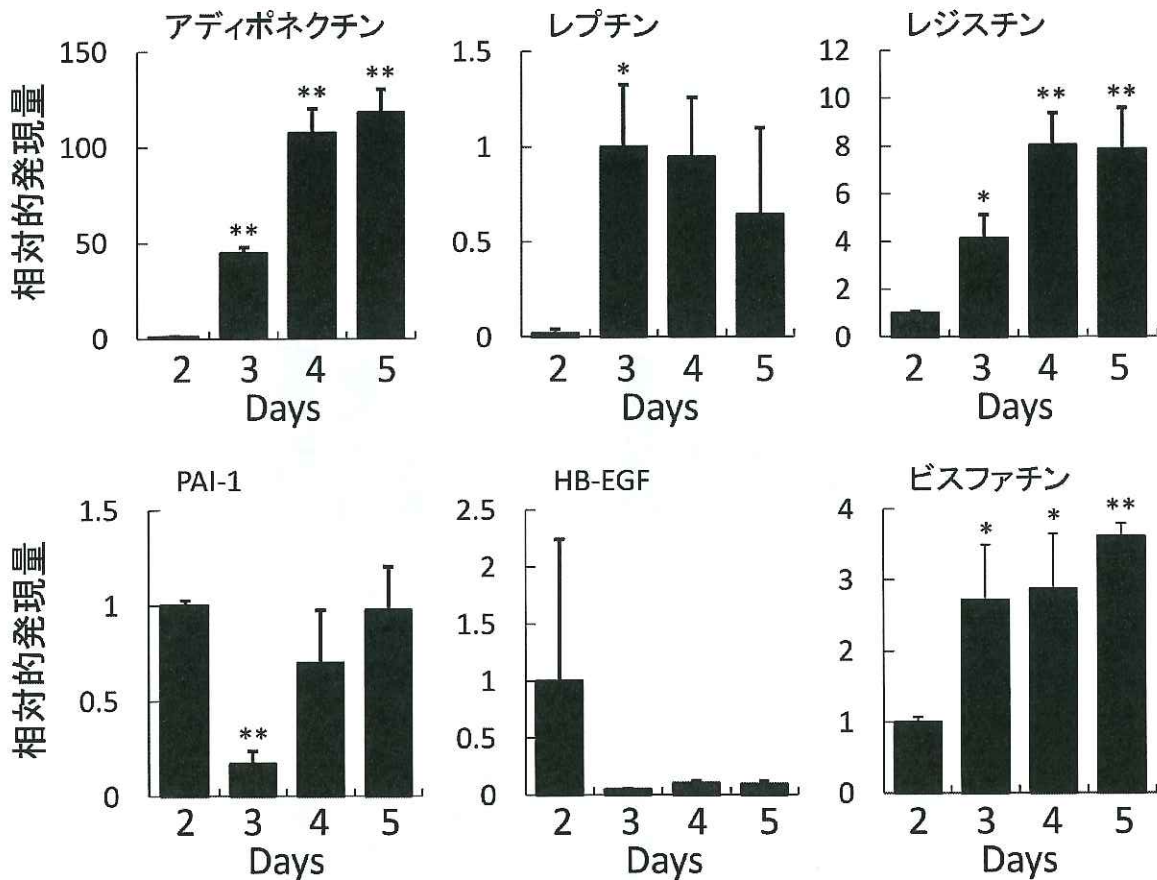


図 14. 3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期における各アディポサイトカインの遺伝子発現変動

3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した (Day 0)。RNA を表記した日数でそれぞれ抽出し、各アディポサイトカイン遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。β-actin を内部標準とし、相対的 mRNA 発現量の平均値及び標準偏差を示した。(n=3、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  versus Day 2)

### 1.3.4 長期的な脂肪細胞成熟過程におけるレジスチンの発現変動

初代培養脂肪細胞と 3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期に顕著な遺伝子発現増大を示したアディポサイトカインはアディポネクチン、レプチン、レジスチンであった。さらに、過去の報告を基に各アディポサイトカインが影響を与える、もしくは影響を受ける細胞内シグナルの予想を行った結果、アディポネクチン、レプチン、レジスチンは他のアディポサイトカインの発現に大きく影響を及ぼしている可能性が考えられた (図 15)。そのため、これらアディポサイトカインが、複数のアディポサイトカイン発現制御を含む脂肪細胞の成熟化に重要な生理作用を有している可能性が考えられた。しかしレプチンは、レプチン受容体が変異した肥満型 Zucker rat に由来する初代培養脂肪細胞が、成熟過程初期から十分に成熟化することから、アディポネクチンやレジスチンと比べ、その重要性は低いと考えられた。また、レプチンはメタボリックシンドローム時、レプチン抵抗性による生理作用の減弱が摂食抑制の不全等に関与すると考えられている。アディポネクチンもメタボリックシンドローム時に血中濃度が減少することが各種病態の増悪に関与する

[12]。一方、レジスチンはメタボリックシンドローム時における血中濃度の増大すなわち過剰にその生理作用を発揮することが、各種病態の増悪に関与すると考えられている[28, 31]。また、レジスチンは培養脂肪細胞の成熟化に伴って発現が顕著に増大したにもかかわらず、肥満時脂肪組織における発現量は減少していたなど特徴的であった。そのためレジスチンは、メタボリックシンドローム時に血中濃度が増大する他のアディポサイトカインの発現制御に関与しているとともに、メタボリックシンドロームの病態を複雑化させている要因の1つではないかと推察した。すなわち、レジスチンがメタボリックシンドロームの治療ターゲットとして最も有用ではないかと考えるに至った。そこで、レジスチンの脂肪細胞成熟過程における生理作用をより詳細に検討する為、3T3-L1 脂肪細胞の長期的な成熟過程における発現変動を評価した(図 16)。その結果、興味深いことに、レジスチンの遺伝子発現量及びタンパク質分泌量が成熟過程の初期 (Day 3-5)に一過性の増大を示すことを見出した。

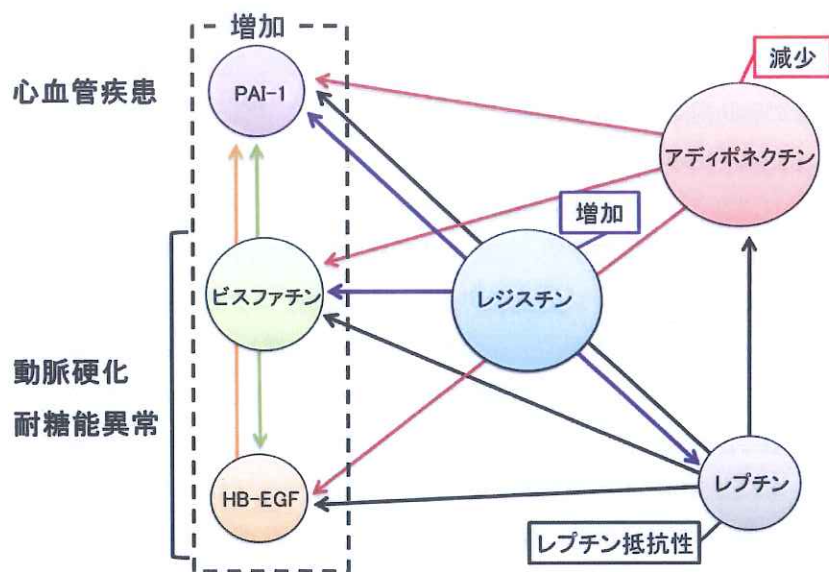


図 15. 予想される各アディポサイトカイン発現連関

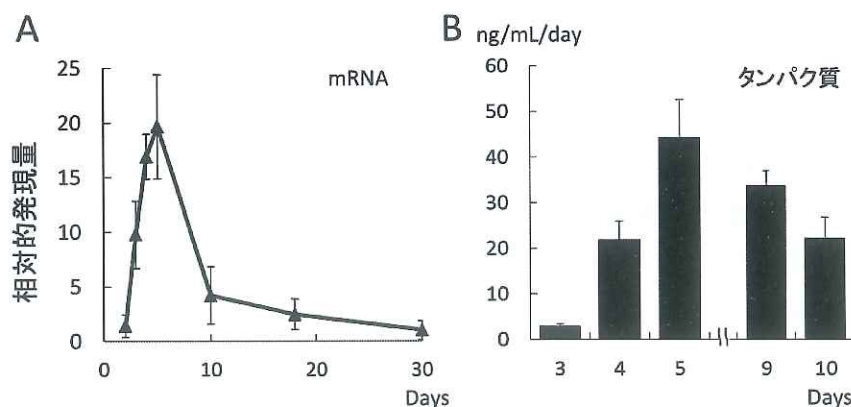


図 16. 3T3-L1 細胞の成熟過程におけるレジスチンの発現変動

3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した (Day 0)。(A) 表記した日数におけるレジスチン遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的発現量を示した (versus Day 2)。(B) 表記した日数における培地中へのレジスチンタンパク質分泌量を ELISA にて定量した。結果は平均値及び標準偏差を示した。(n=3)

## 1.4 考察

本章では、マウス脂肪細胞の初代培養が困難であるという理由からラット脂肪細胞の初代培養を行った。さらに、肥満時におけるアディポサイトカイン生理作用に注目したことからレプチン受容体に変異している Zucker rat を用いて検討を行った。また、腸間膜上脂肪組織を用いた脂肪細胞初代培養を試みたが、脂肪前駆細胞の単離が非常に困難であった。一方、副睾丸上脂肪組織は4匹分の組織をプールすることで野生型ラットからも初代培養に必要な細胞数の脂肪前駆細胞を単離することができた。以上のことから、Zucker rat の副睾丸上脂肪組織を用いて、各種アディポサイトカイン遺伝子発現量の評価及び脂肪細胞初代培養と分化、成熟過程における各種アディポサイトカイン遺伝子発現変動の評価を行った。メタボリックシンドロームに関する研究において肥満モデル動物には、高脂肪食を給餌するモデル動物や遺伝的要因によるモデル動物等が多種類使用されている。Zucker rat 以外のモデル動物を用いることで、本章で得られた知見を基に、各種アディポサイトカインの発現意義の解明につながる可能性を秘めている。

肥満型 Zucker rat の脂肪組織における各種アディポサイトカイン遺伝子発現量を評価した結果、これまでに報告されている肥満時にみられる血中濃度の変化と一致していたのはアディポネクチン及び PAI-1、HB-EGF であった[1, 11, 32]。レプチンは、肥満者の脂肪組織において発現が亢進していることが報告されているが[33]、Zucker rat の野生型と肥満型の脂肪組織中レプチン遺伝子発現量に差異はみられなかった。しかし、肥満型の Zucker rat はレプチン受容体に変異している為、レプチンが発現していても機能はしていない。ビスファチンもまた、肥満者の脂肪組織において発現が亢進していることが報告されているが[10, 34]、肥満型 Zucker rat の脂肪組織中遺伝子発現量に減少傾向がみられた。この結果は、ビスファチンがレプチンの制御下にあることが原因として考えられる[35]。しかしビスファチンは、肥満型 Zucker rat の脂肪組織においても、野生型の約 50%程度の発現量を示していたことから、レプチン以外にも、脂肪組織におけるビスファチン発現制御に関与する因子の存在が考えられた。一方、肥満時に血中濃度が上昇することが報告されているレジスチン[28]の肥満型 Zucker rat 脂肪組織における遺伝子発現量は顕著に減少していた。肥満時に脂肪組織中のレジスチン遺伝子発現量が減少する結果は過去にも報告されてきたが[36]、血中濃度の変動と一致しない原因については不明のままであった。3T3-L1 脂肪細胞は頻りに培地を交換することで、長期間培養することができる[37]。長期的な成熟過程におけるレジスチンの発現変動を評価した結果、遺伝子発現量及びタンパク質分泌量共に、成熟過程の初期に一過性の増大を示した。この結果より、十分に成熟化した脂肪細胞や肥大化した脂肪細胞ではレジスチンの発現が減少している可能性が示唆された。すなわち、肥満時脂肪組織は大部分が肥大化した脂肪細胞で構成されている為、肥満モデルラットの脂肪組織におけるレジスチン遺伝子発現量に減少がみられたと考えられる。一方、肥満時脂肪組織は顕著に増大するため、細胞単位でのレジスチン発現量が減少していても、血中レジスチン濃度は上昇するのではないかと考えられる(図 17)。

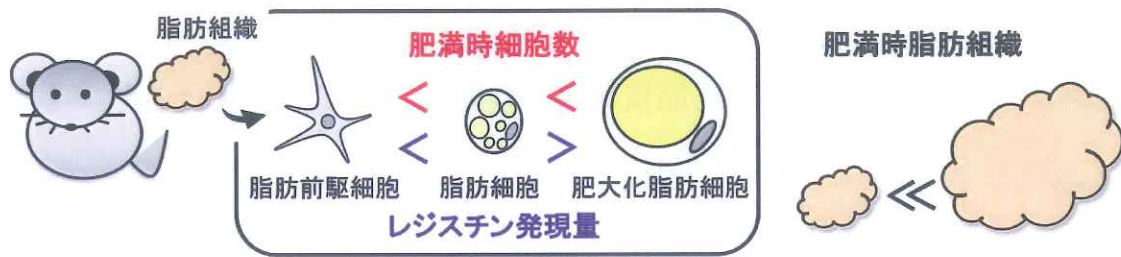


図 17. 肥満モデルラットにおけるレジスチン血中濃度上昇と脂肪組織中レジスチン発現量減少に対する考察

興味深いことに、野生型及び肥満型 Zucker rat 由来初代培養脂肪細胞において、それぞれの分化、成熟過程における A-FABP の発現パターンが類似していたことに加え、各アディポサイトカイン遺伝子発現パターンにも高い類似傾向を見出した。このことから、野生型、肥満型 Zucker rat 由来の初代培養脂肪細胞は、同様の過程を経て分化、成熟化しており、肥満進展の過程とは独立している可能性が示唆された。また、アディポネクチンやレプチン、レジスチンの発現は分化誘導後に発現が増大し、PAI-1 や HB-EGF は一過性の発現減少を示す、といったように、脂肪細胞成熟過程において、各アディポサイトカインの発現パターンは異なることが明らかとなった。初代培養脂肪細胞におけるビスファチンの遺伝子発現増大はレプチン遺伝子の発現増大よりも早期且つ一過性であった。*in vitro* 実験系では脂肪細胞への分化誘導剤の 1 つとして DEX を添加している。過去に、DEX が脂肪細胞に及ぼす影響としてビスファチン発現誘導が報告されており [38]、それゆえ Day 2 においてレプチンよりも早期にビスファチンの遺伝子発現に増加がみられたと考えられた。そして、Day 2 以降に用いた成熟化培地には DEX が含まれていない為、ビスファチンの発現量が減少したと考えられた。また、これまでに PAI-1 と HB-EGF は脂肪細胞の分化、成熟化を抑制することがそれぞれ報告されている [39, 40]。そのため、脂肪前駆細胞から脂肪細胞へと細胞形態の変化が顕著にみられる直前の Day 2 に PAI-1 と HB-EGF の遺伝子発現が一過性に減少したものと考えられた。PAI-1 の一過性の発現量減少やアディポネクチン、レプチン、レジスチンの顕著な発現量増大は 3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期にもみられた。一方、HB-EGF とビスファチンの発現変動パターンは初代培養脂肪細胞と 3T3-L1 脂肪細胞で異なっていた。この矛盾は細胞種の違いやラットとマウスの種差が考えられた [41]。

本章では、メタボリックシンドロームの治療に有用なターゲットの候補となるアディポサイトカインを探索する為、肥満モデルラット脂肪組織におけるアディポサイトカイン発現量及び培養脂肪細胞の分化、成熟過程におけるアディポサイトカイン発現変動を評価した。その結果、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として、脂肪細胞の成熟化に重要な生理作用を有し、多数のアディポサイトカインの発現に影響を及ぼす可能性が高いレジスチンに注目した。しかし、レジスチンは、受容体が同定されておらず、脂肪細胞の成熟過程においてどのような生理作用を有するのかなど多くの議論が行われてきた。そして未だに決定的な結論は得られておらず、更なる研究が必要とされている。そこで次章では、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補としてのレジスチンの有用性を検討する為、脂肪細胞の成熟過程におけるレジスチンの生理作用解明を目指し、得られた知見を記述する。

## 第2章

### レジスチンの脂肪細胞における脂質代謝への関与

#### 2.1 緒言

インスリン抵抗性の増悪に関与するアディポサイトカイン、レジスチン(resistin = resistance to insulin)は、2001年に「チアゾリジン系薬剤である2型糖尿病治療薬 rosiglitazone の投与によって、糖尿病患者における発現量が減少する遺伝子」として発見された[42]。12.5 kDa の cysteine-rich secretory protein family に分類され、齧歯類では脂肪組織特異的に発現し、分泌される[43]。レジスチンの発現は、PPAR $\gamma$  によって抑制され、C/EBP $\alpha$  によって促進されることが報告されている[44-46]。さらに、レジスチン欠損マウスにおける食後血糖値の上昇が、野生型マウスと比較して抑制されることが報告されており、肥満時におけるレジスチンの機能抑制はインスリン抵抗性や血糖値上昇の改善に有用なのではないかと考えられるようになった[47]。興味深いことに、ヒトでは脂肪細胞の他にも、マクロファージにおけるレジスチンの高発現がみられる[48]。そして肥満時脂肪組織には、アディポサイトカインとして分泌される種々のケモカインの作用によって多数のマクロファージが浸潤している[49]。さらにレジスチンは、TNF- $\alpha$  の発現を誘導することで炎症を増悪させると考えられている[18]。レジスチンによって惹起された炎症は、脂肪組織以外にも拡大し、筋肉や肝臓においてインスリン感受性を低下させると考えられている(図 18) [50, 51]。さらに、レジスチンによる炎症の増悪はインスリン抵抗性だけでなく、腸炎[52]や敗血症[53]、冠動脈疾患[54]、リウマチ[18, 55]にも影響することが報告されている。炎症の増悪以外にも細胞内シグナルを介した、心筋肥大化への関与が報告されており[56]、レジスチンの生理作用に着目した創薬研究は、様々な疾患の治療に応用できるものと考えられる。しかし、レジスチンの過剰な生理作用が全身性に悪影響を及ぼすことが示唆されているにも関わらず、脂肪細胞に対する生理作用については不明な点が多く、その発現意義については議論の余地がある。

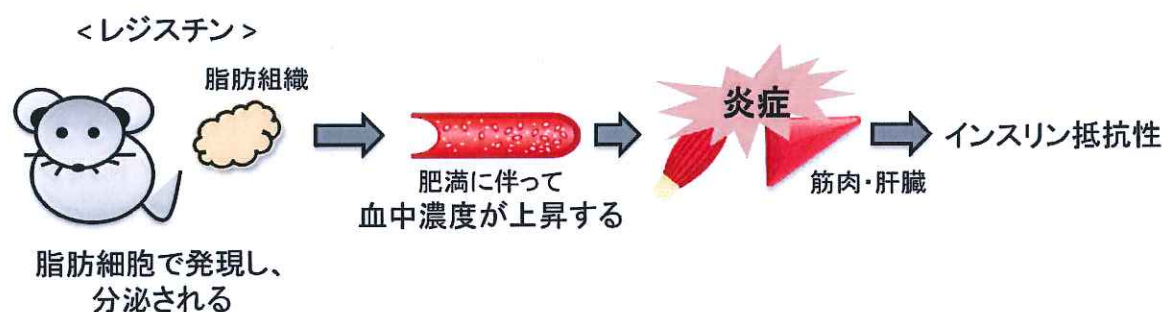


図 18. レジスチンによる炎症を介したインスリン抵抗性の惹起



第1章では、メタボリックシンドロームの治療に有用なターゲットの候補となり得るアディポサイトカインの探索を行い、レジスチンの生理作用が脂肪細胞の成熟化に重要である可能性を述べた。そこで本章では、脂肪細胞の成熟過程におけるレジスチンの生理作用をより詳細に検討し、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補として有用であるかどうかの評価を試みた。そのためにまず、3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期におけるレジスチンの発現を siRNA によって抑制した。そして、レジスチンの発現抑制が脂肪細胞成熟化に与える影響として、脂質の蓄積に注目した評価を行った。

## 2.2 実験方法

特に記述がない限り、第1章と同様に行った。

### 2.2.1 試薬

#### 【Real time RT-PCR】

プライマーは Invitrogen より購入した。配列は Table 2. に示した。

Table 2. 第2章で新規に使用したプライマー

Species	Gene	Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplification	Accession No.
mouse	<i>Fasn</i>	sense CCTCAAGACTGACTCGG	92 bp	NM_007988
		antisense CAGTGTGCTCAGGTTCACTT		
	<i>Scd1</i>	sense ATATCCTGGTTTCCTGGGT	91 bp	NM_009127
		antisense CAGCGTACTCACTGGC		
	<i>Gpat</i>	sense AACTGAAATGGAAGGAGAGC	116 bp	NM_008149
		antisense AGAGATGGGATACTGGGGTTG		
	<i>Acaca(Acc1)</i>	sense TGGCGTCCGCTCTGTGATA	103 bp	NM_133360
		antisense CATGGCGACTTCTGGGTTG		
	<i>Acacb(Acc2)</i>	sense GCAACCACATCTTCTCAACT	103 bp	NM_133904
		antisense CACAGACGGCTGCCATAG		
	<i>Srebf1</i>	sense GGAACAGACACTGGCCGA	96 bp	NM_011480
		antisense AAGTCACTGTCTTGGTTGTTGAT		
	<i>Chrebp (Mlxipl)</i>	sense CTGGGGACCTAACAGGAGC	166 bp	NM_021455
		antisense GAAGCCACCCTATAGCTCCC		
	<i>Actb</i>	sense GACGGCCAGGTCATCACTATTG	89 bp	NM_007393
		antisense CCACAGGATTCATACCCAAGA		

#### 【ELISA】

Mouse Resistin Quantikine ELISA Kit は R&D systems より購入した。

#### 【RNAi】

Opti-MEM、Lipofectamine RNAiMAX Reagent、siRNA(non-stealth, 3' dTdT overhang)は Invitrogen より購入した。配列は Table 3. に示した。

**Table 3. siRNA 配列 (5' to 3')**

siRNA-Resistin	sense	CCAAAUGCAAUAAAGAACAUUGGCU	25 bp
	antisense	AGCCAAUGUUCUUUAUUGCAUUUGG	

**【トリグリセリド定量】**

Triglyceride quantification kit は Wako より購入した。

**【動物】**

6-7 週齢雄性 C57BL/6J mouse は清水実験材料より購入した。高脂肪食(TD.88137)は Harlan Laboratories より購入した。Mayer's Hematoxylin Solution は Wako より購入した。

**【レジスチン発現プラスミド DNA 作成】**

*Nhe*I, *Sal*I, *Cla*I は TaKaRa より購入した。*Hind* III は TOYOBO より購入した。QIAprep Spin Miniprep kit は Qiagen より購入した。FuGENE HD Transfection Reagent は Promega より購入した。Plasmid DNA pcDNA3.1 (+)、プライマーは Invitrogen より購入した。プライマー配列は Table 4. に示した。

**Table 4. レジスチン発現プラスミド DNA 作成に使用したプライマー**

Species	Gene	Nucleotide sequence (5' to 3')		Amplification	Accession No.
mouse	<i>Resistin full</i>	sense	TCCTGCTAGCTCCTCTGCCA	461 bp	NM_022984
		antisense	AGACCCTAAGCTTAGACCTGC		

**【細胞培養】**

COS7 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。

**【組み換えレジスチンタンパク質】**

Recombinant Mouse Resistin (E.coli-derived)は R&D systems より購入した。

**【タンパク質抽出、Western blotting (WB)】**

IGEPAL CA-630 (NP-40)、Sodium deoxycholate、2-mercaptoethanol、 $\beta$ -glycerophosphate、 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、Sodium Dodecyl sulfate (SDS)、N, N'-Methylene-bis (acrylamide)、Acrylamide、Ammonium Peroxodisulfate (APS)、N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)、Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20)は Wako より購入した。Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail は Roche Applied Science より購入した。Bromophenol Blue は SIGMA より購入した。Clear Blot Membrane-p はアトーより購入した。Anti-FASN antibody、Anti-SCD-1 antibody、Anti- $\beta$ -actin antibody、Anti-lamin B1 antibody は Cell Signaling Technology より購入した。Anti-SREBP antibody (Clone : 2A4)は Medical &

Biological Laboratories Co.,LTD より購入した。Anti-ChREBP は ChREBP Cell-based translocation Assay Kit に付属のものを用いた。Goat anti-mouse IgG-HRP、Goat anti-rabbit IgG-HRP は Santa Cruz Biotechnology より購入した。スキムミルクは市販のものを用いた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent は GE Healthcare より購入した。

#### 【タンパク質定量】

BCA protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific より購入した。

#### 【SREBP-1、ChREBP 転写活性測定】

SREBP-1 transcription factor assay kit, ChREBP transcription factor assay kit は Cayman Chemical Company より購入した。

#### 【ChREBP 免疫蛍光染色】

ChREBP Cell-based translocation Assay Kit は Cayman Chemical Company より購入した。

#### 【Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)活性測定】

5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoate) (DTNB) は Wako より購入した。Palmitoyl-CoA、L-carnitine は SIGMA-ALDRICH より購入した。

### 2.2.2 ELISA

Mouse Resistin Quantikine ELISA Kit を用いてレジスチン濃度を測定した。実際の操作は添付マニュアルに従った。24 well plate に播種した 3T3-L1 細胞から回収した培養液は付属の Calibrator Diluent RD5T を用いて 50 倍希釈した。

### 2.2.3 RNAi

分化誘導後 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に siRNA を終濃度 50 nM となるように添加し、72 時間培養した。具体的には、24 well plate に播種した 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2、成熟化培地 500  $\mu$ L)に対して siRNA (20  $\mu$ M) 1.5  $\mu$ L と Lipofectamine RNAiMAX 1.5  $\mu$ L、Opti-MEM 97  $\mu$ L を混合し、室温で 20 分間インキュベートした後に添加した。容量は Dish の大きさに応じてスケールアップした。

以下に siRNA 導入のタイムスケジュールを示す(図 19)。



図 19. siRNA 導入のタイムスケジュール

## 2.2.4 トリグリセリド定量

Triglyceride quantification kit を用いてトリグリセリド濃度を測定した。

具体的には、3.5 cm Dish に培養した 3T3-L1 細胞をトリプシン処理し、エッペンチューブに回収した。室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、PBS(-) 1 mL で 1 回 wash した。再度、室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し得られた細胞ペレットを PBS(-) 300  $\mu$ L で懸濁した。クロロホルムとメタノールを 2:1 で混合し、細胞懸濁液に 300  $\mu$ L 添加した(用事調製)。ソニケーションを 30 分間処理し、細胞内の脂質を有機溶媒に抽出した。室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し下層の有機層を新規エッペンチューブに回収した。回収した有機層に等量の PBS(-)を加え、塩除去を行った。再度、室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し下層の有機層を新規エッペンチューブに回収した。回収した有機層が揮発するまで、ドラフト内で風乾した。エッペンチューブ内に脂質膜が残っていることを確認後、PBS(-) 120  $\mu$ L を加えて 10 分間水和させ、ソニケーション処理することでリポソーム状のサンプル液を調製した。

Triglyceride quantification kit に付属の発色剤を緩衝液に 3.5 mg/mL となるよう溶解した(発色液)。検量線用標準液、調製したサンプル溶液を 96 well plate の対応する well にそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ分注し、発色液 250  $\mu$ L を添加した。37°C、遮光条件下で 5 分間インキュベートした後、主波長 600 nm、副波長 700 nm の吸光度を測定した。

## 2.2.5 レジスチン発現プラスミド DNA 作成

### a) インサートの作成

第 1 章と同様の操作方法で C57BL/6J マウスの副辜丸上脂肪組織から total RNA を抽出した(1.2.3 参照)。抽出した total RNA 1  $\mu$ g 分に対して 2.5 mM dNTP 2  $\mu$ L、50  $\mu$ M Oligo (dT) 18 0.5  $\mu$ L、RNase free water を加え計 6  $\mu$ L とした。65°C で 5 分間熱処理することで、RNA を一本鎖にし、4°C で 5 分間冷却することで、Oligo (dT) 18 をアニーリングさせた。5 $\times$ RT buffer 2  $\mu$ L、0.1 M DTT 0.5  $\mu$ L、RNase free water 0.5  $\mu$ L、Super Script III 1  $\mu$ L を混合した後、熱処理サンプルに加え計 10  $\mu$ L とした。25°C で 5 分間、50°C で 60 分間、70°C で 15 分間の条件で逆転写反応を行い、反応終了後、RNase free water 190  $\mu$ L を加え cDNA サンプルを得た。調製した cDNA サンプル 5  $\mu$ L に滅菌水 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ M プライマー(Table 4) 1.25  $\mu$ L ずつ、2.5 mM dNTP 1  $\mu$ L、10 $\times$ Ex Taq buffer 1.25  $\mu$ L、Ex Taq HS 0.25  $\mu$ L を混合し、94°C で 2 分間を 1 cycle、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 30 cycles、72°C で 5 分間を 1 cycle の条件で PCR を行った。インサートを十分量作成する為、PCR は 9 サンプルに分けて行った。

### b) 制限酵素処理

PCR 反応後のサンプルを脱塩する為、フェノール/クロロホルム沈殿を行った。PCR 産物に滅菌水を添加し、計 150  $\mu$ L とした。さらに、TE 飽和フェノール 75  $\mu$ L、クロロホルム 75  $\mu$ L を添加し、vortex した。室温、12,000 rpm、で 1 分間遠心分離し、上層を 150  $\mu$ L 回収した。回収した上層に 100%エタノール 375  $\mu$ L、3 M 酢酸ナトリウム 15  $\mu$ L を混合した。室温、14,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を除去した。核酸ペレットを 70%エタノール 700  $\mu$ L で wash した後、室温、12,000 rpm で 1 分間遠心分離した。上清を除去し

た後、適量の滅菌水(10  $\mu$ L 程度)に溶解した。

脱塩処理したインサート 8  $\mu$ L に制限酵素(*Nhe* I、*Hind* III)をそれぞれ 1  $\mu$ L ずつ、M buffer を 2  $\mu$ L、滅菌水 8  $\mu$ L を添加し、37°C で 2 時間反応させることで制限酵素処理を行った。制限酵素処理後のインサートは再度脱塩した。

#### c) プラスミド DNA の調製

プラスミド DNA を 5  $\mu$ g 分と滅菌水を混合して計 16  $\mu$ L とした。さらに、制限酵素(*Nhe* I、*Hind* III)をそれぞれ 1  $\mu$ L ずつ、M buffer を 2  $\mu$ L 添加し、37°C で 3 時間反応させることで制限酵素処理を行った。制限酵素処理後のプラスミド DNA は再度脱塩した(2.2.5 b 参照)。

制限酵素処理によって切断した直鎖状プラスミド DNA のセルフライゲーションを阻害するため、プラスミド DNA の末端を脱リン酸化した。具体的には、脱塩処理したプラスミド DNA 20  $\mu$ L に滅菌水 1.5  $\mu$ L、CIP 1  $\mu$ L、10 $\times$ NE buffer 3 2.5  $\mu$ L を添加し、計 25  $\mu$ L とした。37°C で 1 時間反応させることで CIP 処理を行い、反応終了後に再度、脱塩処理した。

#### d) ライゲーション

調製したインサート及びプラスミド DNA を適量の混合比(モル比)で混合し、TaKaRa 2 $\times$ Ligation Mix を混合した。今回は 1:1、1:3、1:9 の混合比でそれぞれライゲーションを行った。また、プラスミド DNA は 2  $\mu$ L に統一した。16°C で一晩反応させることでライゲーションを行った。

#### e) 形質転換

ライゲーション後のサンプルをそれぞれコンピテントセル(DH5 $\alpha$ )に導入し形質転換を行った。氷上で溶解したコンピテントセル 10  $\mu$ L にライゲーション後のサンプルを 1  $\mu$ L 添加し、氷上で 30 分間インキュベートした。42°C に設定したヒートブロックで 45 秒間熱処理し、氷上で 1 分間インキュベートした。熱処理の時間は厳密に行った。それぞれのサンプルに SOC 培地を 200  $\mu$ L ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。4°C、5,000 rpm で 2 分間遠心分離し、上清 125  $\mu$ L を除去した。残りの SOC 培地で菌ペレットを懸濁し LB プレートに播種した後、37°C で一晩インキュベートした。

##### ・LB プレートの調製

アンピシリン 200 mg を超純水 4 mL に溶解し、濾過滅菌後、分注しておいた(50 mg/mL、-20°C 保存)。LB broth 4 g と Agar, Powder 3 g を超純水 200 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。65°C 付近まで冷却し、50 mg/mL アンピシリンを 100  $\mu$ g/mL となるように添加した。ドラフト内、ガスバーナー付近でプレートに分注し、15-20 分間インキュベートすることで凝固させた。

#### f) プラスミド DNA 大量調製

滅菌済み LB broth 溶液を 5 mL ずつ 15 mL コニカルチューブに分注した。50 mg/mL アンピシリンを 10  $\mu$ L 添加し、終濃度 100  $\mu$ g/mL とした後、LB プレートにできたコロニー 1 つから菌株を植菌した。37°C、200 rpm で振とうしながら一晩インキュベートした。

・LB broth 溶液の調製

LB broth を 4 g 秤量し、超純水 200 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した(4°C 保存)。

g) プラスミド DNA 精製

QIAprep Spin Miniprep kit を用いてプラスミド DNA を精製した。一晚インキュベートした植菌済み LB broth を室温、15,000 rpm で遠心分離した。菌ペレットに Buffer P1 を 250  $\mu$ L 添加し、vortex することでペレットを完全に融解した。Buffer P2 を 250  $\mu$ L 添加し、4-6 回転倒混和した。Buffer N3 を 350  $\mu$ L 添加し、10 回転倒混和した。室温、13,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を数回に別け、全量を QIAprep スピンカラムにアプライした。室温、13,000 rpm で 1 分間遠心し、フロースルー液を除去した。Buffer PE を 750  $\mu$ L アプライし、再度室温、13,000 rpm で 1 分間遠心し、フロースルー液を除去した。残留している Buffer PE を完全に除去するため、再度室温、13,000 rpm で 1 分間遠心した。スピнкаラムを新規の 1.5 mL エッペンチューブに移し、Buffer EB を 30  $\mu$ L 添加し 1 分間インキュベート後、室温、13,000 rpm で 1 分間遠心操作することでプラスミド DNA を得た。生成したプラスミド DNA は吸光度測定により濃度を求めた (-20°C 保存)。

h) 制限酵素処理によるプラスミド DNA の確認

設計したプラスミド DNA の作成を確認する為、制限酵素処理を行った。今回は *Cla* I と *Sal* I の制限酵素及び H Buffer を用いた。37°C で 2 時間反応させた後、1%アガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下でゲル撮影を行った。

i) シークエンスチェック

設計したプラスミド DNA の作成を確認する為、シークエンスチェックを行った。具体的には、プラスミド DNA 250 ng 分に 5 $\times$ Big Dye Terminator v1.1 Sequencing Buffer 2  $\mu$ L、Big Dye terminator v1.1 cycle Sequencing kit 1  $\mu$ L、1  $\mu$ M mResistin Full primer 1.5  $\mu$ L (sense もしくは antisense)、滅菌水を遮光しながら混合し、計 10  $\mu$ L とした。95°C で 1 分間を 1 cycle、95°C で 10 秒間、50°C で 5 秒間、60°C で 2 分 30 秒間を 40 cycles の条件で PCR を行った。PCR 後のサンプル 10  $\mu$ L に SAM Solution 45  $\mu$ L、Big Dye X terminator Solution 10  $\mu$ L を混合した後、低温室(4°C)で 30 分間 vortex した。PCR チューブ内のサンプル 65  $\mu$ L をシークエンス用 96 well プレートにアプライした。室温、2,000 rpm で遠心し、Genetic Analyser 3130 を用いてシークエンスチェックを行った。

j) グリセロールストック

プラスミド DNA 大量調整後の菌培養液 800  $\mu$ L に 50%グリセロールを 200  $\mu$ L 添加し、-80°C 保存した。

## 2.2.6 COS7 細胞培養、プラスミド DNA 導入

### a) 培地調製

DMEM を 4.75 g 秤量し、超純水で溶解し 435 mL にメスアップ後、室温で 30 分間攪拌し、オートクレーブ滅菌(121°C、2 気圧、20 分)した。十分に冷却した後、3%グルタミン 10 mL、10% NaHCO<sub>3</sub> 5 mL、FBS 50 mL を添加した。

### b) 継代

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。継代に用いる細胞数も  $4 \times 10^5$  cells/10 cm dish となるように播種し、48 時間毎に継代した。

### c) プラスミド DNA 導入

プラスミド DNA 導入を行う前日に  $2.5 \times 10^4$  cells/well (24 well plate) となるよう COS7 細胞を播種した。プラスミド DNA 0.5  $\mu$ g に FuGENE HD Transfection Reagent 1.5  $\mu$ L と Opti-MEM を添加し計 25  $\mu$ L に調製した (プラスミド DNA : FuGENE HD = 1 : 3)。室温で 15 分間インキュベートした後、225  $\mu$ L/well となるよう培地交換した COS7 細胞に添加した。24 時間後に 250  $\mu$ L/well となるよう培地交換し、さらに 48 時間培養し培地を回収した。500 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、レジスチン含有培養上清を得た(4°C 保存、1 週間以内に使用)。

## 2.2.7 組み換えレジスチンタンパク質

BSA 0.1%含有 PBS を作成し、凍結保存されたレジスチンタンパク質を 250 ng/ $\mu$ L となるよう溶解後、分注し-20°C で保存した。siRNA 導入から 24 時間後の 3T3-L1 細胞に終濃度 500 ng/mL となるよう添加した。対照には BSA 0.1%含有 PBS を添加し、同容量とした。

## 2.2.8 タンパク質抽出

### 【細胞内タンパク質抽出】

#### a) 試薬調製

##### 2M Tris-HCl (pH 8.0 or 6.8)

Tris を 3.634 g 秤量し、超純水 15 mL に溶解した後、HCl で pH 8.0 もしくは pH 6.8 に調整した。

##### Radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (-20°C 長期保存、4°C 短期保存)

2M Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 mL に NaCl 877 mg、NP-40 1 mL、Sodium deoxycholate 500 mg、SDS 100 mg を溶解・混合し、超純水で 100 mL にメスアップした。実験に応じて 50 $\times$ 脱リン酸化阻害剤、10 $\times$ Complete Mini を混合した。

### 5×Sample buffer (-20°C 保存)

(還元型) 2M Tris-HCl (pH 6.8) 300  $\mu$ L に 2-mercaptoethanol 500  $\mu$ L、SDS 200 mg、Bromophenol Blue 10 mg、グリセロール 5 mL を溶解・混合し、超純水で 10 mL にメスアップした。

(非還元型) 2M Tris-HCl (pH 6.8) 300  $\mu$ L に SDS 200 mg、Bromophenol Blue 10 mg、グリセロール 1 mL を溶解・混合し、超純水で 10 mL にメスアップした。

### b) 抽出

あらかじめ PBS と RIPA buffer を氷冷しておいた。培養細胞を PBS で 2 回 wash し、適量の RIPA buffer を添加した(15-20  $\mu$ L/well (24 well plate)、40-50  $\mu$ L/3.5 cm dish)。セルスクレーパーを用いてサンプルを回収した。回収したサンプルを 30 分間、振とうしながらインキュベートした後、ソニケーションを行うことで細胞内タンパク質を抽出した。操作は全て氷上にて行った。

### 【核内タンパク質抽出】

#### a) 試薬調製

#### 50×脱リン酸化阻害剤(-80°C 保存)

$\beta$ -glycerophosphate 15.3 mg と  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  9.2 mg を超純水 1 mL に溶解した。

#### 10×低張液(4°C 保存)

HEPES 1668 mg を超純水 50 mL に溶解し、NaOH で pH 7.5 に調整した後、超純水で 70 mL にメスアップすることで 100 mM HEPES (pH 7.5) を調製した。100 mM HEPES (pH 7.5) 5 mL に NaF 8.4 mg、EDTA 1.86 mg をそれぞれ溶解した。

#### Wash 用 PBS (4°C 保存)

50×脱リン酸化阻害剤を PBS で 50 倍希釈した。

#### 10×Complete, Mini (-80°C 保存)

Complete, Mini 1 tablet を超純水 1 mL に溶解した。

#### 低張液(4°C 保存)

10×低張液 950  $\mu$ L、50×脱リン酸化阻害剤 190  $\mu$ L、10×Complete, Mini 950  $\mu$ L、超純水 7410  $\mu$ L を混合した。

#### 10% NP-40 (4°C 保存)

超純水 9 mL に IGEPAL CA-630 を 1 mL 混合した。

#### 2×核抽出液(4°C 保存)

HEPES 162.2 mg を超純水 26 mL に溶解し、NaOH で pH 7.9 に調整した後、超純水で 34 mL にメスアップすることで 20 mM HEPES (pH 7.9) を調製した。20 mM HEPES (pH 7.9) 16 mL に EDTA 1.19 mg、 $\text{MgCl}_2$  9.76



mg、NaCl 785.4 mg、グリセロール 4 mL を溶解・混合した。

#### 10 mM DTT (-20°C 保存)

DTT 4.62 mg を超純水 3 mL に溶解した。

#### 核抽出液(-80°C 保存)

2×核抽出液 75 μL、50×脱リン酸化阻害剤 3 μL、10×Complete, Mini 15 μL、10 mM DTT 15 μL、超純水 42 μL をそれぞれ混合した。

#### b) 抽出

1.5 mL エッペンチューブにトリプシン処理した細胞を回収し、4°C、15,000 rpm で2分間遠心分離することでサンプル細胞のペレットを得た(-80°C 保存)。氷冷した低張液を 500 μL 添加し、氷上で15分間インキュベートした。10% NP-40 を 100 μL 添加し、慎重にダウンスホモジナイザーを用いて細胞膜を破壊した(5回ストローク)。4°C、2,500×g で10分間遠心分離し、上清を除去後、wash用 PBS 500 μL を添加した。4°C、1,000×g で5分間遠心分離し、上清を除去後、核抽出液を 20 μL 添加した。氷上で30分間インキュベートすることで核膜を破壊した(15分毎に vortex を行った)。4°C、15,000 rpm で10分間遠心分離し、上清を回収した。

### 2.2.9 タンパク質定量

BCA protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定した。付属の試薬 A、B を 50:1 となるよう混合し、サンプル 12.5 μL に対し 100 μL ずつ添加した。遮光、37°C で30分間インキュベートした後、562 nm の吸光度を測定した。

### 2.2.10 WB

#### a) 試薬調製

##### L液 (4°C 保存)

Tris を 18.155 g 秤量し、超純水 40 mL に溶解した。HCl で pH 8.8 に調整後、SDS を 100 mg 溶解し、超純水で 100 mL にメスアップした。(Final : Tris 1.5 M、SDS 0.1%)

##### M液 (4°C 保存)

Tris を 6.055 g 秤量し、超純水に溶解した。HCl で pH 6.8 に調整後、SDS を 100 mg 溶解し、超純水で 100 mL にメスアップした。(Final : Tris 0.5 M、SDS 0.1%)

#### 30%アクリルアミド溶液 (N液 : 4°C 保存、遮光保存)

Acrylamide 29.2 g と N,N'-Methylene-bis (acrylamide) 800 mg をそれぞれ秤量し、超純水 100 mL に溶解した。

#### 10% APS (4°C 保存、遮光保存)

APS を 25 mg 秤量し、超純水 250  $\mu$ L に溶解した。

#### 泳動 buffer (室温保存)

Tris 3 g、Glycine 14.4 g、SDS 1 g をそれぞれ秤量し、超純水 1000 mL に溶解した。

#### Blotting buffer (室温保存)

Tris 3 g、Glycine 14.4 g、SDS 1 g をそれぞれ秤量し、超純水 800 mL に溶解した後、100%メタノールを 200 mL 混合した。

#### TBS-0.1% T (TBS-T : 室温保存)

2M Tris-HCl (pH 7.5) 62.5 mL に NaCl 54.79 g を溶解し、超純水で 500 mL にメスアップすることで 25 $\times$ TBS を調製した。25 $\times$ TBS 20 mL に Tween20 500  $\mu$ L、超純水 479.5 mL を混合し TBS-0.1% T を調製した。

#### b) サンプル調製

タンパク質濃度を測定後、RIPA buffer、5 $\times$ sample buffer を用いて適切なサンプル濃度とした後、95°C、5 分間熱処理することでサンプルを得た(-20°C 保存)

#### c) SDS-PAGE 作成、電気泳動

目的のタンパク質分子量に応じて SDS-PAGE を作成し、電気泳動を行った。各濃度の SDS-PAGE の作成は Table 5. に従って行った。

Table 5. SDS-PAGE 作成と目的タンパク質分子量の目安

SDS-PAGE	3.5 %	5.0 %	8.0 %	12 %	20 %	Stacking Gel	
タンパク質 (kDa)	1000-2000	80-500	60-400	40-200	1-100		
N液	1.4 mL	2 mL	3.2 mL	4.8 mL	8 mL	N液	1 mL
L液	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	M液	1.5 mL
10% APS	48 $\mu$ L	48 $\mu$ L	48 $\mu$ L	48 $\mu$ L	48 $\mu$ L	10% APS	45 $\mu$ L
TEMED	8 $\mu$ L	8 $\mu$ L	8 $\mu$ L	8 $\mu$ L	8 $\mu$ L	TEMED	7.5 $\mu$ L
超純水	7.6 mL	7 mL	5.8 mL	4.2 mL	1 mL	超純水	3.5 mL

#### d) 転写

電気泳動後のゲルを Blotting buffer で wash した。転写装置に Blotting buffer で十分に湿らせた濾紙、メンブレン、ゲルをセットし、2 mA/cm<sup>2</sup>、1 時間の条件で転写を行った。メンブレンはあらかじめ 100%メタノールに 1 分間浸けた後、30 分以上 Blotting buffer に浸けたものを使用した。

#### e) ブロッキング、一次抗体

転写後のメンブレンを 5%スキムミルクに漬け、室温で 1 時間振とうした。一次抗体を氷冷した TBS-0.1%

T を用いて適当に希釈し、メンブレンとともに密封した。4°C で振とうしながら一晩インキュベートした後、室温でさらに1時間振とうしながらインキュベートした。

・5%スキムミルク

スキムミルクを 2.5 g 秤量し、TBS-0.1% T 50 mL に溶解させ、30 分以上攪拌した(用事調製)。

#### f) 二次抗体、評価

一次抗体に適した二次抗体を氷冷した TBS-0.1% T を用いて適当に希釈し、メンブレンとともに密封した。室温で振とうしながら1時間インキュベートした。TBS-0.1% T で振とうしながら10分間の wash を3回行った。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて、抗体のペルオキシダーゼ活性により生じた化学発光を測定・評価した。

### 2.2.11 SREBP-1、ChREBP 転写活性測定

Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)と Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)の転写活性は SREBP-1 transcription factor assay kit、ChREBP transcription factor assay kit を用いてそれぞれ測定した。操作は添付のマニュアルに従って行った。

### 2.2.12 ChREBP 免疫蛍光染色

ChREBP の免疫染色は ChREBP Cell-based translocation Assay Kit を用いて、添付のマニュアルに従って行った。

### 2.2.13 CPT-1 活性測定

CPT-1 の活性は過去の報告を参考に測定した[57, 58]。その原理は、CPT の作用によってミトコンドリアマトリックスに輸送されるパルミトイル-CoA 由来の CoA-SH を DTNB と反応させ、生じる黄色色素 TNB (モル吸光係数: 13,600)の吸光度増加を追跡することである(図 20)。

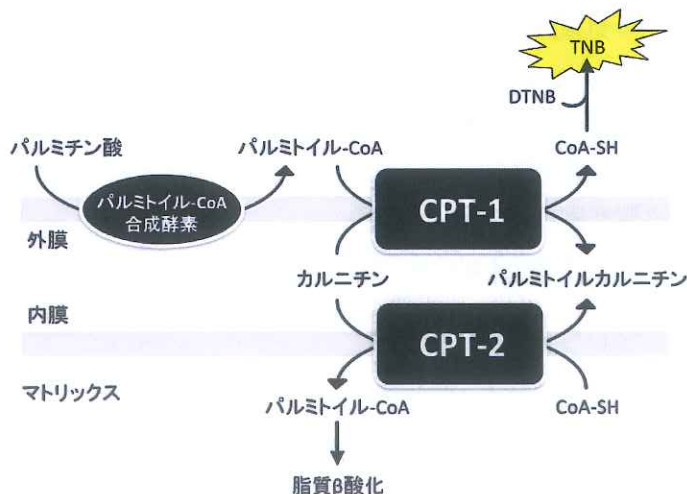


図 20. CPT-1 活性測定原理

**a) 試薬調製**

**116 mM Tris-HCl (pH 8.0、室温保存)**

Tris 281 mg を超純水 15 mL に溶解し、HCl で pH 8.0 に調整した後、超純水で 20 mL にメスアップした。

**12.5 mM EDTA (4°C 保存)**

EDTA 23.265 mg を超純水 5 mL に溶解した。

**12.5 mM L-carnitine (4°C 保存)**

L-carnitine 6.17 mg を超純水 2.5 mL に溶解した。

**10% Triton X-100 (4°C 保存)**

Triton X-100 100  $\mu$ L を超純水 900  $\mu$ L に加え希釈した。

**12.5 mM DTNB (-20°C 保存、遮光)**

DTNB 2.477 mg を 100% EtOH 500  $\mu$ L に溶解した。

**1 mM Palmitoyl-CoA (-20°C 保存)**

Palmitoyl-CoA 1 mg を超純水 1 mL に溶解した。

**抽出液**

116 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100  $\mu$ L、12.5 mM EDTA 20  $\mu$ L、10% Triton X-100 2  $\mu$ L、超純水 78  $\mu$ L を混合した。

**反応液 (1 サンプル量：用事調製)**

116 mM Tris-HCl (pH 8.0) 250  $\mu$ L、12.5 mM EDTA 50  $\mu$ L、10% Triton X-100 5  $\mu$ L、12.5 mM DTNB 10  $\mu$ L、超純水 115  $\mu$ L を混合した。

**b) 操作**

3.5 cm Dish に培養した 3T3-L1 細胞をトリプシン処理によって回収した。回収した細胞を 1,500 $\times$ g、4°C、5 分間遠心操作することでペレット状にした。低張液 80  $\mu$ L (2.2.8 参照) で細胞ペレットを懸濁し、4°C、10 分間インキュベートした後、ダウンスホモジナイザーを用いて細胞膜を破壊した。700 $\times$ g、4°C、10 分間遠心分離することで、核を沈殿させた後、サンプル(上清)を得た。

サンプルを一部分注し、BCA 法にてタンパク質定量を行った(2.2.9 参照)。

測定は 1 サンプルずつ行った。プレートリーダーの条件を下記の通り設定し、前反応、blank 測定、CPT-1 活性測定を行った。

<Infinite M200 (TECAN)/ PLATE manager V4>

Corning 96 Flat transparent

Plate

Temperature: 30°C

Shaking: 3 sec, 1.5 mm Linear

Kinetic cycle

Number of cycle: 10 or 21

Use kinetic interval: 30 sec

Absorbance: 412 nm

Number of flashes: 10

<前反応>

サンプルに含まれる-SH基をすべて反応させる為に行った。96 well plate にサンプル 32.2  $\mu\text{L}$  を分注し、反応液 244  $\mu\text{L}$  を添加し、プレートリーダーにて吸光度の上昇を測定した。反応が終了し吸光度の上昇がみられなくなったことを確認し(約 20 分間)、blank の測定を行った。

<blank 測定>

サンプル内に含まれる Acyl-CoA 水解酵素の反応による吸光度の上昇を測定する為に行った。前反応が終了したサンプルに 1 mM Palmitoyl-CoA 12.84  $\mu\text{L}$  を添加し、5 分間プレートリーダーにて吸光度の上昇を測定した。

<CPT-1 活性測定>

blank 測定から CPT-1 活性測定までは、全ての Palmitoyl-CoA が反応してしまわないように、素早く操作を行った。blank を測定したサンプルに 12.5 mM L-carnitine を 32.2  $\mu\text{L}$  添加し、5 分間プレートリーダーにて吸光度の上昇を測定した。

<解析>

CPT-1 活性測定から得られた吸光度上昇の傾きから blank の吸光度上昇の傾きを差し引くことで CoA-SH の生成速度(Abs/ min)を求めた。TNB のモル吸光係数(13,600)、サンプルのタンパク質濃度を用いて、CPT-1 活性(nmol/ min/ mg protein)を評価した。

#### 2.2.14 高脂肪食摂餌マウスへの抗レジスチン抗体投与

購入した C57BL/6J マウスを通常食で 1 週間飼育した後、通常食群及び高脂肪食群に無作為に分別した。高脂肪食群には脂質 21%、スクロース 34%、コレステロール 0.2% (42% kcal from fat)の高脂肪食を与えた。高脂肪食の摂餌開始と同時に抗レジスチン抗体を 5 日おきに尾静脈注射によって投与した。Control 抗体投与群には Mouse IgG1  $\kappa$ Iso Control を投与した。30 日間飼育した後、24 時間の絶食を行い屠殺した。

## 2.2.15 肝臓凍結切片の作成、ヘマトキシリン/Oil Red O 染色

摘出した肝組織を 5-10 mm の大きさに切り、10% Formalin Neutral buffer solution に漬け、4°C で一晩振とうしながらインキュベートすることでホルマリン固定を行った。凍結切片作成時の氷晶発生を避けるため、4°C で振とうしながら 10%スクロース溶液に 3 時間、20%スクロース溶液に 3 時間、30%スクロース溶液に一晩の順にインキュベートすることで組織を脱水した。30%スクロース溶液に組織が沈むことを確認したのち、OCT Compound で包埋した(-80°C 保存)。包埋した組織ブロックから-20°C に設定したマイクロトームを用いて 8  $\mu\text{m}$  の凍結切片を切り出した。

作成した凍結切片は超純水に 30 秒間浸した後、60%イソプロパノールに 1 分間浸した。さらに濾過した 60% Oil Red O 溶液に浸し、37°C で 15 分間インキュベートした。再度、60%イソプロパノールに 1 分間浸した後、超純水に数秒間浸した。余剰の水分を除去した後、Mayer's Hematoxylin Solution に 10 分間浸した。45°C に加温した超純水で 10 分間、色出しを行い、グリセロールを用いて封入した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 siRNA 導入によるレジスチン発現抑制

3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期(Day 2-5)に一過性の発現増大を示したレジスチン(図 16)の生理作用を検討するため、Day 2 に Anti-resistin siRNA を導入した。従来、十分に脂肪滴を蓄積するまで成熟化させた 3T3-L1 脂肪細胞(Day 8-10)では siRNA 導入による遺伝子発現抑制が困難であることが知られている。これは、分化誘導刺激時に、分化しなかった一部の細胞が増殖し、分化した細胞の表面を覆うことで siRNA の導入を阻害することが原因であると考えられている(図 21) [59]。一方、分化誘導刺激後の Day 2 における 3T3-L1 脂肪細胞への siRNA 添加は、上記の問題点を回避しつつレジスチン遺伝子の発現を抑制し、培地中へのタンパク質分泌量を減少させることが可能であった(図 22 A, B)。

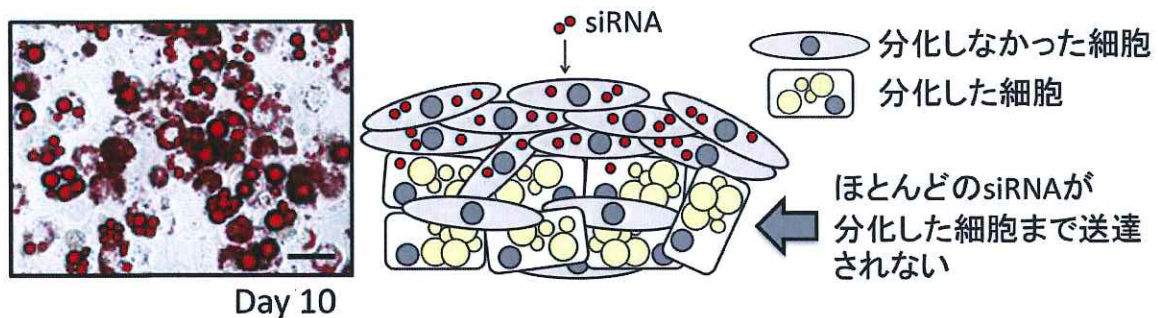


図 21.十分に成熟した 3T3-L1 脂肪細胞への siRNA 導入  
細胞に蓄積した脂質を Oil Red O 染色し、顕微鏡画像を撮影した。赤色：脂質、Bars : 50  $\mu\text{m}$

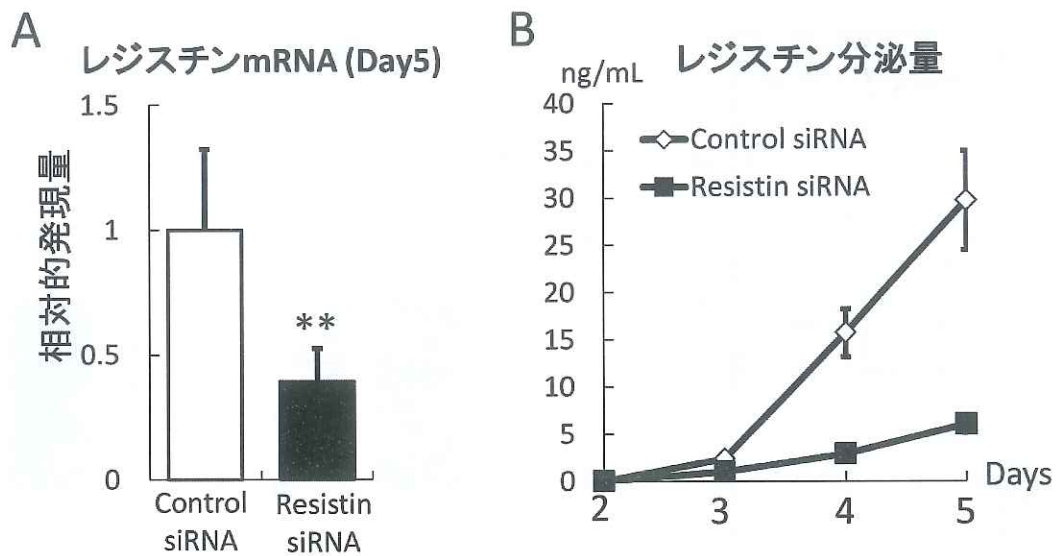


図 22. siRNA 導入によるレジスチン発現抑制

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(A) レジスチン遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的発現量を示した(versus Negative control siRNA)。(B) 表記した日数における培地中へのレジスチンタンパク質分泌量を ELISA にて定量した。結果は平均値及び標準偏差を示した。

(A, n = 8、B, n = 3、\*\* $p < 0.01$  versus Control siRNA)

### 2.3.2 レジスチン発現抑制による脂質蓄積量への影響

3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期におけるレジスチン発現増大を siRNA によって抑制した結果、興味深いことに、脂肪細胞における脂質蓄積量が有意に減少することを見出した。siRNA 導入 3T3-L1 脂肪細胞を Day 5 まで成熟化させた後、脂肪滴を Oil Red O 染色した結果、細胞内脂質蓄積量に約 30%の減少がみられた(図 23 A)。さらに、細胞内の脂質を抽出し、脂肪滴の主成分であるトリグリセリドの定量を行った結果、約 40%の減少がみられた(図 23 B)。

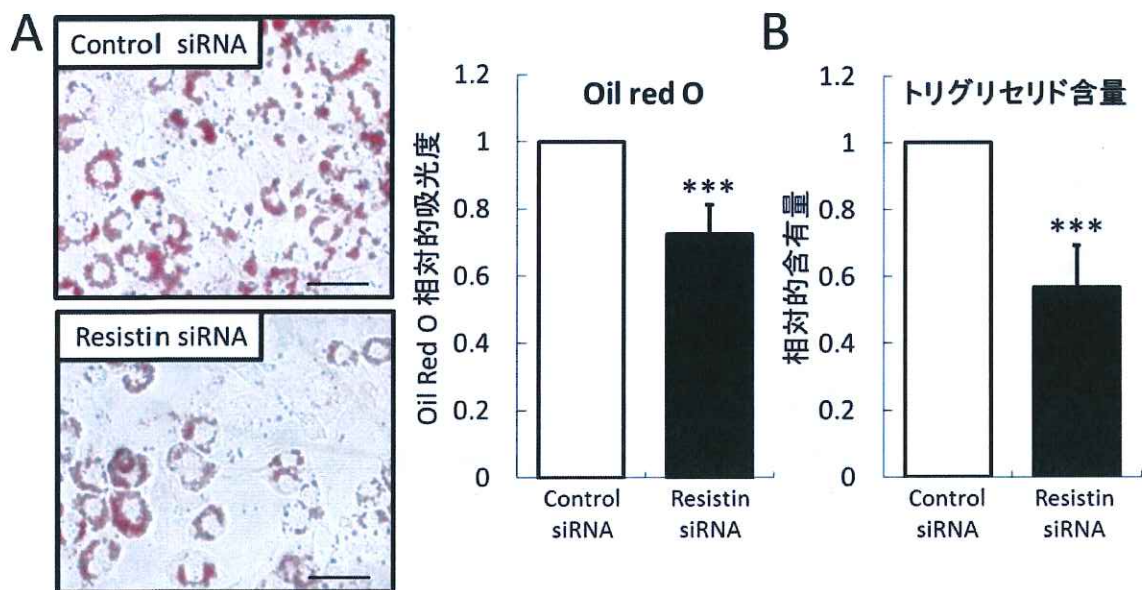


図 23. レジスチン発現抑制による脂質蓄積量減少

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞 (Day 2) に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(A) 細胞に蓄積した脂質を Oil Red O 染色し、顕微鏡画像を撮影した。赤色：脂質、Bars : 50  $\mu\text{m}$ 。細胞内色素を抽出し、波長 540 nm の吸光度を測定し、相対値を求めた。(B) 細胞に蓄積した脂質を抽出し、トリグリセリド濃度を測定し、相対値を求めた。結果は平均値及び標準偏差を示した。(A, n=5、B, n=4、\*\*\* $p < 0.001$  versus Control siRNA)

### 2.3.3 レジスチン発現抑制脂肪細胞に対するレジスチン添加実験

レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量の減少をさらに検討するため、レジスチンの発現を抑制した 3T3-L1 脂肪細胞にレジスチンタンパク質を添加した。その結果、レジスチン発現抑制脂肪細胞にみられた脂質蓄積量の減少が回復した(図 24 A)。しかし、脂質蓄積量減少の回復は一部であり、また、終濃度 500 ng/mL 以上の高いレジスチン濃度を必要とした。この原因として、添加したレジスチンタンパク質が大腸菌由来であった為、レジスチンの生理活性が減弱している可能性が考えられた[60]。そこで、レジスチン発現プラスミド DNA を COS7 細胞に導入することで、哺乳動物細胞由来のレジスチンを含む培養上清の調製を試みた。回収した培養上清を WB にて評価した結果、レジスチンタンパク質の存在及び二量体の形成が確認できた(図 24 B)。また、ELISA によって培養上清に含有されるレジスチン濃度を測定した結果、約 110 ng/mL のレジスチン分泌が確認された。siRNA を添加していない 3T3-L1 脂肪細胞 (Day 5) からは約 50 ng/mL のレジスチンタンパク質が分泌されていた(図 16 B)。そこで、終濃度 50 ng/mL となるようにレジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞にレジスチン含有培養上清を添加した。その結果、レジスチンの生理的な濃度であっても脂質蓄積量の減少が回復した(図 24 C)。



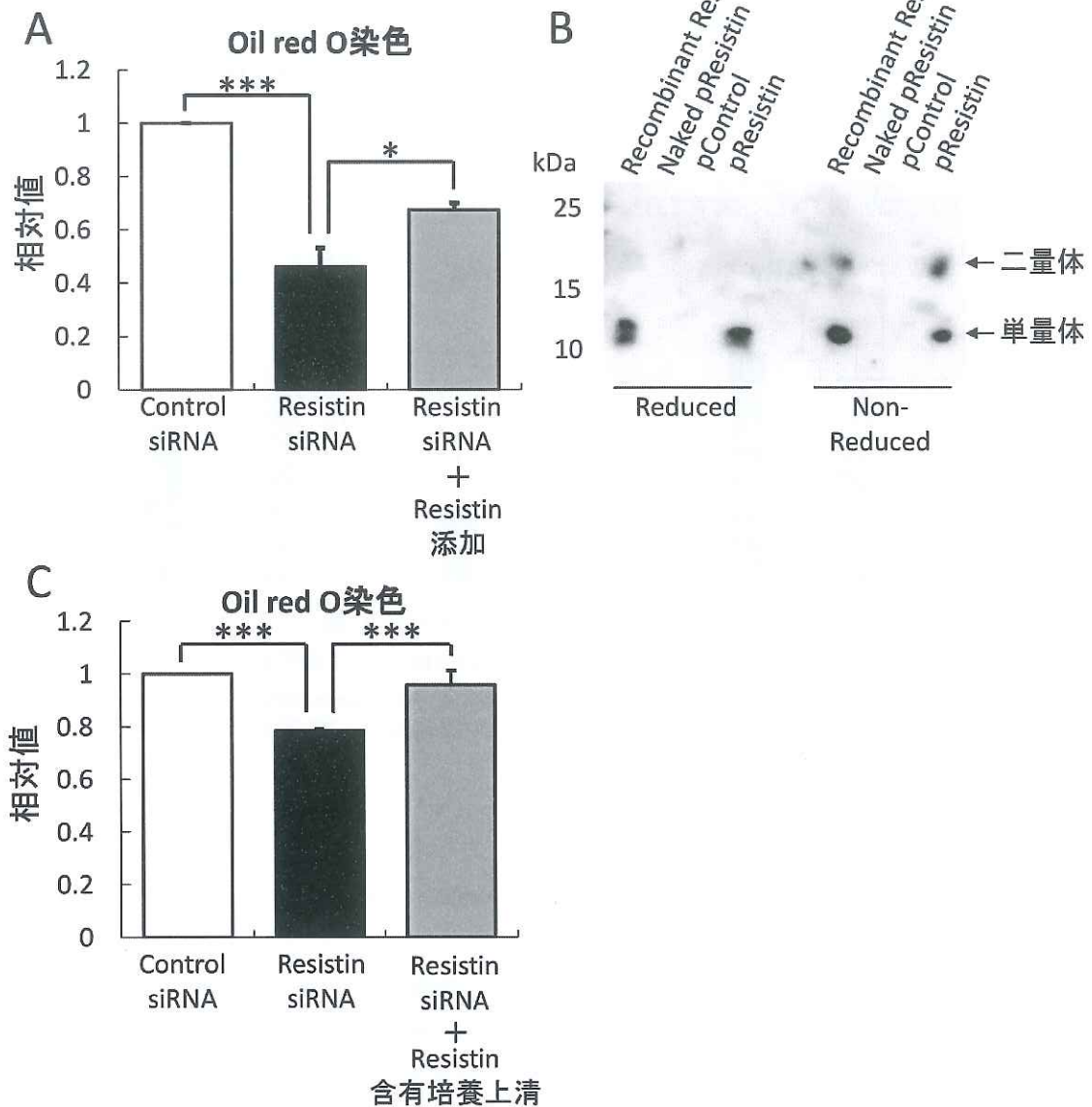


図 24. レジスチン添加による脂質蓄積量減少の回復

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。レジスチンの添加は Day 3 に行った。(A) レジスチンの発現を抑制した細胞に市販のレジスチンタンパク質を 500 ng/mL とするよう添加した。細胞に蓄積した脂質を Oil Red O 染色した後、細胞内色素を抽出し、波長 540 nm の吸光度を測定した。(B) レジスチン発現プラスミド DNA を作成し、COS7 細胞に導入することでレジスチン含有培養上清を調製した。市販のレジスチンタンパク質及び、Control プラスミド DNA、Resistin 発現プラスミド DNA をそれぞれ導入した細胞の培養上清を還元条件、非還元条件下でそれぞれ WB にて評価した。(C) 調製したレジスチン含有培養上清をレジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞に添加した。Day 5 まで培養した後、細胞に蓄積した脂質を Oil Red O 染色した。対照には Control プラスミド DNA 導入細胞の培養上清を添加した。(A, n=3, D, n=4, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 2.3.4 レジスチン発現抑制による脂肪細胞分化への影響

レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量減少の機序解明を目的に脂肪細胞分化過程に注目した。そこで、レジスチン発現抑制が脂肪細胞の分化に重要な転写因子である PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及び脂肪細胞分化マーカー A-FABP の遺伝子発現に影響を与えるかどうかを評価した(図 25)。しかし、これら遺伝子の発現量にほとんど変化はみられなかった。このことから、レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量の減少は、脂肪細胞の分化抑制とは異なる機序である可能性が考えられた。

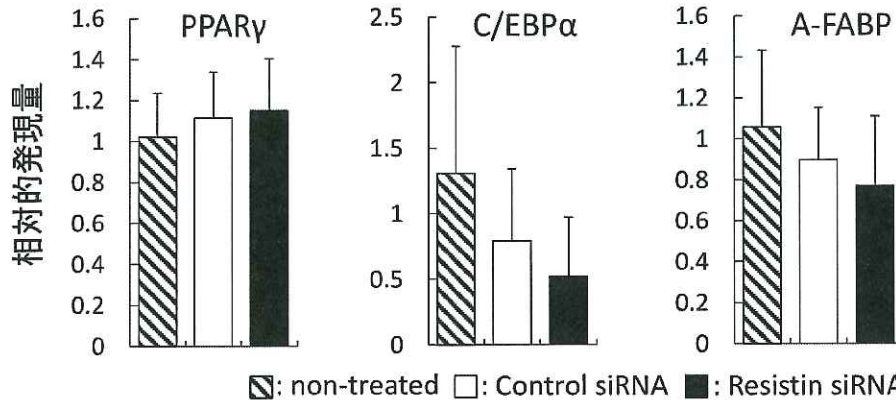


図 25. レジスチン発現抑制時における PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、A-FABP 遺伝子発現量

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、A-FABP 遺伝子発現量をそれぞれ real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(n=4)

### 2.3.5 レジスチン発現抑制が及ぼす転写因子 SREBP-1、ChREBP への影響

レジスチンの発現を抑制した脂肪細胞では、脂質の生合成が抑制されているのではないかと仮説を立てた。脂質の生合成に重要な酵素は多数存在するが、その多くが 2 種類の転写因子 SREBP-1 と ChREBP によって発現制御されている(図 26) [61-63]。さらに SREBP-1、ChREBP は共に脂肪細胞の分化、成熟化に伴って発現が増大することが知られている[64, 65]。そこで、これら転写因子の遺伝子発現量、タンパク質量、転写活性の変化について評価した。細胞内コレステロール濃度の増減に応じて転写活性が変化する SREBP-1 は、レジスチン発現抑制時、遺伝子発現量、タンパク質量に変化はみられず、転写活性にも影響はみられなかった(図 27)。一方、細胞内糖質濃度の増減に応じて転写活性が変化する ChREBP は、レジスチン発現抑制時、遺伝子発現量に変化はみられなかったが、タンパク質量に顕著な減少がみられた(図 28 A, B)。さらに、レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞内における ChREBP を免疫染色した結果、ChREBP タンパク質量の減少による蛍光の減弱に加え、核内に ChREBP が存在していない細胞が多数みられた(図 28 C)。そこで、核内タンパク質を抽出後、WB にて核内 ChREBP タンパク質量を評価した(図 28 D)。その結果、免疫染色の結果と一致して、レジスチン発現抑制時における核内 ChREBP タンパク質量が減少していることが明らかとなった。そして、ChREBP の転写活性を評価した結果、レジスチン発現抑制による有意

な活性低下がみられた(図 29 E)。また、レジスチン発現抑制時にみられた ChREBP タンパク質量の減少は、レジスチンタンパク質の添加によって回復する傾向がみられた(図 28 F)。

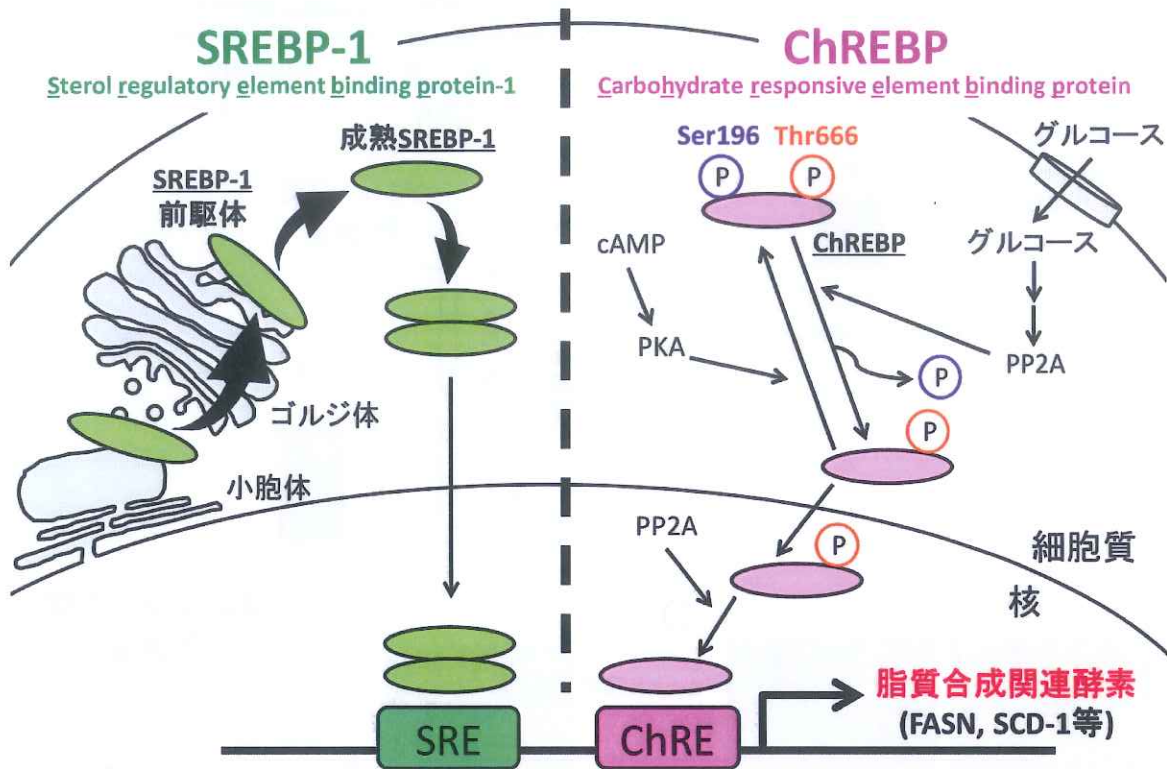


図 26. 脂質合成酵素の発現に関与する主要な転写因子

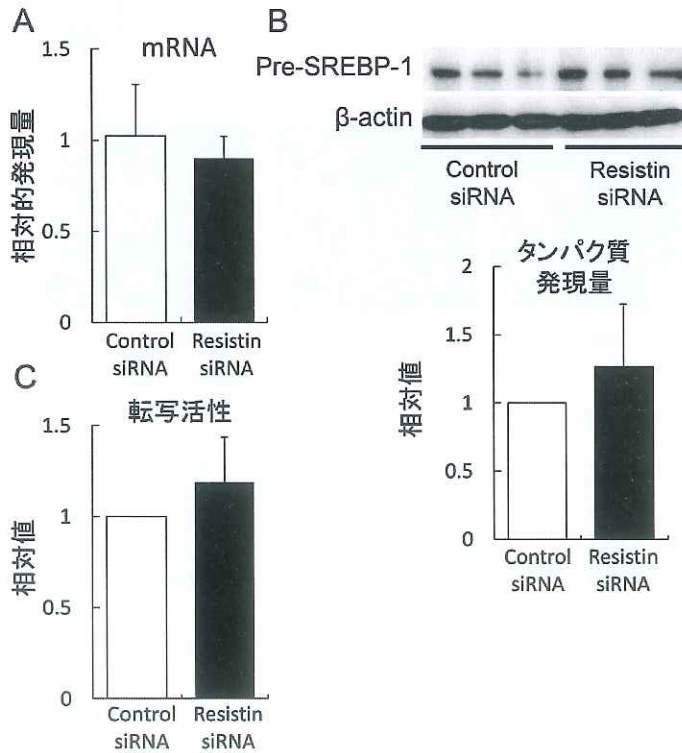


図 27. レジスチン発現抑制による

**SREBP-1 転写活性への影響**

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(A) SREBP-1 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。β-actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(B) 細胞内 SREBP-1 タンパク質量を WB にて評価した。β-actin を内部標準とし、画像解析を行い、相対値を示した。(C) SREBP-1 転写活性を測定し、相対値を示した。(n=3)

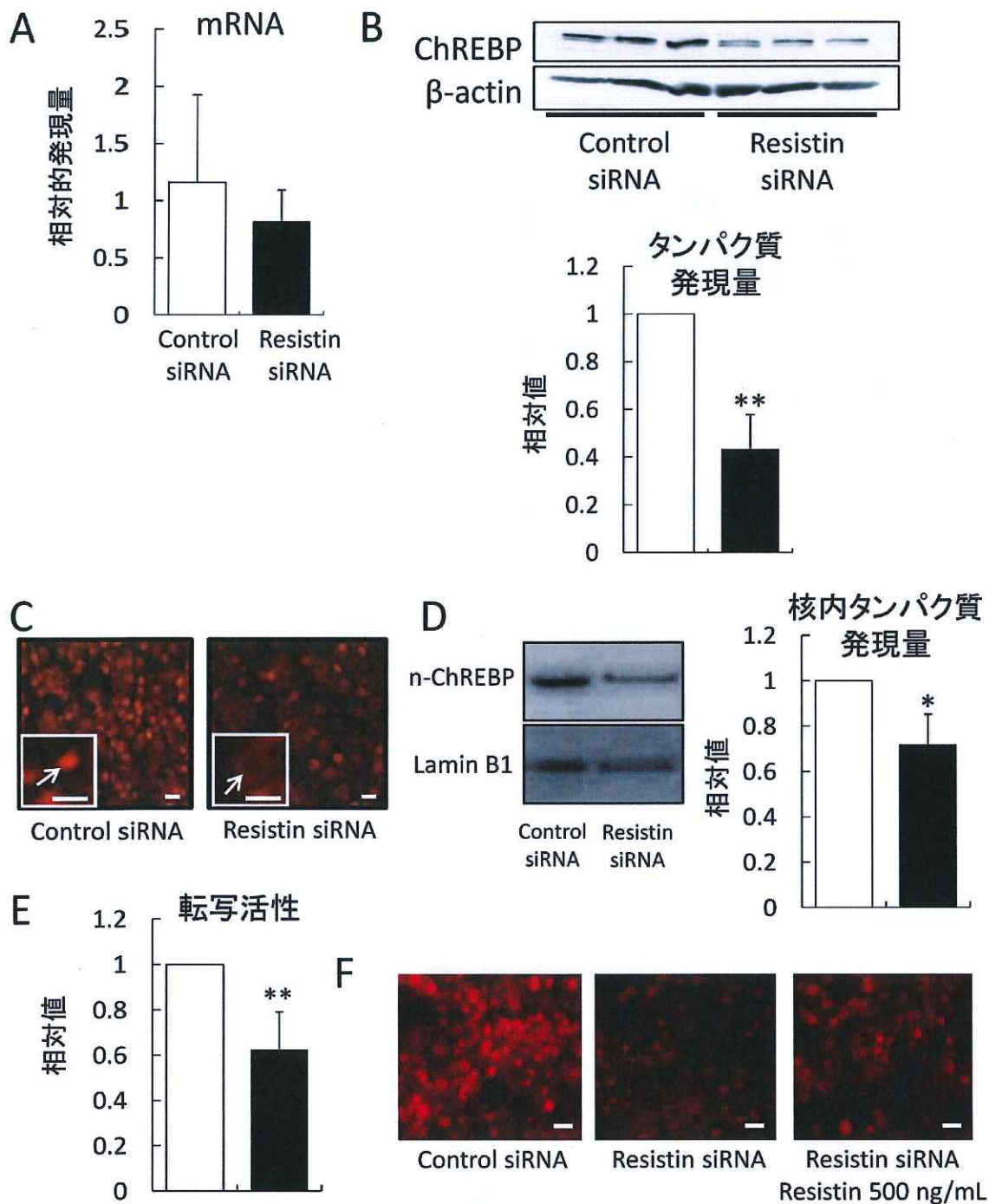


図 28. レジスチン発現抑制時による ChREBP 転写活性への影響

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞 (Day 2) に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(A) ChREBP 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(B) 細胞内 ChREBP タンパク質量を WB にて評価した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、画像解析を行い、相対値を示した。(C) 細胞内 ChREBP を免疫染色し、顕微鏡画像を撮影した。矢印は核内 ChREBP を示す。(D) 核内 ChREBP タンパク質量を WB にて評価した。Lamin B1 を内部標準とし、画像解析を行い、相対値を示した。(E) ChREBP 転写活性を測定し、相対値を示した。(F) Day 3 にレジスチンタンパク質を 500 ng/mL となるよう添加し、細胞内 ChREBP を免疫染色した。Bars: 25  $\mu$ m (n = 3, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 versus Control siRNA)

### 2.3.6 レジスチン発現抑制時における脂質合成関連酵素発現への影響

レジスチン発現抑制時に ChREBP の転写活性が低下していたことから、ChREBP の標的遺伝子であり、脂質の生合成に関与する酵素の遺伝子発現量が減少している可能性が考えられた。そこで、脂質合成関連酵素として、Fatty acid synthase (FASN)、Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)、Glycerol 3-phosphate acyl-transferase (GPAT) の遺伝子発現量変化を評価した。これら酵素はそれぞれ、脂肪細胞の分化、成熟化に伴い発現量が増大し、脂肪滴の主成分であるトリグリセリドの生合成に関与する(図 29, 30)。レジスチン発現抑制時、ChREBP の転写活性が低下していた結果と一致して、これら酵素の遺伝子発現量に有意な減少がみられた(図 31 A-C)。さらに、FASN、SCD-1 のタンパク質量を WB にて評価した結果、遺伝子発現減少に伴ったタンパク質量の顕著な減少がみられた(図 31 D)。以上の結果より、レジスチン発現抑制時に脂質の生合成が抑制されている可能性が示唆された。

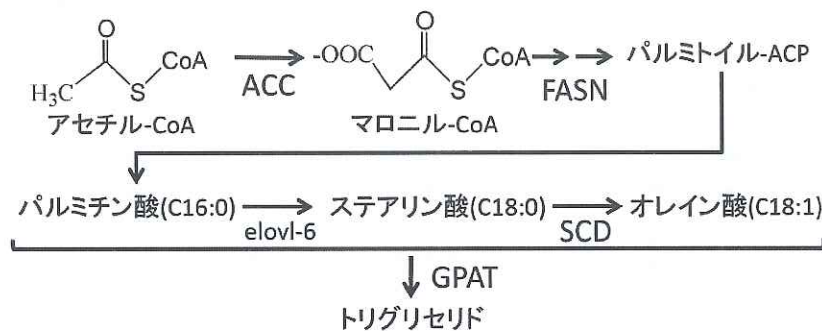


図 29. 脂質合成経路と脂質合成関連酵素

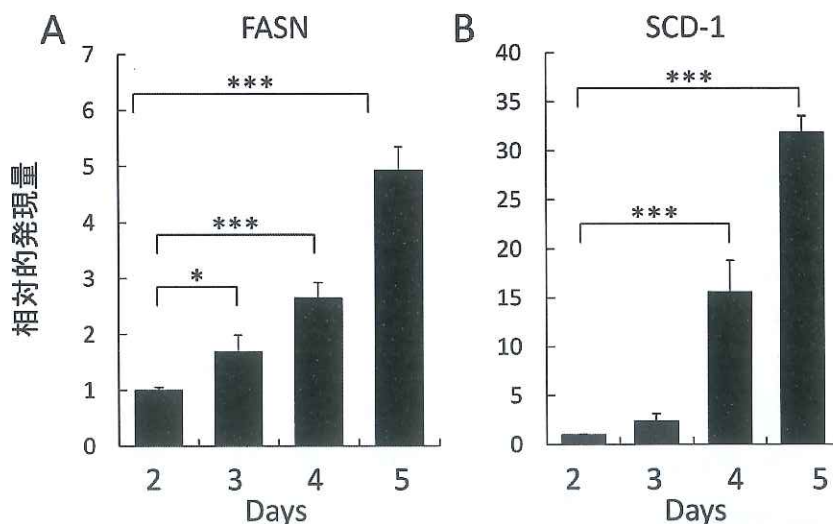
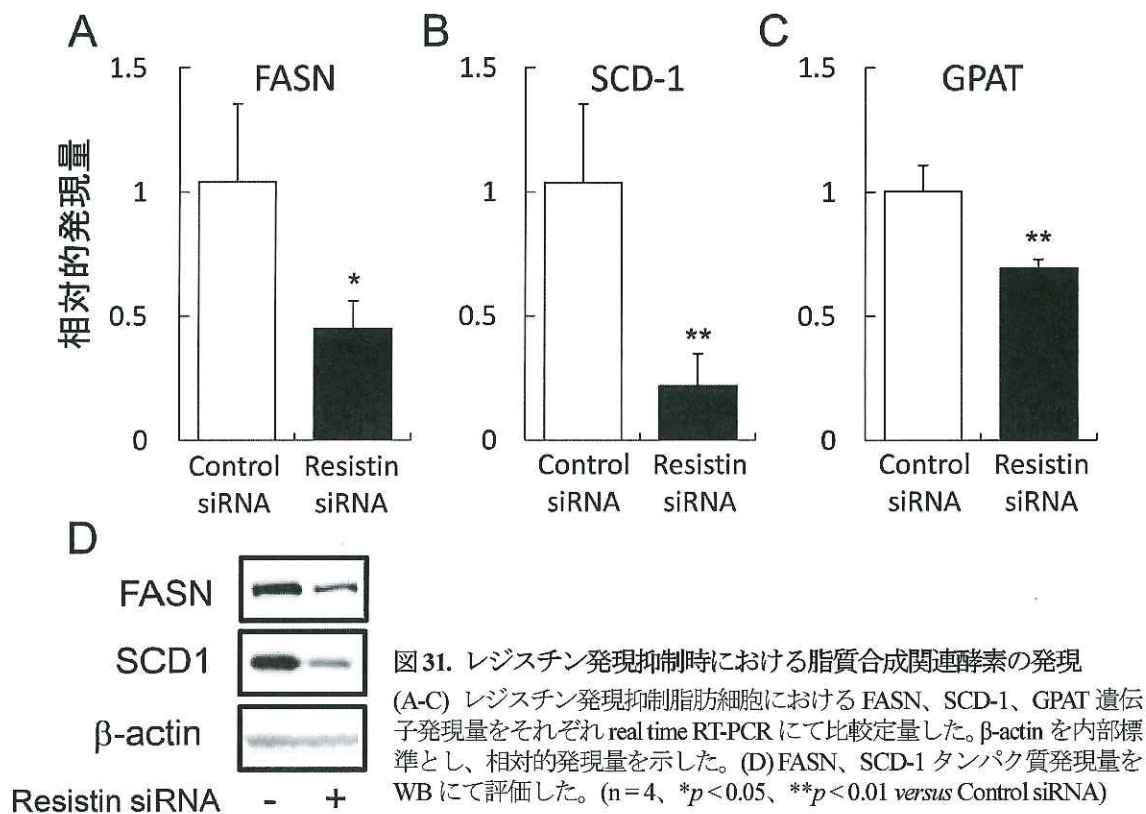


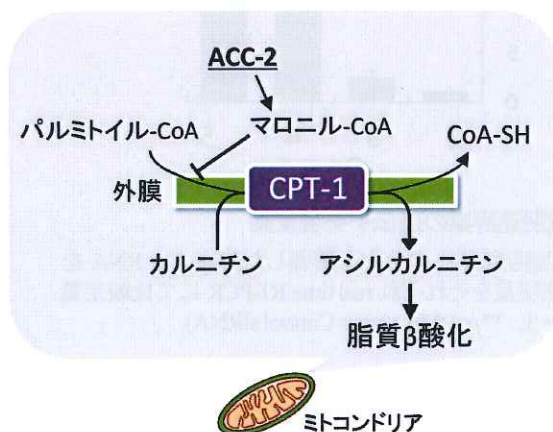
図 30. 3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程初期における脂質合成関連酵素の遺伝子発現変動

3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した(Day 0)。RNA を表記した日数でそれぞれ抽出し、FASN 及び SCD-1 遺伝子発現量をそれぞれ real time RT-PCR にて比較定量した。β-actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(n=3, \*\*p < 0.01 versus Control siRNA)



### 2.3.7 レジスチン発現抑制時における脂質 $\beta$ 酸化への影響

ミトコンドリア内におけるマロニル-CoA の増大は、CPT-1 の活性阻害を介して脂質  $\beta$  酸化を抑制することが報告されている(図 32)[66, 67]。また、ミトコンドリアにおけるマロニル-CoA の生合成に関与する Acetyl-CoA carboxylase-2 (ACC-2) [67, 68]は、脂肪細胞の分化、成熟化に伴って発現が増大する(図 33 A)。さらに興味深いことに、この ACC-2 もまた ChREBP の標的遺伝子として知られている[63]。そのため、ChREBP の転写活性低下がみられたレジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞において、ACC-2 の発現量減少及び CPT-1 の活性上昇を介した脂質  $\beta$  酸化の亢進が考えられた。そこで、レジスチン発現抑制時における



ACC-2 遺伝子発現量を評価した結果、ChREBP 転写活性の低下と一致して、有意な発現量減少がみられた(図 33 B)。さらに、CPT-1 の活性にも有意な上昇がみられたことから、レジスチン発現抑制時に脂質  $\beta$  酸化が亢進している可能性が示唆された(図 33 C)。

図 32. ACC-2 による CPT-1 抑制機序

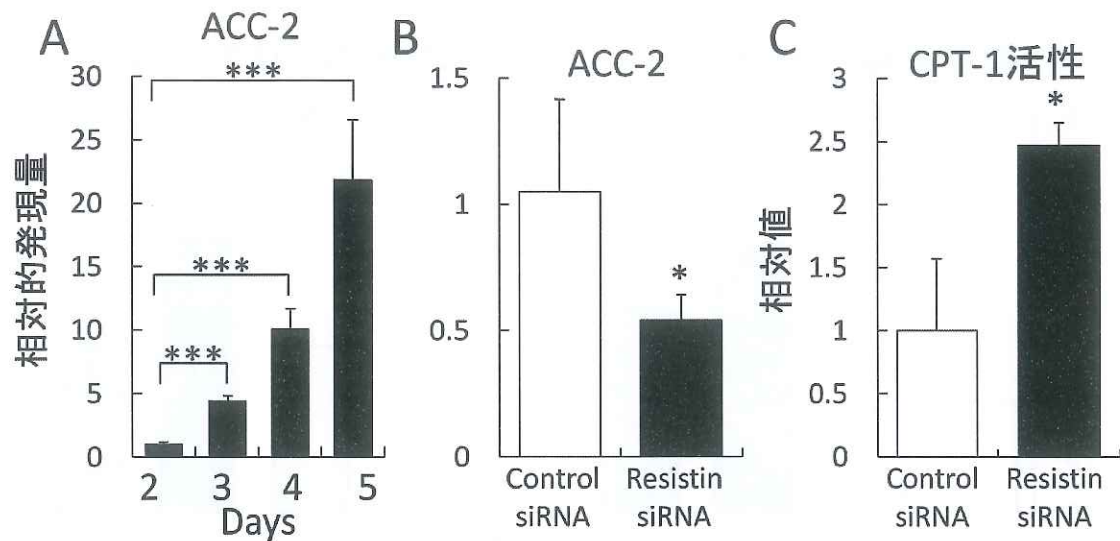


図 33. レジスチン発現抑制脂肪細胞における ACC-2 遺伝子発現と CPT-1 活性

(A) 3T3-L1 細胞を DEX、IBMX、インスリンで処理することで脂肪細胞への分化を誘導した(Day 0)。RNA を表記した日数でそれぞれ抽出し、ACC-2 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。(B, C)分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(B) ACC-2 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。 $\beta$ -actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(C) CPT-1 活性を測定し相対値を示した。(A, C,  $n=3$ , B,  $n=4$ , \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus Control siRNA)

### 2.3.8 高脂肪食摂餌マウスへの抗レジスチン抗体投与が及ぼす影響

レジスチンが脂肪細胞において、ChREBP 活性化を介して脂質合成の亢進及び脂質  $\beta$  酸化の抑制を誘導している可能性が示唆された。すなわち、レジスチンが脂質の蓄積に対して促進的に関与することが考えられたことから、レジスチンの生理作用阻害による肥満の改善が期待できた。そこで、高脂肪食を与えたマウスに定期的に抗レジスチン抗体を投与し、レジスチン生理作用の阻害を試みた。その結果、体重の減少はみられなかったが、高脂肪食の摂餌によって上昇する脂肪組織/体重比に減少傾向がみられた(図 34 A)。また、空腹時血中トリグリセリド濃度の上昇が有意に抑制されていた(図 34 B)。さらに、肝臓内脂質蓄積量の増大にも抑制傾向がみられた(図 34 C)。

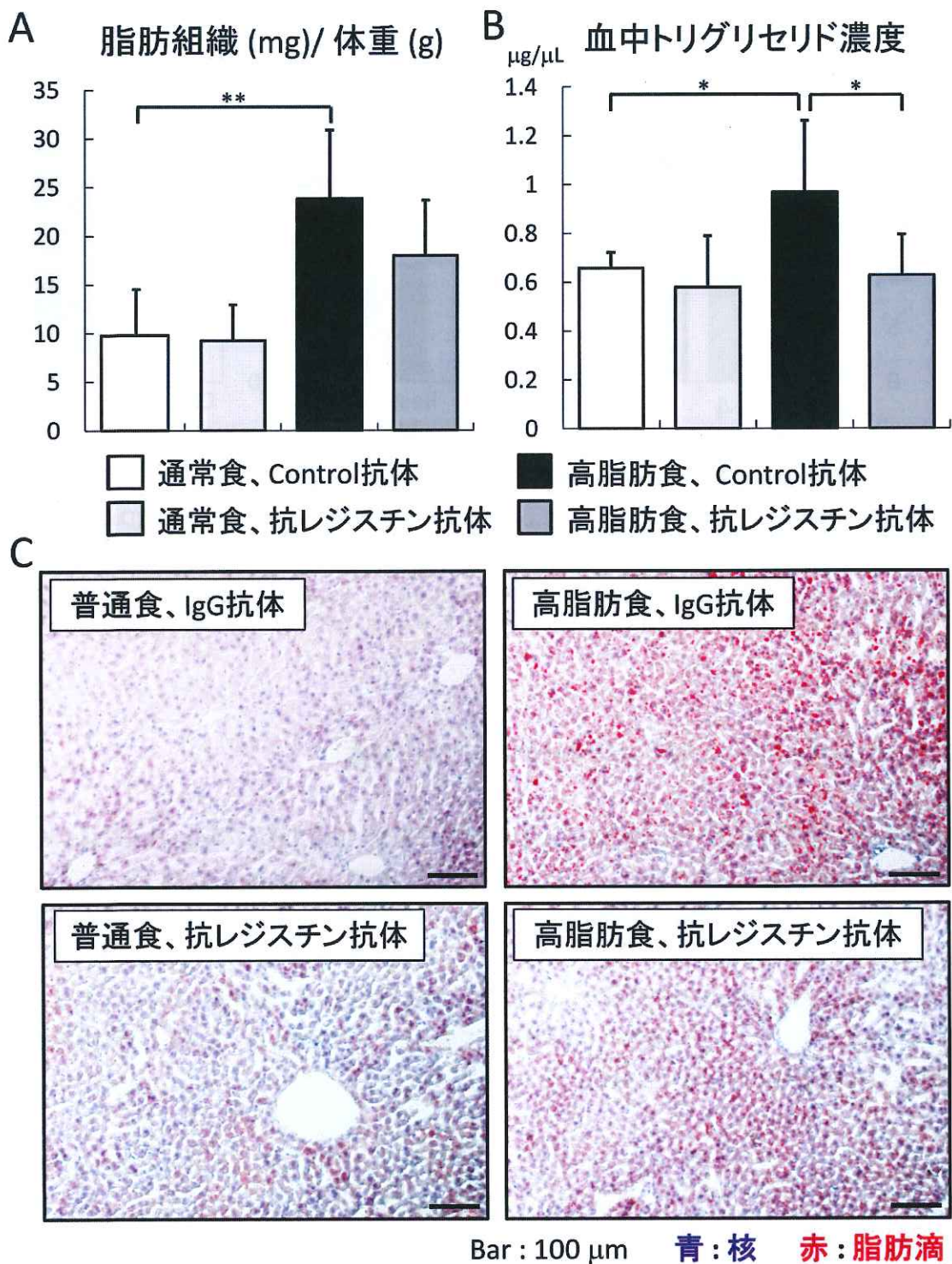


図 34. 高脂肪食摂餌マウスへの抗レジスチン抗体投与

高脂肪食を与えたマウスに5日おきに抗レジスチン抗体を尾静脈注射によって投与した。(A) 30日間飼育した後、副辜丸上脂肪組織を摘出した。(B) 24時間絶食処置し、屠殺直前に採血を行い、トリグリセリド濃度を測定した。(C) 摘出した肝組織から凍結切片を作成後、Oil Red O染色を行った。

(n=6、\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01)



## 2.4 考察

本章では、一種類の siRNA を用いて遺伝子発現抑制実験を行った。そのため、レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量の減少が、siRNA による off target 効果である可能性が危惧された。しかし、レスキュー実験として、レジスチンタンパク質及びレジスチン含有培養上清の添加実験を行っていることから、off target 効果ではないと判断している。

これまでに報告されてきたレジスチンの脂質蓄積に関する生理作用は、脂肪細胞分化に対する影響を基に議論されてきた。しかし未だにレジスチンが、脂肪細胞の分化を促進するのか、また或いは、抑制するのか明確な知見は得られていない[43, 69]。このような現状において、本章の検討によって、レジスチンが脂肪細胞分化とは異なる機序を介して脂質の蓄積に関与する可能性が新たに示唆された。レジスチン発現抑制脂肪細胞において、脂質蓄積量が減少したにもかかわらず、PPAR $\gamma$  及び C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現量に変化はみられなかった。PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  は相互に発現を誘導するポジティブフィードバックループを形成しているため[70]、遺伝子発現量と同様に、転写活性も変化していないと考えられた。さらに分化誘導刺激から 48 時間後の 3T3-L1 細胞には十分量の PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  が発現しており、脂肪細胞分化過程から成熟過程へと移行していると考えられている[71-73]。本研究では、siRNA の導入を分化誘導刺激から 48 時間後に行っていることから、レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量の減少は、脂肪細胞分化の抑制とは異なる機序によるものと考えられた。

レジスチン発現抑制時にみられた脂質蓄積量減少の機序を解明する為、多数の脂質合成関連酵素の発現を制御する SREBP-1 と ChREBP に着目した。しかし、レジスチン発現抑制による SREBP-1 転写活性への影響はみられなかった。この結果は、肝細胞ではなく、脂肪細胞では脂質合成関連酵素の発現に SREBP-1 がほとんど関与していないことを報告している過去の研究と一致する[74]。一方、ChREBP は肝細胞、脂肪細胞それぞれにおいて脂質合成関連酵素の発現に関与することが報告されている[75]。本章では、レジスチン siRNA の導入によって ChREBP のタンパク質量が減少すること及び転写活性が低下することを見出した。ChREBP の遺伝子発現量に変化がみられなかったことから、レジスチン発現抑制は、ChREBP タンパク質の翻訳過程もしくは分解過程に影響を与えたのではないかと考えられたが詳細は不明であり、脂肪細胞の成熟化に伴ってレジスチンの発現量増大がみられる時期における ChREBP の細胞内局在変化を評価する等、レジスチンと ChREBP の関連性を解明するための研究が今後必要とされる。

レジスチン発現抑制脂肪細胞において、ChREBP の標的遺伝子である FASN、SCD-1、GPAT、ACC-2 の発現量に減少がみられた。脂肪滴の主成分であるトリグリセリドは、1 分子のグリセロールに 3 分子の脂肪酸が結合している。結合している脂肪酸は、化学的に安定なパルミチン酸やステアリン酸、オレイン酸が大部分を占める。すなわち、レジスチン発現抑制時にみられた FASN、SCD-1 の発現量減少によって、これら脂肪酸の合成量が減少し、GPAT の発現量減少によってグリセロールと脂肪酸の結合が抑制された結果、細胞内トリグリセリド含量が低下したと考えられた。また、ACC-2 発現量減少によってマロニル-CoA の合成量減少を介した CPT-1 活性化が示唆された。以上のことから、レジスチンは、本来、脂肪細胞においてトリグリセリド合成の亢進及び脂質  $\beta$  酸化の抑制を介して、脂質蓄積に対して促進的に作用している可能性が示唆された(図 35)。さらに、過去に ChREBP 欠損マウスは、肥満が改善されるほか、糖耐性や食欲コントロールも改善されることが報告されている[76]。これらの知見より、レジスチン生理作用を制御

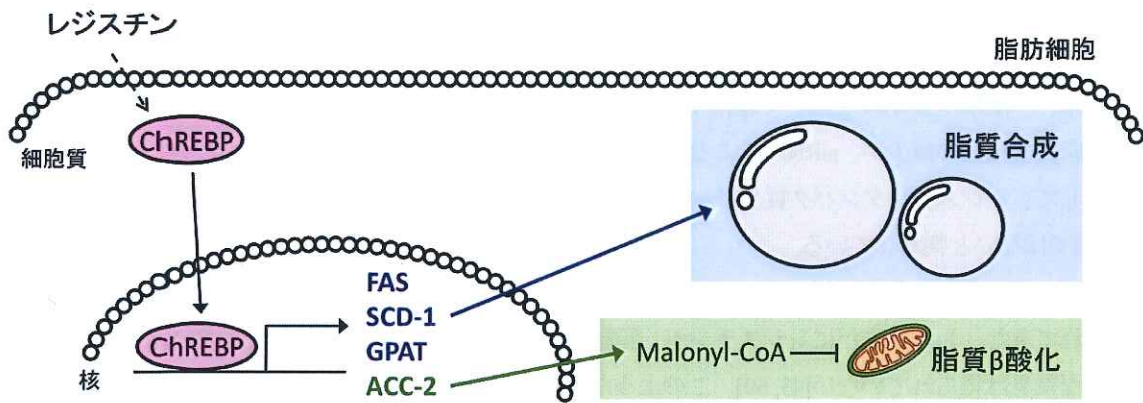


図 35. レジスチンの脂肪細胞における脂質蓄積への関与

することが、肥満の改善に有用であると考えられた。

高脂肪食摂餌マウスに抗レジスチン抗体を投与し、レジスチン生理作用の阻害を試みた。その結果、脂肪組織/体重比及び血中トリグリセリド濃度、肝臓内脂質含量が減少する傾向がみられたが、体重の変化まではみられなかった。レジスチン受容体に関する研究は複数のグループによって行われ、レジスチンと結合する複数の細胞膜上タンパク質が発見されてきたが、それぞれ異なる生理作用が報告されている[77, 78]。そのため、レジスチン受容体の同定には至っておらず、レジスチンの立体構造における活性部位も定かではない。そこで本章ではレジスチンに対するポリクローナル抗体を投与することでレジスチン生理作用の阻害を試みた。今後の研究の発展によって、レジスチン受容体が同定され、モノクローナル抗体やアンタゴニストなどを用いることでレジスチン生理作用の効果的な抑制が可能となれば、高脂肪食の摂餌による体重の増加も抑制できるのではないかと期待している。

本章では、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補としてのレジスチンの有用性を検討する為、3T3-L1 脂肪細胞に siRNA を導入し、レジスチンの発現を抑制することで、脂質の蓄積に対する影響を評価した。その結果、レジスチンが脂肪細胞における脂質合成の亢進及び脂質β酸化の抑制を介して、脂質蓄積に対して促進的に作用している可能性が示唆された。そのため、メタボリックシンドローム時におけるレジスチンの生理作用を制御することで、肥満の改善につながることを期待された。さらに、脂肪細胞の成熟過程初期から顕著な発現増大がみられるレジスチンは、脂質の蓄積のみならず他のアディポサイトカインの発現も制御しているのではないかと考えた。そこで次章では、レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞における他のアディポサイトカイン発現量を評価することで、レジスチンと他のアディポサイトカインとの間における発現連関について検討を行った。

## 第3章

### レジスチンを中心としたアディポサイトカイン発現連関の解析

#### 3.1 緒言

これまでに、個々のアディポサイトカインの生理作用に関する研究が行われ、脂肪細胞分化との関与が報告されてきた[39,40]。そして、脂肪細胞の分化を抑制することで、脂質の蓄積制御やアディポサイトカインの発現制御が試みられてきた。しかし、脂肪組織中に存在する脂肪細胞は、そのほとんどが既に分化した細胞である。さらに、肥満時と非肥満時において脂肪組織中アディポサイトカインの発現量が異なることから、分化とは異なるアディポサイトカイン発現制御機序が存在するのではないかと考えられた。以上のことから、脂肪細胞分化過程よりも成熟過程に注目した研究が必要なのではないかと考えた。第1章、第2章においてアディポサイトカインの一種であるレジスチンが、脂肪細胞の成熟過程初期から顕著な発現増大を示し、脂肪細胞分化とは異なる機序を介して脂質の蓄積に対して促進的に作用することを明らかにした。すなわち、レジスチンは脂肪細胞の成熟化に対して重要な生理作用を有していると考えられ、複数のアディポサイトカインの発現にも強く影響を与えているのではないかと考えた。

本章では、レジスチンと同様に、肥満に伴って血中濃度が増大し、メタボリックシンドロームを増悪させるアディポサイトカインがレジスチンとの間に発現連関を形成しているのかどうかを明らかにする為、レジスチン発現抑制脂肪細胞における他のアディポサイトカイン発現量を評価した。

#### 3.2 実験方法

特に記述がない限り、第1章及び第2章と同様に行った。

##### 3.2.1 試薬

###### 【ELISA】

Mouse PAI-1 Total ELISA Kit は Innovative Research より購入した。

##### 3.2.2 ELISA

Mouse PAI-1 Total ELISA Kit を用いて PAI-1 濃度を測定した。実際の操作は添付マニュアルに従った。24 well plate に播種した 3T3-L1 細胞から回収した培養液は調製した Blocking buffer を用いて 40 倍希釈した。

###### ・ Blocking buffer の調製

Tris 6.057 g, NaCl 4.383 g をそれぞれ秤量し、超純水 450 mL に溶解し、HCl を用いて pH を 7.4 に調整した後、500 mL にメスアップすることで TBS buffer を調製した。BSA を 3 g 秤量し、調製した TBS buffer 100 mL に溶解した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞における PAI-1 発現量の減少

レジスチンが他のアディポサイトカインとの間に発現連関を形成しているのかどうかを検討する為、第2章と同様、分化誘導後 3T3-L1 脂肪細胞に siRNA を導入することでレジスチンの発現を抑制した。レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞(Day 5)における他のアディポサイトカイン遺伝子発現量を評価した結果、線溶系を抑制することで塞栓症の発症リスクを上昇させることが知られている PAI-1 に顕著な減少がみられた(図 36 A)。さらに、遺伝子発現量の減少と一致して、培地中に分泌された PAI-1 タンパク質量にも減少がみられた(図 36 B)。

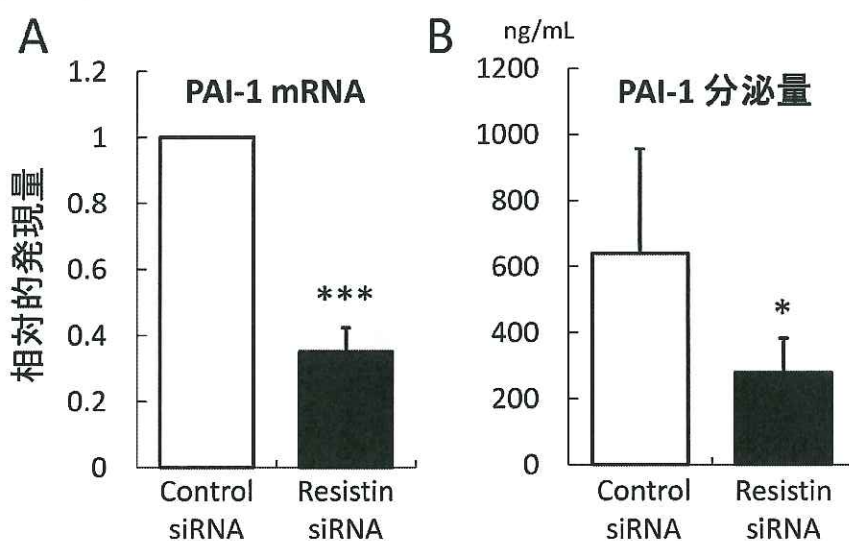


図 36. siRNA 導入によるレジスチン発現抑制

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞(Day 2)に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。(A) PAI-1 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。β-actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(B)培地中へのレジスチンタンパク質分泌量を ELISA にて定量した。結果は平均値及び標準偏差を示した。(A, n=5、B, n=6、\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$  versus Control siRNA)

#### 3.3.2 レジスチン添加による PAI-1 発現量減少の回復

レジスチン発現抑制時にみられた PAI-1 発現量の減少をさらに検討するため、レジスチンの発現を抑制した 3T3-L1 脂肪細胞に COS7 細胞由来レジスチン含有培養上清を添加した。その結果、レジスチン含有培養上清の添加によって、PAI-1 遺伝子発現量及びタンパク質分泌量の減少に回復がみられた(図 37)。以上の結果より、アディポサイトカイン発現連関としてレジスチンによる PAI-1 発現制御が示唆された。

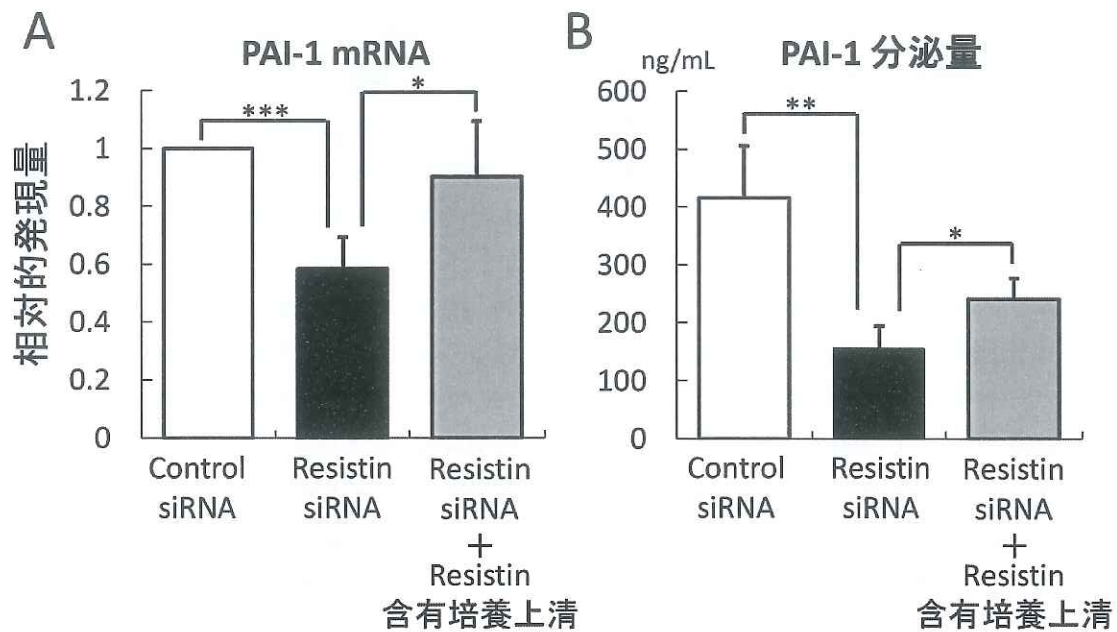


図 37. レジスチン添加による脂質蓄積量減少の回復

分化誘導刺激後の 3T3-L1 脂肪細胞 (Day 2) に Negative control siRNA、Anti-resistin siRNA をそれぞれ導入し、Day 5 まで培養した。レジスチン含有培養上清の添加は Day 3 に行った。対照には Control プラスミド DNA 導入細胞の培養上清を添加した。(A) PAI-1 遺伝子発現量を real time RT-PCR にて比較定量した。β-actin を内部標準とし、相対的発現量を示した。(B) 培地中への PAI-1 タンパク質分泌量を ELISA にて定量した。結果は平均値及び標準偏差を示した。(n=4, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

### 3.4 考察

線溶系を抑制することが知られている PAI-1 は、低酸素条件下において発現が誘導され、新生血管の形成や成長に必要な間質マトリックスを提供することが示唆されている [79]。すなわち脂肪細胞からは、脂肪組織の増大に必要な血管新生に関与するために分泌されていると考えられる。一方、PAI-1 の血中濃度は過去に、人を対象としたコホート試験で、肥満時にレジスチンと正の相関を示し共に増大することが報告されており、メタボリックシンドローム患者における塞栓症の発症リスク上昇との関与が危惧されている [80, 81]。しかしながら、レジスチンと PAI-1 がそれぞれ、相互に発現を促進するのか、また或いは、脂肪細胞の肥大化による結果であり、独立した機序によるものなのかは不明であった。本章の検討において、レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞において、PAI-1 の発現量減少がみられた。さらに、レジスチン含有培養上清の添加によってこの PAI-1 発現量減少に回復がみられた。これら結果より、レジスチンが脂肪細胞において PAI-1 の発現制御に関与している事が明らかとなった。

これまでに脂肪細胞の分化、成熟過程において PPAR $\gamma$  が PAI-1 の発現に関与する転写因子として重要であることが報告されている [82]。しかし第 2 章の検討において、分化誘導後にレジスチンの発現を抑制した結果、PPAR $\gamma$  の発現量及び転写活性に変化はみられなかった。その為、レジスチン発現抑制時にみられた PAI-1 発現量の減少には、他の転写因子の活性制御を介した機序が考えられた。過去に、活性化された Akt によって PAI-1 の発現が抑制されることが報告されている [83]。さらに、Transforming growth factor  $\beta$  に

よって活性化され PAI-1 の発現を制御する転写因子 Smad3 は、リン酸化された Akt と複合体を形成することで、核移行が阻害され、転写活性が低下することが報告されている[84]。そして、レジスチンの発現を抑制した脂肪細胞では、Akt のリン酸化が顕著に亢進していた(data not shown)。その他にも、Nuclear factor-kappa B が PAI-1 の発現を制御することが報告されている[85]。このように PAI-1 の発現制御に関与する複数の転写因子が知られており、レジスチンによる PAI-1 発現制御にどの転写因子が重要なのかを解明するには今後の更なる研究を必要とする。

本章では、レジスチン発現抑制およびレジスチン含有培養上清の添加による他のアディポサイトカイン発現への影響を評価した。その結果、著者は脂肪細胞における、レジスチンによる PAI-1 発現制御を新規に見出した。そのため、メタボリックシンドローム患者においてレジスチンの生理作用を制御することは肥満や糖尿病だけでなく、PAI-1 発現制御を介した塞栓症の予防や改善にも成り得ると考えられた。また、PAI-1 の他にも、レジスチンによって発現が制御されているアディポサイトカインが存在する可能性が考えられる。今後の研究において、PAI-1 発現抑制時におけるレジスチン発現変動やその他のアディポサイトカイン同士の発現連関を検討するなど、アディポサイトカイン同士の発現連関を解明することで、アディポサイトカイン発現制御を介した、より効果的なメタボリックシンドローム治療法の開発が期待できる。

## 総括

本研究では、複数のアディポサイトカインが発現異常をきたすことで複数の疾患が同時に発症するメタボリックシンドロームの複雑な病態を理解する為に「アディポサイトカインの発現は各々が独立しているのではなく、相互に影響を及ぼすことで発現連関を形成し、メタボリックシンドロームの病態をより複雑化させているのではないかと考え、より効果的なメタボリックシンドローム治療を可能とする治療ターゲット候補として、「複数のアディポサイトカインの発現に影響を及ぼすもの」の探索を試みた。

第1章では、メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補を探索する為、肥満モデルラットの脂肪組織における各アディポサイトカイン発現量を評価した。さらにこの脂肪組織を用いた脂肪細胞の初代培養系を確立し、分化、成熟過程における遺伝子発現変動を解析するとともに、3T3-L1 脂肪細胞の成熟過程におけるアディポサイトカイン遺伝子発現変動と比較した。その結果、レジスチンが他のアディポサイトカイン発現制御を含む脂肪細胞の成熟化に重要な生理作用を有する一方、メタボリックシンドロームの病態を複雑化させている要因の1つではないかと推察し、治療ターゲット候補として有用ではないかと考えるに至った。

第2章では、siRNAによるレジスチン発現抑制によって脂肪細胞内脂質蓄積量が減少することを見出した。さらにこの脂質蓄積量の減少は、これまで議論されてきたレジスチンによる脂肪細胞分化への影響とは異なる機序であることを示した。より詳細な検討を行った結果、レジスチンが ChREBP の転写活性制御を介して脂質合成関連酵素の発現を促進し、脂質合成の亢進や脂質 $\beta$ 酸化の抑制に関与することを明らかとした。すなわち、レジスチンは脂肪細胞成熟過程において、脂質の蓄積に促進的に関与していることが示唆された。さらに、高脂肪食を摂餌させたマウスに抗レジスチン抗体を投与した結果、脂肪組織/体重比や血中トリグリセリド濃度、肝臓内脂質含量の増大を抑制することができた。そのため、レジスチンの生理作用を制御することで、肥満の改善が期待できるのではないかといった知見を得た。

第3章ではレジスチンが、他のアディポサイトカインの発現に強く影響を及ぼしている可能性が考えられたことから、レジスチン発現抑制 3T3-L1 脂肪細胞における他のアディポサイトカイン発現量を評価した。その結果、塞栓症の発症リスクを上昇させることが知られている PAI-1 に顕著な減少を見出した。レジスチンと PAI-1 との発現連関が示唆されたことから、メタボリックシンドローム患者においてレジスチンの生理作用を制御することは、肥満や糖尿病だけでなく、PAI-1 発現制御を介した塞栓症の予防や改善にも成り得ると考えられた。

レジスチンはメタボリックシンドローム時に血中濃度が上昇することから、これまで主に炎症の増悪に関与するなど、疾患との関連について議論されてきた。しかし、本研究によって本来は、脂肪細胞成熟過程の初期に一過性の発現増大を示し、脂質の蓄積に対して促進的に作用することや、他のアディポサイトカインの発現制御に関与することで脂肪細胞の成熟化に重要であることが示された。また、このような生理作用を有するからこそ、メタボリックシンドロームの病態をより複雑化させている要因の1つであると考えられた。今後、レジスチン受容体の同定などから、より効果的なレジスチン生理作用の制御が可能となることで、本研究の成果が、レジスチンを標的とした、食事療法や運動療法を補助する薬物治療の開発の一助となることを期待する。

## 謝辞

本研究の遂行から論文の作成に至るまで、終始御懇切なる御指導を賜りましたこと、さらには、研究者としてだけでなく社会人としての在り方まで丁寧且つ熱心に御指導御鞭撻を頂きました京都薬科大学 薬品物理化学分野 小暮健太朗教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、時に厳しく、時に優しく御指導を賜り、また、御留学後も有益なる御助言を頂きました元京都薬科大学 薬品物理化学分野講師 (現ユタ大学博士研究員) 土谷博之博士に謹んで深謝致します。

本研究を遂行する上で有益な御助言、御指導を賜り、また、大学院生活での悩みに対して相談に応じて頂きました京都薬科大学 薬品物理化学分野 濱進講師に心から御礼申し上げます。

脂肪細胞初代培養系の確立から論文作成に至るまで、御懇切なる御指導ならびに有益な御助言を賜りました北海道大学 薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 梶本和昭特任准教授に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、有用な御助言を賜りました京都薬科大学 病態生化学分野 秋葉聡教授、並びに京都薬科大学 生化学分野 中山祐治教授に深謝致します。

研究室生活を支え、快適な研究環境を整えて頂きました京都薬科大学 薬品物理化学分野 元教育補助臨時職員 石塚文緒様、並びに現教育補助臨時職員 富岡佳代様に心より感謝致します。

大学院生活における経済的御支援を賜り、また、貴重な出会いや体験をさせて頂きました公益財団法人 本庄国際奨学財団に深く感謝致します。

大学院生活における経済的御支援を賜りました京都薬科大学 Research Assistant 制度、並びに独立行政法人 日本学生支援機構奨学金に心より御礼申し上げます。

研究生生活を共に過ごし、互いに切磋琢磨し合えた京都薬科大学 薬品物理化学分野大学院生 扇田隆司修士、板倉祥子修士、中村伊吹修士、卒業生の皆様、並びに学部学生の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、日々の生活において精神的に支えて頂きました友人、家族に深く感謝致します。



## 参考文献

1. Matsumoto, S., Kishida, K., Shimomura, I., Maeda, N., Nagaretani, H., Matsuda, M., Nishizawa, H., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Yamada, A., Yamashita, S., Tamura, S., and Kawata, S. : Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 781-786 (2002).
2. Bahia, L., Aguiar, LG., Villela, N., Bottino, D., Godoy-Matos, AF., Geloneze, B., Tambascia, M., and Bouskela, E. : Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*, **61**, 433-440 (2006).
3. Solomon, TP., Sistrun, SN., Krishnan, RK., Del Aguila, LF., Marchetti, CM., O'Carroll, SM., O'Leary, VB., and Kirwan, JP. : Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J. Appl. Physiol.*, **104**, 1313-1319 (1985)
4. Romero Mdel, M., Fernández-López, JA., Esteve, M., and Alemany, M. : Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in white adipose tissue sites in the rat. *Cardiovasc. Diabetol.*, **8**, 42 (2009).
5. Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Masubuchi, S., Omachi, A., Kimura, K., Saito, M., Amo, T., Ohta, S., Yamaguchi, T., Osumi, T., Cheng, J., Fujimoto, T., Nakao, H., Nakao, K., Aiba, A., Okamura, H., Fushiki, T., and Kasuga, M. : FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J. Clin. Invest.*, **118**, 2808-2821 (2008).
6. Stahl, A., Evans, JG., Pattel, S., Hirsch, D., and Lodish, HF. : Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell.*, **2**, 477-488 (2002).
7. Zimmermann, R., Strauss, JG., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. : Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.*, **306**, 1383-1386 (2004).
8. Eriksson, P., Reynisdottir, S., Lönnqvist, F., Stemme, V., Hamsten, A., and Arner, P. : Adipose tissue secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in non-obese and obese individuals. *Diabetologia.*, **41**, 65-71 (1998).
9. Juan, CC., Au, LC., Fang, VS., Kang, SF., Ko, YH., Kuo, SF., Hsu, YP., Kwok, CF., and Ho, LT. : Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 1328-1333 (2001).
10. Berndt, J., Klötting, N., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schön, MR., Stumvoll, M., and Blüher, M. : Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes.*, **54**, 2911-2916 (2005).
11. Gnacińska, M., Małgorzewicz, S., Guzek, M., Lysiak-Szydłowska, W., and Sworczak, K. : Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynol. Pol.*, **61**, 160-168 (2010).
12. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, ML., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., and Kadowaki, T. :

- The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.*, **7**, 941-946 (2001).
13. Yoon, MJ., Lee, GY., Chung, JJ., Ahn, YH., Hong, SH., and Kim, JB. : Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes.*, **55**, 2562-70 (2006).
  14. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, JM. : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.*, **372**, 425-432 (1994).
  15. Ahrén, B., and Scheurink, AJ. : Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. *Eur. J. Endocrinol.*, **139**, 461-467 (1998).
  16. Hotamisligil, GS., Shargill, NS., and Spiegelman, BM. : Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.*, **259**, 87-91 (1993).
  17. Hotamisligil, GS. : The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.*, **245**, 621-625 (1999).
  18. Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. : Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol.*, **174**, 5789-5795 (2005).
  19. Matsuzawa, Y. : The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS. Lett.*, **580**, 2917-2921 (2006).
  20. Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., and Gonda, K. : Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.*, **208**, 64-76 (2006).
  21. Weisberg, SP., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, RL., and Ferrante, AW, Jr. : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1796-1808 (2003).
  22. Pittenger, MF., Mackay, AM., Beck, SC., Jaiswal, RK., Douglas, R., Mosca, JD., Moorman, MA., Simonetti, DW., Craig, S., and Marshak, DR. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.*, **284**, 143-147 (1999).
  23. Ross, SE., Hemati, N., Longo, KA., Bennett, CN., Lucas, PC., Erickson, RL., and MacDougald, OA. : Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.*, **289**, 950-953 (2000).
  24. Krishnan, V., Bryant, HU., and Macdougald, OA. : Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1202-1209 (2006).
  25. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, MY., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Kato, S. : A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- $\gamma$  transactivation. *Nat. Cell. Biol.*, **9**, 1273-1285 (2007).

26. Cawthorn, WP., Bree, AJ., Yao, Y., Du, B., Hemati, N., Martinez-Santibañez, G., and MacDougald, OA. : Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism. *Bone.*, **50**, 477-489 (2012).
27. Shima, A., Shinohara, Y., Doi, K., and Terada, H. : Normal differentiation of rat brown adipocytes in primary culture judged by their expressions of uncoupling protein and the physiological isoform of glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1223**, 1-8 (1994).
28. Malo, E., Ukkola, O., Jokela, M., Moilanen, L., Kähönen, M., Nieminen, MS., Salomaa, V., Jula, A., and Kesäniemi, YA. : Resistin is an indicator of the metabolic syndrome according to five different definitions in the Finnish Health 2000 survey. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, **9**, 203-210 (2011).
29. Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., and McNiece, I. : Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1431-1437 (1994).
30. Friedman, JM., and Halaas, JL. : Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.*, **395**, 763-770 (1998).
31. Fang, WQ., Zhang, Q., Peng, YB., Chen, M., Lin, XP., Wu, JH., Cai, CH., Mei, YF., and Jin, H. : Resistin level is positively correlated with thrombotic complications in Southern Chinese metabolic syndrome patients. *J. Endocrinol. Invest.*, **34**, e36-e42 (2011).
32. Samad, F., and Loskutoff, DJ. : Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol. Med.*, **2**, 568-582 (1996).
33. Alikashioglu, A., Gönç, N., Özön, ZA., Sen, Y., and Kandemir, N. : The relationship between serum adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, leptin levels and insulin sensitivity in childhood and adolescent obesity: adiponectin is a marker of metabolic syndrome. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, **1**, 233-239 (2009).
34. Chang, YC., Chang, TJ., Lee, WJ., and Chuang, LM. : The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism.*, **59**, 93-99 (2010).
35. Tan, BK., Chen, J., Brown, J., Adya, R., Ramanjaneya, M., Menon, V., Bailey, CJ., Lehnert, H., and Randeve, HS. : In vivo and ex vivo regulation of visfatin production by leptin in human and murine adipose tissue: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Endocrinology.*, **150**, 3530-3539 (2009).
36. Lefterova, MI., Mullican, SE., Tomaru, T., Qatanani, M., Schupp, M., and Lazar, MA. : Endoplasmic reticulum stress regulates adipocyte resistin expression. *Diabetes.*, **58**, 1879-1886 (2009).
37. Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. : A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2062-2068 (2005).
38. Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. : Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Endocrinol.*, **185**, R1-R8 (2005).

39. Liang, X., Kanjanabuch, T., Mao, SL., Hao, CM., Tang, YW., Declerck, PJ., Hasty, AH., Wasserman, DH., Fogo, AB., and Ma, LJ. : Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **290**, E103-E113 (2006).
40. Lee, JS., Suh, JM., Park, HG., Bak, EJ., Yoo   ion at commitment and early induction stages. *Differentiation.*, **76**, 478-487 (2008).
41. Poulos, SP., Dodson, MV., and Hausman, GJ. : Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp. Biol. Med. (Maywood).*, **235**, 1185-1193 (2010).
42. Steppan, CM., Bailey, ST., Bhat, S., Brown, EJ., Banerjee, RR., Wright, CM., Patel, HR., Ahima, RS., and Lazar, MA. : The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.*, **409**, 307-312 (2001).
43. Kim, KH., Lee, K., Moon, YS., and Sul, HS. : A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11252-11256 (2001).
44. Way, JM., Görgün, CZ., Tong, Q., Uysal, KT., Brown, KK., Harrington, WW., Oliver, WR, Jr., Willson, TM., Kliewer, SA., and Hotamisligil, GS. : Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25651-25653 (2001).
45. Patel, L., Buckels, AC., Kinghorn, IJ., Murdock, PR., Holbrook, JD., Plumpton, C., Macphee, CH., and Smith, SA. : Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 472-476 (2003).
46. Hartman, HB., Hu, X., Tyler, KX., Dalal, CK., and Lazar, MA. : Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19754-19761 (2002).
47. Banerjee, RR., Rangwala, SM., Shapiro, JS., Rich, AS., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, MW., Pocai, A., Scherer, PE., Steppan, CM., Ahima, RS., Obici, S., Rossetti, L., and Lazar, MA. : Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science.*, **303**, 1195-1198 (2004).
48. Nagaev, I., and Smith, U. : Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 561-564 (2001).
49. Stienstra, R., van Diepen, JA., Tack, CJ., Zaki, MH., van de Veerdonk, FL., Perera, D., Neale, GA., Hooiveld, GJ., Hijmans, A., Vroegrijk, I., van den Berg, S., Romijn, J., Rensen, PC., Joosten, LA., Netea, MG., and Kanneganti, TD. : Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 15324-15329 (2011).
50. Rajala, MW., Obici, S., Scherer, PE., and Rossetti, L. : Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest.*, **111**, 225-230 (2003).
51. Junkin, KA., Dyck, DJ., Mullen, KL., Chabowski, A., and Thrush, AB. : Resistin acutely impairs insulin-stimulated glucose transport in rodent muscle in the presence, but not absence, of palmitate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296**, R944-R951 (2009).

52. Konrad, A., Lehrke, M., Schachinger, V., Seibold, F., Stark, R., Ochsenkühn, T., Parhofer, KG., Göke, B., and Broedl, UC. : Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **19**, 1070-1074 (2007).
53. Sundén-Cullberg, J., Nyström, T., Lee, ML., Mullins, GE., Tokics, L., Andersson, J., Norrby-Teglund, A., and Treutiger, CJ. : Pronounced elevation of resistin correlates with severity of disease in severe sepsis and septic shock. *Crit. Care. Med.*, **35**, 1536-1542 (2007).
54. Reilly, MP., Lehrke, M., Wolfe, ML., Rohatgi, A., Lazar, MA., and Rader, DJ. : Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation.*, **111**, 932-939 (2005).
55. Senolt, L., Housa, D., Vernerová, Z., Jirásek, T., Svobodová, R., Veigl, D., Anderlová, K., Müller-Ladner, U., Pavelka, K., and Haluzík, M. : Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann. Rheum. Dis.*, **66**, 458-463 (2007).
56. Kang, S., Chemaly, ER., Hajjar, RJ., and Lebeche, D. : Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1) pathways. *J. Biol. Chem.*, **286**, 18465-18473 (2011).
57. Markwell, MA., McGroarty, EJ., Bieber, LL., and Tolbert, NE. : The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. A new peroxisomal enzyme. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432 (1973).
58. Zhu, MJ., Ford, SP., Means, WJ., Hess, BW., Nathanielsz, PW., and Du, M. : Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol.*, **575**, 241-250 (2006).
59. Kajimoto, K., Takayanagi, S., Sasaki, S., Akita, H., and Harashima, H. : RNA interference-based silencing reveals the regulatory role of fatty acid-binding protein 4 in the production of IL-6 and vascular endothelial growth factor in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.*, **153**, 5629-5636 (2012).
60. Juan, CC., Kan, LS., Huang, CC., Chen, SS., Ho, LT., and Au, LC. : Production and characterization of bioactive recombinant resistin in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **103**, 113-117 (2003).
61. Le Lay, S., Lefrère, I., Trautwein, C., Dugail, I., and Krief, S. : Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35625-35634 (2002).
62. Dentin, R., Pégorier, JP., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, MA., Girard, J., and Postic, C. : Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20314-20326 (2004).
63. Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Fougelle, F., Dyck, JR., Girard, J., and Postic, C. : Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.*, **55**, 2159-2170 (2006).
64. Nishizuka, M., Arimoto, E., Tsuchiya, T., Nishihara, T., and Imagawa, M. : Crucial role of TCL/TC10beta L, a subfamily of Rho GTPase, in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 15279-15284 (2003).

65. Hurtado del Pozo, C., Vesperinas-García, G., Rubio, M.Á., Corripio-Sánchez, R., Torres-García, A.J., Obregon, M.J., and Calvo, R.M. : ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1811**, 1194-1200 (2011).
66. McGarry, J.D., and Brown, N.F. : The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 1-14 (1997).
67. Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A., and Wakil, S.J. : Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science.*, **291**, 2613-2616 (2001).
68. Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J. : The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1444-1449 (2000).
69. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. : Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.*, **3**, 151-158 (1999).
70. Kang, S., Bennett, C.N., Gerin, I., Rapp, L.A., Hankenson, K.D., and Macdougald, O.A. : Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.*, **282**, 14515-14524 (2007).
71. Diaz-Velasquez, C.E., Castro-Muñozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. : Staurosporine rapidly commits 3T3-F442A cells to the formation of adipocytes by activation of GSK-3beta and mobilization of calcium. *J. Cell. Biochem.*, **105**, 147-157 (2008).
72. Okamura, M., Kudo, H., Wakabayashi, K., Tanaka, T., Nonaka, A., Uchida, A., Tsutsumi, S., Sakakibara, I., Naito, M., Osborne, T.F., Hamakubo, T., Ito, S., Aburatani, H., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J. : COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 5819-5824 (2009).
73. Gong, H., Ni, Y., Guo, X., Fei, L., Pan, X., Guo, M., and Chen, R. : Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Endocrinol.*, **150**, 885-892 (2004).
74. Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Takeuchi, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Okazaki, H., Iizuka, Y., Ohashi, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., Nagai, R., Yamazaki, T., Kadowaki, T., Yamada, N., Osuga, J., and Shimano, H. : SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J. Lipid. Res.*, **48**, 1581-1591 (2007).
75. He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., and Li, J. : Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **287**, E424-E430 (2004).
76. Iizuka, K., Miller, B., and Uyeda, K. : Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E358-E364 (2006).

77. Sánchez-Solana, B., Laborda, J., and Baladrón, V. : Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol. Endocrinol.*, **26**, 110-127 (2012).
78. Daquinag, AC., Zhang, Y., Amaya-Manzanares, F., Simmons, PJ., and Kolonin, MG. : An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell. Stem. Cell.*, **9**, 74-86 (2011).
79. Liao, H., Hyman, MC., Lawrence, DA., and Pinsky, DJ. : Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1 alpha, and C/EBPalpha. *FASEB. J.*, **21**, 935-949 (2007).
80. Utzschneider, KM., Carr, DB., Tong, J., Wallace, TM., Hull, RL., Zraika, S., Xiao, Q., Mistry, JS., Retzlaff, BM., Knopp, RH., and Kahn, SE. : Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia.*, **48**, 2330-2333 (2005).
81. Qi, Q., Wang, J., Li, H., Yu, Z., Ye, X., Hu, FB., Franco, OH., Pan, A., Liu, Y., and Lin, X. : Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers, insulin resistance, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. *Eur. J. Endocrinol.*, **159**, 585-593 (2008).
82. Chen, JG., Li, X., Huang, HY., Liu, HL., Liu, DG., Song, TJ., Ma, CG., Ma, D., Song, HY., and Tang, QQ. : Identification of a peroxisome proliferator responsive element (PPRE)-like cis-element in mouse plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 821-826 (2006).
83. Mukai, Y., Wang, CY., Rikitake, Y., and Liao, JK. : Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt negatively regulates plasminogen activator inhibitor type 1 expression in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **292**, H1937-H1942 (2007).
84. Remy, I., Montmarquette, A., and Michnick, SW. : PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat. Cell. Biol.*, **6**, 358-365 (2004).
85. Hou, B., Eren, M., Painter, CA., Covington, JW., Dixon, JD., Schoenhard, JA., and Vaughan, DE. : Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J. Biol. Chem.*, **279**, 18127-18136 (2004).





# 付録 I



## Quantitative Comparison of Adipocytokine Gene Expression during Adipocyte Maturation in Non-obese and Obese Rats

Yoshito IKEDA,<sup>a</sup> Susumu HAMA,\*<sup>a</sup> Kazuaki KAJIMOTO,<sup>b</sup> Takashi OKUNO,<sup>c</sup> Hiroyuki TSUCHIYA,<sup>a</sup> and Kentaro KOGURE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University; 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan; <sup>b</sup>Laboratory of Innovative Nanomedicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University; Kita-12 Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan; and <sup>c</sup>Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama; 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan.

Received December 27, 2010; accepted February 28, 2011; published online March 10, 2011

Adipocytokines secreted from adipocytes have been extensively analyzed due to their role as key factors in various complications of obesity, including arterial sclerosis, liver steatosis, insulin resistance, and diabetes. Several *in vivo* and *in vitro* studies have suggested that adipocyte maturation is related to fluctuations in adipocytokine secretion. However, the relationship between adipocyte maturation and adipocytokine levels has not been fully elucidated. Therefore, we sought to clarify the link between adipocytokine gene expression and adipocyte maturation through systematic analysis. We quantified mRNA for six adipocytokine genes: adiponectin, resistin, leptin, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor (HB-EGF), and visfatin, in adipose tissue, in primary cultured adipocytes obtained from an obese Zucker rat, and in the preadipocyte cell line 3T3-L1. Moreover, to elucidate the role of adipocytokines in adipocyte maturation, adipocytokine expression levels were analyzed during maturation. Although fluctuations in adipocytokine gene expression were heterogeneous, gene expression was highly similar during maturation of primary cultured adipocytes from obese and non-obese rats, suggesting that the maturation process is independent from processes that lead to obesity. Moreover, the expression patterns of adiponectin, resistin and leptin mRNA in 3T3-L1 cells were highly similar to those in primary cultured adipocytes, indicating that these adipocytokines could be common maturation markers for primary cultured adipocytes obtained from obese and non-obese rats, and for preadipocyte cell lines.

**Key words** adipocytokine; adipocyte maturation; Zucker rat; primary cultured cell; mRNA expression

Adipocytokines are known as key mediators of arterial sclerosis and diabetes in the metabolic syndrome.<sup>1)</sup> “Adipocytokine” is an all-inclusive term used to describe bioactive factors, such as adiponectin and leptin, that are secreted from adipose tissue.<sup>2)</sup> Adipocytokines can be classified into two types: stimulative and suppressive factors of obesity. Levels of opposing adipocytokines are kept in balance under normal conditions. However, in obesity and some other pathological conditions, stimulative adipocytokine levels are higher than levels of suppressive factors. Therefore, expression and secretion of adipocytokines *in vivo*, including in adipose tissue, and in cultured cell lines has been widely studied to clarify the relationship between adipocytokines and obesity.<sup>3)</sup> Fluctuations in the expression and secretion of adipocytokines during adipocyte differentiation are thought to play a key role in the development of metabolic syndrome. However, it is difficult to quantitatively analyze fluctuations in expression and secretion of adipocytokines during adipocyte maturation *in vivo*, because adipose tissue is a mixture of mature and immature adipocytes and other types of cells, including macrophages.<sup>4)</sup> Therefore, we analyzed immature adipocytes isolated from the adipose tissue of an obese Zucker rat, which lacks functional leptin receptors, to analyze expression of adipocytokines during adipocyte maturation.

In this study, we quantitated mRNA levels for various adipocytokine genes, including plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), resistin, visfatin, heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor (HB-EGF), adiponectin, and leptin, in adipose tissue from obese Zucker

rats, in primary cultured adipocytes isolated from the adipose tissue of a Zucker rat, and in the preadipocyte cell line 3T3-L1. PAI-1,<sup>5)</sup> resistin<sup>6)</sup> and visfatin<sup>7)</sup> are known to advance obesity while HB-EGF,<sup>8)</sup> adiponectin<sup>9)</sup> and leptin<sup>10)</sup> are known to suppress obesity. Moreover, to clarify the relationship between adipocyte maturation and adipocytokine expression, we compared mRNA levels for adipocytokine genes at multiple stages of adipocyte maturation.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials** 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3), L-thyroxine (T4), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and insulin (INS) were purchased from SIGMA Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). D-Biotin was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The RNeasy Mini Kit and RNase-Free DNase Set were purchased from QIAGEN (Tokyo, Japan). ISOGEN was obtained from Wako Junyaku Co., Ltd. (Osaka, Japan). TaKaRa EX Taq Hot Start Version, SYBR Premix Ex TaqII (Perfect Real Time) and random primers were purchased from TaKaRa Bio Inc. (Kyoto, Japan). Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) Mixture was obtained from TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan). Zucker obese (fa/fa) and non-obese rats (+/+) were obtained from SLC Co., Ltd. (Shizuoka, Japan). The 3T3-L1 cell line was purchased from the Japan Health Sciences Foundation (Tokyo, Japan).

**Cell Culture and Induction of Adipocyte Maturation in the 3T3-L1 Cell Line** Cell culture and adipocyte maturation were performed as described previously.<sup>11)</sup> Cells were propagated in basal medium (Dulbecco's modified Eagle's

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: hama@mb.kyoto-phu.ac.jp

Table 1. Sequences of PCR Primers for Quantification of mRNA

Gene name	Accession No.	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Rat A-FABP	NM_053365	GGACCTGGTCGTCATCCGGTC	CGTAAACTCTGTAGAAGTCACGCC
Mouse PPAR- $\gamma$	NM_011146	AGTGACTTGGCTATATTTATAGCTGTCATT	TGTCTTGGATGTCCTCGATGG
Rat adiponectin	NM_144744	GGAAACTTGTGCAGGTTGGATG	GGGTCACCCTTAGGACCAAGAA
Mouse adiponectin	NM_009605	GTTCTACTGCAACATTCGGG	TACACCTGGAGCCAGACTTG
Rat resistin	NM_144741	GCTCTCTGCCACGTACTTA	TTCATTGCAGCTGGCAGTAG
Mouse resistin	NM_022984	TCACTTTTCACCTCTGTGGATATGAT	TGCCCCAGGTGGTGTA
Rat leptin	NM_013076	TGGCTTGGTCTATCTG	GAAATGTCATTGATCCTGGT
Mouse leptin	NM_008493	AAATGTGTCGAGATAGCCAATG	AGGGAGCAGCTTTGGAGAAG
Rat PAI-1	NM_012620	TCTTGATCGTCTCCATTGCT	TCCACAGTGGACCTTGAGATAGG
Mouse PAI-1	NM_008871	TCAGCCCTTGCTTGCCTCAT	GCATAGCCAGCACCAGGA
Rat HB-EGF	NM_012945	ACTTGGAAAGGGACCGATCTG	TTTCTAACCCCTTGCCCTTC
Mouse HB-EGF	NM_010415	TTTCTCTCCAAGCCACAAG	TTCTTCCCTAACCCCTTCCT
Rat visfatin	NM_177928	ACAGATACTGTGGCGGGAATTGCT	TCGACACTATCAGGTGTCTCAG
Mouse visfatin	NM_021524	ACAGATACTGTGGCGGGAATTGCT	TCGATACTATCAGATGTCTCAG
Rat GAPDH	M17701	GAGTGCCAGCCTCGTCTCATA	TGCCGTGGGTAGAGTCATA
Mouse GAPDH	NM_008084	GAGGACCAGGTTGTCTCCTG	ATGTAGCCATGAGGTCCAC
Mouse $\beta$ -actin	NM_007393	GACGGCCAGGTCATCACTATTG	CCACAGGATCCATACCCAAGA

A-FABP, adipocyte-fatty acid binding protein; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM L-glutamine, 3.5% glucose, 0.2 mM ascorbate, 1 nM T3, and 30  $\mu$ M T4 under a 5% CO<sub>2</sub>/air atmosphere at 37°C until they approached 100% confluency. To induce adipocyte differentiation, cells were incubated in basal medium containing 500  $\mu$ M IBMX, 1 mM dexamethasone (DEX), and 1.6  $\mu$ M INS (designated as Day 0). Two days after induction (Day 2), the medium was replaced with growth medium (basal medium supplemented with 1.6  $\mu$ M INS and 15  $\mu$ M D-biotin), and then cells were incubated for 3 d (until Day 5).

**Isolation of Immature Adipocytes from the Adipose Tissue of Zucker Obese (fa/fa) and Non-obese (+/+) Rats, and Induction of Adipocyte Maturation** Isolation of immature adipocytes from adipose tissue and primary culture of adipocytes were performed according to methods previously described by Shima *et al.*<sup>12)</sup> Five-Week-old male Zucker obese (fa/fa) and non-obese (+/+) rats were sacrificed, and epididymal adipose tissue was collected from four rats of each genotype. Pooled adipose tissue was digested with 1 mg/ml collagenase for 30 min at 37°C, and centrifuged at 100 $\times$ g for 5 min to isolate preadipocytes. The primary cultured cells were propagated in basal medium supplemented with 1 nM INS and 15  $\mu$ M D-biotin under the same conditions as 3T3-L1 cells until they approached 60% confluency. Differentiation of primary cultured adipocytes was induced by adding 500  $\mu$ M IBMX, 0.5  $\mu$ M DEX, 20 nM INS, and 15  $\mu$ M D-biotin to the basal medium (designated as Day 0). Two days after induction (Day 2), the medium was replaced with growth medium (basal medium supplemented with 100 pM INS and 330  $\mu$ M D-biotin), and cells were incubated for 3 d (until Day 5).

**Quantification of mRNA Expression by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)** Total RNA was isolated from adipose tissue and cultured adipocytes using ISOGEN. The isolated RNA was purified using the RNeasy Mini Kit and RNase-Free DNase Set according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using random primers and Super Script III Reverse

Transcriptase (Takara, Shiga, Japan). Then, real-time PCR was performed using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and SYBR-Green with the primers listed in Table 1. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin mRNA were used as internal controls. Relative mRNA expression was determined using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method.

**Evaluation of Adipocyte Maturation** On days 0, 2, and 5, morphological images were obtained by light microscopy, and cells possessing fat droplets were designated as mature adipocytes. At each time point, total RNA was extracted from adipocytes, and cDNA was synthesized as described above. Adipocyte-fatty acid binding protein (A-FABP), a marker gene for adipocyte maturation, was amplified with the primers listed in Table 1 using Ex Taq Hot Start. PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

**Statistical Analysis** Statistical significance was determined using Student's *t*-test. *p* values <0.05 were considered to be significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Quantitative Comparison of Adipocytokine mRNA Expression in Adipose Tissue from Wild-Type and Obese Zucker Rats** We quantitated mRNA levels of the representative adipocytokines adiponectin, resistin, leptin, PAI-1, HB-EGF and visfatin in epididymal adipose tissue obtained from wild-type and obese Zucker rats. As shown in Fig. 1, mRNA levels of adiponectin, resistin, and visfatin were lower in obese (Zucker) rats than in non-obese (wild-type) rats. Expression of adiponectin, resistin and visfatin in obese rats was approximately 25%, 15%, and 50% of that in wild-type rats, respectively. Adiponectin and resistin expression levels were similar to those in previous reports.<sup>2,13)</sup> Expression levels of adiponectin and resistin were different in obese and non-obese rats. It is likely that adiponectin and resistin are decreased *via* feedback inhibition as a result of significant increases in these adipocytokines with the increased progression of adipocyte maturation in obese rats. Visfatin expres-

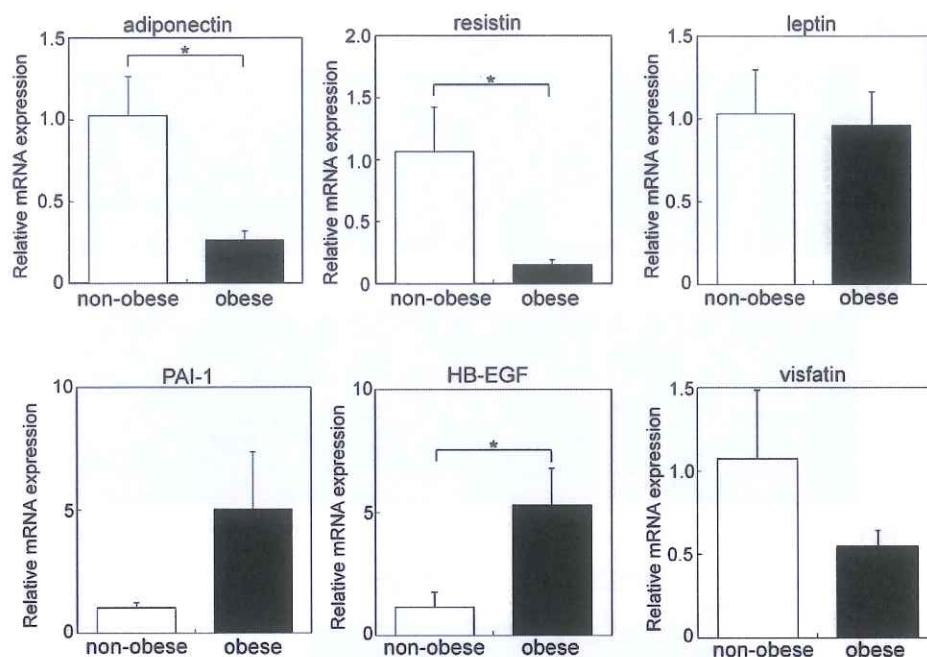


Fig. 1. Quantitative Comparison of Adipocytokine mRNA in Adipose Tissue from Non-obese and Obese Rats

RNA was isolated from adipose tissue, and mRNA expression for each gene was quantitated by real-time RT-PCR. Data show relative mRNA expression using GAPDH mRNA as an internal standard. Values represent the means of three samples. Bar represents S.D. \* $p < 0.05$  versus non-obese.

sion has been reported to be induced by leptin.<sup>13</sup>) However, in our study, leptin mRNA levels were comparable in obese and non-obese rats, although the Zucker rats used in this study genetically lack functional leptin receptors (Fig. 1). This suggests that visfatin expression is mainly regulated by factors other than leptin. Levels of mRNA for PAI-1 and HB-EGF were 5.8-fold and 4.9-fold higher, respectively, in obese rats than in non-obese rats, in agreement with previously reported results.<sup>5,15)</sup>

**Fluctuation of Adipocytokine mRNA Levels during Maturation of Primary Cultured Adipocytes Isolated from Non-obese and Obese Rats** We assessed fluctuations in adipocytokine mRNA levels during maturation of primary cultured adipocytes isolated from non-obese and obese rats. To confirm maturation of primary cultured immature adipocytes, we measured the accumulation of fat droplets in the cytoplasm in comparison with the 3T3-L1 cell line, a representative adipocyte model. As shown in Fig. 2A, fat droplets were observed in 3T3-L1 cells after induction of maturation (Day 5). Similarly, fat droplets were also found in the cytoplasm of adipocytes isolated from adipose tissue of non-obese rats on Days 2 and 5 after induction of maturation (Fig. 2B). Moreover, mRNA for adipocyte-fatty acid binding protein (A-FABP), a marker gene for adipocyte maturation, was increased after induction of maturation (Days 2 and 5), although no A-FABP transcript was detected on Day 0 just after addition of differentiation medium. In primary cultured adipocytes from non-obese rats, A-FABP exhibited a similar expression pattern to that in obese rats, although expression levels were different in non-obese and obese rats. These results confirmed that primary cultured cells isolated from obese and non-obese rats have a similar potential to become mature adipocytes. We next compared adipocytokine mRNA expression during maturation of non-obese and obese rat-

derived primary cultured adipocytes. Interestingly, during adipocyte maturation, the expression patterns of adipocytokine genes were nearly identical in non-obese and obese rat-derived cells (Fig. 3). These results strongly suggest that maturation of immature adipocytes derived from non-obese and obese rats involves essentially the same process of fluctuations in adipocytokine production. As shown in Fig. 3, mRNA levels of adiponectin, resistin and leptin increased throughout the maturation process. On Day 2, adiponectin and resistin mRNA levels were approximately 20-fold higher than on Day 0. This finding suggests that adiponectin and resistin mRNA expression are induced in an early phase of adipocyte maturation. Although little leptin mRNA was detected on Day 2, mRNA levels rapidly increased from Day 2 to Day 5. mRNA for PAI-1 and HB-EGF had decreased by Day 2, but recovered by Day 5. In contrast, visfatin mRNA was transiently increased on Day 2. These results indicate that the balance of adipocytokine gene expression changes as adipocytes mature.

**Time Profiles of Adipocytokine Expression during 3T3-L1 Maturation** To further characterize the expression patterns of adipocytokines, we analyzed the time profiles of adipocytokine mRNA in 3T3-L1 cells after induction of maturation. Since it was possible that a small fraction of mature adipocytes could be present in the primary culture system (Fig. 2B), we used the established preadipocyte cell line 3T3-L1 to precisely analyze adipocytokine expression throughout the maturation process. mRNA for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), a major marker of adipocyte maturation, was increased in a time-dependent manner after induction of maturation. mRNA for adiponectin, resistin and visfatin increased until 3–4 d after induction, and reached saturation by Day 5. Leptin mRNA drastically increased on Day 3, but slightly decreased by Day 5. In contrast, mRNA

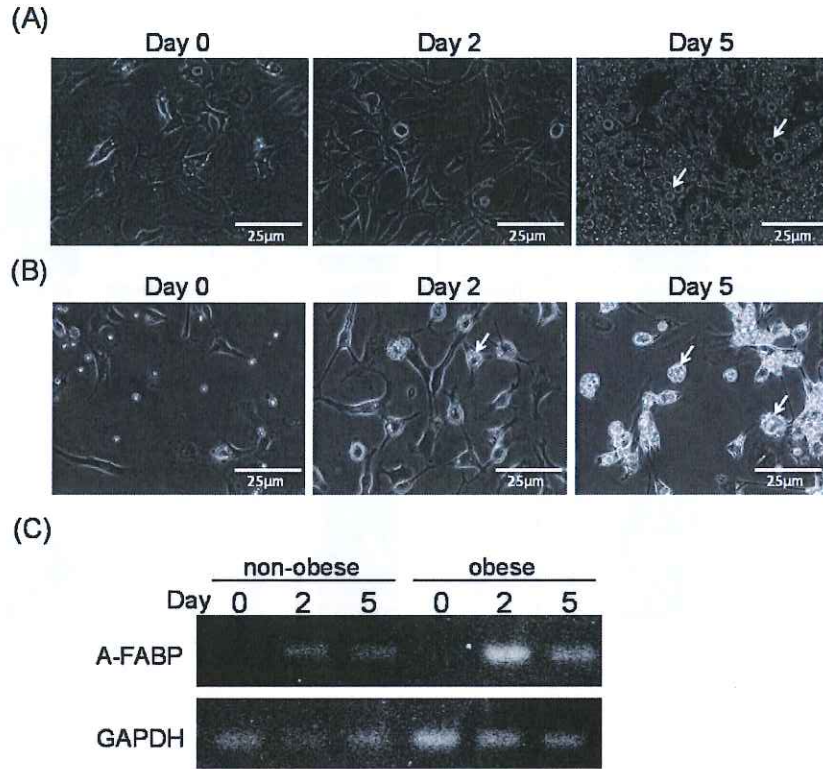


Fig. 2. Morphological Images and A-FABP mRNA Expression during Adipocyte Maturation

(A) 3T3-L1 cells and (B) primary cultured adipocytes derived from the epididymal adipose tissue of non-obese rat were treated with insulin, dexamethasone (DEX), and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) on Day 0, and morphological images were obtained on the indicated days after induction of maturation. Fat droplets are indicated by white arrows. (C) Agarose gel electrophoresis of A-FABP mRNA amplified by RT-PCR during the maturation of adipocytes derived from non-obese and obese rats.

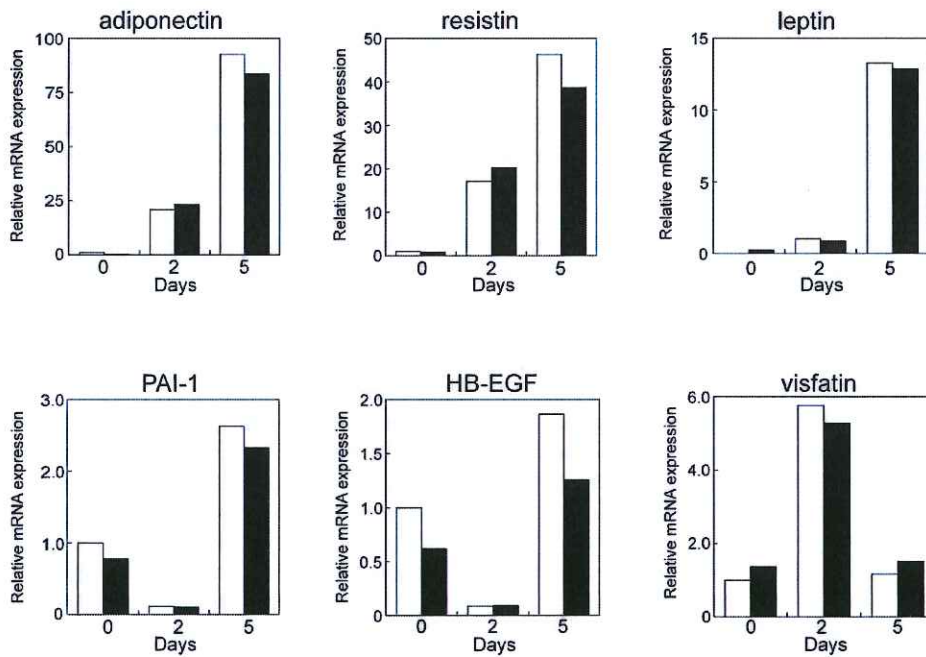


Fig. 3. Quantitative Comparison of Adipocytokine mRNA during Maturation of Primary Cultured Adipocytes Derived from Non-obese and Obese Rats

Immature adipocytes isolated from pooled adipose tissue from four rats were treated with 20 nM insulin, 0.5 μM dexamethasone, and 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine to induce differentiation on Day 0. RNA was isolated from adipocytes derived from non-obese (white column) and obese (black column) rats on the indicated days, and mRNA expression of each gene was quantified by real-time RT-PCR. Data show relative mRNA expression using GAPDH mRNA as an internal standard.

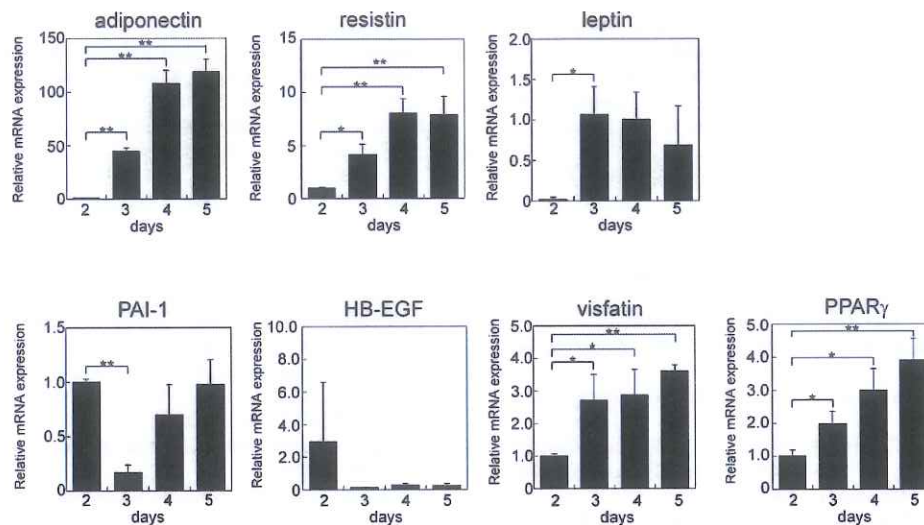


Fig. 4. Time Profiles of Adipocytokine mRNA during 3T3-L1 Maturation

3T3-L1 cells were treated with  $1.6 \mu\text{M}$  insulin,  $1 \text{ nM}$  dexamethasone, and  $500 \mu\text{M}$  3-isobutyl-1-methylxanthine to induce differentiation on Day 0. RNA was isolated from 3T3-L1 cells on the indicated days, and mRNA expression of each gene was quantified by real-time RT-PCR. Data show relative mRNA expression using GAPDH mRNA as an internal standard. Values represent the means of three individual experiments. Bars represent S.D. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus Day 2.

levels of PAI-1 were transiently decreased on Day 3. Expression of HB-EGF mRNA was observed only in immature 3T3-L1 cells. Since mRNA for adiponectin, resistin and leptin increased during adipocyte maturation in both the primary culture system and in 3T3-L1 cells (Figs. 3, 4), it is thought that these genes could be used as adipocyte maturation markers. In previous reports, overexpression of adiponectin was shown to induce adipocyte maturation.<sup>16)</sup> However, studies of the effects of resistin<sup>17,18)</sup> and leptin<sup>19,20)</sup> on adipocyte maturation have yielded conflicting results. Further examination is needed to clarify the roles of these adipocytokines in the adipocyte maturation process. Although mRNA for adiponectin and resistin increased with adipocyte maturation (Figs. 3, 4), the expression levels of these two genes were significantly lower in obese rats than in non-obese rats (Fig. 1). These results suggest that factors regulating expression of adiponectin and resistin during adipocyte maturation are not essential for obesity. In contrast, the *in vitro* expression patterns of PAI-1 and HB-EGF in primary cultured cells (Fig. 3) corresponded to the results of *in vivo* analysis (Fig. 1), *i.e.*, mRNA levels of these two genes were higher both in mature adipocytes and in the obese state than in the immature and non-obese states. Therefore, expression of PAI-1 and HB-EGF may be related to the progression of obesity. In this study, PAI-1, HB-EGF, and visfatin showed differential expression patterns in primary cultured adipocytes and 3T3-L1 cells. Differences in cell types and species differences might be the cause of this discrepancy.<sup>21)</sup> To determine the influence of phylogenetic differences, we measured PAI-1, HB-EGF, and visfatin mRNA in primary cultured adipocytes from Wistar rats. We found that during adipocyte maturation, the expression patterns of PAI-1, HB-EGF, and visfatin were very similar in Zucker and Wistar rats (data not shown). Namely, primary cultured adipocytes obtained from both rat strains showed similar patterns of PAI-1, HB-EGF, and visfatin expression. However, since 3T3-L1 cells are derived from mice, differences be-

tween animal species might be a possible explanation for the discrepancy. Additionally, in this study, the concentrations of differentiation-inducing agents used in 3T3-L1 cells were much higher than in primary cultured cells. The concentrations of these agents, especially dexamethasone and insulin, have been shown to influence adipocytokine expression.<sup>22,23)</sup> These data suggest that differential induction conditions may have affected the expression of PAI-1, HB-EGF and visfatin. The expression of some adipocytokines can vary depending on the cell type and the concentration of differentiation-inducing agents, but the expression patterns of adiponectin, resistin, and leptin were consistent during adipocyte maturation in this study.

In conclusion, the expression patterns of adiponectin, resistin, leptin, PAI-1, HB-EGF and visfatin during adipocyte maturation were nearly identical in primary cultured adipocytes derived from obese and non-obese rats, although the fluctuations in expression of each adipocytokine gene were diverse. These results suggest that the adipocyte maturation process is distinct from the progression of obesity. Moreover, gene expression patterns for adiponectin, resistin and leptin in 3T3-L1 cells were highly similar to those in primary cultured adipocytes isolated from obese and non-obese rats. Our results indicate that these adipocytokines could be used as common maturation markers for primary cultured adipocytes obtained from obese and non-obese rats, and for preadipocyte cell lines.

**Acknowledgments** This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

## REFERENCES

- 1) Matsuzawa Y., *FEBS Lett.*, **580**, 2917–2921 (2006).
- 2) Gnacińska M., Małgorzewicz S., Stojek M., Lysiak-Szydłowska W., Sworcak K., *Adv. Med. Sci.*, **54**, 150–157 (2009).
- 3) Kim Y., Park T., *Biotechnol. J.*, **5**, 99–112 (2010).

- 4) Weisberg S. P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W. Jr., *J. Clin. Invest.*, **112**, 1796—1808 (2003).
- 5) Samad F., Loskutoff D. J., *Mol. Med.*, **2**, 568—582 (1996).
- 6) Steppan C. M., Bailey S. T., Bhat S., Brown E. J., Banerjee R. R., Wright C. M., Patel H. R., Ahima R. S., Lazar M. A., *Nature* (London), **409**, 307—312 (2001).
- 7) Chang Y. C., Chang T. J., Lee W. J., Chuang L. M., *Metabolism*, **59**, 93—99 (2010).
- 8) Lee J. S., Suh J. M., Park H. G., Bak E. J., Yoo Y. J., Cha J. H., *Differentiation*, **76**, 478—487 (2008).
- 9) Whitehead J. P., Richards A. A., Hickman I. J., Macdonald G. A., Prins J. B., *Diabetes Obes. Metab.*, **8**, 264—280 (2006).
- 10) Jéquier E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 379—388 (2002).
- 11) Kajimoto K., Terada H., Baba Y., Shinohara Y., *Mol. Genet. Metab.*, **85**, 46—53 (2005).
- 12) Shima A., Shinohara Y., Doi K., Terada H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1223**, 1—8 (1994).
- 13) Way J. M., Görgün C. Z., Tong Q., Uysal K. T., Brown K. K., Harrington W. W., Oliver W. R. Jr., Willson T. M., Kliewer S. A., Hotamisligil G. S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 25651—25653 (2001).
- 14) Tan B. K., Chen J., Brown J., Adya R., Ramanjaneya M., Menon V., Bailey C. J., Lehnert H., Randeve H. S., *Endocrinology*, **150**, 3530—3539 (2009).
- 15) Matsumoto S., Kishida K., Shimomura I., Maeda N., Nagaretani H., Matsuda M., Nishizawa H., Kihara S., Funahashi T., Matsuzawa Y., Yamada A., Yamashita S., Tamura S., Kawata S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 781—786 (2002).
- 16) Fu Y., Luo N., Klein R. L., Garvey W. T., *J. Lipid Res.*, **46**, 1369—1379 (2005).
- 17) Kim K. H., Lee K., Moon Y. S., Sul H. S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 11252—11256 (2001).
- 18) Gong H., Ni Y., Guo X., Fei L., Pan X., Guo M., Chen R., *Eur. J. Endocrinol.*, **150**, 885—892 (2004).
- 19) Machinal-Quélin F., Dieudonné M. N., Leneuve M. C., Pecquery R., Giudicelli Y., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C853—C863 (2002).
- 20) Ambati S., Kim H. K., Yang J. Y., Lin J., Della-Fera M. A., Baile C. A., *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 378—384 (2007).
- 21) Poulos S. P., Dodson M. V., Hausman G. J., *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **235**, 1185—1193 (2010).
- 22) Venugopal J., Hanashiro K., Nagamine Y., *J. Cell. Biochem.*, **101**, 369—380 (2007).
- 23) MacLaren R., Cui W., Cianflone K., *Diabetes Obes. Metab.*, **9**, 490—497 (2007).



## Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells

Yoshito Ikeda<sup>1</sup>, Hiroyuki Tsuchiya<sup>1,\*</sup>, Susumu Hama<sup>1</sup>, Kazuaki Kajimoto<sup>2</sup> and Kentaro Kogure<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Japan

<sup>2</sup> Laboratory of Innovative Nanomedicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

### Keywords

adipocyte; adipokine; lipid metabolism; lipogenic gene; resistin

### Correspondence

K. Kogure, Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan  
Fax: +81 75 595 4762  
Tel: +81 75 595 4663  
E-mail: kogure@mb.kyoto-phu.ac.jp

### \*Present address

Departments of Medicine and Oncological Sciences, Huntsman Cancer Institute, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84132, USA

(Received 16 March 2013, revised 27 August 2013, accepted 2 September 2013)

doi:10.1111/febs.12514

Resistin, an adipose-tissue-specific secretory factor, aggravates metabolic syndrome through impairment of glucose metabolism. Previously, we demonstrated that resistin expression was induced in both 3T3-L1 cells and primary pre-adipocytes derived from Zucker obese rats during the process of differentiation and maturation (Ikeda Y, Hama S, Kajimoto K, Okuno T, Tsuchiya H & Kogure K (2011) *Biol Pharm Bull* **34**, 865–870). However, the biological function of resistin in adipocytes is poorly understood. In the present study, we examined the effects of resistin knockdown on the biological features of 3T3-L1 cells. We found that lipid content was significantly decreased in 3T3-L1 cells transfected with anti-resistin small interfering RNA (siRNA) after adipocyte differentiation. While expression of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  was not affected, protein expression and transcriptional activity levels of carbohydrate response element binding protein (ChREBP), which upregulates transcription of lipogenic genes, decreased after anti-resistin siRNA treatment. Moreover, gene expression of fatty acid synthase and acetyl-CoA carboxylase 2, which are known to be regulated by ChREBP, were also suppressed by resistin knockdown. In contrast, activity of the fatty acid  $\beta$ -oxidation-regulating protein carnitine palmitoyltransferase 1 increased. These results suggest that resistin knockdown induces suppression of lipid production and activation of fatty acid  $\beta$ -oxidation. Consequently, resistin may affect lipid metabolism during adipocyte maturation.

## Introduction

Adipokines are physiologically active cytokines secreted from adipocytes, include adiponectin, leptin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and resistin, and are known to influence adipogenesis [1–4]. However, heavily lipid-laden adipocytes, which are frequently observed in patients with metabolic syndrome, show an adipokine expression pattern different from that of normal adipocytes [5–7]. A number of studies have postulated that the collapse of the normally

highly orchestrated adipokine system aggravates metabolic syndrome and, specifically, that insulin resistance can be caused by hypo adiponectinemia, hyperphagia by leptin resistance, inhibition of fibrinolysis by increased PAI-1, and chronic inflammation by increased resistin [8–12]. We previously observed that primary pre-adipocytes derived from Zucker obese and lean rats showed similar gene expression profiles during adipocyte differentiation and maturation, although

### Abbreviations

ACC, acetyl-CoA carboxylase; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ; ChREBP, carbohydrate response element binding protein; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1; FASN, fatty acid synthase; GPAT, glycerol 3-phosphate acyl-transferase; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; siRNA, small interfering RNA; SREBP-1, sterol regulatory element binding protein-1.

adipokine expression differed significantly in visceral adipose tissue obtained from these two types of rats. Among the adipokines, resistin showed a characteristic expression profile during differentiation and maturation of 3T3-L1 cells and primary pre-adipocytes, and resistin expression in visceral adipose tissue obtained from Zucker obese rats was lower than in lean rats [13].

Resistin is a cysteine-rich secretory protein, and is preferentially expressed in adipose tissue in rodents [14]. Some studies have demonstrated that circulating resistin levels are correlated not only with type 2 diabetes and metabolic syndrome but also with chronic kidney disease and rheumatoid arthritis [15–18].

Resistin has been proposed to be a therapeutic target of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligands, which are used clinically to improve insulin sensitivity, since circulating resistin levels were shown to be decreased by rosiglitazone [15] and because ligand-induced PPAR $\gamma$  activation strongly downregulated resistin expression in 3T3-L1 cells and human macrophages, possibly through direct transcriptional suppression [19]. One recent report demonstrated that resistin modulates glucose uptake and promotes adipogenesis of 3T3-L1 cells, possibly by acting as an inhibitory ligand for the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1 [20]. Furthermore, a previous study also reported that resistin treatment accelerates adipogenesis [4]. However, the opposite effect of resistin on adipogenesis has also been observed [14,21]. Thus, the biological function of resistin during adipogenesis is still unclear. Based on our previous report, we hypothesized that resistin promotes accumulation of intracellular lipids. Intracellular lipid content is known to be regulated by not only adipocyte differentiation but also lipid metabolism. Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and carbohydrate response element binding protein (ChREBP) are known as transcription factors that regulate the expression of lipogenic enzymes. Therefore, in the present study, we explored the effects of resistin knockdown on transcription factors such as PPAR $\gamma$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), SREBP-1 and ChREBP in 3T3-L1 cells. Moreover, we investigated the expression of lipogenic enzymes such as fatty acid synthase (FASN) and acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2), and the activity of the fatty acid  $\beta$ -oxidation-regulating protein carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), in 3T3-L1 cells treated with anti-resistin small interfering RNA (siRNA). The results obtained in the present study shed some light on the biological function of resistin in adipocytes.

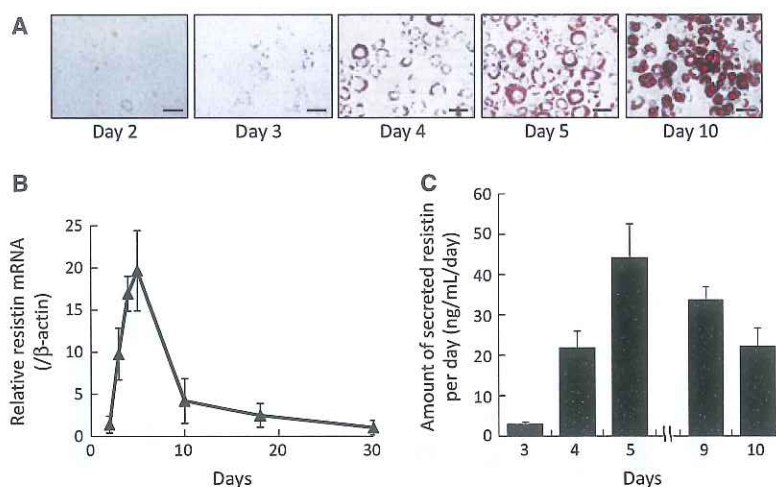
## Results

### Changes in intracellular lipid content and resistin expression during adipogenesis

The purpose of this study was to elucidate resistin function in adipocytes. To measure resistin expression in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes, we cultured 3T3-L1 cells for 30 days and measured changes in resistin mRNA levels over time. 3T3-L1 cells were cultured for 30 days in frequently refreshed maturation medium as described in a previous report [22]. We observed cellular morphological alterations and massive intracellular lipid accumulation by 10 days after the induction of adipocyte differentiation by oil red O staining (Fig. 1A). A marked increase in the number of lipid droplets was visible starting from days 2 to 5. Starting on day 5, the size of the lipid droplets gradually increased. Hypertrophied 3T3-L1 adipocytes with larger lipid droplets were observed on day 10 or later. Resistin gene expression was quantified during the culture period. We previously demonstrated that resistin gene expression was significantly increased by day 3 [13]. Interestingly, in the present study we found that the upregulation was transient, lasting from days 2 to 5, and that resistin gene expression was drastically decreased by day 10 and later (Fig. 1B). Levels of secreted resistin protein in the culture medium also transiently increased (Fig. 1C). These results suggest that resistin strongly influences adipogenesis of 3T3-L1 cells in the early maturation period (days 2–5).

### Anti-adipogenic effects of resistin knockdown

To investigate the biological function of resistin in the early maturation period, the transient increase in resistin from day 2 onward was suppressed by siRNA in 3T3-L1 cells. These experiments were performed according to the schedule shown in Fig. 2A. By day 5, resistin gene expression was decreased to approximately 60% of that of negative control siRNA-transfected cells without observable cytotoxic effects (Fig. 2B). Furthermore, levels of resistin protein secreted in the medium decreased by approximately 80% after resistin knockdown (Fig. 2C). Interestingly, we found that suppression of resistin gene expression resulted in an approximately 30% decrease in intracellular lipid content, as observed using oil red O staining (Fig. 2D). In addition, intracellular triglyceride levels were decreased by approximately 20% in response to resistin knockdown (Fig. 2E). When 3T3-L1 cells were treated with recombinant resistin protein (500 ng·mL<sup>-1</sup>) for 24 h following transfection with



**Fig. 1.** Changes in intracellular lipid content and resistin expression during adipogenesis. Adipocyte differentiation was induced as described in Materials and methods. (A) Changes in intracellular lipid content during adipogenesis determined by oil red O staining. Representative photographs of differentiated 3T3-L1 cells were taken on the indicated days. Bar 50  $\mu\text{m}$ . (B) Relative resistin mRNA expression levels in differentiated 3T3-L1 cells. Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells on the indicated days. Resistin mRNA expression levels relative to  $\beta$ -actin were normalized to those on day 2 using real-time RT-PCR. (C) Levels of secreted resistin in culture medium of control cells on the indicated days. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

resistin-specific siRNA, intracellular lipid content was rescued (Fig. 2F). Then we constructed resistin expression plasmid DNA (pResistin), and the plasmid DNA was transfected to COS7 cells. Resistin protein ( $110 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was secreted into the culture medium of COS7 cells transfected with pResistin. The addition of the culture medium collected from dish of the COS7 cells transfected with pResistin restored the intracellular lipid content of 3T3-L1 cells treated with anti-resistin siRNA (Fig. 2G). In addition, to investigate the extracellular resistin function, recombinant resistin protein was added to 3T3-L1 cells before and after adipocyte differentiation as shown in Fig. 3A. The accumulations of lipid droplets were slightly induced by the addition of resistin protein after adipocyte differentiation (Fig. 3B,C). These results are consistent with Fig. 2D,E and suggest that resistin contributes to the accumulation of intracellular lipids.

#### No effects of resistin knockdown on expression of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ or aP2 mRNA

Resistin knockdown was performed after adipocyte differentiation. Therefore, it was presumed that adipocyte differentiation was not inhibited by resistin knockdown. To confirm this, we examined the effects of anti-resistin siRNA on key transcriptional factors for adipocyte differentiation, including PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . Although intracellular lipid content was decreased by resistin knockdown, there was no effect

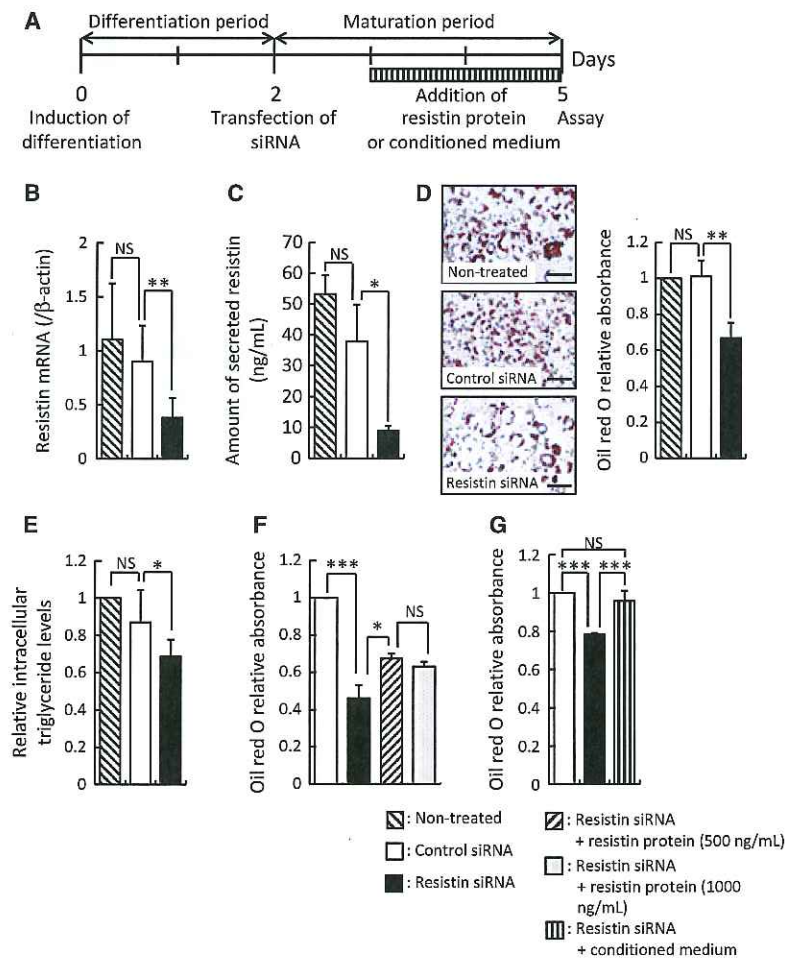
on expression of PPAR $\gamma$  or C/EBP $\alpha$  mRNA (Fig. S1A,B). Expression of another adipocyte differentiation marker gene, aP2, was also not affected by resistin knockdown (Fig. S1C). These data suggest that the reduction in intracellular lipid content resulting from resistin knockdown was not due to suppression of adipocyte differentiation.

#### No effect of resistin knockdown on SREBP-1 transcriptional activity

To investigate the mechanism underlying the reduced intracellular lipid content after anti-resistin siRNA treatment, we assessed SREBP-1 transcriptional activity. SREBP-1 is a transcription factor that regulates lipogenic gene expression. However, no significant difference in SREBP-1 mRNA expression was found between cells transfected with resistin-specific siRNA and negative controls (Fig. S2A). In addition, neither SREBP-1 protein content nor SREBP-1 transcriptional activity was affected by resistin knockdown (Fig. S2B, C). These results suggest that the resistin-knockdown-induced reduction of intracellular lipid content is not caused by inhibition of SREBP-1.

#### Effects of resistin downregulation on ChREBP transcriptional activity

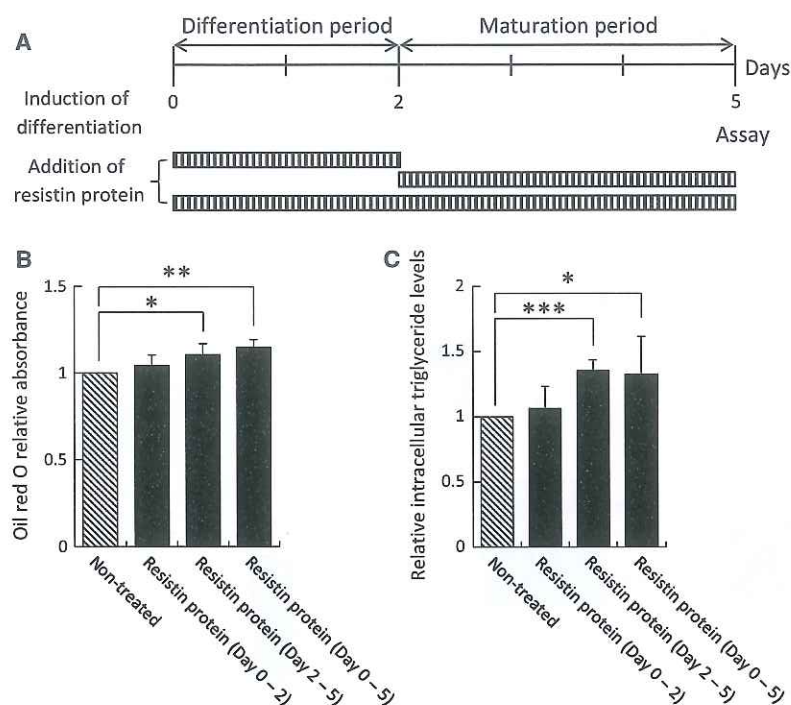
We next examined the effects of resistin knockdown on ChREBP transcriptional activity. ChREBP is also



**Fig. 2.** Anti-adipogenic effects of resistin knockdown. (A) Schedule of resistin knockdown and addition of resistin protein. Knockdown efficiency of resistin-specific siRNA. (B)–(F) 3T3-L1 cells were transfected with negative control (open bars) or resistin-specific (filled bars) siRNA on day 2. (B) Resistin mRNA expression levels relative to  $\beta$ -actin on day 5 were normalized to those in non-treated cells using real-time RT-PCR (slashed bars). (C) Effects of transfection of resistin-specific siRNA on resistin secretion. Resistin in the culture medium on day 5 was measured by ELISA. Resistin secreted from non-treated 3T3-L1 adipocytes is indicated as a slashed column. (D) Relative intracellular lipid content in 3T3-L1 cells on day 5 determined by oil red O staining. (E) Relative triglyceride levels in 3T3-L1 cells on day 5. (F) Effects of the addition of resistin protein on intracellular lipid content. One day after transfection with resistin-specific siRNA, 3T3-L1 cells were treated with recombinant mouse resistin at a concentration of 500 ng·mL<sup>-1</sup> (slashed bar) or 1000 ng·mL<sup>-1</sup> (gray bar) for 2 days. Intracellular lipid content on day 5 was estimated by oil red O staining. (G) Effects of the addition of the culture medium collected from a dish of COS7 cells transfected with pResistin on intracellular lipid content of 3T3-L1 cells. The collected medium containing secreted resistin from COS7 cells was added to the dish of 3T3-L1 cells treated with anti-resistin siRNA on day 3 (striped bar). Intracellular lipid content on day 5 was estimated by oil red O staining. Data are shown as mean  $\pm$  sd (B,  $n = 8$ ; C, F,  $n = 3$ ; D, G,  $n = 4$ ; E,  $n = 6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus cells transfected with negative control siRNA or between the indicated groups. NS, not significant.

a key transcription factor for lipogenic genes as well as for SREBP-1. Expression of ChREBP mRNA was not affected by resistin knockdown (Fig. 4A). However, ChREBP protein content decreased after anti-resistin siRNA treatment (Fig. 4B). Consistent with this result, a reduction in nuclear ChREBP (n-ChREBP) was confirmed by fluorescence microscope observation and immunoblotting analysis (Fig. 4C,D). Moreover, the

transfection of anti-resistin siRNA resulted in significant suppression of ChREBP transcriptional activity (Fig. 4E). Intracellular ChREBP levels after resistin knockdown were partially restored by the addition of resistin protein (Fig. 4F). Since ChREBP protein content was reduced by resistin knockdown, it was expected that the expression of lipogenic genes would be inhibited.



**Fig. 3.** Effects of the addition of resistin protein on intracellular lipid content. 3T3-L1 cells were treated with recombinant mouse resistin at a concentration of  $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  according to the schedule shown in (A). (B) Relative intracellular lipid content in 3T3-L1 cells on day 5 determined by oil red O staining. (C) Relative triglyceride levels in 3T3-L1 cells on day 5. Data are shown as mean  $\pm$  SD (B,  $n = 3$ ; C,  $n = 5$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus non-treated cells (slashed bar).

### Effects of resistin knockdown on expression of lipogenic genes

It has been reported that ChREBP regulates lipogenic genes such as FASN, stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) and glycerol 3-phosphate acyl-transferase (GPAT) [23,24]. To examine the effects of resistin knockdown on lipogenic genes, we measured mRNA expression of genes involved in triglyceride synthesis, including FASN, SCD1 and GPAT, and found that mRNA expression of these genes was reduced by approximately 55%, 80% and 30%, respectively, in response to resistin knockdown (Figs 5A,B and S3). FASN and SCD1 protein levels were also drastically decreased by resistin knockdown (Fig. 5C). These results suggest that lipid production is inhibited by suppression of resistin expression.

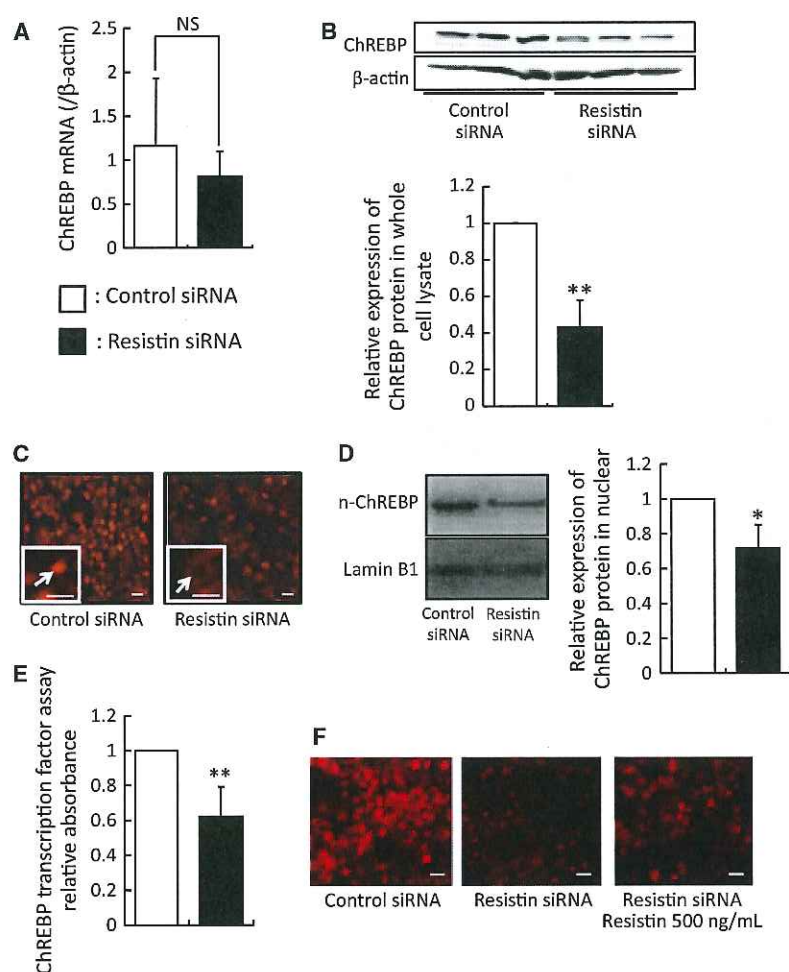
### Activation of CPT-1 by resistin knockdown

The two major ACC isoforms, ACC1 and ACC2, are primarily involved in the regulation of lipid synthesis and fatty acid  $\beta$ -oxidation, respectively [25,26]. Although no change was observed in ACC1 expression, an approximately 45% reduction in ACC2 expression was observed in response to resistin knockdown (Fig. 6A,B). Since expression of ACC2, which regulates malonyl-CoA synthesis, was reduced by resistin knockdown, we presumed that resistin knockdown could

increase CPT-1 activity via reduction of malonyl-CoA production. We measured CPT-1 activity in 3T3-L1 cells treated with resistin-specific siRNA and found that, as expected, CPT-1 activity increased approximately 2.5-fold (Fig. 6C). These results suggest that resistin knockdown can increase CPT-1 activity through suppression of ACC2 expression.

### Discussion

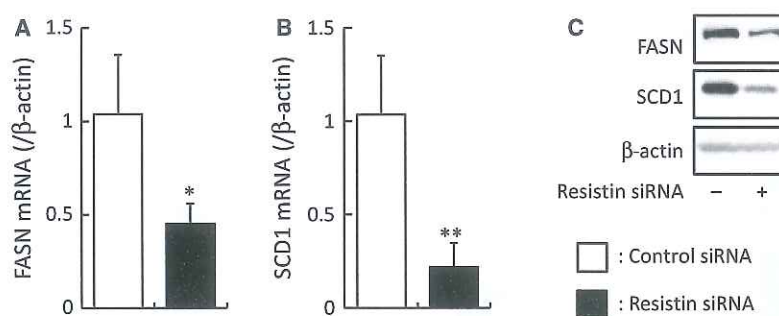
This study showed transient upregulation of resistin mRNA levels in 3T3-L1 cells and a concomitant increase in lipid accumulation from days 2 to 5. Previous studies have demonstrated that resistin is a key mediator of fatty acid import through a pathway involving increased phosphorylation of PI3K in adipocytes [27,28]. Furthermore, Sakaue *et al.* showed that PI3K is activated transiently from days 2 to 5 when the expression of adipocyte-specific proteins, including resistin, is increased [29]. Thus, it can be postulated that the transient upregulation of resistin expression is important for accumulation of intracellular lipid content. In the present study, the transient upregulation of resistin mRNA was suppressed by resistin-specific siRNA in order to investigate the biological function of resistin after adipocyte differentiation. Suppression of resistin expression resulted in a significant decrease in intracellular lipid content. The results obtained in



**Fig. 4.** Effects of resistin downregulation on ChREBP transcriptional activity. Cells were transfected with negative control (open bars) or resistin-specific (filled bars) siRNA on day 2. (A) ChREBP mRNA expression levels in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. Total RNA was recovered on day 5 and subjected to real-time RT-PCR. mRNA expression levels relative to  $\beta$ -actin were normalized to those in cells transfected with negative control siRNA. (B) ChREBP levels in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. Intracellular proteins were recovered on day 5 and subjected to immunoblotting with anti-ChREBP. Relative band intensities of ChREBP were normalized to those in cells transfected with negative control siRNA. (C) Intracellular distribution of ChREBP in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. Cells were immunostained for ChREBP on day 5. Arrows indicate cells with predominantly nuclear localization of ChREBP. Representative cells are shown in insets at higher magnification. (D) Nuclear-localized ChREBP (n-ChREBP) levels in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. Nuclear proteins were recovered on day 5 and subjected to immunoblotting with anti-ChREBP or anti-lamin B1 antibodies. A representative immunoblot is shown. Relative band intensities for n-ChREBP were normalized to those in cells transfected with negative control siRNA. (E) Relative transcriptional activity of ChREBP in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. Nuclear proteins were recovered on day 5 and analyzed using a ChREBP transcription factor assay kit as described in Materials and methods. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus cells transfected with negative control siRNA. NS, not significant. (F) Effects of the addition of resistin protein on intracellular distribution of ChREBP. One day after transfection with resistin-specific siRNA, 3T3-L1 cells were treated with recombinant mouse resistin at a concentration of 500 ng·mL<sup>-1</sup> for 2 days. Intracellular distribution of ChREBP was estimated by immunostaining. Bar 25  $\mu$ m.

this study were consistent with previous reports [4,20], although there are several reports indicating an inconsistent effect of resistin on accumulation of lipid droplets in 3T3-L1 cells [14,21]. Probably differences in experimental conditions might cause the inconsistency.

Thus, further studies are required to solve this. The mechanism of transient upregulation of resistin expression is also unclear and further studies are needed. In a future study it is expected that more detailed information regarding resistin function will be obtained by



**Fig. 5.** Changes in lipogenic gene expression induced by resistin knockdown. Relative mRNA expression levels of FASN (A) and SCD1 (B) in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. The cells were transfected with negative control (open bars) or resistin-specific (filled bars) siRNA on day 2. Total RNA was recovered on day 5 and subjected to real-time RT-PCR. mRNA expression levels relative to  $\beta$ -actin were normalized to those in cells transfected with negative control siRNA. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus cells transfected with negative control siRNA. (C) Changes in lipogenic protein levels induced by resistin knockdown. Cells were transfected with negative control or resistin-specific siRNA on day 2. The effects of resistin knockdown on FASN and SCD1 protein content were examined by western blotting.

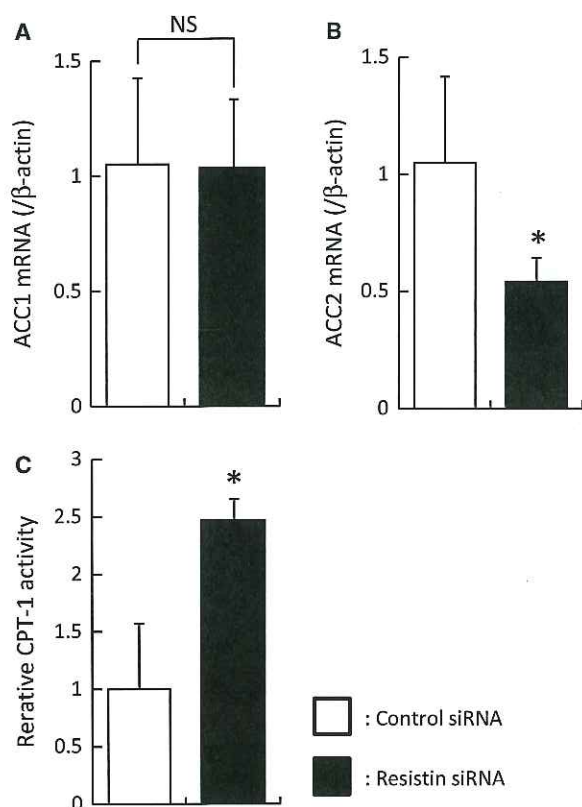
transfection of anti-resistin small hairpin RNA expression plasmid DNA into 3T3-L1 cells for a more effective RNA interference effect on resistin gene expression.

Despite reducing lipid content, resistin knockdown did not affect mRNA expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , which are key transcription factors for adipocyte differentiation (Fig. S1). PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  mRNA expression is induced in 3T3-L1 cells after 48 h of incubation in a differentiation medium [30,31]. Furthermore, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  are able to mutually induce expression of one other, forming a positive feedback loop. In the present study, siRNA was transfected into 3T3-L1 cells after a 48-h incubation in differentiation medium, which normally induces abundant expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . Therefore, our results suggest that resistin contributes to the accumulation of intracellular lipid content after the induction of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ .

To investigate the mechanism by which intracellular lipid content is reduced after resistin knockdown, we focused on SREBP-1 and ChREBP, transcription factors known to regulate the expression of lipogenic enzymes. Expression of both SREBP-1 and ChREBP increases during adipocyte differentiation [32,33]. The present study showed that transcriptional activity of SREBP-1 was not affected by resistin knockdown (Fig. S2). This is consistent with a previous study showing that lipogenic genes in adipocytes, but not hepatocytes, are not primarily regulated by SREBP-1 [34]. However, ChREBP is involved in lipid metabolism in adipocytes as well as hepatocytes at the transcriptional level [35]. We found that ChREBP protein expression was suppressed by transfection of

resistin-specific siRNA. ChREBP expression is regulated by thyroid hormone receptor  $\beta$  in adipose tissue [36]. However, in this study, since mRNA expression of ChREBP was not affected by knockdown of resistin gene, we speculate that resistin knockdown would affect translation or stability of ChREBP protein. Further studies are needed to elucidate the mechanism by which resistin knockdown influences ChREBP protein content.

Moreover, we found that expression of FASN, SCD1 and GPAT, all genes involved in triglyceride synthesis, was suppressed by resistin knockdown. Triglycerides, the primary component of lipid droplets in adipocytes, are formed by combining glycerol with three fatty acid molecules. FASN is a key enzyme that catalyzes the terminal steps in the synthesis of long-chain fatty acids. SCD1 catalyzes the rate-limiting step in the biosynthesis of mono-unsaturated fatty acids. GPAT is a rate-limiting enzyme that catalyzes the esterification of glycerol-3-phosphate with a fatty acyl-CoA to form 1-acylglycerol-3-phosphate in triglyceride biosynthesis. Therefore, reduced expression of these lipogenic enzymes resulting from resistin knockdown would be expected to suppress fatty acid and triglyceride biosynthesis. Moreover, while no change was observed in ACC1 mRNA expression levels, ACC2 mRNA expression was significantly reduced. ACCs catalyze the carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA. The malonyl-CoA produced by ACC1 and ACC2 is localized to the cytoplasm and mitochondria, respectively, and plays distinct functions in these compartments. The malonyl-CoA produced by ACC1 mainly participates in lipid synthesis, while ACC2 is involved in the regulation of fatty acid  $\beta$ -oxidation



**Fig. 6.** Resistin knockdown reduces ACC2 expression and activates CPT-1. Relative mRNA expression levels of ACC1 (A) and ACC2 (B) in differentiated 3T3-L1 cells on day 5. The cells were transfected with negative control (open bars) or resistin-specific (filled bars) siRNA on day 2. Total RNA was recovered on day 5 and subjected to real-time RT-PCR. mRNA expression levels relative to  $\beta$ -actin were normalized to those in cells transfected with negative control siRNA. (C) Effects of resistin knockdown on CPT-1 activity. CPT-1 activity was evaluated based on release of CoA-SH using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate). The reaction was monitored at 412 nm with a spectrometer in the presence or absence of L-carnitine. Data are shown as mean  $\pm$  sd (A, B,  $n = 4$ ; C,  $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  versus cells transfected with negative control siRNA. NS, not significant.

through the inhibition of CPT-1 in malonyl-CoA production [25,26]. Thus, the reduced expression of ACC2 induced by resistin knockdown may result in the activation of fatty acid  $\beta$ -oxidation through decreased mitochondrial malonyl-CoA content. Consistent with this, CPT-1 activity was increased by resistin knockdown. These findings suggest that resistin may enhance triglyceride synthesis and suppress mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation, resulting in increased intracellular lipid content in adipocytes.

Our results suggest that resistin regulates lipogenic enzyme expression and thereby increases intracellular

lipid content. Therefore, we hypothesized that the suppression of resistin would reduce intracellular lipid content even in hypertrophied adipocytes. As expected, a reduction in intracellular lipid content was observed after suppression of resistin expression even in the late maturation period (days 18–30, Fig. S4). However, in this study, we just measured gene expression and secreted resistin protein. Therefore, in a future study, it will be necessary to track loss of resistin in individual cells and correlate this with phenotypes of those cells. Also, further studies using not only 3T3-L1 cells but also genetic animal models will be required for better understanding of resistin function.

In conclusion, the present study provides evidence that resistin affects lipid accumulation during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells, and ChREBP participates in the resistin-relating lipid metabolism. Although further studies are needed to determine the precise molecular mechanisms by which resistin regulates ChREBP, pharmacological regulation of resistin may represent a promising strategy for alleviation of metabolic syndrome.

## Materials and methods

### 3T3-L1 cell culture and induction of differentiation

3T3-L1 pre-adipocytes were cultured and adipocyte differentiation was induced as previously described [13]. Briefly, cells were cultured in basal medium (DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 0.2% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ , 4 mM L-glutamine, 3.5% (w/v) glucose, 0.2 mM ascorbate, 1 nM T3 and 30  $\mu\text{M}$  T4) at 37  $^\circ\text{C}$  under a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . In this study, the day on which cells reached confluence was defined as day 0. Adipocyte differentiation was induced by incubation in differentiation medium (basal medium containing 500  $\mu\text{M}$  3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 mM dexamethasone and 1.6  $\mu\text{M}$  insulin) from days 0 to 2, followed by induction of maturation in maturation medium (basal medium containing 1.6  $\mu\text{M}$  insulin and 15  $\mu\text{M}$  D-biotin).

### RNA extraction and quantitation of mRNA expression by real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 3T3-L1 cells using ISOGEN (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). The isolated RNA was purified using a phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (pH 4.5; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) and 100% (v/v) 2-propanol. Complementary DNA was synthesized using random primers and SuperScript III



Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Then, real-time PCR was performed using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Life Technologies) and SYBR-Green.  $\beta$ -actin mRNA was used as an internal control. The primer sequences used for this study are summarized in Table 1. Relative mRNA expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

## ELISA

Resistin released from 3T3-L1 cells was measured using the Mouse Resistin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

## RNA interference

Resistin siRNA (sense 5'-CCAAAUGCAAUAAAGAA CAUUGGCU-3'; antisense 5'-AGCCAAUGUUCUUUAU UGCAUUUGG-3'; each strand with a 3' dTdT overhang) and negative control siRNA were purchased from Life Technologies. Transfection of siRNA was performed using Lipofectamine RNAiMAX and Opti-MEM (both from Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. On day 2, 3T3-L1 cells were incubated with 50 nM of each siRNA in maturation medium and cultured until day 5.

## Transfection of resistin plasmid DNA and effect of secreted resistin on lipid content of 3T3-L1 cells treated with anti-resistin siRNA

A full-length cDNA encoding mouse resistin gene was prepared by RT-PCR using the total RNA collected from adipose tissue of C57BL/6J mouse and the primer shown in Table 1. The PCR product was digested by *NheI* and *HindIII* for subcloning into protein expression plasmid DNA pcDNA3.1(+). The sequence of resultant plasmid DNA encoding resistin (pResistin) was confirmed, and the plasmid DNA was transfected to COS7 cells with FuGENE HD (Life Technologies). The culture medium was collected at 48 h after transfection. Then the collected medium was subjected to centrifugation at 500 g for 5 min. The secreted resistin in the collected medium was measured by immunoblotting and ELISA, and the amount of resistin was 110 ng·mL<sup>-1</sup>. The collected medium containing secreted resistin was added to the dish of 3T3-L1 cells treated with anti-resistin siRNA.

## Oil red O staining

Following fixation of 3T3-L1 cells in 10% (v/v) formalin solution (Wako Pure Chemical Industries), the cells were incubated with 18 mg·mL<sup>-1</sup> oil red O in a 60% (v/v) 2-propanol

**Table 1.** The primer sequences.

Gene		Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplification	Accession no.
<i>Resistin Full</i>	Sense	TCCTGCTAGCTCCTCTGCCA	461 bp	<a href="#">NM_022984</a>
	Antisense	AGACCCTAAGCTTAGACCTGC		
<i>Resistin</i>	Sense	TCACCTTTCCACCTCTGTGATATGAT	81 bp	<a href="#">NM_022984</a>
	Antisense	TGCCCCAGGTGGTGTAAA		
<i>Pparg</i>	Sense	AGTGACTTGGCTATATTTATAGCTGTCATT	91 bp	<a href="#">NM_011146</a>
	Antisense	TGTCTTGGATGTCCTCGATGG		
<i>C/ebpa</i>	Sense	GCGCAAGAGCCGAGATAAAG	113 bp	<a href="#">NM_007678</a>
	Antisense	CACGGCTCAGCTGTTCCA		
<i>aP2(Fabp4,A-FABP)</i>	Sense	CAGAAGTGGGATGGAAGTCCG	169 bp	<a href="#">NM_024406</a>
	Antisense	CGACTGACTATTGTAGTGTGTTGA		
<i>Fasn</i>	Sense	CCTCCAAGACTGACTCGG	92 bp	<a href="#">NM_007988</a>
	Antisense	CAGTGTGCTCAGGTTCACTT		
<i>Scd1</i>	Sense	ATATCCTGGTTCCCTGGGT	91 bp	<a href="#">NM_009127</a>
	Antisense	CAGCGGTAICTCACTGGC		
<i>Gpat</i>	Sense	ACACTGAAATGGAAGGAGAGC	116 bp	<a href="#">NM_008149</a>
	Antisense	AGAGATGGGATACCTGGGGTTG		
<i>Acaca(Acc1)</i>	Sense	TGGCGTCCGCTCTGTGATA	103 bp	<a href="#">NM_133360</a>
	Antisense	CATGGCGACTTCTGGGTTG		
<i>Acacb(Acc2)</i>	Sense	GCAACCACATCTTCCCTCAACT	103 bp	<a href="#">NM_133904</a>
	Antisense	CACAGACGGCTGCCATAG		
<i>Srebf1</i>	Sense	GGAACAGACACTGGCCGA	96 bp	<a href="#">NM_011480</a>
	Antisense	AAGTCACTGCTTGGTTGTTGAT		
<i>Chrebp</i>	Sense	CTGGGGACCTAAACAGGAGC	166 bp	<a href="#">NM_021455</a>
	Antisense	GAAGCCACCTATAGCTCCC		
<i>Actb</i>	Sense	GACGGCCAGTCCATCACTATTG	89 bp	<a href="#">NM_007393</a>
	Antisense	CCACAGGATTCCATACCCAAGA		

solution for 20 min at room temperature. Intracellular lipid droplets were visualized by washing the cells with 60% 2-propanol solution. Then, oil red O dissolved in lipid droplets was extracted with 100% 2-propanol and its relative concentration was determined by measuring absorbance at 540 nm.

### Triglyceride content in adipocytes

Triglycerides in adipocytes were extracted by sonication with 1 mL of 1 : 2 methanol : chloroform for 30 min at room temperature. The lower phase was transferred to a new tube after centrifugation at 20 400 *g* for 5 min at room temperature. Samples were then resuspended in 300  $\mu$ L NaCl/P<sub>i</sub> and recentrifuged at 20 400 *g* for 5 min at room temperature. The lower phase was transferred to a new tube and dried. The lipid film was dispersed by sonication in 40  $\mu$ L NaCl/P<sub>i</sub> after hydration for 10 min. Triglycerides were measured using a triglyceride quantification kit (Wako Pure Chemical Industries) following the manufacturer's instructions.

### Recombinant resistin protein treatment

Recombinant mouse resistin was purchased from R&D Systems and dissolved in a reconstitution buffer (NaCl/P<sub>i</sub> supplemented with 0.1% BSA). 3T3-L1 cells transfected with resistin-specific siRNA on day 2 were incubated with the reconstitution buffer or recombinant mouse resistin at a concentration of 500 ng·mL<sup>-1</sup> for 2 days starting on day 3. Cells transfected with negative control siRNA were also treated with the buffer. Intracellular lipid content on day 5 was estimated by oil red O staining.

### Preparation of whole cell lysates

3T3-L1 cells were washed with NaCl/P<sub>i</sub> and incubated in RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate and 0.1% (w/v) SDS) for 30 min at 4 °C.

### Purification of cellular nuclear extracts

3T3-L1 cells were washed with NaCl/P<sub>i</sub> (supplemented with 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 1 mM Na<sub>3</sub>OV<sub>4</sub>) and incubated in a hypotonic extraction buffer (10 mM HEPES, 4 mM NaF, 0.1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 1 mM Na<sub>3</sub>OV<sub>4</sub>) supplemented with Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) for 15 min at 4 °C. Following the addition of Nonidet P-40 at a concentration of 10% (v/v), cells were homogenized on ice with a Dounce homogenizer and then centrifuged at 1000 *g* for 5 min at 4 °C. To extract nuclear proteins, a nuclear extraction buffer (10 mM HEPES,

0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>OV<sub>4</sub>, 1 mM dithiothreitol and Complete Mini Cocktail) was added to the nuclear pellet.

### Quantitation of proteins

Protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions.

### Immunoblotting

Proteins were separated on an SDS/PAGE gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. After 1 h of blocking, the membrane was incubated with the primary antibodies anti-FASN, anti-SCD1, anti- $\beta$ -actin, anti-lamin B1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-SREBP (2A4; MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) or anti-ChREBP, along with the ChREBP Cell-Based Translocation Assay Kit reagents at a 1 : 1000 ratio overnight at 4 °C, and then at room temperature for 1 h. After washing three times with NaCl/Tris/0.1% Tween-20, the membrane was incubated with a horseradish-peroxidase-conjugated anti-IgG at a 1 : 2000 ratio for 1 h at room temperature, and then washed again. Bands were visualized using the ECL Prime Western blotting detection kit (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK), and densitometric results were analyzed with IMAGE J software.  $\beta$ -Actin and lamin B1 were used as internal controls.

### Measurement of SREBP-1 and ChREBP transcription factor activity

To evaluate SREBP-1 and ChREBP transcription factor activity in 3T3-L1 cells, nuclear proteins were extracted and analyzed using an SREBP-1 transcription factor assay kit and a ChREBP transcription factor assay kit (both from Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Fluorescence microscopy

ChREBP was visualized in 3T3-L1 cells using the ChREBP Cell-Based Translocation Assay Kit (Cayman Chemical Company), according to the manufacturer's instructions.

### Measurement of CPT-1 activity

CPT-1 activity was measured according to previously published methods [37,38]. The cell lysate was pre-incubated in 58 mM Tris/HCl, 1.25 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 0.25 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate), pH 8.0, after enucleation. After measurement of the background using

40  $\mu\text{M}$  palmitoyl-CoA (Sigma Aldrich), CPT-1 activity was measured in the presence of 0.25 mM L-carnitine (Sigma Aldrich). CPT-1 activity was calculated as the amount of CoA-SH released from mitochondria per minute per milligram of protein and expressed as relative activity.

### Statistical analysis

Statistical significance was determined using Student's *t* test. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. *P* values < 0.05 were considered to be significant.

### Acknowledgements

This work was supported in part by the Kyoto Pharmaceutical University Fund for the Promotion of Scientific Research (HT) and by a Grant-in-Aid for Young Scientists B (No. 21790666, HT) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan. The authors thank Honjo International Scholarship Foundation (HISF), Japan.

### References

- 1 Fu Y, Luo N, Klein RL & Garvey WT (2005) Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* **46**, 1369–1379.
- 2 Astudillo P, Ríos S, Pastenes L, Pino AM & Rodríguez JP (2008) Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J Cell Biochem* **103**, 1054–1065.
- 3 Liang X, Kanjanabuch T, Mao SL, Hao CM, Tang YW, Declercq PJ, Hasty AH, Wasserman DH, Fogo AB & Ma LJ (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E103–E113.
- 4 Gong H, Ni Y, Guo X, Fei L, Pan X, Guo M & Chen R (2004) Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol* **150**, 885–892.
- 5 Eriksson P, Reynisdottir S, Lönnqvist F, Stemme V, Hamsten A & Arner P (1998) Adipose tissue secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in non-obese and obese individuals. *Diabetologia* **41**, 65–71.
- 6 Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF & Ho LT (2001) Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1328–1333.
- 7 Gnacińska M, Magorzewicz S, Guzek M, Lysiak-Szydowska W & Sworcak K (2010) Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynol Pol* **61**, 160–168.
- 8 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N *et al.* (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* **7**, 941–946.
- 9 Ahrén B & Scheurink AJ (1998) Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. *Eur J Endocrinol* **139**, 461–467.
- 10 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U & Tarkowski A (2005) Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* **174**, 5789–5795.
- 11 Park HK, Qatanani M, Briggs ER, Ahima RS & Lazar MA (2011) Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes* **60**, 775–783.
- 12 Kohler HP (2002) Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis. *Swiss Med Wkly* **132**, 241–252.
- 13 Ikeda Y, Hama S, Kajimoto K, Okuno T, Tsuchiya H & Kogure K (2011) Quantitative comparison of adipocytokine gene expression during adipocyte maturation in non-obese and obese rats. *Biol Pharm Bull* **34**, 865–870.
- 14 Kim KH, Lee K, Moon YS & Sul HS (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **276**, 11252–11256.
- 15 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312.
- 16 Zhu B, Fan L, Wang H, Liu L, Tao T & Cui H (2012) The relationship between serum resistin level and the components of metabolic syndrome in elderly Chinese men. *J Am Geriatr Soc* **60**, 592–594.
- 17 Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR, Heimbürger O, Bárány P, Lönnqvist F, Lindholm B, Nordfors L, Alvestrand A & Stenvinkel P (2006) Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int* **69**, 596–604.
- 18 Senolt L, Housa D, Vernerová Z, Jirásek T, Svobodová R, Veigl D, Anderlová K, Müller-Ladner U, Pavelka K & Haluzík M (2007) Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis* **66**, 458–463.
- 19 Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH & Smith SA (2003) Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 472–476.
- 20 Sánchez-Solana B, Laborda J & Baladrón V (2012) Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose

- uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol Endocrinol* **26**, 110–127.
- 21 Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ & Kolonin MG (2011) An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell* **9**, 74–86.
  - 22 Suganami T, Nishida J & Ogawa Y (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2062–2068.
  - 23 Dentin R, Pégrier JP, Benhamed F, Fougère F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J & Postic C (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **279**, 20314–20326.
  - 24 Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougère F, Dyck JR, Girard J & Postic C (2006) Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* **55**, 2159–2170.
  - 25 McGarry JD & Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* **244**, 1–14.
  - 26 Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA & Wakil SJ (2001) Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* **291**, 2613–2616.
  - 27 Kim SJ, Nian C & McIntosh CH (2007) Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* **282**, 8557–8567.
  - 28 Kim SJ, Nian C & McIntosh CH (2007) Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes. *J Biol Chem* **282**, 34139–34147.
  - 29 Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM & Kasuga M (1998) Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 28945–28952.
  - 30 Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD & MacDougald OA (2007) Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **282**, 14515–14524.
  - 31 Okamura M, Kudo H, Wakabayashi K, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF *et al.* (2009) COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5819–5824.
  - 32 Nishizuka M, Arimoto E, Tsuchiya T, Nishihara T & Imagawa M (2003) Crucial role of TCL/TC10beta L, a subfamily of Rho GTPase, in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **278**, 15279–15284.
  - 33 Hurtado del Pozo C, Vesperinas-García G, Rubio MÁ, Corripio-Sánchez R, Torres-García AJ, Obregon MJ & Calvo RM (2011) ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 1194–1200.
  - 34 Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T *et al.* (2007) SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* **48**, 1581–1591.
  - 35 He Z, Jiang T, Wang Z, Levi M & Li J (2004) Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E424–E430.
  - 36 Gauthier K, Billon C, Bissler M, Beylot M, Lobaccaro JM, Vanacker JM & Samarut J (2010) Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *J Biol Chem* **285**, 28156–28163.
  - 37 Markwell MA, Mc Groarty EJ, Bieber LL & Tolbert NE (1973) The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney, a new peroxisomal enzyme. *J Biol Chem* **248**, 3426–3432.
  - 38 Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, Hess BW, Nathanielsz PW & Du M (2006) Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J Physiol* **575**, 241–250.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

**Fig. S1.** No effect of resistin knockdown on expression of key factors for adipocyte differentiation.

**Fig. S2.** No change in SREBP-1 transcriptional activity in response to resistin knockdown.

**Fig. S3.** Resistin knockdown reduces GPAT expression.

**Fig. S4.** Resistin knockdown in the late maturation period.

## 付録 II

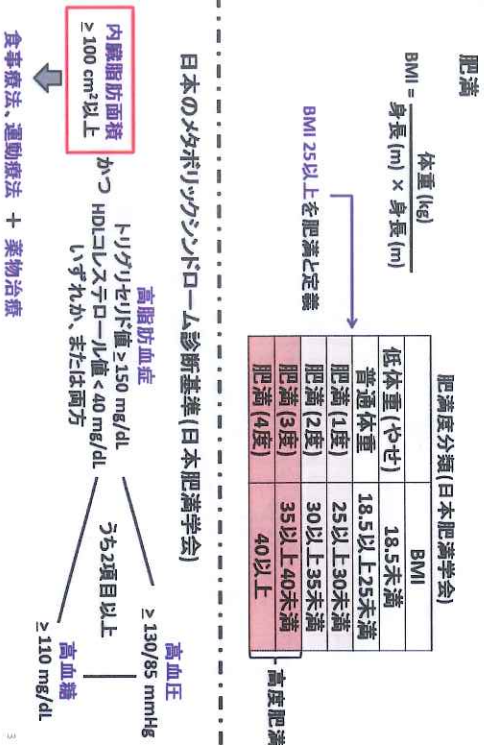




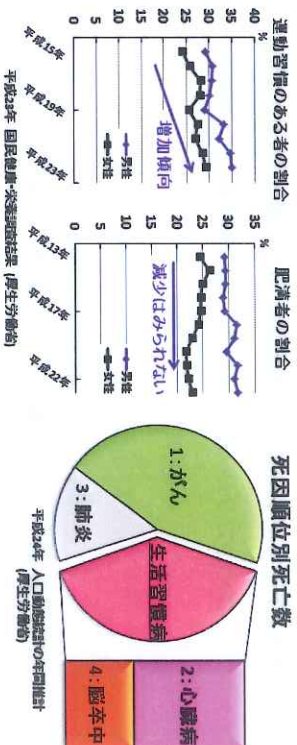
# メタボリックシンドローム治療を目指した 脂肪細胞におけるレジスチン生理作用の解明

薬品物理化学分野  
D11001 池田 義人

背景

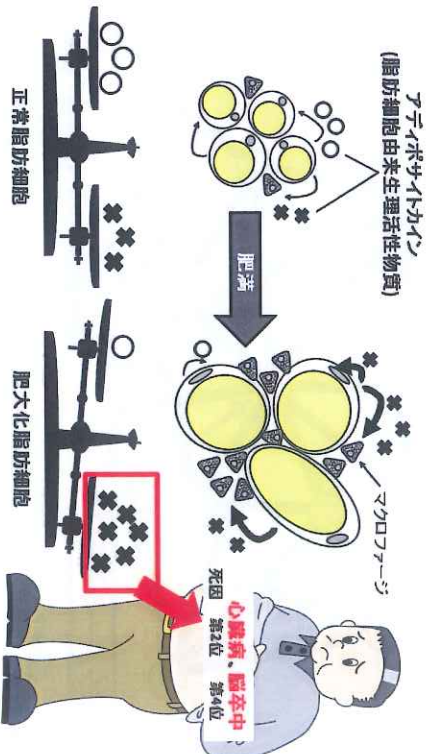


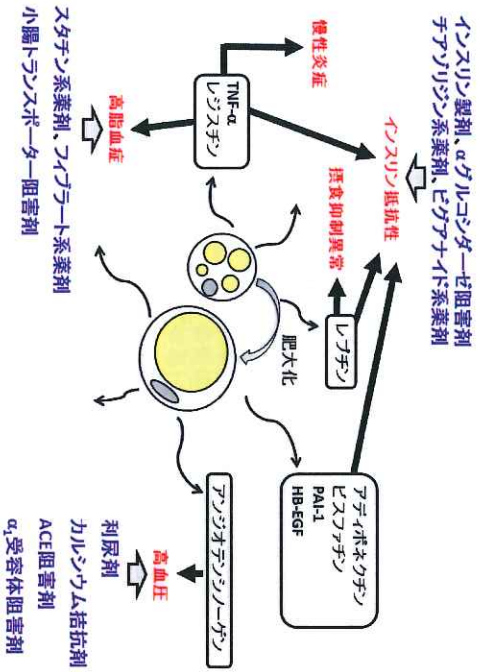
背景



- ▶ 肥満者が継続出来ている人が少ないのではないかと、肥満者の割合に減少がみられない
- ▶ 運動が習慣づいてきたが、
- ▶ 生活の欧米化に伴って、我が国においても肥満者の増加が著しい
- ▶ 生活習慣病として分類される心臓病、脳卒中で死亡する数は常に匹敵する

背景





目的

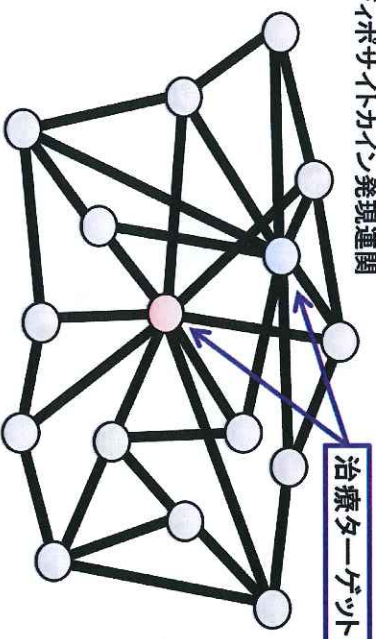
1. メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補となるアデノポサイトカインの探索
2. 治療ターゲット候補としての有用性の評価
3. アデノポサイトカイン発現連関の検討



食事療法や運動療法を補助し、メタボリックシンドローム患者における崩壊したアデノポサイトカイン発現バランスの是正を介した重篤な疾患の予防・改善に繋げたい

仮説

アデノポサイトカイン発現連関



アデノポサイトカインの発現は各々が独立しているのではなく、相互に発現連関を形成することで、メタボリックシンドロームの病態を複雑化させているのではないかと

第1章

### 脂肪細胞の分化・成熟過程における各アデノポサイトカイン発現変動

1. メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補となるアデノポサイトカインの探索
  2. 治療ターゲット候補としての有用性の評価
  3. アデノポサイトカイン発現連関の検討
- 肥満モデルラット脂肪組織におけるアデノポサイトカイン発現量
  - 初代培養脂肪細胞の分化・成熟過程におけるアデノポサイトカイン発現変動
  - 3T3-L1脂肪細胞の成熟過程におけるアデノポサイトカイン発現変動

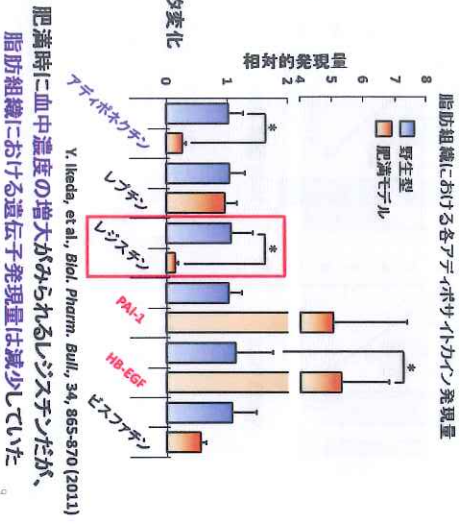


## 肥満モデルラット脂肪組織におけるアディポサイトカイン遺伝子発現量

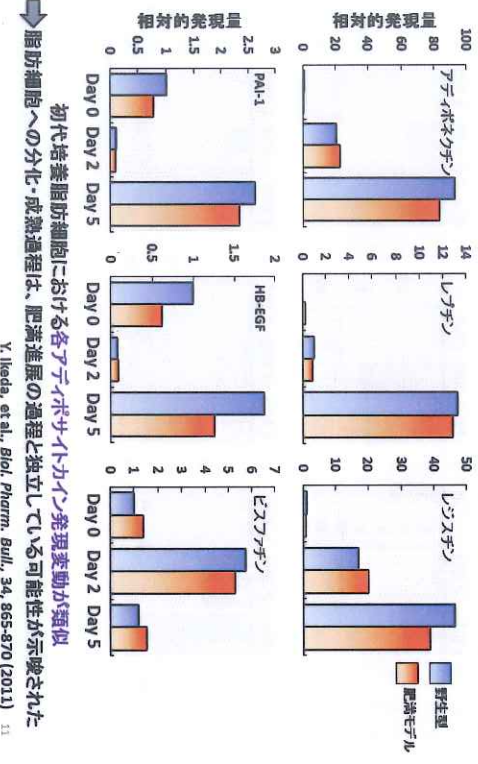


上：野生型  
下：肥満モデル

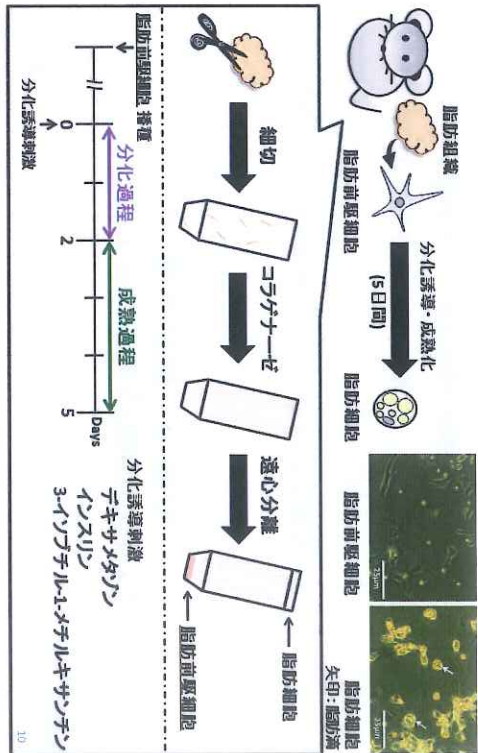
報告されている血中パラメータ変化  
アディポネクチン…減少  
レプチン  
レジスチン  
PAI-1  
HB-EGF  
ビスノクチン  
…増大



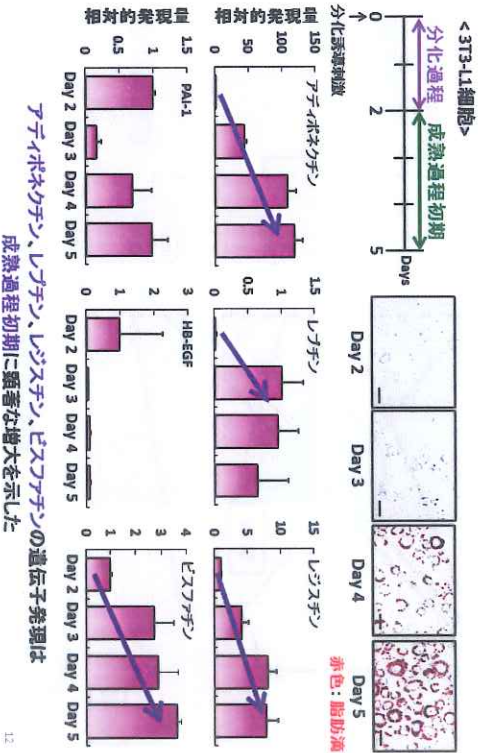
## 初代培養細胞の分化・成熟過程におけるアディポサイトカイン遺伝子発現変動



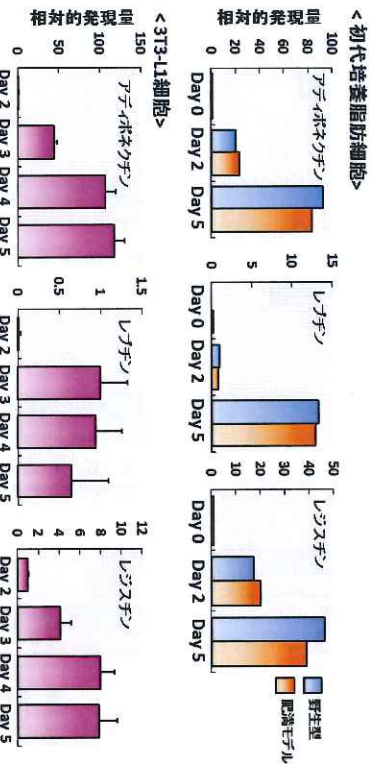
## 脂肪細胞初代培養



## 3T3-L1脂肪細胞の成熟過程におけるアディポサイトカイン遺伝子発現変動

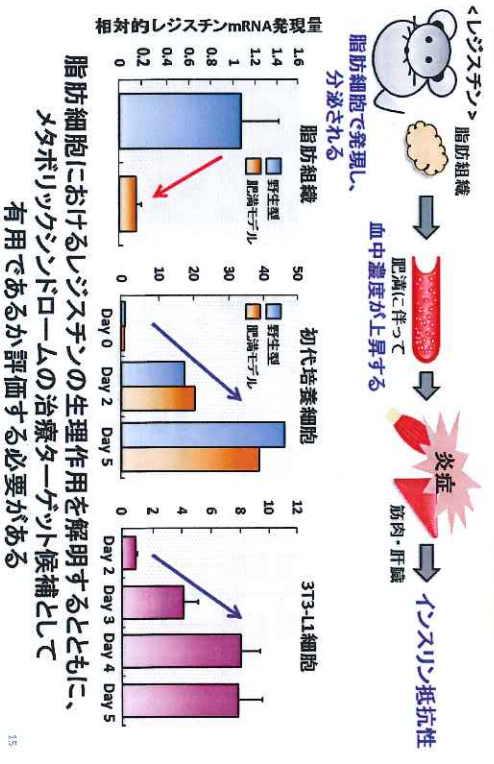


脂肪細胞の分化・成熟過程におけるアディポサイトカイン遺伝子発現変動



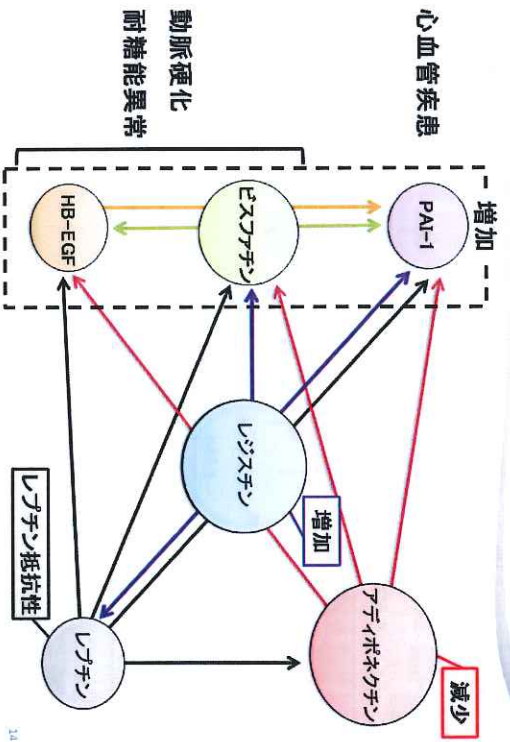
アディポネクチン、レプチン、レジスチンの発現変動が初代培養細胞と類似  
 ↓ これらアディポサイトカインの発現増大が脂肪細胞成熟化に重要である可能性が考えられた

特徴的な遺伝子発現変動を示したレジスチンについて



脂肪細胞におけるレジスチンの生理作用を解明するとともに、  
 メタリックシンドロームの治療ターゲット候補として  
 有用であるか評価する必要がある

予想される各アディポサイトカイン間の発現連関



心血管疾患  
 動脈硬化  
 耐糖能異常

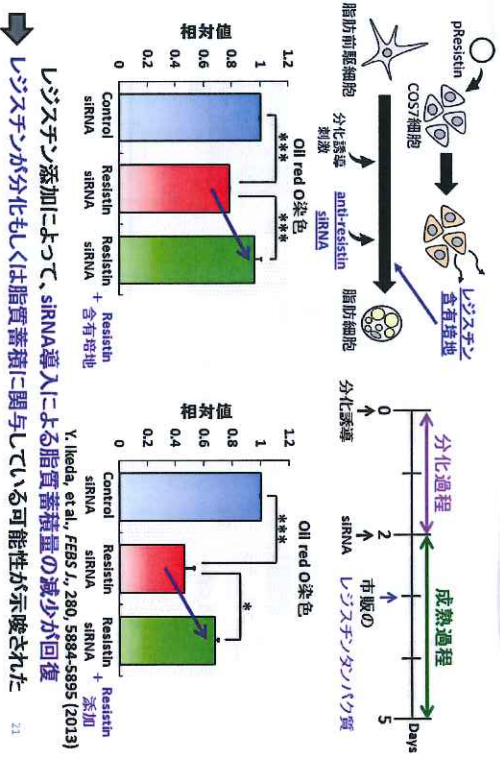
第2章

レジスチンの脂肪細胞における  
 脂質蓄積への関与

1. メタリックシンドロームの治療ターゲット候補となるアディポサイトカインの探索
2. 治療ターゲット候補としての有用性の評価
3. アディポサイトカイン発現連関の検討
  - siRNA導入によるレジスチン発現抑制
  - レジスチン発現抑制による脂質蓄積への影響
  - レジスチンが及ぼす脂質合成、脂質β酸化に対する影響
  - 高脂肪食摂取マウスに対する抗レジスチン抗体投与と脂質蓄積に対する影響



### レジスチン添加による脂質蓄積量減少への影響

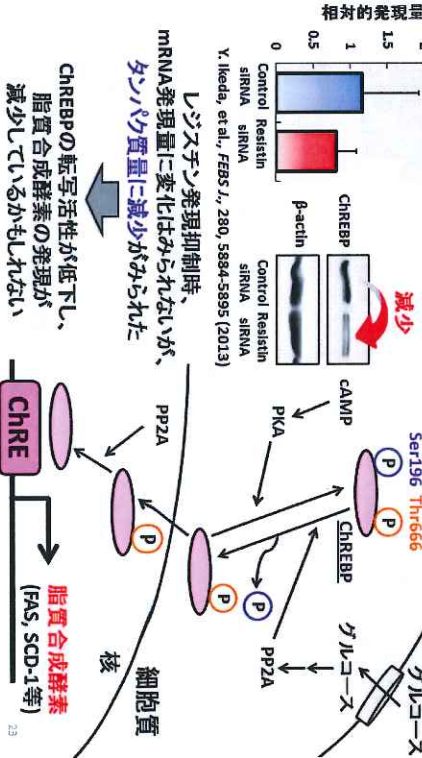


### レジスチン添加によって、siRNA導入による脂質蓄積量の減少が回復

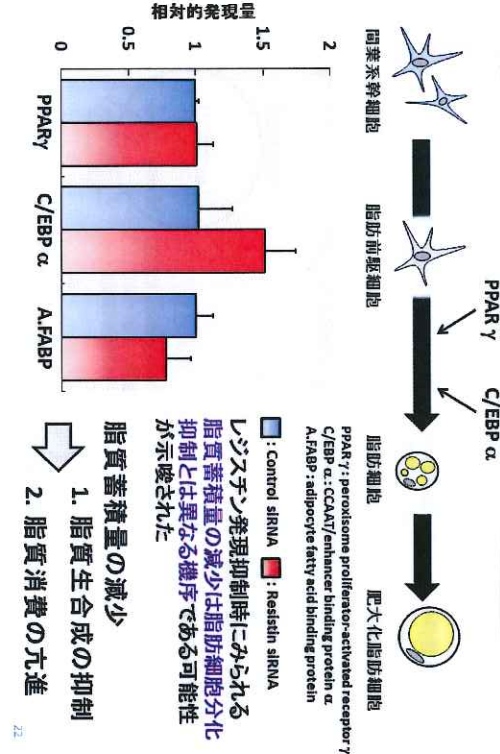
レジスチン添加により、siRNA導入による脂質蓄積量の減少が回復

レジスチンが分化もしくは脂質蓄積に関与している可能性が示唆された

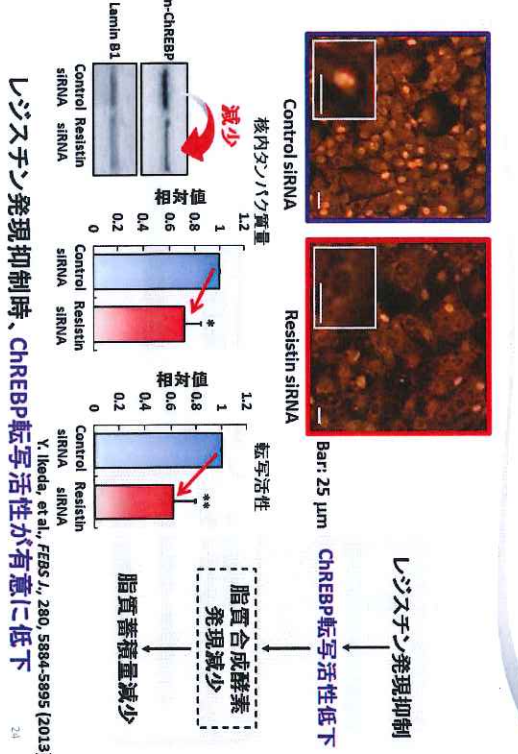
レジスチン発現抑制によるChREBP転写活性への影響



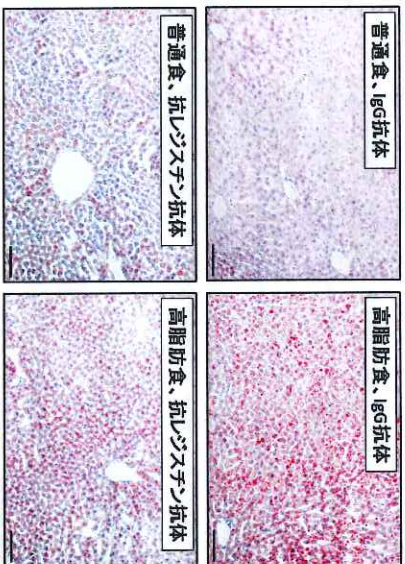
### レジスチン発現抑制時における脂肪細胞分化マーカー発現量



### レジスチン発現抑制によるChREBP転写活性への影響





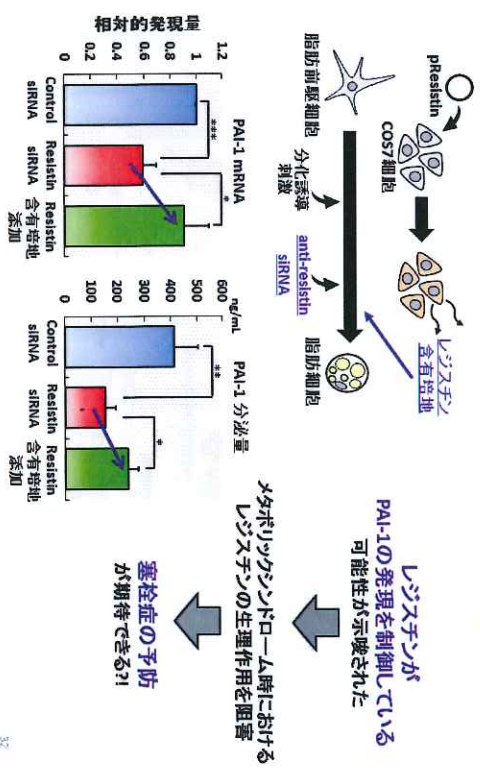


レジスチン中和抗体の投与によって、  
肝臓における脂質蓄積量に減少傾向がみられた

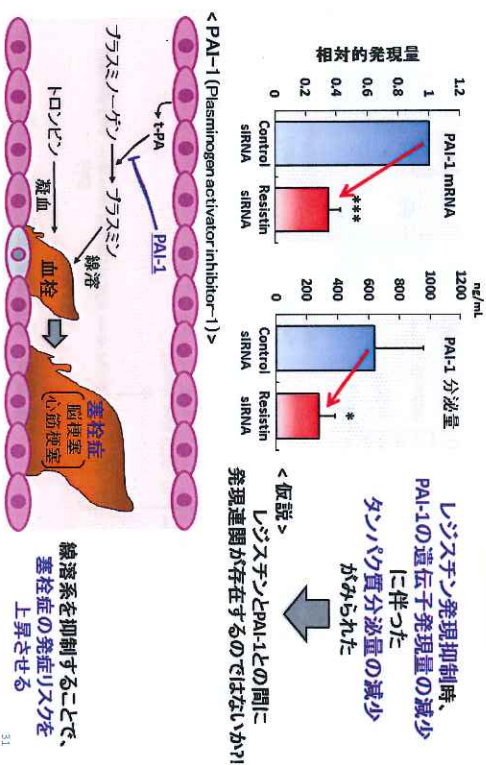
## レジスチンを中心とした アディポサイトカイン発現連関の解析

1. メタボリックシンドロームの治療ターゲット候補となるアディポサイトカインの探索
2. 治療ターゲット候補としての有用性の評価
3. アディポサイトカイン発現連関の検討
  - ・ レジスチン発現抑制によるPAI-1発現減少の発見
  - ・ レジスチン補充によるPAI-1発現減少の回復

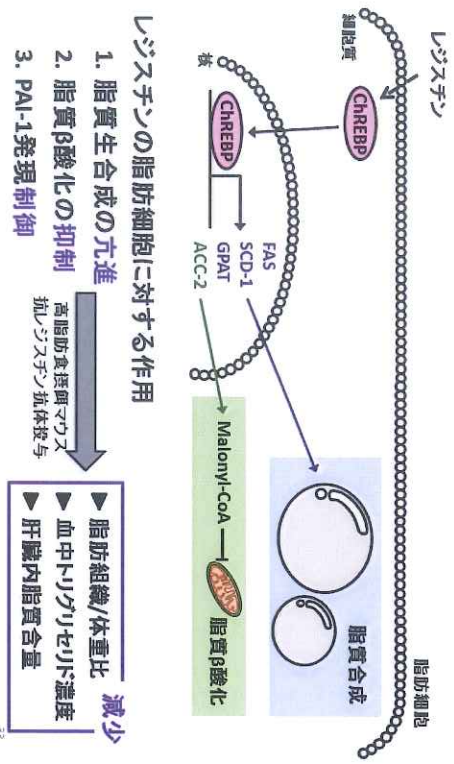
### レジスチン含有培地添加によるPAI-1発現量減少の回復



### レジスチンノックダウンによるPAI-1発現への影響

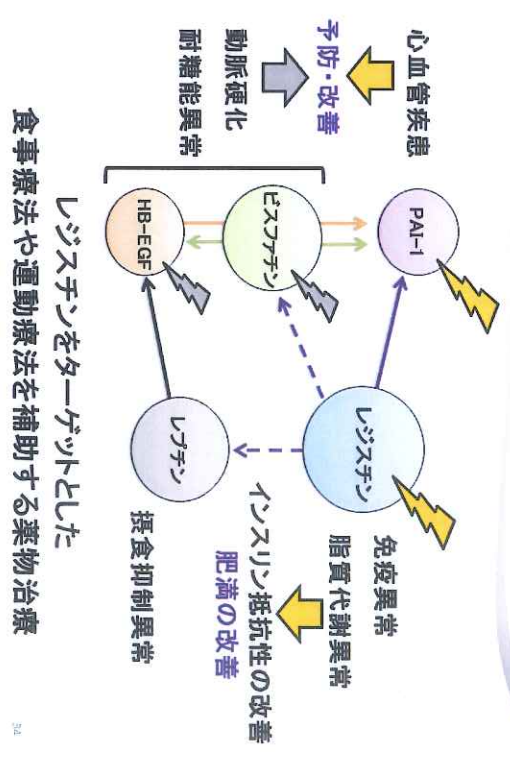


総括



33

総括



34

