インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構の解明

Clarification of Regulatory Mechanisms for Determining Number and Size of Adipocytes by Insulin

平成 25 年度

論文博士申請者

伊藤　実（Ito, Minoru)

指導教員

本島清人

目次

第1章　序論　・・・ 5

第2章　ヒト白色脂肪細胞でのインスリンによるアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用における CIDE ファミリーの役割　・・・ 9

１．　実験方法

1-1.　材料

1-2.　ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化

1-3.　リアルタイム定量 PCR

1-4.　ウエスタンブロット解析

1-5.　siRNA 解析

1-6.　アポトーシスの解析

1-7.　脂肪細胞数の解析

1-8.　脂肪滴サイズの解析

1-9.　グリセロール放出量の解析

1-10.　統計解析

２．　結果

2-1.　インスリンによる CIDE ファミリーの発現制御

2-2.　インスリンのアポトーシス抑制作用に対する CIDE ファミリーの関与

2-3.　インスリンの脂肪滴形成作用に対する CIDE ファミリーの関与

３．　考察

４．　小括

第3章　インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わる経路の探索　・・・ 28

１．　実験方法

1-1.　材料

1-2　ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化

1-3　リアルタイム定量 PCR

1-4.　siRNA 解析

1-5.　ウエスタンブロット解析

1-6.　アポトーシスの解析

1-7.　脂肪滴サイズの解析

1-8.　統計解析

２．　結果

2-1.　インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に対する PI3K の関与

2-2.　インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に対する Akt 及び JNK の選択的な関与

2-3.　インスリンによる CIDEA の発現制御及びアポトーシス抑制作用に対する Akt1/2 の関与

2-4.　インスリンによる CIDEC の発現制御及び脂肪滴形成作用に対

する JNK2 の関与

2-5.　インスリンによる Akt 及び JNK リン酸化に対する PI3K の関与

３．　考察

４．　小括

第4章　インスリン/JNK2 経路による脂肪滴サイズの増大に関与する新規遺伝子の探索　・・・ 47

１．　実験方法

1-1.　材料

1-2.　ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化

1-3.　siRNA 解析

1-4.　マイクロアレイ解析

1-5.　Ingenuity pathway analysis

1-6.　リアルタイム定量 PCR

1-7.　ウエスタンブロット解析

1-8.　共焦点免疫蛍光顕微鏡法

1-9.　de novo 脂肪酸合成の解析

1-10.　共免疫沈降法

1-11.　統計解析

２．　結果

1-1.　インスリン/JNK2 経路により制御される遺伝子の網羅的探索

1-2.　インスリン/JNK2 経路による SREBP-1c の発現制御

1-3.　インスリンによる脂肪酸合成の亢進に対する JNK2 の関与

1-4.　インスリンによる脂肪酸合成の亢進に対する SREBP-1c の関与

1-5.　インスリンによる SREBP-1 プロセシング及び核内移行に対する JNK2 の関与

３．　考察

４．　小括

総括　・・・71

参考文献　・・・73

謝辞　・・・78

第1章　序論

脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵庫として働くばかりでなく、生理状況に応じて種々の内分泌因子（アディポサイトカイン）を産生・分泌し、糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしている。その一方で、過食、運動不足及び遺伝的背景による脂肪蓄積・肥満は 2 型糖尿病、脂質異常症、高血圧、動脈硬化症など生活習慣病の基盤となるリスクファクターである(1)。脂肪組織容量は脂肪細胞のサイズと数によって規定されている(2, 3)。近年、脂肪細胞は肥大化することで悪性化し、アディポサイトカインの分泌異常をきたして、慢性炎症及び糖・脂質代謝異常の惹起に関わることが明らかとなっている(Fig. 1) (4)。しかしながら、脂肪細胞の数の増加や肥大化に関わる分子やシグナル伝達経路は十分には解明されておらず、また肥大化を特異的に抑制する創薬ターゲットも同定されてはいない。従って、脂肪細胞の肥大化を抑制することができれば、種々の肥満関連疾患の予防又は治療につながる可能性が考えられる。

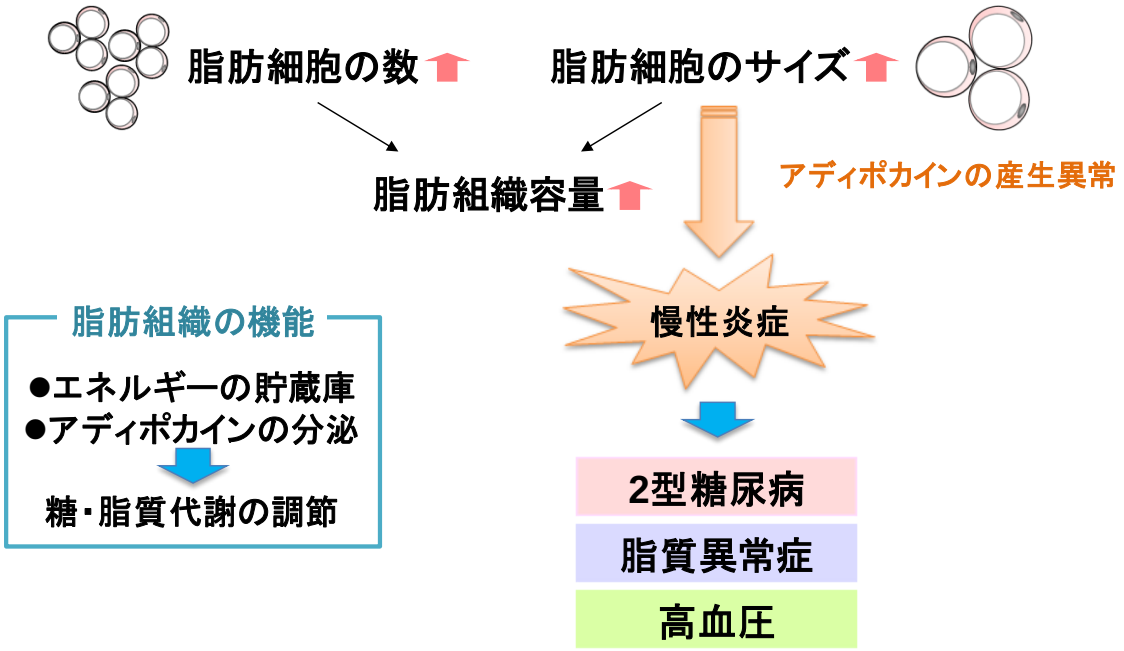

Fig. 1 . 脂肪細胞の肥大化による慢性炎症及び肥満関連疾患の発症

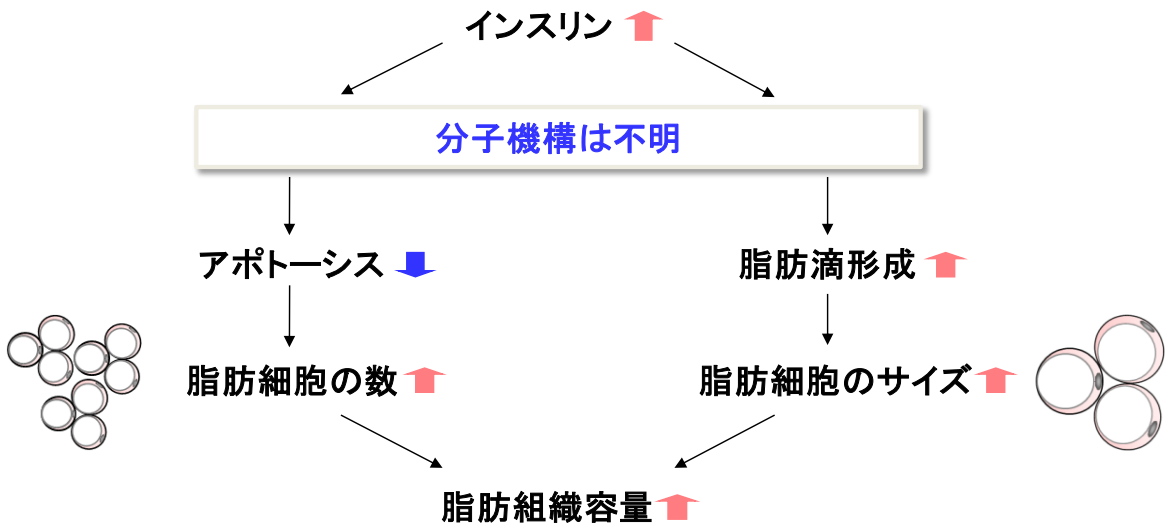

Fig. 2. インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの増加作用

脂肪組織容量を増大させる強力な生体内ホルモンとしてインスリンが知られている。病態における過剰なインスリンシグナルは、脂肪細胞において、数に影響するアポトーシスを抑制すること、サイズに影響する脂質合成を亢進させることで脂肪組織容量を増大させることが示唆されているが(5, 6)、その分子機構は未だ不明な点が多い(Fig. 2)。

一方、インスリンと同様、脂肪組織容量を制御する分子として Cell death-inducing DNA fragmentation factor-α-like effector (CIDE)ファミリータンパク質がある(Fig. 3)。CIDE ファミリータンパク質として CIDEA、CIDEB 及び CIDEC が知られている。CIDE ファミリーの発現はそれぞれ異なる組織分布を示すことが知られており、CIDEA はマウスでは褐色脂肪組織(7)、ヒトでは白色脂肪組織に(8)、CIDEB は肝臓及び腎臓に(9, 10)、CIDEC は白色脂肪組織及び褐色脂肪組織に発現が高いことが報告されている(11, 12)。CIDE ファミリーは DNA fragmentation factor DFF45 と相同性があることから、最初にアポトーシス誘導因子として発見された(10, 13, 14)。その後、CIDE ファミリータンパク質は脂肪滴周

囲に局在し、脂肪分解を抑制することで、脂肪滴形成の亢進に関わる因子であることが見出された(15)。また、CIDE ファミリーのノックアウトマウスはいずれも肥満及びインスリン抵抗性になりにくいこと(15)、CIDEA 及び CIDEC の遺伝的多型はそれぞれ肥満及び脂肪萎縮症に関連することから(16-18)、CIDE ファミリーは肥満及びインスリン抵抗性に深く関与する因子であることが明らかにされている。以上のように、CIDE ファミリータンパク質はインスリンと同様、アポトーシスや脂肪滴形成に関与することが分かっているが、脂肪細胞での CIDE ファミリーの役割やインスリンとの関連については不明である。

本研究では、脂肪細胞の肥大化をターゲットとした新たな肥満関連疾患の予防・治療法の可能性を探索するため、ヒト白色脂肪細胞を用いて、インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構を検討した。本研究の経緯として、なぜ、このような脂肪細胞の数とサイズの制御機構という重要な問題が残されたままになっていたのかについて、以下のように考えた。今までの脂肪細胞研究の概要は、マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞株を用いた研究報告が大半を占め、その研究内容は主に脂肪細胞の分化、糖代謝及びアディポカインの分泌機構に関するものであった。しかし、脂肪細胞の数とサイズの制御機構は未解明であった。その問題点として、以下の 2 点が考えられた。1 つ目は生体から採取されて時間が経過している株細胞では、脂肪細胞の数とサイズの研究には不向きであった可能性が考えられた。2 つ目はより生理的条件に近い初代培養やヒト由来の脂肪細胞を用いた報告はごく少数であり、数とサイズの研究があまり行われていない可能性が考えられた。その理由としては、マウス・ラット等の初代培養は利便性が悪いこと、ヒト脂肪前駆細胞は購入できるが、脂肪細胞へ分化可能な継代培養数が限られていることや分化誘導してから実験に使用できるようになるまで長期間の時間を要することなどが考えられた。以上のことから、本研究ではヒトにおける生理作

用を調べるため、ヒト白色脂肪細胞を用いて検討を行った。その結果、3T3-L1 脂肪細胞では起こらないが、ヒト白色脂肪細胞では起こる現象を発見した。すなわち、インスリンによる脂肪細胞数の増加と脂肪細胞の肥大化に CIDE ファミリータンパク質が深く関与し、その発現制御メカニズムが細胞数の増加と細胞の肥大化で異なることを見出した。第 2 章ではインスリンによるアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用における CIDE ファミリーの役割を明らかにしたこと、第 3 章ではインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わるシグナル経路を同定したこと、第 4 章ではインスリン/JNK2 経路による脂肪滴サイズの増大に関与する新規遺伝子を同定したことについて報告する。

遺伝子名	組織分布	機能
CIDEA	マウス：褐色脂肪組織 ヒト：白色脂肪組織	●アポトーシス誘導 [1] DNA fragmentation factor DFF45と相同性があり、 アポトーシス誘導因子として発見された。
CIDEB	肝臓・腎臓	●脂肪滴形成 [2] 脂肪滴周囲に局在し、脂肪分解を抑制。
CIDEC (FSP27)	白色・褐色脂肪組織	●肥満・インスリン抵抗性に関与 [3] ノックアウトマウスは肥満・インスリン抵抗性になりにくい。 CIDEA、CIDECの遺伝的多型は肥満、脂肪萎縮症に関連。

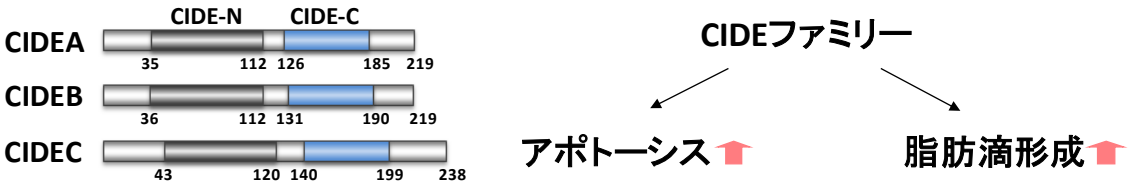

Fig. 3. CIDE ファミリータンパク質の特徴

第2章　ヒト白色脂肪細胞でのインスリンによるアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用における CIDE ファミリーの役割

１．実験方法

1-1. 材料

DMEM/F-12 (1:1, vol/vol)は Invitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。Human insulin は Novo Nordisk (Bagsværd, Denmark)から購入した。Rosiglitazone は Alexis Biochemicals (San Diego, CA) から購入した。3-Isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone (Dex), pantothenate 及び anti-β-actin antibody は Sigma (St. Louis, MO) から購入した。Biotin は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。FBS は Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel)から購入した。Mouse anti-human CIDEA monoclonal antibody 及び mouse anti-human CIDEC polyclonal antibody は Abnova Corporation (Taipei, Taiwan)から購入した。

1-2. ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化(Fig. 4)

インフォームド・コンセントの得られた 6 名の男性患者の皮下脂肪組織由来のヒト白色脂肪前駆細胞は Zen-Bio (Research Triangle Park, NC)から購入した。患者は非喫煙者であり、Body mass index の平均値は 27.2 (range 26.4 – 28.4)、年齢の平均値は 41 歳(range 29 – 57)であった。ヒト白色脂肪前駆細胞を 24-well plate に播種し、10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 及び 0.25 μg/ml amphotericin B 含有 DMEM/F-12 培地で、37°C、5% CO_2 で培養した。細胞をコンフルエントになるまで培養し、3% FBS, 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM Rosiglitazone, 100 nM insulin, 1 μM Dex, 33 μM biotin, 17 μM pantothenate, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 及び 0.25 μg/ml amphotericin B 含有

DMEM/F-12 からなる分化培地で 6 日間培養した。 次に、細胞を 3% FBS, 100 nM insulin, 1 μM Dex, 33 μM biotin, 17 μM pantothenate, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 0.25 μg/ml amphotericin B 含有 DMEM/F-12 からなる維持培地で 5 日間培養した。細胞を再度分化培地で 6 日間培養し、その後、維持培地で 2 日間培養した。これらの細胞を分化脂肪細胞としてすべての実験に使用した。培地は 3 日毎に新しい培地に交換した。

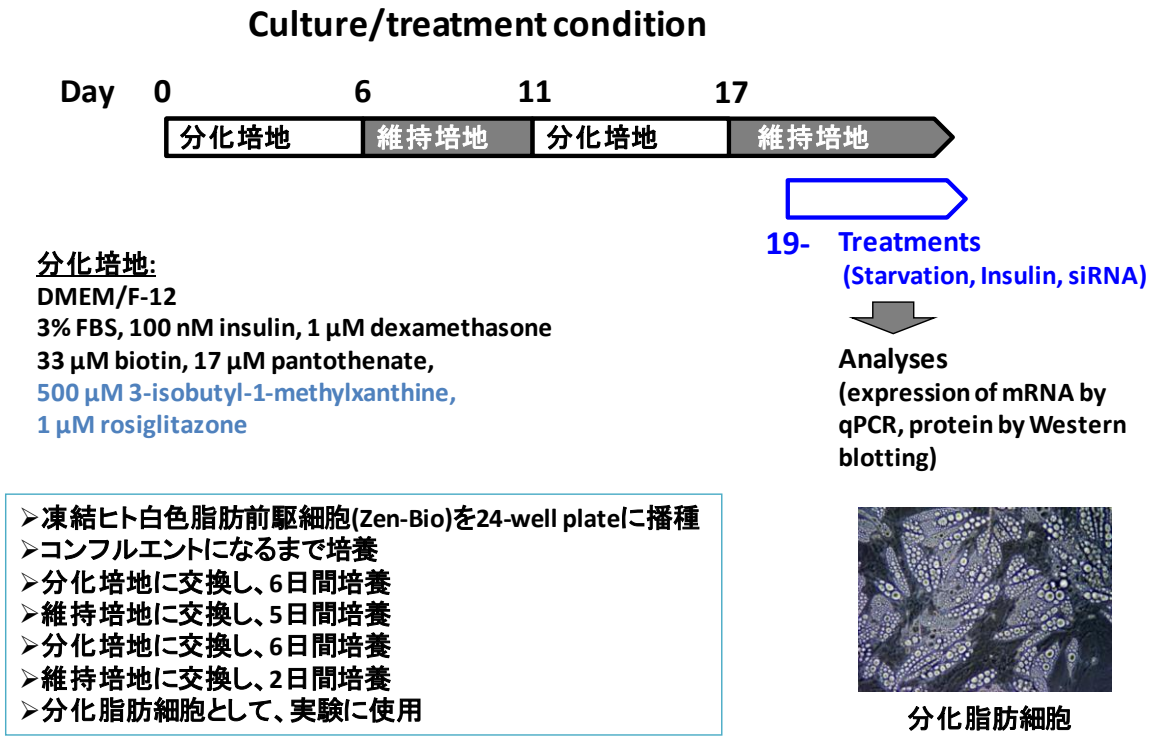

Fig. 4. ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化方法

1-3. リアルタイム定量 PCR

Total RNA の精製及び DNase 処理は RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。逆転写反応は Total RNA (100 – 200 ng)及び High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行った。定量 PCR は TaqMan gene expression assay system を用いて ABI 7500 Fast (Applied

Biosystems)で行った。各遺伝子の TaqMan gene expression assay system は以下に示すものを Applied Biosystems から購入した。CIDEA (Hs00154455_m1), CIDEB (Hs00205339_m1), CIDEC mRNA(Hs00535723_m1)及び 18S (Hs99999901_s1, 内部標準)。各遺伝子の mRNA 発現量は 18S rRNA 発現量で補正し、コントロールに対する相対比として表した。

1-4. ウエスタンブロット解析

Total cell lysates は 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50 mM sodium fluoride, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate 及び Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)含有 lysis buffer を用いて調製した。Cell lysates を 17,800 × *g*、10 分間、4°C で遠心し、上清を 12.5% SDS-polyacrylamide gels で電気泳動した後、Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA)へタンパク質をトランスファーした。Membrane は 5% BSA/5% skim milk 含有 TBS/0.05% Tween-20 で 1 時間ブロッキングし、CIDEA 或いはCIDECに特異的な抗体を用いてオーバーナイト、4°Cでインキュベートした。その後、Horseradish peroxidase anti-mouse secondary antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いて 1 時間インキュベートし、ECL detection reagents (GE Healthcare)を用いてタンパク質を可視化した。

1-5. siRNA 解析

分化脂肪細胞に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、各 10 nM の Control siRNA (12935-200; Invitrogen), CIDEA siRNA (HSS141577; Invitrogen)或いは CIDEC siRNA (HSS127223; Invitrogen)をトランスフェクトした。トランスフェクシ

ョンはアッセイまで 5 日間に 1 度行った。

1-6. アポトーシスの解析

脂肪前駆細胞をカバーガラス上で培養し、上述のように脂肪細胞へと分化させた。アッセイ後、細胞を 2% paraformaldehyde/PBS を用いて 20 分間、室温で固定した。その後、細胞を PBS で 1 回洗浄し、0.2% Triton X-100/0.1% sodium citrate を用いて 10 分間、on ice で浸透化を行った。浸透化ののち、細胞を Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) reaction mixture を用いて 60 分間、37°C でインキュベートした。次に、細胞を 1 回洗浄し、0.2 μg/ml of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma)及び 0.1 μg/ml Nile Red (Sigma)/PBS を用いて 5 分間、室温でインキュベートし、その後 3 回洗浄した。最後の洗浄ののち、細胞を Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL)を用いてスライドガラス上にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡(FV500-D; Olympus, Tokyo, Japan)で可視化した。顕微鏡写真は×20 の倍率で TUNEL は緑、DAPI は青、Nile Red は赤で取得し、ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/)を用いてマージさせた。アポトーシスを起こしている脂肪細胞を TUNEL/DAPI/Nile Red により 3 重染色し、その細胞数をカウントすることでアポトーシス細胞数を定量化した。全脂肪細胞数は下述のように定量化した。結果はランダムな 12 視野における 1000 脂肪細胞数中の TUNEL 陽性脂肪細胞数として表した。TUNEL assay は *in situ* cell death detection kit (Roche)を用いて行った。

1-7. 脂肪細胞数の解析

細胞を固定し、上述のように DAPI 及び Nile Red を用いて染色した。顕微鏡写真は×20 の倍率で取得した。脂肪細胞数は DAPI/Nile Red により染色され

た細胞数をカウントすることで定量化した。結果はランダムな 12 視野における平方ミリメーター中の脂肪細胞数として表した。

1-8. 脂肪滴サイズの解析

細胞を固定し、上述のように Nile Red を用いて染色した。顕微鏡写真は ×100 の倍率で取得した。Nile Red により染色された脂肪滴のサイズは ImageJ software を用いて定量化した。ランダムな 10 視野における 100 個の脂肪滴を解析した。

1-9. グリセロール放出量の解析

分化脂肪細胞を serum/Dex 不含の維持培地を用いて、インスリン存在下或いは非存在下で 24 時間インキュベートした。その後、培養培地を回収し、free glycerol reagent (Sigma)を用いて培地中のグリセロール含量を測定した。結果は細胞内タンパク質量で補正し、micrograms of glycerol per milligram of protein として表した。細胞内タンパク質量は bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL)を用いて定量化した。

1-10.統計解析

統計解析は Unpaired *t* test を実施した。棄却率 5%未満を有意とした。結果は 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で表した。

２．結果

2-1.　インスリンによる CIDE ファミリーの発現制御

CIDEファミリーがインスリン作用に寄与するかどうかを調べるため、はじめに、ヒト白色脂肪前駆細胞から分化させた脂肪細胞（以下、ヒト白色脂肪細胞）でインスリンによるCIDEA、CIDEB及びCIDECの発現変動が認められるか、リアルタイム定量PCR法で調べた。インスリンはCIDEA mRNAの発現を時間依存的且つ濃度依存的に低下させ、24時間及び100 nM以上で最大効果を示した(Fig. 5A, B, left panel)。100 nMインスリンの24時間処置はCIDEA mRNAの発現量を90%減少させた。これとは対照的に、インスリンはCIDEC mRNAの発現を時間依存的且つ濃度依存的に亢進させ、24時間及び100 nMで最大効果を示した(Fig. 5A, B, right panel)。100 nMインスリンの24時間処置はCIDEC mRNAの発現量を約2倍亢進させた。一方、インスリンはCIDEB mRNAの発現には影響を及ぼさなかった(Fig. 5A, B, middle panel)。

次に、インスリンによるmRNAの発現変動が認められたCIDEA及びCIDECのタンパク質発現をウエスタンブロット法により調べた。インスリンはCIDEAタンパク質の発現量を低下させ(Fig. 5C, left panel)、CIDECタンパク質の発現量を亢進させた(Fig. 5C, right panel)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞においてインスリンはCIDEAの発現を低下させ、CIDECの発現を亢進させることが明らかとなった。また、インスリンはCIDEBの発現には影響しないことが明らかとなった。

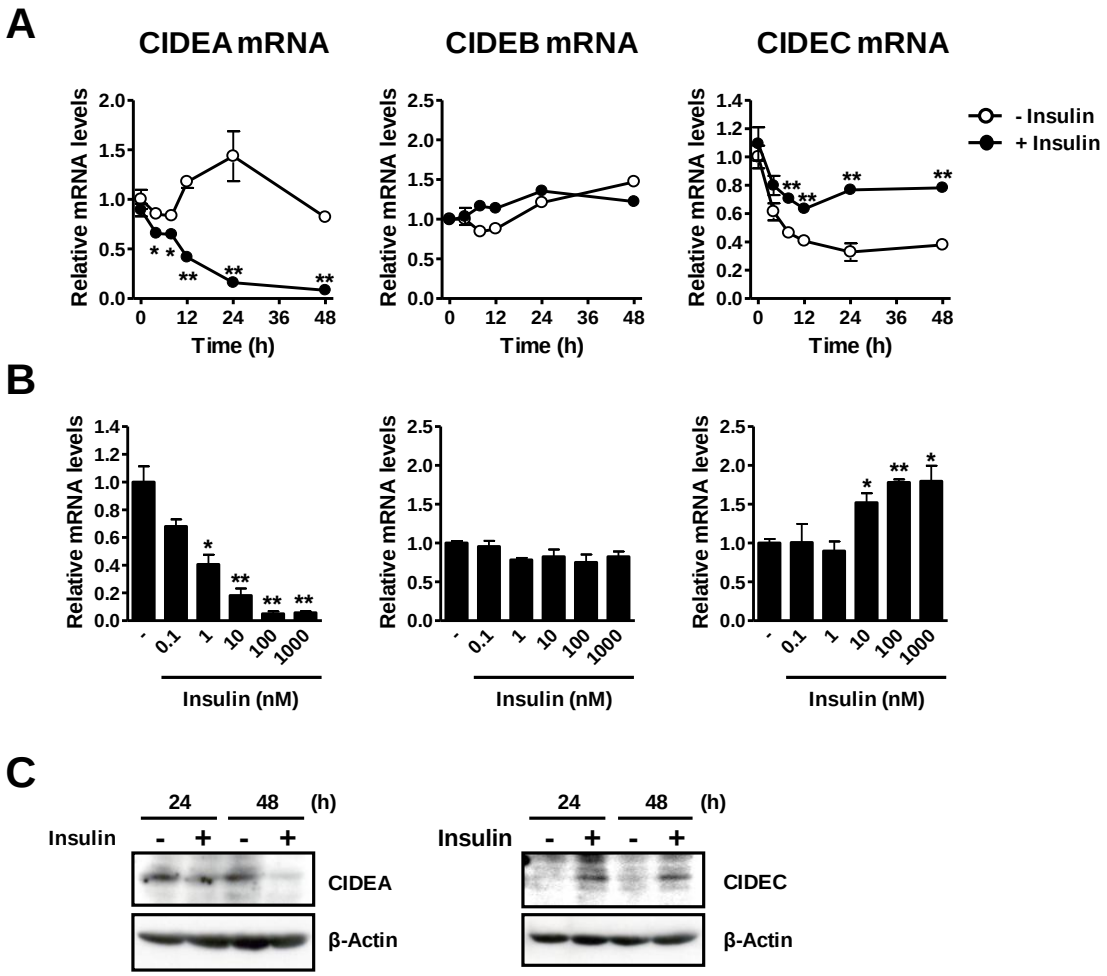

Fig. 5. Differential expression of CIDE family genes regulated by insulin in human adipocytes. A: Time course of insulin-regulated CIDE family gene expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 hours. Cells were then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for the indicated times. The mRNA expression levels of each gene were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and shown as mRNA levels relative to zero-time control without insulin. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. B: Concentration response effect of insulin on CIDE family gene expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 hours and then incubated in serum/Dex-free maintenance

medium in the presence or absence of insulin at the indicated concentrations for 24 hours. The mRNA expression levels of each gene were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and shown as relative mRNA levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. C: Western blotting analysis of CIDEA and CIDEC expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 hours. Cells were then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for the indicated times. β-Actin served as a loading control. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown.

2-2. インスリンのアポトーシス抑制作用に対する CIDE ファミリーの関与

次に、ヒト白色脂肪細胞においてインスリンが無血清培養によるアポトーシスを抑制するかどうかを調べた。脂肪細胞のアポトーシスは TUNEL/DAPI/Nile red の三重染色法により解析した。48 時間の無血清培養を行ったところ、Nile-red で脂肪滴が染色された脂肪細胞の核クロマチン凝縮及び断片化が DAPI 及び TUNEL 染色により観察された(Fig. 6A)。72 時間の無血清培養では、脂肪細胞の数は 18.0% ± 7.7%減少し、6.6% ± 0.6%の脂肪細胞が TUNEL 陽性であった(Fig. 6B)。インスリンは無血清培養により増加した TUNEL 陽性の脂肪細胞の数を有意に減少させた(Fig. 6B)。通常培養においては、DAPI により染色された細胞核の形態は正常であり、TUNEL 陽性の脂肪細胞の数はごく僅かであった(data not shown)。以上の結果から、インスリンは無血清培養による脂肪細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

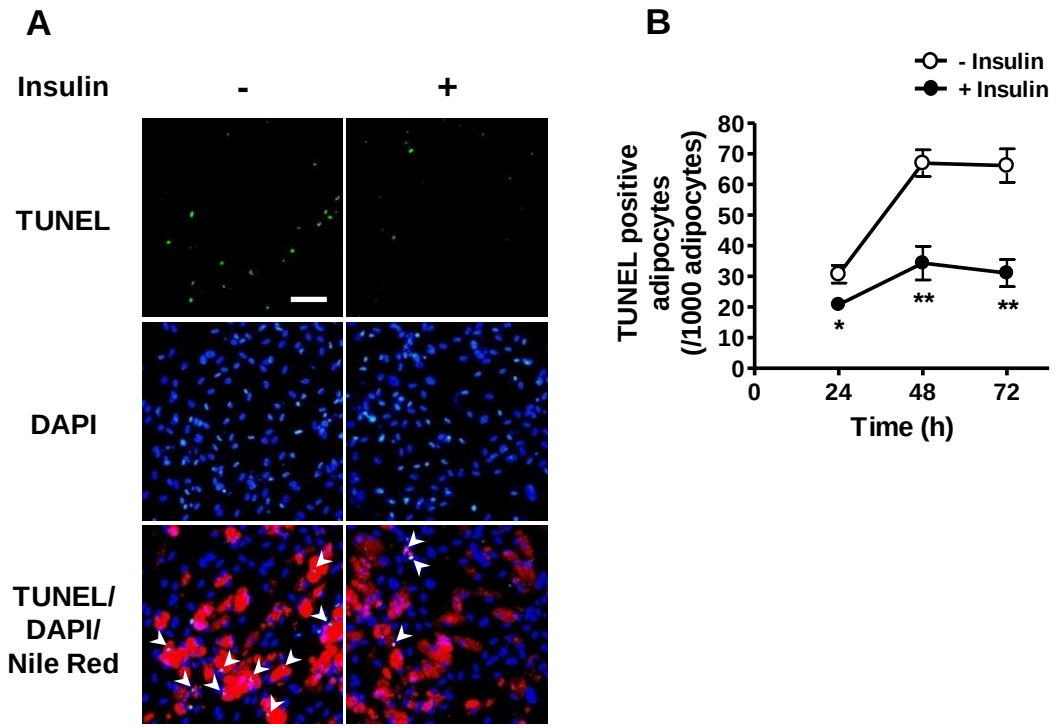

Fig. 6. Insulin inhibits starvation-induced apoptosis in human adipocytes. A: Fluorescence microscopy of adipocytes stained with TUNEL, DAPI, and Nile Red. Differentiated adipocytes were incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 48 hours. Cells were triple-stained with TUNEL (green), DAPI (blue), and Nile Red (red). TUNEL-positive adipocytes are indicated by the arrowheads. Scale bar, 100 μm. B: Quantification of TUNEL-positive adipocytes. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for the indicated times. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

次に、インスリンによる発現変動が認められた CIDEA 及び CIDEC がインスリンのアポトーシス抑制作用に関与するかどうか、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法で調べた。インスリンは無血清培養による脂肪細胞のアポトーシスを抑制し、このとき CIDEA 発現量の低下を認めた(Fig. 7A, B)。CIDEA siRNA (siCIDEA)

を添加した脂肪細胞ではインスリンと同程度に無血清培養によるアポトーシスを抑制していたが、CIDEC siRNA (siCIDEC)添加では無影響であった(Fig. 7A)。また、siCIDEA を添加したヒト白色脂肪細胞ではインスリンによる相加的なアポトーシス抑制作用は認められなかった。siCIDEA 及び siCIDEC により、CIDEA 及び CIDEC mRNA の発現量はそれぞれ特異的にノックダウンされた(Fig. 7B)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞において、CIDEC ではなく CIDEA が無血清培養によるアポトーシスの重要なファクターであり、インスリンによるアポトーシス抑制作用には CIDEA の発現低下が寄与することが示唆された。

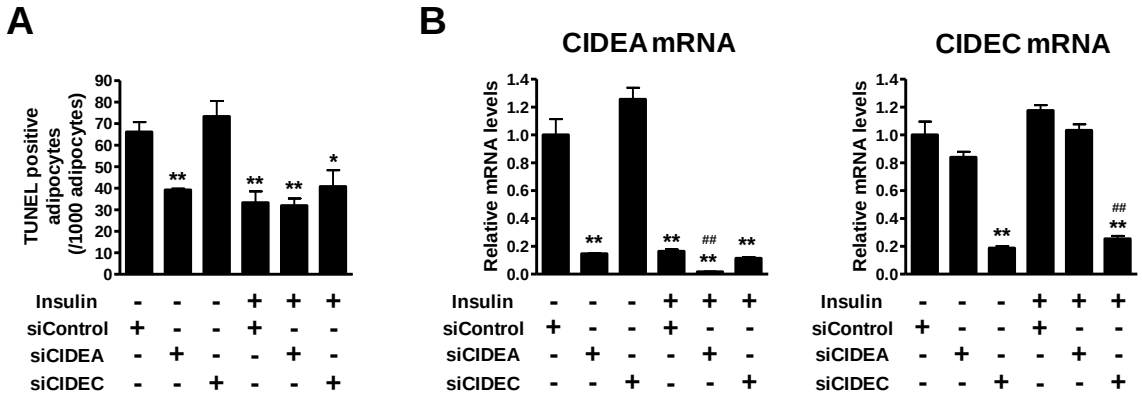

Fig. 7. Suppression of CIDEA expression inhibits starvation-induced apoptosis in human adipocytes. A: Quantification of TUNEL-positive adipocytes. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), CIDEA siRNA (siCIDEA), or CIDEC siRNA (siCIDEC) in maintenance medium for 7 days. Cells were then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 48 hours and analyzed for apoptosis. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. B: Expression analysis of CIDEA and CIDEC mRNA by real-time PCR. The mRNA expression levels of each gene were normalized relative to 18S rRNA expression and shown relative to siControl without

insulin. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs*. siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs*. siControl with insulin.

さらに、CIDEA 及び CIDEC が脂肪細胞の数に影響するかどうか、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法で調べた。インスリンを欠乏させた条件で培養した群と比較して、インスリンは脂肪細胞の数を有意に増加させ、このとき CIDEA 発現量の低下を認めた(Fig. 8A, B, C)。実験は脂肪細胞の分化誘導後から行っていることから、インスリンは脂肪細胞の細胞死を抑制することで細胞数を維持していることが示唆された。これらの培養条件において脂肪前駆細胞の数は変化しなかったことから(data not shown)、インスリンの欠乏は脂肪前駆細胞の細胞死には影響しないことが示唆された。siCIDEA を添加した脂肪細胞ではインスリンと同程度にインスリン欠乏による脂肪細胞数の減少を回復させたが、siCIDEC 添加では無影響であった(Fig. 8A, B)。siCIDEA 及び siCIDEC により、CIDEA 及び CIDEC mRNA の発現量はそれぞれ特異的にノックダウンされた(Fig. 8C)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞において、インスリン及び CIDEA は脂肪細胞の数の維持に重要なファクターであり、インスリンによる脂肪細胞の数の維持には CIDEA の発現低下が寄与することが示唆された。

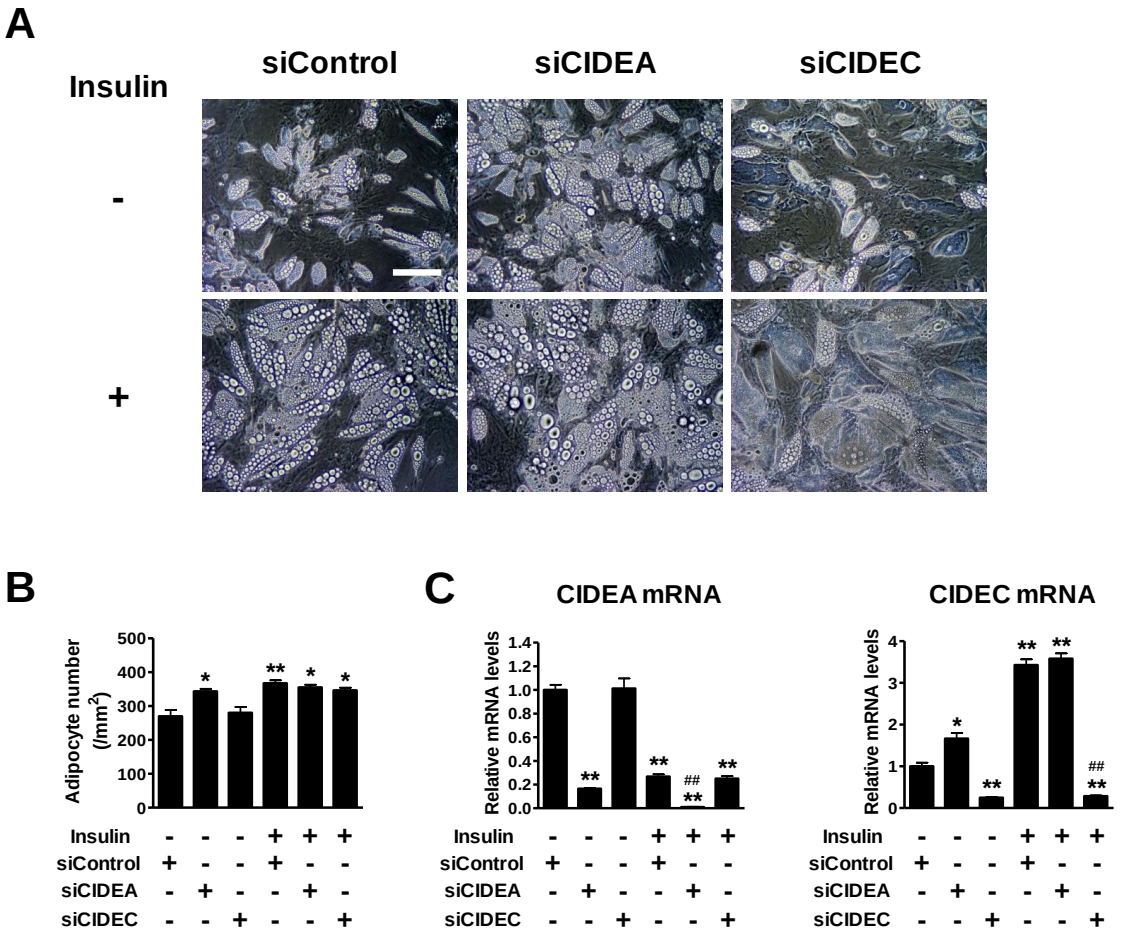

Fig. 8. Suppression of CIDEA expression restores insulin deprivation-reduced adipocyte number. A: Phase contrast microscopy of adipocytes. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), CIDEA siRNA (siCIDEA), or CIDEC siRNA (siCIDEC) in the maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 15 days. Scale bar, 100 μm. B: Quantification of adipocyte number. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. C: Expression analysis of CIDEA and CIDEC mRNA by real-time PCR. The mRNA expression levels of each gene were normalized relative to 18S rRNA expression and shown relative to siControl without insulin. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ *vs*. siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs*. siControl with insulin.

2-3. インスリンの脂肪滴形成作用に対する CIDE ファミリーの関与

次に、インスリンによる発現変動が認められた CIDEA 及び CIDEC がインスリンの脂肪滴形成作用に関与するかどうか、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法で調べた。インスリンは脂肪滴サイズを著明に増加させた(Fig. 9A, B)。インスリンよる脂肪滴サイズの増大は siCIDEC により劇的に抑制されたが、siCIDEA では無影響であった(Fig. 9A, B)。インスリンは脂肪分解の指標であるグリセロール放出量には影響しなかった(Fig. 9C)。siCIDEA はグリセロール放出量に影響しなかったが、siCIDEC はグリセロール放出量を有意に増加させた。siCIDEA 及び siCIDEC により、CIDEA 及び CIDEC mRNA の発現量はそれぞれ特異的にノックダウンされた(Fig. 9D)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞において、CIDEA ではなく CIDEC が脂肪滴形成に重要なファクターであり、インスリンによる脂肪滴形成作用には CIDEC の発現亢進が関与することが示唆された。

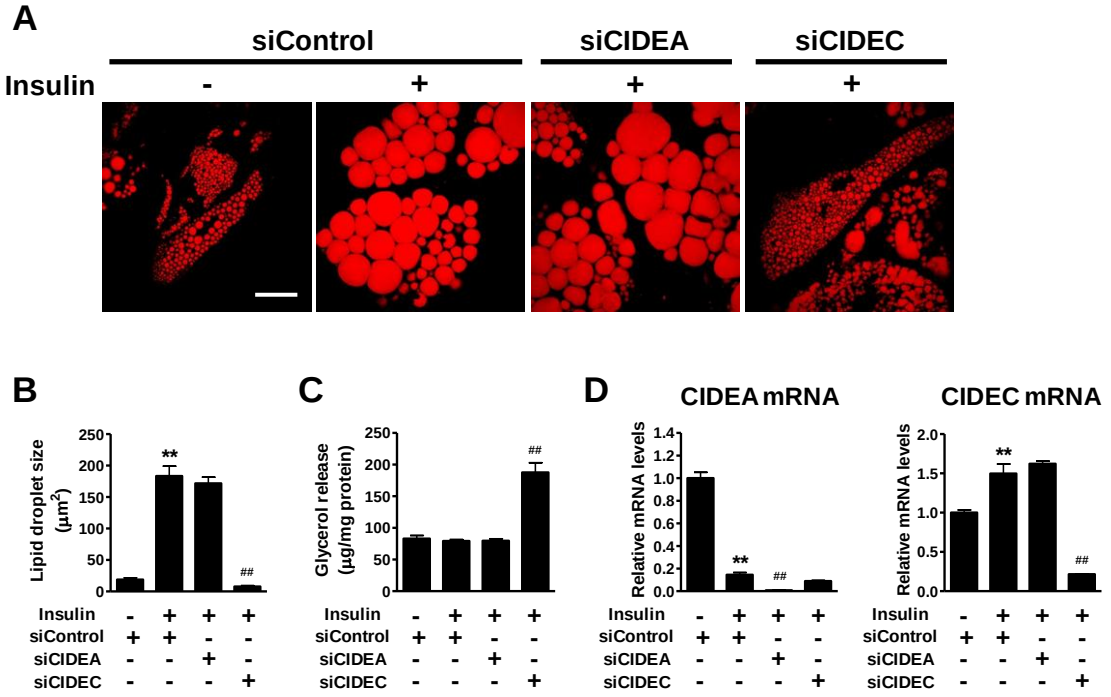

Fig. 9. Suppression of CIDEC expression inhibits insulin-induced enlargement of lipid droplets and increases glycerol release in human adipocytes. A: Fluorescence microscopy

of adipocytes stained with Nile Red. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), CIDEA siRNA (siCIDEA), or CIDEC siRNA (siCIDEC) in maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 10 days and then stained with Nile Red (red). Scale bar, 30 μm. B: Quantification of lipid droplet size. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs*. siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs*. siControl with insulin. C: Lipolysis assay. Glycerol released into the medium over 24 hours was measured after siRNA-mediated depletion of CIDEA and CIDEC. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ##, $P < 0.01$ *vs*. siControl with insulin. D: Expression analysis of CIDEA and CIDEC mRNA by real-time PCR. The mRNA expression levels of each gene were normalized relative to 18S rRNA expression and shown relative to siControl without insulin. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs*. siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ vs. siControl with insulin.

３．考察

本章では、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによるCIDEファミリーの発現制御を解析し、インスリンがCIDEAの発現を低下させ、CIDECの発現を亢進させることを明らかにした(Fig. 5)。一方、インスリンはCIDEBの発現には影響しないことを明らかにした。ヒト白色脂肪細胞において、それぞれのCIDEファミリータンパク質がインスリンにより別々に制御されていることを示した報告は今回が初めてである。インスリンは脂肪細胞分化の代表的なマーカー遺伝子であるadipocyte fatty acid binding protein (aP2)及びperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ mRNAの発現には影響しなかった(data not shown)。aP2はPPAR γの制御下遺伝子でもある。これらの結果から、CIDEA及びCIDECの発現に対して観察されたインスリンの作用は、インスリンが脂肪細胞分化やPPAR γの直接的な転写活性化に影響した結果として引き起こされたものではないと推察される。最近、インスリンはウシ乳腺上皮細胞においてCIDEAの発現を低下させること(19)、マウス3T3-L1脂肪細胞においてCIDECの発現を亢進させることが報告されている(12)。ヒト白色脂肪細胞における本章の発見は、これらの報告からも支持される。また、ヒトではCIDEA及びCIDECは主に白色脂肪組織において高発現しているが(32, 35, 36)、CIDEBは主に肝臓に高発現していることが報告されている(25, 34)。従って、ヒト白色脂肪細胞においてはCIDEBではなく、CIDEA及びCIDECが重要な役割を担っていることが予想される。CIDEA及びCIDECはアポトーシスの誘導因子であり(25, 26)、脂肪滴形成にも関与することが報告されている(30, 35, 37)。CIDEAは様々な状況下で小胞体(20)、核(21)、ミトコンドリア(7)或いは脂肪滴周囲(22)に局在する一方、CIDECは脂肪滴周囲に局在することが報告されている(35, 37)。CIDEA及びCIDECの細胞内局在に関する研究は、これらタンパク質のアポトーシスや脂肪滴形成などの機能を予測する上で重要で

あると考えられる。しかしながら、CIDEタンパク質の局在性は現在のところ不明な点が多く、その解明にはさらなる研究が必要である。

CIDEファミリータンパク質はいずれもアポトーシス及び脂肪滴形成を誘導することから、インスリンのアポトーシス抑制にはCIDEAの発現低下が、脂肪滴形成にはCIDECの発現亢進が関与する可能性が考えられた。そこで、インスリンのアポトーシス抑制作用にCIDEAの発現低下が寄与するかどうかを調べるため、インスリンの代わりにsiRNAを用いてCIDEA発現抑制を模倣したところ、siRNAによるCIDEA発現抑制はインスリンと同様に脂肪細胞のアポトーシスを抑制し(Fig. 7)、インスリン欠乏による脂肪細胞数の減少を回復させた(Fig. 8)。また、インスリンは、CIDEA siRNAと併用した場合でもアポトーシス及び脂肪細胞数に対して相加的な作用を認めなかったことから、インスリン及びCIDEAは同一経路で作用していることが示唆された。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによるアポトーシス抑制作用は、CIDEAの発現低下が関与することが示唆された。これとは対照的に、siRNAによるCIDEC発現抑制はインスリンの有無によらずアポトーシスに影響しなかった。CIDECの過剰発現は3T3-L1脂肪細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが(26)、インスリンによるCIDECの中程度の発現亢進はアポトーシスに関与しないのかもしれない。

一方、インスリンの脂肪滴形成にCIDECの発現亢進が寄与するかどうかをsiRNAによるノックダウン法により調べたところ、siRNAによるCIDEC発現抑制はインスリンによる脂肪滴サイズの増大を著明に抑制し、脂肪分解を亢進させた(Fig. 9)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる脂肪滴形成作用は、CIDECの発現亢進が関与することが示唆された。これらの結果は、3T3-L1脂肪細胞において、CIDEC発現抑制が脂肪分解を亢進させ、脂肪滴サイズを減少させるという報告とも一致している(11, 23)。これとは対照的に、CIDEA発現抑制は脂肪

分解及び脂肪滴サイズに影響しなかった。CIDEA過剰発現は3T3-L1脂肪前駆細胞の脂肪滴形成を亢進させること(11, 24)、CIDEA発現抑制はヒト白色脂肪前駆細胞の脂肪分解を亢進させることが報告されている(25)。既報と異なる現象が観察された要因の1つとして、脂肪前駆細胞と分化脂肪細胞との違いが考えられる。分化脂肪細胞は大きな脂肪滴を有しており、脂肪分解の基礎レベルが脂肪前駆細胞よりも大きいことが推察される。それ故に、分化脂肪細胞では脂肪分解のバックグラウンドが高いために、脂肪分解の微量な変化が観察されなかった可能性が考えられる。結果的に、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによるCIDEAの発現低下は、脂肪滴形成に深く寄与しないことが示唆された。

インスリンは一般に生存促進性のホルモンとして知られており(26)、マウス及びラット脂肪細胞においてアポトーシスを抑制することが報告されている(27, 28)。本章では、ヒト白色脂肪細胞においても、インスリンがアポトーシスを抑制することを初めて明らかにした(Fig. 6)。インスリンは脂肪細胞の分化(11, 12)、脂肪蓄積及び脂肪滴形成を亢進させるホルモンである(29, 30)。脂肪組織特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの報告では、脂肪細胞におけるインスリンシグナルは肥満の進展に重要であることが示されている(31)。故に、脂肪細胞におけるインスリンのアポトーシス抑制作用及び脂肪滴サイズの増大作用は、脂肪組織量の増大に寄与することが推察される。従って、インスリンによる CIDEA の発現低下及び CIDEC の発現亢進は、脂肪細胞のアポトーシス抑制及び脂肪滴形成にそれぞれ選択的に関与し、その結果、脂肪組織量の増大を引き起こすことが推測される(Fig. 10)。

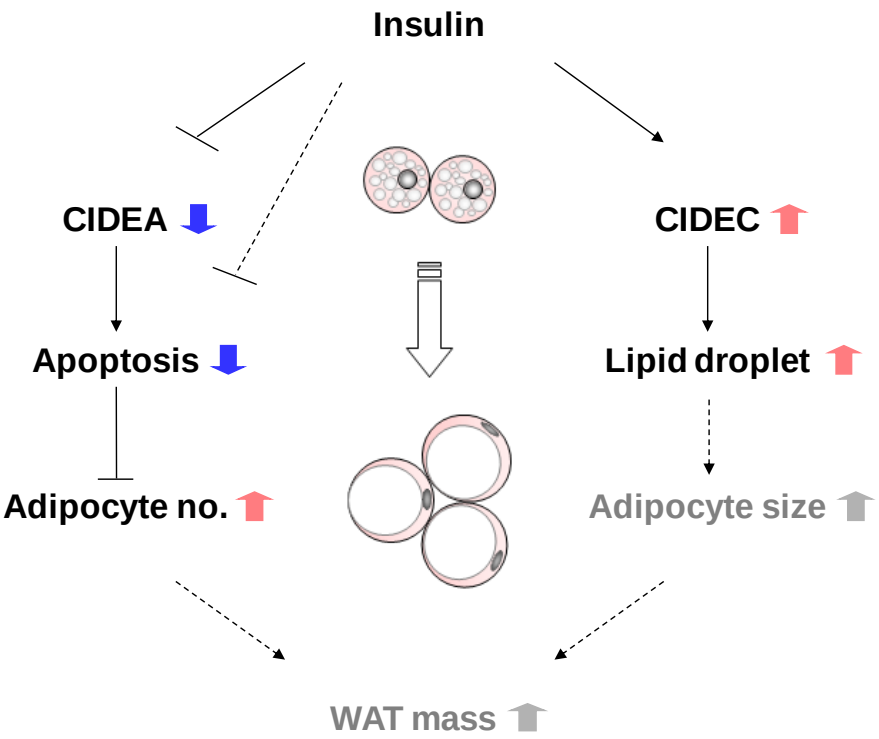

Fig. 10. Schematic diagram of insulin action in human adipocytes. Insulin suppresses apoptosis, at least in part, through downregulation of CIDEA mRNA expression, but increases lipid droplet formation through upregulation of CIDEC mRNA expression. Chronic insulin action would increase adipocyte number and size through gene regulation of CIDEA and CIDEC, and increase the mass of WAT in humans. WAT, white adipose tissue.

４．小括

１）ヒト白色脂肪細胞において、インスリンは CIDEA の発現を低下させ、CIDEC の発現を亢進させる。一方、CIDEB の発現には影響しない。

２）インスリンのアポトーシス抑制作用には CIDEA の発現低下が、脂肪滴形成作用には CIDEC の発現亢進がそれぞれ選択的に関与する。

第3章　インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わる経路の探索

前章では、インスリンが CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わり、その発現制御がインスリンのアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用にそれぞれ選択的に関与することを明らかにした(32)。本章では、インスリンの主要なシグナル伝達経路に関わるキナーゼである Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt 及び mitogen-activated protein kinase (MAPK)の阻害剤又は siRNA を用いて、ヒト白色脂肪細胞でのインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わる経路を探索した。

１．実験方法

1-1. 材料

DMEM/F-12 (1:1, vol/vol)は Invitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。Human insulin は Novo Nordisk (Bagsværd, Denmark)から購入した。Rosiglitazone は Alexis Biochemicals (San Diego, CA)から購入した。3-Isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone (Dex), pantothenate 及び anti-β-actin antibody は Sigma (St. Louis, MO)から購入した。Biotin は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。FBS は Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel)から購入した。Wortmannin, PI-103, API-2, U0126, SP600125 及び SB203580 は Calbiochem (San Diego, CA)から購入した。Mouse anti-human CIDEA monoclonal antibody (H00001149-M01)及び mouse anti-human CIDEC polyclonal antibody (H00063924-B01P) は Abnova Corporation (Taipei, Taiwan)から購入した。Anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-Akt (Thr308), anti-c-Jun N-terminal kinase (JNK), anti-phospho-JNK 及び

anti-phospho-c-Jun antibodies は Cell Signaling Technology (Beverly, MA)から購入した。

1-2. ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化(Fig. 4)

ヒト脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は上述(第 2 章、1-2)のように行った。

1-3. リアルタイム定量 PCR

リアルタイム定量 PCR は上述(第 2 章、1-3)のように行った。各遺伝子の TaqMan gene expression assay system は以下に示すものを Applied Biosystems から購入した。CIDEA (Hs00154455_m1), CIDEC (Hs00535723_m1), Akt1 (Hs00178289_m1), Akt2 (Hs00609846_m1), Akt3 (Hs00178533_m1), JNK1 (Hs00177083), JNK2 mRNA (Hs00177102_m1)及び 18S rRNA (Hs99999901_s1)。

1-4. siRNA 解析

siRNA 解析は上述(第 2 章、1-5)のように行った。分化脂肪細胞に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、各 10 nM の Control siRNA (12935-110; Invitrogen), Akt1 siRNA (12935-001 Duplex1; Invitrogen), Akt2 siRNA (12937-40 Duplex2; Invitrogen), Akt3 siRNA (HSS115177; Invitrogen), JNK1 siRNA (12936-42 Duplex1; Invitrogen)或いは JNK2 siRNA (12936-44 Duplex1; Invitrogen)をトランスフェクトした。トランスフェクションはアッセイまで 5 日間に 1 度行った。

1-5. ウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析は上述(第 2 章、1-4)のように行った。細胞可溶化液の上清を 10% – 15% SDS-polyacrylamide gels で電気泳動した後、Immobilon-P

membrane (Millipore Corporation)へタンパク質をトランスファーした。Membrane は5% BSA 含有 TBS/0.05% Tween-20 で1時間ブロッキングし、CIDEA, CIDEC, Akt, phospho-Akt (Ser473), phospho-Akt (Thr308), JNK 及び phospho-JNK に特異的な抗体を用いてオーバーナイト、4°C でインキュベートした。その後、Horseradish peroxidase anti-mouse secondary antibody 或いは Horseradish peroxidase anti-rabbit secondary antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いて 1 時間インキュベートし、ECL detection reagents (GE Healthcare)を用いてタンパク質を可視化した。

1-6. アポトーシスの解析

アポトーシスの解析は上述(第 2 章、1-6)のように行った。細胞のマウントは ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)を用いて行い、細胞の可視化は共焦点レーザー顕微鏡(LSM 700; Carl Zeiss, Jena, Germany)を用いて行った。

1-7. 脂肪滴サイズの解析

脂肪滴サイズの解析は上述(第 2 章、1-7)のように行った。顕微鏡写真は×63 の倍率で取得した。

1-8. 統計解析

統計解析は Unpaired *t* test を実施した。棄却率 5%未満を有意とした。結果は 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で表した。

２．結果

2-1. インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に対する PI3K の関与

インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御が PI3K を介するかどうか、PI3K の阻害剤である Wortmannin 及び PI-103 を用いて調べた。Wortmannin 及び PI-103 はインスリンによる CIDEA の発現低下及び CIDEC の発現亢進の双方を濃度依存的に抑制した(Fig. 11A, B)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御は PI3K を介することが明らかとなった。

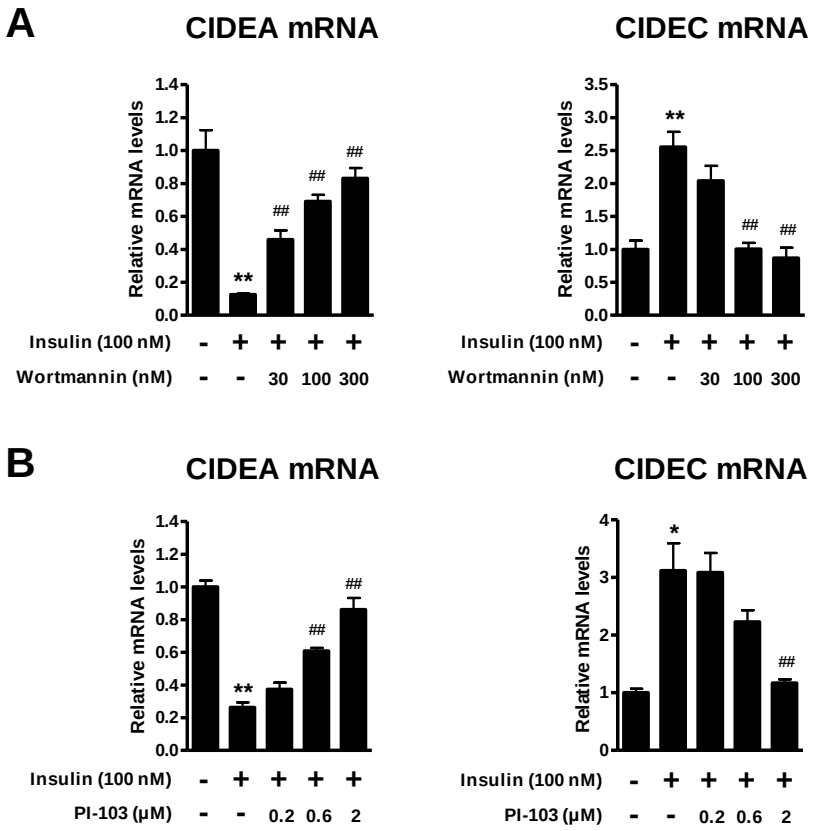

Fig. 11. PI3K inhibitors block the regulation of both CIDEA and CIDEC expression by insulin. A and B: Concentration – response effect of PI3K inhibitors on CIDEA and

CIDEC mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with wortmannin or PI-103 at the indicated concentrations for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of CIDEA and CIDEC were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and are shown as relative mRNA levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ *vs.* control without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* control with insulin.

2-2. インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に対する Akt 及び JNK の選択的な関与

次に、インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に Akt 及び MAPK 経路が寄与するかどうか、Akt1、Akt2 及び Akt3 の阻害剤である API-2 (33)、MAPK/Extracellular signal-regulated kinase (ERK)阻害剤である U0126、c-Jun N-terminal kinase (JNK)阻害剤である SP600125 或いは p38 阻害剤である SB203580 を用いて調べた。API-2 はインスリンによる CIDEA の発現低下を濃度依存的に抑制したが、CIDEC の発現亢進には影響しなかった(Fig. 12A)。各種 MAPK 阻害剤はインスリンによる CIDEA の発現低下には影響しなかったが、SP600125 はインスリンによる CIDEC 発現亢進を抑制した(Fig. 12B)。U0126 及び SB203580 は CIDEC の発現に影響しなかった。また、SP600125 はインスリンによる CIDEC 発現亢進を濃度依存的に抑制した(Fig. 12C)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御は、それぞれ Akt 及び JNK を選択的に介することが明らかとなった。

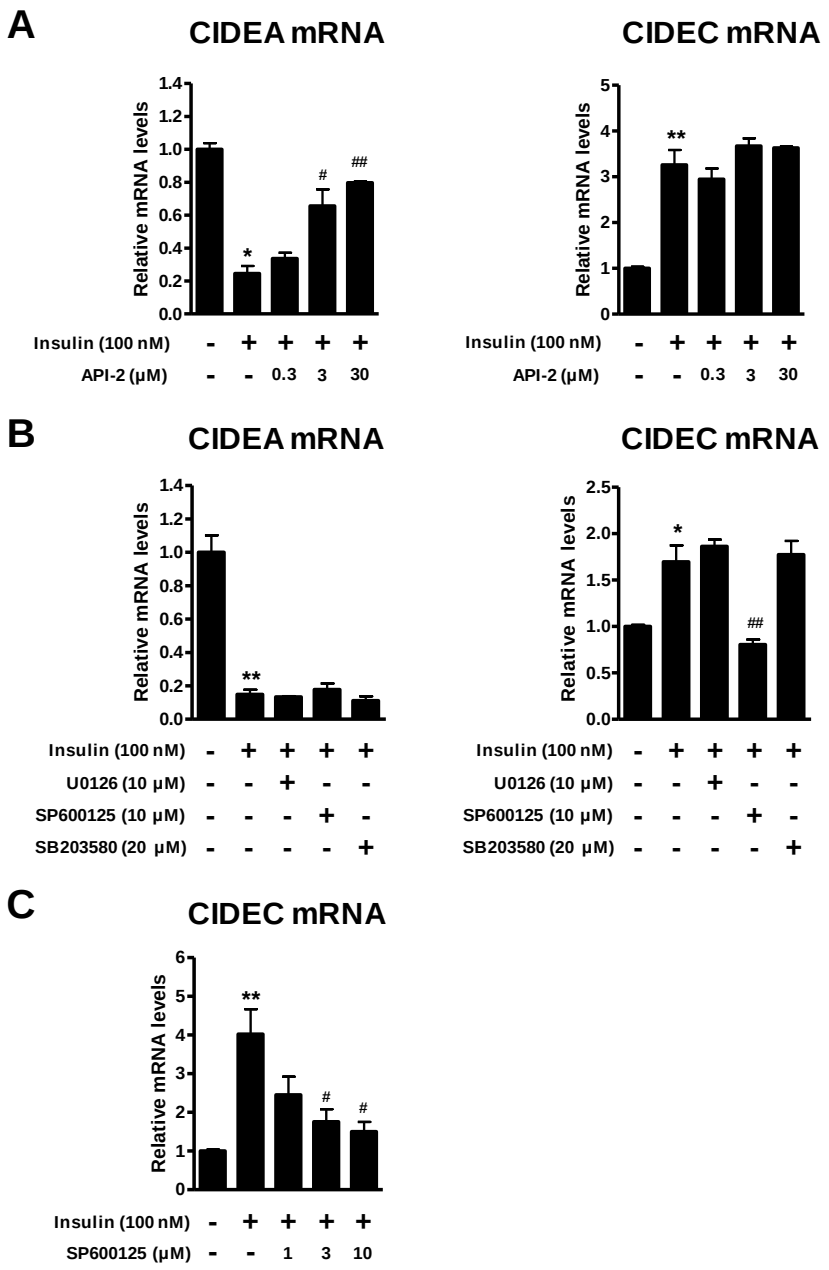

Fig. 12. The Akt inhibitor API-2 and the JNK inhibitor SP600125 selectively block regulation of CIDEA and CIDEC expression by insulin, respectively. A: Concentration – response effect of the Akt inhibitor on CIDEA and CIDEC mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with API-2 at the indicated concentrations for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. B: Effects of the MAPK inhibitors on CIDEA and CIDEC mRNA expression. Differentiated adipocytes

were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with 10 μM U0126, 10 μM SP600125, or 20 μM SB203580 for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. C: Concentration – response effect of the JNK inhibitor on CIDEC mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with SP600125 at the indicated concentrations for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of CIDEA and CIDEC were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and are shown as relative mRNA levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ *vs.* control without insulin; #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$ *vs.* control with insulin.

2-3. インスリンによる CIDEA の発現制御及びアポトーシス抑制作用に対する Akt1/2 の関与

インスリンによる CIDEA の発現制御に対する Akt の特異的な関与をより詳細に検証するため、Akt1 siRNA (siAkt)、Akt2 siRNA (siAkt2)及び Akt3 siRNA (siAkt3)を用いた検証を行った。siAkt1、siAkt2 或いは siAkt3 の単一処置はインスリンによる CIDEA の発現低下に影響しなかった(Fig. 13A)。これとは対照的に、siAkt1/2 の併用処置はインスリンによる CIDEA の発現低下を 61%回復させた(Fig. 13B)。siAkt1/3 或いは siAkt2/3 は CIDEA の発現に影響しなかった。各 siRNA は Akt1、Akt2 及び Akt3 mRNA の発現量をそれぞれ特異的にノックダウンさせた(Fig. 13C)。さらに、siAkt1/2 はインスリンによる CIDEA タンパク質の発現低下を抑制した(Fig. 9D, E)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEA の発現低下は Akt1/2 を介することが明らかとなった。

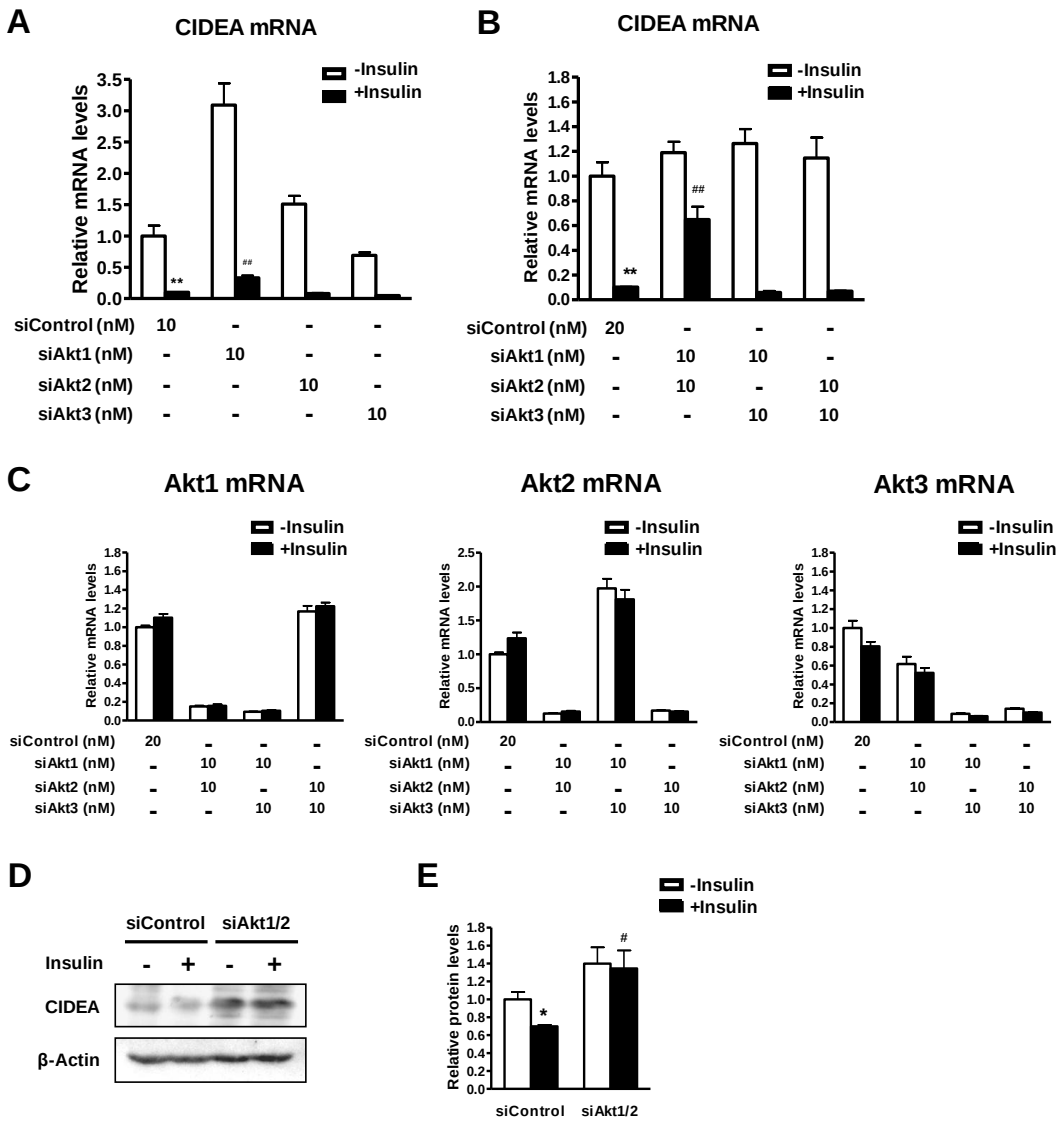

Fig. 13. Depletion of both Akt1 and Akt2 enhances insulin-reduced CIDEA expression. A – C: Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), Akt1 siRNA (siAkt1), Akt2 siRNA (siAkt2), and/or Akt3 siRNA (siAkt3) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of CIDEA (A and B), Akt1, Akt2, and Akt3 (C) were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and are shown as relative mRNA levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin. D: Western

blot analysis of CIDEA protein expression. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA or Akt1/2 siRNA in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 48 h. β-Actin served as a loading control. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown. E: Quantification of protein expression levels of CIDEA. The protein expression levels of CIDEA were normalized relative to β-Actin protein expression and are shown as relative protein levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; #, $P < 0.01$ *vs.* 10 nM siControl with insulin.

第 2 章でインスリンのアポトーシス抑制作用に CIDEA の発現低下が関与することが明らかとなったことから(32)、次に、インスリンのアポトーシス抑制作用に対する Akt の寄与を調べた。siAkt1/2 はインスリンによるアポトーシスの抑制を解除した(Fig. 14A, B)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによるアポトーシス抑制作用は Akt1/2 を介することが明らかとなった。

2-4. インスリンによる CIDEC の発現制御及び脂肪滴形成作用に対する JNK2 の関与

インスリンによる CIDEC の発現制御に対する JNK の特異的な関与をより詳細に検証するため、JNK1 siRNA (siJNK1)及び JNK2 siRNA (siJNK2)を用いた検証を行った。JNK3 は中枢特異的に発現しているため(34)、検討は行わなかった。siJNK1 は CIDEC の発現には影響しなかったが、siJNK2 及び siJNK1/2 はインスリンによる CIDEC の発現亢進を抑制した(Fig. 15A)。各 siRNA は JNK1 及び JNK2 の発現

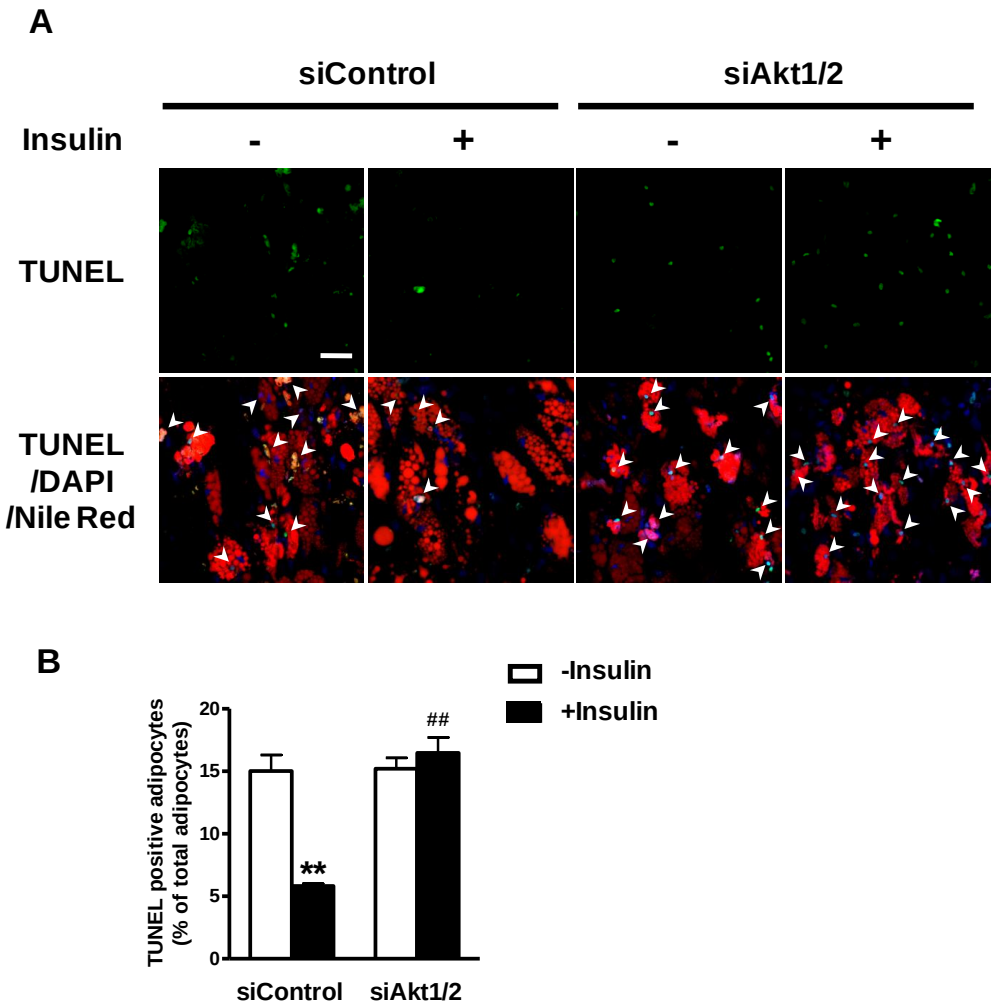

Fig. 14. Depletion of both Akt1 and Akt2 restores insulin-reduced apoptosis. A: Fluorescence microscopy of adipocytes stained with TUNEL, DAPI, and Nile Red. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl) or Akt1/2 siRNA (siAkt1/2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 48 h. Cells were triple-stained with TUNEL (green), DAPI (blue), and Nile Red (red). TUNEL-positive adipocytes are indicated by the arrowheads. Scale bar, 50 μm. B: Quantification of TUNEL-positive adipocytes. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin.

量をそれぞれ特異的にノックダウンさせた(Fig. 15B)。さらに、siJNK2 はインスリンによる CIDEC タンパク質の発現亢進を抑制した(Fig. 15C, D)。

第 2 章でインスリンの脂肪滴形成作用に CIDEC の発現亢進が関与することが明らかとなったことから(32)、次に、インスリンの脂肪滴形成作用に対する JNK の寄与を調べた。siJNK2 はインスリンによる脂肪滴の肥大化を著明に抑制したが、siJNK1 は無影響であった(Fig. 16A, B)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEC の発現亢進及び脂肪滴形成作用は、JNK1 ではなく JNK2 を介することが明らかとなった。

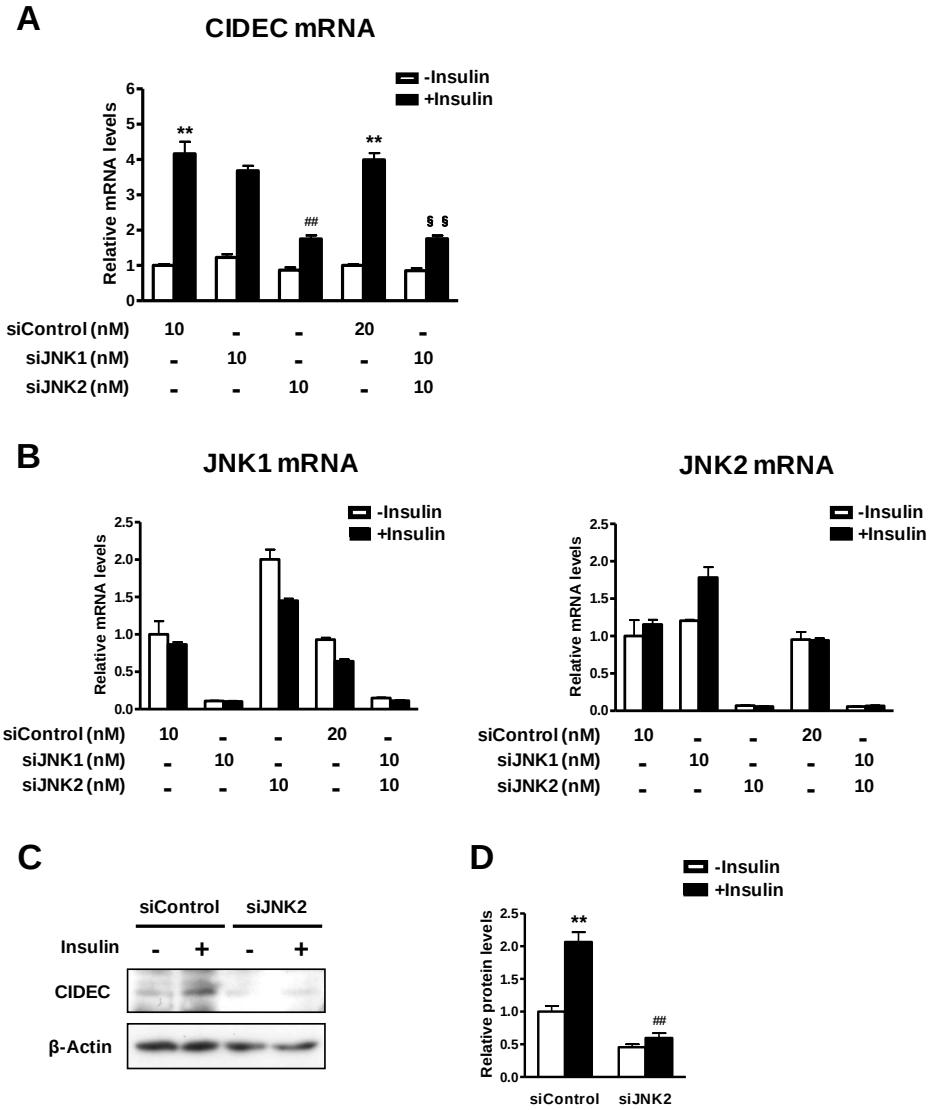

Fig. 15. Depletion of JNK2, but not JNK1, attenuates insulin-induced CIDEC expression.

A and B: Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), JNK1 siRNA (siJNK1), and/or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of CIDEC (A), JNK1, and JNK2 (B) were measured by quantitative real-time PCR, normalized relative to 18S rRNA expression, and are shown as relative mRNA levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* 10 nM siControl with insulin; §§, $P < 0.01$ *vs.* 20 nM siControl with insulin. C: Western blot analysis of CIDEC protein expression. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA or JNK2 siRNA in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 48 h. β-Actin served as a loading control. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown. D: Quantification of protein expression levels of CIDEC. The protein expression levels of CIDEC were normalized relative to β-Actin protein expression and are shown as relative protein levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* 10 nM siControl with insulin.

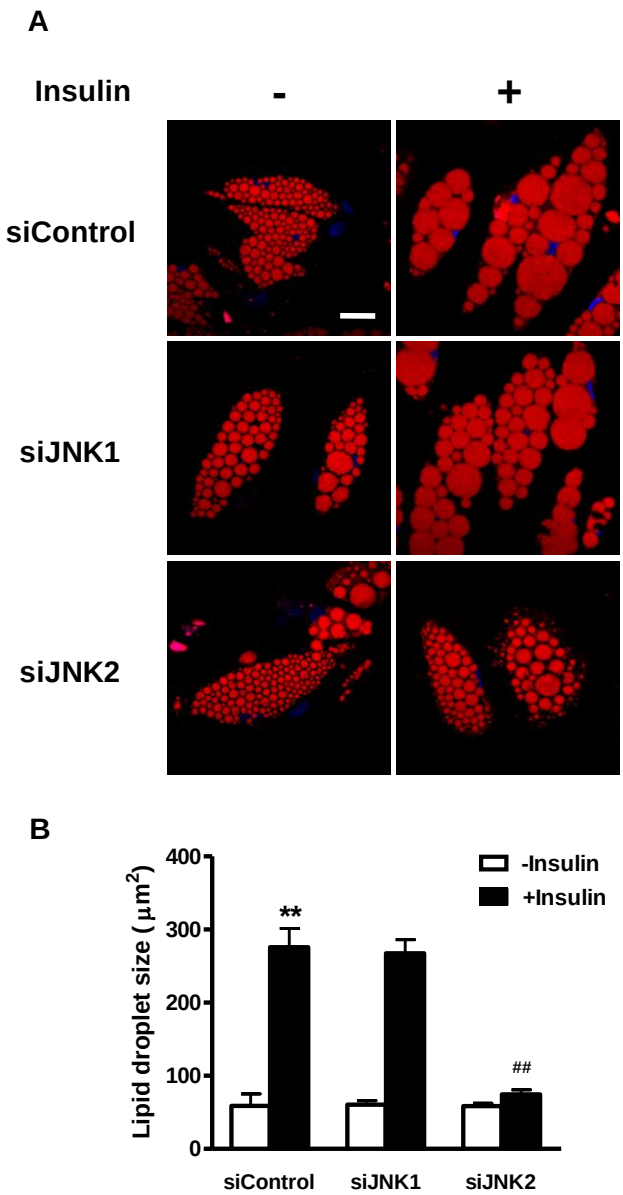

Fig. 16. Depletion of JNK2, but not JNK1, inhibits insulin-induced enlargement of lipid droplets. A: Fluorescence microscopy of adipocytes stained with Nile Red and DAPI. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), JNK1 siRNA (siJNK1), or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for 15 days and then stained with Nile Red (red) and DAPI (blue). Scale bar, 30 μm. B: Quantification of lipid droplet size. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ##, $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin.

2-5. インスリンによる Akt 及び JNK リン酸化に対する PI3K の関与

Akt 及び JNK が PI3K の下流シグナルかどうかを確かめるため、Akt 及び JNK リン酸化に対する PI3K 阻害剤の影響を調べた。30 分間のインスリン処置により、Akt Ser473、Akt Thr308 及び JNK リン酸化が著明に誘導された(Fig. 17A)。インスリンによる Akt 及び JNK リン酸化は、wortmannin 或いは PI-103 のいずれでも阻害された(Fig. 17B)。さらに、API-2 及び SP600125 は、それぞれインスリンによる JNK 及び Akt リン酸化に影響しなかったことから、Akt 及び JNK の活性化は互いを必要としないことが示唆された(Fig. 17C, D)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる Akt 及び JNK リン酸化は PI3K を介することが明らかとなった。

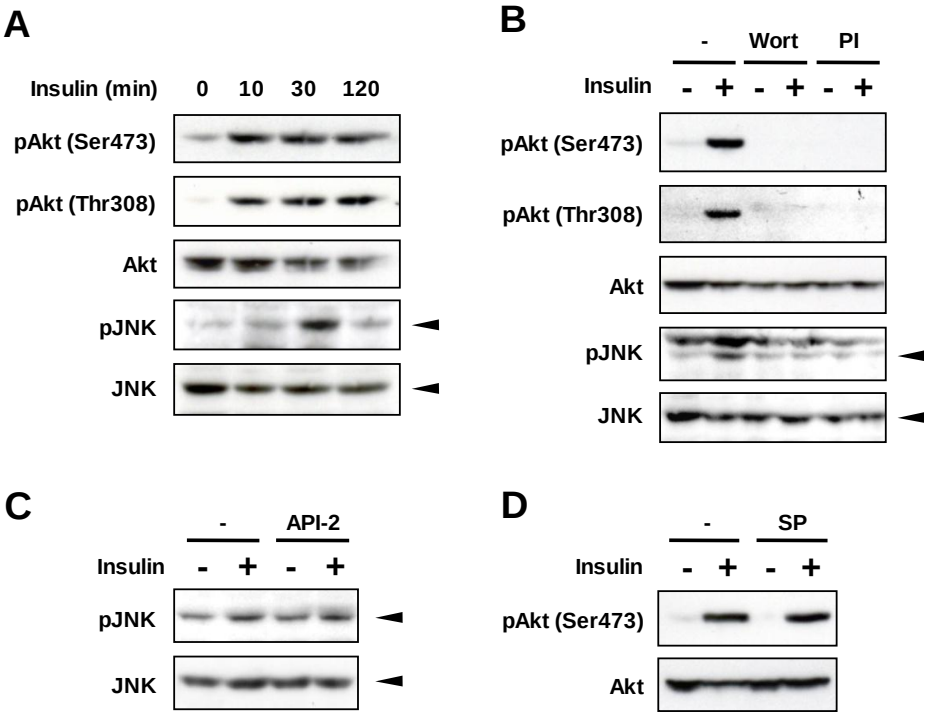

Fig. 17. PI3K inhibitors block both Akt and JNK phosphorylation induced by insulin. A: Time course of insulin-induced Akt and JNK phosphorylation. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by

stimulation with or without 100 nM insulin for the indicated times. B: Effects of PI3K inhibitors on insulin-induced Akt and JNK phosphorylation. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with 0.2 μM wortmannin (Wort) or 2 μM PI-103 (PI) for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 30 min. C: Effects of the Akt inhibitor on insulin-induced JNK phosphorylation. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with 30 μM API-2 for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 30 min. D: Effects of the JNK inhibitor on insulin-induced Akt phosphorylation. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with 10 μM SP600125 (SP) for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 30 min. Akt Ser473, Akt Thr308, and JNK phosphorylation were determined by Western blot analysis. Total Akt and total JNK served as a loading control. Arrowheads indicate the 54-kDa isoform of JNK. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown.

３．考察

前章では、インスリンが CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わり、その発現制御がインスリンのアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用にそれぞれ選択的に関与することを明らかにした(32)。本章では、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わるシグナル経路に関する初めての証拠を提供した。はじめに、PI3K 阻害剤を用いた検討により、インスリンによる CIDEA の発現低下及び CIDEC の発現亢進は PI3K を介することを明らかにした(Fig. 11)。インスリンによる CIDEC の発現亢進が PI3K を介することは、マウス 3T3-L1 脂肪細胞での報告とも一致している(35)。

次に、インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に PI3K の主要な下流シグナルである Akt 及び MAPK が寄与するかどうか、それぞれの選択的な阻害剤を用いて調べた。インスリンによる CIDEA の発現制御は ERK、JNK 及び p38 ではなく、Akt を介すること(Fig. 12)、さらに、Akt1、Akt2 及び Akt3 のアイソフォームのうち、Akt1/2 を介することが明らかとなった(Fig. 13)。このことから、Akt1 及び Akt2 は、インスリンによる CIDEA の発現制御に対し、重複した役割を担うことが考えられた。さらに、Akt1/2 はインスリンによるアポトーシス抑制に関与することが明らかとなった(Fig. 14)。これらの結果と同様に、Akt1/2 の発現抑制は胸腺細胞のアポトーシスを亢進させることが報告されている(36)。以上の結果から、インスリン/Akt1/2/CIDEA 経路はアポトーシス抑制に関与することが示唆された。

一方、インスリンによる CIDEC の発現制御は Akt、ERK 及び p38 ではなく、JNK を介すること(Fig. 12)、さらに、JNK1 及び JNK2 のアイソフォームのうち、JNK2 を介することが明らかとなった(Fig. 15)。さらに、JNK1

ではなく JNK2 がインスリンによる脂肪滴形成に関与することが初めて明らかとなった(Fig. 16)。以上の結果から、インスリン/JNK2/CIDEC 経路は脂肪滴形成に関与することが示唆された。JNK2 は HeLa 細胞において脂肪滴の恒常性維持に関わることが報告されている(37)。また、JNK1+/- JNK2+/+ではなく JNK1+/- JNK2-/-表現型マウスが肥満及びインスリン抵抗性になりにくいことが報告されている(38)。これらの結果から、JNK2 は肥満又はインスリン抵抗性のような脂質関連疾患の進展に寄与することが推察される。

本章では、インスリンによる JNK リン酸化が PI3K を介することを明らかにしたが、ヒト白色脂肪細胞でのそのような報告は今回が初めてである(Fig. 17)。インスリンが PI3K を介して Akt 及び JNK を活性化させることは、他の細胞では既に報告されている(39-41)。本章では、ヒト白色脂肪細胞において、インスリン/PI3K の下流に Akt 及び JNK シグナル経路があり、それぞれが PI3K 下流で分岐していることを明らかにした。CIDEA 及び CIDEC は、PI3K 下流で分岐した Akt1/2 及び JNK2 シグナル経路を介してインスリンにより別々に制御されており、それ故に、それぞれインスリンによるアポトーシス抑制作用及び脂肪滴形成作用に選択的に寄与することが推測される(Fig. 18)。

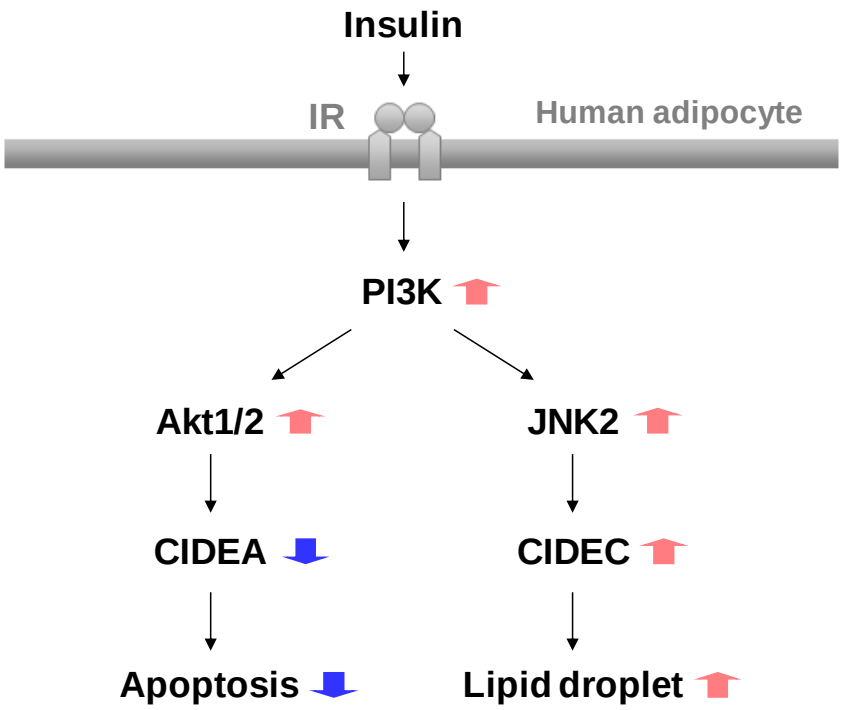

Fig. 18. Hypothesis of insulin signaling pathways associated with the regulation of CIDEA and CIDEC expression in human adipocytes. The regulation of CIDEA and CIDEC expression by insulin is mediated by PI3K signaling. However, the insulin signaling pathway involved in the regulation of CIDEA and CIDEC diverges into different pathways downstream of PI3K. Akt1/2 mediates insulin-induced downregulation of CIDEA, whereas JNK2 mediates insulin-induced upregulation of CIDEC. The insulin regulation of CIDEA and CIDEC *via* different signaling pathways would contribute separately to insulin-induced anti-apoptosis and lipid droplet formation in human adipocytes.

４．小括

1) ヒト白色脂肪細胞において、インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御はいずれも PI3K を介する。

2) その制御に関わるシグナル経路は PI3K 下流で分岐しており、CIDEA の発現制御は Akt1/2、CIDEC の発現制御は JNK2 を介する。

3) インスリン/Akt1/2 経路はアポトーシスに関与する。

4) インスリン/JNK2 経路は脂肪滴形成に関与する。

第4章　インスリン/JNK2 経路による脂肪滴サイズの増大に関与する新規遺伝子の探索

前章では、脂肪滴サイズ増大に関わる CIDEC の発現がインスリン/JNK2 経路により制御されることを明らかにした(42)。本章では、脂肪滴サイズの増大メカニズムをより詳細に明らかにするため、CIDEC 以外にも他の脂肪滴形成に関わる遺伝子がインスリン/JNK2 経路により制御されるかどうかをヒト全ゲノムマイクロアレイ解析及び Ingenuity pathway analysis (IPA)により網羅的に探索した。

１．実験方法

1-1. 材料

DMEM/F-12 (1:1, vol/vol)は Invitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。Human insulin は Novo Nordisk (Bagsværd, Denmark)から購入した。Rosiglitazone は Alexis Biochemicals (San Diego, CA) から購入した。3-Isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone (Dex), pantothenate 及び anti-β-actin antibody は Sigma (St. Louis, MO)から購入した。Biotin は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。FBS は Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel)から購入した。Anti-sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) antibody (H-160, sc-8984)は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から購入した。Anti-JNK2 antibody は Cell Signaling Technology (Beverly, MA)から購入した。

1-2. ヒト白色脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化(Fig. 4)

インフォームド・コンセントの得られた 6 名の男性患者(Fig. 2 で使用)及び 6 名

の女性患者(Fig. 1, 3 – 6 で使用)の皮下脂肪組織由来のヒト白色脂肪前駆細胞は Zen-Bio (Research Triangle Park, NC)から購入した。6 名の男性患者は非喫煙者であり、Body mass index の平均値は 27.2 (range 26.4 – 28.4)、年齢の平均値は 41 歳(range 29 – 57)であった。6 名の女性患者は非喫煙者であり、Body mass index の平均値は 27.9 (range 25.7 – 29.9)、年齢の平均値は 40 歳(range 29 – 52)であった。ヒト脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は上述(第 2 章、1-2)のように行った。

1-3. siRNA 解析

siRNA 解析は上述(第 2 章、1-5)のように行った。分化脂肪細胞に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、各 10 nM の Control siRNA (12935-114; Invitrogen), JNK1 siRNA (12936-42 Duplex1; Invitrogen), JNK2 siRNA (12936-44 Duplex1; Invitrogen)或いは SREBP1 siRNA (HSS110187)をトランスフェクトした。トランスフェクションはアッセイまで 5 日間に 1 度行った。

1-4. マイクロアレイ解析

3 回の独立した実験から調製した RNA をそれぞれ等量ずつ混合し、two-color マイクロアレイ解析(Agilent whole-human genome 4×44K array platform; Agilent Technologies, Santa Clara, CA)に使用した。遺伝子発現プロファイルの比較解析は GeneSpring GX 11.5.1 (Agilent Technologies)を用いて行った。フィルタリングにより変動遺伝子のリストを作成した(Flag: detected; Filter by expression: signal intensity > 80; fold change > 1.2)。さらに、階層的クラスター分析により発現プロファイルの類似した遺伝子を集めて系統樹を作成した(uncentered Pearson correlation, average linkage method)。

1-5. Ingenuity pathway analysis (IPA)

Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com)を用いて、選択した遺伝子群が関与する細胞機能及び上流転写調節因子を予測した。

1-6. リアルタイム定量 PCR

リアルタイム定量 PCR は上述(第 2 章、1-3)のように行った。各遺伝子の TaqMan gene expression assay system は以下に示すものを Applied Biosystems から購入した。ATP citrate lyase (ACLY; Hs00982738_m1), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1; Hs01046047_m1), fatty acid synthase (FAS; Hs00188012_m1), CIDEC mRNA (Hs00535723_m1)及び 18S rRNA (Hs99999901_s1)。Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) mRNA のプライマー及びプローブ配列は以下の通りであった(forward primer, 5' CCATGGATTGCACTTTCGAA 3'; reverse primer, 5' CCAGCATA GGGTGGGTCAAA 3'; probe, 5' TATCAACAACCAAGACAGTGACTTCCCTGGC 3')。

1-7. ウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析は上述(第 2 章、1-4)のように行った。細胞質及び核抽出液の調製は NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて行った。細胞質抽出液(15 μg)及び核抽出液(5 μg)を 7.5% – 10% SDS-polyacrylamide gels で電気泳動した後、Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA)へタンパク質をトランスファーした。Membrane は 5% BSA 含有 TBS/0.05% Tween-20 で 1 時間ブロッキングし、SREBP-1, JNK2 或いは β-actin に特異的な抗体を用いてオーバーナイト、4°C でインキュベートした。その後、Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いて 1 時間インキュベートし、

ECL detection reagents (GE Healthcare)を用いてタンパク質を可視化した。

1-8. 共焦点免疫蛍光顕微鏡法

細胞を上述(第 2 章、1-6)のように固定・浸透化した。浸透化後、細胞を Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen)を用いて 30 分間、室温でブロッキングし、polyclonal SREBP-1 antibody (H-160, 2 μg/ml)を用いて overnight、4°C でインキュベートした。次に、細胞を Alexa-488-conjugated goat anti-rabbit IgG を用いて 1 時間、室温でインキュベートし、0.2 μg/ml DAPI/PBS を用いて 5 分間、室温でインキュベートした。その後、細胞を 3 回洗浄したのち、ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)を用いてスライドガラス上にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 700; Carl Zeiss, Jena, Germany)で可視化した。顕微鏡写真は×63 の倍率で SREBP-1 は緑、DAPI は青で取得し、ZEN software (Carl Zeiss)を用いてマージさせた。

1-9. de novo 脂肪酸合成の解析

分化脂肪細胞を serum/Dex/insulin 不含維持培地で 16 時間インキュベートした後、100 nM インスリンを添加し、24 時間反応させた。さらに、細胞を 1.5 μCi/ml [1-^{14}C]-acetate (New England Nuclear, Boston, MA)及び cold acetic acid (500 μM)含有の同様の培地を用いて 2 時間、37°C でインキュベートした。その後、細胞を 15% KOH/ethanol を用いて可溶化した後、細胞懸濁液を 2 時間、85°C でインキュベートすることでアルカリ加水分解した。次に、石油エーテルを添加し、上層の非極性の脂質成分を抽出・除去した。次に、塩酸を添加したのち、石油エーテルを添加し、極性の脂質成分(fatty acids)を回収し、乾固した。乾固物をメタノールで溶解し、ULTIMA Gold MV scintillation cocktail (PerkinElmer, Waltham, MA)を添加して、放射線量を液体シンチレーションカウンター(Packard Instrument Company,

Meriden, CT)で測定した。結果は nanomoles of fatty acid per hour per milligram of protein として表した。

1-10.共免疫沈降法

共免疫沈降法は Catch and Release Reversible v2.0 Immunoprecipiation System (Millipore Corporation)を用いて行った。細胞を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na2EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/ml leupeptin, 50 μM MG-132 及び 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)含有 Lysis buffer を用いて可溶化した。可溶性画分のタンパク質(500 μg)を JNK2 に特異的な抗体を用いて overnight 、4°C でインキュベートし、免疫沈降物をウエスタンブロット法により解析した。

1-11.統計解析

統計解析は Unpaired *t* test を実施した。棄却率 5%未満を有意とした。結果は 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差で表した。

２．結果

1-1.　インスリン/JNK2 経路により制御される遺伝子の網羅的探索

インスリン/JNK2 経路により特異的に制御される遺伝子を網羅的に探索するため、ヒト全ゲノムマイクロアレイ解析を行った。インスリン、siJNK1/インスリン及び siJNK2/インスリン添加群で発現が 1.2 倍以上変動した遺伝子について、階層的クラスター分析を行った。興味深いことに、各群はそれぞれ異なる遺伝子発現プロファイルを示した(Fig. 19A)。インスリン添加群で発現が亢進した 3,152 遺伝子のうち、455 遺伝子が siJNK2/インスリン添加群で特異的に発現が低下した(Fig. 19B)。また、インスリンで発現低下した 3,032 遺伝子のうち、361 遺伝子が siJNK2/インスリン添加群で特異的に発現が亢進した(Fig. 19C)。これらの遺伝子群(455 及び 361 遺伝子)はインスリン/JNK2 経路により特異的に制御される遺伝子群であることが示唆された。

次に、IPA を用いて、インスリン/JNK2 経路により特異的に発現制御される 816 遺伝子が関与する細胞機能を調べた。インスリン/JNK2 経路は脂質代謝に関わる遺伝子の発現を主に制御し(Table. 1)、8 遺伝子は脂質代謝カテゴリーのトリグリセリド合成に有意に関与することが判明した(z-score < -2; Table. 2)。さらに、肝細胞における脂肪酸合成のマスターレギュレーター転写因子として知られる Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1, SREBF1)がこれら遺伝子の主要な転写調節因子であることが予測された(z-score -4.119; Table. 3)。対照的に、インスリン/JNK1 経路により特異的に発現制御される 868 遺伝子では、これらの機能カテゴリーを示さなかった。以上の結果から、インスリン/JNK2 経路は脂質代謝に関わる遺伝子の発現を主に制御することが明らかとなった。

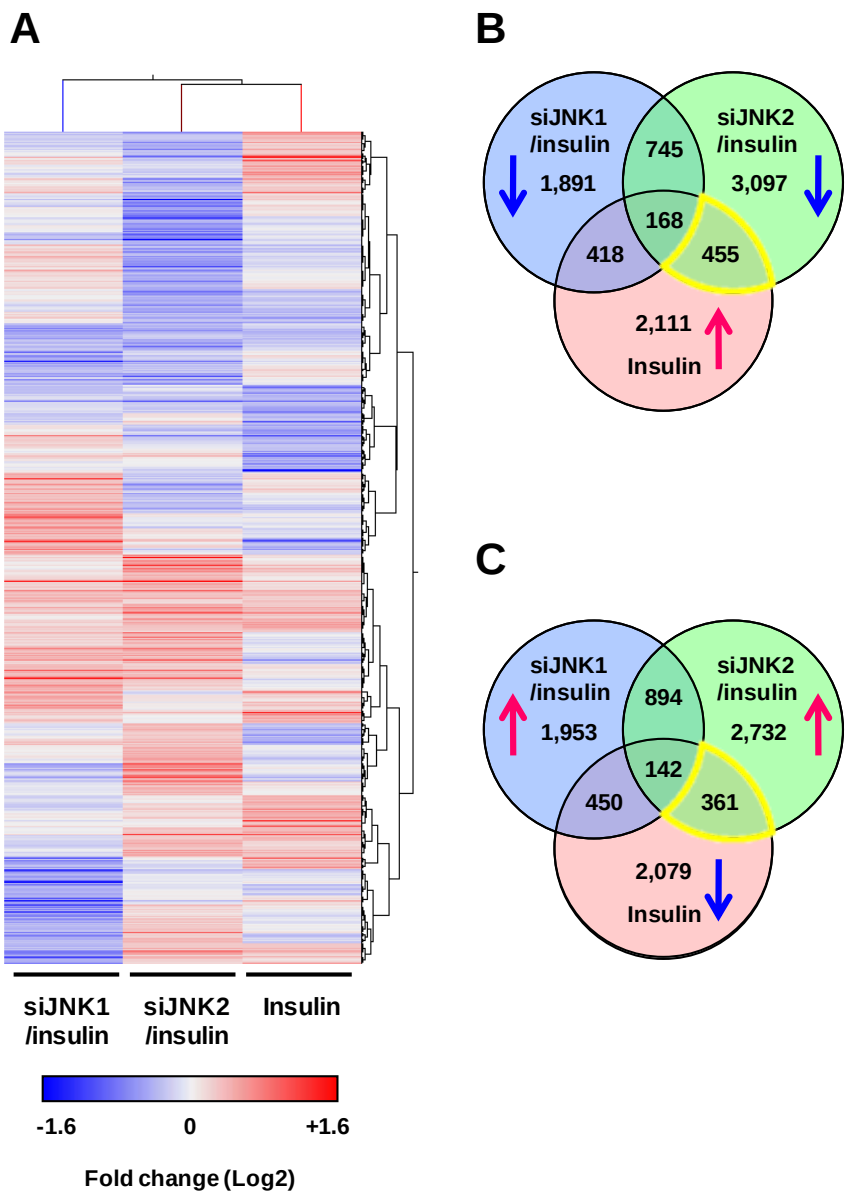

Fig. 19. Global analysis of gene expression regulated by insulin/JNK1- or insulin/JNK2-dependent pathways. A: Hierarchical cluster analysis of upregulated or downregulated genes. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), JNK1 siRNA (siJNK1), or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. Fold changes were calculated using changes in gene expression in siJNK1 or siJNK2 with insulin compared to siControl with insulin (siJNK1/insulin or siJNK2/insulin), and insulin compared to

control (Insulin). Expression values are presented as Log2 scale using different gradations of red for genes upregulated by ≥ 1.2-fold, and blue for genes downregulated by ≥ 1.2-fold. B and C: Venn diagram illustrating overlapping upregulated (↑) and/or downregulated (↓) genes in siJNK1/insulin (blue), siJNK2/insulin (green), and insulin (red). Lists of siJNK2-specific insulin-response genes (yellow regions) were integrated into the IPA (Tables 1 – 3).

Table. 1. Top five bio-functions of genes regulated by an insulin/ JNK2-dependent pathway analyzed by Ingenuity Pathway Analysis.

Molecular and Cellular Functions

	Category	p-value
1	Lipid Metabolism	3.84E-09-1.64E-02
2	Small Molecule Biochemistry	3.84E-09-1.64E-02
3	Cellular Growth and Proliferation	6.52E-08-1.37E-02
4	Vitamin and Mineral Metabolism	1.68E-07-1.37E-02
5	Cellular Development	1.55E-06-1.56E-02

Table. 2. Functional annotation of genes regulated by an insulin/JNK2-dependent pathway.

Category	Functions Annotation	p-Value	Predicted Activation State	Regulation z-score	Molecules
Lipid Metabolism	Synthesis of triacylglycerol	8.38E-05	Decreased	-2.005	AGPAT6,FASN,LPL, NR1H3,PLIN2,PPARG, SCD,SREBF1

Table. 3. Predicted transcription regulator of genes regulated by an insulin/JNK2-dependent pathway.

Transcription Regulator	Fold change	Predicted Activation State	Regulation z-score	p-value of overlap	Target molecules in dataset
SREBF1	-1.499	Inhibited	-4.119	1.22E-12	AACS,AARS,ACACA,ACACB, ACLY,ACSS2,ALDOC,DBI,DHCR7, ELOVL6,FASN,FDPS,G6PD,IDI1, IMMT,INSIG1,IRS2,LDLR,LPL, LSS,MVD,NR1H3,NSDHL,PPARG, SCD,SREBF1,TMEM97

1-2.　インスリン/JNK2 経路による SREBP-1c の発現制御

SREBP-1 は SREBP-1a 及び SREBP-1c のアイソフォームが存在するが、脂肪細胞では SREBP-1c の発現量が多いことが知られている(43)。そこで、SREBP-1c の発現がインスリン/JNK2 経路により制御されるかどうかをリアルタイム定量 PCR 法で調べた。インスリンは SREBP-1c mRNA の発現を時間依存的且つ濃度依存的且つに亢進させ、24 時間及び 100 nM で最大効果を示した(Fig. 20A, B)。

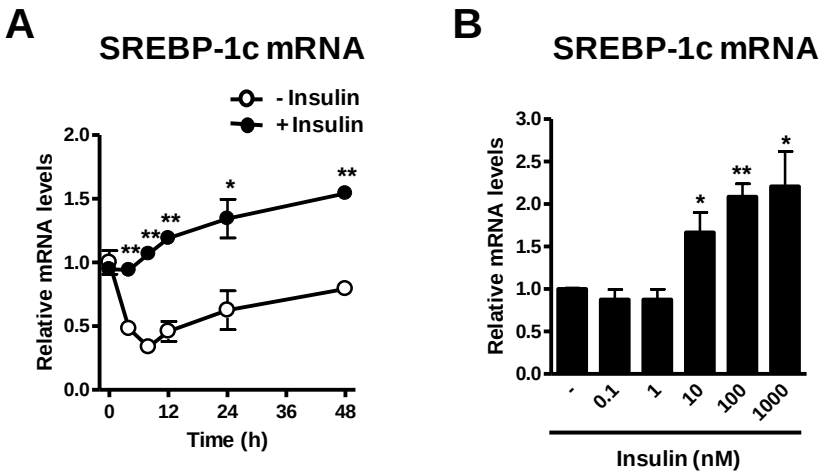

Fig. 20. Insulin increases SREBP-1c mRNA expression in a time- and concentration-dependent manner. A: Time course of insulin-regulated SREBP-1c mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h and then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of 100 nM insulin for the indicated times. B: Concentration – response effect of insulin on SREBP-1c mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h and then incubated in serum/Dex-free maintenance medium in the presence or absence of insulin at the indicated concentrations for 24 h. The mRNA expression levels

of SREBP-1c were measured by quantitative real-time PCR. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

次に、インスリンによる SREBP-1c の発現制御に対する JNK の寄与を調べた。JNK 阻害剤 SP600125 はインスリンによる SREBP-1c の発現亢進を濃度依存的に抑制した(Fig. 21A)。siJNK1 は SREBP-1c の発現に影響しなかったが、siJNK2 はインスリンによる SREBP-1c の発現亢進を抑制した(Fig. 21B)。各 siRNA は JNK1 及び JNK2 mRNA の発現量をそれぞれ特異的にノックダウンさせた(Fig. 21C)。さらに、SREBP-1 は前駆体 SREBP-1 タンパク質(pre-SREBP-1; ～125 kDa)及び活性型である核型 SREBP-1 タンパク質(n-SREBP-1; ～68kDa)が存在することが知られているため、双方の発現をウエスタンブロット法により調べた。インスリンは pre-SREBP-1 及び n-SREBP-1 タンパク質の双方の発現を顕著に亢進させたが、siJNK2 はこれを顕著に抑制した(Fig. 21D)。siJNK2 は JNK2 タンパク質の発現量を特異的にノックダウンさせた。以上の結果から、SREBP-1c の発現はインスリン/JNK2 経路により制御されることが明らかとなった。

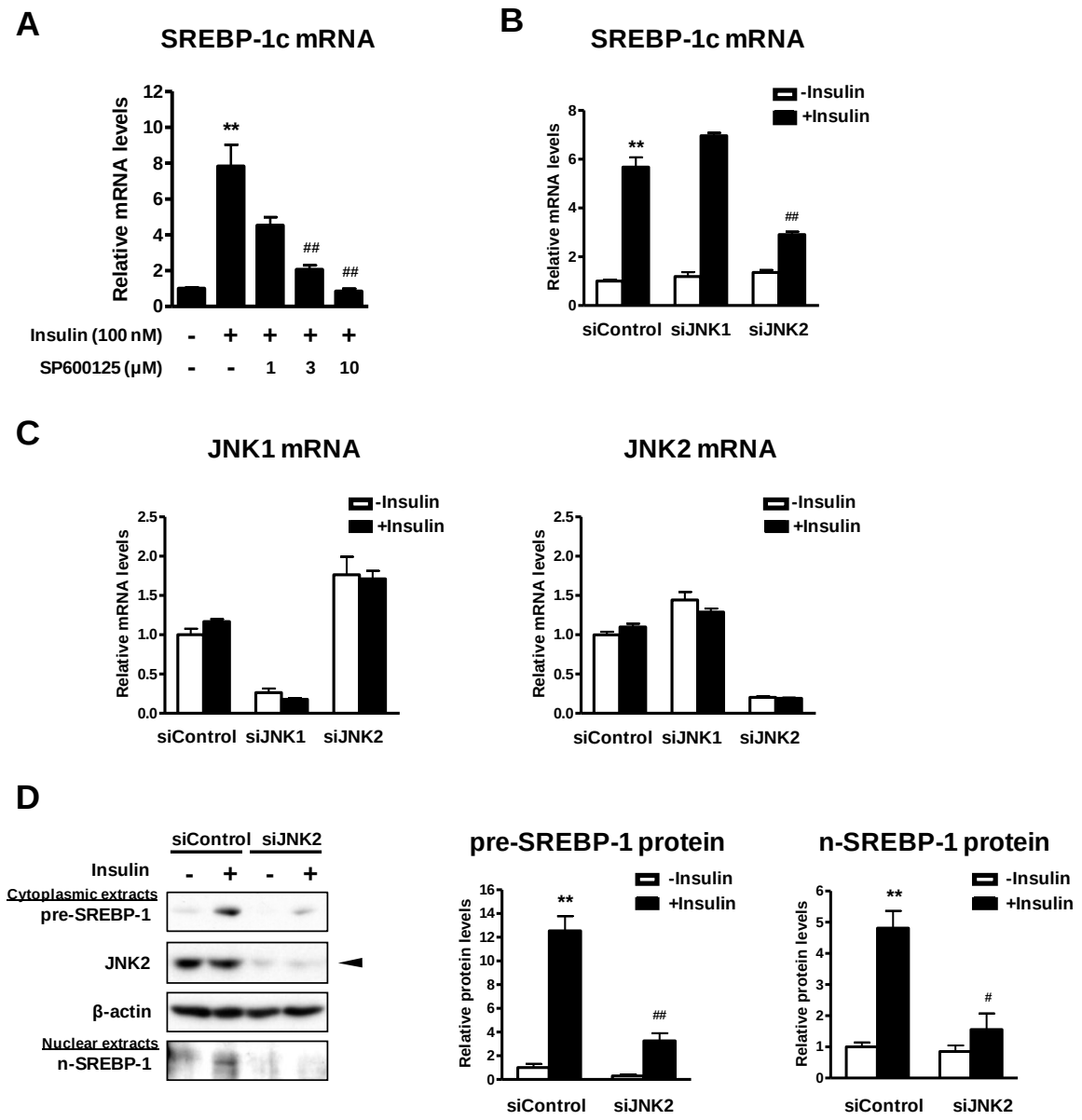

Fig. 21. Depletion of JNK2, but not JNK1, attenuates insulin-induced SREBP-1c expression. A: Concentration – response effect of the JNK inhibitor on SREBP-1c mRNA expression. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h. Cells were then treated with SP600125 at the indicated concentrations for 30 min followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* control without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* control with insulin. B and C: Effects of JNK1 or

JNK2 depletion on mRNA expression of SREBP-1c (B), JNK1, and JNK2 (C). Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), JNK1 siRNA (siJNK1), or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin. D: Western blot analysis of pre-SREBP-1 (~125 kDa) and n-SREBP-1 (~68 kDa) protein expression in cytoplasmic and nuclear extracts, respectively. β-actin served as a loading control. An arrowhead indicates the 54-kDa isoform of JNK2. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown. The expression levels of each protein were normalized relative to β-actin protein expression and are shown as relative protein levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin.

1-3. インスリンによる脂肪酸合成の亢進に対する JNK2 の関与

肝細胞においては、インスリンは SREBP-1c を介してその標的遺伝子である ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 などの脂肪酸合成関連酵素の発現を誘導し、de novo 脂肪酸合成を亢進させることがよく知られているが、JNK2 がこの経路に関与するかどうかは知られていない(Fig. 22) (44)。

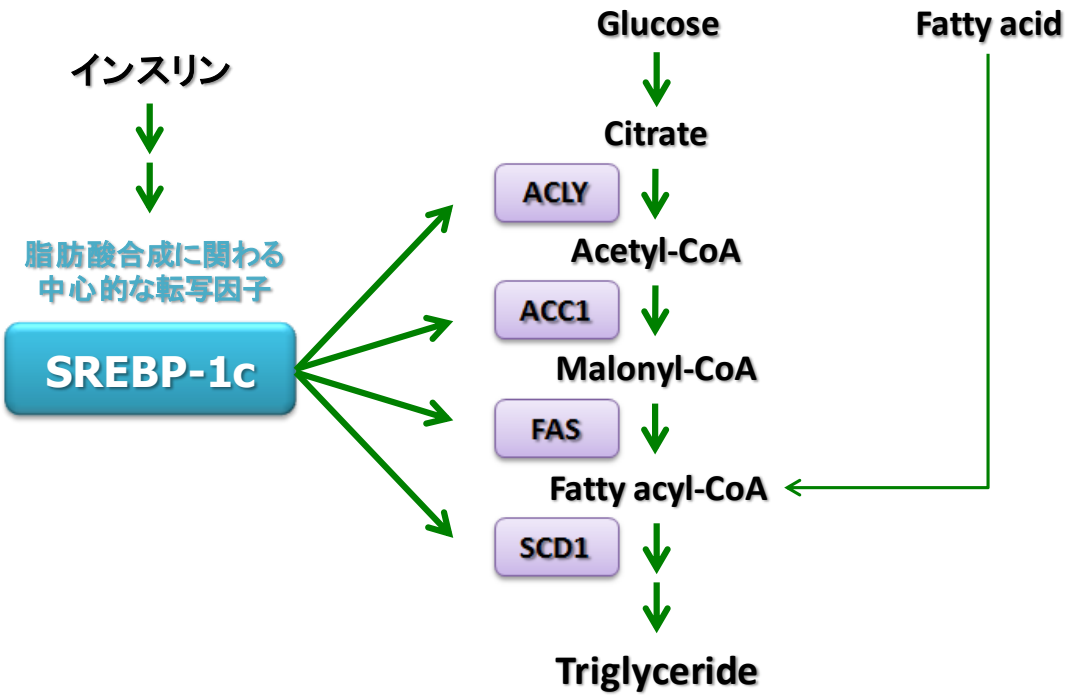

Fig. 22. 肝細胞におけるインスリンによる de novo 脂肪酸合成亢進作用

そこで、インスリン/JNK2 経路が脂肪酸合成に関わる酵素である ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 の発現制御に関与するかどうかを調べた。インスリンは ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 mRNA の発現を顕著に亢進させた(Fig. 23A)。siJNK1 は ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 の発現に影響しなかったが、siJNK2 はインスリンによるこれら遺伝子の発現亢進を減弱させた(Fig. 23A)。次に、de novo 脂肪酸合成に対する JNK2 の関与を調べた。インスリンは de novo 脂肪酸合成を顕著に亢進させたが、siJNK2 はこれを抑制した(Fig. 23B)。siJNK1 は de novo 脂肪酸合成に影響しなかった。以上の結果から、インスリンによる脂肪酸合成関連酵素の発現亢進及び de novo 脂肪酸合成の亢進は、JNK2 が関与することが明らかとなった。

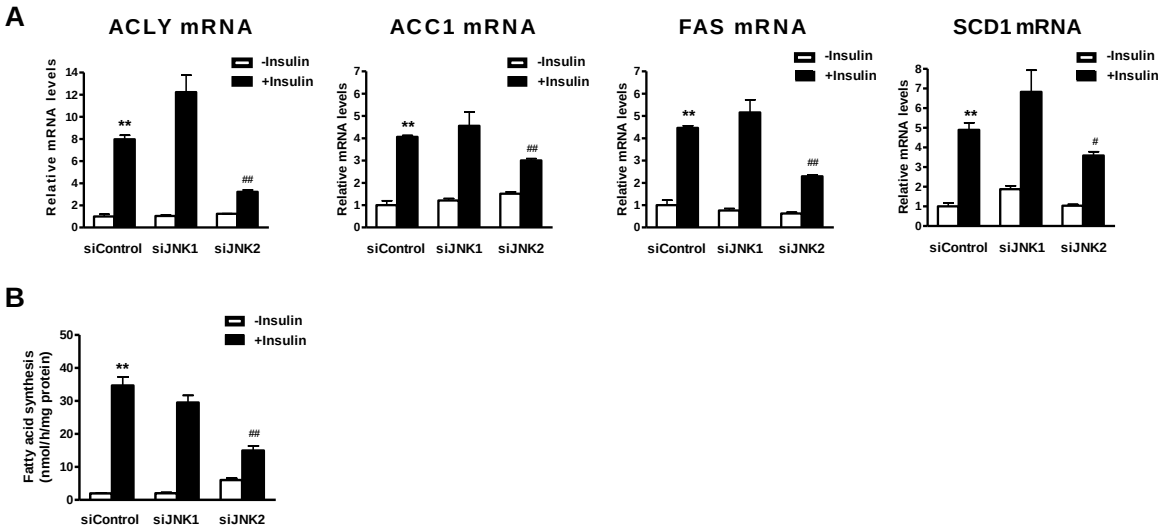

Fig. 23. Depletion of JNK2, but not JNK1, attenuates insulin-induced upregulation of SREBP-1c target genes and increase of fatty acid synthesis. A: Effects of JNK1 or JNK2 depletion on SREBP-1c target gene expression. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), JNK1 siRNA (siJNK1), or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of each gene were measured by quantitative real-time PCR. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin. B: Analysis of fatty acid synthesis. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin.

1-4. インスリンによる脂肪酸合成の亢進に対する SREBP-1c の関与

肝細胞においては、SREBP-1c は標的遺伝子である ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 などの脂肪酸合成関連酵素の発現を誘導し、de novo 脂肪酸合成

を亢進させることがよく知られているが(44)、脂肪細胞における SREBP-1c の作用は明らかではない。そこで、ヒト白色脂肪細胞において、SREBP-1c が脂肪酸合成関連酵素の発現制御及び脂肪酸合成に寄与するかどうかを調べた。SREBP-1 siRNA (siSREBP-1)は、インスリンによる ACLY、ACC1、FAS 及び SCD1 の発現亢進を減弱させた(Fig. 24A)。さらに、siSREBP-1 はインスリンによる de novo 脂肪酸合成の亢進を減弱させた(Fig. 24B)。これらの結果から、インスリンによる脂肪酸合成関連酵素の発現亢進及び de novo 脂肪酸合成の亢進は、SREBP-1 が関与することが明らかとなった。

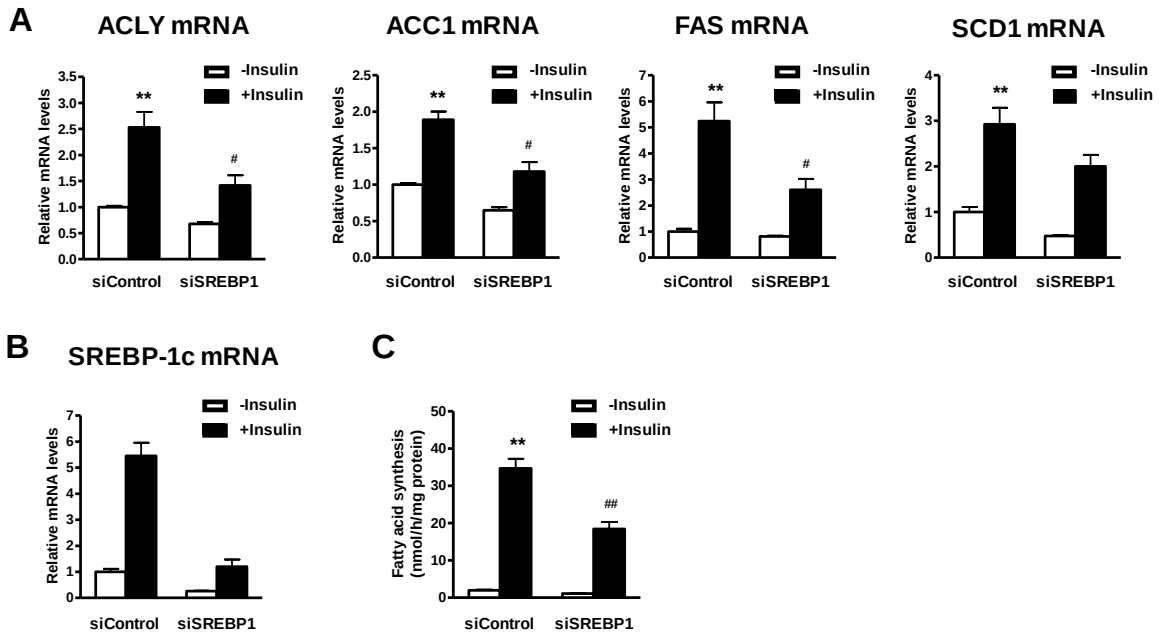

Fig. 24. Depletion of SREBP-1 attenuates insulin-induced upregulation of lipogenic enzymes and fatty acid synthesis. A and B: Effects of SREBP-1c depletion on expression of lipogenic enzymes. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl), or SREBP-1 siRNA (siSREBP-1) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 24 h. The mRNA expression levels of

lipogenic enzymes (A) and SREBP-1c (B) were measured by quantitative real-time PCR. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; # $P < 0.05$ *vs.* siControl with insulin. C: Analysis of fatty acid synthesis. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin.

1-5. インスリンによる SREBP-1 プロセシング及び核内移行に対する JNK2 の関与

SREBP-1 の活性は細胞内局在に依存すると考えられている(45)。SREBP-1 は pre-SREBP-1 として合成され、小胞体膜上に局在する。この pre-SREBP-1 は Coatomer protein II 小胞に結合してゴルジ装置へと移行し、そこで 2 段階の切断(プロセシング)を受ける。遊離した活性型の n-SREBP-1 は核へと移行し、自身と標的遺伝子の転写を調節することが知られている。そこで、SREBP-1 の細胞内局在性をウエスタンブロット法及び共焦点免疫蛍光顕微鏡法により調べた。1 時間のインスリン処置により、細胞質画分の pre-SREBP-1 タンパク質量は低下し、核画分の n-SREBP-1 タンパク質量は亢進した(Fig. 25A)。siJNK2 はインスリンによる核内 n-SREBP-1 タンパク質量の亢進を抑制した(Fig. 25A)。SREBP-1 の著明な染色像はインスリンを添加した脂肪細胞の核で主に観察されたが、siJNK2 はこれを抑制した(Fig. 25B)。同様の条件で、非免疫 IgG では蛍光染色像が検出されなかったことから、SREBP-1 の染色シグナルは特異的であったと考えられた(data not shown)。以上の結果から、インスリンによる SREBP-1 プロセシング及び核内移行の誘導は JNK2 を介することが明らかとなった。

最後に、JNK2 がどのように SREBP-1 のプロセシング及び発現制御に関与するのかを知るため、JNK2 が SREBP-1 とタンパク質複合体を形成する

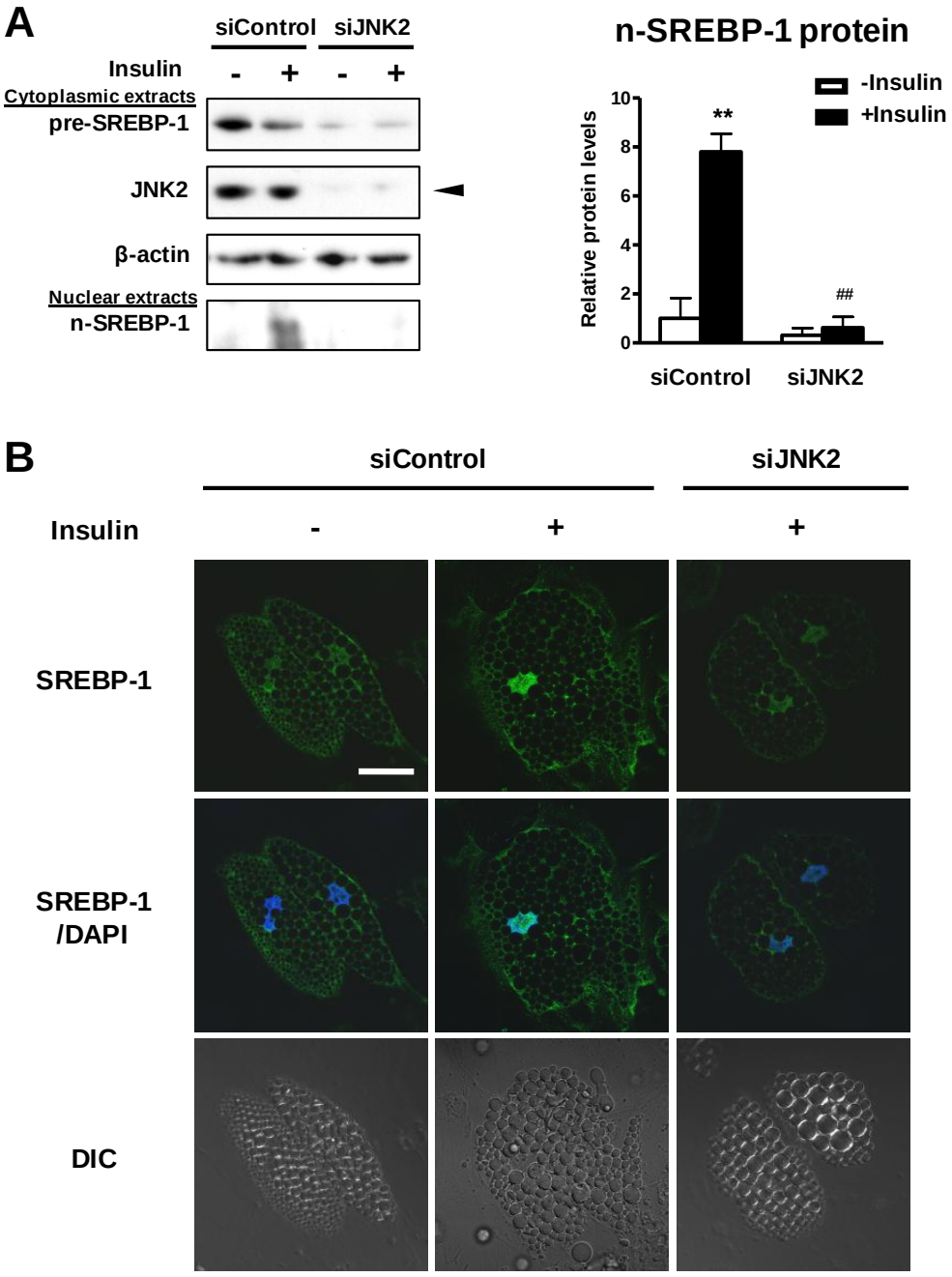

Fig. 25. Depletion of JNK2 inhibits insulin-induced SREBP-1 cleavage processing and nuclear translocation. A: Western blot analysis of pre-SREBP-1 and n-SREBP-1 protein expression in cytoplasmic and nuclear extracts, respectively. Differentiated adipocytes were treated with control siRNA (siControl) or JNK2 siRNA (siJNK2) in maintenance medium for 7 days. Cells were then starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 1 h. β-actin

served as a loading control. An arrowhead indicates the 54-kDa isoform of JNK2. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown. The protein expression levels of n-SREBP-1 were normalized relative to β-actin protein expression and are shown as relative protein levels. Data are presented as means ± SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$ *vs.* siControl without insulin; ## $P < 0.01$ *vs.* siControl with insulin. B: Confocal immunofluorescence microscopy of adipocytes stained with SREBP-1 (green) and DAPI (blue). Scale bar, 30 μm.

かどうかを共免疫沈降法及びウエスタンブロット法により調べた。興味深いことに、30 分間インスリンを処置した細胞から調製した可溶化液において、pre-SREBP-1 タンパク質は JNK2 タンパク質と共免疫沈降した(Fig. 26)。この結果は、JNK リン酸化が 30 分間のインスリン処置により亢進するという前章の結果からも支持される。Normal IgG を用いたコントロール実験では、このような共免疫沈降は観察されなかった。以上の結果から、JNK2 はインスリンに反応して、pre-SREBP-1 と相互作用することが示唆された。

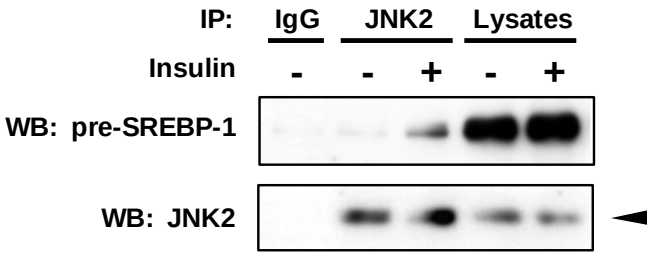

Fig. 26. JNK2 associates with the precursor forms of SREBP-1 in response to insulin. Differentiated adipocytes were starved in serum/Dex/insulin-free maintenance medium for 16 h followed by stimulation with or without 100 nM insulin for 30 min. Endogenous

JNK2 protein from cell lysates was immunoprecipitated with JNK2 antibody, followed by immunoblots with SREBP-1 and JNK2 antibodies as indicated. An arrowhead indicates the 54-kDa isoform of JNK2. These experiments were performed three times and the results of one representative experiment are shown.

３．考察

本章では、ヒト白色脂肪細胞において、インスリン/JNK2 経路により特異的に制御される遺伝子の網羅解析に関する初めての証拠を提供した。マイクロアレイ解析及び IPA により、インスリン/JNK2 経路は主に脂質代謝に関わる遺伝子の発現を制御することが明らかとなった(Fig. 19; Tables 1, 2)。さらに、肝細胞における脂肪酸合成のマスターレギュレーターであり、脂肪肝やインスリン抵抗性などの様々な病態に関与することが知られている SREBP-1 が(44, 46)、インスリン/JNK2 経路により制御される遺伝子の主要な転写調節因子であることが予測された(Table 3)。そこで、SREBP-1 の-1a 及び 1c のアイソフォームのうち、脂肪細胞で発現量の多い SREBP-1c の発現制御について調べたところ、インスリン/JNK2 経路は SREBP-1c の発現亢進に関与することが明らかとなった(Figs. 20, 21)。インスリンによる SREBP-1c の発現及び活性は、肝細胞では Akt、Protein kinase A、Protein kinase C 及び Insulin-induced gene-2 などの経路により制御されることが知られている(47-51)。これらの知見から、インスリンは様々な細胞状況に依存した個々のシグナル経路を介して、SREBP-1c の発現を制御することが示唆された。

次に、siRNA を用いた JNK2 の遺伝子ノックダウン法により、インスリンによる脂肪酸合成関連酵素の発現亢進及び de novo 脂肪酸合成の亢進は、JNK2 が関与することが初めて明らかとなった(Fig. 23)。また、SREBP-1 は肝細胞での作用と同様に、ヒト白色脂肪細胞においても脂肪酸合成関連酵素の発現誘導及び de novo 脂肪酸合成の亢進に関与することが明らかとなった(Fig. 24)。以上の結果から、ヒト白色脂肪細胞において、インスリン/JNK2 経路は SREBP-1c 及びその標的である脂肪酸合成関連酵素の発現亢進を介して、de novo 脂肪酸合成の亢進に寄与することが示唆された(Fig.

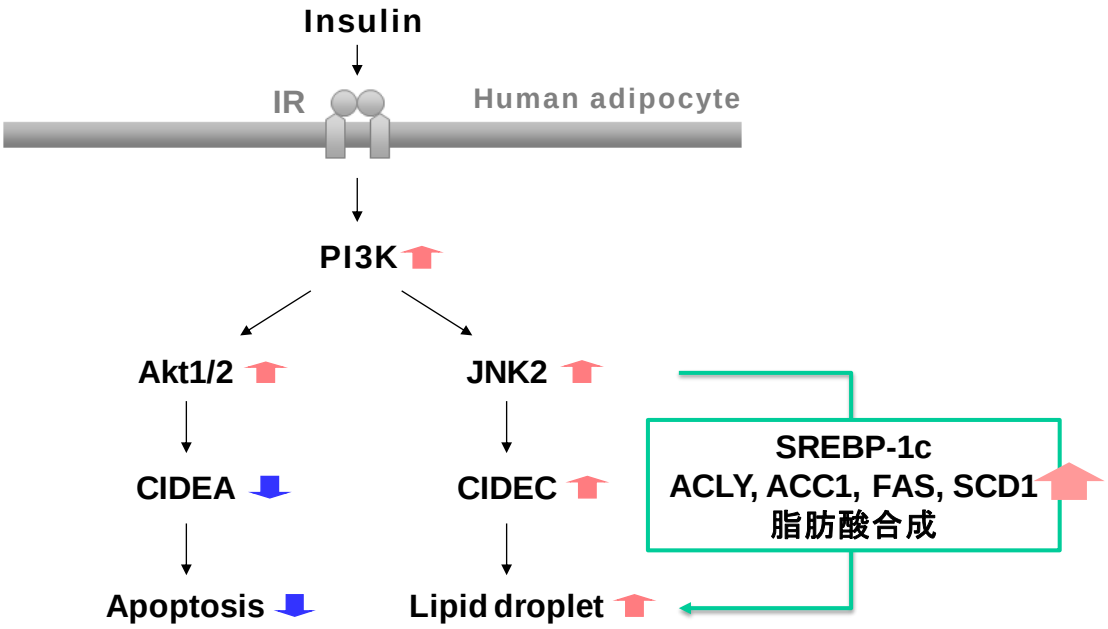

Fig. 27. ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる de novo 脂肪酸合成に関与する新規 JNK2/SREBP-1c 経路

27)。本章でのヒト白色脂肪細胞におけるインスリン/JNK2/SREBP-1c 経路の作用と類似して、H292 細胞では、JNK/SREBP-1 経路が Keratinocyte growth factor による脂肪酸合成関連酵素の発現誘導に関わることが報告されている(52)。

次に、SREBP-1 の活性は細胞内局在に依存すると考えられていることから(45)、SREBP-1 の細胞内局在変化を調べたところ、JNK2 はインスリンによる SREBP-1 プロセシング及び核内移行に関与することが明らかとなった(Fig. 25)。以上の結果から、JNK2 はインスリンによる SREBP-1 のプロセシング及び発現亢進の双方に関与することが示された。SREBP-1 のプロセシング及び発現制御メカニズムに関する更なる知見を得るため、JNK2 と SREBP-1 の相互作用を調べたところ、JNK2 はインスリンに反応して、pre-SREBP-1 と相互作用することが判明した(Fig. 26)。これまでのヒト細胞を用いた報告

から、n-SREBP-1 は SREBP-1c 遺伝子プロモーター上に存在する SRE を介したオートレギュレーションの機構により、自身の発現を調節することが報告されている(53)。このことから、SREBP-1 プロセシングの亢進は核内の n-SREBP-1 タンパク質量を増加させ、その結果、SREBP-1c の発現を亢進させることが考えられる。また、インスリンはラット肝細胞において pre-SREBP-1c のリン酸化を促進することにより、SREBP-1c のプロセシングを亢進させることや(54)、ERK、JNK 及び p38 MAPK が SREBP-1a をリン酸化することが報告されている(55)。以上の知見から、JNK2 は SREBP-1a 或いは SREBP-1c の活性を直接刺激し、そのプロセシング及び核内移行を亢進させることにより、インスリンによる SREBP-1c の発現制御に寄与することが推測された(Fig. 28)。

前章では、JNK2 はインスリンによる CIDEC の発現亢進及び脂肪滴の肥大化に関わることを示した(42)。本章では、JNK2 はインスリンによる SREBP-1c の発現亢進及び脂肪酸合成の亢進に関わることを示した。そこで、転写因子 SREBP-1 が CIDEC の発現制御に関与するかどうかを調べたところ、siRNA による SREBP-1 の発現抑制はインスリンによる CIDEC の発現亢進に影響しなかった(data not shown)。このことから、SREBP-1 は CIDEC の発現制御に関与しないことが示唆された。CIDEC の安定化はトリグリセリド合成及び脂肪滴形成と関連することが報告されている(56)。従って、JNK2 による脂肪滴サイズの制御は、少なくとも部分的には SREBP-1c による de novo 脂肪酸合成とそれに付随する CIDEC の発現制御により調節されていると推定される。また、JNK2/SREBP-1c 経路の de novo 脂肪酸合成に対する寄与は部分的であったことから、JNK2 による脂肪滴サイズの制御は、他の脂肪生成経路も関与している可能性が推察される。

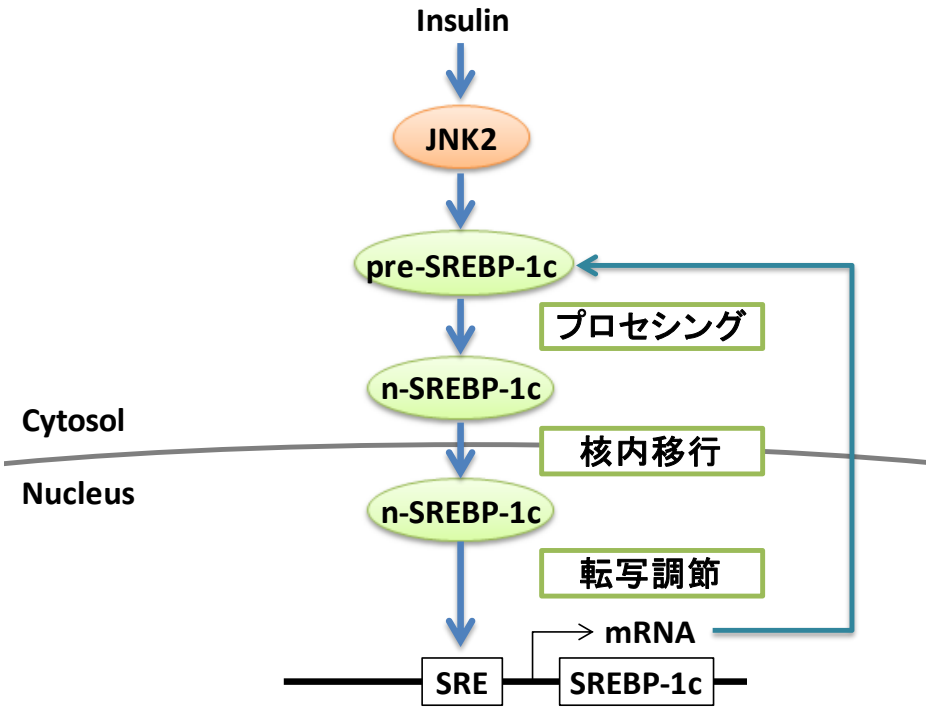

Fig. 28. ヒト白色脂肪細胞における JNK2 による SREBP-1c の発現制御メカニズムの仮説

４．小括

1) ヒト白色脂肪細胞において、インスリン/JNK2 経路は脂質代謝関連遺伝子の発現を主に制御する。

2) インスリン/JNK2 経路の新規制御遺伝子として SREBP-1c が見出された。

3) JNK2/SREBP-1c 経路はインスリンによる脂肪酸合成の亢進に関与する。これは脂肪滴サイズの増大メカニズムの一部と考えられる。

総括

第 2 章では、ヒト白色脂肪細胞におけるインスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御を同定し、インスリンのアポトーシス抑制作用には CIDEA の発現低下が、脂肪滴形成作用には CIDEC の発現亢進がそれぞれ選択的に関与することを明らかにした(32)。第 3 章では、インスリンによる CIDEA 及び CIDEC の発現制御に関わるシグナル経路は PI3K 下流で分岐しており、CIDEA の発現制御は Akt1/2、CIDEC の発現制御は JNK2 を介することを明らかにした(42)。さらに、インスリン/Akt1/2 経路はアポトーシスに関与し、インスリン/JNK2 経路は脂肪滴形成に関与することを明らかにした。第 4 章では、インスリン/JNK2 経路は脂質代謝関連遺伝子の発現を主に制御することを明らかにし、注目すべき新規制御遺伝子として、SREBP-1c が見出された(57)。さらに、JNK2/SREBP-1c 経路はインスリンによる脂肪酸合成の亢進に関与することが明らかとなった。

本研究では、インスリンによるヒト白色脂肪細胞の数の増加（アポトーシスの抑制）と脂肪細胞の肥大化（脂肪滴形成、サイズの増大）に CIDEA と CIDEC が選択的に関与し、その発現制御は PI3K 以降のシグナルで分岐し、それぞれ Akt1/2、JNK2 を介することが明らかとなった(Fig. 29)。また、本研究でヒト白色脂肪細胞においてインスリンによる肥大化（サイズの増大）に関わる特異的な経路として JNK2/CIDEC 並びに JNK2/SREBP-1c が見出された。肥満及びその後の関連疾患の予防・治療においては、言うまでもなく食事・運動療法がベースとなり余剰エネルギーを作らないことが重要である。しかし一方で、数のシグナルとは分岐した肥大化特異的シグナルのみを選択的に阻害するという手法ができれば、慢性炎症を惹起する悪性脂肪細胞を良性脂肪細胞へと質的に変化させ、肥満関連疾患の予防または治療に役立てることができるかもしれない。本知見からの創薬への展望

として、今後、JNK2 の阻害剤または SREBP-1c の発現抑制剤の開発が期待される。

今後は本研究を in vivo へと発展させ、より生理的な条件下におけるインスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構を調べる必要がある。現在のところ、本研究においてヒト白色脂肪細胞で観察された現象が、他の動物種由来の脂肪細胞でも観察されるかどうかは不明である。そのため、まずマウス或いはラットなどの初代培養脂肪細胞を用いて、ヒト白色脂肪細胞と同様の現象が観察される動物種を同定することが必要と考えられる。その上で、それら動物種における遺伝子ノックアウト、ノックダウン或いはキナーゼ特異的阻害剤などの手法を用いて、in vivo におけるインスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構を調査することが必要となるであろう。

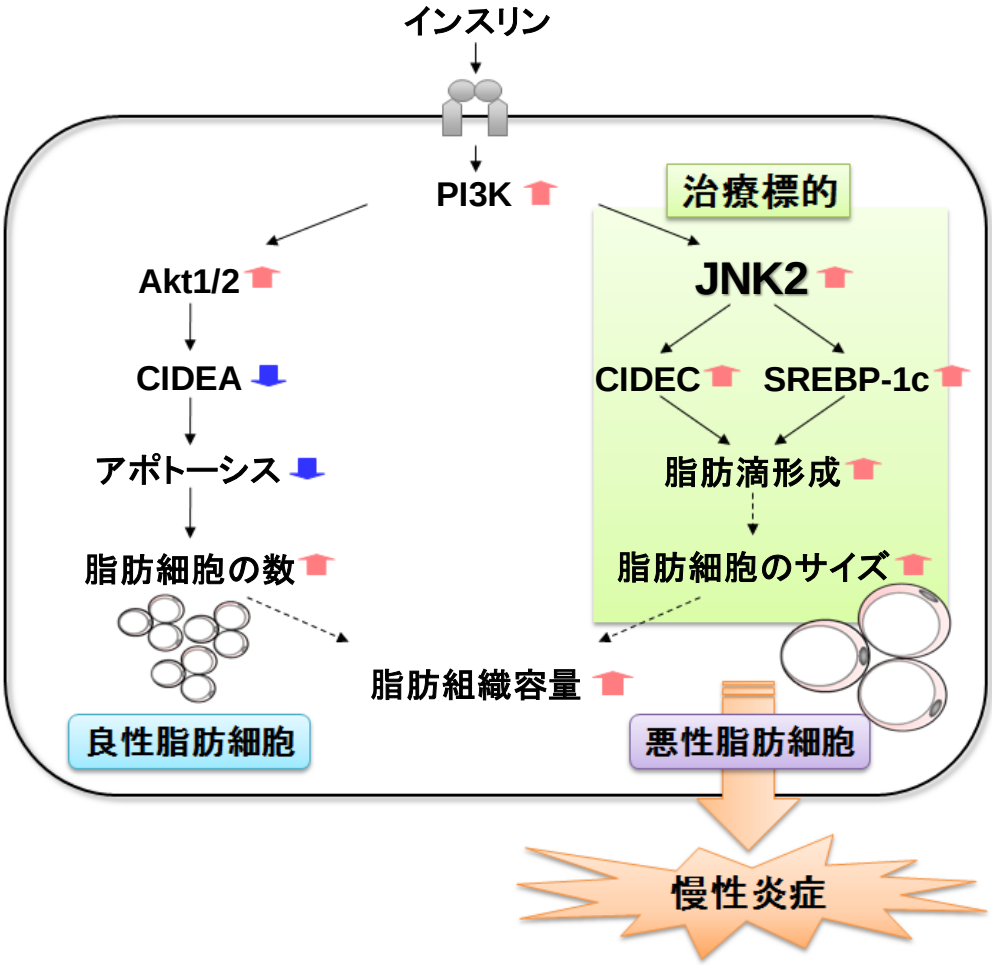

Fig. 29. インスリンによる脂肪細胞の数とサイズの制御機構の仮説

参考文献

1. Haslam D. W.,James W. P., *Lancet*, **366**, 1197-1209 (2005)
2. Hirsch J.,Batchelor B., *Clin Endocrinol Metab.*, **5**, 299-311 (1976)
3. Sakai T., Sakaue H., Nakamura T., Okada M., Matsuki Y., Watanabe E., Hiramatsu R., Nakayama K., Nakayama K. I.,Kasuga M., *J Biol Chem.*, **282**, 2038-2046 (2007)
4. Guilherme A., Virbasius J. V., Puri V.,Czech M. P., *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 367-377 (2008)
5. Urso B., Niesler C. U., O'Rahilly S.,Siddle K., *Cell Signal*, **13**, 279-285 (2001)
6. Kersten S., *EMBO Rep*, **2**, 282-286 (2001)
7. Zhou Z., Yon Toh S., Chen Z., Guo K., Ng C. P., Ponniah S., Lin S. C., Hong W.,Li P., *Nat Genet.*, **35**, 49-56 (2003)
8. Gummesson A., Jernas M., Svensson P. A., Larsson I., Glad C. A., Schele E., Gripeteg L., Sjoholm K., Lystig T. C., Sjostrom L., Carlsson B., Fagerberg B.,Carlsson L. M., *J Clin Endocrinol Metab.*, **92**, 4759-4765 (2007)
9. Li J. Z., Ye J., Xue B., Qi J., Zhang J., Zhou Z., Li Q., Wen Z.,Li P., *Diabetes.*, **56**, 2523-2532 (2007)
10. Inohara N., Koseki T., Chen S., Wu X.,Nunez G., *EMBO J.*, **17**, 2526-2533 (1998)
11. Keller P., Petrie J. T., De Rose P., Gerin I., Wright W. S., Chiang S. H., Nielsen A. R., Fischer C. P., Pedersen B. K.,Macdougald O. A., *J Biol Chem.*, **283**, 14355-14365 (2008)
12. Kim J. Y., Liu K., Zhou S., Tillison K., Wu Y.,Smas C. M., *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **294**, E654-667 (2008)
13. Liang L., Zhao M., Xu Z., Yokoyama K. K.,Li T., *Biochem J.*, **370**, 195-203 (2003)
14. Omae N., Ito M., Hase S., Nagasawa M., Ishiyama J., Ide T.,Murakami K., *Mol Cell*

Endocrinol, **348**, 297-304 (2012)

15. Gong J., Sun Z.,Li P., *Curr Opin Lipidol*, **20**, 121-126 (2009)
16. Dahlman I., Kaaman M., Jiao H., Kere J., Laakso M.,Arner P., *Diabetes.*, **54**, 3032-3034 (2005)
17. Zhang L., Miyaki K., Nakayama T.,Muramatsu M., *Metabolism.*, **57**, 502-505 (2008)
18. Rubio-Cabezas O., Puri V., Murano I., Saudek V., Semple R. K., Dash S., Hyden C. S., Bottomley W., Vigouroux C., Magre J., Raymond-Barker P., Murgatroyd P. R., Chawla A., Skepper J. N., Chatterjee V. K., Suliman S., Patch A. M., Agarwal A. K., Garg A., Barroso I., Cinti S., Czech M. P., Argente J., O'Rahilly S., Savage D. B.,Consortium L. D. S., *EMBO Mol Med*, **1**, 280-287 (2009)
19. Yonezawa T., Haga S., Kobayashi Y., Katoh K.,Obara Y., *Biochem Biophys Res Commun*, **384**, 535-539 (2009)
20. Qi J., Gong J., Zhao T., Zhao J., Lam P., Ye J., Li J. Z., Wu J., Zhou H. M.,Li P., *EMBO J*, **27**, 1537-1548 (2008)
21. Valouskova E., Smolkova K., Santorova J., Jezek P.,Modriansky M., *Gen Physiol Biophys*, **27**, 92-100 (2008)
22. Hallberg M., Morganstein D. L., Kiskinis E., Shah K., Kralli A., Dilworth S. M., White R., Parker M. G.,Christian M., *Mol Cell Biol*, **28**, 6785-6795 (2008)
23. Puri V., Konda S., Ranjit S., Aouadi M., Chawla A., Chouinard M., Chakladar A.,Czech M. P., *J Biol Chem.*, **282**, 34213-34218 (2007)
24. Puri V., Ranjit S., Konda S., Nicoloro S. M., Straubhaar J., Chawla A., Chouinard M., Lin C., Burkart A., Corvera S., Perugini R. A.,Czech M. P., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**, 7833-7838 (2008)
25. Nordstrom E. A., Ryden M., Backlund E. C., Dahlman I., Kaaman M., Blomqvist L.,

Cannon B., Nedergaard J.,Arner P., *Diabetes.,* **54**, 1726-1734 (2005)

26. Tseng Y. H., Ueki K., Kriauciunas K. M.,Kahn C. R., *J Biol Chem.,* **277**, 31601-31611 (2002)
27. Urso B., Niesler C. U., O'Rahilly S.,Siddle K., *Cell Signal.,* **13**, 279-285 (2001)
28. Qian H., Hausman D. B., Compton M. M., Martin R. J., Della-Fera M. A., Hartzell D. L.,Baile C. A., *Biochem Biophys Res Commun.,* **284**, 1176-1183 (2001)
29. Kahn B. B.,Flier J. S., *J Clin Invest.,* **106**, 473-481 (2000)
30. Kersten S., *EMBO Rep.,* **2**, 282-286 (2001)
31. Bluher M., Michael M. D., Peroni O. D., Ueki K., Carter N., Kahn B. B.,Kahn C. R., *Dev Cell.,* **3**, 25-38 (2002)
32. Ito M., Nagasawa M., Hara T., Ide T.,Murakami K., *J Lipid Res,* **51**, 1676-1684 (2010)
33. Yang L., Dan H. C., Sun M., Liu Q., Sun X. M., Feldman R. I., Hamilton A. D., Polokoff M., Nicosia S. V., Herlyn M., Sebti S. M.,Cheng J. Q., *Cancer Res,* **64**, 4394-4399 (2004)
34. Davis R. J., *Cell,* **103**, 239-252 (2000)
35. Kim J. Y., Liu K., Zhou S., Tillison K., Wu Y.,Smas C. M., *Am J Physiol Endocrinol Metab,* **294**, E654-667 (2008)
36. Juntilla M. M., Wofford J. A., Birnbaum M. J., Rathmell J. C.,Koretzky G. A., *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104**, 12105-12110 (2007)
37. Grimard V., Massier J., Richter D., Schwudke D., Kalaidzidis Y., Fava E., Hermetter A.,Thiele C., *J Lipid Res,* **49**, 2427-2440 (2008)
38. Tuncman G., Hirosumi J., Solinas G., Chang L., Karin M.,Hotamisligil G. S., *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103**, 10741-10746 (2006)

39. Taniguchi C. M., Emanuelli B.,Kahn C. R., *Nat Rev Mol Cell Biol,* **7**, 85-96 (2006)

40. Desbois-Mouthon C., Blivet-Van Eggelpoel M. J., Auclair M., Cherqui G., Capeau J.,Caron M., *Biochem Biophys Res Commun,* **243**, 765-770 (1998)

41. Lee Y. H., Giraud J., Davis R. J.,White M. F., *J Biol Chem,* **278**, 2896-2902 (2003)

42. Ito M., Nagasawa M., Omae N., Ide T., Akasaka Y.,Murakami K., *Journal of lipid research,* **52**, 1450-1460 (2011)

43. Brown M. S.,Goldstein J. L., *Cell,* **89**, 331-340 (1997)

44. Foufelle F.,Ferre P., *The Biochemical journal,* **366**, 377-391 (2002)

45. Taghibiglou C., Martin H. G., Lai T. W., Cho T., Prasad S., Kojic L., Lu J., Liu Y., Lo E., Zhang S., Wu J. Z., Li Y. P., Wen Y. H., Imm J. H., Cynader M. S.,Wang Y. T., *Nature medicine,* **15**, 1399-1406 (2009)

46. Ide T., Shimano H., Yahagi N., Matsuzaka T., Nakakuki M., Yamamoto T., Nakagawa Y., Takahashi A., Suzuki H., Sone H., Toyoshima H., Fukamizu A.,Yamada N., *Nat Cell Biol,* **6**, 351-357 (2004)

47. Wong R. H.,Sul H. S., *Current opinion in pharmacology,* **10**, 684-691 (2010)

48. Fleischmann M.,Iynedjian P. B., *The Biochemical journal,* **349**, 13-17 (2000)

49. Yamamoto T., Shimano H., Inoue N., Nakagawa Y., Matsuzaka T., Takahashi A., Yahagi N., Sone H., Suzuki H., Toyoshima H.,Yamada N., *The Journal of biological chemistry,* **282**, 11687-11695 (2007)

50. Yamamoto T., Watanabe K., Inoue N., Nakagawa Y., Ishigaki N., Matsuzaka T., Takeuchi Y., Kobayashi K., Yatoh S., Takahashi A., Suzuki H., Yahagi N., Gotoda T., Yamada N.,Shimano H., *Journal of lipid research,* **51**, 1859-1870 (2010)

51. Yellaturu C. R., Deng X., Park E. A., Raghow R.,Elam M. B., *The Journal of biological chemistry,* **284**, 31726-31734 (2009)

52. Chang Y., Wang J., Lu X., Thewke D. P.,Mason R. J., *Journal of lipid research,* **46**, 2624-2635 (2005)

53. Dif N., Euthine V., Gonnet E., Laville M., Vidal H.,Lefai E., *The Biochemical journal,* **400**, 179-188 (2006)

54. Yellaturu C. R., Deng X., Cagen L. M., Wilcox H. G., Mansbach C. M., 2nd, Siddiqi S. A., Park E. A., Raghow R.,Elam M. B., *J Biol Chem,* **284**, 7518-7532 (2009)

55. Kotzka J., Knebel B., Haas J., Kremer L., Jacob S., Hartwig S., Nitzgen U.,Muller-Wieland D., *PloS one,* **7**, e32609 (2012)

56. Nian Z., Sun Z., Yu L., Toh S. Y., Sang J.,Li P., *J Biol Chem,* **285**, 9604-9615 (2010)

57. Ito M., Nagasawa M., Omae N., Tsunoda M., Ishiyama J., Ide T., Akasaka Y.,Murakami K., *J Lipid Res,* **54**, 1531-1540 (2013)

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御懇意なるご指導、御鞭撻を賜りました明治薬科大学生化学教室教授　本島　清人　博士に深甚なる感謝の意を表します。

また、有益な御助言とご指導を賜りました明治薬科大学衛生化学教室教授　石井　一行　博士、生体分子学教室教授　長浜　正巳　博士に深く感謝申し上げます。

本研究に際し、多大な御支援と発表の機会を頂きましたキョーリン製薬ホールディングス株式会社　山下 正弘　社長、杏林製薬株式会社　宮下 三朝社長に深甚なる感謝の意を表します。

また、多大の御支援と御指導を賜りました杏林製薬株式会社新薬創製センター長　村上　浩二　博士、薬理第一研究部　主任研究員　永澤　道明博士、薬理第一研究部長　井出　智広　博士、薬理第二研究部長　石山　順一　博士、薬理第一研究部　薬理一研究グループ　赤坂　ゆにけ　課長、薬理第一研究部　薬理二研究グループ　栗山　和彦　課長に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、多くの薬理研究部の皆様に、御助言、補佐をしていただき深く感謝いたします。

最後に本論文作成にあたり、かげながら応援、支えてくださいました両親、妻に感謝いたします。

主論文目録

1. Differential roles of CIDEA and CIDEC in insulin-induced anti-apoptosis and lipid droplet formation in human adipocytes.

   Ito M., Nagasawa M., Hara T., Ide T., Murakami K., *J Lipid Res*., **51**, 1676-1684 (2010).

2. Differential regulation of CIDEA and CIDEC expression by insulin via Akt1/2- and JNK2-dependent pathways in human adipocytes.

   Ito M., Nagasawa M., Omae N., Ide T., Akasaka Y., Murakami K., *J Lipid Res.*, **52**, 1450-1460 (2011).

3. A novel JNK2/SREBP-1c pathway involved in insulin-induced fatty acid synthesis in human adipocytes.

   Ito M., Nagasawa M., Omae N., Tsunoda M., Ishiyama J., Ide T., Akasaka Y., Murakami K., *J Lipid Res.*, **54**, 1531-1540 (2013).

参考論文

1. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons.

   Taniura H., Ito M., Sanada N., Kuramoto N., Ohno Y., Nakamichi N., Yoneda Y., *J Neurosci Res.*, **83**, 1179-1189 (2006).

2. Unsaturated FAs prevent palmitate-induced LOX-1 induction via inhibition of ER stress in macrophages.

   Ishiyama J., Taguchi R., Akasaka Y., Shibata S., Ito M., Nagasawa M., Murakami K., *J Lipid Res.*, **52**, 299-307 (2011).

3. Suppression of FoxO1/cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (Cidea) axis protects mouse beta-cells against palmitic acid-induced apoptosis.

   Omae N., Ito M., Hase S., Nagasawa M., Ishiyama J., Ide T., Murakami K., *Mol Cell Endocrinol.*, **348**, 297-304 (2012).

4. 脂肪細胞における CIDE タンパクの役割.

   伊藤　実, 永澤　道明, *細胞*, 11 月号, 24-27 (2012 年).

主査及び副査名

明治薬科大学大学院薬学研究科における論文博士審査では、下記の先生方に主査及び副査をしていただいた。

主査　明治薬科大学教授　本島　清人　博士

副査　明治薬科大学教授　石井　一行　博士

副査　明治薬科大学教授　長浜　正巳　博士